Studien zur Allergenität der heimischen Leguminosen

Gartenerbse (*Pisum sativum* L.) und Gartenbohne (*Phaseolus vulgaris* L.)

DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereiches Chemie
- Abteilung Lebensmittelchemie -
der Universität Hamburg

vorgelegt von

Marco Sell
aus Husum

Hamburg 2004

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von April 2000 bis März 2003 unter Anleitung von Prof. Dr. Dr. H. Steinhart am Institut für Biochemie und Lebensmittelchemie, Abteilung Lebensmittelchemie, der Universität Hamburg angefertigt.

Phantasie ist wichtiger als Wissen,
denn Wissen ist begrenzt.

Albert Einstein (1879-1955)

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

Tag der mündlichen Prüfung: 29.01.04

Danksagungen

Herrn Prof. Dr. Dr. H. Steinhart und Frau Dr. A. Paschke danke ich für die Überlassung des Themas, der Bereitstellung geeigneter Rahmenbedingungen zur Durchführung der Arbeit und der Betreuung dieser Arbeit.

Für die bereitwillige Übernahme des Koreferats danke ich Herrn Prof. Dr. B. Bisping.

Ein besonderer Dank gilt Birgit Fuchslocher, Larsen Schütte und Bianca Stavenow, die mit ihrer engagierten Unterstützung zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Insbesondere möchte ich Frau Bettina Jacobsen für die gute Zusammenarbeit und die experimentelle Hilfe danken.

Für die Hilfsbereitschaft und Zusammenarbeit bei der Rekrutierung der Patienten sowie der Blutentnahme danke ich allen Mitarbeitern der Hautklink des Universitätskrankenhauses Hamburg-Eppendorf.

Ein ganz besonderer Dank für die großartige Zusammenarbeit und die daraus resultierende abwechslungsreiche Promotionszeit gilt allen Kollegen, insbesondere Katy Zunker, Silke Schubert, Michael Wigotzki und Sonja Hoppe.

Für die vielfältige Unterstützung während meiner gesamten Studien- und Promotionszeit, speziell bei der Durchführung der Reifungsversuche, gilt ein sehr großer Dank meinen Eltern Gerda und Heinz Sell.

Abschließend danke ich meiner Frau Birte Sell, die immer an mich geglaubt hat, für mich da war und meine Launen ertragen hat sowie meinem Sohn Niklas Rune Sell, der mit einem Lächeln auch den größten Frust vergessen lässt.

Inhaltsverzeichnis

1 Grundlagen 1

1.1 Einleitung 1
1.2 Begriffsbestimmungen 2
1.3 Pathomechanismus der Soforttyp-Reaktion 5
1.4 Charakterisierung und Diagnostik echter Lebensmittelallergien 7
1.5 Allergien gegen Leguminosen 8
1.6 Verdauung 10
1.7 Einfluss technologischer Verfahren 11
1.8 Problemstellung 12
1.9 Arbeitsplan 13

2 Material 15

2.1 Leguminosen 15
2.1.1 Allgemeines 15
2.1.2 Gartenerbse (*Pisum sativum* L.) 17
2.1.3 Gartenbohne (*Phaseolus vulgaris* L.) 20
2.2 Patientenseren 22
2.3 Enzyme 22

3 Methoden 24

3.1 Übersicht 24
3.2 Proteinextraktionen 25
3.3 Trockenmassebestimmung 26
3.4 Gesamtstickstoffbestimmung 26
3.5 Proteingehaltsbestimmung 26
3.6 Sensorische Untersuchung 27
3.7 Enzymallergosorbent-Test (EAST) 27
3.8 EAST-Inhibition 28
3.9 Elektrophorese 28
3.10 Immunoblot (IB) 30
3.11 Proteinvisualisierung 32
3.12 Gelpermeationschromatographie (GPC) 33
3.13 N-terminale Sequenzanalyse 34

4 Ergebnisse 35

4.1 Gartenerbse 35
4.1.1 Charakterisierung der Gartenerbsenallergene 35
4.1.2 Reifungseinfluss 38
4.1.3 Sortenvergleich 42
4.1.4 Untersuchung von Handelsprodukten 44
4.1.5 Lagerung 47
4.1.6 Trocknung 49
4.1.7 Autoklavierung 53
4.1.8 Mikrowellenbehandlung 56
4.1.9 In-vitro-Verdauung 58
4.1.10 Allergenisolierung 62

4.2 Gartenbohne 68
4.2.1 Charakterisierung der Gartenbohnenallergene 68
4.2.2 Reifungseinfluss 71
4.2.3 Sortenvergleich 75
4.2.4 Untersuchung von Handelsprodukten 77
4.2.5 Lagerung 79
4.2.6 Trocknung 82
4.2.7 Autoklavierung 84
4.2.8 Mikrowellenbehandlung 88
4.2.9 In-vitro-Verdauung 90

5 Diskussion 93
5.1 Allergencharakterisierung 93
5.2 Reifungseinflüsse 97
5.3 Sortenvergleich 99
5.4 Technologische Verarbeitung 100
5.5 In-vitro-Verdauung 105
5.6 Ausblick 108

6 Zusammenfassung/Summary 110

7 Anhang 114
7.1 Gewinnung der Patientenseren 114
7.2 Charakterisierung der Patientenseren 114
7.3 Proteinextraktionen 116
7.4 Trockenmassebestimmung 118
7.5 Gesamtstickstoffbestimmung 119
7.6 Proteingehaltsbestimmung 120
7.7 Enzymallergosorbent-Test (EAST) 127
7.8 EAST-Inhibition 131
7.9 Elektrophorese 150
7.10 Semidry-Blotting 153
7.11 Immunfärbung 155
7.12 Proteinvisualisierung 157
7.13 Gelpermeationschromatographie 161
7.14 Dialyse 162
7.15 N-terminale Sequenzanalyse 162
7.16 Chemikalien, Geräte, Verbrauchsmittel, Zubehör 162

8 Literatur 165

Abkürzungsverzeichnis

AC	Affinitätschromatographie
AgF	Silberfärbung
AM	Gartenerbsensorte „Allerfrüheste Mai“
AP	alkalische Phosphatase
Ara h 1	Hauptallergen der Erdnuss (*Arachis hypogaea* L.)
AS	Aminosäure
ASU	Amtliche Sammlungen von Untersuchungsverfahren
AuF	Goldfärbung
AV	Autoklavierungsversuch
AZP	antigenpräsentierende Zelle
B	Gartenbohne
BBF	Brilliant-Black-Färbung
BSA	Rinderserumalbumin
CAPS	(3-Cyclohexyl-amino)-1-Propansulfonsäure
Car	Carboxypeptidase A
CBBF	Coomassie-Brilliant-Blue-Färbung
DBPCFC	doppeltblinder, placebokontrollierter Expositionstest
Chy	Chymotrypsin
DKB	Dosenkonservenbohnen
DKE	Dosenkonservenerbsen
DONS	Dioctylnatriumsulfosuccinat
DV	Darmverdauung
E	Gartenerbse
EACA	6-Aminohexansäure
EAST	Enzymallergosorbent-Test
EE	Elektroelution
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
EU	Europäische Union
FAB	fragment antigen binding
FC	fragment crystallin
FE	Fraktionierte Extraktion
Gad c 1	Hauptallergen des Kabeljaus
GKB	Glaskonservenbohnen
GKE	Glaskonservenerbsen
GPC	Gelpermeationschromatographie
HPLC	Hochleistungsflüssigkeits-Chromatographie
HRP	Meerrettichperoxidase
IB	Immunoblot
IEC	Ionenaustauschchromatographie
IEF	Isoelektrische Fokussierung

IF	Immunfärbung
Ig	Immunoglobulin (Klasse A, D, M, G, E)
IVE	In-vitro-Verdauungsextraktion
K	Kontrollserum
kat	Katal
KR	Gartenerbsensorte „Kleine Rheinländerin“
KW	Kochwasser
LMA	Lebensmittelallergie
LMBG	Lebensmittel und Bedarfsgegenständegesetz
LPT	Lipid-Transfer-Proteine
LV	Lagerungsversuch
MA	Gartenerbsensorte „Maxigolt“
Ma	Gartenbohnensorte „Maxi“
MES	2-(N-morpholino)ethansulfonsäure
MG	Molekulargewicht
MGM	Molekulargewichtsmarker
MHC	major histocompatibility complex
Mo	Gartenbohnensorte „Montano“
MV	Magenverdauung
MW	Mikrowellenbehandlung
N	nativ
NC	Nitrocellulose
NN	Normalnull
NSB	nicht spezifische Bindung
nZ	nach Zubereitung
oV	ohne Verarbeitung
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Pan	Pankreatin
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
Pen a 1	Hauptallergen des Shrimps (*Penaeus aztecus* L.)
Pep	Pepsin
pI	Isoelektrischer Punkt
pIM	pI-Marker
PNPP	p-Nitrophenylphosphat
PR	pathogenisis-related
Pro	Proteinase K
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RAST	Radioallergosorbent-Test
Ribo	Ribonuclease A
RP	reversed phase
RPC	Umkehrphasenchromatographie
RS	Reifungsstufe
RT	Raumtemperatur

SDS	Natriumdodecylsulfat
SL	Stammlösung
SP	Gartenerbsensorte „Sprinter”
TA	Totalamidkonzentration
TB	Trockenspeisebohnen
TE	Trockenspeiseerbsen
TKB	Tiefkühlbohnen
TKE	Tiefkühlerbsen
TM	Trockenmasse
TMB	Tetramethylbenzidin
Try	Trypsin
TTBS	Tween-Tris gepufferte Salzlösung
TTE	Tieftemperaturextraktion
TV	Trocknungsversuch
U	Unit
UKE	Universitätskrankenhaus Hamburg-Eppendorf
UV	Ultraviolett
WHO	World Health Organisation
WK	Gartenerbsensorte „Wunder von Kelvedon”

1 Grundlagen

1.1 Einleitung

Vielen Menschen erscheint es als unbestreitbare Tatsache, dass die Nahrung die wir heute zu uns nehmen unter anderem durch den „dramatischen Anstieg“ der häufig als moderne Zivilisationskrankheit bezeichneten Lebensmittelallergie eine reale Bedrohung ihrer Gesundheit darstellt. Geschürt wird diese Angst durch eine Fülle von Presseberichten, in denen die Schätzungen über die Häufigkeit von Lebensmittelallergikern in der Bevölkerung teilweise bis zu 40 % betragen (SPREITZER, 1996).

Tatsächlich kann nach heutigem Erkenntnisstand die Vorstellung von der Lebensmittelallergie als moderne Zivilisationskrankheit eindeutig widerlegt werden, da bereits die Ärzte *Hippokrates* (500 v. Chr.) und *Galen* (200 n. Chr.) über Fälle von Unverträglichkeitsreaktionen nach Nahrungsaufnahme berichteten, bei denen es sich nach heutigem Wissensstand um allergische Reaktionen gehandelt hat (CRESPO et al., 1995; KREFT et al., 1995). Auch die Vermutung, dass in den vergangenen Jahren der Anteil der Lebensmittelallergiker in der westlichen Bevölkerung einen sprunghaften Anstieg zu verzeichnen hatte, erscheint höchst unwahrscheinlich. Vielmehr werden durch den leichtfertigen Umgang mit dem Begriff Allergie, sowohl in der Bevölkerung als auch in der Ärzteschaft, nicht selten neben toxischen Reaktionen und spezifischen Intoleranzreaktionen auch pseudoallergische Reaktionen fälschlicherweise den Lebensmittelallergien zugerechnet (VIETHS et al., 1992a).
Begründet ist diese mangelnde Abgrenzung zu den grundsätzlich unterschiedlichen Lebensmittelunverträglichkeitsreaktionen in der überaus aufwendigen Diagnostik. Die individuell verlaufenden Krankheitsbilder in Folge einer Lebensmittelallergie zeichnen sich durch die vielfältige Manifestation der klinischen Symptome aus, welche überwiegend an der Haut, den Schleimhäuten sowie dem Respirations- und Gastrointestinaltrakt auftreten. Weiterhin kann es zum Auftreten von zeitlich verzögerten Symptomen wie Diarrhoe oder Urticaria sowie zu anaphylaktischen Reaktionen kommen (RING 1989; SAMPSON, 1992; HEFLE, 1996; WÜTHRICH, 1996).
Unter Berücksichtigung der durch regional unterschiedliche Ernährungsgewohnheiten und variierende genetische Disposition zustande kommenden Abweichungen in der Häufigkeit von Lebensmittelallergien ergibt sich eine Prävalenz bei Erwachsenen von 0.3 bis 2.4 % (WÜTHRICH, 1993; NIESTIJL JANSEN et al., 1994; YOUNG et al., 1994; CASTILLO et al., 1996; CHANDRA, 1997) und bei Kindern von 1.3 bis 8.0 % (BURKS & SAMPSON, 1993; WÜTHRICH, 1993; CHANDRA, 1997; HILL et al., 1997).

Leguminosen stellen aufgrund ihres hohen Eiweißgehaltes und ihrer geringen Produktionskosten einerseits wichtige Nahrungsmittel dar, sind andererseits jedoch häufig Auslöser allergischer Reaktionen. Während in Bezug auf das allergene Potenzial der Vertreter Soja und Erdnuss zahlreiche Untersuchungen vorliegen, besteht bei anderen Arten, wie der Gartenerbse und -bohne, noch großer Forschungsbedarf (VIETHS et al., 1994a; MARTINEZ SAN IRENEO et al., 2000).

1.2 Begriffsbestimmungen

Obwohl bereits im antiken Griechenland über Fälle von Unverträglichkeitsreaktionen nach Nahrungsaufnahme berichtet wird, verwendete erstmals der Wiener Kinderarzt VON PIRQUET (1906) in einer Publikation den vom griechischen Wort „allonergon“ abstammenden Begriff **Allergie**. Die damalige Definition der „...spezifisch veränderten Reaktionsfähigkeit des Organismus...“ wird heute nach RING (1988) als „...spezifische Änderung der Immunitätslage im Sinne einer krankmachenden Überempfindlichkeit...“ weiter differenziert. Die Vorraussetzung für die Entstehung einer stets dosisunabhängigen Allergie ist der Kontakt des Organismus mit einem Allergen und nach einer Sensibilisierungsphase die Bildung spezifischer Antikörper oder spezifisch sensibilisierter Immunzellen gegen das Allergen.

Die **echte Lebensmittelallergie** (**LMA**) wird nach heutigem Kenntnisstand als nicht-toxische immunvermittelte Überempfindlichkeitsreaktion im Sinne einer Soforttyp (Typ I)-Reaktion klassifiziert und ist somit eindeutig von den nicht-immunvermittelten Lebensmittelintoleranzen abzugrenzen. Die spezifische Interaktion zwischen den Allergenen und dem Immunsystem in Form einer Antigen-Antikörper-Reaktion lässt sich dabei als fehlgesteuerte Überreaktion der körpereigenen Immunabwehr auf natürliche, nicht toxische Lebensmittelinhaltsstoffe verstehen (WÜTHRICH, 1996). Ein vom *Subcommittee on Adverse Reactions to Food* der *European Academy of Allergology and Clinical Immunology* erarbeitetes Positionspapier stellt eine mögliche Einteilung (siehe Abb. 1.1) der zahlreichen Unverträglichkeitsreaktionen durch Lebensmittel vor (BRUIJNZEEL-KOOMEN et al., 1995).

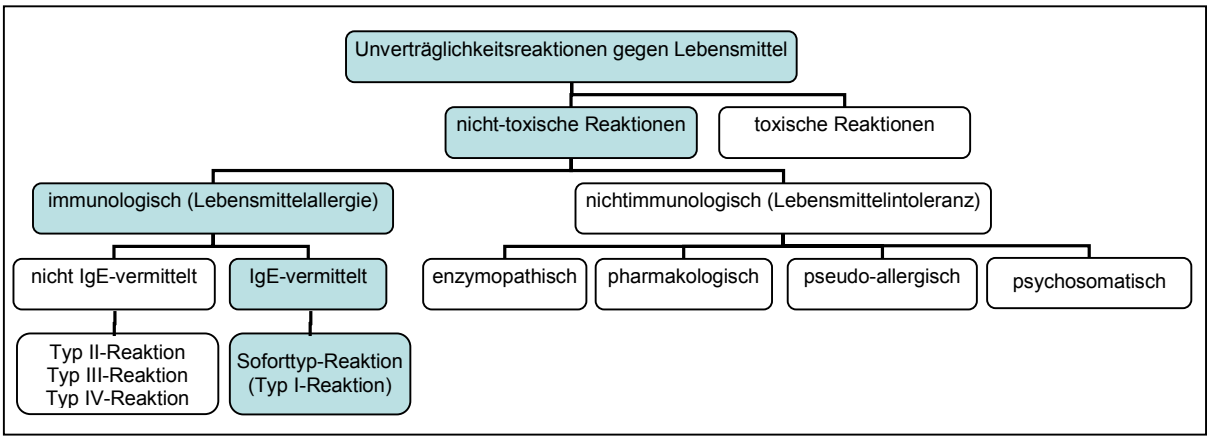


Abb. 1.1: Klassifizierung der Unverträglichkeitsreaktionen gegen Lebensmittel

Eine zentrale Funktion bei der Soforttyp-Reaktion kommt dem **Antikörper** (**IgE**) zu. Hierbei handelt es sich um vom sensibilisierten Körper in differenzierten Plasmazellen produzierte Proteine, welche zur Erkennung sowie Inhibierung und Eliminierung von Antigenen sezerniert werden. Sie befinden sich als Rezeptormoleküle sowohl auf Zelloberflächen als auch in den Körperflüssigkeiten. Somit können erhöhte IgE-Gehalte im Serum als Hinweis auf eine atopische Erkrankung angesehen werden (KELLER, 1987; KAY, 1997).

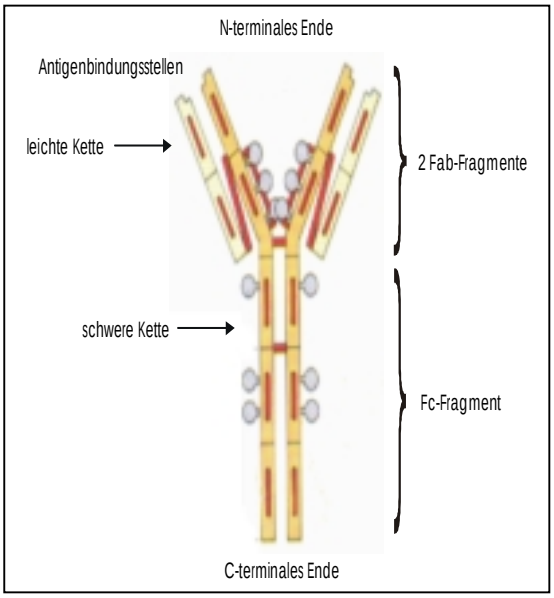


Abb. 1.2: Aufbau eines Antikörpers

Die jedem der insgesamt fünf Ig-Isoformen des menschlichen Organismus zugrunde liegende Struktureinheit (siehe Abb. 1.2) umfasst vier Polypeptidketten, wobei je zwei identische schwere und leichte Ketten vorliegen. Durch Ausbildung von intramolekularen Disulfidbrücken kommt es zum einen zur Stabilisierung der Ketten untereinander, zum anderen führen sie auch zur Bildung von Kettenschlaufen, die wesentlich zur dreidimensionalen „Y"-Struktur des Moleküls beitragen. Diese gut gegeneinander abgegrenzten Bereiche werden als Domänen bezeichnet und sind Träger mehrerer Oligosaccharide. Eine Unterscheidung der einzelnen Isoformen voneinander ist in Bezug auf das Molekulargewicht, die Ladung, die Aminosäuresequenz, den Kohlenhydratanteil sowie ihrer Funktion möglich.

Die kurzen „Fab"-Fragmente (fragment antigen binding) tragen je zwei variable und konstante Domänen, wobei die Spezifität der Antikörper zu Antigenen in der differierenden Aminosäuresequenz der variablen Domäne, welche auch als **Paratop** bezeichnet wird, begründet liegt. Durch eine für jeden der fünf Ig-Isoformen unveränderliche Sequenz der „Fc"-Fragmente (fragment crystallin) wird die Funktionalität des Antikörpers bestimmt. Im Gegensatz zu den Isoformen IgG, IgM, IgA und IgD weist das IgE fünf anstelle vier konstanter Domänen in diesem Bereich auf (SUTTON & GOULD, 1993; MEKORI, 1996; STAINES et al., 1997).

Der Begriff **Antigen** bezeichnet körperfremde Substanzen, die über die Aktivierung von B-Lymphozyten und der daraus folgenden Produktion spezifischer Antikörper bzw. direkt über eine Aktivierung der T-Lymphozyten eine spezifische Immunantwort induzieren können (REICH, 1993).

Allergene sind Antigene, die bei sensibilisierten Individuen die Produktion von spezifischen IgE-Antikörpern induzieren und dadurch eine allergische Reaktion hervorrufen können. Dabei handelt es sich um Proteine oder Glykoproteine mit einem Molekulargewicht (MG) von mindestens 4 kDa, wobei die untere Molekulargewichtsgrenze von der Notwendigkeit der Immunogenität bestimmt wird (AULEPP & VIETHS, 1992). Aber auch Peptide mit einer geringeren Molekularmasse können in der Lage sein eine Antikörperproduktion auszulösen. Dazu müssen diese sogenannten **Haptene** jedoch zuvor an ein Trägermolekül (Carrier) binden, welches ebenfalls ein Protein ist (TAYLOR et al., 1987; ROITT, 1993).
Die meisten **Lebensmittelallergene** weisen MG von 10 bis 70 kDa (SAMPSON, 1991; LEHRER et al., 1996) selten bis zu 100 kDa (AULEPP & VIETHS, 1992; AALBERSE, 2000) auf. Die allergene Potenz wird zum einen durch die Bewahrung der Immunogenität

im Verlauf des Verdauungsprozesses und zum anderen durch die Permeabilität gegenüber der intestinalen Mucosa bestimmt (TAYLOR, 1992).

Kommt es zur Kreuzvernetzung von gebundenen IgE-Molekülen infolge einer Antigen-Antikörper-Reaktion, so erfolgt die Auslösung der allergischen Reaktion. Hierzu muss das Allergen mindestens zwei spezifische, frei zugängliche Bindungsstellen aufweisen, die als **Epitope** bezeichnet werden. Eine strukturbedingte Einteilung dieser spezifischen Bindungsstellen unterscheidet **Sequenzepitope**, welche ausschließlich über die kontinuierliche Abfolge von bis zu 20 Aminosäuren (AS) charakterisiert sind, und **Konformationsepitope**, die im Gegensatz dazu über ihre räumliche Gestaltung in Form von Sekundär- und Tertiärstruktur determiniert sind (ELSAYED & STAVSENG, 1994; GLICK & PASTERNAK, 1995).

Lebensmittel weisen im allgemeinen eine Vielzahl von Allergenen auf, so dass hinsichtlich ihrer Relevanz eine Klassifizierung erfolgt. Dabei ist zur gesicherten Einteilung ein Patientenkollektiv von mehr als 50 Individuen nötig (GEHA, 1995). Bindet ein Allergen bei mehr als 50 % der getesteten Seren spezifisches IgE, so wird es als **Majorallergen** bezeichnet. Ein **Minorallergen** liegt vor, sofern weniger als 10 % des Patientenkollektivs eine positive Bindungsreaktion zeigen. **Intermediärallergene** sind in der Lage eine Sensibilisierung bei 10 bis 50 % der Patienten hervorzurufen (GEHA, 1995; VIETHS et al., 1996). Unterschiedliche Studien haben gezeigt, dass in diversen Lebensmitteln sogenannte **Isoallergene** mit gleichen MG und funktionellen Eigenschaften sowie einer Sequenzhomologie von mehr als 67 % vorliegen, die lediglich divergierende isoelektrische Punkte (pI) aufweisen. Da es sich hierbei fast ausschließlich um Majorallergene handelt, wird vermutet, dass diese Art der Variation eine Vorraussetzung für die Wirkung als Majorallergen darstellt, da hierdurch die Anzahl strukturell ähnlicher Epitope erhöht wird (THOMAS et al., 1998).

Von den bislang als Allergen identifizierten pflanzlichen Proteinen kann die Mehrzahl bezüglich ihrer Funktionalität als Speicherproteine oder Protease-Inhibitoren klassifiziert werden (LEHRER et al., 1996). Eine weitere Gruppe stellen die „**pathogenesis-related**“ (**PR**)-Proteine dar, die als Antwort auf einen Pathogenbefall der betreffenden Pflanze gebildet werden (BOWLES, 1990; STINITZ et al., 1993). Neuere Forschungen diskutieren weiterhin die **Lipid-Transfer-Proteine** (**LPT**) als potenzielle Allergene. Dabei handelt es sich um stabile, phylogenetisch hoch konservierte Proteine mit MG von 9 bis 10 kDa, deren Funktion in der Membran-Biogenese und der Pathogen-Abwehr begründet liegt (GACIA-OLMEDO et al., 1995; KADER, 1996; SANCHEZ-MONGE et al., 1999).

Die Reaktion eines Antikörpers mit strukturell verwandten Epitopen unterschiedlicher Allergene wird als **Kreuzreaktivität** bezeichnet. Die resultierenden Verknüpfungen erfolgen dabei meist mit geringerer Bindungskraft als Interaktionen zwischen voll spezifischen Reaktionspartnern (AULEPP & VIETHS, 1992). Ein besonderes Phänomen stellt dabei die von THIEL (1988) als „**pollenassoziierte Lebensmittelallergie**“ bezeichnete Kreuzreaktion zwischen Lebensmittel- und Pollenallergenen dar.

Als **versteckte Allergene** werden nach VIETHS et al. (1994a) für den Verbraucher nicht erkennbare allergieauslösende Lebensmittel bzw. -bestandteile, die in anderen Lebensmitteln enthalten sind, bezeichnet. Sie können Lebensmitteln entweder bei der Herstellung aus ernährungsphysiologischen oder technologischen Gründen zugesetzt werden oder als unerwünschte Kontaminanten in diesen auftreten. Dabei kommt pflanzlichen Bestandteilen, insbesondere aus Nüssen, Leguminosen und Gewürzen, aufgrund ihrer steigenden Verwendung in zusammengesetzten Lebensmitteln, der hohen Prävalenz der entsprechenden Allergien sowie der Stabilität und der hohen allergenen Potenz der Proteine die größte Bedeutung zu. In Bezug auf Gartenerbsen und -bohnen liegt die Problematik in dem häufigen Einsatz von diversen Verarbeitungsprodukten in unterschiedlichsten Lebensmitteln als konsistenzgebende Grundlage begründet. Nach § 6 Abs. 4 Nr. 1 in Verbindung mit Anlage 1 der Lebensmittelkennzeichnungs-Verordnung (LEBENSMITTELRECHT: LMKV, 1998) müssen diese Zutaten lediglich mit dem Namen ihrer Klasse angegeben werden, wobei der Klassenname „Pflanzeneiweißerzeugnis“ für den betroffenen Allergiker keine eindeutige Zuordnungs-Möglichkeit darstellt. Eine Änderung der rechtlichen Grundlagen innerhalb der Europäischen Union (EU) wird jedoch in Kürze erwartet.

1.3 Pathomechanismus der Soforttyp-Reaktion

Die von COOMBS & GELL (1963) getroffene Einteilung der immunologischen Überempfindlichkeit in vier unterschiedliche Reaktionstypen besitzt noch heute Gültigkeit, wobei diese Klassifizierung als eine vereinfachte Darstellung angesehen wird, da im allgemeinen eine Überschneidung der Mechanismen der Immunantwort vorliegt.

Neben der IgE-vermittelten Soforttyp-Reaktion (Typ I) werden weiterhin die antikörperabhängige zytotoxische Überempfindlichkeit (Typ II) und die Immunkomplexreaktion (Typ III) unterschieden, die ebenfalls antikörpervermittelt ablaufen, allerdings auf die Ig-Klassen G bzw. M zurückgeführt werden. Die Kontaktallergie (Typ IV) hingegen wird in erster Linie durch T-Zellen und Makrophagen vermittelt. Nach SPREITZER (1996) verlaufen 90 % aller LMA als Soforttyp-Reaktion.

Dem Ausbruch einer allergischen Soforttyp-Reaktion geht eine Sensibilisierung des Immunsystems gegen das betreffende Allergen voraus. Während dieser Phase, die Tage bis Jahre dauern kann, treten noch keine klinischen Symptome auf. Nach erneutem Kontakt des sensibilisierten Organismus mit dem Allergen kommt es zu einer sekundenschnellen allergischen Reaktion mit unterschiedlichen klinischen Symptomen (ROTH et al., 1988; HELBING, 1994). Die Abbildung 1.3 zeigt den Mechanismus der Soforttyp-Reaktion.

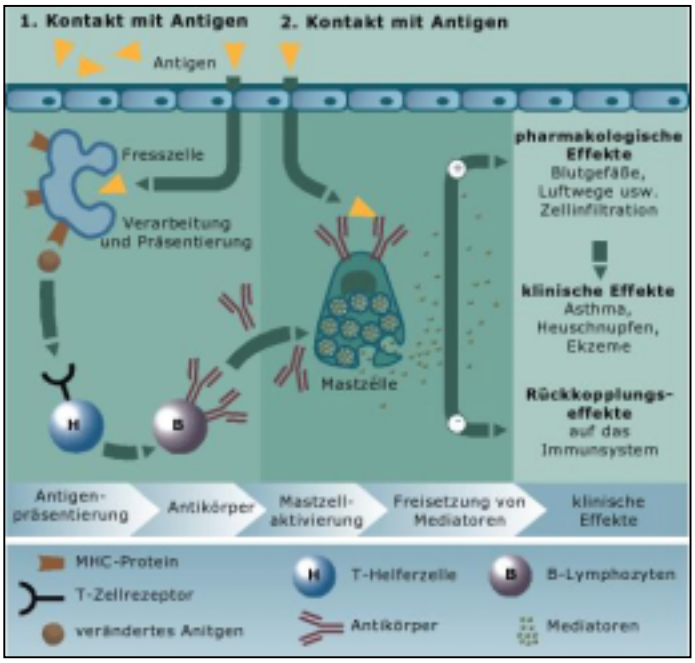


Abb. 1.3: Schematische Darstellung des Mechanismus der Soforttyp-Reaktion (BROCKHAUS, 2001)

Die Sensibilisierungsphase wird durch den Eintritt eines Antigens in den Körper initiiert. Eine Fresszelle (Makrophage), welche als antigenpräsentierende Zelle (AZP) wirkt, nimmt das Antigen auf und spaltet es enzymatisch in kleinere Fragmente. Diese werden anschliessend an der Oberfläche eines MHC-Proteins (major histocompatibility complex) gebunden und liegen somit als T-Zellepitope vor. Wird das T-Zellepitop durch den auf der Oberfläche einer T-Helferzelle lokalisierten T-Zellrezeptor erkannt, so kommt es zur Aktivierung der T-Helferzellen. Diese T-Helferzellen schütten Lymphokine, wie beispielsweise Interleukin 4 oder γ-Interferon, aus, die als Vermittlerstoffe fungieren und die Differenzierung von spezifischen B-Lymphozyten, die zuvor ebenfalls das Antigen erkannt haben, zu Plasmazellen bewirken. Als Konsequenz daraus werden von diesen Zellen IgE-Antikörper sezerniert, wobei die einmal begonnene IgE-Produktion über Monate anhält. Aufgrund ihrer Molekülstruktur sind die IgE-Antikörper in der Lage sich über einen langen Zeitraum an die hochaffinen IgE-Rezeptoren der Mastzellen und der basophilen Granulozyten zu binden (KELLER, 1987; ENGELHARD, 1994; STAINES et al., 1997).

In der zweiten Phase der Soforttyp-Reaktion bindet das Antigen an das Paratop eines IgE-Moleküls, welches sowohl frei zirkulierend im Blut als auch gebunden an der Oberfläche von Mastzellen oder basophilen Granulozyten vorliegen kann. Werden zwei zellständige IgE-Moleküle durch ein Antigen überbrückt (bridging), nähern sich zwei an der Zelloberfläche lokalisierte IgE-Rezeptoren gegenseitig an und es erfolgt eine Deformation der Zelloberfläche der Mastzelle, die zu einer Aktivierung der Enzyme auf der Zellmembran und als Konsequenz daraus zur Exozytose führt. Es werden präformierte Mediatoren wie Histamin und Serotonin ausgeschüttet. Dieser als Degranulation bezeichnete Vorgang kommt durch die Fusion der Granula mit der Plasmamembran zustande, worauf die Inhaltsstoffe der Granula aus der Zelle entladen werden. Diese ausgeschütteten Mediatoren führen schließlich zur Ausbildung der zahlreichen klinischen Symptome (KELLER, 1987; STAINES et al., 1997).

1.4 Charakterisierung und Diagnostik echter Lebensmittelallergien

Die LMA als spezifische Überempfindlichkeit auf Lebensmittel tritt als dosisunabhängige Reaktion häufig bei genetisch disponierten Menschen auf, wobei der Krankheitsverlauf stark variiert. In Folge dessen führt nicht jede Sensibilisierung zur Manifestation klinischer Symptome. Weiterhin beeinflussen die regionalen Ernährungsgewohnheiten die Prävalenz erheblich, so dass im nationalen Vergleich sehr unterschiedliche Lebensmittel als Hauptauslöser einer LMA angegeben werden. Als wichtige, allergische Reaktionen induzierende Lebensmittel sind Hühnerei, Fisch, Leguminosen, Kuhmilch und Nüsse zu nennen (WÜTHRICH, 1996; HAYAKAWA et al., 1999).

Die auf der Mastzellenaktivierung beruhenden Entzündungsreaktionen zeigen sich in zwei Phasen überwiegend an den sogenannten „Grenzflächen zur Umwelt“, worunter neben der Haut, den Schleimhäuten und den Atemwegen auch der Gastrointestinaltrakt verstanden wird (THIEL, 1985). Durch die Sofortreaktion, welche bereits Sekunden nach der Nahrungsaufnahme durch die Aktivität von Histamin, Prostaglandinen und anderen bereits vorhandenen Molekülen beginnt, kommt es zur schnellen Erhöhung der Gefäßdurchlässigkeit, zur Kontraktion der glatten Muskulatur, zur Verengung der Bronchien, zu juckreizlokalen Entzündungen oder sogar zu anaphylaktischen Reaktionen. Im Gegensatz dazu entwickelt sich die Spätreaktion erst nach 8 bis 12 Stunden durch eine in den aktivierten Mastzellen induzierten Synthese von Mediatoren, wie z. B. Leukotrienen. Als Symptome manifestieren sich in Folge dessen Ödeme, Gewebeschwellungen, gesteigerte Bronchial-Mukusproduktion oder eine erhöhte Reaktivität der Bronchialmuskulatur (NACLERIO & BAROODY, 1998).

Der für die Diagnose einer echten LMA zu leistende Aufwand ist enorm, wobei nicht nur die Vielzahl der betroffenen Organe und die dadurch bedingte Variation der Symptome eine entscheidende Rolle spielen, sondern auch die große Anzahl von potenziellen Allergenen und die regional unterschiedlichen Ernährungsgewohnheiten (AULEPP & VIETHS, 1992; HILL et al., 1999). Zu Beginn der Diagnostik erfolgt eine umfassende Anamnese, die durch das Führen eines Beschwerdetagebuches ergänzt werden kann, um den Zusammenhang zwischen der Lebensmittelexposition und den klinischen Symptomen zu ermitteln. Im weiteren Verlauf werden dann sowohl unterschiedlich angelegte Hauttests mit Allergenextrakten oder frischen Lebensmitteln (Prick-, Scratch-, Intrakutan- oder Epikutantest) als auch Eliminationsdiäten durchgeführt. Zur Verifizierung von positiven Hauttests wird dem Probanden mittels offener und oraler Provokationstests das potenzielle Allergen dargeboten. Führt die Provokation zu positiven Befunden wird abschließend ein doppeltblinder, placebo-kontrollierter Expositionstest (DBPCFC) durchgeführt, der zur Zeit als einziger akzeptierter Nachweis einer gesicherten LMA gilt. Diese In-vivo-Untersuchungen werden durch In-vitro-Tests, welche den erhöhten Gehalt an spezifischem IgE (Radio-, Enzym- bzw. Fluoroenzymallergosorbenttest) oder an Mediatorsubstanzen (Histaminfreisetzung bzw. Leukotrientest) im Blut detektieren, ergänzt (BRUIJNZEEL-KOOMEN et al., 1995; WÜTHRICH & SCHMID-GRENDELMEIER, 1995; RING et al., 2001).

1.5 Allergien gegen Leguminosen

1.5.1 Allgemeines

Allergische Reaktionen gegen Leguminosen sind weit verbreitet, wobei es sich im allgemeinen jedoch nicht um eine Gruppensensibilisierung, sondern um Reaktionen auf einzelne Vertreter dieser Pflanzenfamilie handelt (LEMANSKE & TAYLOR, 1987). Über die Häufigkeit einer Allergie gegen die Samen der betreffenden Pflanzen berichten HOFER & WÜTHRICH (1985), dass von 402 Patienten mit einer gesicherten LMA insgesamt 3.3 % auf Gartenbohne, 1.5 % auf Erdnüsse, 1.0 % auf Soja und 0.8 % auf Gartenerbsen reagieren. CRESPO et al. (1995) beschreiben das Auftreten einer LMA gegen Leguminosen bei einer Anzahl von 355 Patienten sogar mit insgesamt 18.9 %. In unterschiedlichen Studien (BARNETT et al., 1987; BERNHISEL-BROADBENT et al., 1989) können serologische Kreuzallergenitäten zwischen Extrakten von Soja, Erdnuss, Gartenerbse und Gartenbohne nachgewiesen werden.

Die Proteine der Leguminosen werden entsprechend ihrer Löslichkeit in drei Fraktionen unterteilt. Neben den wasserlöslichen Albuminen und den wasserunlöslichen Glutelinen kann die quantitativ wichtigste salzlösliche Globulinfraktion abgetrennt werden. Diese Fraktion kann durch Ultrazentrifugation wiederum in die in allen Leguminosen vorkommenden Hauptkomponenten Vicilin (Sedimentationskoeffizient 7S) und Legumin (11S) unterschieden werden. Einzelne Legumine werden unter Bezug auf ihre Herkunft gesondert benannt (MALLEY et al., 1975; VIOQUE et al., 1999).

1.5.2 Gartenerbse (*Pisum sativum* L.)

Sowohl durch das Auftreten von Kreuzreaktionen innerhalb der Familie der Leguminosen als auch durch den vielseitigen Einsatz der Samen, wie zum Beispiel zur Herstellung von Eintopf, Brei oder als Suppengrundlage, kommt der Gartenerbse eine bedeutende Rolle als Lebensmittelallergen zu (BERNHISEL-BROADBENT et al.,1989; IBANEZ et al., 1997). Das Gartenerbsenprotein, welches 6.6 % des Samens ausmacht, beinhaltet als wichtigste Proteinfraktionen Albumine, Globuline und Gluteline.

Untersuchungen zur Allergenität der Gartenerbse wurden erstmals von MALLEY et al. (1975) publiziert. Nach Proteintrennung konnte die gesamte allergene Aktivität in der Albumin-Fraktion nachgewiesen werden. Die Legumin- und Vicelin-Fraktion reagierten im Hauttest negativ. Im Gegensatz dazu haben BERNHISEL-BROADBENT et al. (1989) in allen isolierten Fraktionen spezifische Antigenbindungen nachgewiesen. Da die Albumin-Fraktion bei Menschen, die empfindlich auf Soja reagieren, aber keine klinische Sensitivität gegen Gartenerbsen besitzen, positive Hauttests erzeugt, lässt sich schlussfolgern, dass die allergene Determinante, welche von der Albumin-Fraktion ausgebildet wird, auch bei anderen Leguminosen auftritt (MALLEY et al., 1975).

Die Gartenerbse zeigt verschiedene IgE-bindende Proteine im MG-Bereich von 14 bis 70 kDa (BERNHISEL-BROADBENT et al.,1989). Im niedermolekularen Bereich liegen keine Allergene vor, jedoch konnten MALLEY et al. (1976) ein 1.8 kDa-Glykoprotein mit Hapten-ähnlichen Eigenschaften identifizieren.

Nach MALLEY et al. (1975) steigt der Albumingehalt und damit parallel die allergene Aktivität der Gartenerbse im Verlauf der Reifung an. So besitzen nur reife Gartenerbsen ein deutliches allergenes Potenzial. Gegen thermische Einflüsse sind die Gartenerbsenallergene sehr resistent. So bleibt nach MALLEY et al. (1975) die allergene Aktivität der Albumin-Fraktion bei 30-minütigem Erhitzen auf 60 °C bzw. 5-minütigem Kochen stabil und wird selbst durch Autoklavieren bei 120 °C für 15 min nur teilweise zerstört. Die Einflüsse durch tiefe Temperaturen sowie Untersuchungen zum Einfluss der Proteinverdauung auf die Gartenerbsenallergene wurden bisher nicht durchgeführt.

1.5.3 Gartenbohne (*Phaseolus vulgaris* L.)

Echte LMA gegen Gartenbohnen treten ebenso wie Gartenerbsenallergien gegenüber Erdnuss- und Sojaallergien deutlich zurück, in der Literatur wird jedoch darüber berichtet (IGEA et al., 1994; ZACHARISEN & KURUP, 1998; DAROCA et al., 2000). Ebenso wie bei der Gartenerbse erhöht sich die Bedeutung jedoch durch die Häufigkeit von Kreuzreaktionen zu anderen Leguminosen und dem weit verbreiteten Einsatz in der Lebensmittelindustrie (BERNHISEL-BROADBENT et al., 1989; IBANEZ et al., 1997). So kommt es nach IGEA et al. (1994) sowohl durch Kontakt mit rohen Gartenbohnen während der Speisenzubereitung zu Kontaktallergien, als auch durch Inhalation der Kochdämpfe zu respiratorischen Reaktionen. Der Kontakt mit gekochten Gartenbohnen sowie die orale Aufnahme blieb in diesen Studien dagegen ohne Reaktionen. Da exakte Angaben zu den Parametern der durchgeführten Untersuchungen fehlen, ist eine spezielle Aussage über die Veränderung der Allergenität durch thermische Einflüsse sowohl in Bezug auf Erhitzung als auch durch Tiefgefrierlagerung nicht möglich.

Studien zur Abhängigkeit der Allergenität vom Reifegrad der Gartenbohne bzw. zur Verteilung der Allergene in unterschiedlichen Proteinfraktionen wurden bisher nicht durchgeführt. Die Untersuchungen von BARNETT et al. (1987) zeigen das Auftreten einer Vielzahl von Gartenbohnenproteinen bzw. -allergenen im MG-Bereich < 14 bis 72 kDa. Bestätigung finden diese Ergebnisse in Untersuchungen von ZACHARISEN & KURUP (1998), die ebenfalls eine Vielzahl an Proteinbanden im Bereich von 14 bis 97 kDa identifizieren konnten, wobei IgE-Bindungen insbesondere im Bereich von 60 bis 68 kDa zu verzeichnen sind. Im Gegensatz dazu zeigen von BERNHISEL-BROADBENT ET AL. (1989) durchgeführte Immunoblot-Untersuchungen allergene Proteine mit MG < 14 bis > 66 kDa, wobei eine verstärkte Fähigkeit zur IgE-Bindung im Bereich von 31 bis 58 kDa zu verzeichnen ist. Auch im Fall der Gartenbohne liegen in Bezug auf Verdauungsvorgänge bisher keine Untersuchungen vor.

1.6 Verdauung

Die vom menschlichen Körper aufgenommene Nahrung kann in der ihm angebotenen Form nicht absorbiert werden, da Makromoleküle die Zellbarrieren, welche sich zwischen dem Darmlumen und der Blutbahn befinden, nicht passieren können. Die Aufgabe des Gastrointestinaltraktes besteht somit darin, die aufgenommene Nahrung in absorbierbare Bestandteile abzubauen, damit eine Aufnahme ermöglicht wird. In der Nahrung enthaltene Makromoleküle werden dabei zunächst beim Kauen im Mund mechanisch zerkleinert. Anschliessend erfolgt durch die Säure des Magensaftes die Denaturierung der globulären Proteine, wodurch die Hydrolyse durch die in den verschiedenen Verdauungssäften des Gastrointestinaltraktes enthaltenen spezifisch spaltenden Enzyme ermöglicht wird, und schließlich die Absorption der zuvor gebildeten Monomere durch aktive Transportvorgänge über die Darmmucosa in das Blut oder die Lymphe (LÖFFLER, 1983; SCHMIDT & THEWS, 1995).

Die Spaltung von Proteinen und Peptiden erfolgt dabei durch unterschiedliche Proteasen und Peptidasen. Im Magen (Gaster) kommt es durch Pepsin, einer bevorzugt am aminoterminalen Ende aromatischer Aminosäuren angreifenden Endopeptidase, zur Spaltung von etwa 10 % aller Peptidbindungen eines Proteins innerhalb der Verweildauer des Chymus von bis zu 3 Stunden. Im sich anschließenden Dünndarm (Intestinum tenue) in dem der Nahrungsbrei in etwa neutralem Milieu 4 bis 6 Stunden verweilt, erfolgt unter Einwirkung verschiedener Endo- und Exopeptidasen der weitere Proteinabbau sowie die Absorption der gebildeten Bruchstücke. Im letzten Abschnitt des Verdauungsvorgangs werden im Dickdarm (Colon) vom Organismus nicht aufgenommene Substanzen hauptsächlich durch Wasserentzug eingedickt. Enzymatische Aktivitäten sind auf die Wirkungsweise der aus Darmbakterien stammenden Proteasen beschränkt (LÖFFLER, 1983; SCHMIDT & THEWS, 1995).

Vorraussetzung zur Sensibilisierung des menschlichen Immunsystems nach der Nahrungsaufnahme ist das Vorhandensein von Proteinfragmenten mit intakten Epitopen bei Eintritt des Chymus in den Dünndarm bei gleichzeitiger Permeabilität der Darmmucosa. Zur Überprüfung der Anwesenheit allergen wirkender Nahrungsbestandteile nach zuvor erfolgter enzymatischer Behandlung wurden verschiedene In-vitro-Verdauungsstudien mit unterschiedlichen Lebensmitteln und verschiedenen Enzymkombinationen durchgeführt. Die bisher untersuchten Lebensmittelallergene zeigen dabei kein einheitliches Verhalten (KORTEKANGAS-SAVOLAINEN et al., 1993; VIETHS et al., 1999; BURKS et al., 1999; WIGOTZKI, 2001).

1.7 Einfluss technologischer Verfahren

Die technologische Verarbeitung von Lebensmitteln stellt eine erhebliche Beeinflussung der enthaltenen Proteine dar, welche ebenfalls eine Veränderung der Allergenität hervorrufen kann. Es kann durch mögliche Denaturierungen zur Veränderung der Konformation oder zum Abbau von Proteinen kommen. Hieraus kann sich einerseits eine Verminderung der Allergenität durch Zerstörung bzw. sterische Hinderung von zuvor vorhandenen Epitopen ergeben. Andererseits kann auch eine Erhöhung des allergenen Potenzials durch Ausbildung neuer Epitope in Folge räumlicher Änderungen der Proteinstruktur bzw. durch Freilegung zuvor schwer zugänglicher Bereiche resultieren (VIETHS et al., 1994b). Neben der thermischen Behandlung als wichtigstem technologischen Verfahren haben die Lagerung, der Einfluss von Enzymen und mechanische Energie Bedeutung. Des weiteren können Bestrahlung, gentechnische Veränderungen sowie Schutz- und Starterkulturen einen Einfluss auf das allergene Potenzial eines Lebensmittels ausüben (VIETHS et al., 1994b).

Einen Schwerpunkt sowohl in der technologischen Verarbeitung als auch der küchentechnischen Zubereitung stellt die thermische Behandlung dar. Neben den gängigen lebensmitteltechnologischen Verfahren Blanchieren, Pasteurisieren, Autoklavieren, Trocknen, Rösten oder Extrudieren führen auch Verfahren wie Mikrowellenerhitzung oder Kochen zur Denaturierung von Proteinen, in deren Folge Veränderungen der Epitopstrukturen auftreten können. Dabei weisen die Allergene zahlreicher tierischer aber auch einiger pflanzlicher Lebensmittel eine hohe Hitzestabilität auf (VIETHS et al., 1994b).
So sind sowohl Kaseine und β-Lactoglobulin als dominierende Kuhmilchallergene, als auch die wichtigen Hühnereiweißallergene Ovomucoid und Ovalbumin eher unempfindlich gegen thermische Einflüsse (TAYLOR et al., 1987; MATSUDA & NAKAMURA, 1993). Gleiches gilt für die Hauptallergene des Kabeljaus (Gad c 1) und von Shrimps (Pen a 1) (ELSAYED et al., 1991; DAUL et al., 1994). Aber auch wichtige Allergene pflanzlicher Lebensmittel, wie beispielsweise ein Hauptallergen der Erdnuss (Ara h 1), unterschiedliche Allergene der Sojabohne und der Gartenerbse, zeigen selbst nach hoher thermischer Belastung noch ein erhebliches allergenes Restpotenzial (MALLEY et al., 1975; SHIBASAKI et al., 1980; MOROZ & YANG, 1980; BURKS et al., 1991 & 1995). Als Gemeinsamkeit weisen alle diese Allergene eine gute Wasserlöslichkeit, eine physiologische Funktion bzw. eine Speicherfunktion sowie hohe Stabilitäten gegen andere technologische Einflüsse auf (VIETHS et al., 1997).
Selbst ein Anstieg der Allergenität durch Neubildung von Epitopen konnte durch MATSUDA et al. (1987 & 1992) durch Bildung von Maillard-Produkten aus β-Lactoglobulin und Lactose nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu weisen Allergene von frischen Früchten im allgemeinen eine geringere Hitzestabilität auf (HAYAKAWA et al., 1999; WIGOTZKI, 2001). Als Grund für die Veränderung der Allergenität durch thermische Behandlung wird dabei die Induktion nicht-enzymatischer Bräunungsreaktionen als wichtigste Folgereaktion angesehen (VIETHS et al., 1997).

Liegen über die Beeinflussung der Allergenität durch Erhitzung in unterschiedlichen Variationen zahlreiche Studien vor, gibt es in Bezug auf die Lagerung bei niedrigen Temperaturen nur wenige Untersuchungen. So beschreiben HSIEH et al. (1995) die zunehmende Aktivität des Hauptallergens des Apfels während der Kühllagerung. Dagegen kommt es bei Pekanüssen nach vierwöchiger Lagerung bei 30 °C zur Bildung von bisher nicht vorhandenen Allergenen (MALANIN et al., 1995). Diese Allergenitätszunahmen werden von MONERET-VAUTRIN (1998) auf die Synthese von Stressproteinen zurückgeführt. Auch bei Tomaten kommt es während der Lagerung zum Anstieg der Allergenität, jedoch wird dieser Effekt wiederum auf die Bildung von Maillard-Produkten während der Reifung zurückgeführt (BLEUMINK et al., 1967).
Der Einfluss von mechanischer Energie auf Lebensmittel kann durch unterschiedliche technologische Verarbeitungsschritte erfolgen. So kommt es unter anderem bei der Homogeniserung von flüssigen Lebensmitteln oder bei mechanischer Zerkleinerung fester Lebensmittel zur Entfaltung von Scherkräften, welche zur Oberflächendenaturierung oder zur Ausbildung von Proteinaggregationen führen können. In Folge dieses Einflusses kommt es zur Neuausrichtung von Proteinmolekülen, zu Disulfidaustauschreaktionen oder zur Bildung von Proteinnetzwerken, wodurch das allergene Potenzial eines Lebensmittels erheblich beeinflusst werden kann (VIETHS et al., 1994b). Durch Einweichen von Reiskörnern für 24 Stunden bei 37 °C in Gegenwart eines proteolytischen Enzyms konnte beispielsweise die Allergenität nahezu vollständig abgebaut werden (HAYAKAWA et al., 1999). Die Laugenschälung bei Pfirsichen und die Ultrafiltration des Saftes ergeben nach BRENNA et al. (2000) sogar einen hypoallergenen, klaren Pfirsichsaft bzw. -nektar. Der Einsatz von Enzymen während der Herstellung von Lebensmitteln führt zu Strukturveränderungen, die nach VIETHS et al. (1994b) sowohl eine Zu- als auch eine Abnahme des allergenen Potenzials hervorrufen können.

1.8 Problemstellung

Eine Grundvoraussetzung für eine verbesserte Diagnostik bzw. Therapie einer echten Lebensmittelallergie ist die Identifizierung und molekulare Charakterisierung der relevanten Lebensmittelallergene (BHALLA et al., 2001; KONAN & VIQUES, 2002). Zusammengefasst sind die Ergebnisse von bisher etwa 200 als Allergen identifizierten Proteinen in der Datenbank der World Health Organisation (WHO), die neben der Herkunft der Allergene auch die Primärstruktur sowie die biochemischen und immunologischen Eigenschaften dokumentiert. Darunter befinden sich nur wenige pflanzliche Allergene, wobei Angaben zu Allergenen der Gartenerbse bzw. -bohne gänzlich fehlen (WHO, 2003). Zahlreiche Studien über verschiedene Allergene belegen übereinstimmend eine starke Abhängigkeit des allergenen Potenzials von unterschiedlichen technologischen Einflüssen. Auch hier fehlen noch ausführliche Untersuchungen in Bezug auf die Gartenerbse und -bohne (VIETHS et al., 1994b).

Die zur Familie der Leguminosen gehörenden Vertreter Gartenerbse (*Pisum sativum* L.) und Gartenbohne (*Phaseolus vulgaris* L.) haben in Bezug auf die Häufigkeit als Auslöser einer IgE-vermittelten Überempfindlichkeitsreaktion ebenso wie diese Pflanzenfamilie an sich eine regional sehr unterschiedliche Bedeutung. So stellen die Leguminosen beispielsweise in Indien mit einem Anteil von 54 % die häufigsten Auslöser einer Lebensmittelallergie dar (NIPHADKAR et al., 1992), haben für die australische Bevölkerung mit lediglich 2 % jedoch eine untergeordnete Bedeutung (HILL et al., 1999). Im europäischen Raum, insbesondere in mediterranen Gebieten, kommt sowohl den Leguminosen mit einer Häufigkeit von bis zu 20 % (CRESPO et al., 1995), als auch speziell der Gartenerbse mit 2.3 % bzw. der Gartenbohne mit 3.3 %, bezogen auf alle Allergiker, eine große Bedeutung zu (HOFER & WÜTHRICH, 1985). Begründet sind diese immensen Schwankungen durch die jeweilige Popularität der einzelnen botanischen Vertreter in den unterschiedlichen Regionen, sowie die variierende genetische Disposition zur Ausbildung einer Lebensmittelallergie.

1.9 Arbeitsplan

Um dieser Bedeutung der Gartenerbse und -bohne als Auslöser von echten Lebensmittelallergien nachzukommen, umfasst die vorliegende Arbeit neben der Charakterisierung der Allergene der Gartenerbse bzw. -bohne und der Untersuchung des Einflusses industriell häufig angewandter technologischer Verarbeitungsverfahren auch die Isolierung und anschließende Identifizierung einzelner Gartenerbsenallergene.

Nach Charakterisierung der Allergene der nativen Früchte erfolgt zunächst die Untersuchung verarbeiteter Handelsprodukte zur generellen Überprüfung des Einflusses der technologischen Verarbeitung auf die Allergenität. Anhand dieser Ergebnisse können lediglich grundsätzliche Aussagen über Allergenitätsveränderungen gemacht werden, da exakte Angaben über die einzelnen Prozessparameter fehlen. Folglich werden zusätzlich Untersuchungen zum Einfluss durch Tiefgefrierlagerung, Autoklavierung, Trocknung und Mikrowellenerhitzung im Labormaßstab durchgeführt. Ziel dieser Studien ist es, durch geeignete Kombination einzelner Prozessparameter eine größtmögliche Verminderung der Allergenität ohne Beeinflussung der sensorischen Eigenschaften zu ermitteln und damit sowohl der verarbeitenden Industrie im Rahmen der Produktion, als auch dem Verbraucher selbst in Bezug auf die küchentechnische Zubereitung die Möglichkeit zur Minimierung der Allergenität zu ermöglichen. Dabei werden die Untersuchungen zur Veränderung des allergenen Potenzials zunächst an die industrielle Produktionsweise angepasst. Darüber hinaus erfolgen die Untersuchungen unter Variation einzelner Prozessparameter, wobei eine Ausweitung in extreme Bereiche vollzogen wird, um die maximalen Allergenitätsminderungen ermitteln zu können.

Erstmals von MALLEY et al. (1975) publizierte Untersuchungen zur Allergenität der Gartenerbse konnten eine Abhängigkeit des allergenen Potenzials vom Reifegrad, sowie eine ungleichmäßige Verteilung der Allergene in unterschiedlichen Proteinfraktionen zeigen. Eine Überprüfung dieser von BERNHISEL-BROADBENT et al. (1989) nicht zu verifizierenden Ergebnisse soll anhand eines Freilandversuches in Form der Untersuchung der geernteten Früchte sowohl in Abhängigkeit vom Reifezustand als auch durch gleichzeitige Bestimmung der Allergenverteilung innerhalb der einzelnen Proteinfraktionen erfolgen. Anhand dieser Ergebnisse sowie der Untersuchung der Sortenabhängigkeit der Allergenität, die im Bereich vieler Lebensmittel einen großen Einfluss hat (HSIEH et al., 1995; SON et al., 1995), kann eine Vorauswahl der zur industriellen Verarbeitung eingesetzten Rohstoffe bezüglich der Allergenität stattfinden.

Zur Klärung inwieweit eine Sensibilisierung gegen Gartenerbse bzw. -bohne infolge der Absorption immunologisch aktiver Moleküle im Gastrointestinaltrakt möglich erscheint oder ob eine Sensibilisierung über die Inhalation von bei der Erhitzung entstehenden flüchtigen bisher nicht identifizierten Allergenen erfolgt, wie es bei den ebenfalls zur Familie der Leguminosen gehörenden Vertretern Linse und Kichererbse wiederholt beschrieben wird (MARTIN et al., 1992; VIETHS et al., 1994a; NIPHADKAR et al., 1997), erfolgt die Überprüfung der Stabilität der Allergene gegenüber einer In-vitro-Verdauung.

Zur molekularen Identifizierung einzelner Allergene, welche die Möglichkeit zur verbesserten Diagnostik bzw. Therapie einer echten Lebensmittelallergie ermöglichen kann, ist das Vorliegen der Allergene in reiner Form nötig. Deshalb werden unter Verwendung unterschiedlicher chromatographischer und elektrophoretischer Methoden ausgewählte Gartenerbsenallergene im mikropräparativen Maßstab isoliert und anschließend einer N-terminalen Sequenzierung unterworfen.

Die Untersuchungen zur Umsetzung aller Versuchsreihen zur Gartenerbse und -bohne erfolgen mittels etablierter elektrophoretischer Methoden wie der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und der Isoelektrischen Fokussierung (IEF) sowie der immunologischen Verfahren des Enzymallergosorbenttests (EAST), der EAST-Inhibition und des Immunoblots (IB).

2 Material

2.1 Leguminosen

2.1.1 Allgemeines

Der Begriff Leguminosen bezeichnet die reifen Samen von Pflanzen aus der Familie *Leguminosae*. Sie gehören zur Klasse der zweikeimblättrigen Bedecktsamer (*Dicotyledoneae, Angiospermae).* Gemein ist ihnen, dass die Früchte aus einem Fruchtblatt, welches mit sich selbst verwächst, bestehen und im allgemeinen mehrsamige Hülsen (lat.: *legumen*) darstellen. Im reifen Zustand platzen diese an der Bauch- und Rückenseite auf (HAHN & MICHAELSEN, 1996).
Die häufig auch als Hülsenfrüchte bezeichnet Leguminosen umfassen eine Vielzahl unterschiedlicher Pflanzen von großem kommerziellem Interesse, da viele Vertreter sowohl in der menschlichen und tierischen Ernährung, als auch in der pharmazeutischen und Textilindustrie Verwendung finden. Insgesamt sind über 14000 Arten in 600 Gattungen bekannt,. Die botanische Ordnung der *Fabales* unterteilt sich dabei in drei Familien, wobei den *Leguminosae* die größte Bedeutung zukommt. Einen Überblick über die Einteilung der *Leguminosae* gibt Abbildung 2.1 (FRANKE, 1997; MARTINEZ SAN IRENEO et al., 2000).

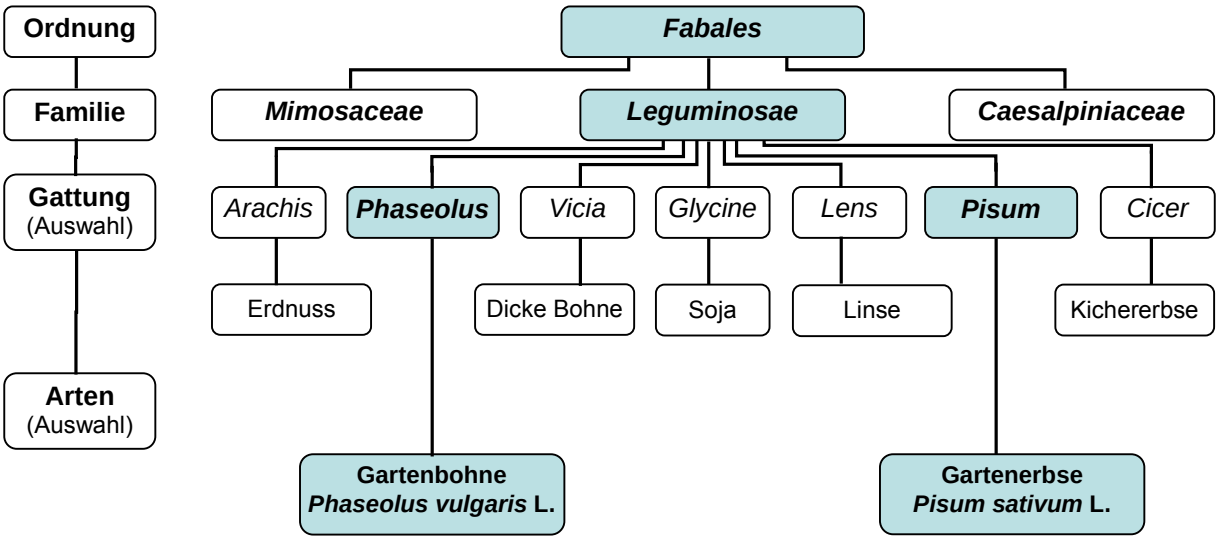


Abb. 2.1: Einteilung der *Leguminosae*

Zu den wirtschaftlich bedeutenden Leguminosen zählen neben der Sojabohne (*Glycine max* (L.) MERR.) und der Erdnuss (*Arachis hypogaea* L.) die Gartenerbse (*Pisum sativum* L.), die Gartenbohne (*Phaseolus vulgaris* L.) und die Linse (*Lens culinaris* MEDIK.). Eine weitaus geringere Bedeutung kommt anderen Vertretern, wie beispielsweise der Ackerbohne, der Lupine, dem Johannisbrot, der Puffbohne, der Mungbohne, dem Gummi arabicum, dem Guar gummi oder dem Traganth zu.

Leguminosen besitzen eine harte Hülle, welche die beiden Keimblätter und den Keimling umschließt. Sie sind die eiweißreichsten pflanzlichen Lebensmittel, teilweise werden Eiweiß-Gehalte von über 20 % erreicht, und deshalb für die Eiweißversorgung insbesondere in den Entwicklungsländern unentbehrlich. Im Hinblick auf die biologische Wertigkeit mangelt es den Leguminosenproteinen mit Ausnahme der Sojabohne an schwefelhaltigen Aminosäuren. Die Proteine, welche bei der Keimung mobilisiert werden, dienen als Reservestoffe (SCHLIEPER, 1997). Über die Zusammensetzung wirtschaftlich bedeutender Leguminosen informiert Tabelle 2.1.

Tab. 2.1: mittlere Zusammensetzung nach SOUCI et al. (1991) [in g/100 g]

	Wasser	Protein	Fett	Kohlen-hydrate	Ballast-stoffe	org. Säuren	Mineral-stoffe
Gartenerbse (Samen, frisch)	75.1	6.6	0.5	12.3	4.3	0.3	0.9
Gartenerbse (Samen, trocken)	13.9	22.9	1.4	41.9	16.6	0.6	2.7
Gartenbohne (Samen, frisch)	89.5	2.4	0.2	5.1	1.9	0.2	0.7
Gartenbohne (Samen, trocken)	8.3	21.3	1.6	47.8	17.0	0.0	4.0
Linse (Samen, trocken)	9.3	23.5	1.4	52.0	10.6	0.0	3.2
Soja (Samen, trocken)	8.5	33.7	18.1	25.9	15.2	0.0	4.7
Erdnuss (Samen, frisch)	5.2	25.3	48.1	12.1	7.1	0.0	2.2
Erdnuss (Samen, geröstet)	1.6	25.6	49.4	13.4	7.4	0.0	2.6

Gartenerbsen, Gartenbohnen und Linsen enthalten wenig Fett, wohingegen Sojabohnen und Erdnüsse auf Grund ihres hohen Fettgehaltes zu den Ölsaaten gerechnet werden. Mengenmäßig überwiegt bei den meisten Leguminosen der Kohlenhydratanteil, der durchschnittlich 40 bis 60 % der Trockenmasse ausmacht und sich überwiegend aus Stärke, aber auch aus Flatulenzen induzierenden Oligo- bzw. Disaccharide sowie Pentosanen zusammensetzt. Einige Arten enthalten toxisch wirkende Substanzen, wie Lektine oder Proteaseinhibitoren, die jedoch durch ausreichende Erhitzung zerstört werden können (WEBERLING & SCHWANTES, 2000).

Eine große wirtschaftliche Bedeutung für den Anbau der Hülsenfrüchte liegt in ihrem Vorfruchtwert für die nachfolgenden Ackerfrüchte. Durch die Symbiose mit Knöllchenbakterien vermögen Leguminosen bis zu 240 kg/ha reinen Stickstoff im Boden anzureichern, der den nachfolgenden Pflanzen zur Verfügung steht (SCHUSTER, 2000). Aktuelle Produktionszahlen gibt Tabelle 2.2 wieder.

Tab. 2.2: Produktionszahlen nach FAO (2001) [in 1000 t]

	Welt	EU	Deutschland
Gartenerbse (Samen, frisch)	7300	1400	62
Gartenerbse (Samen, trocken)	10400	2900	600
Gartenbohne (Samen, frisch)	5100	900	48
Gartenbohne (Samen, trocken)	16800	100	8
Linse (Samen, trocken)	3000	26	0
Soja (Samen, trocken)	176500	1200	1
Erdnuss (mit Hülse)	36100	2300	0

2.1.2 Gartenerbse (*Pisum sativum* L.)

Allgemeines

Die Erbse wurde bereits im Neolithikum domestiziert, wobei sich das Mannigfaltigkeitszentrum nach VAVILOV (1928) in Mittelasien befindet. SCHWANITZ (1967) hingegen nennt Vorderasien, den Mittelmeerraum und Äthiopien als weitere Genzentren und GOVOROV (1929/30) bezeichnet Afghanistan als primäres Entstehungszentrum für kultivierte Erbsenformen. Die Wildart *Pisum elatius* STEV. ist vom Mittelmeerraum bis Tibet beheimatet und gilt somit wahrscheinlich allen genannten Entstehungszentren als Ausgangselter (FRANKE, 1997; BROCKHAUS, 2001).

Die Gattung *Pisum* umfasst drei Arten. Neben *Pisum sativum* L., einschließlich *Pisum arvense* L., mit traubigen Blütenständen und 1 bis 3 weißen Blüten, welche eine weltweite wirtschaftliche Bedeutung besitzt, treten *Pisum fulvum* SIBTH. ET SM. mit kleinen gelben Blüten, welche im Kaukasus, in Syrien und Palästina verbreitet ist sowie die von Kleinasien bis Persien vorkommende mehrjährige, ohne Ranken wachsende Art *Pisum formosum* STEV. auf (HEGI, 1964b).

Abb. 2.2: *Pisum sativum* L. (UNIVERSITÄT BASEL, 2003)

Die einjährige Pflanze *Pisum sativum* L., welche eine Höhe von bis zu einem Meter erreicht, ist krautig und besitzt keine selbsttragende Achse, sondern sucht mit ihren Wickelranken an den Enden der gefiederten, bläulich-grünen Blätter an Stützpflanzen oder Reisig Halt. Aus den von großen halbkreisförmigen Nebenblättern umgebenen Blattachseln entspringen langgestielte, traubige Blütenstände mit 1 bis 3 cm großen weißen oder rosafarbenen Blüten, welche nach Selbstbestäubung 3 bis 10 cm lange, aufgeblähte Hülsen mit bis zu 8 Samen entwickeln. Es werden Zucker-, Mark-, Pal- und Futtererbsen in vielen Sorten unterschieden. Unreife grüne Gartenerbsen werden als Gemüse gekocht verzehrt, tiefgefroren oder in Dosen konserviert und enthalten 5 bis 7 % Protein neben ca. 12 % Kohlenhydraten. In den reifen, gelben oder graugrünen Samen finden sich dagegen bis zu 23 % Protein und 48 % Kohlenhydrate. Diese Samen dienen zur Herstellung von Eintopf, Brei oder gemahlen als Suppengrundlage (FRANKE, 1997; WEBERLING & SCHWANTES, 2000).

Die Kultivierung der Gartenerbse erfolgt je nach Verwendungszweck in unterschiedlicher Anbauform. Die Herstellung von Trockenspeiseerbsen erfolgt entweder durch Trocknen der halbreifen Frucht an der Luft, in Darren bzw. Vakuumapparaten oder in dem die Gartenerbsen durch Ausreifen am Strauch auf dem Feld vertrocknen. In neueren Verfahren werden zuvor getrocknete Gartenerbsen unter Druck mit Heißdampf vorgegart, wodurch ihre Zubereitungszeit wesentlich verkürzt werden kann (TÄUFEL et al., 1998; BALTES, 2000).

Die Gemüseerbsen werden im grünen, krautartigen Zustand geerntet und entweder mit oder ohne Hülse roh oder gekocht verzehrt oder zu Steril- und Gefrierkonserven bzw. Tiefkühlerbsen verarbeitet. Die Gemüseerbsen können aber auch getrocknet werden, indem die unausgereifte, zum Frischverzehr geeignete Gartenerbse zu Trockengemüse verarbeitet wird. Im Gegensatz zur Trockenspeiseerbse wird die getrocknete Gemüseerbse als Gemüsetrockenerbse bzw. als Trockenerbse bezeichnet. Charakteristisch für das Aroma der Gartenerbse sind überwiegend Aldehyde und Pyrazine, beispielsweise 3-Isopropyl-, 3-sec-Butyl-, 3-Isobutyl-2-methoxy-pyrazin (TÄUFEL et al., 1998).

Die Gartenerbse breitet sich dank ihrer guten Anpassungsfähigkeit auf besseren Böden mit hinreichend Feuchtigkeit und genügendem Kalkgehalt überall in der Welt, bis zu 67 ° nördlicher Breite in Skandinavien und in den Alpen bis zu 2000 m über NN, aus. Die Erfolge in der Züchtung ertragreicher Sorten ließ in den vergangenen Jahren sowohl die Hektar-Erträge, als auch die Weltproduktion ansteigen. Zu den weltwirtschaftlich bedeutendsten Anbaugebieten mit einer Jahresproduktion an getrockneten und frischen Gartenerbsen von mehr als 2 Mio t zählten im Jahre 2000 neben Indien und China auch Frankreich sowie Kanada. (SCHUSTER, 2000; FAO, 2003). Etwa 90 % der Gemüseerbsen werden industriell verarbeitet, wobei eine Einteilung der konservierten Gartenerbsen nach ihrem Zartheitsgrad in 4 Güteklassen - Junge Erbsen, extra zart, zart und mittelzart sowie Grüne Erbsen - erfolgt (TÄUFEL et al., 1998).

Untersuchungsmaterial

Um zunächst einen Überblick über mögliche Veränderungen des allergenen Potenzials durch technologische Einflüsse zu ermitteln, erfolgt die Untersuchung diverser Handelsprodukte vergleichend zur Allergenität unterschiedlicher nativer Gartenerbsensorten. Um ein möglichst breites Spektrum der Einflussmöglichkeiten zu erfassen werden die Produkte in Abhängigkeit der technologischen Beeinflussung während der Herstellung ausgewählt. Es werden zum einen Trockenwaren, Tiefkühlprodukte, Glas- und Dosenkonserven unbehandelt und zum anderen die nach Herstellerangaben zubereiteten Produkte untersucht. Da den wasserlöslichen Albuminen nach MALLEY et al. (1975) in Bezug auf das allergene Potenzial die größte Bedeutung zukommt, erfolgt weiterhin eine Untersuchung der bei der Zubereitung anfallenden Kochwässer.

Bei der Auswahl des Untersuchungsmaterials zur Charakterisierung der Gartenerbsenallergene und zur Bestimmung der Einflüsse durch Lagerung, Trocknung, Autoklavierung und Mikrowellenbehandlung sind mehrere Aspekte zu berücksichtigen. Zum einen muss gewährleistet sein, dass über den gesamten Untersuchungszeitraum vergleichbares Untersuchungsmaterial in ausreichender Menge vorliegt. Zum anderen muss Sortenreinheit vorliegen, um eventuelle Abhängigkeiten der Untersuchungsergebnisse durch Sorteneinflüsse auszuschließen.

Des weiteren ist sicherzustellen, dass frisches Material vorliegt. Schließlich ist aufgrund möglicher Einflüsse durch den Reifungszustand bei allen Untersuchungen darauf zu achten, dass eine repräsentative Probenahme in Bezug auf den Reifungszustand stattfindet.
Um diesen Kriterien gerecht zu werden, werden 5 kg noch in der Hülse befindliche frische Gartenerbsen-Samen der Sorte Maxigolt, eine vom Bundessortenamt am 28.12.1979 zugelassene und seit dem 27.03.1981 geschützte Sorte, erworben (BUNDESSORTENAMT, 2003). Das Untersuchungsmaterial, von dem sichergestellt ist, dass Sortenreinheit vorliegt, wurde im Landkreis Harburg im herkömmlichen Freilandanbau kultiviert und am Tag der Ernte aufgearbeitet.

Ein Teil des Untersuchungsmaterials wird direkt nach dem Erwerb unbehandelt verarbeitet und dient der Charakterisierung der Gartenerbsenallergene (siehe 4.1.1) sowie als Ausgangsmaterial zur Isolierung von Gartenerbsenallergenen (siehe 4.1.10). Zur Durchführung des Lagerungsversuches werden definierte Mengen des Untersuchungsmaterials in Tiefkühltruhen bei - 20 bzw. - 80 °C gelagert und nach festgelegten Zeitintervallen untersucht (siehe 4.1.5). Das verbleibende Material, das zur Bestimmung des Einflusses der Trocknung (siehe 4.1.6), der Autoklavierung (4.1.7), der Mikrowellenbehandlung (4.1.8) bzw. einer simulierten In-vitro-Verdauung (4.1.9) Verwendung findet, wird unbehandelt bei - 20 °C gelagert. Zur Berücksichtigung des jeweiligen Lagerungseinflusses bis zur Durchführung der Einzeluntersuchungen wird parallel zu den jeweiligen Behandlungen stets eine unbehandelte Probe als Referenzprobe untersucht.

Für die Untersuchung der Sortenabhängigkeit (siehe 4.1.3) werden insgesamt fünf Gartenerbsensorten ausgewählt. Es handelt sich dabei um leicht zu kultivierende, ertragreiche und sowohl zum Frischverzehr, als auch zur Konservierung geeignete Sorten, die von der Industrie häufig eingesetzt werden. Um Sortenreinheit zu garantieren werden die Sorten „Kleine Rheinländerin“, „Allerfrüheste Mai“, „Maxigolt“, „Spinter“ und „Wunder von Kelvedon“ im herkömmlichen Freilandanbau so kultiviert, dass eine sortenspezifische Ernte gewährleistet ist.

Zur Bestimmung des Reifungseinflusses (siehe 4.1.2) auf das allergene Potenzial der Gartenerbse erfolgt die Ernte von der im Eigenanbau kultivierten Gartenerbsen-Sorten in definierten Zeiträumen in Abhängigkeit vom Samengewicht.

2.1.3 Gartenbohne (*Phaseolus vulgaris* L.)

Allgemeines

Die heute kultivierte Gartenbohne, die auch als Gewöhnliche Bohne, Fisole oder French Bean bezeichnet wird, stammt ebenso wie die mehrjährige Feuer- oder Prunkbohne (*Phaseolus coccineus* L.) ursprünglich von der in Mittel- und Südamerika beheimateten und noch heute anzutreffenden Wildform *Phaseolus aborigineus* BURK. ab. In ihrem Ursprungsgebiet wird die Gartenbohne seit etwa 8000 Jahren kultiviert. Der Transfer nach Europa erfolgte bald nach der Entdeckung Amerikas (KÖRBER-GROHNE, 1987; FRANKE, 1997; TÄUFEL et al., 1998). Die Gattung *Phaseolus* umfasst nach HEGI (1964a) etwa 150 Arten, deren größte Anzahl in Zentralamerika kultiviert wird. Einige Arten werden in Afrika und Südasien angebaut, andere wachsen in wärmeren Zonen über die ganze Erde verbreitet.

Abb. 2.3:
Phaseolus vulgaris L. var. *nanus* ASCHERS.
(UNIVERSITÄT BASEL, 2003)

Die einjährige linkswindende Schlingpflanze mit dreizähligen Blättern bedarf stützender Stangen. Aus der Ursprungsform, welche heute als Stangenbohne (*Phaseolus vulgaris* L. var. *vulgaris*) bezeichnet wird, konnte eine strauchig wachsende Form, die sogenannte Buschbohne (*Phaseolus vulgaris* L. var. *nanus* Aschers.), gezüchtet werden, welche keiner Stützung bedarf. Aus den Blattachseln der Sprosse gehen traubige, weiße Blütenstände mit 3 bis 5 Schmetterlingsblüten hervor. Das einzige oberständige Fruchtblatt wächst nach Selbstbestäubung zu einer Hülse von schlanker Form heran, welche eine Länge von bis zu 20 cm erreichen kann und 5 bis 9 länglich-nierenförmige weiße oder farbige Samen birgt.

Die Hülsen werden zumeist im grünen unreifen Zustand gepflückt und im gekochten Zustand genossen oder zu Konserven verarbeitet. Auch die reifen trockenen Samen werden gekocht oder gemahlen als Grundlage für Suppen konsumiert. Vom Rohgenuss ist auf Grund des in den Samen befindlichen Giftstoffes Phasin, welcher die Blutgerinnung erhöht und durch Kochen jedoch nicht durch Trocknung zerstört werden kann, abzuraten (FRANKE, 1997; TÄUFEL et al., 1998; WEBERLING & SCHWANTES, 2000).

Abb. 2.4:
Phaseolus vulgaris L. var. *vulgaris*
(UNIVERSITÄT BASEL, 2003)

Neben der Einteilung in Stangen- und Buschbohne auf Grund der Wuchsform dient die Farbe der Hülse als Unterscheidungskriterium, so dass neben der grünen Stangen- oder Buschbohne auch die gelbe Wachsbohne und die blaue Stangenbohne differenziert werden. Als weiße Bohnen werden die voll ausgereiften Samen der grünen Gartenbohne bezeichnet. Unter der Bezeichnung Prinzessbohnen werden ausgesuchte, besonders zarte grüne Gartenbohnen mit dünnem Samen und nahezu stecknadeldünnem, rundem Querschnitt gehandelt (FRANKE, 1997).

Heute ist die *Phaseolus*-Bohne fast über die ganze Erde verbreitet. Trotz der Kälteempfindlichkeit wächst sie in Skandinavien bis 63 ° nördlicher Breite und gedeiht in den Alpen bis 1500 m über NN. Die Kultivierung der Gartenbohne erfolgt überwiegend im Mischanbau mit Mais oder anderen Kulturen. Je nach Verwendungszweck wird dabei die Produktion von Trockenspeisebohnen und Gartenbohnen für den Frischmarkt bzw. die Konservenindustrie, welche als Grüne Bohnen bezeichnet werden, unterschieden. Zur Konservierung werden die Grünen Bohnen ohne Spitzen und Stielansatz selten als ganze Gartenbohne verwendet. Vielmehr kommt es nach maschinellem Brechen bzw. Schneiden zur Produktion von Brech- bzw. Schnittbohnen. Die Herstellung von Trockenspeisebohnen erfolgt analog zu den Trockenspeiseerbsen (FRANKE, 1997; TÄUFEL et al., 1998; WEBERLING & SCHWANTES, 2000).

Untersuchungsmaterial

Wie bereits im Fall der Gartenerbsen dokumentiert (siehe 2.1.2) erfolgt die Untersuchung von unterschiedlich hergestellten Handelsprodukten. Die Ergebnisse der Untersuchung von Glas- bzw. Dosenkonserven, Tiefkühl- sowie Trockenwaren geben wiederum einen Überblick über mögliche Beeinflussungen des allergenen Potenzials der Gartenbohne (siehe 4.2.4). Auch in diesen Studien erfolgen die Untersuchungen an unbehandelten Handelsprodukten sowie an nach Herstellerangaben zubereiteten Produkten und den anfallenden Kochwässern.

Das weitere Untersuchungsmaterial zur Charakterisierung der Gartenbohnenallergene (siehe 4.2.1), zur Bestimmung der Einflüsse durch Lagerung (4.2.5), Trocknung (4.2.6), Autoklavierung (4.2.7), Mikrowellenbehandlung (4.2.8) sowie Simulation einer In-vitro-Verdauung (4.2.9) wird aufgrund der bereits erwähnten Überlegungen wiederum in einem eigens durchgeführten Pflanzungsversuch gewonnen. Es erfolgt die Kultivierung der vier Gartenbohnensorten „Salou“, „Montano“, „Admires“ und „Maxi“ im herkömmlichen Freilandanbau, die sowohl eine sortenspezifische Ernte zur Realisierung des Sortenvergleiches (siehe 4.2.3), als auch die Überprüfung des Einflusses des Reifungsstadiums auf das allergene Potenzial der Gartenbohne (siehe 4.2.2) gewährleistet. Die spezielle Vorgehensweise bei Durchführung der Untersuchungen erfolgt analog zu den Studien der Gartenerbse.

2.2 Patientenseren

In Zusammenarbeit mit der Hautklinik des Universitätskrankenhauses Hamburg-Eppendorf (UKE) werden 39 Patienten mit Hinweis auf eine Sensibilisierung gegen Gartenerbse bzw. -bohne rekrutiert. Nach Dokumentation der individuellen Anamnese erfolgt eine Blutentnahme. Aus den so gewonnenen Blutproben werden gemäß Kapitel 7.1 die Patientenseren hergestellt. Anschließend erfolgt die Bestimmung des Gehaltes an spezifischen IgE-Antikörpern gegen Gartenerbse bzw. -bohne mittels EAST (siehe 3.7 und 7.7) und die Detektion der Allergenbanden im IB (siehe 3.9 + 3.10 sowie 7.9 bis 7.11) mittels der Einzelseren. Für alle in dieser Arbeit durchzuführenden immunologischen Untersuchungen wird daraufhin ein Poolserum hergestellt, welches sich aus aliquoten Volumina jener Seren zusammensetzt, welche EAST-Klassen ≥ 2 aufweisen und eindeutige Reaktionen im Immunoblot zeigen.

Durch diese Vorgehensweise ergeben sich spezielle Gartenerbsen- bzw. -bohnen-Poolseren, welche sich aus einem breiten Patientenkollektiv mit einer Sensibilisierung bzw. einer echten Typ-I-Lebensmittelallergie zusammensetzen und somit ein breites Detektionsspektrum für alle durchzuführenden immunologischen Untersuchungen gewährleisten. Die exakten Ergebnisse der untersuchten Einzelseren sowie Daten zum Blutserum eines nicht atopischen Probanden mit der EAST-Klasse 0 ohne Lebensmittelunverträglichkeit, das bei allen Untersuchungen als Kontrollserum dient, sind Tabelle 7.1 in Kapitel 7.2 zu entnehmen.

2.3 Enzyme

Die Untersuchungen des Einflusses einer simulierten In-vitro-Verdauung auf die Stabilität der Gartenerbsen- und Gartenbohnenallergene erfolgt unter Einsatz der wichtigsten proteinverdauenden Enzyme des Gastrointestinaltraktes (siehe Kapitel 1.6). Dabei wird sowohl der Einfluss durch Einzelenzyme, als auch durch unterschiedliche Enzymkombinationen untersucht. Die Angabe der katalytischen Aktivität kann dabei sowohl in Units (U; 1 U = 1 µmol/min) (INTERNATIONAL UNION OF BIOCHEMISTRY, 1961), als auch in Katal (kat; 1 kat = 1 mol/s) (DYBKAER & JÖRGENSEN, 1967), erfolgen.

Zur Simulation der Magenverdauung wird **Pepsin** (EC 3.4.23.1) in Form eines aus der Schweinemagenschleimhaut gewonnen Präparates mit einer Aktivität von 452 U/l eingesetzt. Im menschlichen Körper wird es in Form des inaktiven Proenzyms Pepsinogen von den Hauptzellen der Magenmucosa synthetisiert und in das Magenlumen abgegeben. Durch das vorherrschende salzsaure Milieu wird im Magen durch einen autokatalytischen Prozess der vorliegende Pepsin-Inhibitorkomlex in aktives Pepsin (MG 34.5 kDa) und den Inhibitor (MG 3.1 kDa) gespalten. Trotz des breiten Wirkungsspektrums greift Pepsin bevorzugt Peptidbindungen am Carboxylende von Phenylalanin, Methionin, Leucin und Tryptophan an, sofern an deren Aminoende eine hydrophobe AS gebunden vorliegt. Pepsin, das aufgrund der Spaltung im Inneren der Proteinkette zur Gruppe der Endopeptidasen gehört, spaltet etwa 10 % aller

Peptidbindungen eines Proteins. Das pH-Optimum von 2.0 erklärt sich durch die Struktur des aktiven Zentrums des Pepsins, welches zwei Asparaginsäurereste enthält, von denen einer für die enzymatische Aktivität ionisiert vorliegen muss (KLEBER & SCHLEE, 1991).

Trypsin (EC 3.4.21.4), eine Endopeptidase aus dem Sekret des Pankreas mit einem pH-Optimum von 7.6, wird im schwach alkalischem Milieu des Dünndarms in Gegenwart von Calcium durch eine Enterokinase oder durch Autokatalyse aus der inaktiven Vorstufe Trypsinogen durch Abspaltung eines Hexapeptids gebildet. Trypsin (MG 23.3 kDa) spaltet spezifisch Peptidbindungen am Carboxylende der basischen AS Lysin und Arginin (KLEBER & SCHLEE, 1991). Das eingesetzte Präparat ist ein aus dem Rinderpankreas gewonnenes Sekret mit einer Aktivität von 10900 U/mg.

Chymotrypsin (EC 3.4.21.1) mit einem MG von 25 kDa und einem pH-Optimum von 8.0 entstammt dem Rinderpankreas und weist eine Aktivität von 350 U/mg (gemessen am Substrat N-Acetyl-L-tyrosin-ethylester) auf. Die Aktivierung dieser Endopeptidase verläuft in einer Zwei-Stufen-Reaktion, wobei das im Pankreas gebildete Proenzym Chymotrypsinogen zunächst durch Trypsin im Dünndarm gespalten wird, so dass das aktive Zentrum durch eine Konformationsänderung ausgebildet wird. Anschließend werden autokatalytisch zwei Dipeptide abgespalten, wodurch die aktive Form dieser Endopeptidase, welche bevorzugt Peptidbindungen nach aromatischen AS-Resten von Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan spaltet, ausgebildet wird (LÖFFLER, 1983).

Die zur Gruppe der Exopeptidasen gehörende **Carboxypeptidase** (EC 3.4.17.1) mit einem MG von 34 kDa und einem pH-Optimum von 7 zählt zu den Zinkproteinen und wird ebenfalls in Form einer Vorstufe vom Pankreas sezerniert. Die eingesetzte aktive A-Form dieses Enzyms zeigt eine bevorzugte Affinität zu aromatischen Aminosäuren, welche sie vom Carboxylende ausgehend abspaltet (KLEBER & SCHLEE, 1991). Eingesetzt wird eine aus dem Rinderpankreas gewonnene Suspension, welche Carboxypeptidase A mit einer Aktivität von 1058 U/ml (gemessen am Substrat Hippuryl-L-phenylalanin) enthält.

Pankreatin stellt eine Mischung der im Pankreas-Sekret enthaltenen Verdauungsenzyme Trypsin, Chymotrypsin, Elastase, sowie nicht-proteinspaltenden Amylasen und Lipasen dar (SCHMIDT & THEWS, 1995). Das in den dokumentierten Untersuchungen eingesetzte Pankreatin stammt aus dem Schweinepankreas und weist eine Aktivität auf, welche die Verdauung des 100-fachen des eigenen Enzymgewichtes (gemessen am Substrat Casein) innerhalb von 60 min beim pH-Optimum von 7.5 gewährleistet.

Zur Untersuchung des Einflusses der Dickdarmverdauung wird die Serinendopeptidase **Proteinase K** (EC 3.4.21.14) eingesetzt. Das aus dem Pilz *Tritirachium album* gewonnene Enzym zeigt eine Aktivität von 13.4 U/mg (gemessen am Substrat Casein). Bei einem pH-Optimum von 7 bis 8 werden bevorzugt Peptidbindungen an hydrophoben, N-substituierten Aminosäuren gespalten (SCHMIDT & THEWS, 1995).

3 Methoden

3.1 Übersicht

Einen Überblick über die Zusammenhänge der analytischen Vorgehensweise vermittelt Abbildung 3.1. Dabei werden sowohl für die Charakterisierung der Gartenerbsen- und Gartenbohnenproteine, als auch für die immunologischen Untersuchungen der Allergene dieser Leguminosen überwiegend etablierte und in der Literatur bereits hinreichend beschriebene Methoden eingesetzt. Anschließend werden in den folgenden Abschnitten die Prinzipien der unterschiedlichen Methoden dargelegt sowie eventuelle Modifikationen erläutert.
Nach Extraktion der Proteine aus dem jeweiligen zu untersuchenden Probenmaterial erfolgen, abhängig vom speziellen Untersuchungsziel, weitere Untersuchungen zur qualitativen bzw. quantitativen Bestimmung der Proteine oder Allergene oder zur Isolierung einzelner Proteine.

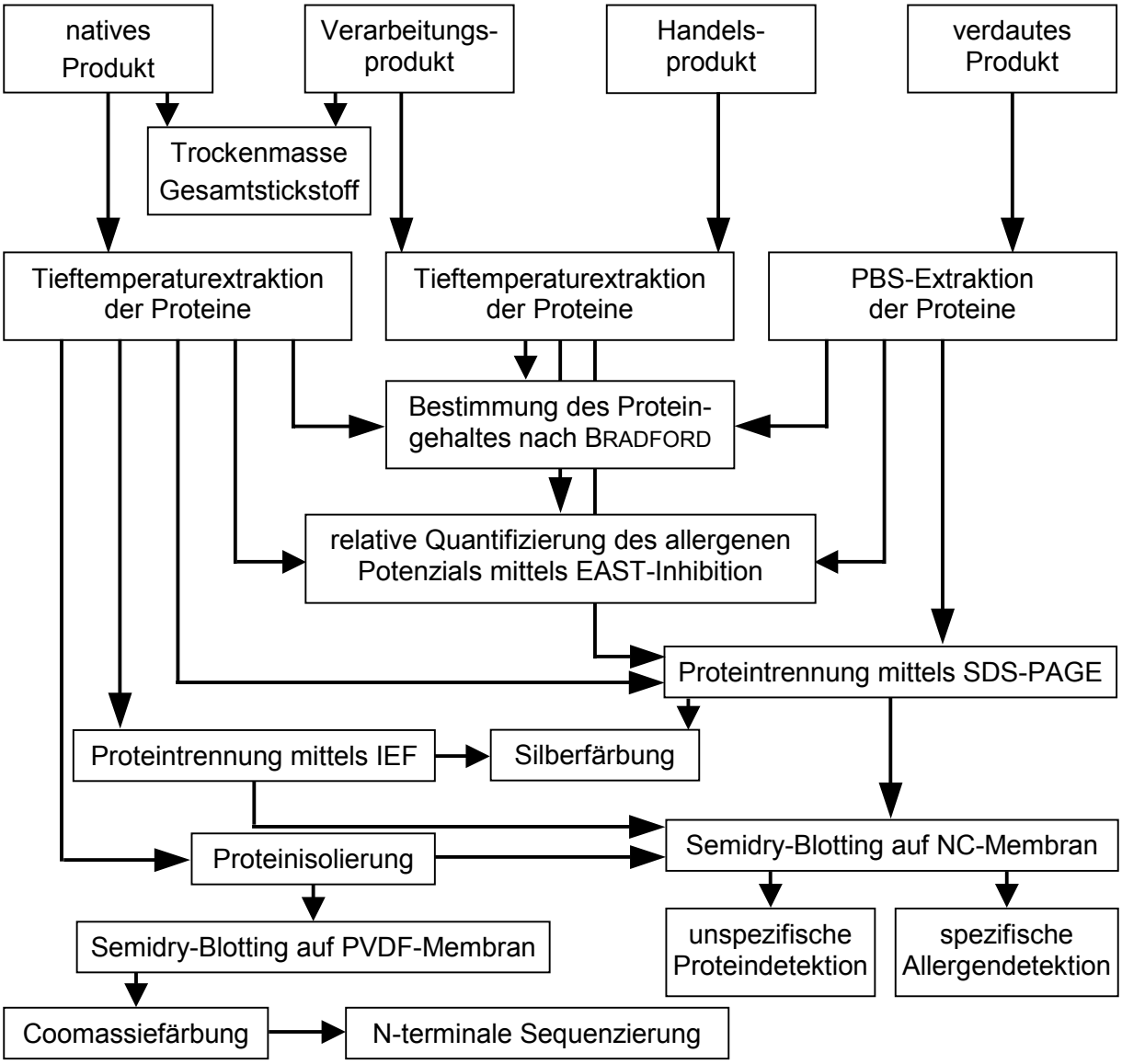


Abb. 3.1: Methodenübersicht

3.2 Proteinextraktionen

Die Grundlage für Untersuchungen von Lebensmittelallergenen bildet deren Extraktion aus dem Probenmaterial mit reproduzierbarer Qualität und Zusammensetzung der Extrakte (AAS et al., 1978). Dabei kann eine Variation der Extraktionsmethode in Abhängigkeit der Untersuchungsziele erforderlich sein.

Studien zur Bestimmung der Gesamtallergenität von Lebensmitteln erfordern die vollständige Isolierung aller Proteine und Glykoproteine ohne Allergenitätsverlust. Auf Grund hoher Gehalte an phenolischen Verbindungen und Phenoloxidasen in Hülsenfrüchten (BELITZ et al., 2001) ist diese Vorraussetzung bei Anwendung der Normaltemperaturextraktion, einer industriell häufig angewandten Methode, nicht gegeben. Durch Zerstörung der Zellkompartimente in Folge der Gewebezerkleinerung bei 4 °C in phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) in Gegenwart von Luftsauerstoff erfolgt zunächst unter Einwirkung der Phenoloxidasen die Umsetzung von Phenolen zu Chinonen. In einer Folgereaktion kommt es zur Ausbildung von kovalenten Bindungen zwischen Chinonen und Proteinen, wodurch ein Allergenitätsverlust der Extrakte zu verzeichnen ist (MCEVILY et al., 1992; VIELUF et al., 1997).

Berücksichtigung findet diese Problematik bei der von CLEMENTS (1965) entwickelten und durch VIETHS et al. (1992b) modifizierten **Tieftemperaturextraktion** (TTE) zur vollständigen Isolierung der Proteine und Glykoproteine aus pflanzlichem Material. Dabei wird das Untersuchungsmaterial bei einer Temperatur von - 40 °C homogenisiert, anschließend die resultierende Suspension filtriert und der gewaschene Rückstand lyophilisiert. Durch dieses Vorgehen erfolgt die Abtrennung der acetonlöslichen phenolischen Verbindungen und die temperaturbedingte Hemmung der Enzymaktivität. Die Extraktion der Proteine nach der TTE erfolgt gemäß Anhang 7.3.1.

Um die Verteilung der Gartenerbsenallergene in unterschiedlichen Proteinfraktionen zu untersuchen, ist die **Fraktionierte Extraktion** (FE) der Proteine in Abhängigkeit ihrer Löslichkeit erforderlich. Diese in Anlehnung an VIOQUE et al. (1999) durchgeführte Extraktionsmethode erfordert eine spezifische Trennung der Albumine, Globuline und Gluteline mittels Dialyse durch Variation wässriger Pufferlösungen, wodurch eine Extraktion bei Temperaturen von - 40 °C undurchführbar ist. Ziel der Untersuchungen ist jedoch eine relative Bestimmung des allergenen Potenzials der einzelnen Proteinfraktionen, so dass ein potenziell auftretender Allergenitätsverlust durch die gemäß Anhang 7.3.2 durchgeführte Extraktion unberücksichtig bleiben kann.

Zur Bestimmung des Einflusses der Verdauung auf Gartenerbsen- und Gartenbohnenallergene erfolgt die mechanische Zerkleinerung bzw. die Proteinextraktion in Anlehnung an die Bedingungen in der Mundhöhle bei Temperaturen von 37 °C. Die anschließende Zentrifugation, portionierte Lyophilisation und Lagerung bei - 80 °C dient der Herstellung identischer Proteinextrakte in lagerfähiger Form, die somit für zeitlich versetzt durchzuführende Untersuchungen in gleichbleibender Qualität und Proteinkonzentration zur Verfügung stehen. Nähere Angaben zur Durchführung der **In-vitro-Verdauungsextraktion** (IVE) gibt Anhang 7.3.3.

3.3 Trockenmassebestimmung

Begleitend zu den unterschiedlichen elektrophoretischen und immunologischen Analysen werden in Abhängigkeit vom Ziel der jeweiligen Untersuchung von diversen Proben Trockenmassebestimmungen durchgeführt (LEBENSMITTELRECHT: ASU Nr. L 06.00-3). Diese Ergebnisse ermöglichen es, zum einen den Einfluss der einzelnen technologischen Verfahren auf das Untersuchungsmaterial zu beurteilen sowie zum anderen einen Bezug der quantitativen immunologischen Ergebnisse auf den Trockenmassegehalt herzustellen.
Die jeweilige Probe wird gemäß Anhang 7.4 bei 103 ± 2 °C bis zur Massekonstanz getrocknet. Der verbleibende Substanzrest, der nach Entfernung aller flüchtigen Bestandteile im Probenmaterial verbleibt, wird als Trockenmasse bezeichnet.

3.4 Gesamtstickstoffbestimmung

Die gemäß Anhang 7.5 nach den Amtlichen Sammlungen von Untersuchungsverfahren (LEBENSMITTELRECHT: ASU, Nr. L 06.00-7) durchgeführte Bestimmung des Gesamtstickstoffgehaltes ermöglicht die direkte Berechnung des Gesamtproteingehaltes des jeweiligen Probengutes. Damit wird wiederum die Möglichkeit zur Beurteilung der quantitativen Ergebnisse in Abhängigkeit des Gesamtproteingehaltes eröffnet.

3.5 Proteingehaltsbestimmung

Die Bestimmung des Proteingehaltes im Mikrogramm-Bereich der für die elektrophoretischen und immunolgischen Untersuchungen einzusetzenden Extrakte erfolgt nach der Methode von BRADFORD (1976). Durch den Einsatz des Farbreagenzes Coomassie Brilliant Blue, dessen negativ geladene Moleküle an die Aminogruppen der Proteine angelagert werden, resultiert ein blaugefärbter, stabiler Protein-Farbstoff-Komlex, der bereits wenige Minuten nach Farbstoffzugabe ohne weitere Aufarbeitung bei 590 nm photometrisch vermessen werden kann. Störungen durch eventuell vorhandene Kohlenhydrate und Natriumionen treten nicht auf. Die Nachweisgrenze liegt im Bereich von 0.05 µg/ml (READ & NORTHCOTE, 1981). Die Quantifizierung erfolgt anhand einer Kalibriergeraden mit Rinderserumalbumin (BSA) als Referenzprotein gemäß Anhang 7.6. Aufgrund verschiedener Absorptioneigenschaften und daraus resultierender unterschiedlicher Responsefaktoren verschiedener Proteine bietet dieses Verfahren jedoch keine Möglichkeit zur absoluten Proteingehaltsbestimmung, sondern lediglich zur relativen Quantifizierung.

3.6 Sensorische Untersuchung

Die sensorische Beurteilung sämtlicher unbehandelter sowie technologisch behandelter Proben erfolgt gemäß einer einfach beschreibenden Prüfung nach den Amtlichen Sammlungen von Untersuchungsverfahren (LEBENSMITTELRECHT: ASU, Nr. L 00.90-6) durch drei geschulte Prüfpersonen. Diese Norm legt ein Verfahren zur Beschreibung von Merkmalseigenschaften fest. Das Verfahren ist u.a. geeignet zur Feststellung von Produktionseinflussfaktoren.

3.7 Enzymallergosorbent-Test (EAST)

Der Enzymallergosorbent-Test (EAST), eine enzymimmunologische Methode zur Bestimmung des Gehaltes an freiem, spezifischem IgE im Blutserum, stellt als Variante des Radioallergosorbent-Testes (RAST) eine der wichtigsten In-vitro-Untersuchungsmethoden zur Diagnose einer Lebensmittelallergie dar. Das Prinzip des EAST, dargestellt in Abbildung 3.2, beruht auf zwei hochspezifischen Reaktionsschritten.

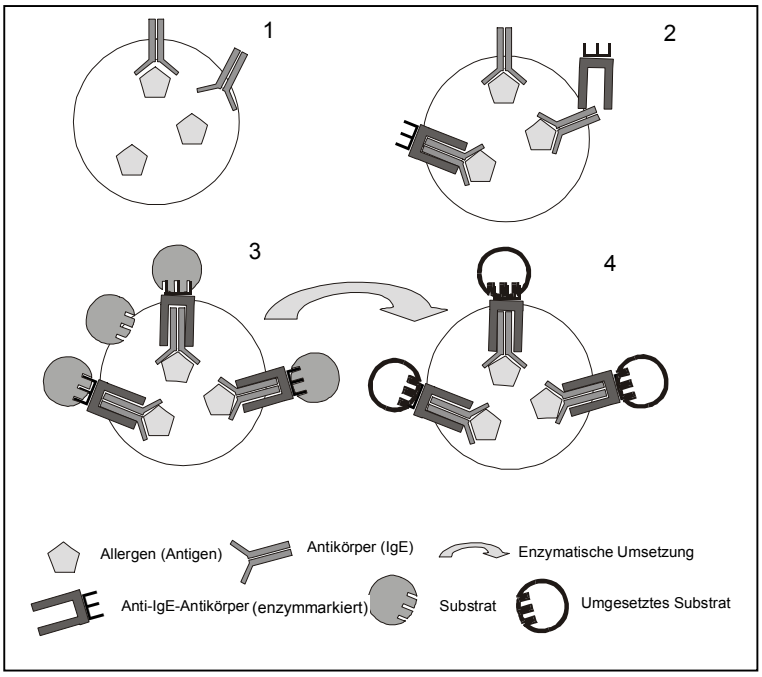


Abb. 3.2: Prinzip des Enzymallergosorbent-Testes

An eine als Festphase dienende bromcyanaktivierte Cellulosescheibe wird im ersten Schritt der Reaktion die Kopplung der Allergene durch Inkubation mit den entsprechenden PBS-Extrakten vorgenommen. Dabei gehen sowohl Allergene als auch nicht allergene Proteine kovalente Bindungen mit der Festphase ein. Adsorbierende Verbindungen werden durch Waschen entfernt und verbleibende reaktive Bereiche mit Ethanolamin abgesättigt (CESKA & LUNDKVIST, 1972).

Gemäß der EAST-Durchführung nach Anhang 7.7 erfolgt im Anschluss daran die Inkubation der Celluloseschei̇ben mit den zu untersuchenden Patientenseren, wobei eine Bindung zwischen den spezifischen IgE-Antikörpern an die festphasengebundenen Allergene ausgebildet wird (Abb. 3.2, Nr.1). Durch spezifisch mit alkalischer Phosphatase (AP) enzymmarkierte Anti-IgE-Antikörper erfolgt die Markierung der gebundenen Antikörper (Abb. 3.2, Nr. 2). Durch das Vorhandensein der AP wird schließlich die enzymatische Umsetzung des zugegebenen farblosen Substrates p-Nitrophenylphosphat (PNPP) zum gelben p-Nitrophenolat, welches bei 405 nm photometrisch vermessen werden kann, katalysiert (Abb. 3.2 Nr. 3 → 4).

Über Referenzseren mit bekanntem IgE-Gehalt gegen Lieschgras unter Verwendung der entsprechenden Lieschgras-Allergenscheiben erfolgt die Einstufung der einzelnen Patientenseren entsprechend ihres IgE-Gehaltes in eine der fünf EAST-Klassen (siehe Tab. 3.1). Die Ergebnisse werden dabei in Units angegeben, wobei 1 Unit 2.4 ng IgE entsprechen (ALLERGOPHARMA, 2000).

Tab. 3.1: Einteilung der EAST-Klassen

EAST-Klasse	IgE-Gehalt [U/ml]
0	0 – 0.35
1	0.35 – 0.70
2	0.70 – 3.50
3	3.50 – 17.50
4	> 17.50

3.8 EAST-Inhibition

Die als Variante des EAST entwickelte EAST-Inhibition wird aufgrund des Messprinzips als kompetitiver Hemmtest eingestuft und ermöglicht somit die relative Quantifizierung des allergenen Potenzials der eingesetzten Proteinextrakte. Die Abwandlung beruht auf der Inkubation des Patientenserums mit dem auf seine allergene Potenz zu untersuchenden Extrakt, welcher in diesem Fall als Inhibitorlösung bezeichnet wird, vor der eigentlichen Messung (VIETHS et al., 1993a; MÖLLER et al., 1997b).

Dabei findet eine Konkurrenzreaktion zwischen den frei in Lösung befindlichen und den festphasengebundenen Allergenen um das aus gleichen Anteilen verschiedener Einzelseren eines Poolserums stammende spezifische IgE statt. Je größer sich das inhibierende Vermögen der eingesetzten Extrakte zeigt, desto stärker wird das Messsignal vermindert. Dabei werden als Inhibitorlösung Verdünnungsreihen der Proteinextrakte eingesetzt, um die Proteingehalte, die zu einer 50 %igen Verminderung des Messsignals (C_{50}-Wert) führen, bestimmen zu können. Anhand der C_{50}-Werte ist ein Vergleich der allergenen Potenz der verschiedenen Extrakte untereinander möglich. Der C_{50}-Wert einer sogenannten homologen Inhibition, die Inhibition mit dem nativen Extrakt, der ebenfalls an die Festphase gekoppelt ist, führt dabei zu einer maximalen Verminderung des Messsignals und fungiert als Bezugsgröße. Die Auswertung erfolgt aus der Abhängigkeit der prozentualen Inhibition von der logarithmischen Proteinkonzentration der Inhibitorextrakte in Form einer logarithmischen Regression.
Als Inhibitorlösungen der gemäß Anhang 7.8 durchgeführten EAST-Inhibition dienen neben den unterschiedlichen Sorten und Reifungsstufen auch die Handelsprodukte sowie alle technologisch behandelten Produkte bzw. In-vitro-verdauten Extrakte.

3.9 Elektrophorese

Die Elektrophorese als etablierte Methode zur Auftrennung von Proteinen basiert auf dem Prinzip der Wanderung geladener Teilchen unter der Einwirkung eines elektrischen Gleichstromfeldes. Aufgrund der unterschiedlichen Ladungen und Massen der Moleküle ist die Fraktionierung eines Gemisches verschiedener Moleküle möglich.

Maßgebend für die Trennschärfe ist dabei die Wanderungsgeschwindigkeit der Teilchen, welche von der Zusammensetzung des Puffers, der Temperatur, der Feldstärke und dem Trägermaterial beeinflusst wird. Eine Einteilung unterschiedlicher elektrophoretischer Methoden erfolgt in Bezug auf das jeweilige zugrundeliegende Trennprinzip (WESTERMEIER, 1990).

Die **Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese** (**SDS-PAGE**) beruht auf der Trennung der Proteine nach ihrem MG. Hierzu erfolgt die Beladung der Proteine mit dem anionischen Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS), wodurch die Eigenladungen der Proteine so effektiv überdeckt werden, dass ein identisches Masse/ Ladungsverhältnis der SDS-Protein-Micellen untereinander vorliegt (GUTTMAN, 1996).

Die reduktive Spaltung der Disulfidbrücken mit 2-Mercaptoethanol hat eine Zerstörung der Sekundär- und Tertiärstruktur zur Folge und führt nach Auffaltung der mit SDS beladenen Proteine zu einheitlichen Micellstrukturen (VIETHS et al., 1992b). Die Trennung der so behandelten Proteine erfolgt in restriktiven Gelen, welche aufgrund ihrer geringen Porengröße die Wanderung größerer Micellen stärker behindern als die kleinerer Micellen. Daraus resultiert eine zum MG proportionale Wanderungsgeschwindigkeit der Proteinmicellen. Die Abschätzung der jeweiligen MG der Probenproteine erfolgt durch Vergleich mit einem Proteinstandardgemisch, dem sogenannten Molekulargewichtsmarker (MGM).

Als Trennmedium werden Polyacrylamid-Gele, welche durch Copolymerisation von Acrylamidmonomeren und dem als Vernetzer fungierenden N,N´-Methylen-bisacrylamid hergestellt werden, eingesetzt. Die für die Trennleistung des Gels verantwortliche Porengröße kann über die Totalamid (TA)-Konzentration und den Vernetzungsgrad reproduzierbar eingestellt werden. Entscheidende Vorteile dieses Geltyps sind die chemische und thermische Stabilität, das weitgehende Fehlen von Adsorption und Elektroosmose sowie die gute Reproduzierbarkeit der Darstellung (MAIER, 1990).

In der vorliegenden Arbeit werden lediglich die kommerziell erworbenen Fertiggele des Typs Novex™ NuPage™ der Firma Invitrogen™ (Groningen, Niederlande) verwendet. Je nach Trennproblem werden durch Variation von Totalamidkonzentration und Puffersystem unterschiedliche optimale Trennbereiche realisiert (siehe Tab. 3.2).

Tab. 3.2: eingesetzte elektrophoretische Trennsysteme

TA-Konz. [%]	Gelpuffer	Elektrodenpuffer	Trennbereich [kDa]
12	Bis-Tris-HCl	MES-SDS	2.5 - 60
10	Bis-Tris-HCl	MES-SDS	14 – 94
7	Tris-Acetat	Tris-Acetat-SDS	36 – 116

Die **Isoelektrische Fokussierung** (**IEF**) basiert auf der Trennung nativer Proteine nach ihren pI. Dabei wandern die Moleküle in einem pH-Gradientensystem entsprechend ihrer Ladung in Richtung Kathode bzw. Anode bis zum Erreichen ihres pI. Da ihre Nettoladung und somit auch ihre Beweglichkeit im elektrischen Feld an diesem pH-Wert gleich null ist, erfolgt eine Fokussierung an diesem Endpunkt (WESTERMEIER, 1990)

Als Trennsystem werden ebenfalls Fertiggele des Typs Novex™ Pre-Cast™ der Firma Invitrogen™ (Groningen, Niederlande) in Verbindung mit den jeweiligen Kathoden- bzw. Anodenpuffern verwendet. Die eingesetzten restriktiven Gele mit einem pH-Gradienten von 3 bis 7 ermöglichen dabei eine reproduzierbare Trennung von Proteinen mit pI zwischen 3 und 7, wobei die Zuordnung der einzelnen pI durch Verwendung eines pI-Markers (pIM) gewährleistet wird. Nähere Angaben zur Durchführung sowie die Zusammensetzung des pIM sind dem Anhang 7.9.2 zu entnehmen.

3.10 Immunoblot (IB)

Nach STOTT (1989) wird der **IB** als Kombination eines Proteintransfers aus einem Trägergel auf eine immobilisierende Membran durch Semidry-Blotting und der anschließenden immunochemischen Detektion zur Differenzierung von allergenen und nicht-allergenen Strukturen mittels Immunfärbung definiert.

Dabei stellt das **Semidry-Blotting** eine spezielle Variante des Blottings dar, bei der die Übertragung der zuvor elektrophoretisch aufgetrennten Proteine mittels zweier horizontaler Graphitelektroden, an welchen ein Gleichstromfeld anliegt, durchgeführt wird. Zwischen den Elektroden werden dabei die Blotmembran und das Trenngel angeordnet, sowie ein diskontinuierliches Puffersystem mit getränkten Elektrodentüchern aufgebaut, wodurch ein effektiver und gleichmäßiger Transfer gewährleistet wird (KHYSE-ANDERSEN, 1984; VIETHS et al., 1992b).

Die transferierten Proteine haften, vermutlich über hydrophobe Wechselwirkungen, ohne vorherige Denaturierung fest an der Membran und sind nicht wie im Trenngel blockiert, sondern für spezifische Ligandenbindungen, beispielsweise mit IgE-Antikörpern, bzw. unspezifische Bindungen zu Farbstoffmolekülen frei zugänglich, da eine Renaturierung der Proteine nach dem Verlust des SDS der Elektrophorese erfolgt (AALBERSE, 2000). Der Bindungsmechanismus ist durch die im neutralen Milieu vorliegende negative Ladung der adsorbierten Proteine und der Membran begründet. Die Bindungskapazität einer Membran hängt entscheidend von ihrer Porengröße ab, wobei ein Wert von 0.2 µm auch eine Immobilisierung kleinerer Proteine ermöglicht (HANDMAN & JARVIS, 1985).

Schließt sich dem Semidry-Blotting eine Immunfärbung zum spezifischen Nachweis von Allergenen an, erfolgt der Transfer im allgemeinen auf Nitrocellulose (NC)-Membran (siehe Anhang 7.10). Im Gegensatz dazu werden Proteine, welche zu ihrer Identifizierung einer N-terminalen Sequenzierung unterworfen werden sollen, nach WARD et al. (1990) auf Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membranen transferiert, da NC-Membranen gegenüber den zum Edman-Abbau benötigten Reagenzien nicht beständig sind.

Unter einer **Immunfärbung** (**IF**) wird die spezifische Visualisierung von Allergenen auf einer immobilisierenden Membran verstanden, wodurch eine Differenzierung zwischen allergenen und nicht-allergenen Proteinen ermöglicht wird (STOTT, 1989). Um unspezifische Farbreaktionen durch verbleibende freie Bindungsstellen der NC-Membran nach erfolgtem Semidry-Blotting zu unterbinden, werden diese zunächst durch Milchproteine abgesättigt (JOHNSON et al., 1984; AHLROTH et al., 1995). Zur Erhöhung der Sensitivität wird nach der Inkubation mit IgE-Antikörpern aus einem Poolserum (siehe Abb. 3.3, Nr. 1) ein von VIETHS et al. (1992b) entwickeltes Verstärkersystem eingesetzt, wodurch eine Nachweisgrenze von 0.5 ng Protein/mm^2 Membran erreicht wird. Es basiert auf einer Inkubationskaskade aus Anti-Human-IgE vom Kaninchen (Nr. 2), mehrfach biotinyliertem Anti-Kaninchen-IgG aus der Ziege (Nr. 3) und einem Streptavidin-Meerrettichperoxidase (HRP)-Konjugat (Nr. 4).

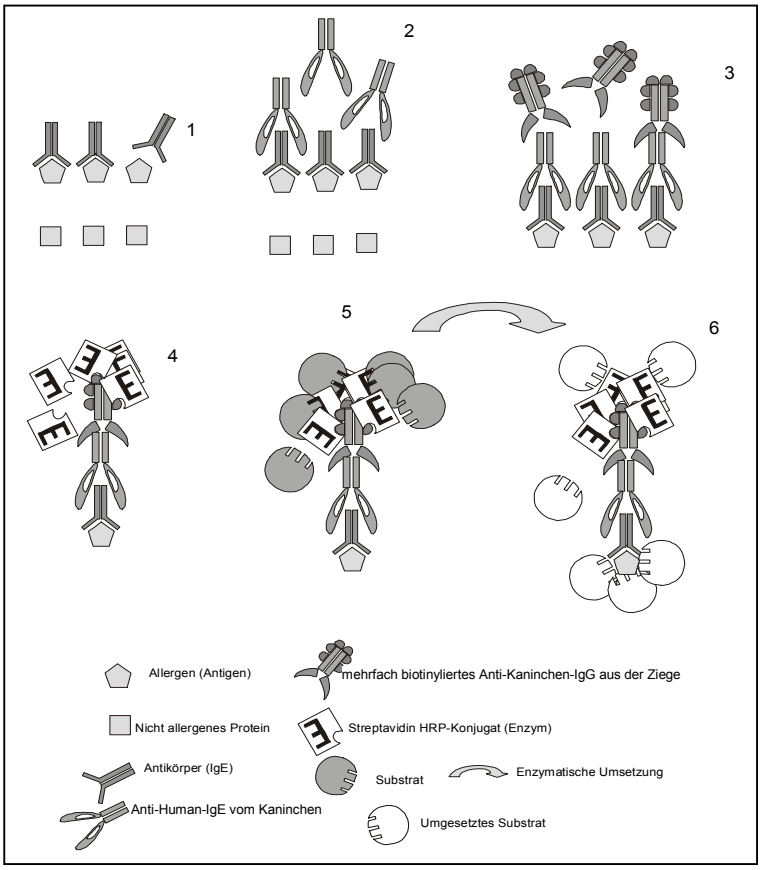


Abb. 3.3: Prinzip der Immunfärbung

Die verstärkende Wirkung resultiert aus der mehrfachen Biotinylierung des IgG, wodurch mehrere Moleküle des Streptavidin-HRP-Konjugates gebunden werden können. Die immunologische Detektion der Allergene erfolgt über eine enzymatische Farbreaktion in der das farblose Substrat 3,3`,5,5`-Tetramethylbenzidin (TMB) in Gegenwart von Dioctylnatriumsulphosuccinat (DONS) und Wasserstoffperoxid infolge der katalytischen Wirkung der HRP zum blaugefärbten Radikalion umgesetzt wird. Selbst unter Lichtausschluss bleibt diese Färbung nur wenige Tage stabil (GALLATI & PRACHT, 1985). Durch Einwirkung von Licht erfolgt die Umsetzung zu einem gelbgefärbten Salz. Die Durchführung der IF erfolgt gemäß Anhang 7.11.

3.11 Proteinvisualisierung

Zur unspezifischen Visualisierung, es werden sowohl allergene als auch nicht-allergene Proteine angefärbt, der elektrophoretisch getrennten Proteine im Acrylamidgel bzw. auf Membranen stehen unterschiedliche Methoden zur Verfügung.

Die gemäß Anhang 7.12.1 durchgeführte **Silberfärbung** (**AgF)** nach HEUKESHOVEN & DERNICK (1986) basiert auf der Reduktion von Silberionen zu elementarem Silber und stellt mit einer Nachweisgrenze von 0.05 bis 0.1 ng Protein/mm^2 die empfindlichste der unspezifischen Färbemethoden für Proteine in Acrylamidgelen dar. Infolge des höheren Normalpotenzials der proteingebundenen Silberionen im Vergleich zu den gelfixierten verläuft die induzierte Reduktion bevorzugt an den proteinassoziierten Silberionen. Ein Nachteil dieser Färbemethode ist jedoch die nur bedingt gegebene Wiederverwendbarkeit der einmal visualisierten Proteine für weitere Untersuchungen. Zwar ist eine Entfärbung möglich, durch die zuvor erfolgte Denaturierung der Proteine können diese jedoch anschließend nur erneut unspezifisch gefärbt werden, stehen für weitere Untersuchungen also nur bedingt zur Verfügung.

Im Gegensatz dazu stellt die **Coomassie-Brilliant-Blue-Färbung (CBBF)** nach FLING & GREGERSON (1986), welche mit einer Nachweisgrenze von etwa 30 ng Protein/mm^2 wesentlich unempfindlicher ist, eine reversible Proteinfärbemethode in Acrylamidgelen dar (Durchführung siehe Anhang 7.12.2). Eine Entfärbung der zuvor durch Anlagerung des Farbstoffes CBB R-250 visualisierten Proteine ist ohne Beeinträchtigung derselben möglich, so dass diese für weitere Untersuchungen uneingeschränkt zur Verfügung stehen.

Neben der Proteindetektion in der Gelmatrix kann die CBBF in Form der unter Anhang 7.12.3 beschriebenen Modifikation nach WARD et al. (1990) ebenfalls zur Visualisierung auf PVDF-Membranen genutzt werden und findet aufgrund der möglichen Entfärbung der Proteine ohne irreversible Schädigung besonders im Bereich der Proteinisolierung häufig Anwendung.

Die unspezifische Proteindetektion der auf NC-Membranen transferierten Proteine erfolgt zum einen durch die kolloidale **Goldfärbung** (**AuF**) nach DANSCHER & NOORGARD (1983). Die selektive Anlagerung von $HAuCl_4$-Molekülen an die Proteine erreicht dabei eine der Silberfärbung vergleichbare Empfindlichkeit (LI et al., 1989). Da die Immunaktivität der Proteine bei dieser Färbemethode erhalten bleibt, steht auch hier die Option zu einer anschließenden Immunfärbung offen (EGGER & BIENZ, 1987). Die Durchführung dieser Methode ist im Anhang unter 7.12.4 dokumentiert.

Als weitere Möglichkeit der unspezifischen Proteinvisualisierung auf NC-Membranen wird die nach HANCOCK & TSANG (1983) modifizierte **Brilliant-Black-Färbung (BBF)** angewandt. Sie basiert ebenfalls auf dem Prinzip der Farbstoffanlagerung und liefert dabei eine nur schwache Hintergrundfärbung und somit eine der AuF vergleichbare Sensitivität. Weitere Vorteile dieser gemäß Anhang 7.12.5 durchgeführten Färbemethode sind der geringe Arbeits- und Kostenaufwand.

3.12 Gelpermeationschromatographie (GPC)

Prinzipiell erscheinen diverse für die Isolierung von Proteinen bereits hinreichend etablierte chromatographische und elektrophoretische Methoden auch zur Isolierung von Allergenen, bei denen es sich um Proteine oder Glykoproteine handelt, geeignet. Hierzu zählen die Gelpermeations-, Ionenaustausch-, Affinitäts- und Umkehrphasenchromatographie sowie die Elektroelution. Da die Isolierung der Allergene sowohl in nativer Form mit möglichst hoher Reinheit als auch in ausreichender Menge erforderlich ist, um einen Einsatz für weitere Untersuchungen zu gewährleisten, ist eine direkte Übertragung der zur Isolierung von Proteinen eingesetzten Methodik jedoch nicht ohne weiteres möglich. Die bisherigen Erfahrungen auf dem Gebiet der Allergenisolierung aus pflanzlichen Lebensmitteln zeigen, dass eine Kombination unterschiedlicher Trennmethoden bzw. die wiederholte Durchführung einzelner Methoden sinnvoll erscheint, um eine erfolgreiche Allergenisolierung zu realisieren.

Die **GPC** ist eine als Säulenchromatographie durchgeführte Flüssigkeitschromatographie, deren Trennprinzip auf der unterschiedlichen Molekülgröße der zu trennenden Substanzen beruht. Die stationäre Phase besteht aus einem gequollenen Netzwerk mit stark variierender Porosität. Als mobile Phase dienen im allgemeinen wässrige Lösungen mit geringen Salzkonzentrationen zur Unterdrückung der Wechselwirkungen zwischen den zu trennenden Substanzen und der stationären Phase. Basierend auf der Permeabilität werden die gelösten Substanzen nach abnehmender Größe eluiert (AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH, 1998).

Zur Trennung der Proteine wird in der vorliegenden Arbeit das Säulenmaterial Sephacryl® S-100 HR der Firma Amersham Pharmacia Biotech (Uppsala, Schweden) eingesetzt. Bei dieser hydrophilen Matrix von hoher mechanischer Stabilität handelt es sich um ein Mischpolymer aus Allyldextran und N,N`-Methylenbisacrylamid mit einer durchschnittlichen Partikelgröße von 50 µm, das besonders für die Trennung von Peptiden und Proteinen mit MG zwischen 1 und 100 kDa geeignet ist. Nähere Angaben in Bezug auf Trennbedingungen, Kalibrierung und Durchführung sind Anhang 7.13 zu entnehmen.

Da erhöhte Konzentrationen an niedermolekularen Substanzen, wie beispielsweise Salzen, die weiteren Untersuchungen einzelner durch die chromatographische Trennung erhaltener Fraktionen erheblich einschränken, schließt sich hieran eine Entsalzung an. Diese erfolgt mittels Slide-A-Lyzer® Dialyse-Kammern der Firma Pierce (Rockford, USA) mit einer Ausschlussgröße von 10 kDa gemäß den Angaben des Herstellers (siehe Anhang 7.14).

3.13 N-terminale Sequenzanalyse

Eine etablierte Methode zur Aminosäuresequenzierung stellt das von EDMAN & BEGG (1967) entwickelte Verfahren der stufenweisen Abspaltung von AS vom N-terminalen Ende eines Proteins dar. Dabei erfolgt zunächst die Kopplung von Phenylisothiocyanat an die endständige AS, die anschließende Abspaltung als Phenylisothiocarbamonylpeptid sowie eine Umwandlung zur stabilen Phenylthiohydantoin-AS. Die Identifizierung dieser Derivate wird mittels RP-HPLC/UV durchgeführt. Die zyklisch ablaufende Reaktion unterliegt einer Limitierung von maximal 50 Durchläufen, da eine Auswertung mit fortschreitendem Abbau stark erschwert ist, und setzt eine Mindestmenge von 80 pmol Protein voraus.

Für die Sequenzanalyse werden die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine auf eine PVDF-Membran transferiert und anschließend mittels CBBF visualisiert (siehe 3.10 bzw. 3.11 in Verbindung mit 7.10 bzw. 7.12.2). Die zu sequenzierenden Banden werden anschließend ausgeschnitten und in Zusammenarbeit mit der Abteilung für Biochemie der Universität Hamburg bzw. dem Institut für Zellbiochemie und klinische Neurobiologie des UKE einer N-terminalen Sequenzanalyse unterzogen.

4 Ergebnisse

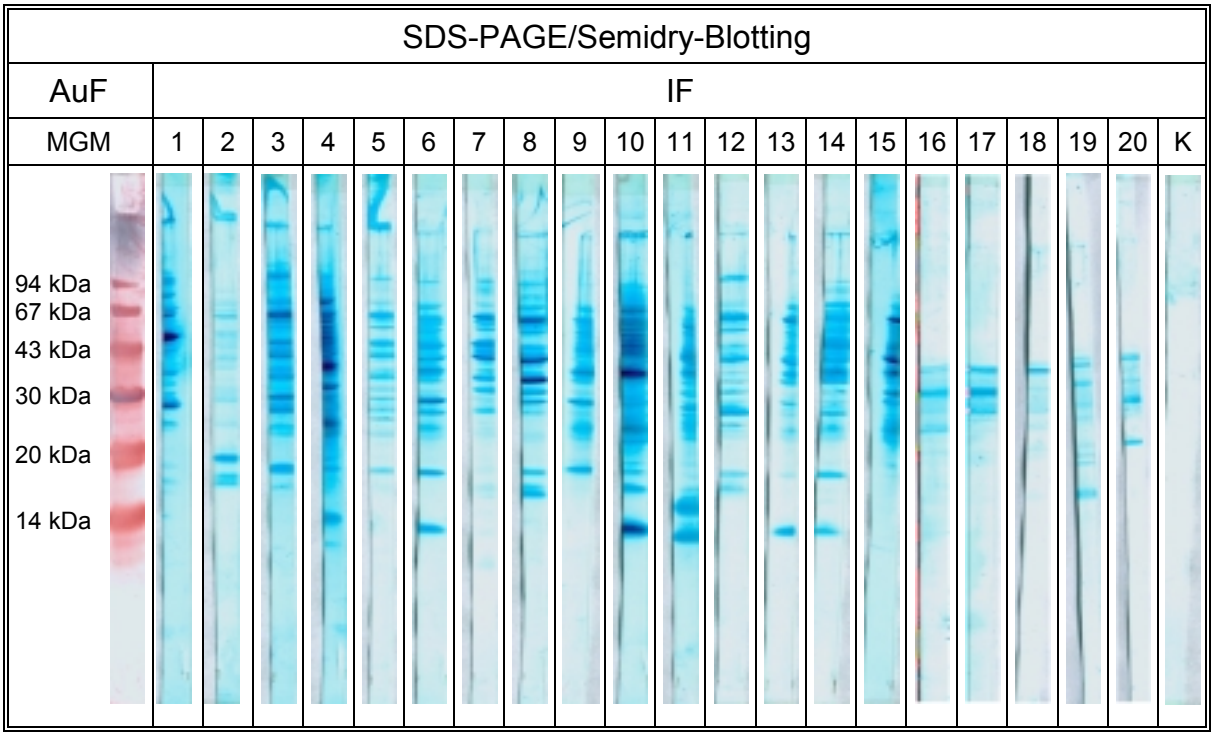
4.1 Gartenerbse

4.1.1 Charakterisierung der Gartenerbsenallergene

Die Charakterisierung der Allergene der Gartenerbse erfolgt anhand eines aus den nativen Samen der Sorte „Maxigolt“ hergestellten Extraktes.

Zur Bestimmung der MG der Allergene erfolgt die Inkubation eines durch SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennten und anschließend mittels Semidry-Blotting auf eine NC-Membran transferierten Proteinextraktes mit Einzelseren von insgesamt 39 Patienten, welche nachweislich eine Sensibilisierung gegen Gartenerbsen aufweisen. Eine Untersuchung mittels EAST ergibt für 24 Seren spezifische IgE-Gehalte ≤ 0.7 U/ml (EAST-Klasse 0 bzw. 1) und für 15 Seren Werte ≥ 0.7 U/ml (EAST-Klassen 2 bis 4). Nähere Angaben siehe Tab. 7.1 in Anhang 7.2.

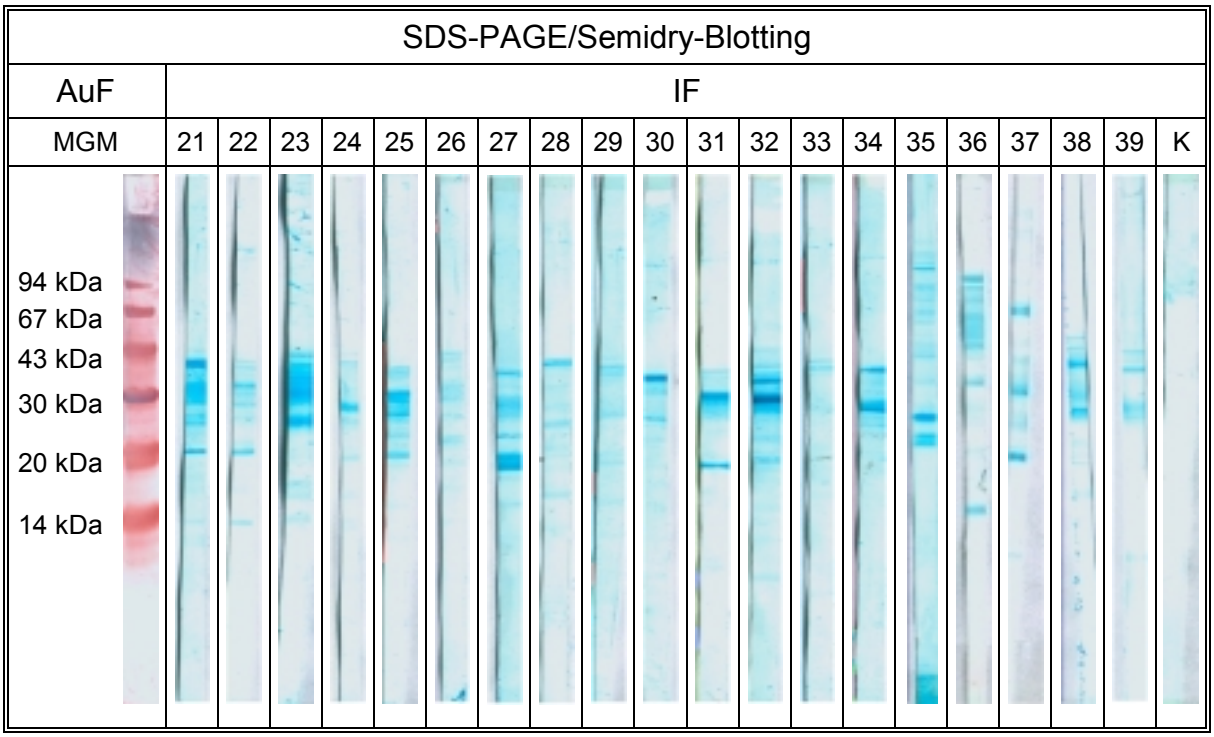
Zur Detektion unspezifischer Bindungen erfolgt zusätzlich die Inkubation eines NC-Streifens mit einem Kontrollserum (K). Hierbei handelt es sich um das Serum eines nicht-Atopikers (EAST-Klasse 0). Die Zuordnung der MG der einzelnen Allergene erfolgt über einen definiert zusammengesetzten MGM, dessen Visualisierung anhand einer AuF erfolgt. Die IF aller Einzelseren erfolgt in den Abbildungen 4.1 bzw. 4.2.



MGM: Molekulargewichtsmarker K: Kontrolle

1: CF 2: NB 3: CG 4: KDH 5: HK 6: RK 7: KL 8: CL 9: EP 10: FR
11: FS 12: HS 13: SW 14: UW 15: JW 16: HR 17: IS 18: MS 19: HM 20: LS

Abb. 4.1: IF der Gartenerbsensorte „Maxigolt“ unter Verwendung der Einzelseren 1 – 20



MGM: Molekulargewichtsmarker K: Kontrolle

21: SK 22: LB 23: RD 24: EH 25: IO 26: UR 27: PK 28: BW 29: MW 30: HS
31: JMA 32: SB 33: IC 34: AD 35: JHE 36: JK 37: EK 38: PE 39: DS

Abb. 4.2: IF der Gartenerbsensorte „Maxigolt“ unter Verwendung der Einzelseren 21 - 39

Aus den Abbildungen 4.1 bzw. 4.2 wird deutlich, dass sowohl in Bezug auf die Häufigkeit als auch die Intensität der Detektion der insgesamt 16 unterschiedlichen sichtbaren Allergene erhebliche Differenzen zwischen den Einzelseren auftreten. Es fällt weiterhin auf, dass die Patientenseren, welche höhere spezifische IgE-Gehalte aufweisen grundsätzlich eine intensivere Allergendetektion ermöglichen. Aus diesem Grund wird in allen folgenden Untersuchungen ein Poolserum verwendet, das sich lediglich aus den Seren Nr. 1 bis Nr. 15, welche IgE-Gehalte zwischen 0.85 und 19.84 U/ml aufweisen, zusammensetzt. Somit wird die hinreichende Detektion aller Gartenerbsenallergene gewährleistet. Zur Betrachtung der Relevanz einzelner Gartenerbsenallergene erfolgt die Zusammenstellung der Detektionshäufigkeit in Abhängigkeit vom MG in Abbildung 4.3.

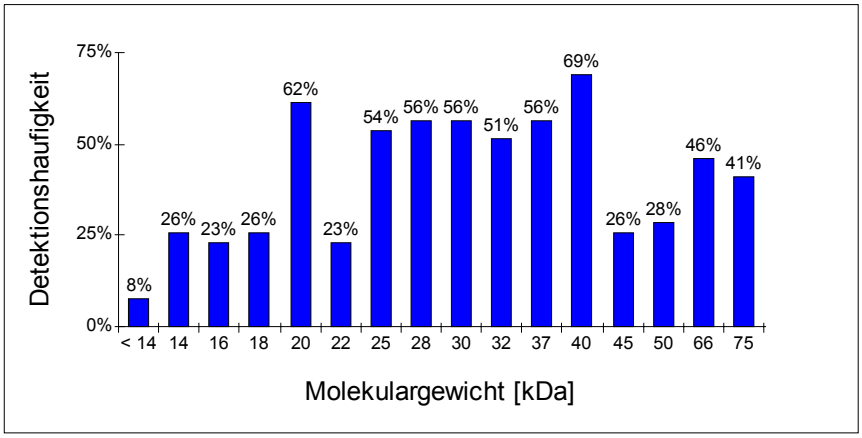


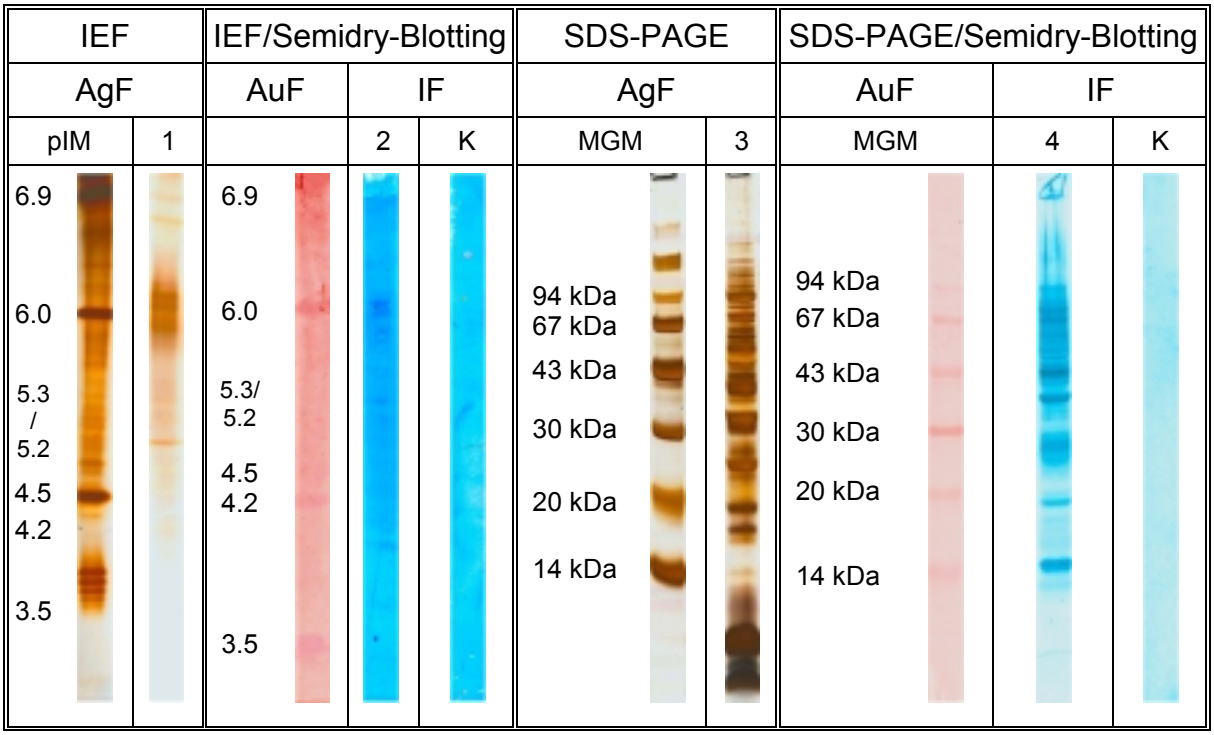
Abb. 4.3: Detektionshäufigkeit der Gartenerbsenallergene

Da die Allergene mit MG von 20, 25, 28, 30, 32, 37 und 40 kDa mit einer Häufigkeit > 50 % detektiert werden, kommt diesen Allergenen in Bezug auf das eingesetzte Patientengut die größte immunologische Bedeutung zu.

Eine Verallgemeinerung hinsichtlich der tatsächlich vorherrschenden Relevanz dieser IgE-bindenden Proteine ist aufgrund der lediglich 39 Patienten umfassenden Studie jedoch nicht möglich. Es ist jedoch zu vermuten, dass es sich um Hauptallergene handelt.

Des weiteren werden vier niedermolekulare Allergene mit MG von 14, 16, 18 bzw. 22 kDa sowie ebenfalls vier Allergene mit höheren MG (45, 50, 66 und 75 kDa) mit einer Häufigkeit zwischen 10 und 50 % detektiert. Bedingt durch die z. T. starke Anfärbung, welche im allgemeinen mit der Bindungskraft der IgE-Antikörper an die Epitope einhergeht, besitzen auch diese Allergene Bedeutung für die Gesamtallergenität der Gartenerbse. Lediglich das Allergen mit einem MG < 14 kDa, welches von drei Patienten (4, 7, 32) detektiert wird, kann als Minorallergen eingestuft werden.

Die Bestimmung der pI der Gartenerbsenallergene erfolgt anhand eines nativen Extraktes der Gartenerbsensorte „Maxigolt“ mittels IEF in einem pH-Bereich von 3 bis 7. Nach elektrophoretischer Trennung wird einerseits mittels AgF eine Visualisierung aller Proteine des nativen Extraktes sowie des pI-Markers durchgeführt. Andererseits erfolgt der Transfer auf eine NC-Membran und die anschließende IF unter Verwendung des Gartenerbsen-Poolserums zur Detektion der Allergene in Abhängigkeit ihrer pI. Der pI-Marker wird in diesem Fall durch die AuF angefärbt. Die Darstellungen dieser Färbungen sind in Abbildung 4.4 dokumentiert.



MGM: Molekulargewichtsmarker pIM: pI-Marker 1 - 4: Gartenerbse „Maxigolt“ K: Kontrolle

Abb. 4.4: AgF und IF nach IEF bzw. SDS-PAGE der Gartenerbsensorte „Maxigolt“

Der mittels SDS-PAGE getrennten und silbergefärbten Extrakt (3) weist verschiedene Proteinbanden im MG-Bereich < 14 kDa bis > 94 kDa auf. Neben diffusen Anfärbungen im höhermolekularen Bereich können Proteine mit MG < 14, 18, 20, 25, 30, 32, 37, 40, 55, 70 und 94 kDa eindeutig zugeordnet werden.
Die IF (4) zeigt die sechzehn bereits durch die Einzelseren-Anfärbung detektierten Allergene in stark variierender Intensität. So werden die Allergene mit MG von 14, 20, 25, 28, 37, 40, 45, 50, 66 und 75 kDa mit mittlerer bzw. starker Intensität nachgewiesen. Dagegen sind die Banden der Allergene mit MG < 14, 16, 18, 22, 30 und 32 kDa wesentlich schwächer angefärbt. Das K zeigt keine Banden, so dass unspezifische Bindungen ausgeschlossen werden können.

Der native Proteinextrakt der Gartenerbsensorte „Maxigolt“, welcher mittels IEF getrennt und durch die Silberfärbung visualisiert worden ist (1), zeigt insgesamt acht Proteine im neutralen und sauren Bereich. Dabei handelt es sich um drei diskret vorliegende Banden mit pI von 6.9, 6.7 und 4.8. Weiterhin können vier diffuse Banden im Bereich von pH 6.2 bis 5.9 sowie eine weitere mit einem pI von 5.3 angefärbt werden. Mittels IF nach zuvor erfolgter IEF (2) können vier dieser Banden mit pI von 6.1, 6.0, 5.9 sowie 5.3 als IgE-bindende Proteine charakterisiert werden. Neben diesen drei im neutralen bis leicht sauren Bereich vorliegenden Allergenen kann zusätzlich ein Allergen mit einem pI von 4.0 detektiert werden, welches in der Silberfärbung nicht detektiert wird. Da auch hier das K keine Anfärbungen zeigt, können unspezifische Bindungen wiederum ausgeschlossen werden.

4.1.2 Reifungseinfluss

Um eine potenzielle Abhängigkeit der Allergenität im Verlauf der Reifung von Gartenerbsen nachweisen zu können, wird ein Reifungsversuch mit fünf Gartenerbsensorten durchgeführt, wobei im folgenden lediglich die Ergebnisse der Sorte „Maxigolt“ (MA) dargestellt sind. Aufgrund der Konzeption der Anpflanzung ist die Ernte nach unterschiedlichen Reifungszeiten gewährleistet.

Es werden insgesamt jeweils ca. 100 g Gartenerbsensamen nach 70, 77, 84 bzw. 91 Tagen geerntet. Anschließend wird der jeweilige Mittelwert des Samengewichtes bestimmt und für alle weiteren Untersuchungen lediglich Samen mit einer maximalen Gewichts-Standardabweichung von 0.05 g verwendet. Sowohl die Trockenmassen (siehe Anhang 7.4) als auch die Gesamtstickstoffgehalte (siehe Anhang 7.5) der einzelnen Reifungsstufen (RS) werden bestimmt (Ergebnisse siehe Tabelle 4.1). Die Darstellung der Gesamtproteinmuster mittels AgF nach zuvor durchgeführter SDS-PAGE, sowie des Allergenspektrums mittels IF (siehe Abbildung 4.5) nach SDS-PAGE/Semidry-Blotting erfolgt an mittels TTE (siehe Anhang 7.3.1) erhaltenen Gesamtproteinextrakten. Die relative Quantifizierung der allergenen Potenziale dieser Extrakte erfolgt durch EAST-Inhibition (C_{50}-Werte siehe Tabelle 4.1 bzw. Anhang 7.5) unter Verwendung eines festphasengebundenen Extraktes der RS 4.

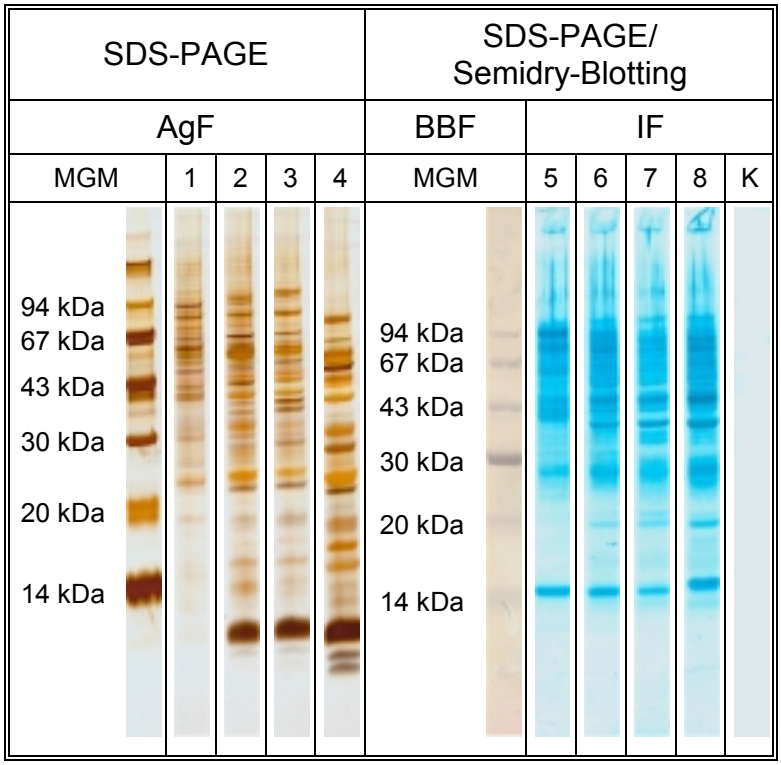
Tab. 4.1: Grundanalytische Kenndaten und C_{50}-Werte der RS

Reifungszeit [d]	Gewicht [g]	Wassergehalt [%]	Proteingehalt [%]	C_{50}-Werte [µg/ml]
70	0.21	80.4	5.9	7.5
77	0.59	72.1	7.6	3.5
84	0.84	60.6	10.0	1.4
91	1.11	49.5	10.9	0.7

Die gemittelten Einzelgewichte der untersuchten RS zeigen eine kontinuierliche Gewichtszunahme, wobei die RS 1 ein durchschnittliches Gewicht von 0.21 g aufweist, die RS 4 mit 1.11 g diesen Wert um das fünffache übersteigt. Anhand der grundanalytischen Daten ist weiterhin festzustellen, dass der Wassergehalt im Verlauf der Reifung von 80.4 % auf 49.5 % beständig abnimmt, wohingegen eine stetige Zunahme des Proteingehaltes von ursprünglich 5.9 % auf 10.9 % festzustellen ist. Die C_{50}-Werte der EAST-Inhibition zeigen fallende Werte von 7.5 µg/ml der RS 1 auf 0.7 µg/ml für die vierte RS (siehe Tab. 4.1), wodurch ein zunehmendes allergenes Potenzial im Verlauf der Reifung angezeigt wird.

Der elektrophoretisch getrennte und anschließend silbergefärbte Gesamtproteinextrakt der ersten RS (Abb. 4.7, 1) zeigt diverse Banden im MG-Bereich zwischen 20 und 94 kDa. Alle charakteristischen Banden < 67 kDa dieses Extraktes werden ebenfalls in den RS 2 bis 4 (Abb. 4.7, 2 - 4) detektiert. Darüber hinaus zeigen diese Extrakte mit zunehmender Reifungsdauer eine steigende Anzahl an Proteinen mit MG < 20 kDa sowie eine Zunahme der Detektionsintensität verschiedener Proteine.

Ein ähnliches Bild zeigen die IF der RS 1 bis 4 (Abb. 4.7, 5 - 8). So werden im Gesamtproteinextrakt der ersten RS (5) bereits sechs diskrete Allergene mit MG von 14, 28, 40, 45, 66 und 75 kDa detektiert. Darüber hinaus sind unspezifische Färbungen im höhermolekularen Bereich erkennbar. Im Vergleich dazu wird lediglich die 66-kDa-Bande in den folgenden RS (6 - 8) nicht detektiert, alle weiteren Allergene werden mit zunehmender Intensität detektiert. Zusätzlich werden IgE-bindende Proteine mit MG von 22 bzw. 37 kDa (6 - 8), < 14 kDa (7, 8) sowie 16 und 18 kDa (8) detektiert.



MGM: Molekulargewichtsmarker K: Kontrolle
1, 5: RS 1 2, 6: RS 2 3, 7: RS 3 4, 8: RS 4

Abb. 4.5: AgF und IF der RS 1 - 4

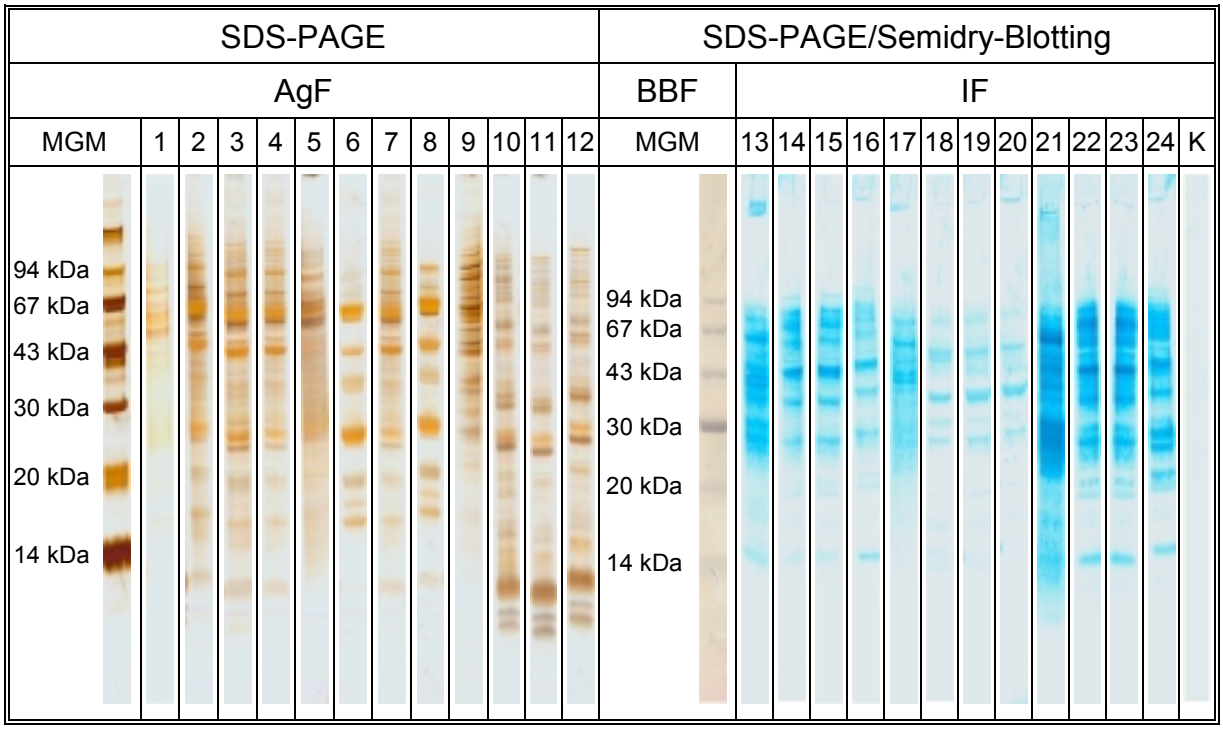
Unspezifische Bindungen können ausgeschlossen werden, da die mit dem Serum eines nicht-Atopikers inkubierte NC-Membran (K) keine Anfärbungen zeigt.
Sowohl die zunehmende Anzahl an Allergenen als auch die steigende Bindungskapazität der einzelnen IgE-bindenden Proteine sowie die mittels EAST-Inhibition ermittelten sinkenden C_{50}-Werte bestätigen den Anstieg der Allergenität im Verlauf der Reifung.

Um die Zuordnung der Allergene auf die Proteinfraktionen Glutelin, Globulin und Albumin vornehmen zu können und somit eine Lokalisierung der Allergene zu ermöglichen, wird eine FE aller RS nach Anhang 7.3.2 durchgeführt. Von den Einzelfraktionen werden die Anteile am Gesamtproteingehalt (siehe Tab. 4.2), das Gesamtprotein- und Allergenspektrum (siehe Abb. 4.6) sowie die allergene Potenz bestimmt (siehe Tab. 4.3).

Tab. 4.2: Anteile der Proteinfraktionen

Reifungszeit [d]	Gluteline [%]	Globuline [%]	Albumine [%]
70	19.8	61.2	19.0
77	18.7	58.5	22.8
84	15.4	53.1	31.5
91	21.5	48.3	30.3

Die Berechnung der Anteile der einzelnen Proteinfraktionen am Gesamtproteingehalt ergibt für die Gluteline Werte zwischen 15.4 und 19.8 %, wobei ein tendenzieller Verlauf hinsichtlich der Reifung nicht ermittelt werden kann. Im Gegensatz dazu steigt der Albuminanteil im Verlauf der Reifung von ursprünglich 19.0 auf 30.3 % an und nimmt der Globulinanteil von 61.2 auf 48.3 % ab.



MGM: Molekulargewichtsmarker K: Kontrolle

1, 13: Gluteline, RS 1 2, 14: Gluteline, RS 2 3, 15: Gluteline, RS 3 4, 16: Gluteline, RS 4
5, 17: Globuline, RS 1 6, 18: Globuline, RS 2 7, 19: Globuline, RS 3 8, 20: Globuline, RS 4
9, 21: Albumine, RS 1 10, 22: Albumine, RS 2 11, 23: Albumine, RS 3 12, 24: Albumine, RS 4

Abb. 4.6: AgF und IF der Proteinfraktionen der RS 1 - 4

Die Silberfärbung der Glutelin-Fraktion der RS 1 (1) zeigt bei einer insgesamt nur schwachen Färbung lediglich drei Proteine im MG-Bereich von 43 bis 75 kDa. Im Vergleich dazu wird in den Glutelin-Fraktionen der höheren RS (2 - 4) eine Vielzahl von Proteinen im MG-Bereich von 14 kDa bis 94 kDa detektiert. Ein tendenzieller Anstieg der Detektionsintensitäten bzw. der Anzahl der sichtbaren Proteine in den Glutelin-Fraktionen mit zunehmender Reifung ist nicht feststellbar. Ähnliche Verhältnisse liegen sowohl in den silbergefärbten Globulin- (5 - 8) als auch den Albumin-Fraktionen (9 - 12) vor. So ist für die Gluteline bzw. Albumine, besonders beim Übergang von der jeweils ersten zur zweiten RS, eine steigende Anzahl der detektierten Proteine sowie eine verstärkte Detektionsintensität feststellbar. Die charakteristischen Proteinbanden der Globulin-Fraktionen weisen MG von 24, 40, 45 und 66 kDa, die der Albumin-Fraktionen von < 14, 14, 25 und 32 kDa auf.

Die IF aller vier RS der Glutelin-Fraktionen (13 - 16) weisen IgE-bindende Proteine mit MG von 14, 28, 40 und 45 kDa auf. Darüber hinaus werden lediglich in den RS 2 bis 4 (14 - 16) Allergene mit MG von 20 bzw. 75 kDa und in den RS 3 und 4 (15, 16) ein Allergen mit einem MG von 22 kDa detektiert. Im Gegensatz zur AuF weist bei der spezifischen Allergendetektion jedoch die RS 1 (13) die höchste Detektionsintensität auf, die übrigen RS (14 - 16) unterscheiden sich nicht.

Die IF der Globulin-Fraktionen (17 – 20) weisen insgesamt die geringste Färbung aller Einzelproteinfraktionen auf, wobei diskrete Banden bei 28, 32, 40, 50 und 75 kDa detektiert werden. Die Detektionsintensität verhält sich vergleichbar den Glutelin-Fraktionen. Im Gegensatz dazu weisen die Albumin-Fraktionen die stärksten Färbungen auf. In allen Extrakten (20 - 24) werden Allergene mit MG von 14, 28, 32, 40, 45 und 66 kDa detektiert. Darüber hinaus enthalten die RS 2 bis 4 (21 - 24) IgE-bindende Proteine mit MG von 20, 22 und 75 kDa. Unspezifische Anfärbungen sind lediglich in der IF der ersten RS (20) erkennbar, wohingegen das K keine unspezifischen Bindungen zeigt.

Zur relativen Quantifizierung der allergenen Potenz der zwölf Einzelproteinfraktionen wird eine EAST-Inhibition unter Verwendung eines mittels TTE hergestellten festphasengebundenen Gesamtproteinextraktes der RS 4 und der jeweiligen Einzelproteinfraktion als Inhibitorextrakt durchgeführt (siehe Tab. 4.3 bzw. Anhang 7.6).

Tab. 4.3: C_{50}-Werte der Einzelproteinfraktionen in [µg/ml]

RS	Gluteline	Globuline	Albumine
1	1.0	4.8	0.5
2	0.9	3.3	1.0
3	0.8	3.5	0.3
4	0.6	2.0	0.2

Insgesamt weisen alle zwölf untersuchten Einzelproteinfraktionen niedrige C_{50}-Werte und damit hohe allergene Potenziale auf. Im Verlauf der Reifung nehmen die Allergenitäten dabei stetig zu, die einzige Ausnahme bildet der Übergang von Albumin-Fraktion 2 zu 3. Den jeweils geringsten Anteil zur Gesamtallergenität einer RS trägt die Globulin-Fraktion, den höchsten die Albumin-Fraktion bei, so dass Übereinstimmungen zu den mittels IF ermittelten Ergbnissen vorliegen. Die weiteren vier unter-suchten Sorten weisen vergleichbare Ergebnisse auf (nicht dargestellt).

4.1.3 Sortenvergleich

Ein potenzieller Sorteneinfluss auf das allergene Potenzial der Gartenerbse wird anhand der fünf Sorten „Kleine Rheinländerin“ (KR), „Allerfrüheste Mai“ (AM), „Maxigolt“ (MA), „Sprinter“ (SP) und „Wunder von Kelvedon“ (WK) überprüft. Die Untersuchungen werden an jeweils 30 g der voll ausgereiften Samen eines Anbauversuches durchgeführt.

Neben der Bestimmung des Mittelwertes der Stückgewichte der Samen werden der Wasser- und Gesamtstickstoffgehalt ermittelt, um durch Reifungsunterschiede hervorgerufene Allergenitäts-Unterschiede ausschließen zu können (Ergebnisse siehe Tab. 4.4). Weiterhin erfolgt die Darstellung des Gesamtprotein- und des Allergenmusters (siehe Abbildung 4.7). Zur relativen Quantifizierung des allergenen Potenzials durch EAST-Inhibition (C_{50}-Werte siehe Tabelle 4.5) werden die jeweils festphasengebundenen Extrakte der einzelnen Sorten mit allen anderen Sorten inhibiert.

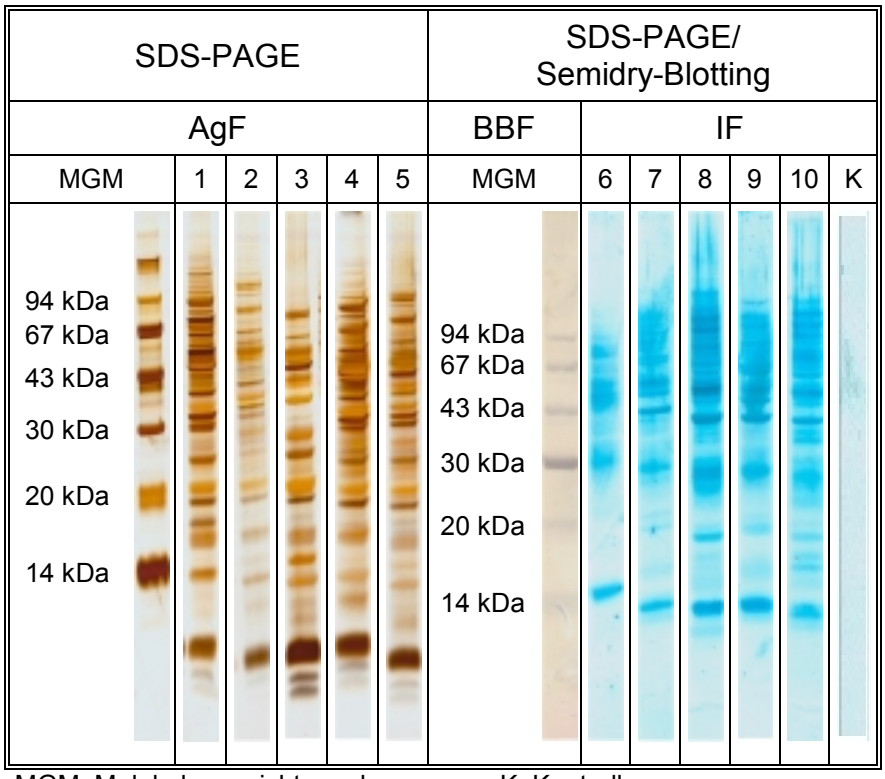
Tab. 4.4: Kenndaten der Gartenerbsensorten

Sorte	Stückgewicht [g]	Wassergehalt [%]	Proteingehalt [%]
KR	1.10	56.0	11.2
AM	0.65	48.9	10.9
MA	1.11	49.5	10.9
SP	1.05	65.1	8.3
WK	0.80	69.4	9.4

Die grundanalytischen Kenndaten der einzelnen Gartenerbsensorten weisen sowohl bezüglich des gemittelten Stückgewichtes der Einzelsamen als auch hinsichtlich der Wasser- und Proteingehalte starke Schwankungen auf. Dabei ist jedoch der zu erwartende Zusammenhang, dass Samen mit geringerem Stückgewicht höhere Wasser- und niedrigere Proteingehalte aufweisen, nicht gegeben. Es lassen sich aus den ermittelten Werten keine Zusammenhänge über die tendenziellen Verknüpfungen der einzelnen Kenngrößen ableiten.

Die in Abbildung 4.7 dargestellten unspezifischen Anfärbungen der Gesamtproteinextrakte (1 - 5) sowie die spezifischen Darstellungen der Allergenspektren (6 - 10) der fünf Gartenerbsensorten weisen grundsätzlich starke Ähnlichkeiten auf. Lediglich die Sorte AM (2) zeigt ein weniger differenziertes und mit verminderter Intensität hervortretendes Proteinspektrum. In allen weiteren untersuchten Sorten (1, 3, 4, 5) werden die charakteristischen Proteine mit MG < 14, 16, 20, 25, 30, 32, 37, 40, 70 und 94 kDa in unterschiedlicher Intensität sichtbar.

Für sämtliche der fünf Gartenerbsensorten werden durch die spezifische IF (6 - 10) Allergene mit MG von 14, 30, 40, 50 und 75 kDa angefärbt. Darüber hinaus weisen mit Ausnahme der Sorte KR (6), welche sowohl bezüglich der Detektionsintensität als auch des Allergenspektrums gegenüber den übrigen Sorten abfällt, alle weiteren Extrakte Allergene mit MG von 16, 18, 28, 32, 37, 45 und 66 kDa auf. Die Intensität der Detektion der einzelnen Banden ist starken Schwankungen unterworfen. Das Auftreten unspezifischer Bindungen kann durch die Inkubation mit dem K ausgeschlossen werden.



MGM: Molekulargewichtsmarker K: Kontrolle
1, 6: „Kleine Rheinländerin“ 2, 7: „Allerfrüheste Mai“
3, 8: „Maxigolt“ 4, 9: „Sprinter“ 5, 10: „Wunder von Kelvedon“

Abb. 4.7: AgF und IF der Gartenerbsensorten

Insgesamt ist ein vergleichbares allergenes Potenzial der untersuchten Sorten mit Ausnahme der Varietät KR zu erwarten. Um diese Hypothese zu überprüfen, wird eine EAST-Inhibition durchgeführt, bei der sämtiche Sorten sowohl als festphasengebundener als auch als inhibierender Extrakt eingesetzt werden. Durch Vergleich der jeweiligen Kombinationen können anschließend Allergenitätsunterschiede ermittelt werden. Aufgrund der unterschiedlichen Proteingehalte der jeweils zur Kopplung der Allergenscheiben eingesetzten Extrakte (siehe auch Anhang 7.7 bzw. 7.8) der unterschiedlichen Sorten ist jedoch lediglich der horizontale Vergleich von unter gleichen Bedingungen hergestellten festphasengekoppelten Extrakten möglich.

Tab. 4.5: C_{50}-Werte Sortenvergleich Gartenerbse [µg/ml]

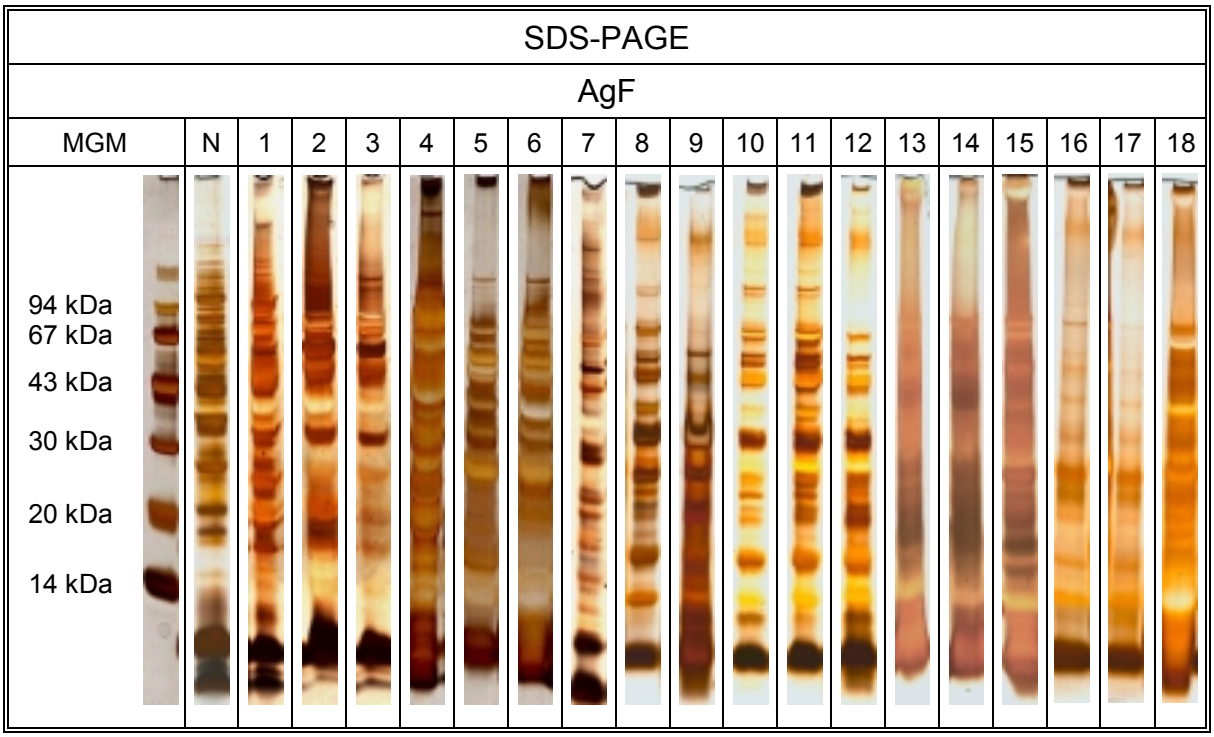
	Inhibitor				
Festphase	KR	AM	MA	SP	WK
„Kleine Rheinländerin“ (KR)	8.2	6.8	1.2	9.2	10.4
„Allerfrüheste Mai“ (AM)	7.8	5.7	10.4	6.0	7.4
„Maxigolt“ (MA)	11.3	4.9	6.5	9.1	15.6
„Sprinter“ (SP)	12.2	4.0	5.4	7.7	3.9
„Wunder von Kelvedon“ (WK)	5.2	10.8	8.0	6.5	7.6

Die ermittelten C_{50}-Werte (siehe Tabelle 4.5) der einzelnen Sorten weisen generell sehr ähnliche Größenordnungen auf, wobei Abweichungen durch Messwertschwankungen begründet sind. Somit kann die anhand der IF zu vermutende geringere Allergenität der Gartenerbsensorte KR durch die EAST-Inhibition nicht bestätigt werden. Lediglich die Inkubation der festphasengebundenen Sorte KR mit der Sorte MA ergibt mit einem C_{50}-Wert von 1.2 µg/ml einen signifikant kleineren Wert als alle übrigen C_{50}-Werte dieser festphasengekoppelten Sorte, welche zwischen 6.8 und 10.4 µg/ml liegen. Da die Inhibitorextrakte der Sorte MA jedoch in den weiteren Inhibitionsversuchen keine Abweichungen von den übrigen Werten zeigen, kann nicht von einem höheren allergenen Potenzial dieser Gartenerbsensorte ausgegangen werden.

4.1.4 Untersuchung von Handelsprodukten

Die Untersuchung von Handelsprodukten gibt grundlegende Hinweise auf den Einfluss der Verarbeitung auf die Stabilität der Gartenerbsenallergene. Dabei werden in Anlehnung an die industriell durchgeführten Konservierungsverfahren hauptsächlich thermische Einflüsse untersucht, so dass neben Trockenerbsen (TE) und Tiefkühlerbsen (TKE) die Untersuchung von Glaskonservenerbsen (GKE) und Dosenkonservenerbsen (DKE) erfolgt. Zum einen werden die Produkte ohne Vorbehandlung (oV) zum anderen nach Zubereitung (nZ) gemäß Herstellerangaben untersucht. Weiterhin erfolgt die Untersuchung der bei der Zubereitung anfallenden Kochwässer (KW), um einen möglichen Übergang der Allergene auf Grund ihrer Wasserlöslichkeit zu ermitteln.

Die mittels TTE isolierten Proteine werden elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend mittels AgF (siehe Abb. 4.8) unspezifisch bzw. mittels IF (siehe Abb. 4.9) spezifisch detektiert. Weiterhin wird die Bestimmung des allergenen Potenzials mittels EAST-Inhibition (siehe Tab. 4.6, Seite 46) durchgeführt. Nähere Angaben zu den untersuchten Handelsprodukten, weiteren Zutaten, sowie der Zubereitung gibt die Tabelle 7.2 in Anhang 7.6.



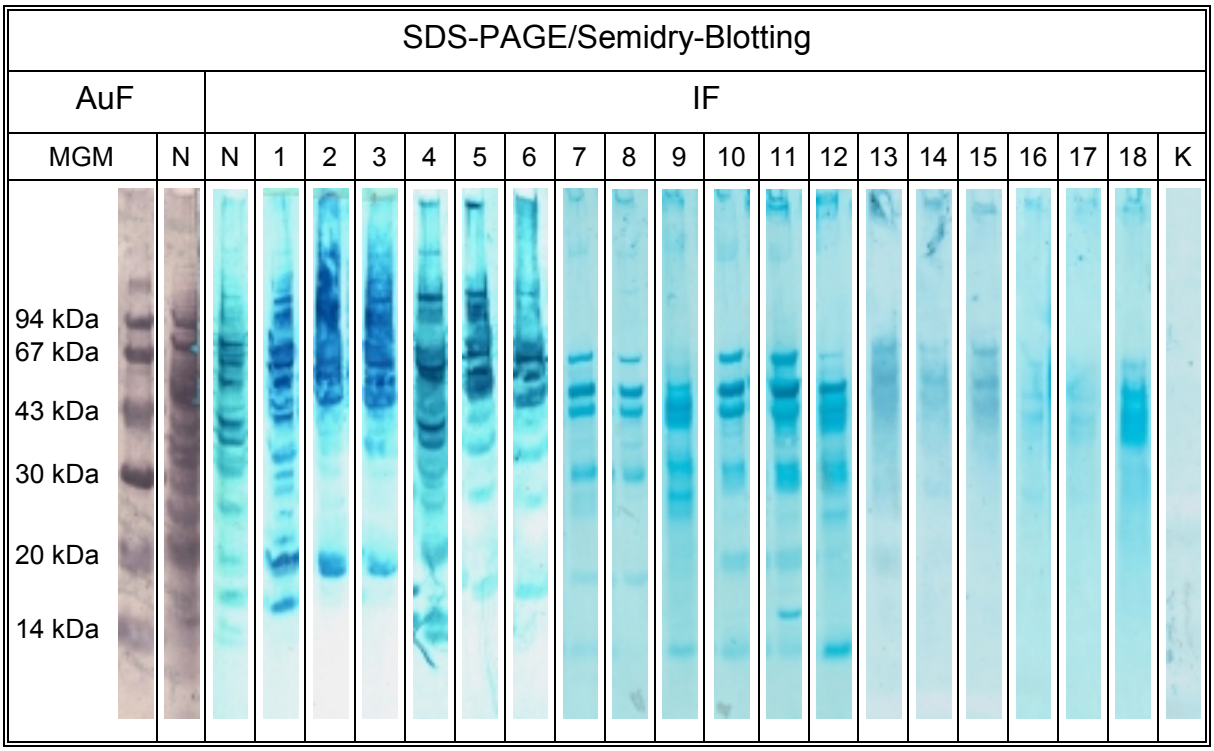
MGM: Molekulargewichtsmarker N: native Gartenerbse

1: TE 1 (oV)	2: TE 1 (nZ)	3: TE 1 (KW)	4: TE 2 (oV)	5: TE 2 (nZ)	6: TE 2 (KW)
7: TKE 1 (oV)	8: TKE 1 (nZ)	9: TKE 1 (KW)	10: TKE 2 (oV)	11: TKE 2 (nZ)	12: TKE 2 (KW)
13: GKE (oV)	14: GKE (nZ)	15: GKE (KW)	16: DKE (oV)	17: DKE (nZ)	18: DKE (KW)

Abb. 4.8: AgF der Handelsprodukte nach SDS-PAGE

Sämtliche in Abb. 4.8 dargestellten AgF zeigen eine Vielzahl von Proteinen im MG-Bereich < 14 kDa bis 94 kDa. Dabei weisen die ohne weitere Verarbeitung aufgetragenen Extrakte der TE (1, 4) ein der nativen Gartenerbse (N) vergleichbares

Bandenmuster auf. Auch die jeweiligen erhitzten Produkte (2, 5) und die bei der Erhitzung erhaltenen KW (3, 6) zeigen eine Vielzahl von Proteinbanden, wobei jedoch besonders im MG-Bereich von 20 bis 43 kDa eine deutlich geringere Anzahl an detektierten Banden festzustellen ist. In den Extrakten 7 und 10, es handelt sich dabei um die ohne weitere Verarbeitung aufgetragenen TKE-Extrakte, werden deutlich weniger Proteinbanden detektiert. Im Vergleich dazu zeigen die jeweiligen erhitzten Produkte (8, 11) sowie die KW (9, 12) ein ähnliches Bandenmuster.
Sowohl die ohne weitere Vorbehandlung untersuchte DKE als auch die GKE (13, 16) zeigt lediglich diffuse Anfärbungen, ohne dass diskrete Banden detektiert werden. Eine Veränderung des Bandenmusters nach Erhitzung (14, 17) bzw. in den KW (15, 18) ist nicht feststellbar.



MGM: Molekulargewichtsmarker N: native Gartenerbse K: Kontrolle

1: TE 1 (oV)	2: TE 1 (nZ)	3: TE 1 (KW)	4: TE 2 (oV)	5: TE 2 (nZ)	6: TE 2 (KW)
7: TKE 1 (oV)	8: TKE 1 (nZ)	9: TKE 1 (KW)	10: TKE 2 (oV)	11: TKE 2 (nZ)	12: TKE 2 (KW)
13: GKE (oV)	14: GKE (nZ)	15: GKE (KW)	16: DKE (oV)	17: DKE (nZ)	18: DKE (KW)

Abb. 4.9: IF der Handelsprodukte nach SDS-PAGE/Semidry-Blotting

Bestätigung erfahren diese Ergebnisse durch eine IF derselben Extrakte, welche in Abbildung 4.9 dargestellt ist. So zeigen die Extrakte 1 und 4, es handelt sich hierbei um die ohne weitere Verarbeitung untersuchten Extrakte der TE, ein der nativen Erbse vergleichbares Allergenmuster. Auch hier ist ein deutlicher Verlust an niedermolekularen IgE-bindenden Proteinen durch Erhitzung (2, 5) feststellbar, da in diesen Extrakten lediglich das 20-kDa-Allergen detektiert wird.
Da in den KW (3, 6) ausschließlich dieses niedermolekulare Allergen sichtbar wird, kann ausgeschlossen werden, dass ein Übergang anderer wasserlöslicher Allergene stattgefunden hat. Im höhermolekularen Bereich > 43 kDa weisen die Extrakte ein den ohne weitere Verarbeitung aufgetragenen Extrakten vergleichbares Bild auf.

Bei den TKE weisen bereits die ohne weitere Verarbeitung untersuchten Extrakte 7 und 10 ein vermindertes Allergenspektrum auf, wobei wiederum eine Ausdünnung im MG-Bereich < 43 kDa festzustellen ist. Da weder die zubereiteten Handelsprodukte (8, 11) noch die dabei erhaltenen KW (9, 12) eine deutliche Veränderung im Allergenspektrum zeigen, ist eine weitgehende Stabilität der verbliebenen Allergene gegenüber dem 10-minütigen Erhitzen abzuleiten.
Ein deutlich anderes Bild zeigen die DKE bzw. GKE. Bereits die keiner weiteren Erhitzung unterworfenen Produkte (13, 16) zeigen lediglich 3 Allergene mit MG von 45, 50 bzw. 66 kDa. Diese Allergene sind ebenfalls in den zubereiteten Handelsprodukten (14, 17) sowie in den jeweiligen KW (15, 18) detektierbar.

Tab. 4.6: C_{50}-Werte der Handelsprodukte (siehe auch Tab. 7.2.2.4)

Kürzel	Inhibitor	Kochzeit [min]	C_{50}-Wert [µg/ml]
N	native Gartenerbse, Maxigolt	-	1.6
TE 1 (oV)	Schälerbse, grün, glutenfrei	-	1.0
TE 1 (nZ)	Schälerbse, grün, glutenfrei	45	27.9
TE 1 (KW)	Schälerbse, grün, glutenfrei	45	15.1
TE 2 (oV)	Schälerbse, gelb, glutenfrei	-	2.7
TE 2 (nZ)	Schälerbse, gelb, glutenfrei	45	30.5
TE 2(KW)	Schälerbse, gelb, glutenfrei	45	21.4
TKE 1 (oV)	Junge Erbsen, Les Primeurs	-	7.1
TKE 1 (nZ)	Junge Erbsen, Les Primeurs	10	7.9
TKE 1 (KW)	Junge Erbsen, Les Primeurs	10	8.7
TKE 2 (oV)	Erbsen, extra zart	-	3.5
TKE 2 (nZ)	Erbsen, extra zart	10	6.4
TKE 2(KW)	Erbsen, extra zart	10	3.8
GKE (oV)	Junge Erbsen, extra fein	-	41.1
GKE (nZ)	Junge Erbsen, extra fein	10	116.7
GKE (KW)	Junge Erbsen, extra fein	10	66.6
DKE (oV)	Erbsen, sehr fein	-	5.2
DKE (nZ)	Erbsen, sehr fein	15	37.5
DKE (KW)	Erbsen, sehr fein	15	8.0

Anhand der C_{50}-Werte der EAST-Inhibition, deren Ergebnisse in Tabelle 4.6 dargestellt sind, wird deutlich, dass die ohne weitere Verarbeitung untersuchten Extrakte der TE (1, 4) ein der nativen Gartenerbse vergleichbares allergenes Potenzial aufweisen. Die erhitzten Produkte (2, 5) sowie die KW (3, 6) besitzen im Vergleich dazu ein wesentlich geringeres allergenes Potenzial. Im Gegensatz dazu zeigen die nicht weiter verarbeiteten TKE (7, 10) leicht erhöhte C_{50}-Werte. Eine zusätzliche Erhitzung (8, 11) hat lediglich einen geringen Einfluss auf das allergene Potenzial dieser Handelsprodukte. Auch die KW (9, 12) unterscheiden sich nur unwesentlich von den unverarbeiteten Extrakten. Der hohe C_{50}-Wert der ohne weitere Zubereitung untersuchten GKE (13) zeigt ein stark vermindertes allergenes Potenzial an. Da sowohl das erhitzte Produkt (14), als auch das dabei anfallende KW (15) nochmals erhöhte Werte aufweisen, kann eine geringere Allergenität dieser Extrakte dokumentiert werden. Alle bisher ermittelten Ergebnisse bestätigen die in Abbildung 4.9 dargestellten IF.

Im Gegensatz dazu sind die C_{50}-Werte der DKE (16 bis 18) gegensätzlich zur IF. Zwar ist eine Erhöhung der Werte im Vergleich zu den anderen Handelsprodukten festzustellen, doch fällt diese wesentlich geringer aus als nach den Ergebnissen der IF zu erwarten gewesen wäre.

4.1.5 Lagerung

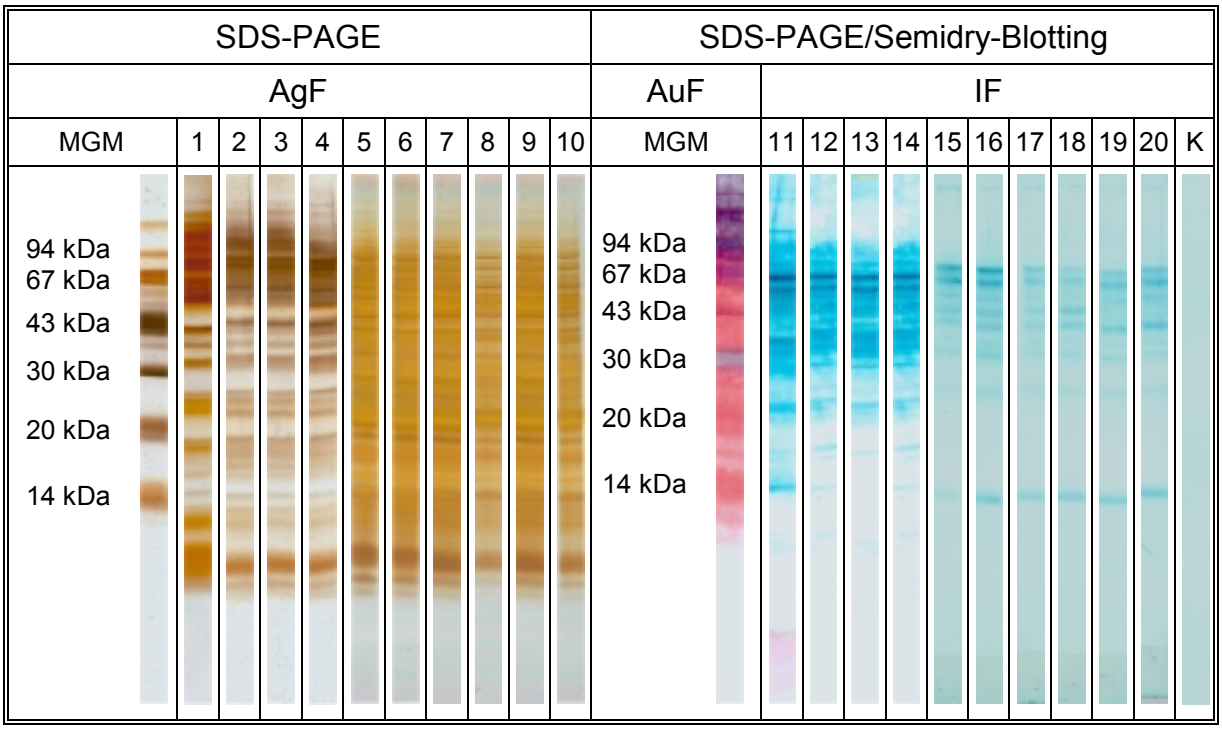
Die Tiefgefrierlagerung bei ca. - 20 °C nach Blanchieren stellt eine industriell häufig angewandte Konservierungsmethode dar. Um einen daraus resultierenden potenziellen Einfluss auf das allergene Potenzial der Gartenerbsensorte „Maxigolt“ zu ermitteln, wird ein Langzeitlagerungsversuch durchgeführt. Dabei wird auf ein Blanchieren des frischen Ausgangsmaterials verzichtet, um mögliche Einflüsse durch die thermische Belastung ausschließen zu können. Neben der üblichen Lagerungstemperatur von - 20 °C werden parallele Untersuchungen bei Temperaturen von - 80 °C durchgeführt. Zusätzlich zu den grundanalytischen Kenndaten Wasser- und Proteingehalt wird eine sensorische Überprüfung des gelagerten Probenmaterials durchgeführt. Weiterhin erfolgt die Darstellung des Gesamtproteinmusters und des Allergenspektrums sowie die relative Quantifizierung des allergenen Potenzials.

Tab. 4.7: Kenndaten des - 20 °C Lagerungsversuches der Gartenerbse

Lagerungsdauer [Wochen]	Kennzeichnung	Wassergehalt [%]	Proteingehalt [%]	C_{50}-Wert [µg/ml]	sensorische Eigenschaften
0	LV-E-0-20	80.1	5.3	11.6	arttypisch
4	LV-E-4-20	80.3	5.5	22.8	arttypisch
12	LV-E-12-20	80.6	5.3	26.0	arttypisch
20	LV-E-20-20	81.4	5.2	23.6	arttypisch
28	LV-E-28-20	82.6	5.3	11.4	arttypisch
36	LV-E-36-20	83.0	5.1	10.6	arttypisch
44	LV-E-44-20	81.9	5.4	12.7	arttypisch
52	LV-E-52-20	82.0	5.6	12.0	arttypisch
60	LV-E-60-20	82.6	5.2	16.0	arttypisch
68	LV-E-68-20	83.2	5.2	17.9	arttypisch

Die in Tab. 4.7 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass weder bezüglich des Wasser- noch des Proteingehaltes Veränderungen der bei - 20 °C gelagerten Gartenerbsenproben innerhalb des Gesamtlagerungszeitraumes von 68 Wochen auftreten. Auch die sensorischen Eigenschaften unterliegen keiner wahrnehmbaren Veränderung.

Die AgF der Lagerungsproben (Abb. 4.10, 1 - 10) zeigen identische charakteristische Proteinbanden mit MG < 14, 14, 16, 18, 22, 25, 28, 32, 37, 45, 55 und 70 kDa. Weiterhin werden undifferenzierte Anfärbungen im höhermolekularen Bereich sichtbar. Auch bei den immungefärbten Proben (11 - 20) werden ähnliche Allergenspektren detektiert, wobei Anfärbungen bei 14, 16, 20, 28, 30, 32, 45, 50 und 66 kDa zu verzeichnen sind. Bestätigt wird diese Allergenstabilität durch die lediglich geringfügig schwankenden C_{50}-Werte von 11.6 bis 26.0 µg/ml der EAST-Inhibition, wodurch keine Änderung des allergenen Potenzials angezeigt wird.



MGM: Molekulargewichtsmarker K: Kontrolle
1, 11: LV-E-0-20 2, 12: LV-E-4-20 3, 13: LV-E-12-20 4, 14: LV-E-20-20 5, 15: LV-E-28-20
6, 16: LV-E-36-20 7, 17: LV-E-44-20 8, 18: LV-E-52-20 9, 19: LV-E-60-20 10, 20: LV-E-68-20

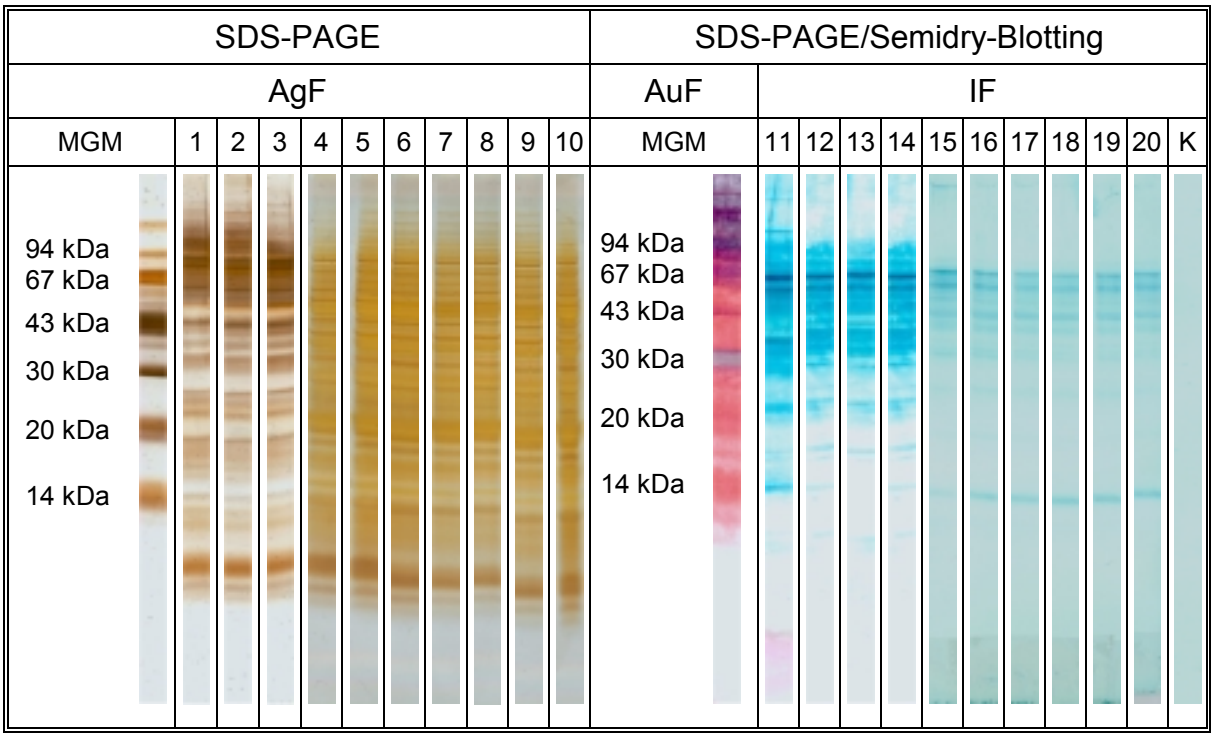
Abb. 4.10: AgF und IF der - 20 °C Lagerungsproben

Die Ergebnisse der in identischer Weise bei einer Lagerungstemperatur von - 80 °C durchgeführten Studie zeigt Tabelle 4.8 sowie Abbildung 4.11.
Auch die bei - 80 °C gelagerten Gartenerbsen zeigen gegenüber der nativen Probe weder in ihren sensorischen Eigenschaften Veränderungen noch können signifikante Unterschiede der Wasser- bzw. Proteingehalte ermittelt werden.

Tab. 4.8: Kenndaten des - 80 °C Lagerungsversuches der Gartenerbsen

Lagerungsdauer [Wochen]	Kennzeichnung	Wassergehalt [%]	Proteingehalt [%]	C_{50}-Wert [µg/ml]	sensorische Eigenschaften
0	LV-E-0-80	80.1	5.3	11.6	arttypisch
4	LV-E-4-80	80.7	5.1	25.5	arttypisch
12	LV-E-12-80	81.1	5.2	26.1	arttypisch
20	LV-E-20-80	81.5	5.2	12.6	arttypisch
28	LV-E-28-80	82.5	5.5	26.7	arttypisch
36	LV-E-36-80	84.1	5.2	13.0	arttypisch
44	LV-E-44-80	83.1	5.3	14.6	arttypisch
52	LV-E-52-80	83.2	5.1	12.9	arttypisch
60	LV-E-60-80	82.9	5.2	17.5	arttypisch
68	LV-E-68-80	81.1	4.9	14.6	arttypisch

Sowohl die AgF (Abb. 4.11, 1 - 10) als auch die IF (11 - 20) der bei - 80 °C gelagerten Proben zeigen über den Gesamtlagerungszeitraum ein unverändertes Bandenmuster. Da auch die C_{50}-Werte, die zwischen 11.6 und 26.7 µg/ml liegen, keine Veränderung zeigen, kann gefolgert werden, dass weder die Lagerung bei - 20 °C noch bei - 80 °C einen Einfluss auf die Allergenität der Gartenerbsen hervorruft.



MGM: Molekulargewichtsmarker K: Kontrolle
1: LV-E-0-80 2: LV-E-4-80 3: LV-E-12-80 4: LV-E-20-80 5: LV-E-28-80
6: LV-E-36-80 7: LV-E-44-80 8: LV-E-52-80 9: LV-E-60-80 10: LV-E-68-80

Abb. 4.11: AgF und IF der - 80 °C Lagerungsproben

4.1.6 Trocknung

Die industrielle Herstellung von Trockenspeiseerbsen erfolgt i.a. durch Lufttrocknung unter Rotation bei Temperaturen von 58 °C. Dabei wird der Trocknungsvorgang bis zu einem Restwassergehalt der Gartenerbsen von 10 bis 11 % durchgeführt. Der notwendige Trocknungszeitraum bis zum Erreichen dieses Restwassergehaltes wird durch periodisches Auswiegen von insgesamt 600 g bei 58 ± 2 °C im Trockenschrank unter Rotation getrockneten Gartenerbsen der Sorte „Maxigolt“ ermittelt. Dabei wird in Abständen von 30 min über einen Zeitraum von 24 h der jeweilige Wassergehalt bestimmt. Die Ergebnisse dieser Messreihe sind in Tab. 4.9 bzw. Abb. 4.12 dargestellt.

Anhand der Messreihe des Trocknungsversuches (Tab. 4.9) zeigt sich, dass in den ersten Stunden eine schnelle Abnahme des Wassergehaltes auf < 10 % erfolgt und sich dieser dann einem Wert von ca. 1.3 % annähert. Der gesuchte Restwassergehalt wird dabei nach einer Trocknungszeit von ca. 9 h erreicht, so dass in diesem Bereich nach 8, 9 und 10 h eine verstärkte Probenahme erfolgt. Um den gesamten Bereich vom anfänglichen Wassergehalt der nativen Erbse von 80 % bis zum Endwassergehalt von 1.3 % untersuchen zu können, werden außerdem Proben nach 0, 0.5, 1, 2, 4, 14, 19 und 24 h gezogen.

Tab. 4.9: Wassergehalte des Trocknungsversuches (grau unterlegt: Probenahme)

Trocknung [h]	Wassergehalt [%]	Trocknung [h]	Wassergehalt [%]	Trocknung [h]	Wassergehalt [%]
0	80.2	8	15.2	16.5	1.8
0.5	76.2	8.5	12.8	17	1.8
1	71.3	9	10.6	17.5	1.7
1.5	66.6	9.5	8.7	18	1.6
2	61.1	10	7.1	18.5	1.6
2.5	56.8	11	4.9	19	1.5
3	52.1	11.5	3.8	19.5	1.5
3.5	47.9	12	3.0	20	1.5
4	43.5	12.5	2.7	20.5	1.5
4.5	39.9	13	2.5	21	1.4
5	35.8	13.5	2.4	21.5	1.4
5.5	32.1	14	2.2	22	1.4
6	28.6	14.5	2.1	22.5	1.4
6.5	24.9	15	2.0	23	1.3
7	21.0	15.5	2.0	23.5	1.3
7.5	17.9	16	1.9	24	1.3

Auch die in Abbildung 4.12 dokumentierte graphische Darstellung des prozentualen Restwassergehaltes in Abhängigkeit von der Trocknungsdauer verdeutlicht den anfänglich schnellen Wasserverlust sowie die Annäherung an den Restwassergehalt von 1.3 %

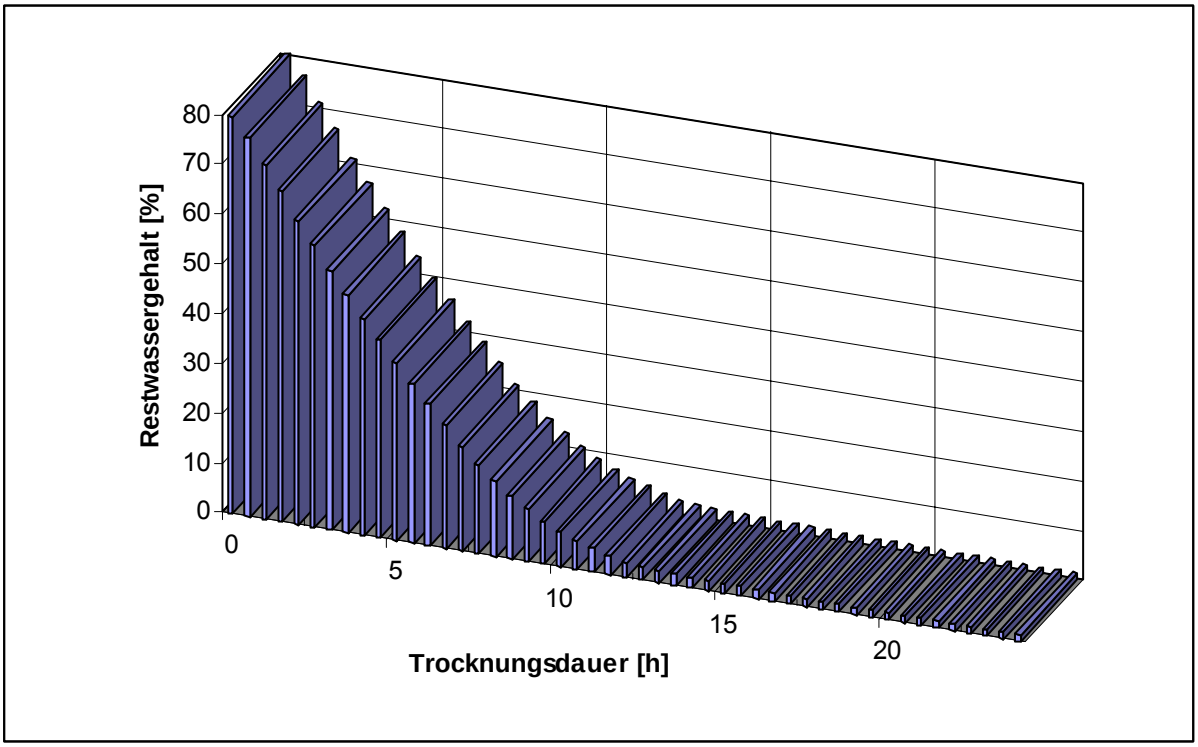
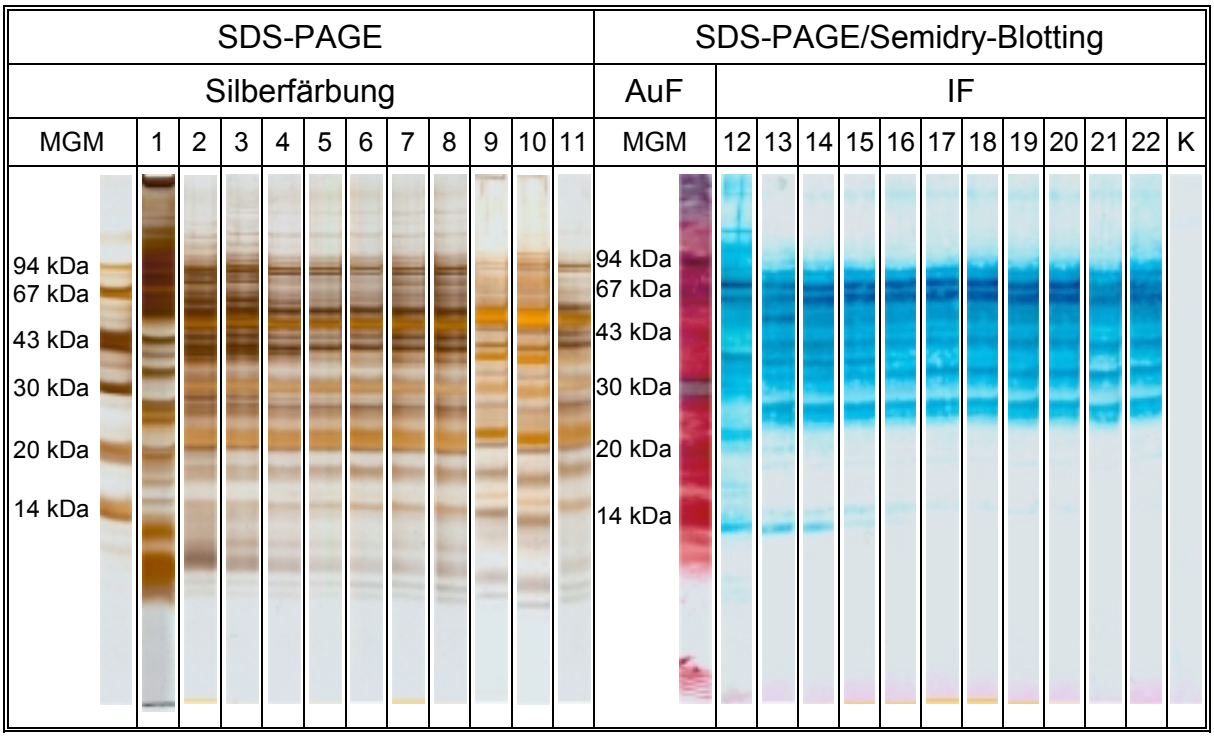


Abb. 4.12: Trocknungsversuch: Messreihe von 0 bis 24 h

Tab. 4.10: Kenndaten des Trocknungsversuches der Gartenerbsen

Trocknung [h]	Kenn-zeichnung	Wassergehalt [%]	Trockenmasse [%]	Proteingehalt [%]	rel. Proteingehalt [%]	C_{50}-Wert [µg/ml]
0	TV-E-0	80.2	19.8	5.3	26.8	11.6
0.5	TV-E-0.5	76.2	23.8	5.3	22.3	5.4
1.0	TV-E-1.0	71.3	28.7	5.4	18.8	10.6
2.0	TV-E-2.0	61.1	39.9	5.5	13.8	11.3
4.0	TV-E-4.0	43.5	56.5	6.9	12.2	8.3
8.0	TV-E-8.0	15.2	84.8	23.0	27.1	8.8
9.0	TV-E-9.0	10.6	89.4	22.4	25.1	6.7
10.0	TV-E-10.0	7.1	92.9	21.8	23.5	7.5
14.0	TV-E-14.0	2.2	97.8	21.8	22.3	13.0
19.0	TV-E-19.0	1.5	98.5	22.4	22.7	11.3
24.0	TV-E-24.0	1.3	99.7	24.4	24.7	13.6

Die in Tabelle 4.10 dargestellten Ergebnisse zeigen eine durch den Wasserverlust begründete Erhöhung des absoluten Proteingehaltes im Verlauf des Trocknungsprozesses von 5.3 auf 24.4 %. Um einen potenziellen Proteinabbau während der Trocknung nachweisen zu können, ist die Berechnung des relativen Proteingehaltes durch Division des Proteingehaltes durch die Trockenmasse notwendig. Es zeigt sich anhand dieser Werte, dass bis zu einer Trocknungsdauer von vier Stunden parallel zum Wasserverlust ein Proteinabbau erfolgt. Erst anschließend bleibt der relative Proteingehalt mit Werten von 22.3 bis 27.1 % annähernd konstant. Die C_{50}-Werte schwanken zwischen 5.4 und 13.6 µg/ml und zeigen keine größeren Veränderungen.



MGM: Molekulargewichtsmarker K: Kontrolle 1, 12: TV-E-0
2, 13: TV-E-0.5 3, 14: TV-E-1.0 4, 15: TV-E-2.0 5, 16: TV-E-4.0 6, 17: TV-E-8.0
7, 18: TV-E-9.0 8, 19: TV-E-10.0 9, 20: TV-E-14.0 10, 21: TV-E-19.0 11, 22: TV-E-24.0

Abb. 4.13: AgF und IF des Gartenerbsen-Trocknungsversuches

Die in Abbildung 4.13 dargestellten AgF (1 - 11) belegen diesen teilweisen Proteinabbau. So werden im nativen Extrakt (1) charakteristische Proteinbanden bei < 14, 14, 16, 18, 20, 25, 28, 32, 37 und 43 kDa detektiert. Die Banden bei 55, 66, 75, 94 und > 94 kDa können nur sehr schwer vor dem stark angefärbten Hintergrund lokalisiert werden, sind aber nachweisbar.
Die Proteinspektren des Trocknungsversuches (2 - 11) zeigen im niedermolekularen Bereich < 14 kDa deutliche Veränderungen. So wird die 14-kDa-Bande zwar über alle Stufen unverändert angefärbt, die beiden breiten Banden unterhalb von 14 kDa des nativen Extraktes werden jedoch im Laufe der Trocknung deutlich schwächer detektiert. Sie können nach einstündiger Trocknung (3) als vier Banden, nach 10 h (8) nur noch als drei schmale Banden detektiert werden. Bereits nach 0.5 h (2) können das 16 bzw. 18-kDa-Protein nicht mehr angefärbt werden. Statt dessen werden sowohl in diesem Bereich als auch oberhalb 20 kDa jeweils eine breite Bande sichtbar, welche auch nach 24-stündiger Trocknung noch erhalten bleiben. Im Bereich von 30 kDa werden im nativen Extrakt keine Proteine angefärbt, jedoch kann bei 0.5 h beginnend bis 24 h eine neue Bande detektiert werden. Die Proteine mit den MG von 37 und 43 kDa sind unverändert bis zur letzten Trocknungsstufe nachweisbar. Im Bereich von 55 bis > 94 kDa können bereits nach 2 h (4) nur noch Banden bei 55, 60, 75, 94 sowie > 94 kDa nachgewiesen werden. Das 55-kDa-Protein sowie die weit oberhalb des 94 kDa Markerproteins lokalisierten zwei Banden können ab einer Trocknungszeit von 10 h (8) nicht mehr detektiert werden.

Die IF des Trocknungsversuches zeigt für die native Probe (12) allergene Banden < 14, 14, 16, 18, 20, 22, 30, 32, 37, 40, 45, 50, 66 und 75 kDa. Die Allergene mit MG von 16, 22 und 30 kDa können bereits nach halbstündiger Trocknung der Proben nicht mehr detektiert werden. Eine neue Bande erscheint dafür im Bereich von 23 bis 27 kDa und ändert sich in der Intensität der Färbung bis zum Ende der Trocknung nicht mehr. Nach einstündiger Trocknung werden das 18- und 20-kDa-Allergen, nach 4 h das Allergen < 14 kDa und nach 8 h das 37-kDa-Allergen nicht mehr detektiert. Die Allergene mit MG von 32, 40, 45, 50, 66 und 75 kDa bleiben bis zu einer Trocknungszeit von 24 h nachweisbar. Unspezifische Bindungen können durch die Inkubation mit dem K ausgeschlossen werden.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass zwar leichte Veränderungen der Protein- und Allergenspektren, insbesondere im niedermolekularen Bereich, durch die Trocknung der Gartenerbsen auftreten, das allergene Potenzial jedoch unverändert bleibt.

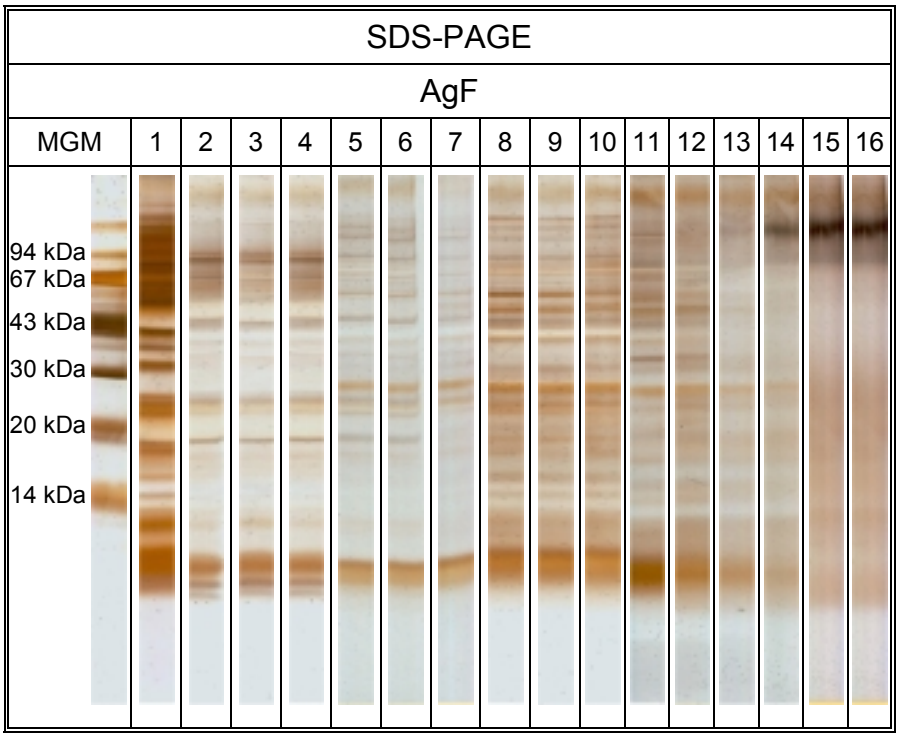
4.1.7 Autoklavierung

Die für den Autoklavierungsversuch gewählten Temperaturstufen von 60, 85, 100, 121 und 140 °C bei einer jeweiligen Erhitzungsdauer von 20, 40 bzw. 60 Minuten entsprechen nicht den industriell angewandten Parametern zur Konservierung, sondern übersteigen z. T. deutlich die zur Herstellung von Konserven eingesetzten thermischen Belastungen. Es soll vielmehr durch diese Versuchsanordnung ein Gesamtüberblick über den Einfluss der Erhitzung auf die Allergenität der Gartenerbse auch unter extremen Bedingungen gewonnen werden. Dabei erfolgt die Auswahl der Temperaturstufen in Anlehnung an die Herstellung von Trockenspeiseerbsen (60 °C), an die Pasteurisierung (85 °C) und Sterilisierung (121 °C), die Kochtemperatur (100 °C) und die Autoklavierung (140 °C). Die Autoklavierung von jeweils 50 g Gartenerbsen der Sorte „Maxigolt“ erfolgt dabei in einem handelsüblichen Laborautoklaven.

Tab. 4.11: Kenndaten des Autoklavierungsversuches der Gartenerbsen

Kenn-zeichnung	Temperatur [°C]	Dauer [min]	Trockenmasse [%]	Proteingehalt [%]	C_{50}-Wert [µg/ml]	sensorische Eigenschaften
AV-E-0-0	0	0	19.9	5.3	11.6	arttypisch
AV-E-60-20	60	20	20.6	5.6	23.4	arttypisch
AV-E-60-40	60	40	20.1	5.1	47.0	arttypisch
AV-E-60-60	60	60	19.7	5.3	50.0	arttypisch
AV-E-85-20	85	20	21.4	5.3	31.0	arttypisch
AV-E-85-40	85	40	22.4	5.6	26.8	arttypisch
AV-E-85-60	85	60	20.8	5.7	33.3	arttypisch
AV-E-100-20	100	20	19.7	5.6	43.9	arttypisch
AV-E-100-40	100	40	19.6	5.5	40.7	arttypisch
AV-E-100-60	100	60	21.3	5.5	41.5	arttypisch
AV-E-121-20	121	20	22.1	5.3	26.7	arttypisch
AV-E-121-40	121	40	22.2	5.3	34.6	arttypisch
AV-E-121-60	121	60	21.5	5.3	122.2	Braunfärbung Verbrennungsgeruch
AV-E-140-20	140	20	22.8	6.2	105.3	Braunfärbung Verbrennungsgeruch
AV-E-140-40	140	40	21.0	6.5	97.6	Braunfärbung Verbrennungsgeruch
AV-E-140-60	140	60	21.9	6.2	145.2	Braunfärbung Verbrennungsgeruch

Die in Tabelle 4.11 dokumentierten Trockenmassen liegen zwischen 19.6 und 22.8 %, die Proteingehalte zwischen 5.1 und 6.5 %. Es wird deutlich, dass die Autoklavierung bei Temperaturen von 60, 85 und 100 °C weder Einfluss auf diese Parameter noch auf die sensorischen Eigenschaften hervorruft. Erst ab einer Temperatur von 121 °C kommt es zum geringfügigen Anstieg der Trockenmassen und ab einer Temperatur von 140 °C zur Erhöhung des Proteingehaltes. Diese Veränderungen verlaufen übereinstimmend zu den sensorischen Untersuchungen, die Einflüsse auf das Untersuchungsmaterial beginnend mit der Stufe AV-E-121-60 zeigen.



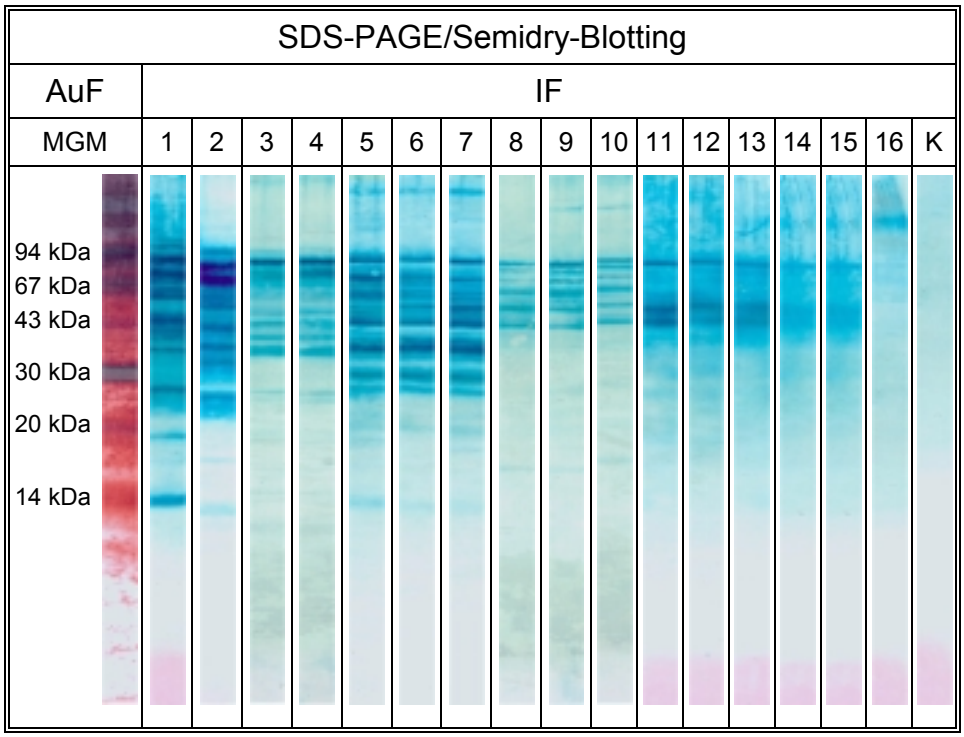
MGM: Molekulargewichtsmarker

1: AV-E-0-0	2: AV-E-60-20	3: AV-E-60-40	4: AV-E-60-60
5: AV-E-85-20	6: AV-E-85-40	7: AV-E-85-60	8: AV-E-100-20
9: AV-E-100-40	10: AV-E-100-60	11: AV-E-121-20	12: AV-E-121-40
13: AV-E-121-60	14: AV-E-140-20	15: AV-E-140-40	16: AV-E-140-60

Abb. 4.14: AgF des Gartenerbsen-Autoklavierungsversuches

Die in Abbildung 4.14 dargestellten AgF der Autoklavierung zeigen für sämtliche thermisch behandelten Proben (2 - 16) deutliche Unterschiede zur unbehandelten Gartenerbse (1). Dabei weisen die Proben einer Autoklavierungsstufe jeweils starke Ähnlichkeiten auf. So werden bereits ab einer Temperatur von 60 °C (2 - 4) zahlreiche in der nativen Erbse detektierte Proteinbanden im MG-Bereich von 14 bis 50 kDa nicht mehr sichtbar. Bei den auf 85 °C erhitzten Proben (5 - 7) setzt sich diese Tendenz fort, so dass lediglich vereinzelte Banden im gesamten MG-Bereich detektiert werden. Dazu ähnliche Proteinspektren weisen die bei 100 °C bzw. für 20 sowie 40 min bei 121 °C autoklavierten Gartenerbsen auf (8 - 12), wobei eine durch Polymerisationsprodukte hervorgerufene deutlich zunehmende unspezifische Hintergrundfärbung wahrnehmbar ist. Schließlich werden bei der für 60 min auf 121 °C (13) sowie den auf 140 °C erhitzten Proben (14 - 16) lediglich Proteinbanden mit MG < 14, 28 und 45 kDa sowie eine Bande im höhermolekularen Bereich detektiert. Diese Bande wird vermutlich durch von im Sammelgel verbleibenden Polymerisationsprodukten hervorgerufen.

Auch die spezifische Allergendetektion mittels IF (siehe Abb. 4.15) zeigt deutliche Unterschiede der Allergenspektren zwischen der unbehandelten Gartenerbse (1) und den erhitzten Proben (2 - 16). Dabei ist wiederum eine abnehmende Anzahl der sichtbaren Banden sowie eine verminderte Detektionsintensität insbesondere im niedermolekularen Bereich mit steigender Erhitzungstemperatur festzustellen.
Das K zeigt keine Anfärbungen, so dass unspezifische Anfärbungen ausgeschlossen werden können.



MGM: Molekulargewichtsmarker K: Kontrolle

1: AV-E-0-0	2: AV-E-60-20	3: AV-E-60-40	4: AV-E-60-60
5: AV-E-85-20	6: AV-E-85-40	7: AV-E-85-60	8: AV-E-100-20
9: AV-E-100-40	10: AV-E-100-60	11: AV-E-121-20	12: AV-E-121-40
13: AV-E-121-60	14: AV-E-140-20	15: AV-E-140-40	16: AV-E-140-60

Abb. 4.15: IF des Gartenerbsen-Autoklavierungsversuches

So werden im nativen Extrakt (1) charakteristische Allergenbanden mit MG von 14, 16, 18, 22, 25, 28, 30, 37, 40, 45, 50, 66 und 75 kDa detektiert. Bereits durch eine Erhitzung von 20 min auf 60 °C sowie durch alle stärkeren thermischen Belastungen werden die Allergene mit MG von 16, 25 bzw. 28 kDa nicht mehr detektiert. Weiterhin werden ab einer Autoklavierungstemperatur von 100 °C die 14-, 37- und 40-kDa-Allergene sowie ab 121 °C des 18-kDa-Allergens nicht mehr detektiert. Stabiler zeigen sich dagegen die Allergene im höhermolekularen Bereich. So werden selbst bei einer 40-minütigen Autoklavierung bei 140 °C noch IgE-bindende Proteine mit MG von 30, 45, 50, 66 und 75 kDa detektiert, die in ihrer Intensität jedoch vermindert sind. Selbst die maximale thermische Belastung von 60 min bei 140 °C führt nur zur teilweisen Reduktion der IgE-Bindungskapazität der Allergene mit MG von 50, 66 und 75 kDa.

Vergleichbare Ergebnisse liefern die in Tabelle 4.11 dargestellten C_{50}-Werte der unter Verwendung eines festphasengebundenen nativen Extraktes durchgeführten EAST-Inhibitionen. Zeigen sich beim Übergang von der nativen Gartenerbse mit einem C_{50}-Wert von 11.6 µg/ml zur ersten Erhitzungsstufe von 60 °C mit Werten von 23.4 bis 49.6 µg/ml deutliche Veränderungen, so bleiben diese bei den weiteren Stufen bei 85 °C, 100 °C sowie 121 °C bei 20 und 40 min bei Werten von 26.7 bis 43.9 µg/ml aus. Erst die abschließende Autoklavierung bei 140 °C sowie die 60-minütige Erhitzung bei 121 °C zeigen im Vergleich dazu deutlich erhöhte C_{50}-Werte, die eine Verminderung der Allergenität der Gartenerbsen verdeutlichen.

4.1.8 Mikrowellenbehandlung

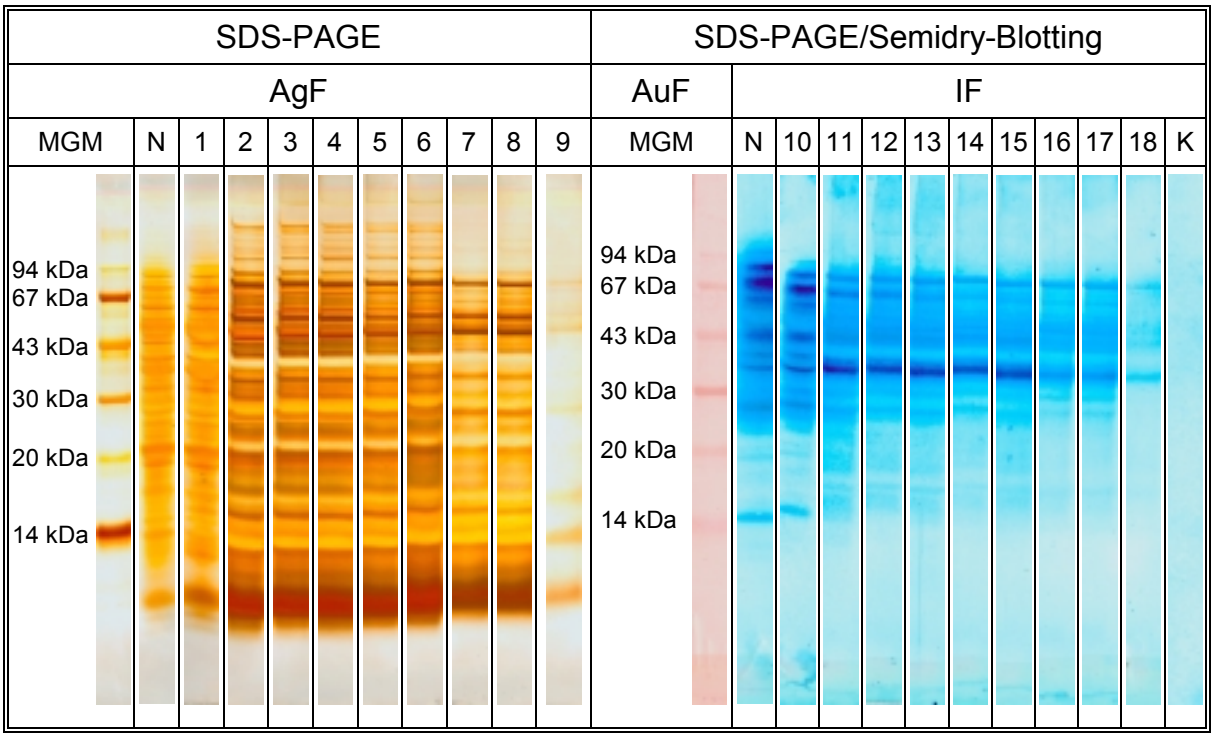
Aufgrund ihrer physikalischen Eigenschaften eignen sich Mikrowellen, kurzwellige hochfrequente elektromagnetische Schwingungen, zur Energieübertragung und können deshalb sowohl zur oberflächlichen Keimabtötung als auch zum Garen verwendet werden. Durch die gewählte Versuchsanordnung der Mikrowellenbestahlung von jeweils 50 g des gefrorenen Probenmaterials, welches in einem geeigneten Gefäß befindlich unter Zusatz von 5 ml Wasser mit einer Leistung von 500 W bei steigenden Zeitintervallen behandelt wird, kann der potenzielle Einfluss auf die Allergenität der Gartenerbsensorte „Maxigolt“ auch bei Extrembedingungen untersucht werden.

Tab. 4.12: Kenndaten der Mikrowellenbehandlung der Gartenerbsen

Kenn-zeichnung	Dauer [min]	TM [%]	Proteingehalt [%]	relativer Proteingehalt [%]	C_{50}-Wert [µg/ml]	sensorische Eigenschaften
MW-E-N	0	18.4	5.3	28.8	1.2	arttypisch
MW-E-1	1	21.2	5.8	27.4	2.0	arttypisch
MW-E-2	2	24.6	7.4	30.1	3.8	arttypisch
MW-E-3	3	29.9	8.4	28.1	9.9	arttypisch
MW-E-4	4	31.8	10.4	32.7	5.2	arttypisch
MW-E-5	5	50.5	13.7	27.1	5.2	arttypisch
MW-E-6	6	54.7	13.3	24.3	3.8	leichte Braunfärbung Verbrennungsgeruch
MW-E-7	7	68.2	19.0	27.9	7.7	leichte Braunfärbung Verbrennungsgeruch
MW-E-8	8	75.4	20.1	26.7	7.1	stärkere Braunfärbung Verbrennungsgeruch
MW-E-9	9	91.8	28.7	31.3	25.3	starke Braunfärbung Verbrennungsgeruch

Anhand der ermittelten grundanalytischen Daten (siehe Tabelle 4.12) zeigt sich, dass die Mikrowellenbehandlung bereits bei einminütiger Bestrahlung zum Wasserverlust und damit zum Anstieg der Trockenmasse führt. Dadurch bedingt steigt ebenfalls der Proteingehalt der Gartenerbsen an. Durch Berechnung der relativen Proteingehalte, welche sich durch Division der absoluten Proteingehalte durch die Trockenmassen ergeben und die damit den Proteinanteil unter Berücksichtigung des Wasserverlustes wiedergeben, wird jedoch deutlich, dass dieser Wert konstant bleibt und somit kein Proteinabbau festzustellen ist. Bis zu einer Bestrahlungszeit von 5 min treten keine Veränderungen der sensorischen Eigenschaften der Gartenerbse auf. Anschließend sind jedoch eine leichte Braunfärbung sowie ein leichter Verbrennungsgeruch wahrnehmbar, die sich mit fortschreitender Bestrahlungsdauer weiter verstärken.

Die AgF der zuvor elektrophoretisch getrennten Extrakte (Abbildung 4.16, 1 - 9) zeigt ebenfalls beginnend mit einminütiger Mikrowellenbestrahlung und bei fortschreitender Bestrahlung zunehmend eine deutliche Veränderung des Proteinmusters der Gartenerbse. Besonders charakteristisch ist dabei die zunehmende Detektionsintensität einzelner Proteinbanden nach zwei- bis sechsminütiger Bestrahlung und die anschließend folgende Minderung der Intensität.



MGM: Molekulargewichtsmarker K: Kontrolle N: MW-E-N
1, 10: MW-E-1 2, 11: MW-E-2 3, 12: MW-E-3 4, 13: MW-E-4 5, 14: MW-E-5
6, 15: MW-E-6 7, 16: MW-E-7 8, 17: MW-E-8 9, 18: MW-E-9

Abb. 4.16: AgF und IF der Gartenerbsen-Mikrowellenbehandlung

Insbesondere die in der unbehandelten Gartenerbse (N) nur schwach detektierten Banden mit MG < 14, 16, 18, 20, 25, 35, 45, 60 und 75 kDa zeigen dieses Detektionsverhalten.

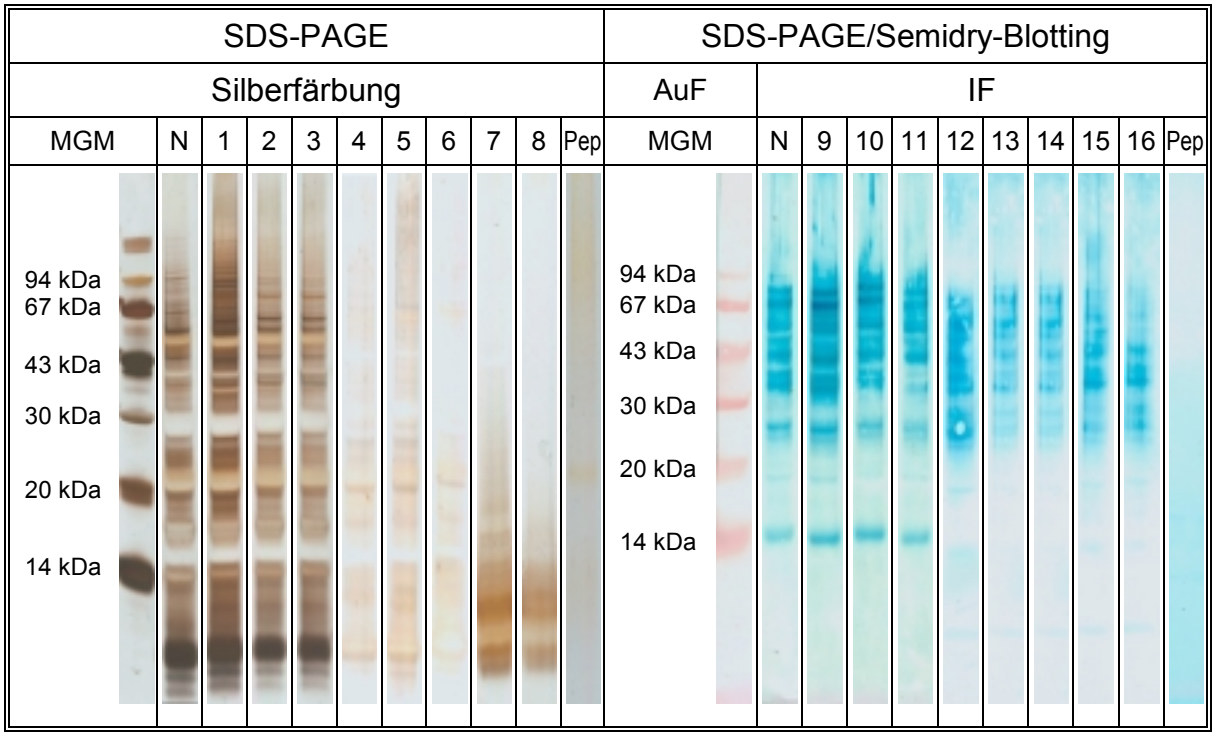
Im Gegensatz dazu zeigen die IF eine Abnahme der Anzahl der Allergenbanden sowie der Detektionsintensitäten mit zunehmender Bestrahlungsdauer. So werden die im nativen Extrakt (N) detektierten Allergene im niedermolekularen Bereich mit MG von 14, 16, 18, 20, 22 und 25 kDa lediglich bis zur einminütigen Bestrahlung sichtbar (10). Die Allergene mit MG von 40 bzw. 50 kDa zeigen sich bis zu einer Mikrowellenbestrahlung von 2 min (11) und das 32-kDa-Allergen bis zu 4 min stabil (13). Bis zu einer Dauer von 8 min (17) können die Banden bei 28, 30 und 66 kDa angefärbt werden, wobei die Detektionsintensitäten jedoch mit zunehmenden Bestrahlungszeiten erheblich abnehmen. Am stabilsten zeigen sich die auch nach neunminütiger Mikrowellenbestahlung (17) detektierbaren Allergene mit MG von 37, 45 und 75 kDa.

Die in Tabelle 4.12 aufgeführten C_{50}-Werte weisen generell eine steigende Tendenz beginnend mit 1.2 µg/ml für die unbehandelte Gartenerbse und 25.3 µg/ml für die 9 min bestrahlte Probe auf und zeigen somit ein sinkendes allergenes Potenzial im Verlauf der Bestrahlung. Auch die Zwischenwerte verhalten sich ansteigend, wobei jedoch z.T. erhebliche Schwankungen auftreten.

4.1.9 In-vitro-Verdauung

Die Persistenz von Proteinen gegenüber proteolytischen Enzymen stellt einen wichtigen Parameter bei der Beurteilung der Bedeutung einzelner Allergene dar. Um die Übertragbarkeit von In-vitro-Studien auf die menschliche Verdauung zu gewährleisten, ist eine Simulation unter möglichst realitätsnahen Bedingungen nötig. Gleichzeitig muss eine Vergleichbarkeit unterschiedlicher Behandlungen durch das Vorhandensein von identischem Ausgangsmaterial sichergestellt sein.
Zur Untersuchung des Einflusses der enzymatischen Verdauung auf die Allergene der Gartenerbsensorte „Maxigolt“ werden zunächst die Proteine nach 7.3.3 aus unbehandeltem Ausgangsmaterial bei einer Temperatur von 37 °C extrahiert und anschließend aliquote Anteile dieser Lösung lyophilisiert, so dass identische Ansätze für vergleichende Untersuchungen eingelagert werden können.

Ausgehend von diesen Ansätzen wird im ersten Schritt die Simulation der Magenverdauung anhand der rehydratisierten Lyophilisate vorgenommen. Dazu wird zum einen der Einfluss der Magensäure durch Einstellung auf pH 2, zum anderen die Auswirkungen des Enzyms Pepsin in unterschiedlichen Aktivitäten bei jeweils variierenden Zeitintervallen untersucht. Die Inkubationen erfolgen dabei bei einer Temperatur von 37 °C unter Rühren. Die Ergebnisse der EAST-Inhibition sowie die gewählten Kürzel zur Zuordnung präsentiert Tabelle 4.13. Die Ergebnisse der Anfärbung des Gesamtproteinmusters mittels AgF nach elektrophoretischer Trennung und des Allergenspektrums durch IF nach SDS-SAGE/Semidry-Blotting sind in Abbildung 4.17 dargestellt.



MGM: Molekulargewichtsmarker N: MV-E-N Pep: Pepsinlösung
1, 9: MV-E-pH-120 2, 10: MV-E-pH-180 3, 11: MV-E-pH-240 4, 12: MV-E-Pep-1
5, 13: MV-E-Pep-2 6, 14: MV-E-Pep-3 7, 15: MV-E-Pep-4 8, 16: MV-E-Pep-5

Abb. 4.17: AgF und IF der simulierten Magenverdauung der Gartenerbse

Durch Vergleich der in Abbildung 4.17 dargestellten AgF der für 2 bis 4 h bei einer Temperatur von 37 °C und einem pH-Wert von 2 ohne Pepsin-Zusatz inkubierten Gartenerbsenextrakte (1 - 3) mit der nativen Probe (N) wird deutlich, dass eine derartige Behandlung lediglich geringfügige Veränderungen im niedermolekularem Proteinspektrum sowie eine leichte Verminderung der Detektionsintensität einzelner Proteinbanden hervorruft. Im Gegensatz dazu führt bereits der Zusatz einer Pepsin-Lösung mit einer Aktivität von $6.8 \cdot 10^1$ U/l (4) zum vollständigen Abbau diverser Proteine im gesamten MG-Bereich. Auch die Detektionsintensität der verbleibenden Proteinbanden ist im Vergleich zum nativen Gartenerbsenextrakt erheblich herabgesetzt. Eine Erhöhung der Pepsinaktivität auf Werte von $6.8 \cdot 10^2$ U/l bis maximal $6.8 \cdot 10^5$ U/l (5 - 8) ruft im Vergleich zum mit einer Pepsinaktivität von $6.8 \cdot 10^1$ U/l inkubierten Gartenerbsenextrakt wiederum nur geringfügige Veränderungen hervor. So kommt es zu einer Verstärkung der Detektionsintensität niedermolekularer Proteinbanden, bei denen es sich vermutlich um Proteinfragmente handelt, sowie zum vollständigen Abbau zuvor schwach visualisierter höhermolekularer Proteine. Die elektrophoretisch aufgetrennte Pepsinlösung mit einer Aktivität von $6.8 \cdot 10^2$ U/l zeigt nur eine schwach angefärbte Proteinbande mit einem MG von 22 kDa.

Das Allergenspektrum der nativen Gartenerbse (N) zeigt die charakteristischen Banden mit MG von 14, 20, 25, 28, 30, 32, 37, 40, 45, 50, 66 und 75 kDa. Eine Veränderung dieses Spektrums bzw. der Detektionsintensität ist durch die Inkubation im sauren Milieu (9 - 11) auch bei Ausdehnung der Inkubationszeit auf 240 min (11) nicht zu beobachten. Auch der Zusatz der Pepsinlösung mit einer Aktivität von $6.8 \cdot 10^1$ U/l (12) hat nur geringfügige Veränderungen hinsichtlich des Abbaus der Allergene mit MG von 14 bzw. 30 kDa zur Folge. Eine Erhöhung der Pepsinaktivität auf Werte von $6.8 \cdot 10^2$ U/l bis $6.8 \cdot 10^5$ U/l (13 - 16) ruft keine weiteren Veränderungen hervor.

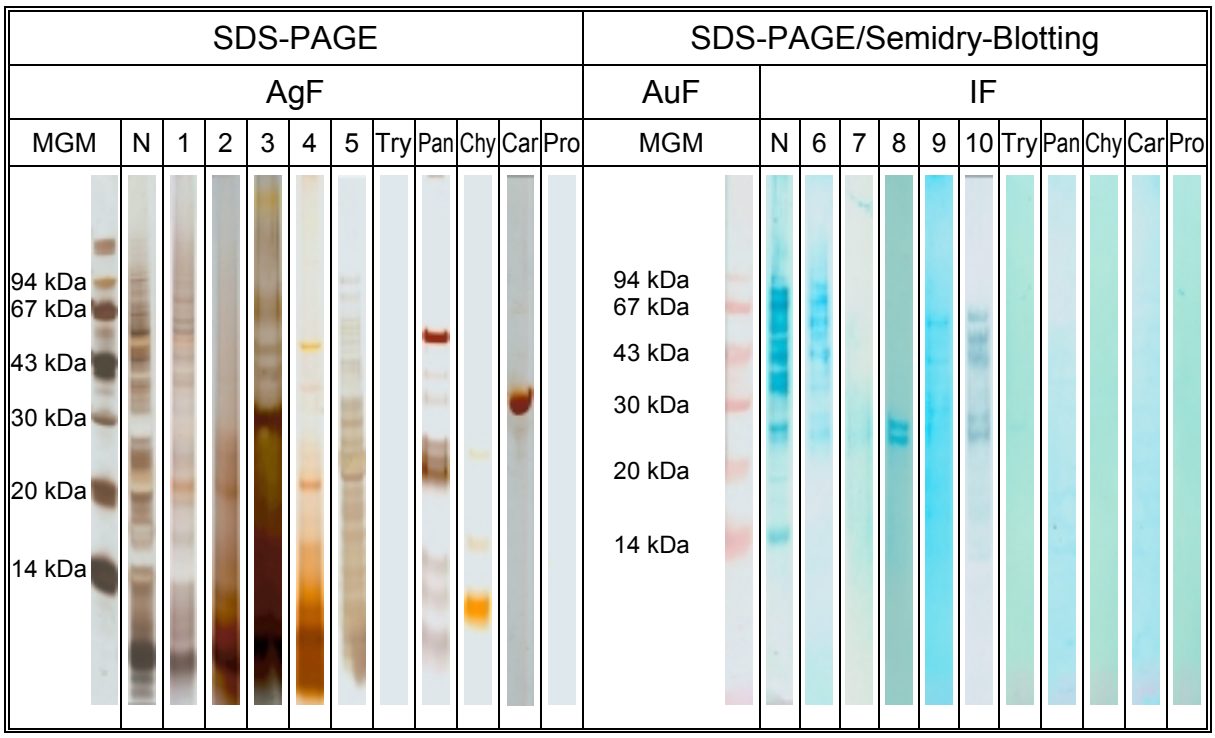
Die in Tabelle 4.13 dargestellten C_{50}-Werte der EAST-Inhibition der einzelnen Extrakte bestätigen die Ergebnisse der IF. Ausgehend vom nativen Gartenerbsenextrakt mit einem Wert von 2.3 µg/ml ist keine charakteristische Erhöhung der Werte für die zwei- bis vierstündige Inkubation im sauren Milieu zu verzeichnen. Durch den Pepsinzusatz kommt es zum Anstieg der C_{50}-Werte (14.4 - 23.4 µg/ml), wobei wiederum kein Einfluss der Pepsinaktivität festzustellen ist.

Tab. 4.13: Kenndaten der simulierten Magenverdauung

Kennzeichnung	Pepsin-Aktivität [U/l]	Dauer [min]	C_{50}-Wert [µg/ml]
Pep	$6.8 \cdot 10^2$	-	n.e.
MV-E-N	-	-	2.3
MV-E-pH-120	-	120	2.5
MV-E-pH-180	-	180	3.5
MV-E-pH-240	-	240	2.8
MV-E-Pep-1	$6.8 \cdot 10^1$	180	15.8
MV-E-Pep-2	$6.8 \cdot 10^2$	180	16.1
MV-E-Pep-3	$6.8 \cdot 10^3$	180	19.4
MV-E-Pep-4	$6.8 \cdot 10^4$	180	14.4
MV-E-Pep-5	$6.8 \cdot 10^5$	180	23.4

Durch die Ergebnisse der simulierten Magenverdauung kann weder ein Einfluss der Inkubationsdauer im sauren Milieu noch der Pepsinaktivität auf das Allergenspektrum bzw. das allergene Potenzial der Gartenerbse bestätigt werden. Daher wird in den folgenden Untersuchungen zur Simulation der Darmverdauung eine dreistündige Inkubation im sauren Milieu mit einer Pepsinlösung der Aktivität $6.8 \cdot 10^1$ U/l als Parameter für die Vorverdauung gewählt.

Im Anschluss an die Magenverdauung wird zur Untersuchung des Einflusses der Darmverdauung auf die IgE-Bindungsfähigkeit der Gartenerbsenallergene zum einen ein In-vitro-Darmverdau mit Trypsin-, Chymotrypsin- und Carboxypeptidaselösung simuliert. Zum anderen erfolgt die Inkubation mit Pankreatin- bzw. Proteinase K-Lösung. Die Darstellung der AgF sowie der IF erfolgt in Abbildung 4.18, die Ergebnisse der EAST-Inhibition sind in Tabelle 4.14 zusammengefasst.



MGM: Molekulargewichtsmarker N: DV-E-N 1, 6: DV-E-Pep-1 + Try-4
2, 7: DV-E-Pep-1 + Try-4 + Chy-4 3, 8: DV-E-Pep-1 + Try-4 + Chy-4 + Car-3
4, 9: DV-E-Pep-1 + Pan-0.9 5, 10: DV-E-Pep-1 + Pro-2 Try: Trypsinlsg. Pan: Pankreatinlsg.
Chy: α-Chymotrypsinlsg. Car: Carboxypeptidase A-Lsg. Pro: Proteinase K-Lsg.

Abb. 4.18: AgF und IF der simulierten Darmverdauung der Gartenerbse

Anhand der in Abbildung 4.18 dargestellten AgF des mit unterschiedlichen Darmenzymen verdauten Gartenerbsenextraktes (1 - 5) zeigt sich im Vergleich zum nativen Extrakt (N) eine deutliche Veränderung des Proteinspektrums insbesondere im höhermolekularem Bereich. So werden in dem mit Pepsin und Trypsin (1) verdauten Extrakt noch zahlreiche Banden im MG-Bereich < 14 bis 75 kDa detektiert. Die zusätzliche Inkubation mit α-Chymotrypsin (2) führt zum weiteren Proteinabbau, woraufhin in diesem Extrakt lediglich Proteine mit MG < 28 kDa verbleiben.

Zwar treten bei weiterer Verdauung mit Carboxypeptidase A (3) neben wenigen Banden im niedermolekularen Bereich auch einige Banden höherer MG auf, doch stammen diese vom Enzym selbst, wie die AgF der Carboxypeptidase A-Lösung zeigt. Erfolgt im Anschluss an die Magenverdauung die Inkubation mit dem Enzymgemisch Pankreatin (4) werden lediglich Gartenerbsenproteine im MG-Bereich < 16 kDa neben den vom Pankreatin herrührenden Banden angefärbt. Auch die Inkubation mit Proteinase K (5) führt überwiegend zum Abbau höhermolekularer Proteine.

Dagegen zeigen die allergenspezifischen IF der simulierten Darmverdauung (Abb. 4.18, 5 - 10) überwiegend Bandendetektionen im höhermolekularen Bereich. So wird durch die zusätzlich zur Pepsinverdauung durchgeführte Trypsininkubation (6) ausschließlich das 20-kDa-Allergen (vgl. Abb. 4.17, 10) abgebaut. In Kombination mit einer α-Chymotrypsinverdauung (7) zeigen sich jedoch nur die Allergene mit MG von 25 sowie 28 kDa stabil. Die anschließende Inkubation mit Carboxypeptidase A (8) zeigt keinen weiteren Einfluss auf die IgE-Bindungsfähigkeit dieser Allergene.

Schließt sich an die Magenverdauung eine Inkubation mit dem Enzymgemisch Pankreatin an (9), so zeigen sich die Allergene mit MG von 25, 28, 40 und 50 kDa stabil. Auch nach einer enzymatischen Verdauung mit Proteinase K (10) zeigen sich sowohl die Allergene mit MG von 25 sowie 28 kDa, als auch die mit MG von 40, 50 und 66 kDa stabil.

Tab. 4.14: C_{50}-Werte der Darmverdauung (90 min je Stufe nach vorheriger Magenverdauung)

Kennzeichnung	Try [U/l]	Chy [U/l]	Car [U/l]	Pan [mgl]	Pro [U/l]	C_{50}-Wert [µg/ml]
DV-E-Pep-1	-	-	-	-	-	2.3
DV-E-Pep-1 + Try-4	$2.2 \cdot 10^4$	-	-	-	-	9.7
DV-E-Pep-1 + Try-4 + Chy-4	$2.2 \cdot 10^4$	$7.0 \cdot 10^4$	-	-	-	46.0
DV-E-Pep-1 + Try-4 + Chy-4 + Car-3	$2.2 \cdot 10^4$	$7.0 \cdot 10^4$	$2.9 \cdot 10^3$	-	-	60.1
DV-E-Pep-1 + Pan-0.9	-	-	-	0.9	-	52.5
DV-E-Pro-2	-	-	-	-	$2.7 \cdot 10^2$	199.1
Trypsin	$2.2 \cdot 10^4$	-	-	-	-	n.e.
α-Chymotrypsin	-	$7.0 \cdot 10^4$	-	-	-	n.e.
Carboxypeptidase A	-	-	$2.9 \cdot 10^3$	-	-	n.e.
Pankreatin	-	-	-	0.9	-	n.e.
Proteinase K	-	-	-	-	$2.7 \cdot 10^2$	n.e.

Die in Tabelle 4.14 dargestellten Ergebnisse der EAST-Inhibition bestätigen die Ergebnisse der IF. So weist der Gartenerbsenextrakt, welcher ausschließlich der Magenverdauung unterworfen wurde, mit 2.3 µg/ml den niedrigsten C_{50}-Wert und somit die höchste Allergenität auf. Durch die nacheinander durchgeführte Inkubation mit Trypsin, α-Chymotrypsin und Carboxypeptidase A steigen die C_{50}-Werte stufenweise bis auf 60.1 µg/ml an. Auch die zusätzlich zur Magenverdauung durchgeführten Inkubationen mit Pankreatin bzw. Proteinase K führen zum charakteristischen Anstieg der C_{50}-Werte auf 52.5 bzw. 199.1 µg/ml. Alle eingesetzten Enzymlösungen rufen lediglich vernachlässigbar geringe Inhibitionen hervor (siehe Anhang 7.8, Tab. 7.19).

4.1.10 Allergenisolierung

4.1.10.1 Isolierung mittels GPC aus einem Gartenerbsengesamtextrakt

Die Isolierung des 40-kDa-Allergens aus einem mittels TTE gewonnenem Gesamtextrakt erfolgt unter Verwendung des Säulenmaterials Sephacryl® S 100 HR, das eine Proteintrennung im MG-Bereich von 1 bis 100 kDa ermöglicht. Die Trennbedingungen sind an die von HAGEL et al. (1989) beschriebene Methode angelehnt (siehe Anhang 7.13). Eine Kalibrierung des Trennsystems (siehe Abb. 4.19 bzw. Tab. 4.15) mit einem Standardgemisch aus Blue Dextran, BSA, Ovalbumin und Ribonuclease A (Ribo) ermöglicht die Zuordnung der MG-Bereiche einzelner Proteinfraktionen sowie die Einschränkung des zu fraktionierenden Zeitintervalls.

Die Elution der Standardsubstanz Blue Dextran mit einem MG von 2000 kDa nach 99.5 min charakterisiert das Totvolumen der Trennsäule, weil aufgrund des hohen MG keinerlei Wechselwirkungen mit der Säulenmatrix stattfinden. Da die Allergene der Gartenerbse MG zwischen 75 und 14 kDa aufweisen, kennzeichnet die Elution der Standardsubstanz BSA mit einem MG von 67 kDa den Beginn und der Substanz Ribo mit einem MG von 14 kDa das Ende einer durchzuführenden Fraktionierung.

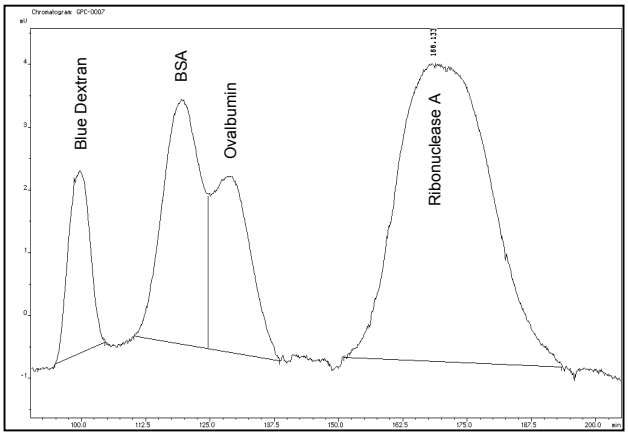


Abb. 4.19: Chromatogramm des MG-Standards

Tab. 4.15: Kenndaten des MG-Standardchromatogrammes

Substanz	MG [kDa]	Konzentration [mg/ml]	Retentionszeit [min]	Area [Skt]
Blue Dextran	2000	0.01	99.5	438671
BSA	67	0.1	119.4	1033892
Ovalbumin	43	0.1	128.8	761751
Ribo	14	0.1	168.1	3124267

Das in Abb. 4.20 dargestellte Chromatogramm eines Gartenerbsengesamtextraktes weist insgesamt sechs deutlich zu erkennende Peaks im relevanten Elutionsbereich auf. Eine Fraktionierung der Eluate erfolgt ausgerichtet an der Trennung der Standardsubstanzen in 15-Minuten-Schritten beginnend nach einer Retentionszeit von 90.6 min und endend nach 210.0 min. Die erhaltenen Eluate werden lyophilisiert, in 500 µl bidest. Wasser rehydratisiert, dialysiert und abschließend reduziert (siehe Anhang 7.13 bzw. 7.14).

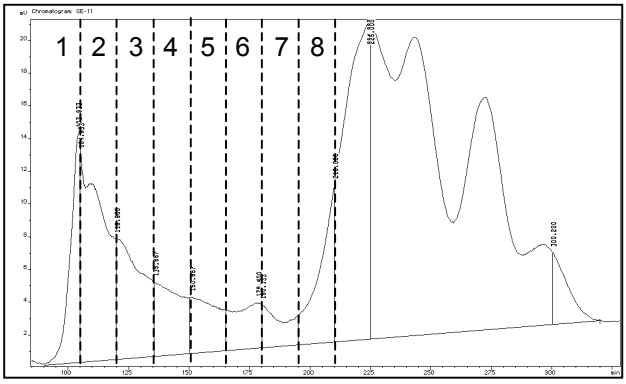
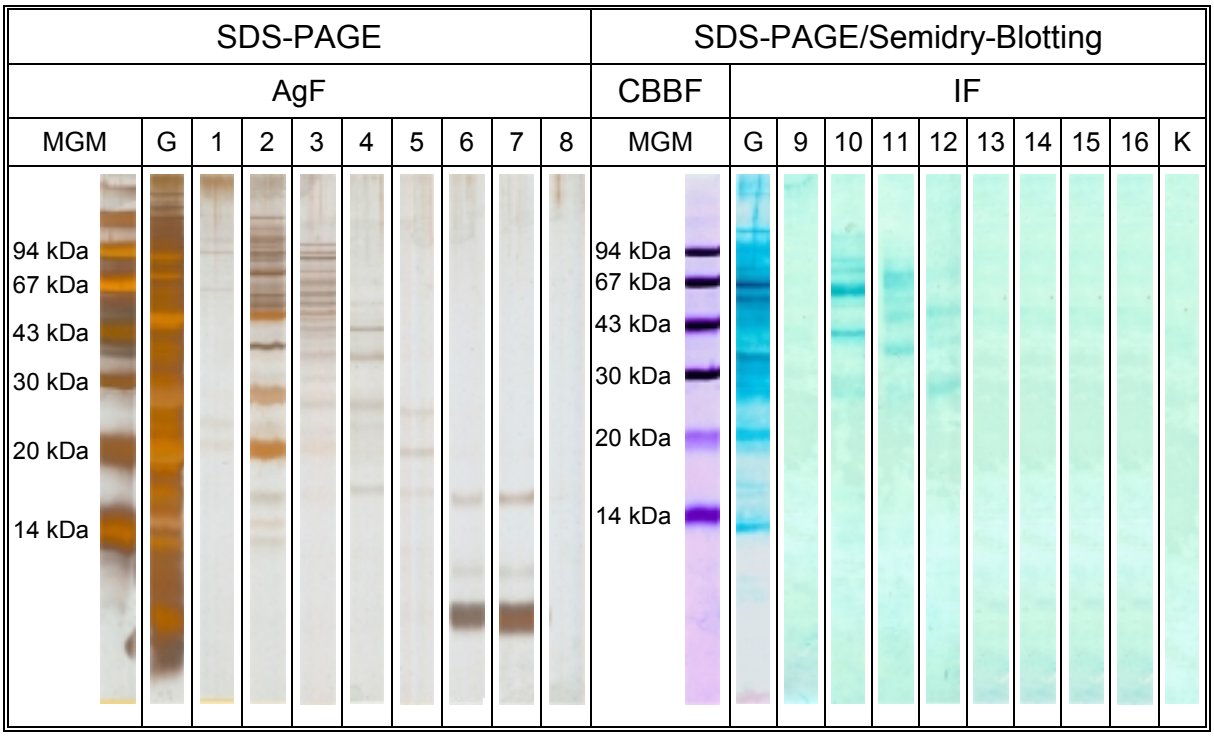


Abb. 4.20: Chromatogramm des Gartenerbsengesamtextraktes (937 mg/l)



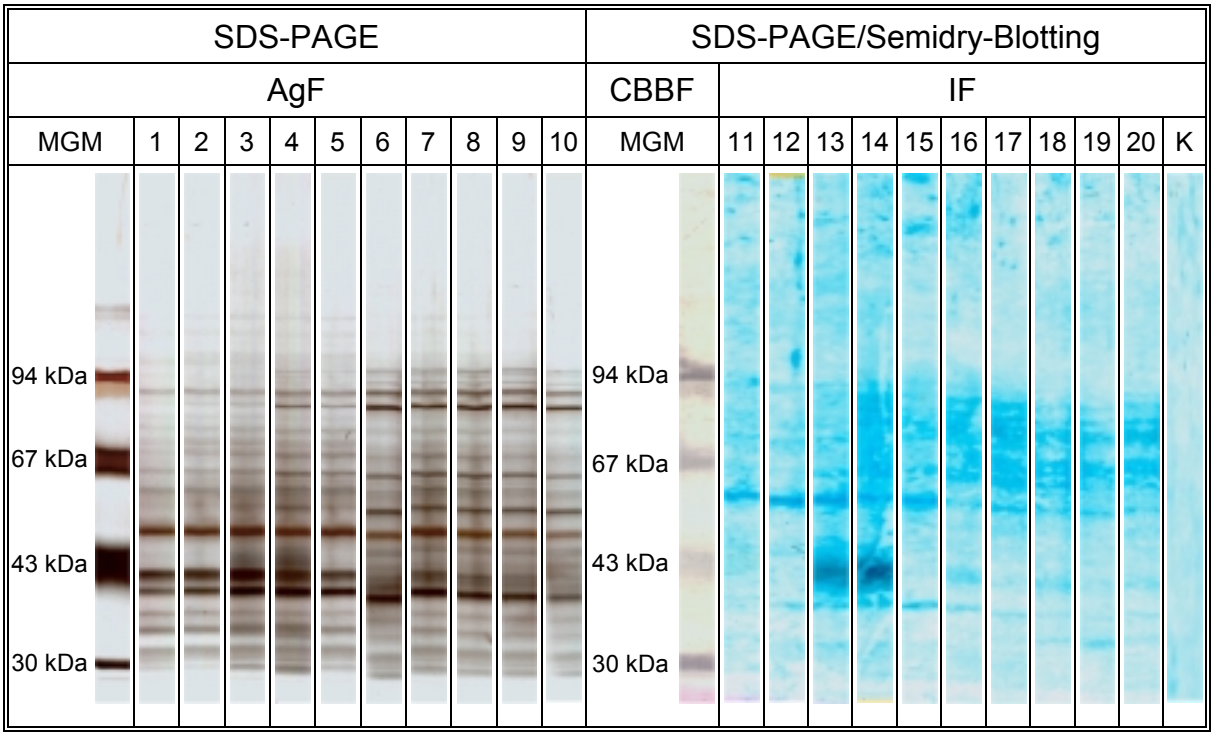
MGM: Molekulargewichtsmarker G: Gesamtextrakt (937 mg/l) K: Kontrolle
1, 9: Fraktion 1 (90 - 105 min) 2, 10: Fraktion 2 (105 - 120 min) 3, 11: Fraktion 3 (120 - 135 min)
4, 12: Fraktion 4 (135 - 150 min) 5, 13: Fraktion 5 (150 - 165 min) 6, 14: Fraktion 6 (165 - 180 min)
7, 15: Fraktion 7 (180 - 195 min) 8, 16: Fraktion 8 (195 - 210 min)

Abb. 4.21: AgF und IF der Fraktionierung des Gesamtextraktes (15-Minuten-Schritte)

Die in Abbildung 4.21 dargestellten AgF der Fraktionen 1 und 8 sowie die korrespondierenden IF (9 & 16) ergeben keinerlei Anfärbungen, so dass weitere Untersuchungen auf das Zeitintervall 105 bis 195 min begrenzt werden können. Die unspezifische Proteinfärbung verdeutlicht, dass innerhalb der Retentionszeit von 105 bis 150 min in den Fraktionen 2 bis 4 der überwiegende Teil der Proteine eluiert. In den Fraktionen 5 bis 7 erfolgt die Detektion niedermolekularer Proteine < 28 kDa, welche jedoch, verdeutlicht durch die IF (13 - 15), keine IgE-Bindungsfähigkeit besitzen.
Die IF der Fraktionen 2 bis 4 (10 - 12) zeigt die Anfärbung der Allergene mit MG von 18, 30, 32, 37, 40, 45, 50, 66 und 75 kDa, wobei in Fraktion 2 (10) eine intensive Detektion der Allergene mit MG von 40 und 66 kDa erfolgt.

Anhand dieser Ergebnisse zeigt sich, dass eine Fraktionierung des Gesamtextraktes in 15-Minuten-Schritten keine zur N-terminalen Sequenzierung ausreichende Trennschärfe der Proteine ergibt. Aufgrund dessen wird eine Fraktionierung eines Gesamtextraktes in 2-Minuten-Schritten durchgeführt, wobei eine Begrenzung auf den Elutionszeitraum von 121 bis 141 min erfolgt, da in diesem Bereich die verstärkte Elution allergener Proteine erfolgt. Der Elutionsbereich von 105 bis 121 min wird von dieser Fraktionierung ausgenommen, da eine Vielzahl nicht allergener Proteine in hoher Konzentration eluieren (siehe Abb. 4.21, 2).

Das erhaltene Chromatogramm (nicht dargestellt) zeigt starke Ähnlichkeiten zum in Abbildung 4.20 dargestellten Chromatogramm. Die in 2-min-Schritten gesammelten Eluate der zweiten Fraktionierung werden wie zuvor beschrieben aufgearbeitet und die enthaltenen Proteine ebenfalls mittels AgF bzw. IF visualisiert. Dabei erfolgt die in Abbildung 4.22 dargestellte elektrophoretische Trennung der Fraktionen des Elutionszeitraumes von 121 bis 141 min unter Verwendung von Tris-Acetat-Gelen, welche verbesserte Trenneigenschaften im relevanten MG-Bereich von 30 bis 94 kDa zeigen. Die spezifische Detektion der Allergenbanden mittels IF erfolgt aufgrund der Gelmatrix in verminderter Qualität, wobei eine Lokalisation der charakteristischen Banden trotzdem möglich ist.

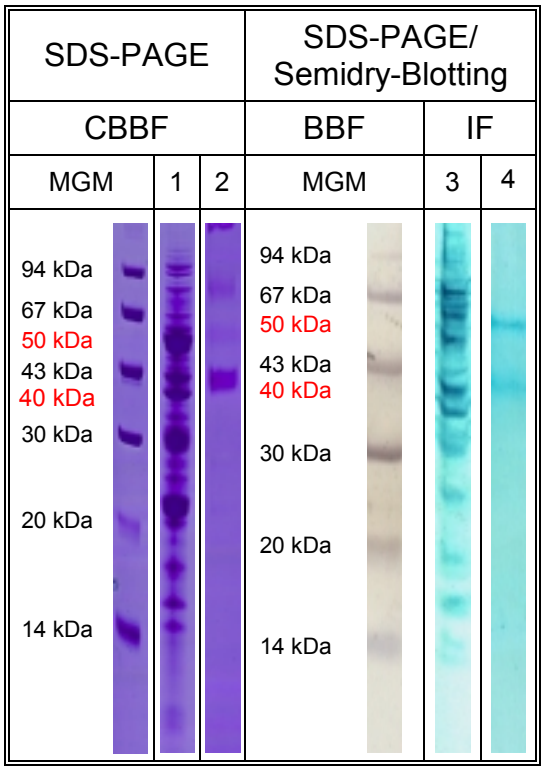


MGM: Molekulargewichtsmarker K: Kontrolle 1, 11: Fraktion 1 (121 - 123 min)
2, 12: Fraktion 2 (123 - 125 min) 3, 13: Fraktion 3 (125 - 127 min) 4, 14: Fraktion 4 (127 - 129 min)
5, 15: Fraktion 5 (129 - 131 min) 6, 16: Fraktion 6 (131 - 133 min) 7, 17: Fraktion 7 (133 - 135 min)
8, 18: Fraktion 8 (135 - 137 min) 9, 19: Fraktion 9 (137 – 139 min) 10, 20: Fraktion 10 (139 – 141 min)

Abb. 4.22: AgF und IF der Fraktionierung des Gesamtextraktes (2-Minuten-Schritte)

Die AgF der Fraktionen 1 und 2 zeigt neben einigen weniger stark detektierten Banden eine intensive Anfärbung der Proteine mit MG von 37, 40 und 50 kDa. In den folgenden Fraktionen erfolgt eine stärkere Detektion weiterer Proteine mit MG von 55, 66, 85 und 90 kDa sowie zahlreicher schwächer detektierter Banden. Die IF der Fraktionen (11 - 20) zeigt, dass die Allergene mit MG von 37, 45, 50, 66 und 75 kDa in sämtlichen Fraktionen mit wenig veränderter Intensität angefärbt werden. Lediglich das 40-kDa-Allergen wird in Fraktion 3 und 4 (13 & 14) mit hoher Intensität, in den folgenden Fraktionen aber wesentlich schwächer detektiert.

Anhand dieser Ergebnisse des in 2-Minuten-Schritten fraktionierten Gesamtextraktes ergibt sich eine Verteilung der Allergene mit MG > 37 kDa über einen längeren Elutionszeitraum, wodurch eine Anreicherung in einzelnen Fraktionen und somit eine für die N-terminale Sequenzierung ausreichende Proteinisolierung nicht gewährt ist. Im Gegensatz dazu eluiert das Allergen mit einem MG von 40 kDa zum überwiegenden Teil innerhalb eines stark begrenzten Zeitraumes von 4 min in den Fraktionen 3 und 4. Folglich werden insgesamt 15 chromatographische Fraktionierungen unter Sammlung der nach einer Retentionszeit von 125 bis 129 min eluierenden Proteine durchgeführt, die Eluate vereinigt, wie zuvor beschrieben aufgearbeitet und einer elektrophoretischen Trennung unterzogen. Anschließend erfolgt der Transfer auf eine PVDF-Membran sowie die in Abbildung 4.24 dargestellte Proteindetektion mittels CCBF bzw. die Allergendetektion durch IF.



MGM: Molekulargewichtsmarker

1,3 : Gesamtextrakt 2, 4: gepoolte GPC-Fraktion

Abb. 4.24: CBBF und IF der gepoolten GPC-Fraktion

Die CBBF zeigt dass die gepoolte Fraktion (2) neben dem diskret detektiertem 40-kDa-Protein zwei weitere Proteine mit MG von ca. 50 und 75 kDa enthält. Dabei handelt es sich, ersichtlich anhand der IF (4), um Allergene mit MG von 40 sowie 50 kDa, die höhermolekulare Anfärbung wird von einem nicht-allergenen Protein hervorgerufen. Trotz dieser Verunreinigungen wird eine N-terminale Sequenzierung der Allergene mit MG von 40 bzw. 50 kDa durchgeführt, da eine ausreichende Abtrennung von Proteinen mit vergleichbaren MG erfolgt ist. Hierzu werden die Banden ausgeschnitten und direkt zur Sequenzanalyse eingesetzt. Die ermittelte N-terminale Aminosäuresequenz des 40-kDa-Allergens ist in Tab. 4.16 dargestellt. Die Sequenzierung des 50-kDa-Allergens ergibt, vermutlich infolge zu geringer Proteinmengen bzw. aufgrund einer N-terminalen Blockierung, keine eindeutigen Ergebnisse.

Tab. 4.16: N-terminale AS-Sequenzen (übereinstimmende AS grau unterlegt)

40-kDa-Bande	^{1}A	F	L	K	P	I	V	L	E^{9}
Arachin-Untereinheit (SWISSPROT P20780)	^{46}A	F	S	K	P	L	V	L	E^{54}

Zwar können infolge der geringen Proteinmenge lediglich 9 Zyklen der N-terminalen Sequenzierung des 40-kDa-Allergens durchgeführt werden, trotzdem ergibt eine Datenbankrecherche eine 78 %ige Homologie zur AS-Sequenz einer von insgesamt sechs Untereinheiten des Erdnuss-Hauptproteins Arachin.

4.1.10.2 Isolierung mittels GPC aus der Albuminfraktion

Die in Kapitel 4.1.2 ermittelten Ergebnisse belegen sowohl einen Anstieg des allergenen Potenzials der Gartenerbse im Verlauf der Reifung, als auch eine variierende Verteilung der Allergene bezüglich der einzelnen Proteinfraktionen. Daher wird in einer weiteren Versuchsreihe die zuvor nach 7.3.2 aus reifen Gartenerbsensamen der Sorte „Maxigolt“ isolierte Albuminfraktion als Ausgangsmaterial für eine Isolierung mittels GPC eingesetzt, da dieser Fraktion das höchste allergene Potenzial zukommt. Zur Isolierung des 28-kDa-Allergens, dem die höchste immunologische Bedeutung der in dieser Proteinfraktion vorhandenen Allergene zukommt, erfolgt die Trennung sowie die Aufarbeitung der erhaltenen Fraktionen unter den in Abschnitt 4.1.10.1 dokumentierten Bedingungen (siehe Anhang 7.13 & 7.14).

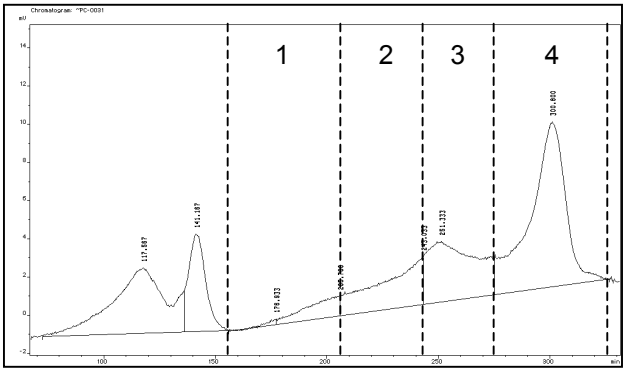
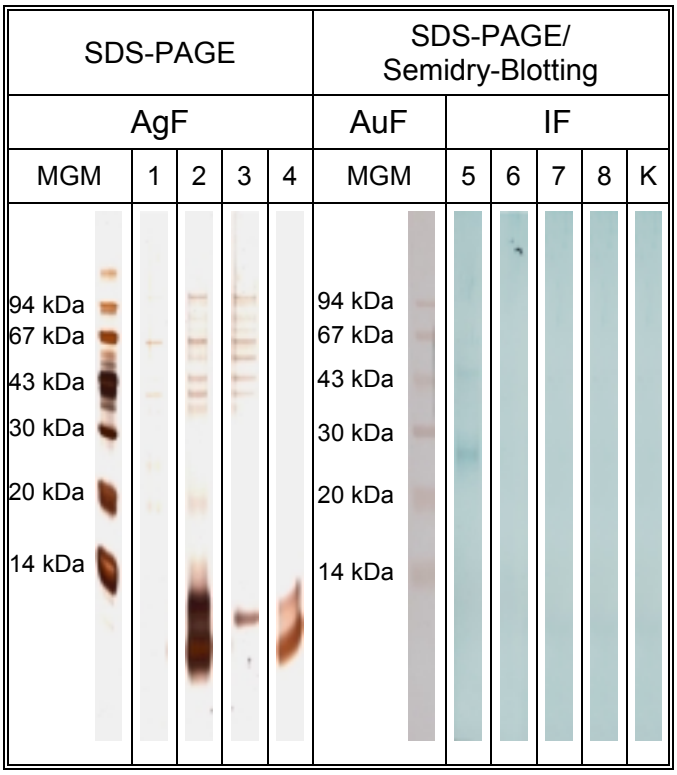


Abb. 4.25: GPC-Chromatogramm des Albuminextraktes (473 mg/l)

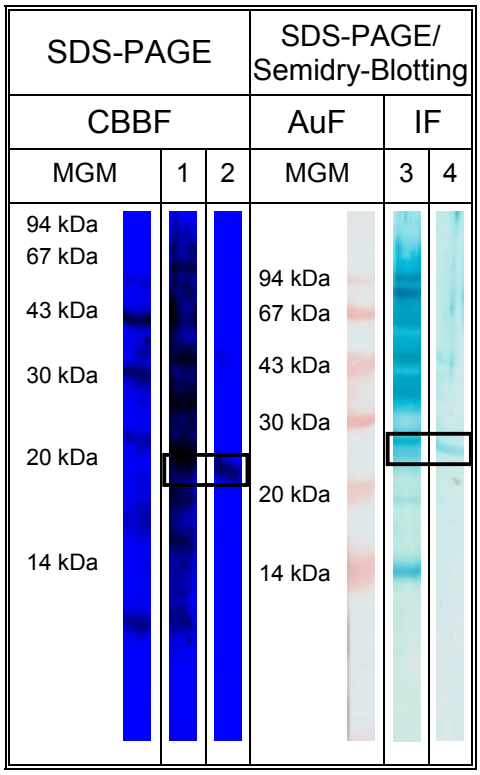
Das GPC-Chromatogramm des getrennten Albuminextraktes (siehe Abb. 4.25) zeigt im Vergleich zum Gesamtextrakt, dargestellt in Abb. 4.20, deutliche Unterschiede, insbesondere im höhermolekularen Bereich. So erfolgt im Zeitintervall von ca. 100 bis 150 min lediglich die Elution zweier Peaks mit geringen Peakhöhen und -flächen. Diese Differenzen deuten auf eine Abtrennung höhermolekularer Proteine durch die FE hin. Von den im Gesamtextrakt detektierten vier Peaks im Elutionszeitraum von 150 bis 325 min werden lediglich die Peaks mit Retentionszeiten von 251.3 und 300.8 min detektiert, so dass auch in diesem Bereich eine Proteinabtrennung zu verzeichnen ist. Auf die Untersuchung des Elutionszeitraumes bis 150 min wird verzichtet (siehe 4.1.10.1). Stattdessen erfolgt die in Abbildung 4.26 dargestellte Detektion der Proteine sowie Allergene von insgesamt vier Fraktionen im Zeitintervall von 155 bis 327 min (siehe auch Abb. 4.25).

Es wird ersichtlich, dass die im Zeitraum von 155 bis 206 min eluierende Fraktion 1 (1) vier Proteine mit MG von 20, 27, 40 sowie 67 kDa enthält, von denen lediglich das 28-kDa-Protein eine IgE-Bindungsfähigkeit aufweist (5). In den Fraktionen 2 und 3 werden mittels AgF Proteine mit MG < 14, 20, 37, 40, 43, 67 und > 94 kDa angefärbt. Die vierte Fraktion des Elutionszeitraumes 275 bis 327 min enthält ausschließlich niedermolekulare Proteine. In den Fraktionen 2 bis 4 werden keine Allergene detektiert (6 - 8). Anhand dieser Detektionen zeigt sich, dass ein großer Anteil der Proteine durch die FE abgetrennt werden konnte. Darunter befinden sich, mit Ausnahme des 28-kDa-Allergens, jedoch auch alle niedermolekularen IgE-bindenden Proteine. Zur Erhöhung der Proteinmenge werden fünfzehn weitere GPC-Trennungen unter Vereinigung der nach einer Retentionszeit von 155 bis 206 min eluierenden Proteine durchgeführt und wie zuvor dokumentiert weiterbehandelt. Die durchgeführten CBBF und IF sind in Abb. 4.27 dargestellt.



MGM: Molekulargewichtsmarker K: Kontrolle
1, 5: Frak. 1 (155 - 206 min) 2, 6: Frak. 2 (206 - 243 min)
3, 7: Frak. 3 (243 - 275 min) 4, 8: Frak. 4 (275 - 327 min)

Abb. 4.26: AgF und IF der Fraktionierung des Albuminextraktes



MGM: Molekulargewichtsmarker
1: Gesamtextrakt
2: gepoolte GPC-Fraktion

Abb. 4.27: CBBF und IF der gepoolten GPC-Fraktion

In der CBBF der gepoolten Fraktion (2) wird lediglich ein Protein mit einem MG von 28 kDa visualisiert, bei dem es sich, ersichtlich aus der IF (4) um ein Allergen handelt. Nach Ausschneiden dieser Bande wird eine N-terminale Sequenzanalyse durchgeführt (siehe Tab. 4.17). Eine Datenbankrecherche ergibt eine 69 %ige Homologie zur AS-Sequenz des als Albumin 1 (PA1A) bezeichneten Samenspeicherproteins der Sojabohne.

Tab. 4.17: N-terminale AS-Sequenzen (übereinstimmende AS grau unterlegt)

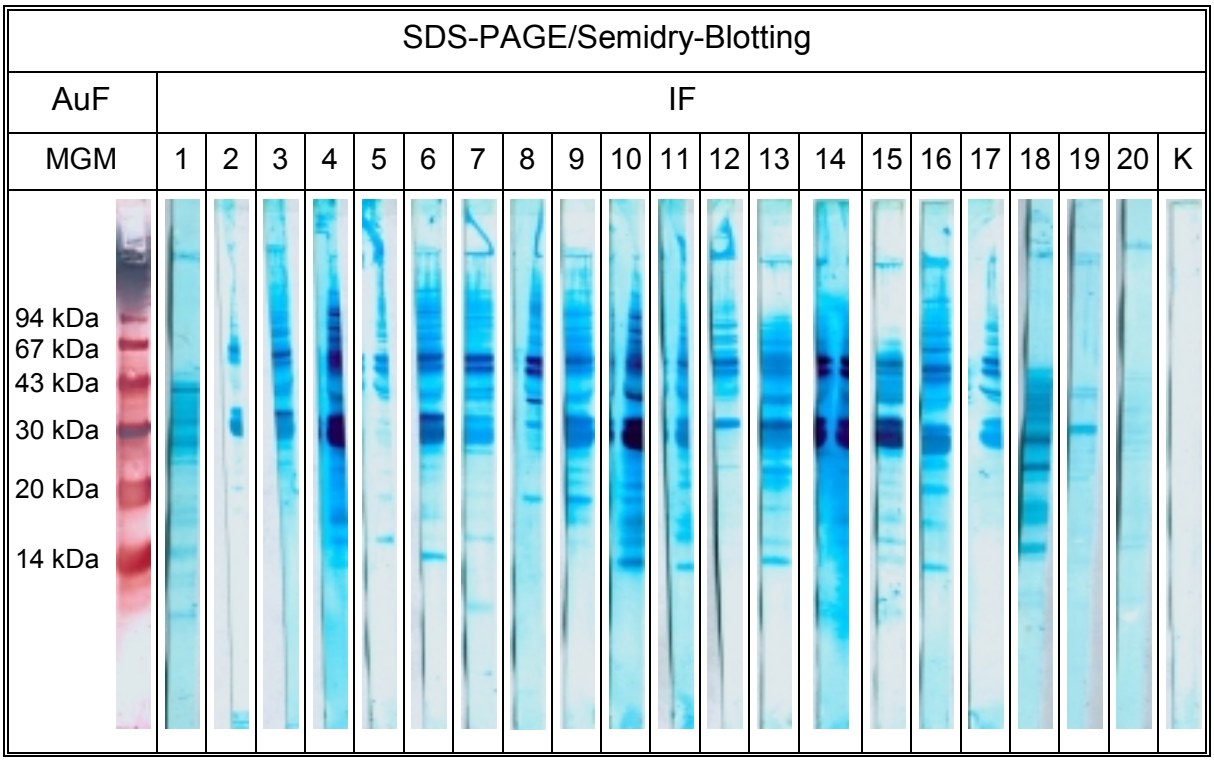
28-kDa-Bande	^{1}V	P	I	A	L	F	V	P	F	L	I	K	P^{13}
Soja-Albumin 1 (SwissProt Q39837)	^{42}V	P	I	G	L	F	V	G	F	C	I	H	P^{54}

4.2 Gartenbohne

4.2.1 Charakterisierung der Gartenbohnenallergene

Die Bestimmung der MG der Gartenbohnenallergene erfolgt durch Inkubation eines durch SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennten und anschließend mittels Semi-dry-Blotting auf eine NC-Membran transferierten Gartenbohnengesamtextraktes unter Verwendung von insgesamt 39 Seren von Patienten, welche nachweislich eine Sensibilisierung gegen Gartenbohnen aufweisen. Zur Detektion unspezifischer Bindungen erfolgt zusätzlich die Inkubation eines NC-Streifens mit einem K. Hierbei handelt es sich um das Serum eines nicht-Atopikers (EAST-Klasse 0). Die Zuordnung der MG der einzelnen Allergene erfolgt über einen definiert zusammengesetzten MGM, dessen Detektion anhand einer AuF erfolgt. Die Darstellung der IF aller Einzelseren zeigen die Abbildung 4.27 bzw. 4.28.

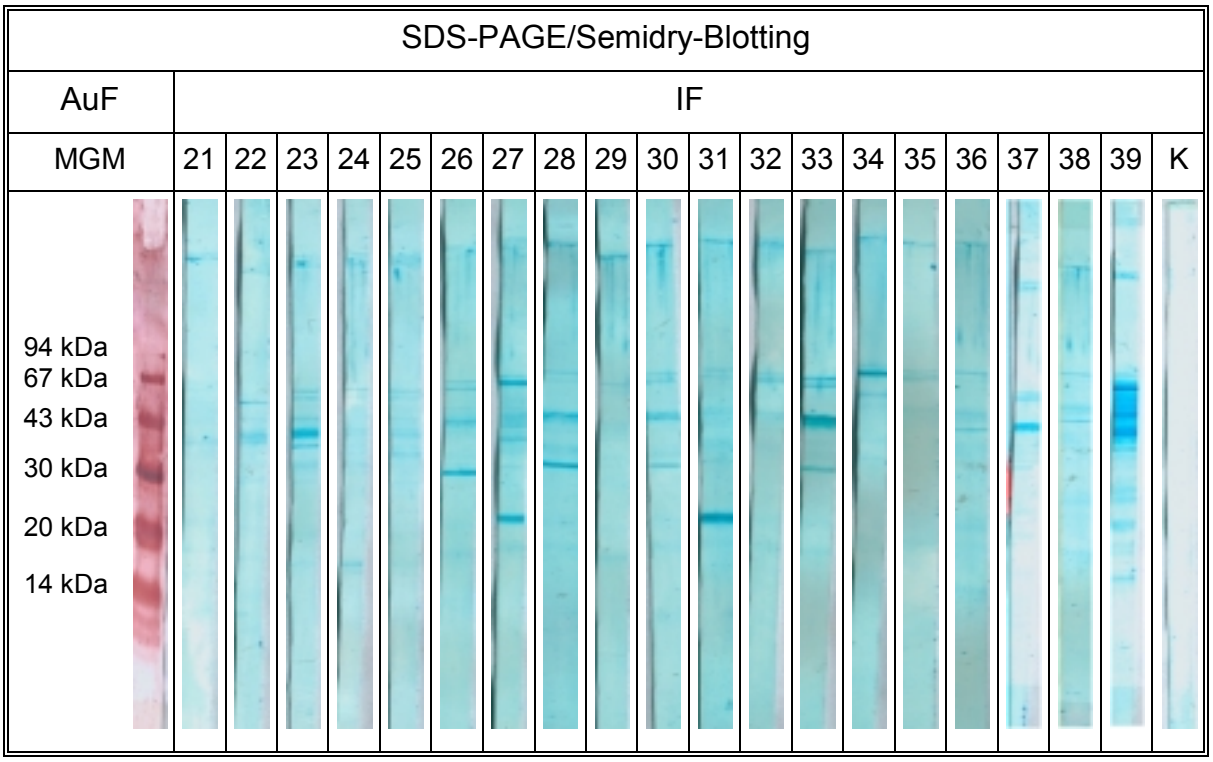
Eine EAST-Untersuchung ergibt ausschließlich für die Seren Nr. 2 bis 17 IgE-Gehalte ≥ 0.7 U/ml (EAST-Klassen 2 bis 4), so dass lediglich diese 16 Seren für weitere immunologische Untersuchungen Verwendung finden. Nähere Angaben zu den verwendeten Patientenseren gibt Tabelle 7.1 in Anhang 7.2.



MGM: Molekulargewichtsmarker K: Kontrolle

1: CF 2: NB 3: CG 4: KDH 5: HK 6: RK 7: KL 8: CL 9: EP 10: FR
11: FS 12: HS 13: SW 14: UW 15: JW 16: HR 17: IS 18: MS 19: HM 20: LS

Abb. 4.27: IF der Gartenbohnensorte „Maxi“ unter Verwendung der Einzelseren 1 - 20



MGM: Molekulargewichtsmarker K: Kontrolle

21: SK 22: LB 23: RD 24: EH 25: IO 26: UR 27: PK 28: BW 29: MW 30: HS
31: JMA 32: SB 33: IC 34: AD 35: JHE 36: JK 37: EK 38: PE 39: DS

Abb. 4.28: IF der Gartenbohnensorte „Maxi“ unter Verwendung der Einzelseren 21 - 39

Anhand der in Abbildung 4.27 und 4.28 dargestellten IF mit den Einzelseren der Gartenbohnenallergiker zeigt sich, dass die Patientenseren der EAST-Klassen 2 bis 4 (2 - 17) generell sowohl eine intensivere Detektion der Gartenbohnenallergene hervorrufen als auch eine höhere Anzahl an IgE-bindenden Proteinen beinhalten. Aber auch zwischen diesen sechzehn im Poolserum enthaltenen Seren treten starke Unterschiede bezüglich der Detektionsintensität einzelner Allergene und des angefärbten Allergenspektrums auf. Durch die Inkubation mit dem K kann das Auftreten unspezifischer Bindungen ausgeschlossen werden.

Insgesamt werden 14 Allergene mit MG < 14 und 75 kDa detektiert. Besonders auffällig ist dabei die intensive Detektion der Banden mit MG von 29, 31, 55 und 67 kDa. Die in Abbildung 4.29 dokumentierte Detektionshäufigkeit zeigt weiterhin, dass diesen Allergenen neben den Banden bei 38, 42 und 48 kDa auch bezüglich der Häufigkeit der Detektion die größte Bedeutung zukommt.

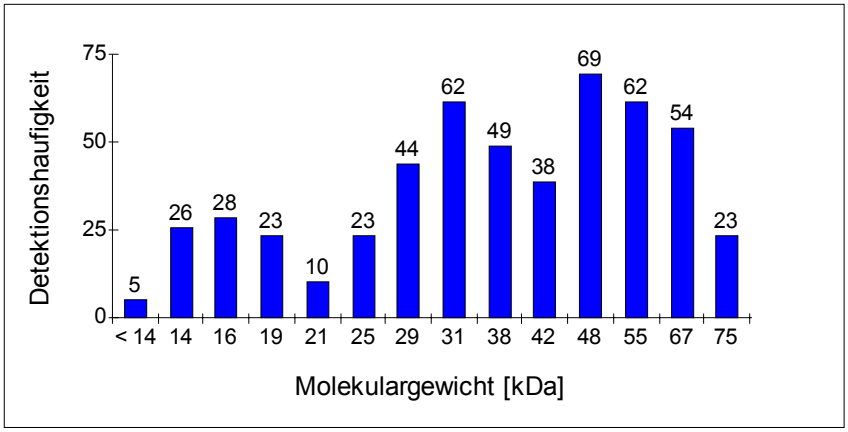
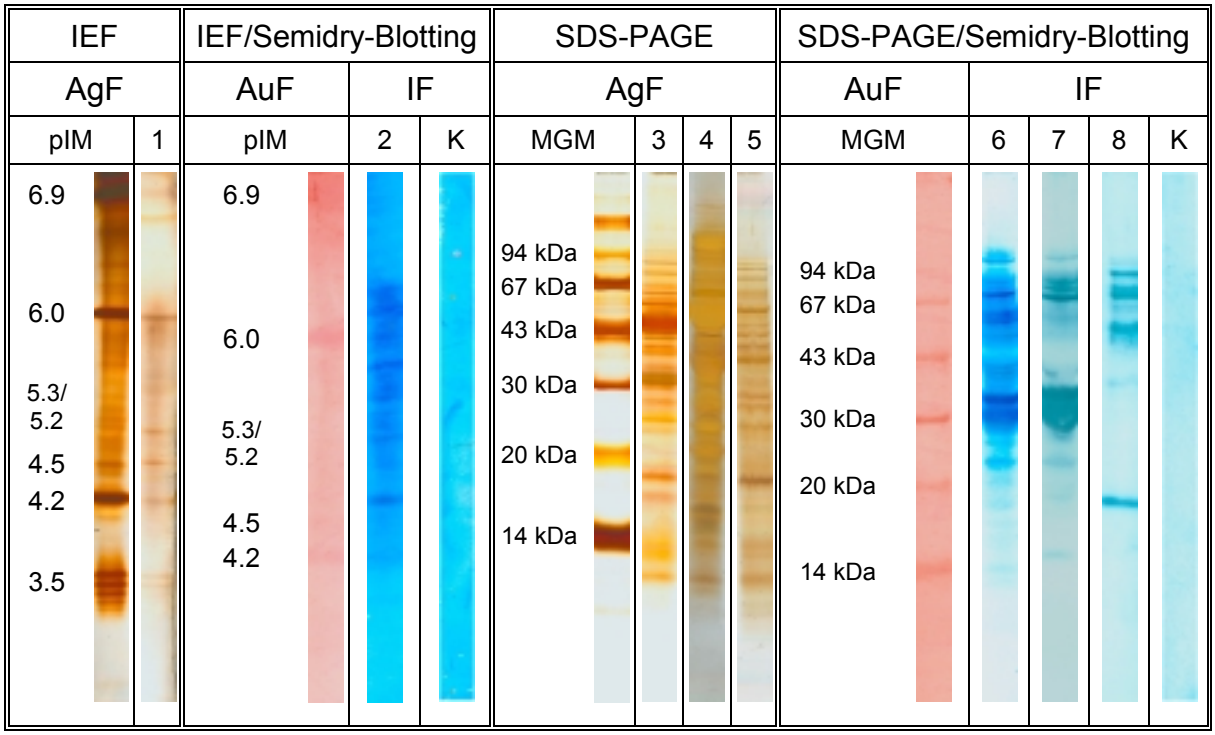


Abb. 4.29: Detektionshäufigkeit der Gartenbohnenallergene

Des weiteren werden fünf Allergene mit MG von 14, 16, 19, 25 und 75 kDa mit einer Häufigkeit von 23 bis 28 % und die Allergene mit MG < 14 und 21 kDa durch 2 bzw. 4 Seren detektiert. Zu berücksichtigen ist die geringe Anzahl der untersuchten Patientenseren, die eine Verallgemeinerung dieser Ergebnisse nur bedingt zulässt.

Zur Bestimmung der pI der Gartenbohnenallergene werden mittels TTE gewonnene Gesamtextrakte aus der Gesamtfrucht und sowohl aus den Samen als auch der Hülse der Sorte „Maxi“ hergestellt. Somit kann zum einen eine Charakterisierung der Proteine bzw. Allergene der Gesamtfrucht und zum anderen die Verteilung auf Samen und Hülse ermittelt werden. Die erhaltenen Extrakte werden mittels IEF bzw. SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend silbergefärbt sowie nach Transfer auf eine NC-Membran immungefärbt. Die Darstellung der Färbungen erfolgt in Abbildung 4.30.



MGM: Molekulargewichtsmarker pIM: pI-Marker K: Kontrolle
1, 2, 3, 6: Gesamtfrucht 4, 7: Samen 5, 8: Hülse

Abb. 4.30: AgF und IF nach IEF bzw. SDS-PAGE der Gartenbohnensorte „Maxi“

Die Darstellung des mittels SDS-PAGE getrennten und mittels AgF anfärbten Extraktes der Gesamtfrucht (3) zeigt zahlreiche Proteinbanden im MG-Bereich < 14 kDa bis 94 kDa. Neben schwachen Anfärbungen können Proteine mit MG von < 14, 16, 19, 25, 29, 31, 48, und 55 kDa eindeutig zugeordnet werden. Im Extrakt der nach SDS-PAGE durchgeführten AgF der Gartenbohnensamen der Sorte „Maxi“ (4) können die Proteine mit MG von 16, 25, 29, 31 und 48 kDa angefärbt werden, der Extrakt der Hülse (5) dagegen zeigt ein unterschiedliches Proteinspektrum mit Banden bei 19, 25, 29, 48 und 55 kDa.

Sowohl die IF des Gesamtextraktes nach SDS-PAGE (6) als auch die des Samens (7) zeigt sämtliche bereits zuvor charakterisierte Allergene der Gartenbohne. Im Extrakt der Hülse (8) dagegen werden nur sechs Allergene mit MG von 19, 38, 48, 55, 67 sowie 75 kDa sichtbar, so dass auch im Allergenspektrum eindeutige Differenzen zwischen Samen und Hülse nachgewiesen werden können.

Der mittels IEF getrennte und durch AgF angefärbte Gesamtextrakt (1) weist insgesamt sieben Proteine mit pI von 6.9, 6.7, 6.0, 5.2, 4.5, 4.2 und 3.5 im neutralen und sauren pH-Bereich auf. Durch die spezifische Anfärbung mittels IF (2) können die Proteine mit pI von 6.0 und 5.2 als IgE-bindend charakterisiert werden. Weiterhin werden Allergene mit pI von 6.3, 6.2, 5.8, 5.6 und 4.7 detektiert. Da auch hier das K keine Anfärbungen zeigt, können unspezifische Bindungen wiederum ausgeschlossen werden.

4.2.2 Reifungseinfluss

Die Untersuchung eines potenziellen Reifungseinflusses auf die Allergenität der Gartenbohne erfolgt anhand der vier Sorten „Maxi“, „Salou“, „Admires“ sowie „Montano“ eines Reifungsversuches, der aufgrund seiner Konzeption die sortenreine Ernte zu unterschiedlichen Zeitpunkten ermöglicht, wobei lediglich die Ergebnisse der Sorten „Maxi“ (Ma) und „Montano“ (Mo) dokumentiert sind.
Die geernteten Früchte werden zunächst infolge der unterschiedlichen Einzelgewichte in RS eingeteilt. Anschließend erfolgt die Bestimmung der Wasser- (siehe Anhang 7.4) und Proteingehalte (siehe 7.5), sowie nach Herstellung der Proteinextrakte mittels TTE (siehe 7.3.1) die Anfärbung der Gesamtproteinmuster und der Allergenspektren (siehe Abb. 4.31) sowie die Bestimmung des allergenen Potenzials (siehe Tab. 4.18) der einzelnen RS.

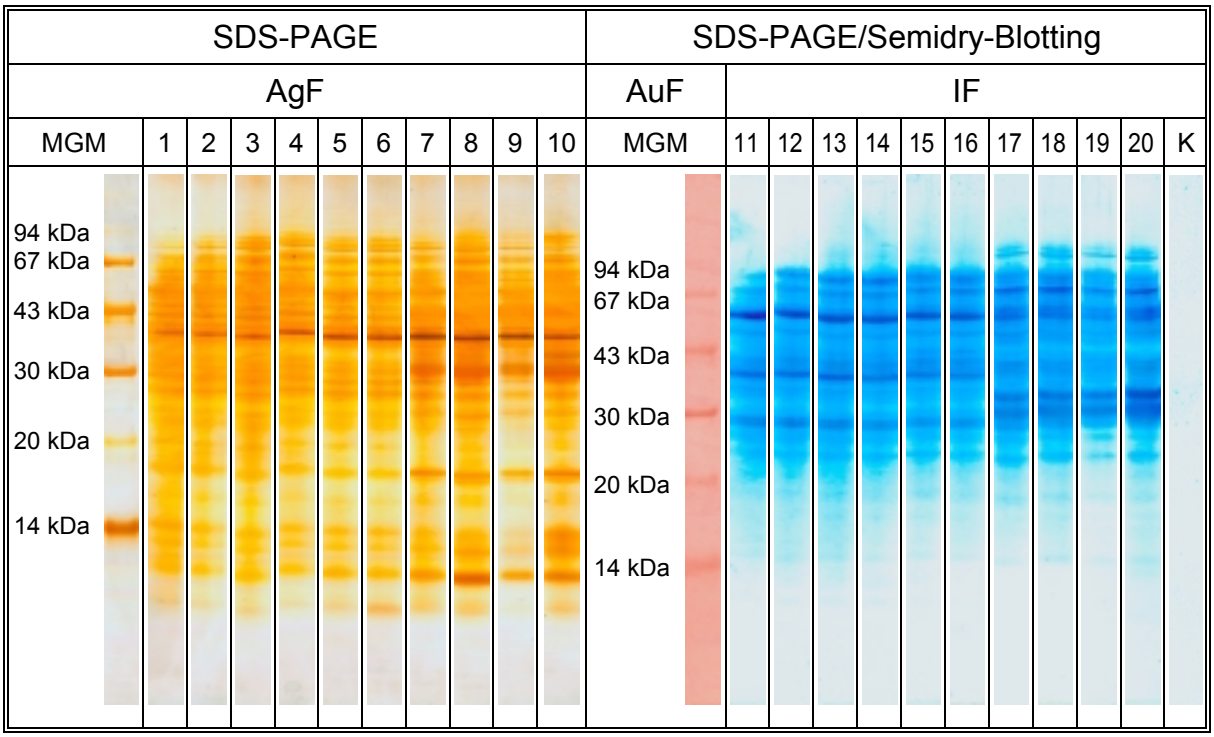
Tab. 4.18: Grundanalytische Kenndaten und C_{50}-Werte der RS

Kennzeichnung	Gewichtsbereich [g]	Wassergehalt [%]	Proteingehalt [%]	C_{50}-Werte [µg/ml]
Mo-1	0.00 - 1.99	93.7	1.5	29.6
Mo-2	2.00 - 2.99	93.8	1.4	18.5
Mo-3	3.00 - 3.99	94.1	1.2	35.1
Mo-4	4.00 - 4.99	94.3	1.4	19.5
Mo-5	5.00 - 5.99	93.4	1.6	26.3
Mo-6	6.00 - 6.99	93.2	1.5	23.6
Mo-7	7.00 - 7.99	89.3	2.1	13.3
Mo-8	8.00 - 8.99	86.0	1.8	15.0
Mo-9	9.00 - 9.99	86.4	2.0	6.9
Mo-10	10.00 - 10.99	91.0	2.5	9.4
Ma-1	0.00 - 1.99	93.7	1.8	38.7
Ma-2	2.00 - 3.99	94.4	1.5	23.6
Ma-3	4.00 - 5.99	93.3	1.4	21.8
Ma-4	6.00 - 7.99	93.7	1.2	29.9
Ma-5	8.00 - 9.99	94.2	1.2	33.0
Ma-6	10.00 - 11.99	91.2	1.6	21.6
Ma-7	12.00 - 13.99	91.9	1.5	28.3
Ma-8	14.00 - 15.99	91.8	1.4	31.5

Die in Tabelle 4.18 aufgeführten grundanalytischen Kenndaten belegen für die frühen RS Mo-1 bis Mo-6, dies entspricht dem Gewichtsbereich von 0 bis 6.99 g der Gartenbohnensorte „Montano“, weder bezüglich der zwischen 93.2 und 94.3 % liegenden Wasser- noch der Proteingehalte, die Werte im Bereich von 1.2 bis 1.6 % aufweisen, tendenzielle Veränderungen. Die übrigen RS Mo-7 bis Mo-10 hingegen weisen mit Werten zwischen 86.0 und 91.0 % deutlich niedrigere Wasser- und erhöhte Proteingehalte im Bereich von 1.8 bis 2.5 % auf.

Diese Veränderungen lassen sich ebenfalls bei der relativen Quantifizierung der allergenen Potenziale mittels EAST-Inhibition unter Verwendung der RS Mo-10 als festphasengebundenen Extrakt erkennen. So liegen die C_{50}-Werte der Stufen Mo-1 bis Mo-6 im Intervall von 18.5 bis 35.1 µg/ml. Die höheren RS weisen dagegen geringere Werte zwischen 6.9 und 15.0 µg/ml und somit höhere allergene Potenziale auf.

Diese Veränderungen sind für die RS Ma-1 bis Ma-8 der Sorte „Maxi“ nicht festzustellen. So zeigen weder die Wassergehalte mit Werten zwischen 91.2 und 94.4 % bzw. die Proteingehalte, die zwischen 1.2 und 1.8 % liegen, noch die im Bereich von 21.6 bis 38.7 µg/ml liegenden C_{50}-Werte tendenzielle Veränderungen im Verlauf der Reifung.



MGM: Molekulargewichtsmarker K: Kontrolle

1, 11: Mo-1 2, 12: Mo-2 3, 13: Mo-3 4, 14: Mo-4 5, 15: Mo-5

6, 16: Mo-6 7, 17: Mo-7 8, 18: Mo-8 9, 19: Mo-9 10, 20: Mo-10

Abb. 4.31: AgF und IF der Reifungsstufen 1 - 10 der Gartenbohnensorte „Montano“

Sowohl die in Abbildung 4.31 dargestellten AgF (1 - 10) als auch die IF (11 - 20) zeigen Veränderungen der detektierten Bandenspektren im Verlauf der Reifung.

So zeigen zwar alle unspezifischen Anfärbungen im niedermolekularen Bereich Proteinbanden mit MG < 14, 14, 16, 19, 21, 25, 27, 29 und 38 kDa, doch erfolgt ein kontinuierlicher Anstieg der Detektionsintensität. Im Gegensatz dazu werden im höhermolekularen Bereich die Proteine mit MG von 44, 48, 55, 67, 70 und 75 kDa in unveränderter Intensität detektiert. Lediglich das 31-kDa-Protein wird ausschließlich in den RS Mo-7 bis Mo-10 (7 -10), das 42-kDa-Protein hingegen in den Stufen Mo-1 bis Mo-6 (1 - 6), detektiert.

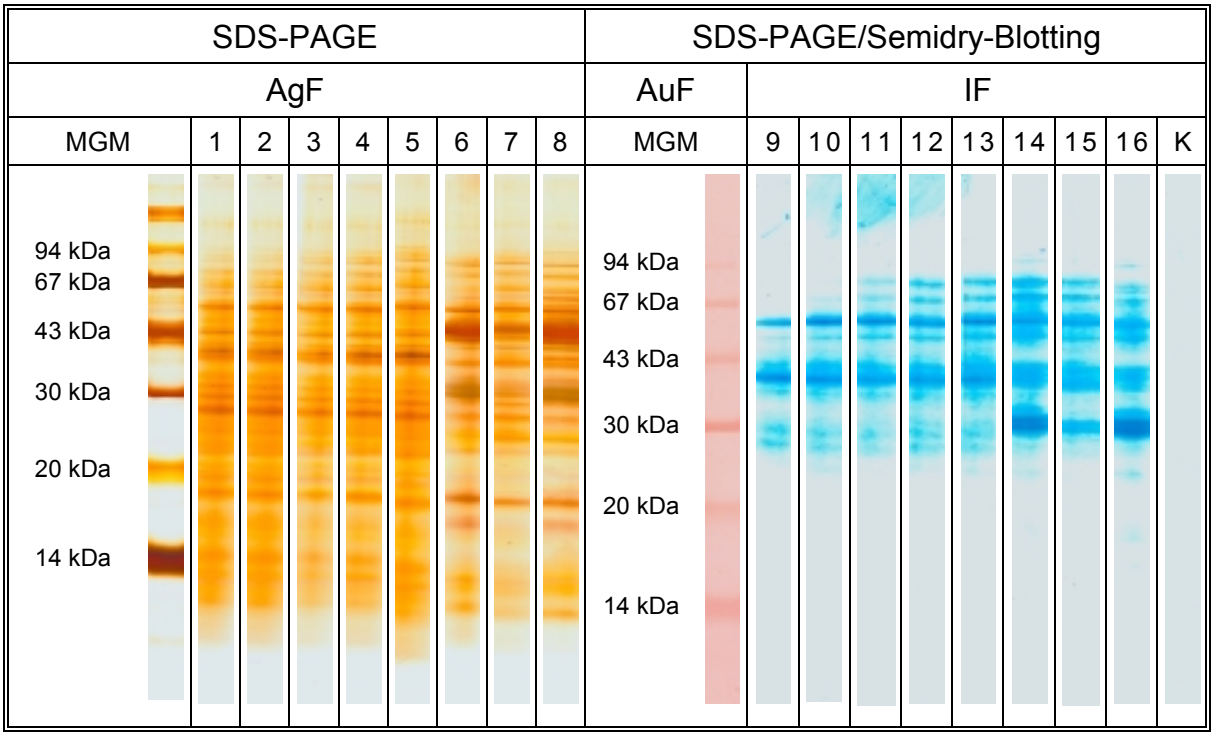
Ein vergleichbares Detektionsverhalten zeigen die spezifischen Allergenspektren (11 - 20) der einzelnen RS. So werden im niedermolekularen Bereich gleichbleibend schwache Anfärbungen der IgE-bindenden Proteine mit MG von 14, 16, 19 und 21 kDa sowie ebenfalls konstante jedoch wesentlich stärker detektierte Allergene mit MG von 25, 29, 48 und 75 kDa angefärbt. Weiterhin erfolgt in den RS Mo-1 bis Mo-6 (11 - 16) eine intensive Detektion des 42-kDa-Allergens sowie in den Extrakten Mo-7 bis Mo-10 (17 - 20) der Allergene mit MG von 31 und 38 kDa.
Eine Veränderung der Detektionsintensität weisen die Banden mit MG von 55 und 67 kDa auf. Dabei zeigt sich, dass der Anstieg der Detektionsintensität des 67-kDa-Allergens im Verlauf der Reifung mit einer Intensitätsabnahme des 55-kDa-Allergens einhergeht.

Zusammenfassend lässt sich eine Übereinstimmung zu den C_{50}-Werten der EAST-Inhibition feststellen, welche vergleichbare allergene Potenziale für die RS Mo-1 bis Mo-6 bzw. Mo-7 bis Mo-10 ergibt. So stehen beim Übergang von RS Mo-6 auf Mo-7 die ausbleibende Detektion des 42-kDa-Allergens der zusätzlichen Anfärbung des 31- bzw. 38-kDa-Allergens sowie die Gegenläufigkeit der IgE-Bindungsfähigkeit der Allergene mit 55 und 67 kDa gegenüber. Insgesamt kommt es dadurch zur Erhöhung des allergenen Potenzials der Gartenbohnensorte „Montano“.

Sämtliche in Abbildung 4.32 dargestellten AgF (1 - 8) der RS der Gartenbohnensorte „Maxi“ zeigen zahlreiche Proteinbanden im MG-Bereich < 14 bis 85 kDa, wobei Proteinspektren in stark variierender Intensität angefärbt werden. Alle Stufen weisen mehrere diffuse Banden < 14 kDa sowie schwach detektierte Banden mit MG von 20, 21, 25, 30, 48, 55, 67, 75 und 85 kDa auf. Die Detektion der Proteine mit MG von 16, 19, 31 und 42 kDa erfolgt in den Stufen Ma-1 bis Ma-5 mit mittlerer Intensität, in den höheren RS ist dagegen eine deutlich stärkere Detektion festzustellen. Gegenläufig hierzu verhält sich die Anfärbung der Banden bei 29 bzw. 38 kDa, welche in den RS 1 bis 5 stark, in den folgenden jedoch lediglich schwach ausgeprägt ist.

Die IF (9 - 16) weisen jeweils die charakteristischen Allergene mit MG von 25, 29, 31, 38, 42, 48, 55, 67 und 75 kDa auf, wobei wiederum starke Schwankungen der Detektionsintensitäten auftreten. So werden die Banden mit MG von 25, 29, 42 und 55 kDa mit konstanter Intensität angefärbt. Eine stetig zunehmende IgE-Bindungsfähigkeit ergibt sich für die Allergene mit MG von 48, 67 und 75 kDa.

Vergleichbar mit der AgF wird das 31-kDa-Allergen in den Stufen Ma-1 bis Ma-5 (9 - 13) wesentlich schwächer detektiert als in den folgenden Stufen. Eine Umkehrung der Verhältnisse, eine starke Detektion bis zur Stufe Ma-5 und anschließend eine deutlich verminderte Anfärbung, ergibt sich für das 38-kDa-Allergen. Das K wird nicht angefärbt, so dass ein Auftreten unspezifischer Bindungen auszuschließen ist.



MGM: Molekulargewichtsmarker K: Kontrolle 1, 9: Ma-1 2, 10: Ma-2
3, 11: Ma-3 4, 12: Ma-4 5, 13: Ma-5 6, 14: Ma-6 7, 15: Ma-7 8, 16: Ma-8

Abb. 4.32: AgF und IF der Reifungsstufen 1 - 8 der Gartenbohnensorte „Maxi“

Insgesamt belegen somit sowohl die AgF als auch die IF der RS der Gartenbohnensorte „Maxi“ eine deutliche Veränderung der Protein- bzw. Allergenspektren im Verlauf der Reifung. Dabei liegt aufgrund der gegenläufigen Effekte der zum einen zunehmenden IgE-Bindungsfähigkeit bzw. der höheren Gehalte einzelner Allergene und der zum anderen abnehmenden IgE-Bindung bzw. der geringeren Gehalte anderer Allergene ein konstantes allergenes Potenzial vor.

Die in identischer Weise durchgeführten Untersuchungen unter Verwendung der Gartenbohnensorten „Salou“ und „Admires“ (Ergebnisse nicht dargestellt) ergeben bezüglich der Protein- und Allergenspektren einer der Sorte „Maxi“ vergleichbare veränderte Anfärbungen sowie konstante C_{50}-Werte.

Abschließend kann festgestellt werden, dass ausschließlich für die Gartenbohnensorte „Montano“ eine Veränderung des Allergenspektrums infolge von Reifungsunterschieden auftritt, welche eine Erhöhung des allergenen Potenzials zur Folge hat. Die Variation des Allergenspektrums der Sorten „Maxi“, „Salou“ und „Admires“ führt hingegen nicht zur Veränderung der Allergenität.

4.2.3 Sortenvergleich

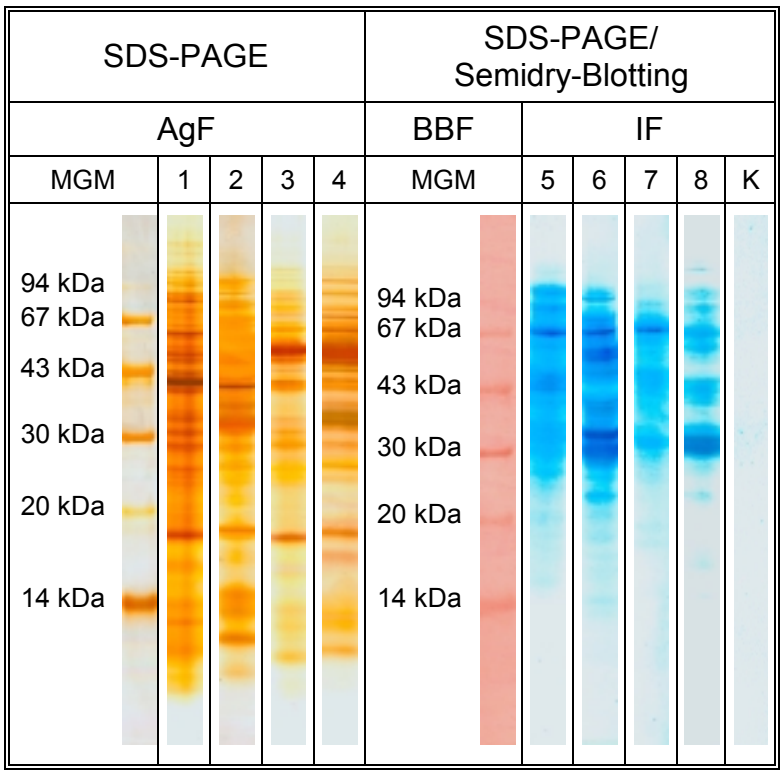
Anhand der in Kapitel 4.2.2 dokumentierten Ergebnisse zeigen sich Unterschiede der Protein- und Allergenspektren unterschiedlicher Gartenbohnensorten. Ob infolge dieser Schwankungen ein Einfluss auf das allergene Potenzial vorliegt, wird durch Untersuchung von vollständig ausgereiften Samen der Sorten „Salou“, „Montano“, „Admires“ und „Maxi“ eines Anbauversuches ermittelt.

Neben der Bestimmung der Wasser- und Proteingehalte (siehe Tab. 4.19) erfolgt weiterhin die Anfärbung der Gesamtproteinmuster mittels AgF sowie der Allergenspektren mittels IF (siehe Abbildung 4.33). Zur relativen Quantifizierung der allergenen Potenziale durch EAST-Inhibition (C_{50}-Werte siehe Tabelle 4.19) werden die jeweils festphasengebundenen Extrakte der einzelnen Sorten mit Extrakten aller anderen Gartenbohnensorten inhibiert.

Tab. 4.19: Kenndaten der Gartenbohnensorten

Sorte	Gewichtsbereich [g]	Wassergehalt [%]	Proteingehalt [%]
„Salou“	5.00 - 5.99	91.6	2.0
„Montano“	10.00 - 10.99	91.0	2.5
„Admires“	15.00 - 17.99	91.6	1.6
„Maxi“	14.00 - 15.99	91.8	1.4

Obwohl die untersuchten Gartenbohnensorten bezüglich ihrer Einzelgewichte große Unterschiede aufweisen, belegt Tabelle 4.19, dass nur geringe Abweichungen der Wasser- und Proteingehalte auftreten. Es kann somit keine Tendenz zwischen dem Einzelgewicht und den grundanalytischen Kenndaten hergestellt werden.



MGM: Molekulargewichtsmarker K: Kontrolle 1, 5: „Salou“
2, 6: „Montano“ 3, 7: „Admires“ 4, 8: „Maxi“

Abb. 4.33: AgF und IF der Gartenbohnensorten

Die AgF der vier untersuchten Gartenbohnensorten (Abb. 4.33, 1 - 4) weisen alle Proteinbanden im MG-Bereich < 14 kDa bis 94 kDa auf. Dabei variiert jedoch sowohl die Detektionsintensität einzelner Proteinbanden als auch das Proteinspektrum insgesamt. Eine vergleichbare Detektion erfolgt nur für die charakteristischen Banden mit MG von 19 sowie 42 kDa. Die niedermolekularen Proteine < 14 kDa dagegen treten bei den Sorten „Salou“ (1) und „Montano“ (2) wesentlich intensiver hervor als in den beiden anderen Sorten.

Dagegen wird insbesondere das 48-kDa-Protein in den Sorten „Admires“ (3) und „Maxi“ (4) intensiver angefärbt. Die stärkste Detektion der Banden mit MG von 16 und 31 kDa erfolgt im Extrakt der Sorte „Maxi“ (4).

Auch die immunologischen Anfärbungen weisen erhebliche Unterschiede bezüglich der Detektionsintensität sowie der Allergenspektren der einzelnen Sorten insbesondere im niedermolekularen Bereich auf. So treten die Allergene mit MG von 14 und 19 kDa lediglich in der Sorte „Montano“ schwach hervor. Durch die Sorten „Salou“ und „Montano“ werden allergene Banden mit den MG 16 und 21 kDa in geringer Intensität detektiert. Die weiteren Allergene mit MG von 25, 29, 31, 38, 42, 48, 55, 67 und 75 kDa werden von allen vier Sorten angefärbt, wobei jedoch die Intensitäten der Einzelbanden z.T. erheblich voneinander abweichen. Unspezifisch Bindungen können aufgrund der ausbleibenden Anfärbungen des K ausgeschlossen werden.

Insgesamt ist aufgrund vergleichbarer Allergenspektren der Gartenbohnensorten „Salou“, „Admires“ und „Maxi“ ein ähnliches allergenes Potenzial zu erwarten. Dagegen wird für die Sorte „Montano“ ein höheres allergenes Potenzial postuliert. Eine Überprüfung erfolgt anhand einer EAST-Inhibition. Dabei ist aufgrund der jeweils individuellen Kopplungsbedingungen bei Herstellung der Allergenscheiben der einzelnen Gartenbohnensorten (siehe Anhang 7.7 & 7.8) eine Aussage bezüglich des allergenen Potenzials lediglich für mit gleichen Extrakten gekoppelte Allergenscheiben möglich (horizontaler Vergleich).

Tab. 4.20: C_{50}-Werte Sortenvergleich Gartenbohne [µg/ml]

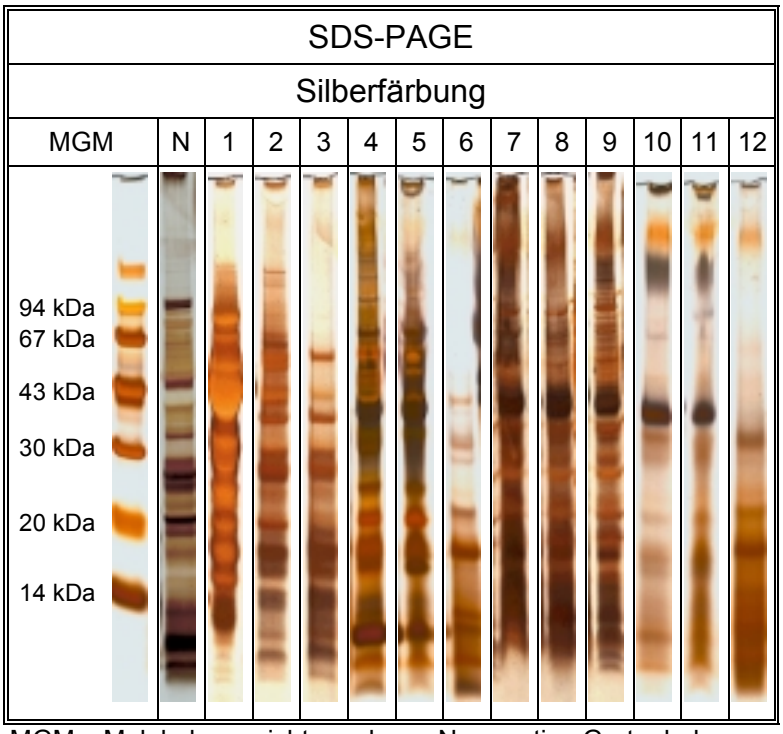
	Inhibitor			
Festphase	„Salou“	„Montano“	„Admires”	„Maxi”
„Salou“	25.5	12.3	37.2	41.1
„Montano“	27.4	9.9	34.9	29.2
„Admires“	32.9	15.2	29.7	33.3
„Maxi“	40.1	14.1	25.6	35.5

Anhand der in Tabelle 4.20 dokumentierten Ergebnisse zeigt sich aufgrund der jeweils deutlich niedrigeren C_{50}-Werte der Sorte „Montano“ eine stärker inhibierende Wirkung und somit ein höheres allergenes Potenzial. Alle übrigen Sorten weisen keine charakteristischen Unterschiede auf, so dass ein vergleichbares allergenes Potenzial festzustellen ist. Die Ergebnisse der EAST-Inhibition stehen somit in Übereinstimmung mit den zuvor getroffenen Überlegungen.

Abschließend ist festzuhalten, dass die zwischen den Gartenbohnensorten „Salou“, „Admires“ und „Maxi“ ermittelten Unterschiede im Protein- und Allergenspektrum keine Unterschiede bezüglich der allergenen Potenz verursachen. Im Gegensatz dazu ist eine erhöhte allergene Aktivität der Sorte „Montano“ vorhanden.

4.2.4 Untersuchung von Handelsprodukten

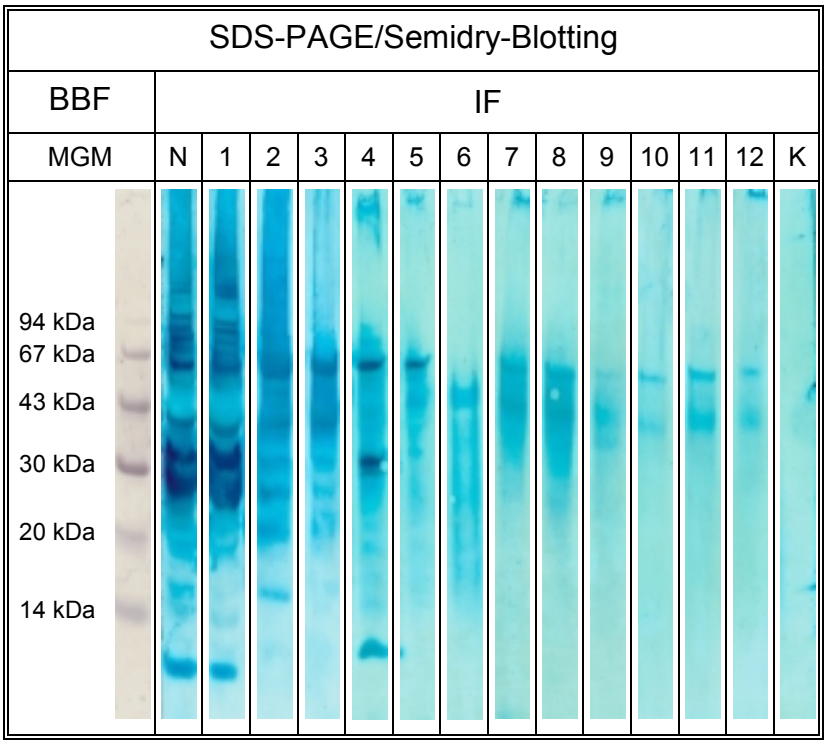
Weitere Erkenntnisse zum Einfluss der technologischen Behandlung auf die Allergenität der Gartenbohnenallergene liefert die Untersuchung unterschiedlicher Handelsprodukte (siehe Tabelle 7.3 in Anhang 7.6). Es werden Trockenbohnen (TB), Tiefkühlbohnen (TKB), Glaskonserven (GKB) und Dosenkonserven (DKB) ohne Verarbeitung (oV), nach Zubereitung (20 min; 100 °C) gemäß Herstellerangaben (nZ) und die dabei entstehenden Kochwässer (KW) untersucht. Anschließend erfolgt die Anfärbung der Gesamtproteinmuster mittels SDS-PAGE/AgF (siehe Abb. 4.34) sowie der Allergenspektren durch SDS-PAGE/Semidry-Blotting und anschließender IF (siehe Abb. 4.35) und die relative Quantifizierung des allergenen Potenzials durch EAST-Inhibition (siehe Tab. 4.21).



MGM: Molekulargewichtsmarker N: native Gartenbohne
1: TB (oV) 2: TB (nZ) 3: TB (KW) 4: TKB (oV)
5: TKB (nZ) 6: TKB (KW) 7: GKB (oV) 8: GKB (nZ)
9: GKB (KW) 10: DKB (oV) 11: DKB (nZ) 12: DKB (KW)

Abb. 4.34: AgF der Handelsprodukte nach SDS-PAGE

Die AgF des hergestellten Extraktes der TB (1) zeigt ein stark differenziertes Proteinmuster im MG-Bereich < 14 bis > 94 kDa. Nach Zubereitung des Produktes (2) erscheint das Proteinspektrum insbesondere durch die fehlende Anfärbung höhermolekularer und die Neubildung niedermolekularer Proteinbanden verändert. Insgesamt wird jedoch weiterhin eine Vielzahl von Banden im gesamten MG-Bereich detektiert. Das bei der Erhitzung anfallende KW (3) zeigt ein hierzu annähernd identisches Bild. Auch das Bandenmuster der TKB (4) zeigt Abweichungen gegenüber der nativen Probe, wobei eine Erhitzung (5) nur geringfügige zusätzliche Veränderungen hervorruft. Die AgF des KW (6) zeigt, dass insbesondere die niedermolekularen Proteine eine hohe Wasserlöslichkeit aufweisen. Die Beeinflussung durch Herstellung von Konserven (7, 10) hat im Vergleich zur Trocknung und Tiefgefrierlagerung einen wesentlich stärkeren Einfluss auf das Proteinspektrum, so dass neben starken diffusen Färbungen nur wenige diskrete Proteinbanden vorhanden sind. Die weitere Zubereitung dieser Extrakte (8, 11) führt dabei zu keiner wesentlichen Veränderung. Anhand der untersuchten KW (9, 12) wird wiederum deutlich, dass der überwiegende Teil der Proteine eine gute Wasserlöslichkeit aufweist.



MGM: Molekulargewichtsmarker N: native Gartenbohne
1: TB (oV) 2: TB (nZ) 3: TB (KW) 4: TKB (oV)
5: TKB (nZ) 6: TKB (KW) 7: GKB (oV) 8: GKB (nZ)
9: GKB (KW) 10: DKB (oV) 11: DKB (nZ) 12: DKB (KW)

Abb. 4.35: IF der Handelsprodukte nach SDS-PAGE/Semidry-Blotting

Die in der nativen Gartenbohne (N) detektierten vierzehn Allergene werden mit Ausnahme des 16-kDa-Allergens in unveränderter Intensität auch in der TB (1) detektiert. Die Zubereitung dieses Produktes (2) führt zum Verlust der IgE-Bindungsfähigkeit der Allergene mit MG < 14, 14, 19, 67 und 75 kDa.
Während des Erhitzungsvorgangs (3) treten die Allergene mit MG von 21, 25, 29, 31, 38, 42, 48 und 55 kDa aufgrund ihrer Wasserlöslichkeit teilweise ins KW über. Im Gegensatz dazu weist die unbehandelte TKB (4) ein wesentlich schwächer ausgeprägtes Allergenspektrum mit deutlichen Banden bei MG < 14, 29, 31 und 55 kDa sowie schwächere Anfärbungen bei 14, 16, 19, 21, 25, 38, 42 und 48 kDa auf. Im zubereiteten Produkt werden nur noch die vier Allergene mit MG von 38, 42, 48 und 55 kDa detektiert, im KW erscheinen Banden mit MG von 42 und 48 kDa. Die untersuchten Konserven (7 -12) weisen sowohl oV als auch nZ sowie in den KW die Allergene mit MG von 42 und 55 kDa in unterschiedlicher Intensität auf.

Tab. 4.21: C_{50}-Werte der untersuchten Handelsprodukte (siehe Tab. 7.25)

Nr.	Kürzel	Inhibitor	Kochzeit [min]	C_{50}-Wert [µg/ml]
N	N	native Gartenbohne, Maxi	-	5.1
1	TB (oV)	Weiße Bohne, getrocknet	-	2.7
2	TB (nZ)	Weiße Bohne, getrocknet	105	6.4
3	TB (KW)	Weiße Bohne, getrocknet	105	21.4
4	TKB (oV)	Prinzessbohnen, Les Primeurs	-	11.3
5	TKB (nZ)	Prinzessbohnen, Les Primeurs	10	7.8
6	TKB (KW)	Prinzessbohnen, Les Primeurs	10	6.9
7	GKB (oV)	Feine junge Brechbohnen	-	27.0
8	GKB (nZ)	Feine junge Brechbohnen	10	43.1
9	GKB (KW)	Feine junge Brechbohnen	10	50.3
10	DKB (oV)	Grüne Bohnen, sehr fein	-	7.4
11	DKB (nZ)	Grüne Bohnen, sehr fein	15	7.5
12	DKB (KW)	Grüne Bohnen, sehr fein	15	17.7

Anhand der in Tabelle 4.21 aufgelisteten Ergebnisse der EAST-Inhibitions-Untersuchungen lässt sich feststellen, dass die TB (oV) (1) und die TB (nZ) (2) der nativen Gartenbohne vergleichbare allergenen Potenziale aufweisen. Diese Ergebnisse stehen in Übereinstimmung zur Detektion der Allergenbanden durch die IF. Auch das bei der Erhitzung erhaltene KW (3) weist keinen deutlich erhöhten C_{50}-Wert auf.

Im Gegensatz dazu zeigen sowohl die ohne Zubereitung aufgearbeitete TKB (4) und die DKB (10) als auch die jeweiligen erhitzten Produkte (5 & 11) sowie das KW der TKB (6) mit C_{50}-Werten zwischen 7.4 und 11.3 µg/ml im Vergleich zur nativen Gartenbohne lediglich leicht verminderte allergene Potenziale. Die IF dokumentieren dagegen eine erhebliche Ausdünnung der Allergenspektren. Eine mögliche Erklärung für diese scheinbare Diskrepanz der Ergebnisse wäre eine überaus starke IgE-Bindungsfähigkeit der detektierten Allergene mit MG von 42 und 55 kDa, welche zu einer starken Inhibitionswirkung durch diese hitzestabilen Allergene führen würde. Die drei untersuchten Varianten der GKB (7 - 9) sowie das KW der DKB (12) weisen zum Teil stark erhöhte C_{50}-Werte und damit in Folge der IF zu erwartende Allergenitätsverminderungen auf.

4.2.5 Lagerung

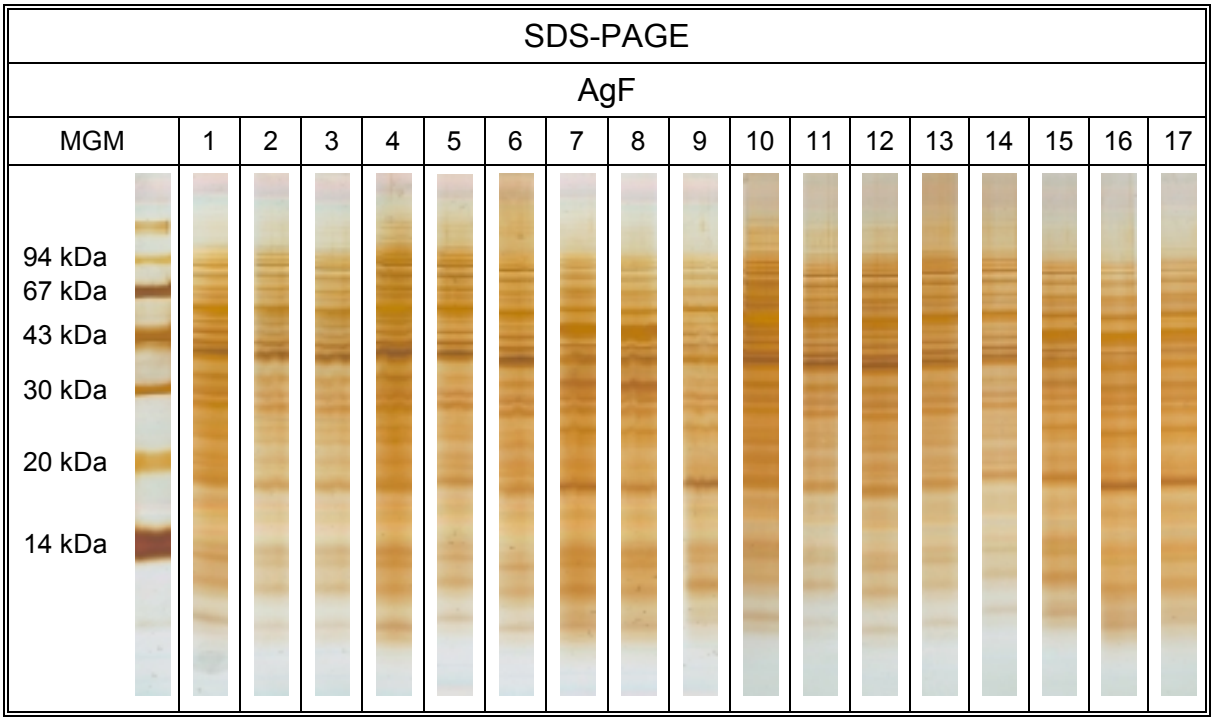
Zur Überprüfung des Einflusses der herkömmlichen Lagerungstemperatur von ca. - 20 °C sowie der Extremtemperatur von - 80 °C auf die Allergene der Gartenbohne werden frisch geerntete Früchte der Sorte „Montano“ bei entsprechenden Temperaturen gelagert. Auf ein vorheriges Blanchieren wird verzichtet, um mögliche Einflüsse durch die thermische Belastung ausschließen zu können. In definierten Abständen erfolgt neben der sensorischen Überprüfung der Proben die Bestimmung des Wasser- und Proteingehaltes, sowie die Detektion des Gesamtproteinmusters, des Allergenspektrums und die relative Quantifizierung des allergenen Potenzials.

Die in Tabelle 4.22 dargestellten Ergebnisse verdeutlichen für die Lagerungstemperaturen - 20 °C sowie - 80 °C konstante Daten über den Gesamtzeitraum von 28 Wochen. So zeigen ausnahmslos alle Proben arttypische sensorische Merkmale. Auch die Wasser- und Proteingehalte weisen bei Schwankungen im Bereich von 92.9 bis 95.0 % bzw. 1.3 bis 1.9 % lediglich analytisch bedingte Abweichungen auf.
Die C_{50}-Werte schwanken zwischen 1.8 und 6.7 µg/ml und weichen nicht charakteristisch vom Wert der nativen Probe (LV-B-0), dieser beträgt 2.9 µg/ml, ab.

Tab. 4.22: Kenndaten des Lagerungsversuches der Gartenbohne

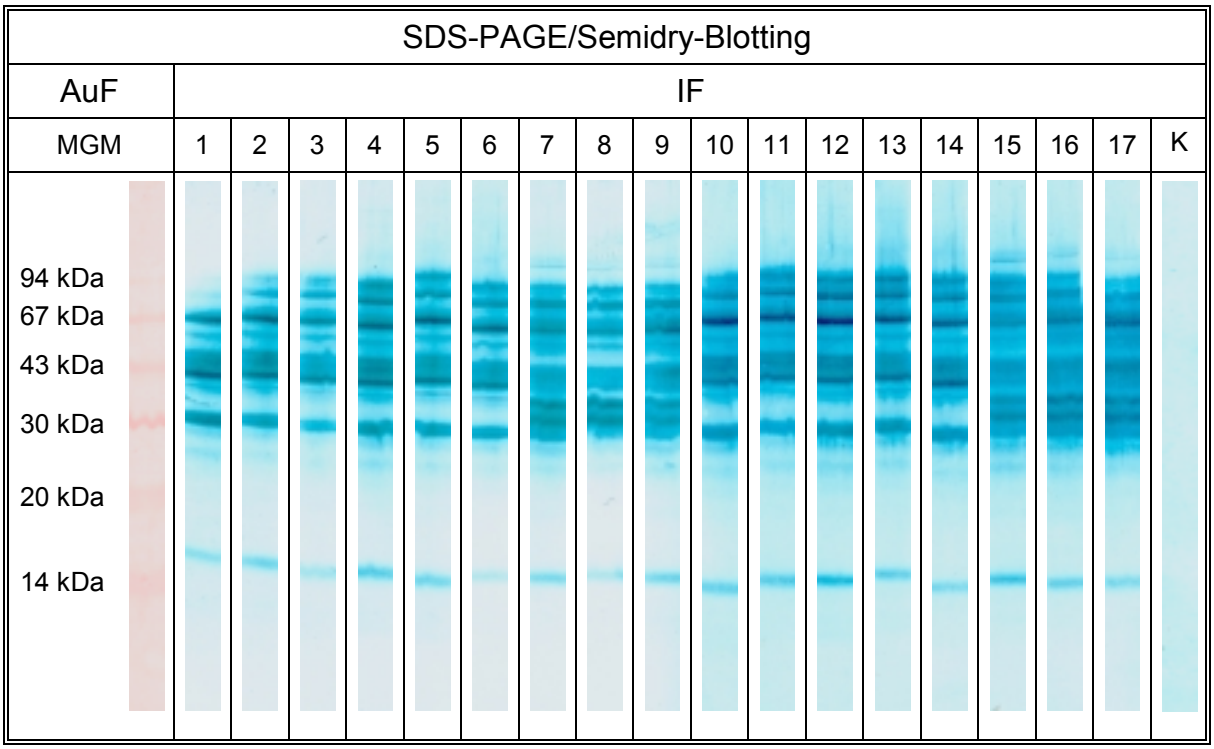
Dauer [Wochen]	Temperatur [°C]	Kenn-zeichnung	Wassergehalt [%]	Proteingehalt [%]	C_{50}-Wert [µg/ml]	sensorische Eigenschaften
0	-	LV-B-0	93.6	1.6	2.9	arttypisch
2	- 20	LV-B-2-20	93.6	1.6	3.0	arttypisch
4	- 20	LV-B-4-20	93.3	1.6	1.8	arttypisch
8	- 20	LV-B-8-20	93.7	1.5	2.2	arttypisch
12	- 20	LV-B-12-20	93.6	1.4	2.2	arttypisch
16	- 20	LV-B-16-20	94.0	1.7	6.7	arttypisch
20	- 20	LV-B-20-20	94.5	1.8	2.3	arttypisch
24	- 20	LV-B-24-20	95.0	1.3	3.3	arttypisch
28	- 20	LV-B-28-20	93.2	1.7	5.3	arttypisch
2	- 80	LV-B-2-80	93.5	1.5	5.5	arttypisch
4	- 80	LV-B-4-80	93.9	1.5	4.4	arttypisch
8	- 80	LV-B-8-80	93.5	1.5	3.5	arttypisch
12	- 80	LV-B-12-80	93.8	1.4	2.5	arttypisch
16	- 80	LV-B-16-80	92.9	1.7	4.1	arttypisch
20	- 80	LV-B-20-80	93.2	1.6	4.5	arttypisch
24	- 80	LV-B-24-80	93.6	1.9	2.8	arttypisch
28	- 80	LV-B-28-80	94.4	1.5	2.0	arttypisch

Die native Gartenbohne der Sorte „Montano“ zeigt in der AgF (Abb. 4.36, 1) ein stark differenziertes Bandenmuster mit Proteinen im MG-Bereich < 14 bis 94 kDa. Für die zwischen 2 und 16 Wochen bei Temperaturen von - 20 bzw. - 80 °C gelagerten Proben (2 - 6 & 10 - 14) ergibt sich ein nahezu identisches Proteinspektrum. Im Gegensatz dazu treten in den 20 bis 28 Wochen gelagerten Proben (7 - 9 & 15 - 17) Abweichungen auf. Die 38-kDa-Bande wird in diesen Extrakten wesentlich schwächer, die Proteine mit MG von 35 und 48 kDa eindeutig intensiver detektiert.



MGM: Molekulargewichtsmarker 1: LV-B-0 2: LV-B-2-20 3: LV-B-4-20 4: LV-B-8-20 5: LV-B-12-20
6: LV-B-16-20 7: LV-B-20-20 8: LV-B-24-20 9: LV-B-28-20 10: LV-B-2-80 11: LV-B-4-80
12: LV-B-8-80 13: LV-B-12-80 14: LV-B-16-80 15: LV-B-20-80 16: LV-B-24-80 17: LV-B-28-80

Abb. 4.36: AgF des Lagerungsversuches der Gartenbohne



MGM: Molekulargewichtsmarker 1: LV-B-0 2: LV-B-2-20 3: LV-B-4-20
4: LV-B-8-20 5: LV-B-12-20 6: LV-B-16-20 7: LV-B-20-20 8: LV-B-24-20
9: LV-B-28-20 10: LV-B-2-80 11: LV-B-4-80 12: LV-B-8-80 13: LV-B-12-80
14: LV-B-16-80 15: LV-B-20-80 16: LV-B-24-80 17: LV-B-28-80

Abb. 4.37: IF des Lagerungsversuches der Gartenbohne

Diese Unterschiede werden ebenfalls bei den in Abbildung 4.37 dargestellten spezifischen Detektionen der Allergenspektren deutlich. So weisen neben dem nativen Extrakt auch die 2 bis 16 Wochen bei beiden Temperaturen gelagerten Proben (1 - 6 & 10 - 14) Allergene mit MG von 14, 25, 29, 31, 38, 42, 48, 55, 67 und 75 kDa auf. Für die über diesen Zeitraum hinaus gelagerten Proben (7 - 9 & 15 - 17) erfolgt die Detektion der 38-kDa-Bande mit höherer Intensität, wohingegen das Allergen mit einem MG von 42 kDa schwächer angefärbt wird. Weiterhin erfolgt die zusätzliche Detektion eines Allergens mit einem MG von 35 kDa.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass beginnend mit einer Lagerungszeit von 20 Wochen sowohl bei einer Temperatur von - 20 °C als auch bei - 80 °C eine Veränderung der Allergene mit MG von 38 und 42 kDa erfolgt. Diese Abweichungen im Allergenspektrum haben jedoch keinen Einfluss auf die Allergenitäten, was aus den nicht charakteristisch abweichenden C_{50}-Werten ersichtlich ist. Es ist zu vermuten, dass es durch temperaturbedingte Abspaltungen kurzer Peptidbausteine bzw. durch Deglycolisierung lediglich zur MG-Änderung des 42-kDa-Allergens und infolge dessen zur Intensivierung der 38-kDa-Bande bzw. der Neudetektion der 35-kDa-Bande kommt, ohne dass eine Beeinflussung der Epitope vorliegt.

4.2.6 Trocknung

Zur Untersuchung des Einflusses der Herstellung von TB auf die Allergenität der Gartenbohne ist es zunächst notwendig, den benötigten Trocknungszeitraum zur Absenkung des Restwassergehaltes auf Werte von 10 bis 11 % zu ermitteln. In Anlehnung an die industrielle Herstellung erfolgt deshalb in Vorversuchen das periodische Auswiegen von bei 58 ± 2 °C im Trockenschrank unter Rotation getrockneten Gartenbohnensamen der Sorte „Montano“. Dabei wird in Abständen von 30 min über einen Zeitraum von 24 h der jeweilige Restwassergehalt des Trocknungsgutes bestimmt. Die Ergebnisse dieser Messreihe sind in Tab. 4.23 dargestellt.

Tab. 4.23: Wassergehalte des Trocknungsversuches (grau unterlegt: Probenahme)

Trocknung [h]	Wassergehalt [%]	Trocknung [h]	Wassergehalt [%]	Trocknung [h]	Wassergehalt [%]
0	81.0	8	4.7	16.5	4.4
0.5	63.3	8.5	4.7	17	4.4
1	51.7	9	4.7	17.5	4.4
1.5	29.5	9.5	4.7	18	4.4
2	28.9	10	4.7	18.5	4.4
2.5	21.1	11	4.7	19	4.2
3	13.5	11.5	4.5	19.5	4.2
3.5	10.1	12	4.5	20	4.2
4	6.4	12.5	4.5	20.5	4.2
4.5	5.2	13	4.5	21	4.2
5	4.9	13.5	4.4	21.5	4.0
5.5	4.9	14	4.4	22	4.0
6	4.9	14.5	4.4	22.5	4.0
6.5	4.9	15	4.4	23	4.0
7	4.7	15.5	4.4	23.5	4.0
7.5	4.7	16	4.4	24	4.0

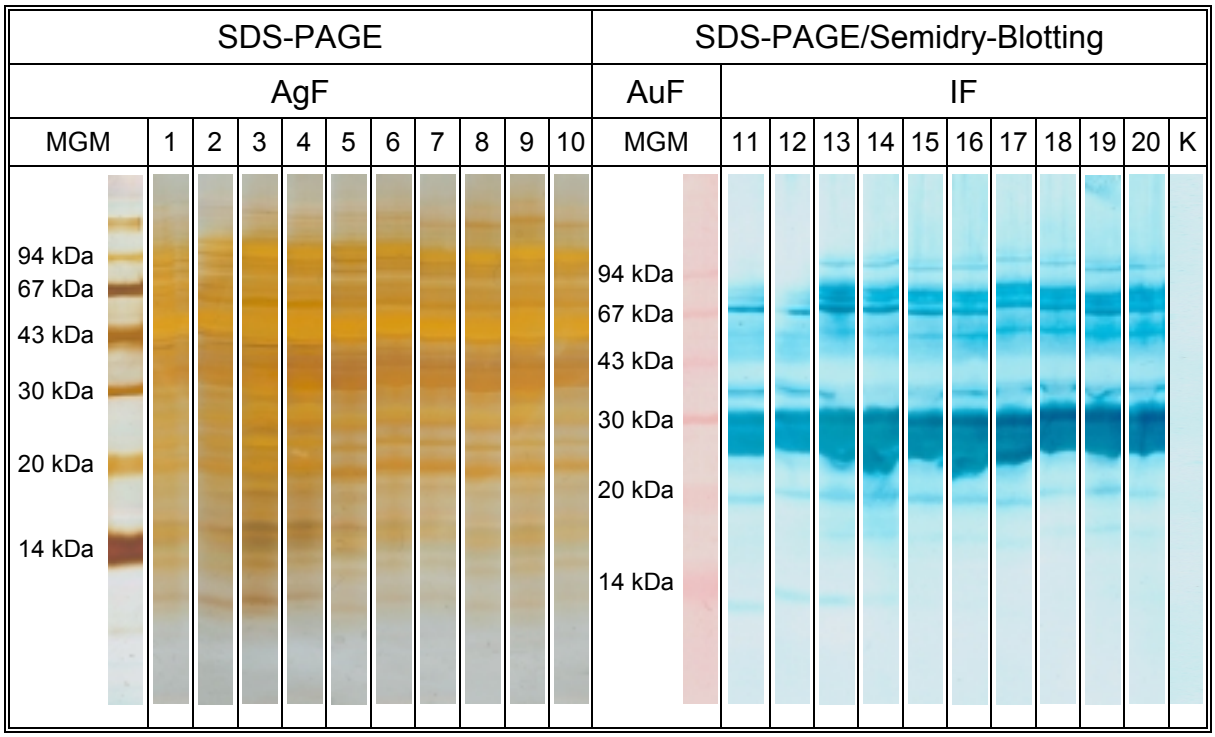
Anhand der Messreihe des Trocknungsversuches zeigt sich, dass in den ersten vier Stunden eine schnelle Abnahme des Wassergehaltes auf < 10 % erfolgt und sich dieser dann einem Wert von 4.0 % annähert. Der gesuchte Restwassergehalt von < 10 % wird somit nach einer Trocknungszeit von 4 h unterschritten. Es erfolgt deshalb zu Beginn der Trocknung eine verstärkte Probennahme nach 0.5, 1.0, 2.0 und 4.0 h. Um den gesamten Trocknungsbereich untersuchen zu können, werden außerdem Proben nach 8.0, 12.0, 16.0, 20.0 und 24 h gezogen.

Anhand der in Tabelle 4.24 dargelegten grundanalytischen Daten zum Trocknungsversuch ergibt sich ein durch den Wasserverlust begründeter Anstieg des absoluten Proteingehaltes der Gartenbohnensamen von ursprünglich 6.3 % auf einen Maximalwert von 37.0 %. Durch Berechnung des relativen Proteingehaltes, der den infolge der Trocknung auftretenden Wasserverlust berücksichtigt, zeigt sich ein parallel zum Wasserverlust einsetzender Proteinabbau für den Trocknungszeitraum bis 8 h. Im weiteren Verlauf der Trocknung weisen die relativen Proteingehalte trotz starker Schwankungen keinen weiteren Anstieg auf. Die C_{50}-Werte liegen zwischen 2.6 und 13.3 µg/ml, wobei keine charkteristischen Änderungen festzustellen sind.

Tab. 4.24: Kenndaten des Trocknungsversuches der Gartenbohnensamen

Trocknung [h]	Kenn-zeichnung	Wassergehalt [%]	Trockenmasse [%]	Proteingehalt [%]	rel. Proteingehalt [%]	C_{50}-Wert [µg/ml]
0	TV-B-0	81.0	19.0	6.3	33.2	3.3
0.5	TV-B-0.5	63.3	36.7	7.2	19.6	2.7
1.0	TV-B-1.0	51.7	48.3	8.8	18.2	2.6
2.0	TV-B-2.0	28.9	71.1	15.7	22.1	10.2
4.0	TV-B-4.0	6.4	93.6	26.1	27.9	6.4
8.0	TV-B-8.0	4.7	95.3	27.5	28.9	7.2
12.0	TV-B-12.0	4.5	95.5	29.9	31.3	6.1
16.0	TV-B-16.0	4.4	95.6	36.8	38.5	13.3
20.0	TV-B-20.0	4.2	95.8	37.0	38.6	9.3
24.0	TV-B-24.0	4.0	96.0	33.0	34.4	11.0

Zur weiteren Bestimmung des Einflusses dieser Abläufe auf die Proteine bzw. Allergene sowie auf das allergene Potenzial der getrockneten Gartenbohnen erfolgt die Detektion der Protein- und Allergenspektren sowie die relative Quantifizierung des allergenen Potenzials der in Tabelle 4.24 aufgeführten Trocknungsstufen.



MGM: Molekulargewichtsmarker K: Kontrolle

1, 11: TV-B-0 2, 12: TV-B-0.5 3, 13: TV-B-1.0 4, 14: TV-B-2.0 5, 15: TV-B-4.0

6, 16: TV-B-8.0 7, 17: TV-B-12.0 8, 18: TV-B-16.0 9, 19: TV-B-20.0 10, 20: TV-B-24.0

Abb. 4.38: AgF und IF des Gartenbohnen-Trocknungsversuches

Grundsätzlich werden anhand des silbergefärbten Extraktes des nativen Gartenbohnensamens (Abb. 4.38, 1) Unterschiede im Proteinspektrum zur Gesamtfrucht (siehe Abb. 4.35, Nr. 1) deutlich. Neben zahlreichen diffusen Anfärbungen im MG-Bereich < 14 bis 94 kDa weist der native Extrakt (TV-B-0) lediglich diskrete Banden bei < 14, 16, 19, 31, 45 und 94 kDa auf.

In den für 0.5 bzw. 1.0 h getrockneten Samen (2 & 3) verstärkt sich die Detektionsintensität der Banden mit MG < 14, 16 und 42 kDa, wohingegen die 19-, 31-, 45- und 94-kDa-Banden unverändert detektiert werden. Weiterhin werden Proteine mit MG von 18, 22, 25 und ca. 90 kDa sowie eine weitere Proteinbande < 14 kDa detektiert. Auch im weiteren Verlauf der Trocknung bleibt die Detektionsintensität der Proteine mit MG von 19, 31, 45 und 94 kDa unverändert. Alle weiteren Proteine werden mit fortschreitender Trocknungsdauer weniger stark angefärbt, wobei jedoch nur das 42-kDa-Protein ab einer Trocknungszeit von 4.0 h (Nr. 5) nicht mehr detektiert wird. Alle übrigen Banden können selbst nach 24-stündiger Trocknung noch angefärbt werden.

Das Allergenspektrum des nativen Gartenbohnensamens der Sorte „Montano“ (11) weist der nativen Gesamtfrucht (siehe Abb. 4.37, 1) vergleichbare Banden auf. So erfolgen neben schwachen Detektionen der Allergene mit MG von 14, 19, 55 und 75 kDa, starke Anfärbungen bei 25, 29, 31, 38 und 55 kDa. Im Verlauf der Trocknung zeigt sich dabei die Detektionsintensität der Allergenbanden mit MG von 19 bzw. 38 kDa unverändert. Zunehmende Anfärbungen weisen die Allergene mit MG von 25, 29, 31, 55 und 75 kDa auf, wohingegen lediglich das 67-kDa-Allergen mit zunehmender Trocknungsdauer weniger stark detektiert wird. Das 14-kDa-Allergen wird lediglich bis zu einer Trocknungszeit von 2 h (11 - 14) detektiert. Eine zusätzliche Allergenbande mit einem MG von 16 kDa tritt ab einer Trocknungszeit von 1 h (13 - 20) auf. Das K zeigt keine Anfärbungen, so dass ein Auftreten unspezifischer Färbungen ausgeschlossen werden kann.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass zwar leichte Veränderungen der Protein- und Allergenspektren durch die Trocknung der Gartenbohnensamen hervorgerufen werden, das allergene Potenzial jedoch keine charakteristischen Änderung erfährt.

4.2.7 Autoklavierung

Da infolge der Versuchsanordnung ein Gesamtüberblick über den Einfluss der Autoklavierung auf die Allergenität der Gartenbohne auch unter extremen Bedingungen gewonnen werden soll, werden für den Autoklavierungsversuch Temperaturstufen von 60, 85, 100, 121 und 140 °C bei einer jeweiligen Erhitzungsdauer von 20, 40 bzw. 60 Minuten gewählt (siehe auch: 4.1.7). Diese Parameter übersteigen dabei z.T. deutlich die zur Herstellung von Konserven eingesetzten thermischen Belastungen. Die Autoklavierung von Gartenbohnen der Sorte „Montano“ erfolgt in einem handelsüblichen Laborautoklaven.

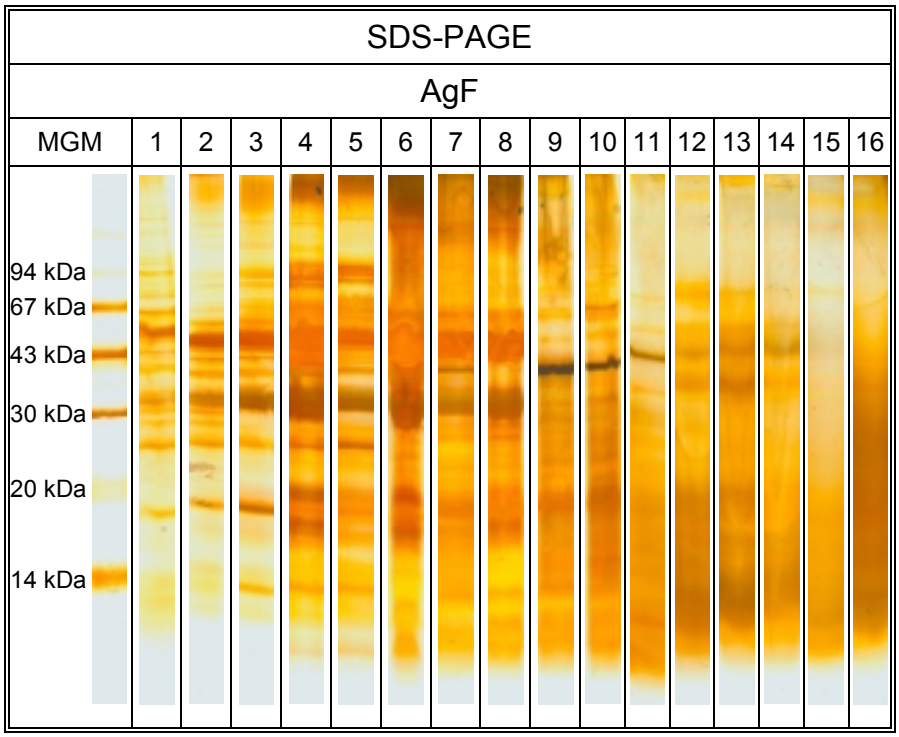
Nach erfolgter Behandlung werden zum einen sensorische Veränderungen ermittelt sowie die Trockenmasse und der Proteingehalt bestimmt. Zum anderen erfolgt die Detektion der Protein- und Allergenspektren sowie die Bestimmung des allergenen Potenzials der thermisch behandelten Proben.

Tab. 4.25: Kenndaten des Autoklavierungsversuches der Gartenbohnen

Kenn-zeichnung	Temperatur [°C]	Dauer [min]	Trockenmasse [%]	Proteingehalt [%]	C_{50}-Wert [µg/ml]	sensorische Eigenschaften
AV-B-0-0	-	-	8.5	1.3	1.6	arttypisch
AV-B-60-20	60	20	8.5	1.6	1.1	arttypisch
AV-B-60-40	60	40	5.7	1.9	1.4	arttypisch
AV-B-60-60	60	60	6.6	1.6	1.1	arttypisch
AV-B-85-20	85	20	7.0	1.7	1.3	arttypisch
AV-B-85-40	85	40	8.7	1.9	2.4	arttypisch
AV-B-85-60	85	60	7.3	2.0	2.2	arttypisch
AV-B-100-20	100	20	6.1	1.7	2.2	arttypisch
AV-B-100-40	100	40	6.8	2.0	2.0	arttypisch
AV-B-100-60	100	60	9.6	1.8	3.3	arttypisch
AV-B-121-20	121	20	8.7	2.3	6.9	leichte Braunfärbung
AV-B-121-40	121	40	9.4	2.4	5.8	leichte Braunfärbung
AV-B-121-60	121	60	9.3	2.0	6.2	Braunfärbung Verbrennungsgeruch
AV-B-140-20	140	20	8.3	2.9	8.9	Braunfärbung Verbrennungsgeruch
AV-B-140-40	140	40	9.4	2.0	12.6	Braunfärbung Verbrennungsgeruch
AV-B-140-60	140	60	12.7	2.6	20.9	Braunfärbung Verbrennungsgeruch

Anhand der in Tabelle 4.25 dokumentierten Ergebnisse zeigen sich starke Schwankungen der Trockenmassen für die Temperaturstufen 60, 85 und 100 °C mit Werten zwischen 5.7 und 9.6 %. Somit sind in diesem Bereich keine charakteristischen Veränderungen der Trockenmassen festzustellen. Im Gegensatz dazu zeigen die Proteingehalte, die im Intervall von 1.6 bis 2.0 % liegen, sowie die C_{50}-Werte mit Werten von 1.1 bis 3.3 µg/ml nahezu konstante, mit der unbehandelten Gartenbohne vergleichbare Werte. Auch die sensorischen Eigenschaften ändern sich bei diesen Temperaturstufen nicht.

Beginnend mit der 20-minütigen Autoklavierung bei 121 °C treten charakteristische Abweichungen sowohl der grundanalytischen Kenndaten, als auch der sensorischen Eigenschaften und der allergenen Potenziale auf. So bewirkt die bei 121 bzw. 140 °C durchgeführte Erhitzung eine zunehmende Braunfärbung und die Entwicklung eines Verbrennungsgeruchs. Parallel hierzu setzt ein durch Wasserverlust bedingter charakteristischer Anstieg der Trockenmasse auf einen Endwert von 12.7 % und des Proteingehaltes auf 2.6 % bei der Autoklavierungsstufe AV-B-140-60 ein. Weiterhin kann eine stufenweise Erhöhung der C_{50}-Werte, welche für die Temperaturstufen 121 und 140 °C zwischen 5.8 und 20.9 µg/ml liegen, und somit eine Verminderung des allergenen Potenzials festgestellt werden.



MGM: Molekulargewichtsmarker

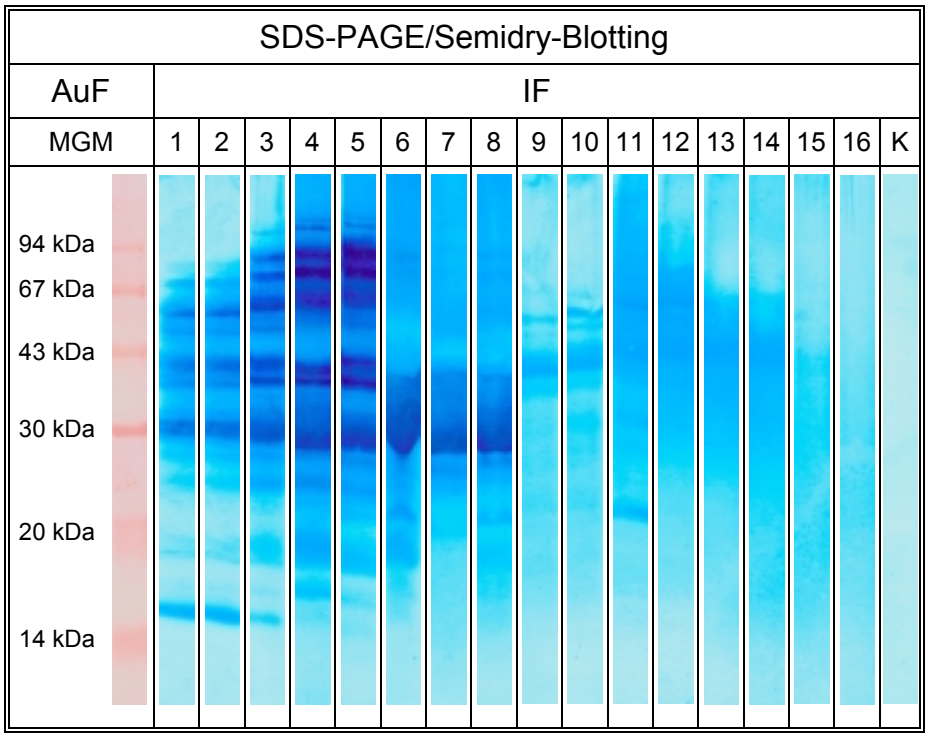
1: AV-B-0-0	2: AV-B-60-20	3: AV-B-60-40	4: AV-B-60-60
5: AV-B-85-20	6: AV-B-85-40	7: AV-B-85-60	8: AV-B-100-20
9: AV-B-100-40	10: AV-B-100-60	11: AV-B-121-20	12: AV-B-121-40
13: AV-B-121-60	14: AV-B-140-20	15: AV-B-140-40	16: AV-B-140-60

Abb. 4.39: AgF des Gartenbohnen-Autoklavierungsversuches

Die AgF des unbehandelten Extraktes der Gartenbohne (Abb. 4.39, 1) zeigt das typische Proteinspektrum mit zahlreichen Banden im MG-Bereich < 14 bis 94 kDa sowie charakteristischen Proteinbanden mit MG von 14, 19, 25, 29, 30, 31, 38, 42, 55, 67, 75 und 94 kDa. Allgemein ist eine stetig zunehmende Detektionsintensität dieser Banden bis zur 60-minütigen Autoklavierung bei 60 °C (2 - 4) festzustellen.

Darüber hinaus (5 - 16) erfolgt die Abnahme der Färbungsintensität der Banden sowie eine erheblich zunehmende Hintergrundfärbung. Dabei werden die Banden mit MG von 42, 75 und 94 kDa lediglich bis zur Stufe AV-85-20 (1 - 5), die mit MG von 14, 19, 25, 29, 30 und 31 bis AV-B-100-60 (1 - 10) und das 38- bzw. 55-kDa-Protein bis AV-140-20 (1 - 14) detektiert. Die Proteine mit MG von 31 und 67 kDa werden in sämtlichen autoklavierten Proben angefärbt.

Auch die spezifische Allergendetektion mittels IF (siehe Abb. 4.40) zeigt deutliche Unterschiede der Allergenspektren zwischen der unbehandelten Gartenbohne (1) und den jeweiligen erhitzten Proben (2 - 16), wobei der AgF vergleichbare Tendenzen vorliegen. Es ist wiederum eine anfänglich zunehmende Detektionsintensität, in diesem Fall bis zur 20-minütigen Autoklavierung bei 85 °C (1 - 5), und eine darüber hinaus gehende Verminderung (6 - 16) des Bandenmusters sowie eine Zunahme der Hintergrundfärbung erkennbar. Das K zeigt keine Anfärbungen, so dass unspezifische Detektionen ausgeschlossen werden können.
So werden in der unbehandelten Gartenbohne (Abb. 4.40, 1) Allergene mit MG von 14, 16, 19, 21, 25, 29, 31, 38, 42, 48, 55, 67 und 75 kDa angefärbt. Lediglich die Detektionsintensität des 14-kDa-Allergens nimmt infolge der Autoklavierung bei 60 °C (2 - 4) ab, so dass eine Detektion in den weiteren Autoklavierungsstufen (5 - 16) nicht mehr erfolgt.



MGM: Molekulargewichtsmarker K: Kontrolle

1: AV-B-0-0	2: AV-B-60-20	3: AV-B-60-40	4: AV-B-60-60
5: AV-B-85-20	6: AV-B-85-40	7: AV-B-85-60	8: AV-B-100-20
9: AV-B-100-40	10: AV-B-100-60	11: AV-B-121-20	12: AV-B-121-40
13: AV-B-121-60	14: AV-B-140-20	15: AV-B-140-40	16: AV-B-140-60

Abb. 4.40: IF des Gartenbohnen-Autoklavierungsversuches

Lediglich bis zur Stufe AV-B-85-40 (1 - 6) stabil zeigen sich die Allergene mit MG von 16 und 55 kDa. Eine Stabilität bis zur 20-minütigen Autoklavierung auf 100 °C (1 - 8) zeigen das 19- bzw. 25-kDa-Allergen. Die höhermolekularen Allergene mit MG von 67 sowie 75 kDa werden bis zur Stufe AV-B-100-40 (1 - 9) und die Allergene mit MG von 21, 29 und 31 kDa bis einschließlich AV-B-121-20 (1 - 11) detektiert. Die höchste Stabilität gegenüber der Autoklavierung zeigen die Allergene mit MG von 38, 42 und 48 kDa, welche bis zur Stufe AV-B-121-40 (1 - 12), AV-B-121-60 (1 - 13) und AV-B-140-20 (1 - 14) angefärbt werden. Die für 40 bzw. 60 Minuten auf 140 °C erhitzten Proben zeigen lediglich diffuse Anfärbungen im mittleren MG-Bereich.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die ermittelten Ergebnisse tendenziell übereinstimmen. Anhand der sensorischen und grundanalytischen Ergebnisse ergeben sich nur geringfügige Veränderungen für die Autoklavierungen bei 60, 85 und 100 °C, was sowohl durch die Detektion der Protein- und der Allergenspektren als auch durch die Bestimmung des allergenen Potenzials bestätigt wird. Darüber hinaus sind infolge von thermischer Instabilität durch Autoklavierung bei 121 bzw. 140 °C sowohl charakteristische Änderungen der sensorischen und grundanalytischen Daten als auch der Protein- bzw. Allergenspektren und der allergenen Potenz festzustellen.

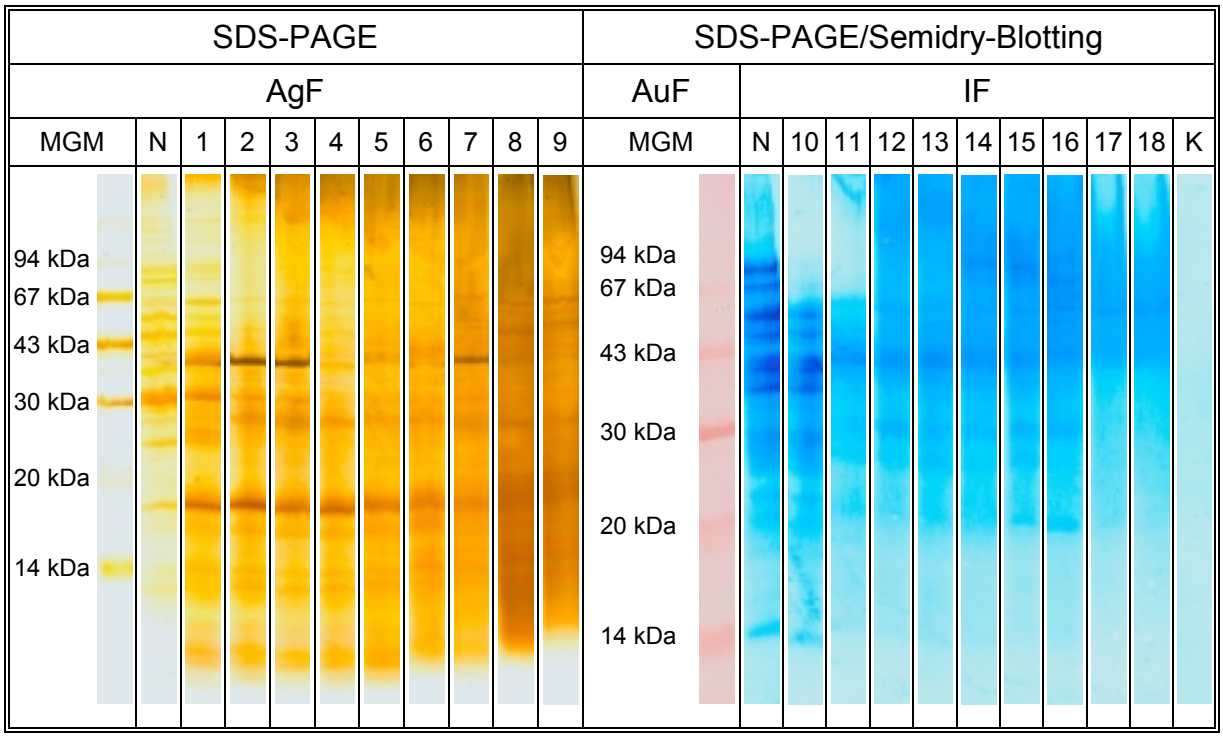
4.2.8 Mikrowellenbehandlung

Die Untersuchungen zum Einfluss der Mikrowellenbehandlung auf die Allergenität der Gartenbohnesorte „Maxi“ erfolgen anhand von tiefgefrorenem Material. Hierzu werden jeweils 50 g Probenmaterial unter Zugabe von 5 ml Wasser bei steigender Zeitdauer der Mikrowellenstrahlung ausgesetzt. Im Anschluss an diese Behandlung erfolgen neben sensorischen Untersuchungen sowie der Bestimmung der Trockenmasse und des Proteingehaltes weiterhin die Detektion des Protein- und Allergenspektrums sowie die relative Quantifizierung des allergenen Potenzials.

Tab. 4.26: Kenndaten der Mikrowellenbehandlung der Gartenbohnen

Kenn-zeichnung	Dauer [min]	TM [%]	Proteingehalt [%]	relativer Proteingehalt [%]	C_{50}-Wert [µg/ml]	sensorische Eigenschaften
MW-B-N	0	6.6	1.7	25.8	0.8	arttypisch
MW-B-1	1	8.1	2.2	27.2	1.1	arttypisch
MW-B-2	2	10.5	3.1	29.5	1.8	arttypisch
MW-B-3	3	15.0	3.5	23.3	2.3	arttypisch
MW-B-4	4	26.2	7.6	29.0	2.5	arttypisch
MW-B-5	5	34.1	8.9	26.1	2.6	leichte Braunfärbung Verbrennungsgeruch
MW-B-6	6	43.1	11.5	26.7	4.2	stärkere Braunfärbung Verbrennungsgeruch
MW-B-7	7	57.8	13.2	22.8	3.7	stärkere Braunfärbung Verbrennungsgeruch
MW-B-8	8	61.2	12.1	19.8	4.9	starke Braunfärbung Verbrennungsgeruch
MW-B-9	9	70.8	12.7	17.9	7.3	starke Braunfärbung Verbrennungsgeruch

Die in Tabelle 4.26 dokumentierten Ergebnisse der Trockenmasse-Bestimmungen ergeben für die mikrowellenbehandelten Gartenbohnen mit zunehmender Bestrahlungsdauer ansteigende Werte, welche durch den auftretenden Wasserverlust bedingt sind. Auch der absolute Proteingehalt steigt von ursprünglich 1.7 % (MW-B-N) auf 12.7 % (MW-B-9) an. Da diese Werte sich jedoch auf das Gesamtgewicht beziehen, werden zusätzlich die relativen Proteingehalte unter Berücksichtigung des Wasserverlustes während der Mikrowellenbestrahlung berechnet. Hierfür ergeben sich bis zu einer Behandlungsdauer von 6 Minuten (MW-B-N - MW-B-6) konstante Werte im Bereich von 23.3 bis 29.0 %. Für längere Bestrahlungszeiten (MW-B-7 - MW-B-9) zeigt sich ein Absinken des relativen Proteingehaltes auf 17.9 %. Diese Entwicklung ist durch den einsetzenden Proteinabbau durch hohe thermische Belastungen begründet. Unterstützt wird diese Annahme des Proteinabbaus durch die sensorischen Ergebnisse, welche für die Bestrahlungsdauern von 5 bis 9 Minuten (MW-B-5 - MW-B-9) zunehmende Verbrennungsreaktionen anzeigen. Die C_{50}-Werte der EAST-Bestimmungen steigen ausgehend von 0.8 µg/ml für die unbehandelte Probe (MW-B-N) bis auf 7.3 µg/ml für die maximal bestrahlte Probe (MW-B-9) an.



MGM: Molekulargewichtsmarker K: Kontrolle N: MW-B-N
1, 10: MW-B-1 2, 11: MW-B-2 3, 12: MW-B-3 4, 13: MW-B-4 5, 14: MW-B-5
6, 15: MW-B-6 7, 16: MW-B-7 8, 17: MW-B-8 9, 18: MW-B-9

Abb. 4.41: AgF und IF der Gartenbohnen-Mikrowellenbehandlung

Die Anfärbungen der Proteinspektren der behandelten Proben (Abb. 4.41, 1 - 9) bestätigen die grundanalytischen Ergebnisse, insofern deutliche Minderungen der detektierten Bandenzahlen mit zunehmender Bestrahlungsdauer festzustellen sind. So werden in der unbehandelten Probe (N) charakteristische Proteinbanden mit MG < 14, 14, 18, 19, 25, 29, 31, 38, 45, 55, 67, 75 und 85 kDa detektiert. Lediglich bei einminütiger Bestrahlung zeigen sich die Proteine mit MG von 25, 45, 55, 75 und 85 kDa stabil. Die niedermolekularen Proteine mit MG < 14, 14, 18 und 31 kDa werden in den für eine bis sieben Minuten bestrahlten Extrakten (1 - 7) angefärbt, wobei die Detektionsintensität bis zu einer Bestrahlungszeit von zwei Minuten ansteigt, um anschließend kontinuierlich abzunehmen. In allen Extrakten mit identischer Entwicklung der Detektionsintensität werden die Proteine mit MG von 19, 29, 38 und 67 kDa angefärbt.

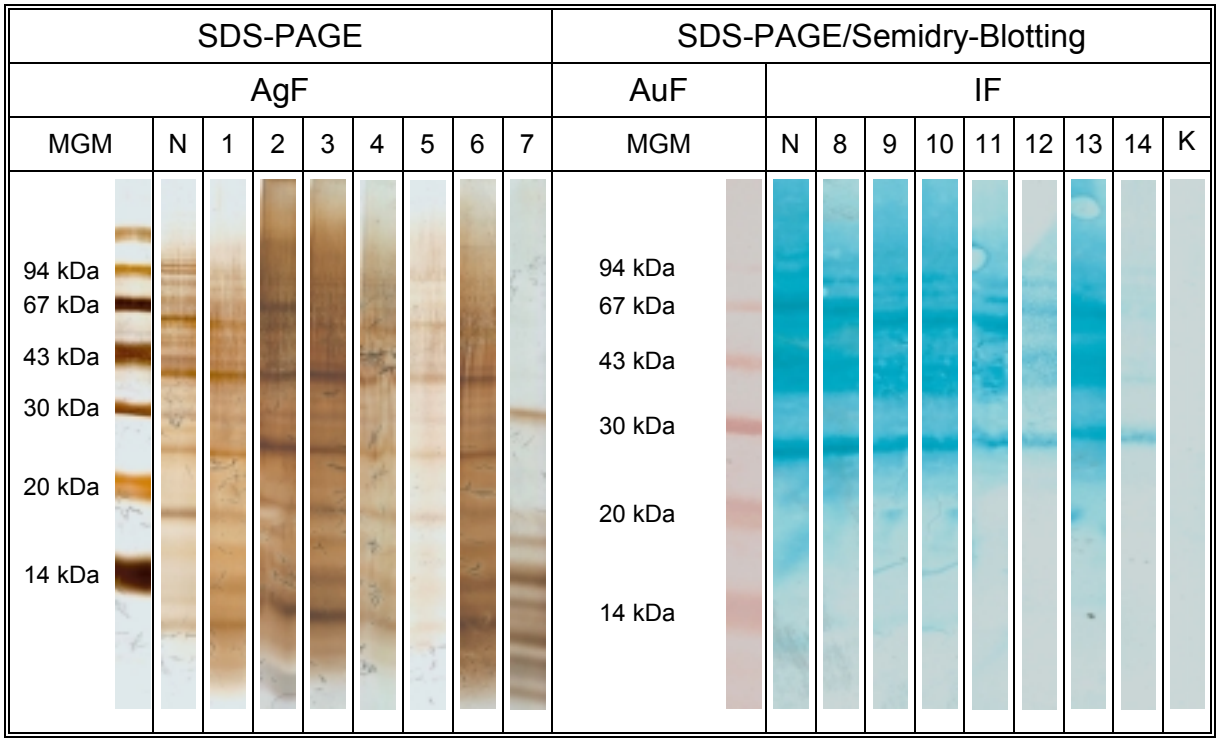
Im Gegensatz dazu zeigen die IF (10 - 18) mit zunehmender Bestrahlungsdauer eine fortschreitend abnehmende Bandenzahl und Detektionsintensität. Wird im nativen Extrakt (N) noch das charakteristische Allergenspektrum mit Banden bei 14, 16, 19, 21, 25, 29, 31, 38, 42, 48, 55, 67 und 75 kDa angefärbt, zeigen sich die Allergene mit MG von 14, 16, 21, 25, 29, 48, 67 und 75 kDa bereits bei einminütiger Bestrahlung (10) instabil. Bis zur Bestrahlungszeit von sieben Minuten werden die niedermolekularen Allergene mit MG von 19, 31 und 38 kDa detektiert, eine Anfärbung selbst nach einer Gesamteinwirkdauer von neun Minuten zeigt lediglich die 42- bzw. 55-kDa-Bande.

Insgesamt dokumentieren die ermittelten Ergebnisse einen erheblichen Proteinabbau im Verlauf der Mikrowellenbestrahlung, der einen Verlust der IgE-Bindungsfähigkeit diverser Allergene zur Folge hat. Somit wird eine starke Verminderung des allergenen Potenzials der Gartenbohne hervorgerufen. Gegenüber dieser Behandlung stabil zeigen sich das 42- sowie 55-kDa-Allergen.

4.2.9 In-vitro-Verdauung

Die Untersuchung des Einflusses der enzymatischen Verdauung auf die Allergene der Gartenbohnensorte „Maxi“ erfolgt in Anlehnung an die in Kapitel 4.1.9 ermittelten Versuchsparameter. Es wird sowohl die Magen- als auch die Darmverdauung simuliert.

Die Ergebnisse der Detektion des Gesamtproteinmusters mittels AgF nach elektrophoretischer Trennung und des Allergenspektrums durch IF nach SDS-SAGE/Semidry-Blotting sind in Abbildung 4.42 dargestellt, die Ergebnisse der EAST-Inhibition gibt Tabelle 4.27 wider.



MGM: Molekulargewichtsmarker K: Kontrolle N: IV-B-N
1, 8: IV-B-pH-120 2, 9: IV-B-Pep-1 3, 10: IV-B-Pep-1 + Try-4
4, 11: IV-B-Pep-1 + Try-4 + Chy-4 5, 12. IV-B-Pep-1 + Try-4 + Chy-4 + Car-3
6, 13: IV-B-Pep-1 + Pan-0.9 7, 14: IV-B-Pep 1 + Pro-2

Abb. 4.42: AgF und IF der simulierten In-vitro-Verdauung der Gartenbohne

Durch Vergleich der AgF der unterschiedlich inkubierten Extrakte 1 bis 8 mit der nativen Probe (N) zeigen sich lediglich geringfügige Veränderungen der Proteinspektren. Im Gegensatz dazu treten bei Inkubation mit dem Enzymgemisch Proteinase K (9) erhebliche Veränderungen auf.

Im nativen Extrakt werden Proteine mit MG < 14, 14, 16, 19, 25, 28, 29, 31, 38, 42, 45, 48, 55, 67, 75 und 94 kDa angefärbt. Mit Ausnahme des 94-kDa-Proteins werden diese ebenfalls in dem 2 h bei 37 °C und pH 2 sowie dem mit Pepsin (Aktivität: $6.8 \cdot 10^1$ U/l) bzw. mit einer Kombination aus Pepsin und Trypsin (Aktivität: $2.2 \cdot 10^4$ U/l) inkubierten Extrakten (1 - 3) detektiert. Erst der anschließende Zusatz einer α-Chymotrypsin-Lösung mit einer Aktivität von $7.0 \cdot 10^4$ U/l (4) führt zum Abbau der Proteine mit MG < 14, 28, 45, 48 und 67 kDa. Die Inkubation mit Carboxypeptidase A (Aktivität: $2.9 \cdot 10^3$ U/l) bewirkt den Abbau des 31-kDa-Proteins sowie die Verminderung der Detektionsintensität der verbleibenden Proteine (5).

Erfolgt im Anschluss an die Pepsin-Inkubation der Zusatz von Pankreatin (6) so werden lediglich die Proteine mit MG von 14, 16, 19, 25, 28, 29, 31, 38 und 42 kDa detektiert, höhermolekulare Proteine liegen nicht vor. Nach Inkubation mit dem Enzymgemisch Proteinase K mit einer Aktivität von $2.7 \cdot 10^2$ U/l wird neben den Proteinen, welche vom Enzym selbst stammen (siehe Abb. 4.18, Seite 59), ausschließlich das 31-kDa-Protein visualisiert.

Das Allergenspektrum der nativen Gartenbohne (N) zeigt neben schwachen Anfärbungen bei MG von 16, 19, 21 und 25 kDa charakteristische Banden mit MG von 29, 38, 42, 55, 67 und 75 kDa. Mit Ausnahme der Allergene mit MG von 16 bzw. 19 kDa werden diese ebenfalls in dem für 2 h bei 37 °C und pH 2 (8) sowie dem mit Pepsin (Aktivität: $6.8 \cdot 10^1$ U/l) bzw. mit einer Kombination aus Pepsin und Trypsin (Aktivität: $2.2 \cdot 10^4$ U/l) inkubierten Extrakten (9 & 10) detektiert. Zum Abbau der niedermolekularen Proteine mit MG von 21 bzw. 25 kDa führt der Zusatz der α-Chymotrypsin-Lösung mit einer Aktivität von $7.0 \cdot 10^4$ U/l (11). Die Allergene mit MG von 29, 38, 42, 55, 67 und 75 kDa werden unverändert detektiert. Im Gegensatz dazu führt der Zusatz des Enzyms Carboxypeptidase A (Aktivität: $2.9 \cdot 10^3$ U/l (12) zur deutlichen Abnahme der Detektionsintensität dieser Banden.

Die im Anschluss an die Pepsin-Inkubation durchgeführte Verdauung mit dem Enzymgemisch Pankreatin (13) zeigt keine weitere Verminderung der IgE-Bindungsfähigkeit der detektierten Allergene. Einen erheblichen Einfluss auf das Allergenspektrum ruft die simulierte Proteinase K-Verdauung (14) hervor, in deren Anschluss lediglich das 29-kDa-Allergen deutlich sowie die Allergene mit MG von 42 und 67 kDa schwach visualisiert werden. Da weder das K noch die Enzyme selbst (siehe Abb. 4.18, Seite 59) Anfärbungen zeigen, können unspezifische Anfärbungen ausgeschlossen werden.

Tab. 4.27: C_{50}-Werte der simulierten In-vitro-Verdauung

Kennzeichnung	C_{50}-Wert [µg/ml]
IV-B-N	5.1
IV-B-pH-120	4.9
IV-B-Pep-1	5.3
IV-B-Pep-1 + Try-4	5.1
IV-B-Pep-1 + Try-4 + Chy-4	24.0
IV-B-Pep-1 + Try-4 + Chy-4 + Car-3	44.1
IV-B-Pep-1 + Pan-0.9	7.3
IV-B-Pep-1 + Pro-2	270.7

Die in Tabelle 4.27 dargestellten C_{50}-Werte der EAST-Inhibition der einzelnen Extrakte bestätigen die Ergebnisse der IF. Ausgehend vom nativen Gartenbohnenextrakt mit einem Wert von 5.1 µg/ml sind keine charakteristischen Abweichungen für die zweistündige Inkubation im sauren Milieu (IV-B-pH-120), die Inkubation mit Pepsin (IV-B-Pep-1) sowie der kombinierten Pepsin/Trypsin-Verdauung (IV-B-Pep-1 + Try-4) zu verzeichnen.

Im Gegensatz dazu erfolgen nach darauf folgender α-Chymotrypsin-Verdauung (IV-B-Pep-1 + Try-4 + Chy-4) sowie Carboxypeptidase A-Verdauung (IV-B-Pep-1 + Try-4 + Chy-4 + Car-3) charakteristische Anstiege der C_{50}-Werte auf 24.0 bzw. 44.1 µg/ml. Damit wird eine deutliche Verminderung des allergenen Potenzials gezeigt.

Auch die im Anschluss an die Pepsininkubation durchgeführte Pankreatin-Verdauung zeigt in Übereinstimmung mit der IF bei einem C_{50}-Wert von 7.3 µg/ml keine charakteristische Veränderung gegenüber der Pepsin-Inkubation.
Mit 270.7 µg/ml weist der zusätzlich mit dem Enzymgemisch Proteinase K (IV-B-Pep 1 + Pro-2) verdaute Gartenbohnenextrakt den höchsten C_{50}-Wert und somit das geringste allergene Potenzial auf. Auch mittels EAST-Inhibition (siehe Tab. 4.14, Seite 60) lässt sich keine IgE-Bindungsfähigkeit der eingesetzten Enzymlösungen nachweisen.

5 Diskussion

Neben der Charakterisierung der Allergene der Gartenerbse (*Pisum sativum* L.) und der Gartenbohne (*Phaseolus vulgaris* L.) dokumentiert die vorliegende Arbeit die Einflüsse technologischer Verarbeitungsverfahren sowie proteolytischer Spaltungen auf das allergene Potenzial dieser Lebensmittel und beschreibt einen Ansatz zur Isolierung einzelner Gartenerbsenallergene.

5.1 Allergencharakterisierung

Wichtige Kriterien zur Charakterisierung von Allergenen stellen die MG der einzelnen IgE-bindenden Proteine sowie deren Detektionshäufigkeit dar. Diese Kennzeichen ergeben sich anhand der Detektion der Allergenspektren nach SDS-PAGE/ Semidry-Blotting und anschließender IF mit Einzelseren von gegen Gartenerbsen bzw. -bohnen sensibilisierten Patienten.

Durch die verwendeten 39 Einzelseren können insgesamt sechzehn Gartenerbsen- bzw. vierzehn Gartenbohnenallergene im MG-Bereich < 14 kDa bis 75 kDa identifiziert werden. Unterschiedliche Studien (SAMPSON, 1991; AULEPP & VIETHS, 1992; LEHRER et al., 1996) belegen, dass die meisten Lebensmittelallergene MG zwischen 10 und 70 kDa, selten bis zu 100 kDa, aufweisen. Begründet ist dieser Bereich dadurch, dass zum einen die Immunogenität und zum anderen die Durchlässigkeit gegenüber der intestinalen Mucosa gewährleistet bleiben muss. Somit liegen Übereinstimmungen mit den ermittelten Untersuchungsergebnissen vor.

Eine gesicherte Klassifizierung der Allergene erfolgt anhand der Detektionshäufigkeit eines Patientenkollektivs von mehr als 50 Individuen (GEHA, 1995; VIETHS et al., 1996). Obwohl in der vorliegenden Studie lediglich 39 Einzelseren zur Verfügung stehen, kann es als gesichert angesehen werden, dass es sich bei den von maximal 41 % der sensibilisierten Patienten detektierten Gartenerbsenallergenen mit MG < 14, 14, 16, 18, 22, 45, 50 und 75 kDa um Minor- bzw. Intermediärallergene handelt, welche laut Einteilungsdefinition von maximal 50 % der Individuen angefärbt werden. Andererseits werden die Allergene mit MG von 20, 25, 28, 30, 37 und 40 kDa von mindestens 54 % der Patienten detektiert, so dass sie den Kriterien zur Klassifizierung als Majorallergen entsprechen. Keine eindeutige Zuordnung aufgrund von Detektionshäufigkeiten von 46 bzw. 51 % kann für die Allergene mit MG von 66 bzw. 32 kDa erfolgen.

Da bisher keine Studien zur Klassifizierung der Gartenerbsenallergene vorliegen, kann keine Diskussion zur Einteilung erfolgen. BERNHISEL-BROADBENT et al. (1989) dokumentieren in ihrer Studie jedoch diverse IgE-bindende Proteine der Gartenerbse im MG-Bereich von 14 bis 70 kDa ohne eine exakte Zuordnung vorzunehmen. Im niedermolekularen Bereich < 14 kDa liegen demnach keine Allergene vor. Vergleichende Betrachtungen ermöglichen eine eindeutige Zuordnung von stark detektierten Banden mit MG von 14, 17, 24, 29, 53 und 67 kDa sowie schwächer ange-

färbten Banden bei 19, 21, 27, 37, 41, 48, 50 und 60 kDa. Es ergeben sich insbesondere im niedermolekularen Bereich große Übereinstimmungen zu dem in dieser Studie detektiertem Allergenspektrum. Insgesamt zwölf der identifizierten Allergene können, abgesehen von analytisch bedingten geringen Abweichungen der MG, in beiden Studien angefärbt werden. Lediglich die Allergene mit MG < 14, 22, 30 und 75 kDa werden durch BERNHISEL-BROADBENT et al. (1989) nicht dokumentiert. In einer weiteren Studie konnten MALLEY et al. (1975) ein Allergen mit einem MG von 11 kDa nachweisen, wobei es sich um das mit einem MG von < 14 kDa detektierte IgE-bindende Protein handeln könnte.

Sehr ähnliche Verhältnisse in Bezug auf die Allergenverteilung zeigt das Allergenspektrum der Gartenbohne. Trotz der zuvor genannten Einschränkung der zu geringen Anzahl der verwendeten Patientenseren erfolgt aufgrund der geringen Detektionshäufigkeiten zwischen 5 und 38 % eine weitgehend gesicherte Klassifizierung der Allergene mit MG < 14, 14, 16, 19, 21, 25, 42 und 75 kDa als Minor- bzw. Intermediärallergen. Bei den mit einer Häufigkeit von 62 bis 69 % detektierten höhermolekularen Allergenen mit MG von 31, 48 und 55 kDa handelt es sich vermutlich um Hauptallergene. Keine eindeutige Zuordnung aufgrund von Detektionshäufigkeiten zwischen 44 und 54 % kann für die Allergene mit MG von 29, 38 und 67 kDa erfolgen.

Auch für die Gartenbohne liegen bisher keine Studien zur Einteilung in Minor-, Intermediär- bzw. Majorallergene vor. Allerdings können wiederum Parallelen zu unterschiedlichen dokumentierten Allergenspektren festgestellt werden. So detektieren BERNHISEL-BROADBENT et al. (1989) mit dem Serum eines Gartenbohnenallergikers Allergene mit MG < 14, 18, 30, 31, 38, 41, 48, 50, 53, 55, 60 und 75 kDa, so dass unter Berücksichtigung von durch die elektrophoretische Trennung begründeten analytischen Abweichungen, die in dieser Studie angefärbten Allergene mit MG < 14, 19, 29, 31, 38, 41, 48, 55 und 75 kDa zugeordnet werden können. Auch ZACHARISEN & KURUP (1998) beschreiben ein ausgeprägtes Allergenspektrum im MG-Bereich von 18 bis 68 kDa. Im Gegensatz dazu identifizierten DAROCA et al. (2000) mittels eines Poolserums in nativen Gartenbohnen neben zahlreichen Allergenen lediglich drei Hauptbanden mit MG von 41, 47 und 71 kDa. Es können somit insbesondere im mittleren und höheren MG-Bereich deutliche Übereinstimmungen zu bisherigen Studien festgestellt werden.

Da weitere Studien zu Allergenspektren der Gartenerbse bzw. -bohne fehlen, gleichzeitig aber sowohl Kreuzreaktivitäten (BARNETT et al., 1987; BERNHISEL-BROADBENT & SAMPSON, 1989; BERNHISEL-BROADBENT et al., 1989; IBANEZ et al., 1997) als auch starke Ähnlichkeiten in der Protein-Zusammensetzung (KREFT et al., 1995) zu den Leguminosen Erdnuss, Soja, Linse und Lupine vorliegen, erfolgt ein zusätzlicher Vergleich mit deren Allergenspektren.

In der Sojabohne konnten bisher zwölf Allergene identifiziert werden (SHIBASAKI et al., 1980; BAUR et al, 1988; BUSH et al, 1988), wobei die IgE-Bindungen bei Immunoblot-Untersuchungen vor allem zwischen 30 und 70 kDa mit dominierenden Banden bei 30 und 50 kDa auftreten (BURKS & FUCHS, 1995). In der Erdnuss werden insgesamt 17 verschiedene Allergene identifiziert (BURKS et al, 1992a; UHLEMANN et al., 1993; EIGENMANN et al., 1996; NIEMEIJER et el., 1996; JONG et al., 1998). Auch diese Studien zeigen übereinstimmend, dass die Hauptreaktivitäten neben dem 17-kDa-Hauptallergen Ara h 2 wiederum Allergenen im MG-Bereich von 30 bis 66 kDa, in dem u.a. auch die Hauptallergene Ara h 1 (63.5 kDa) und Ara h 3 (57 kDa) lokalisiert sind, zukommen. Somit liegen auch hier weitgehende Übereinstimmungen bezüglich der detektierten Anzahl sowie dem MG-Bereich der Hauptreaktivitäten der Allergene vor.

Die von IBANEZ SANDIN et al. (1999) anhand eines aus 33 Einzelseren zusammengesetzten Poolserums durchgeführten Studien zur Charakterisierung der Linsenallergene zeigen insgesamt ca. 30 unterschiedliche IgE-bindende Proteine im MG-Bereich von 10 bis 90 kDa, wobei die Allergene mit MG von 18, 21, 40, 52, 53 und 70 kDa mit einer Häufigkeit > 50 % detektiert werden. Weitere Aussagen über weniger häufig detektierte Allergene werden nicht getroffen. Auch PASCUAL et al. (1999) konnten in Studien, welche unter vergleichbaren Bedingungen durchgeführt wurden, insgesamt sechzehn Linsenallergene im MG-Bereich von 14 bis 84 kDa nachweisen, wobei eine Detektionshäufigkeit > 50 % lediglich für die Banden mit MG von 30, 38, 40, 54, 68 und 70 kDa festgestellt werden kann. Das Allergenspektrum des Lupinensamens, der vermahlen als Zusatz von Teigwaren verwendet wird, weist spezifische Bindungen im MG-Bereich von 21 bis 55 kDa auf (HEFLE et al, 1994), wobei ein 43-kDa-Hauptallergen identifiziert werden kann (MONERET-VAUTRIN et al., 1999). Ähnliche Ergebnisse dokumentieren MATHEU et al. (1999), die acht IgE-bindende Proteine im MG-Bereich von 12.5 bis 61 kDa identifizieren.

Zusammenfassend zeigen diese Studien übereinstimmend sowohl bezüglich der Anzahl der detektierten Allergene als auch hinsichtlich der dominierenden Banden im MG-Bereich von 30 bis 70 kDa Ähnlichkeiten zu den vorliegenden Untersuchungsergebnissen der Gartenerbsen- und Gartenbohnenallergenspektren.

Als weitere Möglichkeit der Charakterisierung erfolgt die pI-Bestimmung der Allergene. So können im nativen Gartenerbsenextrakt fünf Banden mit pI von 6.1, 6.0, 5.9, 5.3 sowie 4.0 als IgE-bindende Proteine nachgewiesen werden. Die Gartenbohne weist sieben IgE-bindende Proteine mit pI von 6.3, 6.2, 6.0, 5.8, 5.6, 5.2 und 4.7 auf. Da in der Literatur bisher keine analogen Studien vorliegen, erfolgt wiederum ein weitreichenderer Vergleich. UHLEMANN et al. (1993) definieren den Bereich der pI von insgesamt 30 bis 40 IgE-reaktiven Erdnusskomponenten, von denen der überwiegende Teil als Isoallergene identifiziert wird, von 3.2 bis 7.5. Sowohl die pI der Hauptallergene der Erdnuss Ara h 1 mit 4.55 (BURKS et al., 1991) und Ara h 2 mit 5.2 (BURKS et al, 1992a) als auch unterschiedlicher Sojaallergene mit pI von 6.0 (CODINA et al., 1997) bzw. 6.8 sowie 6.1 bis 6.2 (GONZALES et al., 1992) liegen im sauren bis neutralen Bereich. Damit zeigen diese Allergene den in der vorliegenden Studie cha-

rakterisierten IgE-bindenden Proteinen vergleichbare Werte. Darüber hinaus belegen weitere Studien (PETERSEN, et al., 1996; HENZGEN et al., 1998; ZUNKER, 2001, PASCHKE et al., 2001) den leicht sauren Bereich als dominierende Region der pI von Lebensmittelallergenen.

Sowohl nach VIETHS et al. (1994b) als auch nach KONAN & VIQUES (2002) liegen bezüglich der Strukturen von Gartenerbsenallergenen in der Literatur bisher keine Studien vor. Dabei stellt die molekulare Charakterisierung einzelner Allergene nach zuvor erfolgter Isolierung die Grundlage zur verbesserten Diagnostik bzw. Therapie einer LMA dar. Die bisher angewandten Methoden zur Isolierung von Lebensmittelallergenen beruhen dabei grundsätzlich auf zwei unterschiedlichen Ansätzen.

Bei der Affinitätschromatographie (AC) erfolgt die spezifische und reversible Adsorption der Allergene an einen individuellen, matrixgebundenen Bindungspartner. Diese in unterschiedlichen Studien unter Verwendung von IgE-Antikörpern angewandte selektive Methode stellt sich für Routineuntersuchungen jedoch als zu empfindlich heraus (KINDER, 1999; ZUNKER, 2001). Auch die in der vorliegenden Studie durchgeführten Isolierungsversuche mittels unterschiedlicher Lectine (Ergebnisse nicht dargestellt) liefern wenig reproduzierbare Ergebnisse, welche keine zur N-terminalen Sequenzierung ausreichende Proteintrennung ermöglicht.
Als weitere Möglichkeit kann die Reinigung von komplexen Proteingemischen anhand klassischer chromatographischer Trennmethoden erfolgen. So konnten durch einfache Trennungen mittels GPC, Ionenaustauschchromatographie (IEC), Umkehrphasenchromatographie (RPC) oder Elektroelution (EE) bzw. Kombination unterschiedlicher dieser Trennmethoden wiederholt einzelne Lebensmittelallergene isoliert werden (BERNHISEL-BROADBENT et al., 1994; MÖLLER et al., 1997a; KINDER, 1999; ZUNKER, 2001).

Anhand der Entwicklung einer GPC-Methode zur Trennung eines Gartenerbsengesamtextraktes kann in der vorliegenden Arbeit der Elutionszeitraum des als potenzielles Hauptallergen charakterisierten 40-kDa-Proteins auf 4 min begrenzt werden. Durch gezielte Vereinigung der Eluate zahlreicher Trennungen wird die N-terminale Sequenzierung dieses Allergens ermöglicht. In einem weiteren Ansatz wird, ausgehend von der hochallergenen Albuminfraktion, durch vergleichbares Vorgehen die Sequenzierung des potenziellen 28-kDa-Hauptallergens ermöglicht.
Ein Vergleich der ermittelten N-terminalen AS-Sequenzen dieser Allergene mit den Einträgen der Proteindatenbank SWISSPROT (2003) ergibt eine 78 bzw. 69 %ige Homologie zu bereits identifizierten Proteinen. Es handelt sich dabei zum einen um eine Untereinheit des Erdnuss-Hauptproteins Arachin (BHUSHAN & REDDY, 1990), zum anderen um das Albumin 1 (PA1A) der Sojabohne (WATANABE et al., 1994; TAN et al., 1999). Da bezüglich dieser Proteine bisher keine immunologischen Untersuchungen durchgeführt wurden, lässt sich über ihre Bedeutung als kreuzreaktive Komponenten keine Aussage treffen. Da es sich jedoch jeweils um Leguminosenproteine handelt, wird nochmals die starke Verwandtschaft der Protein-Zusammensetzung dieser botanischen Familie belegt.

5.2 Reifungseinflüsse

Die Untersuchungen zur Veränderung des allergenen Potenzials im Verlauf der Reifung werden anhand von unterschiedlichen Entwicklungsstufen verschiedener Gartenerbsen- bzw. Gartenbohnensorten durchgeführt.

Dabei zeigen sich in allen Gartenerbsensorten zunehmende Differenzierungen im Protein- bzw. im Allergenspektrum, welche insbesondere im niedermolekularen Bereich auftreten. Weiterhin ergeben sich verstärkte IgE-Bindungsfähigkeiten einzelner Allergene und steigende allergene Potenziale mit fortschreitendem Reifungsgrad. Gleichzeitig kann aber auch für die jeweils im frühen Entwicklungsstadium geernteten Samen ein beträchtliches allergenes Potenzial nachgewiesen werden.

Um darüber hinaus die Verteilung der Gesamtallergenität auf einzelne in der Gartenerbse vorkommende Proteinfraktionen vornehmen zu können, erfolgt die getrennte immunologische Untersuchung der Glutelin-, Globulin- und Albumin-Fraktion der vier Reifungsstufen der Sorte „Maxigolt“. Dabei ergibt sich bereits für die frühen RS ein erheblicher im Verlauf der Reifung weiter ansteigender Albumin-Anteil. Gleichzeitig sinkt der Globulin-Anteil bei konstantem Glutelin-Anteil. Weiterhin kann in allen Einzelfraktionen der vier RS eine hohe allergene Potenz nachgewiesen werden, wobei der Albumin-Fraktion die jeweils höchste Allergenität zukommt. Weiterhin kann eine Allergenitätszunahme mit zunehmender Reifung in allen drei Proteinfraktionen nachgewiesen werden.

Diese Ergebnisse stimmen mit den von MALLEY et al. (1975) publizierten Resultaten insofern überein, dass ein deutlicher Anstieg der Allergenität im Verlauf der Reifung festzustellen ist. Andererseits dokumentiert diese Studie ein deutliches allergenes Potenzial jedoch nur für reife Gartenerbsensamen. Mögliche Gründe für die Diskrepanzen der Ergebnisse sind Unterschiede bezüglich der Reifungsdauern bzw. der Entwicklungszustände der jeweiligen untersuchten Samen.
Aufgrund der unterschiedlichen Funktionen der Proteinfraktionen Glutelin, Globulin und Albumin erfolgt deren Hauptsynthese zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Samenentwicklung. Dabei ist die im Verlauf der Reifung zunehmende Albumin-Synthese (JACOBS, 1951; DANIELSSON, 1952; DANIELSSON & LIS, 1952) anhand der ermittelten Ergebnisse deutlich nachzuweisen. Nach MALLEY et al. (1975) kommt dabei dieser Fraktion die gesamte allergene Aktivität zu. Im Gegensatz dazu weisen BERNHISEL-BROADBENT et al. (1989) in allen isolierten Fraktionen spezifische Antigenbindungen nach. Auch BURKS et al. (1988) dokumentieren vergleichbare Ergebnisse der Allergenverteilung in den Proteinfraktionen der Sojabohne. Anhand der ermittelten Ergebnisse kann eine Verteilung der allergenen Potenz auf alle untersuchten Fraktionen nachgewiesen werden, wobei der Albumin-Fraktion der jeweils größte Anteil zukommt, so dass die Ergebnisse von BERNHISEL-BROADBENT et al. (1989) und BURKS et al. (1988) bestätigt werden.

Im Gegensatz dazu ergeben die Untersuchungen der Gartenbohnensorten unterschiedliche Ergebnisse. Sowohl die AgF als auch die IF der einzelnen RS der Gartenbohnensorte „Maxi“ zeigen eine deutliche Veränderung der Protein- bzw. Allergenspektren im Verlauf der Reifung. Dabei liegt aufgrund der gegenläufigen Effekte der zum einen zunehmenden IgE-Bindungsfähigkeit bzw. der höheren Gehalte der Allergene mit MG von 31, 48, 67 und 75 kDa und der zum anderen abnehmenden IgE-Bindung bzw. der geringeren Gehalte des 38-kDa-Allergens ein konstantes allergenes Potenzial vor. Die Untersuchungen unter Verwendung der Gartenbohnensorten „Salou“ und „Admires“ (Ergebnisse nicht dargestellt) zeigen hierzu vergleichbare Veränderungen. Die Sorte „Montano“ zeigt eine sprunghafte Veränderung sowohl der Protein- und Allergenspektren als auch der allergenen Potenziale im Verlauf der Reifung. So stehen der ausbleibenden Detektion des 42-kDa-Allergens die zusätzliche Anfärbung des 31- bzw. 38-kDa-Allergens sowie die Gegenläufigkeit der IgE-Bindungsfähigkeit der Allergene mit 55 und 67 kDa gegenüber. Insgesamt kommt es dadurch zur Erhöhung des allergenen Potenzials.

Zwar liegen weder bezüglich der Gartenerbse bzw. -bohne noch weiterer Leguminosen Veröffentlichungen über den Einfluss des Reifungszustandes auf das allergene Potenzial vor, doch belegen verschiedene Studien bezüglich anderer pflanzlicher Lebensmittel sowohl Veränderungen der Protein- sowie Allergenspektren als auch Allergenitätszunahmen im Verlauf der Reifung. So beschreiben KONDO et al. (2001) den Anstieg des allergenen Potenzials der Tomate infolge der steigenden Konzentrationen von am Reifungsprozess beteiligten IgE-bindenden Proteinen. Auch für den Apfel sind Allergenitätszunahmen begründet durch steigende Konzentration des Hauptallergens Mal d 1 belegt (VIETHS et al., 1993b; HSIEH et al., 1995).

Vergleichbare Veränderungen bezüglich der Allergenspektren sind auch für die untersuchten Gartenerbsensorten festzustellen, so dass ein Anstieg der allergenen Potenziale im Verlauf der Reifung wahrscheinlich durch erhöhte Konzentrationen bereits vorhandener Allergene bzw. durch Allergenneubildungen erfolgt.

Zusätzlich zu diesen ebenfalls bei den untersuchten Gartenbohnensorten festzustellenden verstärkten Anfärbungen einzelner Allergene sind als gegenläufige Entwicklung abnehmende Detektionen einzelner Allergene festzustellen. Diese können durch abnehmende IgE-Bindungsfähigkeiten infolge von katabolen Prozessen im späten Entwicklungsstadium der Bohnen begründet sein (TÄUFEL et al., 1998). Dadurch begründet kommt es, mit Ausnahme der Gartenbohnensorte „Montano“, insgesamt nicht zum Anstieg der allergenen Potenziale der Gartenbohnen im Verlauf der Reifung. Die Unterschiede bezüglich der einzelnen Sorten werden in Kapitel 5.3 diskutiert.

5.3 Sortenvergleich

Eine anhand von voll ausgereiften Samen der fünf Gartenerbsensorten „Kleine Rheinländerin“, „Allerfrüheste Mai“, „Maxigolt“, „Sprinter“ und „Wunder von Kelvedon“ untersuchte Sortenabhängigkeit des allergenen Potenzials ergibt keine charakteristischen Unterschiede. Sowohl die unspezifischen Anfärbungen der Gesamtproteinmuster als auch die spezifischen Detektionen der Allergenspektren der fünf Gartenerbsensorten weisen grundsätzliche Ähnlichkeiten auf, wobei geringe Variationen der Detektionsintensitäten einzelner Banden sowie leichte Abweichungen der Allergenspektren auftreten. Da die durchgeführten EAST-Inhibitions-Untersuchungen jedoch vergleichbare IgE-Bindungsfähigkeiten für alle untersuchten Sorten ergeben, ist zu folgern, dass keine Unterschiede der Gesamtallergenitäten vorliegen.

Identische Studien der Gartenbohnensorten „Salou“, „Admires“ und „Maxi“ ergeben vergleichbare Ergebnisse. Im Gegensatz dazu ist infolge der Variationen der Allergenspektren der Sorte „Montano“ eine erhöhte allergene Aktivität zu konstatieren.

Unterschiede der Protein- und somit möglicherweise auch der Allergenspektren einzelner Sorten sind im allgemeinen durch klimatische und züchterische Einflüsse, welche zur Anreicherung bzw. Verminderung einzelner Proteine führen können, begründet (HEFLE, 1996). Zwar liegen bezüglich der Gartenerbse bzw. -bohne bisher keine derartigen Studien vor, doch konnten für die Erdnuss und die Sojabohne erhebliche Unterschiede im Gehalt und in der Zusammensetzung der Speicherproteine nachgewiesen werden, ohne dass Untersuchungen bezüglich der Allergenität durchgeführt wurden (HEFLE, 1996). Andere Studien (NORDLEE et al, 1981; HERIAN et al., 1990; BURKS et al, 1995; KOPPELMAN et al., 2001) belegen jedoch sowohl für Erdnuss- als auch Sojasorten Abweichungen in den Protein- und Allergenspektren, dessen ungeachtet sind jedoch keine signifikanten Unterschiede der allergenen Potenziale nachzuweisen. Vergleichbare Ergebnisse sind für verschiedene Lebensmittel, wie Mandeln (BARGMAN et al., 1992), Paprika (JENSEN-JAROLIM et al., 1998), Mangos und Litchis (ZUNKER, 2001) sowie Haselnüsse und Karotten (WIGOTZKI, 2001) dokumentiert.

Einzig für verschiedene Apfelsorten konnten erhebliche Abweichungen der allergenen Potenziale festgestellt werden. So weisen die neueren Zuchtsorten „Golden Delicious“ und „Granny Smith“ stärkere Allergenitäten auf als die wesentlich länger bekannten Sorten „Boskoop“, „Gloster“ und „Jamba“ (VIETHS et al., 1994d; HSIEH et al., 1995). Begründet sind diese Unterschiede durch Korrelationen der allergenen Potenz mit der Konzentration des Hauptallergens Mal d 1 (VIETHS et al, 1994c; SON et al, 1995). Da es sich bei den untersuchten Gartenerbsen- und Gartenbohnensorten zum überwiegenden Teil um lange bekannte (BUNDESSORTENAMT, 2003) unter identischen Kultivierungsbedingungen gereifte Zuchtsorten handelt, erscheinen die Ähnlichkeiten der Protein- und Allergenspektren sowie die vergleichbaren allergenen Potenziale durchaus plausibel. Für die in ihrem allergenen Potenzial erhöhte Gartenbohnensorte „Maxi“ liegt kein Antrag auf Zulassung vor (BUNDESSORTENAMT, 2003), so dass keine Aussage bezüglich des Züchtungszeitraumes getroffen werden kann.

5.4 Technologische Verarbeitung

Ein wichtiges Kriterium sowohl für die Bedeutung einzelner Allergene als auch für die Allergenität eines Lebensmittels stellt die Beeinflussung durch Verarbeitungsprozesse dar. So kann die allergene Aktivität einerseits unverändert bleiben, anderseits jedoch vermindert werden oder sogar ansteigen (BESLER et al, 2001). Dabei gibt die Untersuchung von verarbeiteten Handelsprodukten zunächst Hinweise auf die Allergenstabilität, wobei jedoch zu berücksichtigen ist, dass ohne nähere Angaben zu Herkunft, Sorte, Reifungszustand und den Verarbeitungsparametern lediglich tendenzielle Aussagen abzuleiten sind. Um die Ergebnisse anhand sortenreiner Rohstoffe vergleichbarer Reifestadien unter definierten Prozessbedingungen zu verifizieren bzw. infolge extremer Behandlungen die Restallergenität der Produkte weiter zu beeinflussen, werden zusätzlich die Auswirkungen auf die Gartenerbsen- sowie Gartenbohnenallergene durch Tiefgefrierlagerung, Trocknung, Autoklavierung und Mikrowellenbestrahlung im Labormaßstab untersucht.

Die Tiefkühlerbsen aus dem Handel zeigen im Vergleich zur nativen Gartenerbse insgesamt leichte Veränderungen der Protein- bzw. Allergenspektren, wobei die allergenen Potenziale keine signifikanten Veränderungen aufweisen. Damit ist von einer hohen Stabilität der Allergene gegenüber der Tiefgefrierlagerung bei - 20 °C auszugehen. Bei den nach Herstellerangaben zubereiteten Produkten zeigt sich eine deutliche Verminderung der allergenen Potenziale. Diese kann zum einen durch den Verlust der IgE-Bindungsfähigkeit infolge von Proteinveränderungen zum anderen jedoch auch durch die Wasserlöslichkeit und den dadurch bedingten Übergang von Allergenen ins Kochwasser begründet sein.
Im Vergleich dazu zeigen die über einen Zeitraum von 68 Wochen bei Temperaturen von - 20 °C bzw. - 80 °C gelagerten Gartenerbsen keinerlei Veränderungen bezüglich der grundanalytischen Kenndaten, der sensorischen Eigenschaften, der Protein- bzw. Allergenspektren oder der allergenen Potenziale.

Es ist zu berücksichtigen, dass im allgemeinen vor dem Tiefgefrieren von pflanzlichen Lebensmitteln durch Blanchieren, eine kurzzeitige Erhitzung im Wasserdampf auf ca. 70 bis 80 °C, eine Minimierung der Enzymaktivität induziert wird (HEISS & EICHNER, 2002). Auf diese Behandlung wurde im durchgeführten Lagerungsversuch jedoch verzichtet. Deshalb ist zu vermuten, das die Unterschiede in den detektierten Allergenspektren durch diese Vorbehandlung und nicht durch die Lagerungsbedingungen verursacht wurden. Gestützt wird diese Vermutung durch den Umstand, dass keine Unterschiede bei den Protein- bzw. Allergenspektren sowie den allergenen Potenzialen bei Lagerungstemperaturen von - 20 und - 80 °C auftreten.

Im Gegensatz dazu weist bereits die ohne weitere Vorbehandlung untersuchte Tiefkühlbohne ein deutlich ausgedünntes Allergenspektrum sowie ein leicht vermindertes allergenes Potenzial auf. Eine anschließende Zubereitung nach Herstellerangaben führt lediglich zu geringfügigen Veränderungen der allergenen Potentiale.

Da auch für die Gartenbohne die Tiefgefrierlagerung weder bei - 20 noch bei - 80 °C Einflüsse auf das Allergenspektrum noch das allergene Potenzial hervorruft, ist auch hier ein Allergenitätsverlust des Handelsproduktes infolge des Blanchierens zu vermuten. Ob dabei eine geringere Allergenstabilität oder drastischere Blanchierbedingungen die stärkere Beeinflussung hervorrufen, lässt sich nicht feststellen.

Die für den Lagerungsversuch der Gartenerbse gewählten Versuchsparameter entsprechen bei einer Gesamtlagerungszeit von 68 Wochen und - 20 °C in etwa der von Herstellern angegebenen Höchstlagerungsdauer von 72 Wochen bei - 20 °C für Tiefgefriererbsen. Die Lagerungsdauer der Gartenbohnen erreichen diesen Zeitraum aus technischen Gründen nicht. Da sowohl unter diesen Lagerungsbedingungen als auch bei der Extremtemperatur von - 80 °C keine Einflüsse auf die Allergene der Gartenerbse bzw. -bohne hervorgerufen werden, kann von einer sehr hohen Allergenstabilität gegenüber der Tiefgefrierlagerung ausgegangen werden.

Da sich nur wenige Lebensmittel zur Tiefgefrierlagerung über längere Zeiträume eignen, liegen diesbezüglich wenig Studien vor. Jedoch konnte sowohl ZUNKER (2001) bei der Lagerung von Litchis (52 Wochen/- 20 °C) als auch WIGOTZKI (2000) anhand der Untersuchung von tiefgefriergelagerten Karotten (Handelsprodukte) eine unveränderte Allergendetektion sowie konstante allergene Potenziale und damit eine maximale Allergenstabilität nachweisen.

Die thermische Behandlung von Lebensmitteln gehört zu den gängigsten technologischen Verarbeitungsverfahren (VIETHS et al., 1994b). Von den allgemein für Lebensmittel angewandten Verfahren sind für die Bearbeitung von Gartenerbsen und -bohnen das Trocknen, die Autoklavierung sowie die Mikrowellenbehandlung von Bedeutung, so dass die Beeinflussung der Allergenität durch diese Verfahren im folgenden näher betrachtet wird.

Die Untersuchung von getrockneten Handelsprodukten zeigt kaum Veränderungen der Protein- und Allergenspektren sowie unveränderte allergene Potenziale. Eine weitere Erhitzung dieser Produkte bedingt jedoch deutliche Verluste der IgE-Bindungsfähigkeit niedermolekularer Allergene sowie signifikant verminderte allergene Potenziale. Des weiteren wird die hohe Wasserlöslichkeit verschiedener Allergene ermittelt. In Übereinstimmung hierzu stehen die im Labormaßstab durchgeführten Untersuchungen zur Trocknung der Gartenerbse bzw. -bohne. Dabei können bis zum Erreichen der handelsüblichen Restwassergehalte von 10 bis 11 % lediglich geringfügige Veränderungen im niedermolekularen Protein- und Allergenspektrum bei unveränderten allergenen Potenzialen festgestellt werden. Selbst darüber hinaus werden kaum zusätzliche Veränderungen hervorgerufen. Somit ist eine hohe Allergenstabilität gegenüber den angewandten Trocknungstemperaturen von 58 ± 2 °C im Trockenschrank unter Rotation des Trocknungsgutes festzustellen.

Infolge der industriell durchgeführten Behandlung zur Herstellung von Dosen- und Glaskonserven durch Autoklavierung ergeben sich dagegen erhebliche Veränderungen im gesamten Protein- und Allergenspektrum der Gartenerbse und -bohne sowie eine erhebliche Reduzierung der allergenen Potenziale. Vergleichbare Ergebnisse liefern die Laboruntersuchungen, die signifikante Allergenitätsverluste ohne sensorische Veränderungen bei der Gartenerbse im Bereich beginnend bei einer 20-minütigen Erhitzung auf 60 °C bis zur 40-minütigen Erhitzung auf 121 °C ergeben. Darüber hinaus werden weitere Reduzierungen der IgE-Bindungsfähigkeiten und Minimierungen der allergenen Potenziale einhergehend mit sensorischen Veränderungen ermittelt. Für die anhand von Gartenbohnen unter gleichen Bedingungen durchgeführten Untersuchungen ergeben sich bis zu einer 60-minütigen Autoklavierung bei 100 °C lediglich geringfügige Veränderungen dieser Parameter. Darüber hinaus treten zahlreiche Bandenverluste in den detektierten Allergenspektren und Minimierungen der allergenen Potenziale auf. Sowohl in den Handelsprodukten als auch bei den Laborversuchen zeigen jeweils die höhermolekularen Allergene größere Hitzestabilitäten.

Die Mikrowellenbehandlung der Gartenerbse zeigt annähernd identische Auswirkungen auf die Protein- und Allergenspektren sowie die allergenen Potenziale. Bereits durch zweiminütige Mikrowellenbestrahlung können im niedermolekularen Bereich auftretende Protein- und Allergenveränderungen sowie geringere allergene Potenziale festgestellt werden. Deutliche Veränderungen werden jedoch erst durch die für mindestes 7 min einwirkende Mikrowellenbestrahlung hervorgerufen, welche gleichzeitig negative sensorische Veränderungen bewirkt. Die Mikrowellenbestrahlung der Gartenbohne zeigt im Vergleich dazu bereits nach einminütiger Behandlung einsetzende und deutlicher aufgeprägte Veränderungen der Protein- und Allergenspektren.

Es ergeben sich kaum Beeinflussungen der Allergenitäten von Gartenerbse und -bohne durch Lufttrocknung bei Temperaturen von etwa 60 °C. Auch Autoklavierungen bei bis zu 100 °C, welche im Vergleich dazu eine Energieübertragung in Form von Wasserdampf darstellen, sowie Mikrowellenbestrahlungen bis zu 6 min rufen nur geringfügige Allergenitätsveränderungen hervor.
Erst die Autoklavierung ab 121 °C sowie die mindestens acht Minuten andauernde Mikrowellenbestrahlung führen zum deutlichen Verlust der IgE-Bindungsfähigkeiten vieler Allergene und zur charakteristischen Minimierung der allergenen Potenziale, wobei selbst nach extremen thermischen Einflüssen deutliche allergene Restpotenziale verbleiben. Insgesamt zeigen dabei sowohl die höhermolekularen Allergene der Gartenerbse als auch der Gartenbohne wesentliche höhere Stabilitäten gegenüber thermischer Belastung. Weiterhin ist eine leicht erhöhte Beständigkeit der Gartenerbsenallergene im Vergleich zur Gartenbohne festzustellen.

Zahlreiche Untersuchungen belegen, dass durch thermische Behandlung von Lebensmitteln, bedingt sowohl durch Verarbeitungsprozesse als auch durch die Zubereitung, Denaturierungen und Abbauprozesse von Proteinen erfolgen (BELITZ et al., 2001; HEISS & EICHNER, 2002).

Mit steigender Intensität der thermischen Behandlung treten dabei zunächst die Zerstörung der Tertiärstruktur durch die Entfaltung bzw. Lockerung des Proteins infolge des Lösens von Wasserstoffbrücken- bzw. Disulfidbindungen, anschließend der Verlust der Sekundärstruktur durch Entfaltung der Helices und der Abbau der β-Faltblattstruktur infolge der Spaltung von Wasserstoffbrückenbindungen und schließlich der Abbau der Primärstruktur durch Spaltung der Peptidkette begleitet von Schwefelwasserstoff-Abspaltung bei hohen Temperaturen auf (VIETHS et al., 1994b). Neben den tierischen Allergenen aus Eiern und Milch besitzen auch die Allergene der Leguminosen Erdnuss und Soja (TAYLOR et al., 1997) sehr hohe Hitzestabilitäten. Nach KREFT et al. (1995) werden Allergene mit Sequenzepitopen durch thermische Behandlungen nicht beeinflusst, wo hingegen Konformationsepitope durch Entfaltung der Peptidketten sowie Aufbrechen der Disulfidbrücken zerstört werden.

Die von MALLEY et al. (1975) durchgeführten Studien belegen eine Stabilität der Gartenerbsenallergene sowohl bei Erhitzung auf 60 °C für 30 min als auch bei fünfminütigem Kochen bei 100 °C. Selbst eine Autoklavierung bei 120 °C für 15 min führt lediglich zur teilweisen Verminderung der allergenen Aktivität, wobei keine Aussagen über die veränderte IgE-Bindungsfähigkeit einzelner Allergene getroffen werden.
Ähnliche Ergebnisse erzielten IGEA et al. (1994) bei der Erhitzung von Gartenbohnen auf 75 °C, wodurch selbst nach 24 h keine signifikanten Veränderungen des allergenen Potenzials hervorgerufen werden. Auch DAROCA et al. (2000) konnten lediglich geringe Unterschiede zwischen den IgE-Reaktivitäten von rohen und gekochten Gartenbohnenextrakten nachweisen, wobei von den im rohen Extrakt detektierten Hauptbanden mit MG 41, 47 und 71 kDa nach der Erhitzung, nähere Angaben zur Dauer werden nicht gemacht, nur noch die 41- und 71-kDa-Hauptbande detektiert werden. Es ergeben sich somit ausgeprägte Übereinstimmungen zu den in dieser Studie festgestellten hohen Hitzestabilitäten der Gartenerbsen- und Gartenbohnenallergene.

Zahlreiche Studien belegen die allgemein sehr hohe Hitzeresistenz von Erdnussallergenen (HEINER & NEUCERE, 1975; TAYLOR et al., 1982; BARNETT et al., 1983; KEATING et al., 1990; BURKS et al., 1992b). Weiterhin ermitteln KOPPELMAN et al. (1998) keine signifikanten Änderungen der IgE-Bindungsfähigkeit des zuvor isolierten 63.5-kDa-Erdnuss-Hauptallergens Ara h 1 nach 15-minütiger Erhitzung auf 120 bis 140 °C. Auch BURKS et al. (1992b) weisen diese hohe Hitzestabilität von isolierten Erdnussallergenen nach, indem zunächst eine 13- bis 16-minütige Röstung der Gesamtfrucht auf 163 bis 177 °C erfolgt und anschließend einzelne Allergene, u.a. die Hauptallergene Ara h 1 und Ara h 2, für 60 min auf 100 °C erhitzt werden, ohne dass eine Reduktion der IgE-Bindungsfähigkeit festgestellt werden kann. Anhand von trocken-

bzw. ölgerösteten Produkten, welche im allgemeinen Temperaturen von 180 °C ausgesetzt sind (TÄUFEL et al., 1998), können die nahezu unveränderten IgE-Bindungsaktivitäten durch NORDLEE et al. (1981) bestätigt werden. Insgesamt weist diese Studie lediglich für ein stark verarbeitetes Erdnussöl sowie ein Erdnussmehl deutlich verminderte Restallergenitäten auf.

Zwar dokumentieren BURKS et al. (1992b) sowohl für ganze Sojabohnen als auch für einzelne Proteinfraktionen nach 60-minütiger Erhitzung auf 100 °C unveränderte Allergenitäten, doch konnten MÜLLER et al. (1998) zum einen durch zweistündiges Kochen und zum anderen durch 25-minütige Mikrowellenbestrahlung (700 W) Reduzierungen der IgE-Bindungsfähigkeiten hervorrufen. Auch von SHIBASAKI et al. (1980) am gesamten Sojaglobulin sowie an einzelnen Fraktionen durchgeführte 30-minütige Erhitzungen auf 80, 100 bzw. 120 °C zeigen überwiegend Reduzierungen der IgE-Bindungsfähigkeiten, wobei jedoch in allen Fraktionen Restallergenitäten verbleiben. Somit ergeben sich auch für Sojaallergene sehr hohe Hitzestabilitäten, welche jedoch im Vergleich zur Erdnuss abfallen.

Auch die Leguminosen Linse und Kichererbse, welche bevorzugt im Mittelmeerraum konsumiert werden und dort eine hohe Bedeutung als allergieauslösende Lebensmittel besitzen (MARTINEZ SAN IRENEO et al., 2000) weisen überwiegend hitzestabile Allergene auf. So weisen IBANEZ SANDIN et al. (1999) ein unverändertes Allergenspektrum der Linse mit lediglich verringerter Detektionsintensität einzelner Banden nach 15 minütigem Kochen nach, wobei ein leichter Anstieg der IgE-Bindungsfähigkeit zu verzeichnen ist. Auch CARRILLO et al. (1986) sowie LALLES & PELTRE (1996) bestätigen diese Hitzestabilität der Linsenallergene. Vergleichbare Ergebnisse, ein nahezu unverändertes Allergenspektrum eines unbehandelten und 15 min auf 100 °C erhitzten Extraktes bei leichtem Anstieg der IgE-Bindungsfähigkeit infolge der thermischen Behandlung, ermitteln MARTINEZ SAN IRENEO et al. (2000) für die Kichererbse. Im Gegensatz dazu dokumentieren SANCHEZ-MONGE et al. (2000) substanzielle Veränderungen des Proteinspektrums nach Erhitzen mit verstärkter Detektion der Banden zwischen 12 und 16 kDa, sowie eine verminderte Detektionsintensität im Bereich von 25 bis 45 kDa. Im Allergenspektrum werden die Hauptbanden in den MG-Bereichen von 12 bis 16 sowie 45 bis 70 kDa lokalisiert.

Somit kann zusammenfassend festgestellt werden, dass die hohe Hitzestabilität der Gartenerbsen- und Gartenbohnenallergene insgesamt mit der in zahlreichen Studien belegten Unempfindlichkeit anderer Leguminosen gegenüber thermischer Behandlung vergleichbar ist. Dabei können keine signifikant unterschiedlichen Einflüsse bezüglich der angewandten Verfahren der thermischen Beeinflussung ermittelt werden. Eine von der Art der Erhitzung unabhängige Protein- sowie Allergendenaturierung für Sellerie- und Apfel konnte ebenfalls durch VIETHS et al. (1994b) festgestellt werden. Hinweise bezüglich unterschiedlicher Hitzeresistenzen in Abhängigkeit vom Molekulargewicht liegen jedoch nicht vor.

5.5 In-vitro-Verdauung

Basierend auf den Kenntnissen bezüglich echter LMA stellt die Magenpassage von Gartenerbsen- und Gartenbohnenallergenen unter Erhalt intakter Epitope eine Grundvoraussetzung zur Sensibilisierung des Immunsystems über den Gastrointestinaltrakt und damit zur Manifestation klinischer Symptome dar, weil nur so eine Absorption durch die Mucosa möglich ist (ASTWOOD et al., 1996; VIETHS et al, 1999; FU et al., 2002). Diesbezüglich erfolgen Stabilitätsuntersuchungen der Allergene gegenüber proteolytischen Enzymen unter vereinfachter Simulation des menschlichen Verdauungstraktes. Weiterhin stellt die enzymatische Behandlung von Lebensmitteln, obwohl eine generelle Anwendung im Rahmen der Lebensmittelherstellung ist nicht möglich ist, ein gängiges Verfahren zur gezielten Reduktion der allergenen Potenz dar (VIETHS et al., 1994b). So erfolgt die Behandlung von Gartenerbsen- und Gartenbohnenextrakten unter Einsatz verschiedener Enzyme bzw. Enzymmischungen zur Überprüfung der potenziellen Minimierung der Restallergenitäten von stark verarbeiteten Produkten, wie sie häufig zur Herstellung von Brei oder gemahlen als Suppengrundlage eingesetzt werden (FRANKE, 1997; WEBERLING & SCHWANTES, 2000).
Potenzielle Protein- bzw. Allergenveränderungen können bereits beim Eintritt der Nahrung in den Gaster infolge der Inkubation mit Salzsäure erfolgen. Deshalb werden zunächst vergleichende Untersuchungen der Allergenspektren und der allergenen Potenziale der nativen und bei einer Temperatur von 37 °C und einem pH-Wert von 2 inkubierten Extrakte durchgeführt.

Anhand der Gartenerbsenextrakte wird deutlich, dass eine derartige Behandlung lediglich geringfügige Veränderungen im niedermolekularem Proteinspektrum jedoch keine Beeinflussung des Allergenspektrums bzw. der Detektionsintensitäten sowie des allergenen Potenzials hervorruft. Einflüsse in Folge unterschiedlicher Inkubationsdauern sind nicht festzustellen. Der Pepsin-Zusatz führt im Gegensatz dazu nahezu unabhängig von der eingesetzten Aktivität der Lösung zum vollständigen Abbau zahlreicher Proteine im gesamten MG-Bereich. Es kommt zur verstärkten Detektion niedermolekularer Proteinbanden, bei denen es sich vermutlich um Fragmente höhermolekularer Proteine handelt, sowie zum vollständigen Abbau höhermolekularer Proteine. Die Veränderungen im Allergenspektrum dagegen fallen weniger deutlich aus. Es werden wiederum unabhängig von der Pepsin-Aktivität lediglich die Allergene mit MG von 14 bzw. 30 kDa abgebaut. Die geringfügige Abnahme der Allergenität, charakterisiert durch den leichten Anstieg der C_{50}-Werte der EAST-Inhibition, bestätigen diese Veränderungen.

Im Gegensatz dazu erfolgen im Gartenbohnenextrakt sowohl durch die zweistündige Behandlung bei pH 2 als auch infolge der Pepsin-Inkubation nur geringfügige Veränderungen der Proteinspektren sowie der Verlust der IgE-Bindungsfähigkeit des 16- bzw. 19-kDa-Allergens. Bestätigt wird diese Hydrolyseresistenz durch die Ergebnisse der EAST-Inhibition, welche lediglich geringfügige Abnahmen der allergenen Potenziale anzeigen.

Zusammenfassend ergibt sich somit sowohl für zahlreiche Gartenerbsen- als auch Gartenbohnenallergene eine hohe Persistenz gegenüber der simulierten Magenverdauung, wobei eine geringfügig höhere Stabilität der Gartenbohnenallergene festzustellen ist.

Die Inkubation des zuvor mit Pepsin verdauten Gartenerbsenextraktes mit den Enzymen des Intestinaltraktes führt sowohl im Protein- als auch im Allergenspektrum zu drastischen Veränderungen. Nach der Trypsin-Verdauung werden zwar noch verschiedene Proteine im MG-Bereich < 14 bis 75 kDa detektiert und lediglich das 20-kDa-Allergen abgebaut. Doch führt die α-Chymotrypsin-Zugabe zum starken Protein- und Allergenabbau, so dass anschließend lediglich das 25- und 28-kDa-Allergen visualisiert werden. Die Inkubation mit Carboxypeptidase A zeigt keinen weiteren Einfluss auf diese resistenten Allergene. Die im niedermolekularen Bereich gebildeten Proteine weisen keine IgE-Bindungsfähigkeiten auf. Durch steigende C_{50}-Werte nach den jeweiligen Inkubationsstufen werden abnehmende allergene Potenziale der Extrakte verdeutlicht. Vergleichbare Ergebnisse liefern die Inkubationen mit den Enzymgemischen Pankreatin bzw. Proteinase K.

Auch die Gartenbohnenproteine bzw. -allergene zeigen sich gegenüber der Trypsin-Verdauung weitgehend stabil. Dagegen werden wiederum durch die α-Chymotrypsin-Inkubation zahlreiche Proteine im gesamten MG-Bereich abgebaut sowie die Detektionsintensitäten der verbleibenden Proteine stark vermindert. Diese Veränderungen führen im Allergenspektrum zwar zum Abbau der niedermolekularen Allergene mit MG von 21 bzw. 25 kDa, jedoch werden die Allergene mit MG von 29, 38, 42, 55, 67 und 75 kDa unverändert detektiert. Da die abschließende Carboxypeptidase A-Inkubation lediglich den Abbau des 31-kDa-Allergens sowie die Verminderung der Detektionsintensität der verbleibenden Allergene hervorruft, kann im Vergleich zur Gartenerbse eine höhere Allergenstabilität der Gartenbohnenallergene gegenüber der simulierten intestinalen Verdauung festgestellt werden. Bestätigt werden diese Tendenzen sowohl durch die C_{50}-Werte der EAST-Inhibitionen als auch durch die Inkubationen mit den Enzymgemischen Pankreatin sowie Proteinase K.
Insgesamt ist festzustellen das infolge der simulierten intestinalen Verdauung eine deutliche Verringerung der Allergenitäten der Gartenerbse und -bohne hervorgerufen wird, wobei stärkere Einflüsse auf die Gartenerbsenallergene festzustellen sind, jedoch alle verdauten Extrakte noch Restallergenitäten aufweisen.

Zahlreiche unter variierenden Parametern bezüglich der eingesetzten Enzyme bzw. der Inkubationszeiten durchgeführte Studien, sowohl zur einfachen Pepsinbehandlung als auch zur simulierten gastrointestinalen Verdauung, belegen vergleichbare Stabilitäten verschiedener Leguminosenallergene. Die vorliegende Studie ist sowohl an grundlegende Erkenntnisse der menschlichen Verdauung (SCHMIDT & THEWS, 1995) als auch an diese Studien (ASTWOOD et al., 1996; VIETHS et al., 1999; FU et al., 2002) über die proteolytische Beeinflussung von Leguminosenallergenen angelehnt, so dass eine generelle Vergleichbarkeit gewährleistet ist.

So weisen nach FU et al. (2002) unterschiedliche zuvor isolierte nicht allergene Gartenerbsen- bzw. Bohnenproteine gegenüber der Magenverdauung nur eine maximal 15-minütige Stabilität, gegenüber der Darmverdauung aber höhere Beständigkeiten auf. VIETHS et al. (1999) dagegen konnten für das Proteinspektrum der Erdnuss keine Beeinflussung durch zweistündige Inkubation bei 37 °C und einem pH-Wert von 1.5 ermitteln. Auch BECKER (1997) konnte bei Erdnüssen, die 10 min gekaut wurden, keine Veränderungen im Allergenspektrum nachweisen. Nach zweistündiger Inkubation unter Magenbedingungen ist eine deutliche Verdauung der Erdnussproteine mit MG > 30 kDa, einschließlich des Hauptallergens Ara h 1, sowie die Detektion zahlreicher Proteinfragmente < 25 kDa festzustellen, wobei mittels IF jedoch ein breites Spektrum an Allergenen detektiert werden kann (VIETHS et al., 1999). Eine hohe Stabilität des Hauptallergens Ara h 1 nach 80-minütiger Pepsin-Inkubatuion zeigen die Untersuchungen von BECKER (1997). Nach Darmverdauung verbleibt nach VIETHS et al. (1999) jedoch nur eine geringe IgE-Bindungsfähigkeit von drei Banden mit MG < 14 kDa. Auch BURKS et al. (1992b) stellen nur minimale Veränderungen für Erdnuss- und Sojaallergene nach einer der menschlichen Verdauung angepassten chemischen Behandlung sowie eine 100- bzw. 10-fache Reduzierung der IgE-Bindungsfähigkeit der Erdnuss- bzw. Sojaallergene nach simulierter menschlicher Verdauung fest. Ähnliche Ergebnisse erzielen ASTWOOD et al. (1996) anhand von Erdnuss- und Sojaextrakten nach 60-minütiger Inkubation unter simulierten Magenbedingungen, wobei eine höhere Stabilität allergener Proteine im Vergleich zu nicht allergenen Proteinen festgestellt wird. Ein Vergleich der proteolytischen Stabilität von Major- und Minorallergenen der Erdnuss bzw. der Sojabohne zeigt, dass keine signifikant höhere Persistenz der Majorallergene vorliegt (Fu et al., 2002). Auch bezüglich allergener und nicht-allergener Proteine weist diese Studie keine Stabilitätsunterschiede nach. LALLES & PELTRE (1996) beschreiben anhand ihrer Untersuchungen die natürliche Resistenz einiger Leguminosen gegenüber chemischer und zum Teil gegenüber proteolytischer Denaturierung als gemeinsames Merkmal.

Insgesamt zeigen diese Studien eine hohe Säurestabilität unterschiedlicher Leguminosenproteine bzw. -allergene, starke Beeinflussungen der Protein- und Allergenspektren jedoch wesentlich geringere Verminderungen der Allergenitäten durch eine simulierte Magenverdauung. Bei der Darmverdauung ergeben sich dagegen drastische Veränderungen der Protein- und Allergenspektren sowie erhebliche Reduzierungen der allergenen Potenziale. Damit liegen große Übereinstimmungen zu den in der vorliegenden Studie ermittelten Ergebnissen bezüglich der Gartenerbse und -bohne vor.

Für die Stärke der Restallergenität nach proteolytischer Verdauung ist nicht nur das Ausmaß der Proteinhydrolyse sondern vielmehr die Stabilität der Epitope entscheidend (MAHMOUD et al., 1992). So lassen sich auch die in dieser Studie ermittelten starken Unterschiede der Allergenstabilitäten einzelner Gartenerbsen- und Gartenbohnenallergene, welche auch für zahlreiche andere Lebensmittel festgestellt wer-

den können, erklären (YAGAMI et al., 2000). Die Unterschiede der zwar tendenziell vergleichbaren Ergebnisse der mittels IF nachgewiesen ausbleibenden Detektionen des überwiegenden Teils der Allergene und die durch EAST-Inhibition ermittelten Abnahmen der Gesamtallergenitäten erklären sich zum einen durch die höhere Empfindlichkeit der EAST-Inhibition. Zum anderen besteht die Möglichkeit des Vorhandenseins von Allergenfragmenten mit intaktem Epitop, welche durch die IF nicht mehr detektiert werden können, da die untere MG-Grenze der Immunogenität unterschritten ist (AULEPP & VIETHS, 1992).

5.6 Ausblick

Bisher in der Literatur fehlende umfassende Kenntnisse zur Charakterisierung der Allergene der Gartenerbse- und Gartenbohne sowie deren Stabilität gegenüber der Verarbeitung und der Einfluss der simulierten menschlichen Verdauung konnten in der vorliegenden Studie erarbeitet werden.

Zur gesicherten Klassifizierung der Relevanz einzelner Allergene wird allgemein eine Mindestgröße des Patientenkollektivs von 50 Personen gefordert (GEHA, 1995; VIETHS et al., 1996). Da diese Anzahl in der vorliegenden Studie nicht erreicht wird, können die hier getroffenen Einteilungen in Major-, Intermediär- und Minorallergene lediglich als Tendenz eingestuft werden und bedürfen weiterer Untersuchungen. Weiterhin sollten anhand der 2D-Elektrophorese Bestätigungen der ermittelten pI der Gartenerbsen- und Gartenbohnenallergene erfolgen, so dass hinsichtlich der Allergencharakterisierung eine Absicherung der Ergebnisse sowie die Identifizierung von Isoallergenen erfolgt.

Die zur Isolierung von Gartenerbsenallergenen durchgeführten Untersuchungen mittels der spezifischen Methode der AC liefert wenig reproduzierbare Ergebnisse (nicht dargestellt), so dass eine Eignung für das vorliegende spezielle analytische Problem nicht gegeben ist. Gleichzeitig ermöglicht die entwickelte GPC-Methode zwar die Isolierung und somit auch die N-terminale Sequenzierung zweier Allergene, doch stellt dieses Verfahren zum einen aufgrund des hohen Zeitaufwandes und zum anderen dadurch, dass nur die Isolierung bestimmter Allergene des Gesamtspektrums möglich ist, kein generell anwendbares Verfahren dar. Daher erscheint die Kombination der entwickelten GPC-Methode mit anderen klassischen Isolierungverfahren wie der IEC, der RPC oder der EE sinnvoll.

Weitere Studien hinsichtlich der potenziellen Minimierungen der Gesamtallergenität durch thermische Behandlung der untersuchten Leguminosen erscheinen nicht notwendig, da durch die dokumentierten Untersuchungen eine hohe Hitzestabilität einzelner Allergene hinreichend nachgewiesen wird. Auch der Ansatz zur möglichen Verringerung der Restallergenitäten unverarbeiteter Produkte durch die bisher wenig untersuchten Einflüsse der Behandlung mit ionisierenden Strahlen, durch die nachweislich Proteinveränderungen hervorgerufen werden (DELINCEE, 1983; DIEHL, 1990), stellen zum einen aufgrund der geltenden Bestimmungen der Lebensmittelbestrahlungsverordnung (LEBENSMITTELRECHT: LMBESTRV, 2000) und zum anderen durch die fehlende Akzeptanz in der Bevölkerung nur bedingte Möglichkeiten zur Reduzierung der Gesamtallergenitäten dar.

Im Gegensatz dazu kann die enzymatische Behandlung von stark verarbeiteten Gartenerbsen- und Gartenbohnenprodukten, welche häufig als konsistenzgebende Grundlage komplex zusammengesetzter Lebensmittel Verwendung finden und eine hohe Bedeutung als versteckte Allergene besitzen (VIETHS et al., 1994a), als durchaus wirksames Mittel zur Allergenitätsminimierung dienen. Dabei stehen weiterführende Untersuchungen zum Einfluss auf die konsistenzgebenden und sensorischen Eigenschaften noch aus. Auch der Einsatz von Mikroorganismen ist in diesem Zusammenhang bisher wenig untersucht. BARKHOLT et al. (1998) konnten durch den Einfluss fermentierender Bakterien eine 10 %ige Reduktion des allergenen Potenzials der Gartenerbse nachweisen, so dass weiterführende Studien durchaus sinnvoll erscheinen. Als weitere Möglichkeiten sind Untersuchungen zur gezielten Abtrennung einzelner Proteinfraktionen, wie beispielsweise der hochallergenen Albumine der Gartenerbse, zu nennen. Auch hier müssen jedoch Einflusse auf die Eigenschaften entstehender Produkte Berücksichtigung finden.

Auf den Nachweis von Kreuzreaktivitäten sowohl innerhalb der Familie der Leguminosen als auch zu anderen tierischen sowie pflanzlichen Lebensmitteln wurde in der vorliegenden Arbeit bewusst verzichtet, da zwar in verschiedenen In-vitro-Studien dieses Phänomen beschrieben wird (FRIES, 1982; BARNETT et al., 1987; SACHS & O´CONNELL, 1988; BERNHISEL-BROADBENT & SAMPSON, 1989; BERNHISEL-BROADBENT et al., 1992), doch selten eine klinische Bedeutung vorliegt (BOCK & ATKINS, 1988; ORTOLANI et al., 1998). Aufklärung dieser Problematik können deshalb nur bisher fehlende Studien unter Anwendung doppeltblinder, placebo-kontrollierter Expositionsteste (DBPCFC) geben, welche in Zusammenarbeit mit medizinischem Fachpersonal durchzuführen sind.

6 Zusammenfassung

Den zur Familie der Leguminosen gehörenden Vertretern Gartenerbse (*Pisum sativum* L.) und Gartenbohne (*Phaseolus vulgaris* L.) kommt in Bezug auf die Häufigkeit als Auslöser einer IgE-vermittelten Überempfindlichkeitsreaktion ebenso wie dieser Pflanzenfamilie insgesamt eine große Bedeutung zu. Obwohl auf dem Gebiet der Lebensmittelallergien in den vergangenen Jahren erhebliche Fortschritte erzielt wurden, liegen bisher nur wenig Erkenntnisse zur Charakterisierung der Allergene und zum Einfluss auf die allergenen Potenziale der Gartenerbse und -bohne vor. Durch umfassende Untersuchungen der aus nativen sowie technologisch behandelten Früchten gewonnenen Proteinextrakte mittels etablierter elektrophoretischer und immunologischer Verfahren sollen die Erkenntnisse auf diesem Gebiet erweitert werden.

Unter Verwendung eines Poolserums bestehend aus 39 Einzelseren sensibilisierter Patienten können insgesamt sechzehn Gartenerbsenallergene im MG-Bereich < 14 bis 75 kDa identifiziert werden. Die Charakterisierung mittels IEF zeigt, dass die pI dieser Allergene im neutralen bis sauren pH-Bereich liegen. Nach zuvor erfolgter Isolierung kann über eine N-terminale Sequenzierung eine 78 %ige Homologie des 40-kDa-Allergens zu einer Untereinheit des Erdnuss-Hauptproteins Arachin sowie eine 69 %ige Homologie des 28-kDa-Allergens zum Speicherprotein Albumin 1 (PA1A) der Sojabohne nachgewiesen werden.

Die Untersuchungen von Samen unterschiedlicher Entwicklungsstadien zeigen eine zunehmende Differenzierung des Protein- und Allergenspektrums der fünf untersuchten Gartenerbsensorten im Verlauf der Reifung. Weiterhin ist ein durch zunehmende IgE-Bindungsfähigkeiten der drei Proteinfraktionen Glutelin, Globulin und Albumin begründeter Anstieg des allergenen Potenzials festzustellen. Anhand der fünf Gartenerbsensorten „Kleine Rheinländerin“, „Allerfrüheste Mai“, „Maxigolt“, „Sprinter“ und „Wunder von Kelvedon“ kann keine Sortenabhängigkeit der Allergenität bei geringfügig variierenden Allergenspektren nachgewiesen werden.

Durch umfangreiche Untersuchungen unter Variation der beeinflussenden Parameter Zeit, Temperatur und Druck können hohe Allergenstabilitäten gegenüber unterschiedlichen technologischen Verarbeitungsprozessen ermittelt werden. Anhand von Langzeitlagerungsversuchen ergibt sich eine sehr hohe Stabilität der Gartenerbsenallergene gegenüber Temperaturen von - 20 sowie - 80 °C. Weiterhin zeigen sich unabhängig vom angewandten Verfahren der thermischen Beeinflussung, wie Trocknung, Autoklavierung und Mikrowellenbestrahlung, hohe Hitzestabilitäten der Gartenerbsenallergene.

Die Studien zur simulierten In-vitro-Verdauung ergeben hohe Säurestabilitäten für die Gartenerbsenallergene sowie mittlere Beständigkeiten unter Magenbedingungen. Die simulierte Darmverdauung bedingt dagegen eine starke Verminderung der Anzahl detektierter Allergene sowie starke Verminderungen der allergenen Potenziale.

Im Spektrum der Gartenbohne werden vierzehn Allergene angefärbt, deren MG ebenfalls im Bereich < 14 bis 75 kDa liegen und die pI im neutralen bis sauren pH-Bereich aufweisen.

In Abhängigkeit der Entwicklungsstadien können bei den vier untersuchten Sorten „Maxi“, „Salou“, „Admires“ sowie „Montano“ Veränderungen der Protein- und Allergenspektren beobachtet werden, welche jedoch lediglich bei der Sorte „Montano“ eine Erhöhung des allergenen Potenzials im Verlauf der Reifung hervorrufen. Vergleichende Untersuchungen dieser Gartenbohnenvarietäten zum Sorteneinfluss auf die Allergenität bestätigen ein erhöhtes allergenes Potenzial der Sorte „Montano“.

Analog zu den Ergebnissen der Gartenerbse zeigen auch die Gartenbohnenallergene sehr hohe Stabilitäten gegenüber der Tiefgefrierlagerung bei - 20 bzw. - 80 °C. Nach Trocknung, Autoklavierung und Mikrowellenbestrahlung verbleiben wiederum erhebliche Restallergenitäten, wobei eine geringfügig verminderte Beständigkeit im Vergleich zur Gartenerbse festzustellen ist.

Die abschließenden Betrachtungen zur In-vitro-Verdauung zeigen minimale Beeinflussungen durch niedrige pH-Werte sowie hohe Allergenstabilitäten bei simulierter Magenverdauung und mittlere Beständigkeiten unter Darmbedingungen.

Insgesamt ergeben sich sowohl bezüglich der Allergenspektren als auch der Beeinflussung der IgE-Bindungsfähigkeit der Gartenerbsen- und Gartenbohnenallergene (siehe auch Tab. 6.1) starke Homologien untereinander sowie Parallelen im Vergleich mit anderen Leguminosen.

Tab. 6.1: Ergebnisübersicht zur technologischen Verarbeitung

	Gartenerbse		Gartenbohne	
Parameter	Kapitel	Stabilität	Kapitel	Stabilität
Lagerung bei - 20 °C	4.1.5	+++	4.2.5	+++
Lagerung bei - 80 °C	4.1.5	+++	4.2.5	+++
Trocknung	4.1.6	++	4.2.6	++
Autoklavierung	4.1.7	++	4.2.7	+
Mikrowellenbestrahlung	4.1.8	++	4.2.8	++
Säurebehandlung	4.1.9	++	4.2.9	++
Magenverdauung	4.1.9	+	4.2.9	++
Darmverdauung	4.1.9	-	4.2.9	+

Legende:

- : geringe Stabilität
+ : mittlere Stabilität
++ : hohe Stabilität
+++ : sehr hohe Stabilität

6 Summary

The representatives green pea (*Pisum sativum* L.) and green bean (*Phaseolus vulgaris* L.) belonging to the family of legumes have as well as this plant family in principle a great significance in respect to the frequency as a trigger of an IgE-mediated over-sensitiveness. Although the investigations on the field of food allergies in the last years show significant progress up to now only few experiments are available about the characterization of the allergens and influence on allergen potency of green pea and green bean. Therefore, by means of established electrophoretic and immunologic procedures the existing data should be complemented by comprehensive investigations of protein extracts got from native as well as technological processed fruits.

A pool serum of 39 single sera of sensitized patients identifies sixteen green pea allergens in the range of molecular weight of < 14 to 75 kDa. IEF shows pI of these allergens from neutral to acid pH-values. Following isolation of the single allergens N-terminal sequencing verifies a 78-%-similarity of the 40-kDa-allergen to a subunit of the peanut main protein Arachin as well as a 69-%-similarity of the 28-kDa allergen to the seed storage protein albumin 1 (PA1A) of the soybean.

Investigations of different development stages of seeds show in the process of maturation an increasing differentiation of the protein and allergen spectrum of the five examined green pea varieties as well as a rise of allergenic potency. It is established by increasing IgE binding abilities of the three protein fractions gluteline, globulin, and albumin. By insignificant change of the allergen spectra for five green pea varieties "Kleine Rheinländerin", "Allerfrüheste Mai", "Maxigolt", "Sprinter" and "Wunder von Kelvedon" no dependence of allergenicity on the variety is found.

High stability of allergens is determined by extensive investigations referring to variation of the allergenicity influencing parameters time, temperature, and pressure in different technological processing activities. Long-term storage experiments shows a very high stability of green pea allergens looking at temperatures of - 20 as well as - 80 °C. Further, independent of the applied procedure, high heat stability of the green pea allergens is shown. Thermal influencing is examined due to drying, autoclaving, and microwave irradiation.

The studies about the simulated in-vitro-digestion yield a high acid stability for the green pea allergens as well as medium stability under stomach conditions. On the other hand, simulated intestine digestion evocates a strong decrease in the number of detected allergens as well as significant decreases of allergen potenticy.

In the spectrum of the green bean fourteen allergens are visualized. Their molecular weights also appear in the range of < 14 to 75 kDa and the isoelectric points are longing from neutral to acid pH-values.

For the different stages of development of the four examined varieties "Maxi", "Salou", "Admires" as well as "Montano" modifications of the protein and allergen spectra are observed. An increase of the allergen potency during the process of maturation merely evocates in the variety "Montano". Concerning sort influence on the allergenicity comparative investigations of these green bean varieties also confirm a raised allergenic potency of the variety "Montano".

Analogous to the results of the green pea the green bean allergens show very high stability to deep-freezing storage with - 20 or - 80 °C. According to drying, autoclaving, and microwave irradiation considerable allergenicity remains. While compared to the green pea an insignificantly decreasing stability is stated.

The In-vitro-digestion shows only minimal influence due to low pH-values as well as high allergen stabilities during the simulated stomach digestion and medium stability in the case of intestine conditions.

Summarizing to one another both, the allergen spectra and the IgE binding ability of green pea and green bean allergens show strong similarities (see also, tab. 6.1) as well as parallels to other legumes.

tab. 6.1: Overview of the results of the different technological procedures

	green pea		green bean	
parameter	chapter	stability	chapter	stability
storage at - 20 °C	4.1.5	+++	4.2.5	+++
storage at - 80 °C	4.1.5	+++	4.2.5	+++
drying	4.1.6	++	4.2.6	++
autoclaving	4.1.7	++	4.2.7	+
microwave irradiation	4.1.8	++	4.2.8	++
acid treatment	4.1.9	++	4.2.9	++
stomach digestion	4.1.9	+	4.2.9	++
intestine digestion	4.1.9	-	4.2.9	+

legend:

- : minor stability
+ : medium stability
++ : high stability
+++ : very high stability

7 Anhang

7.1 Gewinnung der Patientenseren

- Entnahme von 10 ml Blut der jeweiligen Probanden mittels Serumröhrchen
- Blut unter Umschwenken ca. 30 min abkühlen lassen
- Zentrifugation für 10 min bei 4 °C und 3000 g
- überstehendes Serum in Tubes überführen
- Lagerung der Seren bei - 80 °C

7.2 Charakterisierung der Patientenseren

Tab. 7.1 (1/2): Patientenseren

Nr. - Patient	Jhg - Geschl.	Symp-tome*	Gartenerbse		Gartenbohne	
			IgE [U/ml] - EAST-Kl.	Allergenbanden im IB [kDa]	IgE [U/ml] - EAST-Kl.	Allergenbanden im IB [kDa]
1 - CF	60 - ♀	5/6	0.88 - 2	14, 16, 18, 20, 25, 28, 30, 32, 37, 50, 66, 75	0.62 - 1	< 14, 14, 16, 19, 25, 29, 31, 67
2 - NB	78 - ♀	1/3/5	2.67 - 2	16, 18, 20, 25, 30, 37, 40, 45, 50, 66, 75	1.90 - 2	29, 31, 48, 55
3 - CG	70 - ♀	3/4/5	1.05 - 2	20, 25, 28, 30, 32, 37, 40, 45, 66, 75	2.13 - 2	29, 31, 38, 48, 55, 75
4 - KDH	54 - ♂	3/6	19.84 - 4	< 14, 14, 16, 18, 20, 22, 25, 28, 32, 37, 45, 50, 66, 75	22.49 - 4	16, 19, 25, 29, 31, 38, 48, 55, 67, 75
5 - HK	66 - ♀	1/3/4	1.36 - 2	20, 25, 28, 30, 40, 45, 66, 75	0.92 - 2	16, 42, 48, 55
6 - RK	85 - ♂	5/7/8	1.01 - 2	14, 20, 25, 28, 30, 32, 37, 40, 45, 50, 66, 75	0.76 - 2	14, 19, 25, 29, 31, 38, 48, 55, 67, 75
7 - KL	42 - ♂	3/5	3.02 - 2	< 14, 16, 18, 20, 30, 32, 37, 40, 45, 50, 66, 75	2.39 - 2	< 14, 16, 25, 29, 31, 38, 42, 48, 55
8 - CL	70 - ♀	1/5/6	1.40 - 2	16, 18, 20, 30, 32, 37, 40, 50, 66, 75	2.68 - 2	19, 31, 38, 48, 55, 67
9 - EP	69 - ♀	5/6/7	1.10 - 2	20, 25, 28, 30, 32, 37, 40, 66, 75	4.60 - 3	16, 19, 29, 31, 38, 48, 55, 67, 75
10 - FR	54 - ♂	1/3	5.20 - 3	18, 20, 22, 32, 40, 66, 75	21.97 - 4	14, 16, 19, 21, 29, 31, 42, 48, 55, 67, 75
11 - FS	67 - ♂	1/2/7/8	3.04 - 2	14, 16, 18, 20, 22, 28, 30, 32, 66	2.21 - 2	14, 16, 21, 29, 31, 38, 55, 67, 75
12 - HS	44 - ♀	5/6	2.74 - 2	14,18, 20, 25, 32, 40, 50, 66, 75	3.99 - 3	25, 31, 48, 55, 67, 75
13 - SW	65 - ♂	1/2/3/6	0.85 - 2	14, 30, 37, 66, 75	2.35 - 2	14, 16, 19, 25, 29, 31, 38, 48, 55, 67
14 - UW	41 - ♀	5	5.07 - 3	20, 25, 28, 30, 32, 37, 45, 50, 66, 75	0.97 - 2	29, 31, 42, 48, 55

Tab. 7.1 (2/2): Patientenseren

Nr. - Patient	Jhg - Geschl.	Symp-tome*	Gartenerbse		Gartenbohne	
			IgE [U/ml] - EAST-Kl.	Allergenbanden im IB [kDa]	IgE [U/ml] - EAST-Kl.	Allergenbanden im IB [kDa]
15 - JW	44 - ♂	1/2/3	2.12 - 2	14, 20, 25, 28, 30, 32, 37, 40, 45, 50, 66, 75	2.90 - 2	14, 16, 19, 29, 31, 38, 48, 55
16 - HR	38 - ♂	1/3/6	0.69 - 1	25, 28, 30, 40	2.17 - 2	14, 16, 21, 25, 29, 31, 38, 48, 55, 67, 75
17 - IS	63 - ♀	1/3/5	0.69 - 1	28, 30, 37	5.13 - 3	29, 31, 42, 48, 55, 67, 75
18 - MS	86 - ♂	1/2/7	0.36 - 1	40	0.52 - 1	14, 19, 25, 29, 31, 38, 42
19 - HM	44 - ♂	1/3/5/7	0.51 - 1	16, 20, 25, 28, 32, 40	0.41 - 1	31, 42
20 - LS	72 - ♂	2	0.35 - 1	22, 30, 32, 40	0.36 - 1	14, 29, 38, 67
21 - SK	50 - ♀	3/4/5/6	0.43 - 1	20, 25, 28, 40	0.51 - 1	38
22 - LB	37 - ♂	3/5/7	0.55 - 1	14, 20, 28, 30,32, 37, 40	0.60 - 1	38, 48
23 - RD	65 - ♂	5	0.44 -1	14, 18, 25, 30, 32, 37, 40	0.41 - 1	31, 38, 42, 48, 55
24 - EH	34 - ♀	5	0.44 - 1	20, 25, 28, 40	0.55 - 1	16, 31, 48, 55
25 - IO	72 - ♀	1/3	0.41 - 1	20, 22, 25, 30, 32, 37	0.51 - 1	31, 38, 48, 55
26 - UR	67 - ♀	k. A.	0.52 - 1	22, 25, 28, 40	0.37 - 1	29, 42, 48, 55
27 - PK	51 - ♂	k. A.	0.66 - 1	16, 18, 20, 22, 37	0.42 - 1	21, 38, 42, 67
28 - BW	59 - ♀	5	0.35 - 1	16, 25, 40	0.33 - 1	31, 48
29 - MW	72 - ♂	k. A.	0.39 - 1	20, 28, 37, 40	0.66 - 1	67
30 - SH	68 - ♂	k. A.	0.40 - 1	25, 32, 37	0.52 - 1	31, 48, 38, 67
31 - JMA	77 - ♂	k. A.	0.42 - 1	20, 30, 37	0.39 - 1	19, 67
32 - SB	87 - ♂	k. A.	0.68 - 1	< 14, 20, 22, 28, 30, 32, 37	0.41 - 1	48, 67
33 - IC	83 - ♀	k. A.	0.66 - 1	37, 40	0.39 - 1	31, 42, 48, 55
34 - AD	71 - ♂	k. A.	0.38 - 1	25, 28, 40	0.36 - 1	55, 67
35 - JHE	87 - ♂	k. A.	0.65 - 1	22, 25, 28, 40, 66, 75	0.62 - 1	67
36 - JK	69 - ♂	k. A.	0.66 - 1	14, 32, 45, 50, 66, 75	0.66 - 1	42, 48, 67
37 - EK	39 - ♀	k. A.	0.40 - 1	20, 30, 40, 66	0.55 - 1	42, 48, 55
38 - PE	76 - ♂	k. A.	0 50 - 1	28, 30, 40, 45, 50	0.51 - 1	42, 48, 67
39 - DS	87 - ♂	k. A.	0.39 - 1	28, 37, 40	0.50 - 1	14, 21, 25, 38,42, 55
K - SL	72 - ♂	-	0.02 - 0	-	0.01 - 0	-

* Legende:

k. A.	keine Angaben
1	Juckreiz, Kribbeln, Schwellungen im Bereich der Lippen sowie der Mundschleimhaut
2	Schluckbeschwerden, Schwellungen des Zäpfchens und/oder des Rachenbereiches
3	Rötung, Juckreiz, Ekzeme der Haut
4	Nesselsucht (Urtikaria)
5	Augentränen, -rötungen, -brennen, Niesreiz, Fließschnupfen, verstopfte Nase
6	Anfallsweise Atemnot, pfeifendes Atemgeräusch, Asthma
7	Übelkeit, Erbrechen, Magen- und/oder Bauchkrämpfe, Blähungen, Durchfall
8	Schwindel, Kreislaufstörungen, Blutdruckabfall

7.3 Proteinextraktionen

7.3.1 Tieftemperaturextraktion (TTE)

Durchführung nach CLEMENTS (1965) modifiziert nach VIETHS et al. (1992b)

verwendete Lösungen:

Aceton/Diethylether-Gemisch:	T: - 80 °C c: 1:1 (v:v)	• 125 ml Aceton • 125 ml Diethylether
PBS-Lösung:	pH: 7.4 c(NaCl): 0.15 M c(KCl): 0.0027 M c(K_2HPO_4): 0.01 M	• Puffertablette in bidest. Wasser lösen • mit bidest. Wasser ad 200 ml

Durchführung:

- 700 ml Aceton, 100 ml Aceton/Diethylether-Gemisch und 1 Stahlbecherglas über Nacht bei - 80 °C kühlen
- 150 ml des gekühlten Acetons und 30 g des Untersuchungsmaterials in vorgekühltes Stahlbecherglas geben und auf < - 40 °C abkühlen lassen
- Gemisch mit Ultra-Turrax im Stahlbecherglas homogenisieren
- Homogenat mittels Aceton (T < - 40 °C) quantitativ in 1000-ml-Glasflasche überführen
- Homogenat über Nacht in Tiefkühltruhe bei - 80 °C äquilibrieren lassen
- Homogenat über Büchnertrichter filtrieren
- Filterrückstand 3 x mit jeweils 80 ml Aceton (T = - 80 °C) waschen
- Filterrückstand 3 x mit jeweils 80 ml Aceton/Diethylether-Gemisch (1:1, v:v; T = - 80 °C) waschen
- Rückstand trockensaugen, Filtrat verwerfen
- Rückstand in Rundkolben überführen, 3 h bei - 80 °C kühlen und über Nacht lyophilisieren
- Lyophilisat (= Acetonpulver) im Achatmörser fein zerreiben (bei – 20 °C ohne Allergenitätsverlust lagerfähig)
- 1.8 g Acetonpulver in einem Becherglas mit 30 ml PBS-Lösung versetzen
- erhaltene Suspension unter Eiskühlung 1 h mittels Magnetrührer vermischen
- Suspension 1 h bei 4 °C und 10500 g zentrifugieren
- Lösung filtrieren und je 2 ml des Filtrats in 4-ml-Vials überführen
- Lösungen 3 h bei - 80 °C tiefgefrieren und anschließend lyophilisieren
- Lyophilisat (= PBS-Extrakt) für jeweilige Untersuchungen einsetzen bzw. bei - 20 °C lagern

7.3.2 Fraktionierte Extraktion (FE)

modifizierte Durchführung nach VIOQUE et al. (1999)

verwendete Lösungen:

Borat-Puffer:	pH :8.3 c(Borat): 0.1 M c(NaOH): 0.1 M c(HCl): 0.1 M	• 2.474 g Borsäure • 0.80 g Natriumhydroxid • 1.67 ml Salzsäure 37 %ig • mit bidest. Wasser ad 100 ml
Citrat-Puffer:	pH: 4.6 c(Natriumcitrat): 0.1 M c(NaOH): 0.1 M c(HCl): 0.1 M	• 23.95 g Na-Citrat • 2 H_2O • 8.0 g Natriumhydroxid • 1.67 ml Salzsäure 37 %ig • mit bidest. Wasser ad 100 ml

Durchführung:

- 25 g Leguminosensamen mittels handelsüblichem Mixer fein vermahlen
- insgesamt 3 mal:
  - vermahlenes Leguminosenmehl in einem Becherglas mit 25 ml Borat-Puffer versetzen
  - erhaltene Suspension bei 4 °C 1 h mittels Magnetrührer vermischen
  - Suspension 1 h bei 4 °C und 8000 g zentrifugieren
  - überstehende Lösung abnehmen
- abgenommene Lösungen vereinigen

- Rückstand über Büchnertrichter trocknen
- getrockneten Rückstand in Rundkolben überführen 3 h bei - 80 °C tiefgefrieren und anschließend lyophilisieren (= Gluteline)

- 4 ml des vereinigten Überstandes für 48 h bei 4 °C gegen Citrat-Puffer dialysieren
- dialysierte Lösung für 1 h bei 4 °C 1 h 8000 g zentrifugieren
- überstehende Lösung abnehmen, 3 h bei - 80 °C tiefgefrieren und anschließend lyophilisieren (= Albumine)

- verbleibenden Bodensatz ebenfalls 3 h bei - 80 °C tiefgefrieren und anschließend lyophilisieren (= Globuline)
- Lyophilisate für jeweilige Untersuchungen einsetzen bzw. bei - 20 °C lagern

7.3.3 In-vitro-Verdauungsextraktion (IVE)

verwendete Lösungen:

PBS-Lösung: pH: 7.4
c(NaCl): 0.15 M
c(KCl): 0.0027 M
c(K_2HPO_4): 0.01 M

- Puffertablette in bidest. Wasser lösen
- mit bidest. Wasser ad 200 ml

Durchführung:

- 250 g Gartenerbsensamen bzw. Gartenbohnenfrüchte mittels handelsüblichem Mixer grob zerkleinern
- vermahlenes Leguminosenmehl in einem Becherglas mit 750 ml PBS-Lösung versetzen
- erhaltene Suspension bei 37 °C 1 h mittels Magnetrührer vermischen
- Suspension 30 min bei 4 °C und 8000 g zentrifugieren
- 2 ml der überstehenden Lösung abnehmen und in 4-ml-Vials überführen
- Lösungen 3 h bei - 80 °C abkühlen lassen und über Nacht lyophilisieren
- Lyophilisat für jeweilige Untersuchungen einsetzen bzw. bei - 20 °C lagern

7.4 Trockenmassebestimmung

Durchführung nach § 35 LMBG i. V. m. ASU Nr. L 06.00-3
(LEBENMITTELRECHT: LMBG, 2002)

Durchführung:

- Aluminiumschale mit Glasstab und ca. 30 g Seesand versehen
- Aluminiumschale für 4 h im Trockenschrank bei 103 ± 2 °C trocknen
- Aluminiumschale im Exsikkator auf Raumtemperatur abkühlen lassen und anschließend einwiegen
- ca. 3 g Probe einwiegen und mittels Glasstab gleichmäßig mit dem Seesand verreiben
- Aluminiumschale für 2 h im Trockenschrank bei 103 ± 2 °C trocknen, anschließend im Exsikkator abkühlen lassen und auswiegen
- Aluminumschale erneut bei 103 ± 2 °C für 2 h trocknen, anschließend wieder im Exsikkator abkühlen lassen und auswiegen

Auswertung:

$$Trockenmasse\ [\%] = \frac{Auswaage\ [g]}{Einwaage\ [g]} \bullet 100\ \%$$

$$Wassergehalt\ [\%] = 100\ \% - Trockenmasse\ [\%]$$

7.5 Gesamtstickstoffbestimmung

Durchführung nach § 35 LMBG i. V. m. ASU Nr. L 06.00-7
(LEBENMITTELRECHT: LMBG, 2002)

verwendete Lösungen:

Borsäure-Lösung:	c(Borsäure): 4 % (g:v)	• 40 g Borsäure • mit dest. Wasser ad 1 l
Natronlauge:	c(NaOH): 35 % (g:v)	• 1850 g Natriumhydroxid • mit dest. Wasser ad 5 l
Salzsäure:	c(HCl): 0.1 M	• 100 ml Titrisol-Maßlösung mit dest. Wasser quantitativ überführen • mit dest. Wasser ad 1 l
Tashiro-Indikator:	c(Methylrot): 0.026 % (g:v) c(Methylenblau): 0.013 % (g:v)	• 60 mg Methylrot in 200 ml Ethanol • 30 mg Methylenblau in 30 ml dest. Wasser • beide Lösungen vereinigen

Durchführung:

1. Aufschluss

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

2. Destillation

- Destillationsapparatur (Vapodest 12) gemäß Betriebsanweisung vorbereiten
- Vorlage mit 50 ml 4 %iger Borsäure-Lösung und einigen Tropfen Tashiro-Indikator befüllen und in Destillationsapparatur einsetzen
- Natronlauge vorsichtig zugeben
- Lösung 9 min destillieren

3. Titration

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

Auswertung:

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

$$Gesamtproteingehalt\ [\%] = \frac{(a-b) \bullet F \bullet 1.4008 \bullet U}{E \bullet 10}$$

a: Verbrauch der Salzsäure-Maßlösung (0.1 M) im Hauptversuch in ml
b: Verbrauch der Salzsäure-Maßlösung (0.1 M) im Blindversuch in ml
F: Titer der Maßlösung (t: 1.0000)
1.4008: 1 ml Salzsäure-Maßlösung (0.1 ml) entspricht 1.4008 mg Stickstoff
U: Umrechnungsfaktor zur Berechnung des Proteingehaltes (für Leguminosen: 6.25)
E: Probeneinwaage in g

7.6 Proteingehaltsbestimmung

Durchführung nach BRADFORD (1976)

verwendete Lösungen:

Lösung I:		• 10 ml Ethanol (96 %ig) • 20 ml Phosphorsäure (88 %ig) • 35 mg Coomassie Serva Blue G
Lösung II:	T: 20 °C unter Lichtausschluss lagern	• 3 ml Lösung I • 3 ml Phosphorsäure (88 %ig) • 1.5 ml Ethanol (96 %ig) • 42.5 ml bidest. Wasser
Stammlösung (SL):	c(BSA): 400 µg/ml	• 20 mg BSA mit bidest ad 50 ml
Standardlösungen:	c(BSA): 300 µg/ml	• 15 ml SL mit bidest. Wasser ad 20 ml
	c(BSA): 200 µg/ml	• 10 ml SL mit bidest. Wasser ad 20 ml
	c(BSA): 100 µg/ml	• 5 ml SL mit bidest. Wasser ad 20 ml
	c(BSA): 50 µg/ml	• 2.5 ml SL mit bidest. Wasser ad 20 ml
	c(BSA): 20 µg/ml	• 1 ml SL mit bidest. Wasser ad 20 ml
	c(BSA): 10 µg/ml	• 0.5 ml SL mit bidest. Wasser ad 20 ml
	c(BSA): 7.5 µg/ml	• 0.375 ml SL mit bidest. Wasser ad 20 ml
	c(BSA): 5.0 µg/ml	• 0.25 ml SL mit bidest. Wasser ad 20 ml
	c(BSA): 2.0 µg/ml	• 0.1 ml SL mit bidest. Wasser ad 20 ml

Durchführung:

- PBS-Probenextrakt mit bidest. Wasser rekonstituieren und 50 µl der Lösung direkt bzw. bei Bedarf verdünnt zur Messung einsetzen
- 50 µl jedes Standards in je eine Kavität einer Mikrotiterplatte pipettieren
- 50 µl PBS-Lösung als Blindwert in eine Kavität der Mikrotiterplatte pipettieren
- jeweils 200 µl Lösung II hinzufügen
- Mikrotiterplatte im ELISA-Reader 10 s schütteln
- nach exakt 5 min bei 590 nm im ELISA-Reader gegen den Blindwert vermessen

Auswertung:

Die Auswertung erfolgt über eine Kalibrierreihe mittels linearer Regression.

Ergebnisse Gartenerbse:

Tab. 7.2 (1/3): Proteingehalte der eingesetzten Gartenerbsenextrakte

Kapitel	Abb.	Nr.	Extrakt	Proteingehalt [µg/ml]
4.1.1	4.4	1 + 2	Gesamtextrakt „Maxigolt“, IEF	172
4.1.1	4.4	3 + 4	Gesamtextrakt „Maxigolt“, SDS-PAGE	296
4.1.2	4.5	1 + 5	Gesamtextrakt „Maxigolt“, Reifungsstufe 1	345
4.1.2	4.5	2 + 6	Gesamtextrakt „Maxigolt“, Reifungsstufe 2	299
4.1.2	4.5	3 + 7	Gesamtextrakt „Maxigolt“, Reifungsstufe 3	346
4.1.2	4.5	4 + 8	Gesamtextrakt „Maxigolt“, Reifungsstufe 4	316
4.1.2	4.6	1 + 13	Glutelin-Fraktion „Maxigolt“, Reifungsstufe 1	425
4.1.2	4.6	2 + 14	Glutelin-Fraktion „Maxigolt“, Reifungsstufe 2	315
4.1.2	4.6	3 + 15	Glutelin-Fraktion „Maxigolt“, Reifungsstufe 3	299
4.1.2	4.6	4 + 16	Glutelin-Fraktion „Maxigolt“, Reifungsstufe 4	388
4.1.2	4.6	5 + 17	Globulin-Fraktion „Maxigolt“, Reifungsstufe 1	162
4.1.2	4.6	6 + 18	Globulin-Fraktion „Maxigolt“, Reifungsstufe 2	392
4.1.2	4.6	7 + 19	Globulin-Fraktion „Maxigolt“, Reifungsstufe 3	365
4.1.2	4.6	8 + 20	Globulin-Fraktion „Maxigolt“, Reifungsstufe 4	109
4.1.2	4.6	9 + 21	Albumin-Fraktion „Maxigolt“, Reifungsstufe 1	214
4.1.2	4.6	10 + 22	Albumin-Fraktion „Maxigolt“, Reifungsstufe 2	361
4.1.2	4.6	11 + 23	Albumin-Fraktion „Maxigolt“, Reifungsstufe 3	300
4.1.2	4.6	12 + 24	Albumin-Fraktion „Maxigolt“, Reifungsstufe 4	361
4.1.3	4.7	1 + 6	Gesamtextrakt „Kleine Rheinländerin“	318
4.1.3	4.7	2 + 7	Gesamtextrakt „Allerfrüheste Mai“	356
4.1.3	4.7	3 + 8	Gesamtextrakt „Maxigolt“	296
4.1.3	4.7	4 + 9	Gesamtextrakt „Sprinter“	298
4.1.3	4.7	5 + 10	Gesamtextrakt „Wunder von Kelvedon“	312
4.1.4	4.8 + 4.9	N	native Gartenerbse, Maxigolt	293
4.1.4	4.8 + 4.9	1	Schälerbse, grün, glutenfrei	253
4.1.4	4.8 + 4.9	2	Schälerbse, grün, glutenfrei	259
4.1.4	4.8 + 4.9	3	Schälerbse, grün, glutenfrei	197
4.1.4	4.8 + 4.9	4	Schälerbse, gelb, glutenfrei	402
4.1.4	4.8 + 4.9	5	Schälerbse, gelb, glutenfrei	248
4.1.4	4.8 + 4.9	6	Schälerbse, gelb, glutenfrei	383
4.1.4	4.8 + 4.9	7	Junge Erbsen, Les Primeurs	297
4.1.4	4.8 + 4.9	8	Junge Erbsen, Les Primeurs	252
4.1.4	4.8 + 4.9	9	Junge Erbsen, Les Primeurs	259
4.1.4	4.8 + 4.9	10	Erbsen, extra zart	278
4.1.4	4.8 + 4.9	11	Erbsen, extra zart	280
4.1.4	4.8 + 4.9	12	Erbsen, extra zart	299
4.1.4	4.8 + 4.9	13	Junge Erbsen, extra fein (Zutaten: Wasser, Salz, Zitronensäure)	224
4.1.4	4.8 + 4.9	14	Junge Erbsen, extra fein (Zutaten: Wasser, Salz, Zitronensäure)	280
4.1.4	4.8 + 4.9	15	Junge Erbsen, extra fein	268
4.1.4	4.8 + 4.9	16	Erbsen, sehr fein (Zutaten: Wasser, Zucker, Salz)	210
4.1.4	4.8 + 4.9	17	Erbsen, sehr fein (Zutaten: Wasser, Zucker, Salz)	300
4.1.4	4.8 + 4.9	18	Erbsen, sehr fein	246

Tab. 7.2 (2/3): Proteingehalte der eingesetzten Gartenerbsenextrakte

Kapitel	Abb.	Nr.	Extrakt	Proteingehalt [µg/ml]
4.1.5	4.10	1 + 11	Gesamtextrakt „Maxigolt“, LV-E-0-20	275
4.1.5	4.10	2 + 12	Gesamtextrakt „Maxigolt“, LV-E-4-20	387
4.1.5	4.10	3 + 13	Gesamtextrakt „Maxigolt“, LV-E-12-20	358
4.1.5	4.10	4 + 14	Gesamtextrakt „Maxigolt“, LV-E-20-20	336
4.1.5	4.10	5 + 15	Gesamtextrakt „Maxigolt“, LV-E-28-20	368
4.1.5	4.10	6 + 16	Gesamtextrakt „Maxigolt“, LV-E-36-20	366
4.1.5	4.10	7 + 17	Gesamtextrakt „Maxigolt“, LV-E-44-20	372
4.1.5	4.10	8 + 18	Gesamtextrakt „Maxigolt“, LV-E-52-20	262
4.1.5	4.10	9 + 19	Gesamtextrakt „Maxigolt“, LV-E-60-20	248
4.1.5	4.10	10 + 20	Gesamtextrakt „Maxigolt“, LV-E-68-20	305
4.1.5	4.11	1 + 11	Gesamtextrakt „Maxigolt“, LV-E-0-80	299
4.1.5	4.11	2 + 12	Gesamtextrakt „Maxigolt“, LV-E-4-80	362
4.1.5	4.11	3 + 13	Gesamtextrakt „Maxigolt“, LV-E-12-80	366
4.1.5	4.11	4 + 14	Gesamtextrakt „Maxigolt“, LV-E-20-80	367
4.1.5	4.11	5 + 15	Gesamtextrakt „Maxigolt“, LV-E-28-80	337
4.1.5	4.11	6 + 16	Gesamtextrakt „Maxigolt“, LV-E-36-80	318
4.1.5	4.11	7 + 17	Gesamtextrakt „Maxigolt“, LV-E-44-80	386
4.1.5	4.11	8 + 18	Gesamtextrakt „Maxigolt“, LV-E-52-80	285
4.1.5	4.11	9 + 19	Gesamtextrakt „Maxigolt“, LV-E-60-80	303
4.1.5	4.11	10 + 20	Gesamtextrakt „Maxigolt“, LV-E-68-80	355
4.1.6	4.13	1 + 12	Gesamtextrakt „Maxigolt“, TV-E-0	299
4.1.6	4.13	2 + 13	Gesamtextrakt „Maxigolt“, TV-E-0.5	304
4.1.6	4.13	3 + 14	Gesamtextrakt „Maxigolt“, TV-E-1.0	345
4.1.6	4.13	4 + 15	Gesamtextrakt „Maxigolt“, TV-E-2.0	325
4.1.6	4.13	5 + 16	Gesamtextrakt „Maxigolt“, TV-E-4.0	315
4.1.6	4.13	6 + 17	Gesamtextrakt „Maxigolt“, TV-E-8.0	229
4.1.6	4.13	7 + 18	Gesamtextrakt „Maxigolt“, TV-E-9.0	338
4.1.6	4.13	8 + 19	Gesamtextrakt „Maxigolt“, TV-E-10.0	337
4.1.6	4.13	9 + 20	Gesamtextrakt „Maxigolt“, TV-E-14.0	290
4.1.6	4.13	10 + 21	Gesamtextrakt „Maxigolt“, TV-E-19.0	328
4.1.6	4.13	11 + 22	Gesamtextrakt „Maxigolt“, TV-E-24.0	325
4.1.7	4.14 + 4.15	1	Gesamtextrakt „Maxigolt“, AV-E-0-0	314
4.1.7	4.14 + 4.15	2	Gesamtextrakt „Maxigolt“, AV-E-60-20	344
4.1.7	4.14 + 4.15	3	Gesamtextrakt „Maxigolt“, AV-E-60-40	309
4.1.7	4.14 + 4.15	4	Gesamtextrakt „Maxigolt“, AV-E-60-60	316
4.1.7	4.14 + 4.15	5	Gesamtextrakt „Maxigolt“, AV-E-85-20	286
4.1.7	4.14 + 4.15	6	Gesamtextrakt „Maxigolt“, AV-E-85-40	347
4.1.7	4.14 + 4.15	7	Gesamtextrakt „Maxigolt“, AV-E-85-60	353
4.1.7	4.14 + 4.15	8	Gesamtextrakt „Maxigolt“, AV-E-100-20	347
4.1.7	4.14 + 4.15	9	Gesamtextrakt „Maxigolt“, AV-E-100-40	333
4.1.7	4.14 + 4.15	10	Gesamtextrakt „Maxigolt“, AV-E-100-60	308
4.1.7	4.14 + 4.15	11	Gesamtextrakt „Maxigolt“, AV-E-121-20	258
4.1.7	4.14 + 4.15	12	Gesamtextrakt „Maxigolt“, AV-E-121-40	301
4.1.7	4.14 + 4.15	13	Gesamtextrakt „Maxigolt“, AV-E-121-60	257
4.1.7	4.14 + 4.15	14	Gesamtextrakt „Maxigolt“, AV-E-140-20	267
4.1.7	4.14 + 4.15	15	Gesamtextrakt „Maxigolt“, AV-E-140-40	252
4.1.7	4.14 + 4.15	16	Gesamtextrakt „Maxigolt“, AV-E-140-60	297

Tab. 7.2 (3/3): Proteingehalte der eingesetzten Gartenerbsenextrakte

Kapitel	Abb.	Nr.	Extrakt	Proteingehalt [µg/ml]
4.1.8	4.16	1 + 10	Gesamtextrakt „Maxigolt“, MW-E-N	334
4.1.8	4.16	2 + 11	Gesamtextrakt „Maxigolt“, MW-E-1	355
4.1.8	4.16	3 + 12	Gesamtextrakt „Maxigolt“, MW-E-2	273
4.1.8	4.16	4 + 13	Gesamtextrakt „Maxigolt“, MW-E-3	317
4.1.8	4.16	5 + 14	Gesamtextrakt „Maxigolt“, MW-E-4	288
4.1.8	4.16	6 + 15	Gesamtextrakt „Maxigolt“, MW-E-5	232
4.1.8	4.16	7 + 16	Gesamtextrakt „Maxigolt“, MW-E-6	355
4.1.8	4.16	8 + 17	Gesamtextrakt „Maxigolt“, MW-E-7	272
4.1.8	4.16	9 + 18	Gesamtextrakt „Maxigolt“, MW-E-8	293
4.1.8	4.16	10 + 19	Gesamtextrakt „Maxigolt“, MW-E-9	296
4.1.9	4.17	N	In-vitro-Extrakt „Maxigolt“, MV-E-N	307
4.1.9	4.17	1 + 9	In-vitro-Extrakt „Maxigolt“, MV-E-pH-120	356
4.1.9	4.17	2 + 10	In-vitro-Extrakt „Maxigolt“, MV-E-pH-180	312
4.1.9	4.17	3 + 11	In-vitro-Extrakt „Maxigolt“, MV-E-pH-240	341
4.1.9	4.17	4 + 12	In-vitro-Extrakt „Maxigolt“, MV-E-Pep-1	353
4.1.9	4.17	5 + 13	In-vitro-Extrakt „Maxigolt“, MV-E-Pep-2	357
4.1.9	4.17	6 + 14	In-vitro-Extrakt „Maxigolt“, MV-E-Pep-3	282
4.1.9	4.17	7 + 15	In-vitro-Extrakt „Maxigolt“, MV-E-Pep-4	302
4.1.9	4.17	8 + 16	In-vitro-Extrakt „Maxigolt“, MV-E-Pep-5	374
4.1.9	4.17	Pep	Pepsin-Lösung	103
4.1.9	4.18	N	In-vitro-Extrakt „Maxigolt“, DV-E-Pep-1	353
4.1.9	4.18	1 + 8	In-vitro-Extrakt „Maxigolt“, DV-E-Pep-1 + Try-4	364
4.1.9	4.18	2 + 9	In-vitro-Extrakt „Maxigolt“, DV-E-Pep-1 + Try-4 + Chy-4	159
4.1.9	4.18	3 + 10	In-vitro-Extrakt „Maxigolt“, DV-E-Pep-1 + Try-4 + Chy-4 + Car-3	154
4.1.9	4.18	4 + 11	In-vitro-Extrakt „Maxigolt“, DV-E-Pep-1 + Pan-0.9	382
4.1.9	4.18	5 + 12	In-vitro-Extrakt „Maxigolt“, DV-E-Pro-2	389
4.1.9	4.18	Try	Trypsin-Lösung	204
4.1.9	4.18	Chy	α-Chymotrypsin-Lösung	108
4.1.9	4.18	Car	Carboxypeptidase A-Lösung	145
4.1.9	4.18	Pan	Pankreatin-Lösung	389
4.1.9	4.18	Pro	Proteinase K-Lösung	245

Ergebnisse Gartenbohne:

Tab. 7.3 (1/3): Proteingehalte der eingesetzten Gartenbohnenextrakte

Kapitel	Abb.	Nr.	Extrakt	Proteingehalt [µg/ml]
4.2.1	4.30	1 + 2	Gesamtextrakt „Maxi“, IEF	165
4.2.1	4.30	3 + 6	Gesamtextrakt „Maxi“, SDS-PAGE	296
4.2.1	4.30	4 + 7	Gesamtextrakt Samen „Maxi“, SDS-PAGE	275
4.2.1	4.30	5 + 8	Gesamtextrakt Hülse „Maxi“, SDS-PAGE	246
4.2.2	4.31	1 + 11	Gesamtextrakt „Montano“, Reifungsstufe 1	442
4.2.2	4.31	2 + 12	Gesamtextrakt „Montano“, Reifungsstufe 2	463
4.2.2	4.31	3 + 13	Gesamtextrakt „Montano“, Reifungsstufe 3	421
4.2.2	4.31	4 + 14	Gesamtextrakt „Montano“, Reifungsstufe 4	410
4.2.2	4.31	5 + 15	Gesamtextrakt „Montano“, Reifungsstufe 5	414
4.2.2	4.31	6 + 16	Gesamtextrakt „Montano“, Reifungsstufe 6	388
4.2.2	4.31	7 + 17	Gesamtextrakt „Montano“, Reifungsstufe 7	388
4.2.2	4.31	8 + 18	Gesamtextrakt „Montano“, Reifungsstufe 8	391
4.2.2	4.31	9 + 19	Gesamtextrakt „Montano“, Reifungsstufe 9	317
4.2.2	4.31	10 + 20	Gesamtextrakt „Montano“, Reifungsstufe 10	369
4.2.2	4.32	1 + 9	Gesamtextrakt „Maxi“, Reifungsstufe 1	469
4.2.2	4.32	2 + 10	Gesamtextrakt „Maxi“, Reifungsstufe 2	333
4.2.2	4.32	3 + 11	Gesamtextrakt „Maxi“, Reifungsstufe 3	302
4.2.2	4.32	4 + 12	Gesamtextrakt „Maxi“, Reifungsstufe 4	349
4.2.2	4.32	5 + 13	Gesamtextrakt „Maxi“, Reifungsstufe 5	241
4.2.2	4.32	6 + 14	Gesamtextrakt „Maxi“, Reifungsstufe 6	335
4.2.3	4.32	7 + 15	Gesamtextrakt „Maxi“, Reifungsstufe 7	383
4.2.3	4.32	8 + 16	Gesamtextrakt „Maxi“, Reifungsstufe 8	391
4.2.3	4.33	1 + 5	Gesamtextrakt „Salou“	369
4.2.3	4.33	2 + 6	Gesamtextrakt „Montano“	241
4.3.3	4.33	3 + 7	Gesamtextrakt „Admires“	323
4.2.4	4.33	4 + 8	Gesamtextrakt „Maxi“	391
4.2.4	4.8 + 4.9	N	Gesamtextrakt „Montano“	285
4.2.4	4.8 + 4.9	1	Weiße Bohne, getrocknet	369
4.2.4	4.8 + 4.9	2	Weiße Bohne, getrocknet	272
4.2.4	4.8 + 4.9	3	Weiße Bohne, getrocknet	286
4.2.4	4.8 + 4.9	4	Prinzessbohne, Les Primeurs	265
4.2.4	4.8 + 4.9	5	Prinzessbohne, Les Primeurs	362
4.2.4	4.8 + 4.9	6	Prinzessbohne, Les Primeurs	258
4.2.4	4.8 + 4.9	7	Feine junge Brechbohne (Zutaten: Wasser, Salz, Zitronensäure)	271
4.2.4	4.8 + 4.9	8	Feine junge Brechbohne (Zutaten: Wasser, Salz, Zitronensäure)	285
4.2.4	4.8 + 4.9	9	Feine junge Brechbohne	242
4.2.4	4.8 + 4.9	10	Grüne Bohne, sehr fein (Zutaten: Wasser, Salz)	210
4.2.4	4.8 + 4.9	11	Grüne Bohne, sehr fein (Zutaten: Wasser, Salz)	235
4.2.4	4.8 + 4.9	12	Grüne Bohne, sehr fein	235

Tab. 7.3 (2/3): Proteingehalte der eingesetzten Gartenbohnenextrakte

Kapitel	Abb.	Nr.	Extrakt	Proteingehalt [µg/ml]
4.2.5	4.35 + 4.36	1	Gesamtextrakt „Montano“, LV-B-0	313
4.2.5	4.35 + 4.36	2	Gesamtextrakt „Montano“, LV-B-2-20	358
4.2.5	4.35 + 4.36	3	Gesamtextrakt „Montano“, LV-B-4-20	335
4.2.5	4.35 + 4.36	4	Gesamtextrakt „Montano“, LV-B-8-20	294
4.2.5	4.35 + 4.36	5	Gesamtextrakt „Montano“, LV-B-12-20	320
4.2.5	4.35 + 4.36	6	Gesamtextrakt „Montano“, LV-B-16-20	371
4.2.5	4.35 + 4.36	7	Gesamtextrakt „Montano“, LV-B-20-20	381
4.2.5	4.35 + 4.36	8	Gesamtextrakt „Montano“, LV-B-24-20	336
4.2.5	4.35 + 4.36	9	Gesamtextrakt „Montano“, LV-B-28-20	339
4.2.5	4.35 + 4.36	10	Gesamtextrakt „Montano“, LV-B-2-80	211
4.2.5	4.35 + 4.36	11	Gesamtextrakt „Montano“, LV-B-4-80	298
4.2.5	4.35 + 4.36	12	Gesamtextrakt „Montano“, LV-B-8-80	287
4.2.5	4.35 + 4.36	13	Gesamtextrakt „Montano“, LV-B-12-80	386
4.2.5	4.35 + 4.36	14	Gesamtextrakt „Montano“, LV-B-16-80	364
4.2.5	4.35 + 4.36	15	Gesamtextrakt „Montano“, LV-B-20-80	337
4.2.5	4.35 + 4.36	16	Gesamtextrakt „Montano“, LV-B-24-80	367
4.2.5	4.35 + 4.36	17	Gesamtextrakt „Montano“, LV-B-28-80	344
4.2.6	4.37	1 + 11	Gesamtextrakt Samen „Montano“, TV-B-0	385
4.2.6	4.37	2 + 12	Gesamtextrakt Samen „Montano“, TV-B-0.5	379
4.2.6	4.37	3 + 13	Gesamtextrakt Samen „Montano“, TV-B-1.0	255
4.2.6	4.37	4 + 14	Gesamtextrakt Samen „Montano“, TV-B-2.0	242
4.2.6	4.37	5 + 15	Gesamtextrakt Samen „Montano“, TV-B-4.0	250
4.2.6	4.37	6 + 16	Gesamtextrakt Samen „Montano“, TV-B-8.0	228
4.2.6	4.37	7+ 17	Gesamtextrakt Samen „Montano“, TV-B-12.0	183
4.2.6	4.37	8 + 28	Gesamtextrakt Samen „Montano“, TV-B-16.0	206
4.2.6	4.37	9 + 19	Gesamtextrakt Samen „Montano“, TV-B-20.0	311
4.2.6	4.37	10 + 20	Gesamtextrakt Samen „Montano“, TV-B-24.0	190
4.2.7	4.38 + 4.39	1	Gesamtextrakt „Montano“, AV-B-0-0	267
4.2.7	4.38 + 4.39	2	Gesamtextrakt „Montano“, AV-B-60-20	272
4.2.7	4.38 + 4.39	3	Gesamtextrakt „Montano“, AV-B-60-40	284
4.2.7	4.38 + 4.39	4	Gesamtextrakt „Montano“, AV-B-60-60	355
4.2.7	4.38 + 4.39	5	Gesamtextrakt „Montano“, AV-B-85-20	330
4.2.7	4.38 + 4.39	6	Gesamtextrakt „Montano“, AV-B-85-40	198
4.2.7	4.38 + 4.39	7	Gesamtextrakt „Montano“, AV-B-85-60	336
4.2.7	4.38 + 4.39	8	Gesamtextrakt „Montano“, AV-B-100-20	320
4.2.7	4.38 + 4.39	9	Gesamtextrakt „Montano“, AV-B-100-40	302
4.2.7	4.38 + 4.39	10	Gesamtextrakt „Montano“, AV-B-100-60	335
4.2.7	4.38 + 4.39	11	Gesamtextrakt „Montano“, AV-B-121-20	244
4.2.7	4.38 + 4.39	12	Gesamtextrakt „Montano“, AV-B-121-40	202
4.2.7	4.38 + 4.39	13	Gesamtextrakt „Montano“, AV-B-121-60	285
4.2.7	4.38 + 4.39	14	Gesamtextrakt „Montano“, AV-B-140-20	309
4.2.7	4.38 + 4.39	15	Gesamtextrakt „Montano“, AV-B-140-40	171
4.2.7	4.38 + 4.39	16	Gesamtextrakt „Montano“, AV-B-140-60	208

Tab. 7.3 (3/3): Proteingehalte der eingesetzten Gartenbohnenextrakte

Kapitel	Abb.	Nr.	Extrakt	Proteingehalt [µg/ml]
4.2.8	4.40	N	Gesamtextrakt „Maxi“, MW-B-N	353
4.2.8	4.40	1 + 10	Gesamtextrakt „Maxi“, MW-B-1	352
4.2.8	4.40	2 + 11	Gesamtextrakt „Maxi“, MW-B-2	218
4.2.8	4.40	3 + 12	Gesamtextrakt „Maxi“, MW-B-3	231
4.2.8	4.40	4 + 13	Gesamtextrakt „Maxi“, MW-B-4	258
4.2.8	4.40	5 + 14	Gesamtextrakt „Maxi“, MW-B-5	204
4.2.8	4.40	6 + 15	Gesamtextrakt „Maxi“, MW-B-6	267
4.2.8	4.40	7 + 16	Gesamtextrakt „Maxi“, MW-B-7	311
4.2.8	4.40	8 + 17	Gesamtextrakt „Maxi“, MW-B-8	280
4.2.8	4.40	9 + 18	Gesamtextrakt „Maxi“, MW-B-9	212
4.2.9	4.41	N	In-vitro-Extrakt „Maxi“, IV-B-N	147
4.2.9	4.41	1 + 8	In-vitro-Extrakt „Maxi“, IV-B-pH-120	231
4.2.9	4.41	2 + 9	In-vitro-Extrakt „Maxi“, IV-B-Pep-1	263
4.2.9	4.41	3 + 10	In-vitro-Extrakt „Maxi“, IV-B-Pep-1 + Try-4	175
4.2.9	4.41	4 + 11	In-vitro-Extrakt „Maxi“, IV-B-Pep-1 + Try-4 + Chy-4	220
4.2.9	4.41	5 + 12	In-vitro-Extrakt „Maxi“, IV-B-Pep-1 + Try-4 + Chy-4 + Car-3	173
4.2.9	4.41	6 + 13	In-vitro-Extrakt „Maxi“, IV-B-Pep-1 + Pan-0.9	165
4.2.9	4.41	7 + 14	In-vitro-Extrakt „Maxi“, IV-B-Pro-2	251

7.7 Enzymallergosorbent-Test (EAST)

Durchführung nach CESKA & LUNDKVIST (1972) modifiziert nach MÖLLER et al. (1997b)

7.7.1 Aktivierung der Allergenscheiben

verwendete Lösungen:

Natronlauge:	c(NaOH): 1 M	• 4.0 g Natriumhydroxid • mit bidest. Wasser ad 100 ml
Natriumhydrogencarbonat-Lösung:	c($NaHCO_3$): 0.005 M	• 2.1 g Na-Hydrogencarbonat • mit bidest. Wasser ad 10 l
Natronlauge:	c(NaOH): 10 %ig	• 10.0 g NaOH • mit bidest. Wasser ad 100 ml
Natrium-Hypochlorit-Lösung:	c($NaClO_4$): 12 %ig	• 12.0 g Natriumhypochlorit • mit dest. Wasser ad 100 ml

Durchführung:

- 1-l-Dreihalskolben mit 250-ml-Tropftriter und pH-Elektrode versehen
- 15 g Bromcyan in einem Becherglas in 450 ml bidest. Wasser unter Rühren lösen (mit Atemschutzmaske unter dem Abzug arbeiten)
- 15 g Papierscheiben (ca. 5000 Stück) in einen 1-l-Dreihalskolben in 150 ml bidest. Wasser quellen lassen
- Bromcyan-Lösung zur Papierscheiben-Suspension hinzufügen
- durch Zutropfen von 1 M Natronlauge pH-Wert auf 10 bis 10.5 einstellen
- insgesamt 75 ml der 1 M Natronlauge hinzufügen, wobei der pH-Wert 11.5 nicht übersteigen darf
- Lösung über Büchnertrichter absaugen
- Papierscheiben insgesamt 12 x mit 375 ml 0.005 M Natriumhydrogencarbonat-Lösung waschen, dabei jeweils 2 min stehen lassen und anschließend Lösung absaugen
- Papierscheiben nacheinander mit folgenden Lösung waschen:
  - 2 x mit 375 ml dest. Wasser
  - 2 x mit 375 ml Aceton/dest. Wasser (25:75, v:v)
  - 2 x mit 375 ml Aceton/dest. Wasser (50:50, v:v)
  - 2 x mit 375 ml Aceton/dest. Wasser (75:25, v:v)
  - 2 x mit 375 ml Aceton
- bromcyanaktivierte Scheiben 3 h bei - 80 °C tiefgefrieren und anschließend lyophilisieren
- Papierscheiben bei - 20 °C lagern

Entsorgung der bromcyanhaltigen Abfälle:

- Bromcyan-Lösung mit 15 ml 10 %iger Natronlauge/g Bromcyan versetzen und 1 h stehen lassen
- pH-Wert auf 10 bis 11 einstellen und 50 %igen Überschuss an 12 %iger Natriumhypochlorit-Lösung zugeben
- Lösung über Nacht stehen lassen
- pH-Wert der Lösung auf 7 einstellen (Gasentwicklung) und den Überschuss an Hypochlorit mit Hydrogensulfit zerstören
- Lösung über das Abwasser entsorgen

7.7.2 Kopplung der Proteinextrakte

verwendete Lösungen:

Natriumhydrogencarbonat-Lösung:	c($NaHCO_3$): 0.5 M	• 21.0 g Natriumhydrogencarbonat • mit ca. 450 ml bidest. Wasser versetzen • pH-Wert auf 8.4 einstellen • mit bidest. Wasser ad 500 ml
Natriumhydrogencarbonat - Lösung:	c($NaHCO_3$): 0.1 M	• 4.2 g Natriumhydrogencarbonat • mit ca. 450 ml bidest. Wasser versetzen • pH-Wert auf 8.4 einstellen • mit bidest. Wasser ad 500 ml
Ethanolamin-Puffer:	c(C_2H_7NO): 0.16 M	• 5.0 ml Ethanolamin • mit ca. 450 ml bidest. Wasser versetzen • pH-Wert mit 4 M HCl auf 9.2 einstellen • mit bidest. Wasser ad 500 ml
Natriumacetat-Lösung:	c($NaCOOCH_3$): 0.1 M	• 4.2 g Natriumacetat • mit ca. 450 ml bidest. Wasser versetzen • pH-Wert mit 4 M HCl auf 4.0 einstellen • mit bidest. Wasser ad 500 ml

Durchführung:

- lyophilisierte PBS-Extrakte durch Rekonstitution in bidest. Wasser auf Proteinkonzentration von ca. 20 µg/ml einstellen
- 100 ml Extraktlösung in 250-ml-Iodzahlkolben überführen
- ca. 300 bromcyanaktiverte Scheiben (0.6 g) hinzufügen
- Lösung über Nacht mittels Magnetrührer bei 4 °C rühren
- Überstand absaugen (Wasserstrahlpumpe)
- Papierscheiben mit folgenden Lösungen waschen und anschließend Lösungen jeweils wieder absaugen
  - 1 x mit 100 ml 0.5 M $NaHCO_3$-Lösung
  - 3 x mit 100 ml 0.1 M $NaHCO_3$-Lösung
  - 2 x mit 100 ml 0.1 M Natriumacetat-Lösung
  - 2 x mit 100 ml 0.5 M $NaHCO_3$-Lösung

- Papierscheiben gründlich absaugen
- Papierscheiben mit 100 ml dest. Wasser waschen und mit dest. Wasser in 250-ml-Rundkolben überführen
- dest. Wasser gründlich absaugen
- Papierscheiben 3 h bei - 80 °C tiefgefrieren und anschließend lyophilisieren
- Papierscheiben bei - 20 °C lagern

7.7.3 EAST-Bestimmung

Durchführung entsprechend der Anweisung des verwendeten TestKits „Spez. IgE Elisa TR (RV)“ der Firma Allergopharma (Reinbek, Germany)

verwendete Lösungen:

Inkubations-Puffer:	Lösung I	• 15.6 g $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ • mit bidest. Wasser ad 1 l
	Lösung II	• 8.4 g $NaHCO_3$ • mit bidest. Wasser ad 1 l
	Lösung III	• 190 ml Lösung I • 803 ml Lösung II • pH-Wert mit 4 M HCl auf 7.4 einstellen
	Lösung IV	• 800 ml Lösung III • 3.0 g BSA • 37.22 g EDTA • 2.0 g NaN_3 • 2.0 ml Tween 20 • pH-Wert mit HCl auf 7.4 einstellen
Waschlösung:	entsprechend Testkit	• enthält Tween 20
Konjugatlösung:	entsprechend Testkit	• enthält Anti-Human-IgE
Färbetabletten:	entsprechend Testkit	• enthalten p-Nitrophenylphosphat (PNPP)
Substratlösung:	entsprechend Testkit	• enthält $MgCl_2$
Färbelösung:		• 1 Färbetablette in 5.0 ml Substratlösung
Stopplösung:	entsprechend Testkit	• enthält 1 M NaOH
Referenzallergen-scheiben:		• festphasengekoppelter Lieschgrasextrakt
Referenzseren:	Lieschgras-Kalibrierreihe	• Serum A: 0.35 U/ml (EAST-Klasse 1) • Serum B: 0.70 U/ml (EAST-Klasse 2) • Serum C: 3.50 U/ml (EAST-Klasse 3) • Serum D: 17.5 U/ml (EAST-Klasse 4)

Durchführung:

- für die Bestimmung benötigte Allergenscheiben mit einer Pinzette in je eine Kavität einer Mikrotiterplatte überführen
- Allergenscheiben mit einem Tropfen Inkubationspuffer befeuchten
- Referenzallergenscheiben (nicht mit Inkubationspuffer befeuchtet) in je eine Kavität einer Mikrotiterplatte überführen
- eine Kavität ohne Allergenscheibe belassen (Leerwert)
- jeweils 50 µl Patientenserum auf die Allergenscheiben pipettieren
- jeweils 50 µl Referenzserum auf die Referenzallergenscheiben pipettieren
- Mikrotiterplatte mit Parafilm abdecken und 1 h bei 37 °C unter Lichtausschluss inkubieren
- Scheiben 3 x mit je 250 µl Waschlösung versetzen und nach 10 min Lösung absaugen
- 50 µl Konjugatlösung in jede Kavität pipettieren
- Mikrotiterplatte mit Parafilm abdecken und über Nacht bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss inkubieren
- Scheiben 3 x mit je 250 µl Waschlösung versetzen und nach 10 min Lösung absaugen
- 100 µl Färbelösung in jede Kavität (auch Leerwert) pipettieren
- Lösungen 1 h bei 37 °C unter Lichtausschluss inkubieren
- 200 µl Stopplösung in jede Kavität pipettieren und mittels ELISA-Reader durchmischen
- 250 µl aus jeder Kavität in eine korrespondierende Kavität einer leeren Mikrotiterplatte pipettieren
- Lösungen bei 405 nm im ELISA-Reader photometrisch vermessen

Auswertung:

Die quantitative Bestimmung der Gehalte an spezifischem IgE in den Patientenseren erfolgt durch logarithmische Regression anhand der Lieschgras-Kalibrierreihe.
Die Angabe der Ergebnisse erfolgt sowohl in U/ml als auch durch Einteilung in 5 EAST-Klassen (siehe Tab. 7.4).

Tab.7.4: Einteilung der EAST-Klassen

EAST-Klasse	IgE-Gehalt [U/ml]
0	0.00 – 0.35
1	0.35 – 0.70
2	0.70 – 3.50
3	3.50 – 17.50
4	> 17.50

7.8 EAST-Inhibition

Durchführung nach VIETHS et al. (1993a) modifiziert nach MÖLLER et al. (1997b) unter Verwendung des TestKits „Spez. IgE Elisa TR (RV)“ der Firma Allergopharma (Reinbek, Germany)

verwendete Lösungen:

Allergenverdünnungs-lösung:	c(BSA): 0.3 % (g:v) c(Tween 20): 0.1 % (v:v) c(NaN_3): 0.05 % (g:v)	• 300 mg BSA • 100 µl Tween 20 • 50 mg Natriumazid • mit PBS-Lösung ad 100 ml
Ovalbuminlösung:	c(Ovalbumin): 0.1 % (g:v)	• 10 mg Ovalbumin • mit Allergenverdünnungslösung ad 10 ml
Waschlösung:	entsprechend Testkit	• enthält Tween 20 und in PBS-Lösung
Konjugatlösung:	entsprechend Testkit	• enthält Anti-Human-IgE, konjugiert mit AP
Färbetabletten:	entsprechend Testkit	• enthalten PNPP
Substratlösung:	entsprechend Testkit	• enthält $MgCl_2$
Färbelösung:		• 1 Färbetablette in 5.0 ml Substratlösung
Stopplösung:	entsprechend Testkit	• enthält 1 M NaOH
Poolserum	entsprechend Anhang 7.2	• enthält spez. IgE-Antikörper

Durchführung:

- für die Bestimmung benötigte Allergenscheiben mit einer Pinzette in je eine Kavität einer Mikrotiterplatte überführen und mit einem Tropfen Inkubationspuffer befeuchten
- anschließend folgende Lösungen auf die Allergenscheiben pipettieren
  - 50 µl unverdünnter Inhibitorextrakt und 50 µl Poolserum
  - 50 µl Inhibitorextrakt 1:10 verdünnt und 50 µl Poolserum
  - 50 µl Inhibitorextrakt 1:100 verdünnt und 50 µl Poolserum
  - 50 µl Inhibitorextrakt 1:1000 verdünnt und 50 µl Poolserum
  - 50 µl Inhibitorextrakt 1:10000 verdünnt und 50 µl Poolserum
  - 50 µl Inhibitorextrakt 1:100000 verdünnt und 50 µl Poolserum
  - 50 µl Allergenverdünnungslösung und 50 µl Patientenserum (B_o)
  - 50 µl Ovalbuminlösung und 50 µl Patientenserum (B)
  - 100 µl Allergenverdünnungslösung (NSB)
- Mikrotiterplatte mit Parafilm abdecken und 3 h bei 37 °C unter Lichtausschluss inkubieren
- Scheiben 3 x mit je 250 µl Waschlösung versetzen und nach 10 min Lösung absaugen

- 50 µl Konjugatlösung in jede Kavität pipettieren
- Mikrotiterplatte mit Parafilm abdecken und über Nacht bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss inkubieren
- Scheiben 3 x mit je 250 µl Waschlösung versetzen und nach 10 min Lösung absaugen
- 200 µl Färbelösung in jede Kavität pipettieren
- für die Bestimmung des Blindwertes 200 µl Färbelösung in eine leere Kavität pipettieren
- Lösungen 1 h bei 37 °C unter Lichtausschluss inkubieren
- 100 µl Stopplösung in jede Kavität pipettieren und mittels ELISA-Reader durchmischen
- 250 µl aus jeder Kavität in eine korrespondierende Kavität einer leeren Mikrotiterplatte pipettieren
- Lösungen bei 405 nm im ELISA-Reader photometrisch vermessen

Auswertung:

Die Berechnung der prozentualen Inhibition erfolgt mittels folgender Formel:

$$Inhibition\ [\%] = \frac{(B_0 - B)}{(B_0 - NSB)} \bullet 100$$

B_o: Messwerte ohne Inhibitorzusatz
B: Messwerte der einzelnen Inhibitionsstufen
NSB: Nichtspezifische Bindung

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

$$C_{50} - Wert\ [mg/L] = e^{\frac{y-b}{a}} \qquad \text{mit} \qquad y = a \bullet \ln(x) + b$$

y: 50 %ige Inhibition

Ergebnisse Gartenerbse:

Tab. 7.5: Reifung (Kapitel: 4.1.2, Tab. 4.1)
Festphase: „Maxigolt“, RS 4

Inhibitor	Konz. [µg/ml]	Ext. [Skt]	Inhib. [%]	C_{50} [µg/ml]
Gesamtextrakt „Maxigolt“ Reifungsstufe 1	1053.8	0.035	95	7.5
	105.38	0.044	94	
	10.538	0.121	82	
	1.0538	0.332	51	
	0.1053	0.506	26	
	0.0105	0.544	20	
Gesamtextrakt „Maxigolt“ Reifungsstufe 2	901.37	0.058	92	3.5
	90.137	0.142	79	
	9.0137	0.258	62	
	0.9014	0.458	33	
	0.0901	0.536	21	
	0.0090	0.624	8	
Gesamtextrakt „Maxigolt“ Reifungsstufe 3	1050.4	0.031	96	1.4
	105.04	0.058	92	
	10.504	0.136	80	
	1.0504	0.369	46	
	0.1050	0.485	29	
	0.0105	0.555	18	
Gesamtextrakt „Maxigolt“ Reifungsstufe 4	960.68	0.027	96	0.7
	96.068	0.034	95	
	9.6068	0.128	81	
	0.9607	0.301	56	
	0.0961	0.532	22	
	0.0096	0.545	20	
OA	989.9	0.661	-	-
B_0	-	0.679	-	-
NSB	-	0.001	-	-

Tab. 7.6 (1/3): Reifung (Kapitel: 4.1.2, Tab. 4.3)
Festphase: „Maxigolt“, RS 4

Inhibitor	Konz. [µg/ml]	Ext. [Skt]	Inhib. [%]	C_{50} [µg/ml]
Gluteline „Maxigolt“ Reifungsstufe 1	608.00	0.029	96	1.0
	60.800	0.065	91	
	6.0800	0.167	76	
	0.6080	0.393	42	
	0.0608	0.566	17	
	0.0061	0.633	7	
Globuline „Maxigolt“ Reifungsstufe 1	1078.1	0.044	94	4.8
	107.82	0.125	82	
	10.782	0.235	65	
	1.0782	0.537	21	
	0.1078	0.545	20	
	0.0108	0.603	11	
Albumine „Maxigolt“ Reifungsstufe 1	917.10	0.064	91	0.5
	91.710	0.174	74	
	9.1710	0.164	76	
	0.9171	0.282	59	
	0.0917	0.483	29	
	0.0092	0.547	19	
OA	989.9	0.661	-	-
B_0	-	0.679	-	-
NSB	-	0.001	-	-

Tab. 7.6 (2/3): Reifung (Kapitel: 4.1.2, Tab. 4.3)
Festphase: „Maxigolt“, RS 4

Inhibitor	Konz. [µg/ml]	Ext. [Skt]	Inhib. [%]	C_{50} [µg/ml]
Gluteline „Maxigolt“ Reifungsstufe 2	1053.8	0.035	96	0.9
	105.38	0.044	91	
	10.538	0.121	76	
	1.0538	0.332	42	
	0.1054	0.506	17	
	0.0105	0.544	7	
Globuline „Maxigolt“ Reifungsstufe 2	469.41	0.089	94	3.3
	46.941	0.164	82	
	4.6941	0.310	65	
	0.4694	0.501	21	
	0.0469	0.635	20	
	0.0047	0.605	11	
Albumine „Maxigolt“ Reifungsstufe 2	946.59	0.062	91	1.0
	94.659	0.094	74	
	9.4659	0.154	76	
	0.9466	0.310	59	
	0.0947	0.479	29	
	0.0095	0.561	19	
Gluteline „Maxigolt“ Reifungsstufe 3	774.86	0.035	96	0.8
	77.486	0.042	95	
	7.7486	0.125	81	
	0.7749	0.345	56	
	0.0775	0.567	22	
	0.0078	0.547	20	
Globuline „Maxigolt“ Reifungsstufe 3	901.37	0.058	92	3.5
	90.137	0.142	79	
	9.0137	0.258	62	
	0.9014	0.458	33	
	0.0901	0.536	21	
	0.0090	0.624	8	
Albumine „Maxigolt“ Reifungsstufe 3	724.57	0.059	91	0.3
	72.457	0.066	90	
	7.2457	0.127	81	
	0.7246	0.241	65	
	0.0725	0.502	26	
	0.0073	0.526	23	
Gluteline „Maxigolt“ Reifungsstufe 4	732.17	0.013	98	0.6
	73.217	0.067	90	
	7.3217	0.102	85	
	0.7322	0.322	53	
	0.0732	0.599	12	
	0.0073	0.604	11	
Globuline „Maxigolt“ Reifungsstufe 4	1175.9	0.029	96	2.0
	117.59	0.089	87	
	11.759	0.170	75	
	1.1759	0.362	47	
	0.1176	0.462	32	
	0.0118	0.537	21	
OA	989.9	0.661	-	-
B_0	-	0.679	-	-
NSB	-	0.001	-	-

Tab. 7.6 (3/3): Reifung (Kapitel: 4.1.2, Tab. 4.3)
Festphase: „Maxigolt“, RS 4

Inhibitor	Konz. [µg/ml]	Ext. [Skt]	Inhib. [%]	C_{50} [µg/ml]
Albumine „Maxigolt“ Reifungsstufe 4	822.75	0.009	99	0.2
	82.275	0.033	95	
	8.2275	0.120	82	
	0.8228	0.214	69	
	0.0823	0.411	40	
	0.0082	0.551	19	
OA	989.9	0.661	-	-
B_0	-	0.679	-	-
NSB	-	0.001	-	-

Tab. 7.7: Sortenvergleich (Kapitel: 4.1.3, Tab. 4.5),
Festphase: „Kleine Rheinländerin“

Inhibitor	Konz. [µg/ml]	Ext. [Skt]	Inhib. [%]	C_{50} [µg/ml]
Gesamtextrakt „Kleine Rheinländerin“	1114.0	0.107	88	8.2
	111.40	0.116	85	
	11.140	0.196	56	
	1.1140	0.311	14	
	0.1114	0.340	3	
	0.0111	0.348	0	
Gesamtextrakt „Allerfrüheste Mai“	980.22	0.096	92	6.8
	98.022	0.127	81	
	9.8022	0.192	57	
	0.9802	0.315	12	
	0.0980	0.320	11	
	0.0098	0.346	1	
Gesamtextrakt „Maxigolt“	1044.8	0.116	85	1.2
	104.48	0.117	84	
	10.448	0.148	73	
	1.0448	0.215	49	
	0.1045	0.308	15	
	0.0105	0.347	1	
Gesamtextrakt „Sprinter“	1006.1	0.123	82	9.2
	100.61	0.138	77	
	10.061	0.208	51	
	1.0061	0.302	17	
	0.1006	0.335	5	
	0.0101	0.345	1	
Gesamtextrakt „Wunder von Kelvedon“	1136.2	0.111	87	10.4
	113.62	0.133	79	
	11.362	0.208	51	
	1.1362	0.301	17	
	0.1136	0.313	13	
	0.0114	0.349	0	
OA	989.9	0.369	-	
B_0	-	0.349	-	
NSB	-	0.074	-	

Tab. 7.8: Sortenvergleich (Kapitel: 4.1.3, Tab. 4.5),
Festphase: „Allerfrüheste Mai“

Inhibitor	Konz. [µg/ml]	Ext. [Skt]	Inhib. [%]	C_{50} [µg/ml]
Gesamtextrakt „Kleine Rheinländerin“	1114.0	0.107	88	7.8
	111.40	0.116	81	
	11.140	0.196	57	
	1.1140	0.311	13	
	0.1114	0.340	0	
	0.0111	0.348	2	
Gesamtextrakt „Allerfrüheste Mai“	980.22	0.096	92	5.7
	98.022	0.127	78	
	9.8022	0.192	58	
	0.9802	0.315	26	
	0.0980	0.320	8	
	0.0098	0.346	16	
Gesamtextrakt „Maxigolt“	1044.8	0.116	92	10.4
	104.48	0.117	85	
	10.448	0.148	50	
	1.0448	0.215	22	
	0.1045	0.308	17	
	0.0105	0.347	7	
Gesamtextrakt „Sprinter“	1006.1	0.123	91	6.0
	100.61	0.138	82	
	10.061	0.208	55	
	1.0061	0.302	33	
	0.1006	0.335	8	
	0.0101	0.345	10	
Gesamtextrakt „Wunder von Kelvedon“	1136.2	0.111	92	7.4
	113.62	0.133	81	
	11.362	0.208	55	
	1.1362	0.301	29	
	0.1136	0.313	1	
	0.0114	0.349	5	
OA	989.9	0.421	-	-
B_0	-	0.419	-	-
NSB	-	0.075	-	-

Tab. 7.9 (1/2): Sortenvgl. (Kapitel: 4.1.3, Tab. 4.5),
Festphase: „Maxigolt“

Inhibitor	Konz. [µg/ml]	Ext. [Skt]	Inhib. [%]	C_{50} [µg/ml]
Gesamtextrakt „Kleine Rheinländerin“	1114.0	0.107	88	11.3
	111.40	0.116	81	
	11.140	0.196	50	
	1.1140	0.311	25	
	0.1114	0.340	1	
	0.0111	0.348	0	
OA	989.9	0.374	-	-
B_0	-	0.366	-	-
NSB	-	0.069	-	-

Tab. 7.9 (2/2): Sortenvgl. (Kapitel: 4.1.3, Tab. 4.5), Festphase: „Maxigolt“

Inhibitor	Konz. [µg/ml]	Ext. [Skt]	Inhib. [%]	C_{50} [µg/ml]
Gesamtextrakt „Allerfrüheste Mai“	980.22	0.096	91	4.9
	98.022	0.127	82	
	9.8022	0.192	70	
	0.9802	0.315	5	
	0.0980	0.320	1	
	0.0098	0.346	0	
Gesamtextrakt „Maxigolt“	1044.8	0.116	87	6.5
	104.48	0.117	82	
	10.448	0.148	58	
	1.0448	0.215	20	
	0.1045	0.308	19	
	0.0105	0.347	10	
Gesamtextrakt „Sprinter“	1006.1	0.123	82	9.1
	100.61	0.138	68	
	10.061	0.208	52	
	1.0061	0.302	19	
	0.1006	0.335	0	
	0.0101	0.345	2	
Gesamtextrakt „Wunder von Kelvedon“	1136.2	0.111	88	15.6
	113.62	0.133	76	
	11.362	0.208	46	
	1.1362	0.301	15	
	0.1136	0.313	7	
	0.0114	0.349	1	
OA	989.9	0.374	-	-
B_0	-	0.366	-	-
NSB	-	0.069	-	-

Tab. 7.10 (1/2): Sortenvgl. (Kap.: 4.1.3, Tab. 4.5), Festphase: „Sprinter“

Inhibitor	Konz. [µg/ml]	Ext. [Skt]	Inhib. [%]	C_{50} [µg/ml]
Gesamtextrakt „Kleine Rheinländerin“	1114.0	0.107	91	12.2
	111.40	0.116	84	
	11.140	0.196	49	
	1.1140	0.311	21	
	0.1114	0.340	3	
	0.0111	0.348	3	
Gesamtextrakt „Allerfrüheste Mai“	980.22	0.096	89	4.0
	98.022	0.127	88	
	9.8022	0.192	70	
	0.9802	0.315	19	
	0.0980	0.320	10	
	0.0098	0.346	0	
Gesamtextrakt „Maxigolt“	1044.8	0.116	94	5.4
	104.48	0.117	84	
	10.448	0.148	57	
	1.0448	0.215	32	
	0.1045	0.308	9	
	0.0105	0.347	2	
OA	989.9	0.421	-	-
B_0	-	0.440	-	-
NSB	-	0.088	-	-

Tab. 7.10 (2/2): Sortenvgl. (Kap.: 4.1.3, Tab. 4.5), Festphase: „Sprinter“

Inhibitor	Konz. [µg/ml]	Ext. [Skt]	Inhib. [%]	C_{50} [µg/ml]
Gesamtextrakt „Sprinter“	1006.1	0.123	91	7.7
	100.61	0.138	88	
	10.061	0.208	53	
	1.0061	0.302	31	
	0.1006	0.335	15	
	0.0101	0.345	10	
Gesamtextrakt „Wunder von Kelvedon“	1136.2	0.111	91	3.9
	113.62	0.133	85	
	11.362	0.208	67	
	1.1362	0.301	30	
	0.1136	0.313	9	
	0.0114	0.349	10	
OA	989.9	0.421	-	-
B_0	-	0.440	-	-
NSB	-	0.088	-	-

Tab. 7.11: Sortenvgl. (Kap.: 4.1.3, Tab. 4.5), Festphase: „Wunder von Kelvedon“

Inhibitor	Konz. [µg/ml]	Ext. [Skt]	Inhib. [%]	C_{50} [µg/ml]
Gesamtextrakt „Kleine Rheinländerin“	1114.0	0.107	87	5.2
	111.40	0.116	83	
	11.140	0.196	62	
	1.1140	0.311	27	
	0.1114	0.340	10	
	0.0111	0.348	8	
Gesamtextrakt „Allerfrüheste Mai“	980.22	0.096	91	10.8
	98.022	0.127	85	
	9.8022	0.192	48	
	0.9802	0.315	12	
	0.0980	0.320	10	
	0.0098	0.346	1	
Gesamtextrakt „Maxigolt“	1044.8	0.116	90	8.0
	104.48	0.117	84	
	10.448	0.148	55	
	1.0448	0.215	15	
	0.1045	0.308	3	
	0.0105	0.347	5	
Gesamtextrakt „Sprinter“	1006.1	0.123	90	6.5
	100.61	0.138	81	
	10.061	0.208	57	
	1.0061	0.302	20	
	0.1006	0.335	5	
	0.0101	0.345	2	
Gesamtextrakt „Wunder von Kelvedon“	1136.2	0.111	89	7.6
	113.62	0.133	79	
	11.362	0.208	55	
	1.1362	0.301	24	
	0.1136	0.313	7	
	0.0114	0.349	3	
OA	989.9	0.400	-	-
B_0	-	0.428	-	-
NSB	-	0.071	-	-

Tab. 7.12 (1/3): Handelsprod. (Kap.: 4.1.4, Tab. 4.6)
Festphase: „Maxigolt“

Inhibitor	Konz. [µg/ml]	Ext. [Skt]	Inhib. [%]	C_{50} [µg/ml]
Gesamtextrakt „Maxigolt“ N	840.02	0.064	100	1.6
	84.002	0.091	96	
	8.4002	0.180	80	
	0.8400	0.419	38	
	0.0840	0.600	6	
	0.0084	0.624	2	
Schälerbse, grün, glutenfrei TE 1 (oV)	1072.3	0.054	102	1.0
	107.23	0.098	94	
	10.723	0.201	76	
	1.0723	0.345	51	
	0.1072	0.565	12	
	0.0107	0.628	1	
Schälerbse, grün, glutenfrei TE 1 (nZ)	756.45	0.090	96	27.9
	75.645	0.261	66	
	7.5645	0.468	29	
	0.7565	0.605	5	
	0.0756	0.611	4	
	0.0076	0.627	1	
Schälerbse, grün, glutenfrei TE 1 (KW)	840.78	0.049	103	15.1
	840.78	0.183	79	
	8.4078	0.408	40	
	0.8408	0.574	11	
	0.0841	0.605	5	
	0.0084	0.618	3	
Schälerbse, gelb, glutenfrei TE 2 (oV)	1124.2	0.063	96	2.7
	112.42	0.121	85	
	11.242	0.217	68	
	1.1242	0.376	39	
	0.1124	0.441	27	
	0.0112	0.546	8	
OA	989.9	0.636	-	-
B_0	-	0.733	-	-
NSB	-	0.066	-	-

Inhibitor	Konz. [µg/ml]	Ext. [Skt]	Inhib. [%]	C_{50} [µg/ml]
Schälerbse, gelb, glutenfrei TE 2 (nZ)	872.78	0.086	92	30.5
	87.278	0.201	71	
	8.7278	0.454	25	
	0.8728	0.498	17	
	0.0873	0.539	10	
	0.0087	0.589	1	
Schälerbse, gelb, glutenfrei TE 2(KW)	928.34	0.044	99	21.4
	92.834	0.175	76	
	9.2834	0.397	35	
	0.9283	0.502	16	
	0.0928	0.525	12	
	0.0093	0.552	7	
OA	989.9	0.601	-	-
B_0	-	0.593	-	-
NSB	-	0.040	-	-

Tab. 7.12 (2/3): Handelsprod. (Kap.: 4.1.4, Tab. 4.6)
Festphase: „Maxigolt“

Inhibitor	Konz. [µg/ml]	Ext. [Skt]	Inhib. [%]	C_{50} [µg/ml]
Junge Erbsen, Les Primeurs TKE 1 (oV)	924.88	0.049	95	7.1
	92.488	0.166	79	
	9.2488	0.366	52	
	0.9249	0.483	36	
	0.0925	0.563	25	
	0.0092	0.661	12	
Junge Erbsen, Les Primeurs TKE 1 (nZ)	738.55	0.080	90	7.9
	73.855	0.228	71	
	7.3855	0.384	49	
	0.7386	0.565	25	
	0.0739	0.670	11	
	0.0074	0.665	12	
OA	989.9	0.768	-	-
B_0	-	0.750	-	-
NSB	-	0.010	-	-

Inhibitor	Konz. [µg/ml]	Ext. [Skt]	Inhib. [%]	C_{50} [µg/ml]
Junge Erbsen, Les Primeurs TKE 1 (KW)	944.02	0.083	92	8.7
	94.402	0.165	77	
	9.4402	0.314	50	
	0.9440	0.455	25	
	0.0944	0.515	14	
	0.0094	0.554	7	
OA	989.9	0.601	-	-
B_0	-	0.593	-	-
NSB	-	0.040	-	-

Inhibitor	Konz. [µg/ml]	Ext. [Skt]	Inhib. [%]	C_{50} [µg/ml]
Erbsen, extra zart TKE 2 (oV)	732.32	0.044	95	3.5
	73.232	0.106	87	
	7.3232	0.268	64	
	0.7323	0.569	21	
	0.0732	0.666	7	
	0.0073	0.697	3	
Erbsen, extra zart TKE 2 (nZ)	466.50	0.039	96	6.4
	46.650	0.174	77	
	4.6650	0.395	46	
	0.4665	0.606	16	
	0.0467	0.668	7	
	0.0047	0.690	4	
Erbsen, extra zart TKE 2(KW)	712.78	0.025	98	3.8
	71.278	0.105	87	
	7.1278	0.294	60	
	0.7128	0.552	23	
	0.0713	0.643	11	
	0.0071	0.654	9	
OA	989.9	0.672	-	-
B_0	-	0.718	-	-
NSB	-	0.011	-	-

Tab. 7.12 (3/3): Handelsprod. (Kap.: 4.1.4, Tab. 4.6) Festphase: „Maxigolt“

Inhibitor	Konz. [µg/ml]	Ext. [Skt]	Inhib. [%]	C_{50} [µg/ml]
Junge Erbsen, extra fein GKE (oV)	500.45	0.092	95	41.1
	50.045	0.335	53	
	5.0045	0.516	21	
	0.5005	0.582	9	
	0.0501	0.609	5	
	0.0050	0.612	4	
Junge Erbsen, extra fein GKE (nZ)	554.98	0.187	79	116.7
	55.498	0.429	36	
	5.5498	0.582	9	
	0.5550	0.601	6	
	0.0555	0.611	4	
	0.0056	0.626	2	
Junge Erbsen, extra fein GKE (KW)	884.44	0.115	91	66.6
	88.444	0.321	55	
	8.8444	0.572	11	
	0.8844	0.601	6	
	0.0884	0.614	4	
	0.0088	0.619	3	
OA	989.9	0.636	-	-
B_0	-	0.733	-	-
NSB	-	0.066	-	-

Inhibitor	Konz. [µg/ml]	Ext. [Skt]	Inhib. [%]	C_{50} [µg/ml]
Erbsen, sehr fein DKE (oV)	666.09	0.087	90	5.2
	66.609	0.288	62	
	6.6609	0.364	52	
	0.6661	0.519	31	
	0.0666	0.608	19	
	0.0067	0.624	17	
Erbsen, sehr fein DKE (nZ)	796.11	0.174	78	37.5
	79.611	0.343	55	
	7.9611	0.457	40	
	0.7961	0.528	30	
	0.0796	0.633	16	
	0.0080	0.646	14	
Erbsen, sehr fein DKE (KW)	926.56	0.105	87	8.0
	92.656	0.298	61	
	9.2656	0.368	52	
	0.9266	0.554	27	
	0.0927	0.616	18	
	0.0093	0.637	15	
OA	989.9	0.768	-	-
B_0	-	0.750	-	-
NSB	-	0.010	-	-

Tab. 7.13 (1/2): Lagerung - 20 °C (Kapitel: 4.1.5, Tab. 4.7); Festphase: „Maxigolt“

Inhibitor	Konz. [µg/ml]	Ext. [Skt]	Inhib. [%]	C_{50} [µg/ml]
LV-E-0-20	932.51	0.083	94	11.6
	93.251	0.272	76	
	9.3251	0.571	47	
	0.9325	1.124	-6	
	0.0933	0.992	7	
	0.0093	1.044	2	
LV-E-4-20	823.09	0.134	90	22.8
	82.309	0.286	73	
	8.2309	0.658	32	
	0.8231	0.848	10	
	0.0823	0.850	10	
	0.0082	0.928	1	
LV-E-12-20	818.88	0.093	95	26.0
	81.888	0.278	74	
	8.1888	0.711	26	
	0.8189	0.830	12	
	0.0819	0.893	5	
	0.0082	0.905	4	
LV-E-20-20	750.45	0.101	94	23.6
	75.045	0.301	72	
	7.5045	0.685	29	
	0.7505	0.843	11	
	0.0750	0.818	14	
	0.0075	0.878	7	
LV-E-28-20	566.12	0.054	99	11.4
	56.612	0.276	74	
	5.6612	0.589	39	
	0.5661	0.836	12	
	0.0566	0.879	7	
	0.0056	0.934	1	
LV-E-36-20	543.41	0.052	99	10.6
	54.341	0.268	75	
	5.4341	0.586	40	
	0.5434	0.813	14	
	0.0543	0.922	2	
	0.0054	0.936	1	
LV-E-44-20	512.99	0.064	98	12.7
	51.299	0.254	77	
	5.1299	0.650	33	
	0.5130	0.810	15	
	0.0513	0.912	3	
	0.0051	0.899	5	
LV-E-52-20	484.96	0.071	97	12.0
	48.496	0.266	76	
	4.8496	0.643	33	
	0.4850	0.785	17	
	0.0485	0.871	8	
	0.0049	0.854	10	
OA	989.9	1.109	-	-
B_0	-	1.060	-	-
NSB	-	0.025	-	-

Tab. 7.13 (2/2): Lagerung - 20 °C (Kapitel: 4.1.5, Tab. 4.7); Festphase: „Maxigolt“

Inhibitor	Konz. [µg/ml]	Ext. [Skt]	Inhib. [%]	C_{50} [µg/ml]
LV-E-60-20	476.28	0.069	98	16.0
	47.628	0.285	73	
	4.7628	0.726	24	
	0.4763	0.890	6	
	0.0476	0.868	8	
	0.0048	0.864	9	
LV-E-68-20	495.55	0.068	99	17.9
	49.555	0.269	75	
	4.9555	0.777	17	
	0.4955	0.873	14	
	0.0496	0.882	4	
	0.0050	0.855	4	
OA	989.9	1.109	-	-
B_0	-	1.060	-	-
NSB	-	0.025	-	-

Tab. 7.14 (1/2): Lagerung - 80 °C (Kapitel: 4.1.5, Tab. 4.8),Festphase: „Maxigolt“

Inhibitor	Konz. [µg/ml]	Ext. [Skt]	Inhib. [%]	C_{50} [µg/ml]
LV-E-0-80	932.51	0.083	94	11.6
	93.251	0.272	76	
	9.3251	0.571	47	
	0.9325	1.124	-6	
	0.0933	0.992	7	
	0.0093	1.044	2	
LV-E-4-80	715.63	0.117	92	25.5
	71.563	0.312	70	
	7.1563	0.717	25	
	0.7156	0.879	7	
	0.0716	0.899	5	
	0.0072	0.902	4	
LV-E-12-80	933.19	0.110	93	26.1
	93.319	0.274	75	
	9.3319	0.671	30	
	0.9332	0.854	10	
	0.0933	0.920	2	
	0.0093	0.928	1	
LV-E-20-80	886.41	0.053	99	12.6
	88.641	0.201	83	
	8.8641	0.547	44	
	0.8864	0.811	15	
	0.0886	0.872	8	
	0.0089	0.876	7	
OA	989.9	1.109	-	-
B_0	-	1.060	-	-
NSB	-	0.025	-	-

Tab. 7.14 (2/2): Lagerung - 80 °C (Kapitel: 4.1.5, Tab. 4.8),Festphase: „Maxigolt“

Inhibitor	Konz. [µg/ml]	Ext. [Skt]	Inhib. [%]	C_{50} [µg/ml]
LV-E-28-80	596.00	0.091	95	26.7
	59.600	0.394	61	
	5.9600	0.681	29	
	0.5960	0.938	0	
	0.0596	0.895	5	
	0.0060	0.851	10	
LV-E-36-80	546.28	0.107	93	13.0
	54.628	0.275	74	
	5.4628	0.626	35	
	0.5463	0.893	5	
	0.0546	0.841	11	
	0.0055	0.907	4	
LV-E-44-80	546.47	0.092	95	14.6
	54.647	0.276	74	
	5.4647	0.656	32	
	0.5465	0.927	2	
	0.0546	0.897	5	
	0.0055	0.926	2	
LV-E-52-80	426.96	0.101	94	12.9
	42.696	0.310	71	
	4.2696	0.664	31	
	0.4270	0.880	7	
	0.0427	0.867	8	
	0.0043	0.848	10	
LV-E-60-80	505.14	0.098	94	17.5
	50.514	0.294	72	
	5.0514	0.728	24	
	0.5051	0.868	8	
	0.0505	0.840	11	
	0.0051	0.831	12	
LV-E-68-80	474.20	0.118	92	14.6
	47.420	0.275	74	
	4.7420	0.702	27	
	0.4742	0.882	7	
	0.0474	0.906	4	
	0.0047	0.855	10	
OA	989.9	1.109	-	-
B_0	-	1.060	-	-
NSB	-	0.025	-	-

Tab. 7.15 (1/3): Trocknung (Kapitel: 4.1.6, Tab. 4.9), Festphase: „Maxigolt“

Inhibitor	Konz. [µg/ml]	Ext. [Skt]	Inhib. [%]	C_{50} [µg/ml]
TV-E-0	932.51	0.083	94	11.6
	93.251	0.272	76	
	9.3251	0.571	47	
	0.9325	1.124	-6	
	0.0933	0.992	7	
	0.0093	1.044	2	
OA	989.9	1.109	-	-
B_0	-	1.060	-	-
NSB	-	0.025	-	-

Tab. 7.15 (2/3): Trocknung (Kapitel: 4.1.6. Tab. 4.9) Festphase: „Maxigolt“

Inhibitor	Konz. [µg/ml]	Ext. [Skt]	Inhib. [%]	C_{50} [µg/ml]
TV-E-0.5	669.54	0.081	98	5.4
	66.954	0.250	83	
	6.6954	0.592	54	
	0.6695	1.080	12	
	0.0670	1.084	12	
	0.0067	1.196	2	
TV-E-1.0	647.04	0.127	94	10.6
	64.704	0.366	73	
	6.4704	0.713	44	
	0.6470	0.872	30	
	0.0647	1.217	0	
	0.0065	1.016	18	
TV-E-2.0	762.52	0.104	96	11.3
	76.252	0.356	74	
	7.6252	0.697	45	
	0.7625	0.944	24	
	0.0763	1.121	9	
	0.0076	1.083	12	
TV-E-4.0	704.53	0.129	94	8.3
	70.453	0.395	71	
	7.0453	0.657	48	
	0.7045	0.876	30	
	0.0705	1.244	-2	
	0.0071	1.151	6	
TV-E-8.0	746.54	0.158	91	8.8
	74.654	0.411	69	
	7.4654	0.656	49	
	0.7465	0.983	20	
	0.0747	0.972	21	
	0.0075	1.201	2	
TV-E-9.0	616.54	0.187	89	6.7
	61.654	0.446	66	
	6.1654	0.646	49	
	0.6165	0.982	21	
	0.0617	1.001	19	
	0.0062	1.058	14	
TV-E-10.0	635.66	0.128	94	7.5
	63.566	0.381	72	
	6.3566	0.659	48	
	0.6357	0.850	32	
	0.0636	0.985	20	
	0.0064	0.998	19	
TV-E-24.0	705.02	0.163	91	13.6
	70.502	0.405	70	
	7.0502	0.731	42	
	0.7050	0.975	21	
	0.0705	0.968	22	
	0.0071	1.070	13	
OA	989.9	1.299	-	-
B_0	-	1.222	-	-
NSB	-	0.055	-	-

Tab. 7.15 (3/3): Trocknung (Kapitel: 4.1.6, Tab. 4.9), Festphase: „Maxigolt“

Inhibitor	Konz. [µg/ml]	Ext. [Skt]	Inhib. [%]	C_{50} [µg/ml]
TV-E-14.0	892.27	0.097	94	13.0
	89.227	0.369	64	
	8.9227	0.518	47	
	0.8923	0.736	23	
	0.0892	0.918	3	
	0.0089	0.931	1	
TV-E-19.0	912.88	0.194	84	11.3
	91.288	0.360	65	
	9.1288	0.499	49	
	0.9128	0.768	19	
	0.0913	1.069	4	
	0.0091	0.916	3	
OA	989.9	0.900	-	-
B_0	-	0.941	-	-
NSB	-	0.047	-	-

Tab. 7.16 (1/3): Autoklavierung (Kapitel: 4.1.7, Tab. 4.11), Festphase: „Maxigolt“

Inhibitor	Konz. [µg/ml]	Ext. [Skt]	Inhib. [%]	C_{50} [µg/ml]
AV-E-0-0	932.51	0.083	94	11.6
	93.251	0.272	76	
	9.3251	0.571	47	
	0.9325	1.124	-6	
	0.0933	0.992	7	
	0.0093	1.044	2	
AV-E-60-20	868.58	0.086	96	23.4
	86.858	0.225	80	
	8.6858	0.697	27	
	0.8686	0.728	24	
	0.0869	0.823	13	
	0.0087	0.864	9	
AV-E-60-40	977.00	0.090	95	47.0
	97.700	0.406	60	
	9.7700	0.682	29	
	0.9770	0.802	16	
	0.0977	0.811	15	
	0.0098	0.916	3	
AV-E-60-60	901.14	0.111	93	50.0
	90.114	0.435	57	
	9.0114	0.662	31	
	0.9011	0.720	25	
	0.0901	0.772	19	
	0.0090	0.893	5	
AV-E-85-20	703.78	0.081	95	31.0
	70.378	0.413	63	
	7.0378	0.778	27	
	0.7038	0.870	18	
	0.0704	0.918	14	
	0.0070	1.017	4	
OA	989.9	1.109	-	-
B_0	-	1.060	-	-
NSB	-	0.025	-	-

Tab. 7.16 (2/3): Autoklavierung (Kapitel: 4.1.7, Tab. 4.11), Festphase: „Maxigolt“

Inhibitor	Konz. [µg/ml]	Ext. [Skt]	Inhib. [%]	C_{50} [µg/ml]
AV-E-85-40	786.99	0.069	96	26.8
	78.699	0.312	72	
	7.8699	0.806	25	
	0.7870	0.919	14	
	0.0787	1.015	4	
	0.0079	0.973	8	
AV-E-85-60	709.18	0.079	95	33.3
	70.918	0.422	62	
	7.0918	0.790	26	
	0.7092	0.945	11	
	0.0709	0.965	9	
	0.0071	1.010	5	
AV-E-100-20	648.55	0.094	93	43.9
	64.855	0.516	53	
	6.4855	0.673	37	
	0.6486	0.957	10	
	0.0649	0.941	12	
AV-E-100-40	569.78	0.131	90	40.7
	56978	0.513	53	
	5.6978	0.716	33	
	0.5698	0.917	14	
	0.0567	0.988	7	
AV-E-100-60	694.62	0.110	92	41.5
	69.462	0.505	54	
	6.9462	0.733	32	
	0.6946	0.867	19	
	0.0695	0.864	19	
AV-E-121-20	782.47	0.110	92	26.7
	78.247	0.404	63	
	7.8247	0.701	35	
	0.7825	0.743	31	
	0.0783	0.899	16	
AV-E-121-40	640.25	0.167	86	34.6
	64.025	0.469	57	
	6.4025	0.744	31	
	0.6403	0.840	21	
	0.0640	0.904	15	
AV-E-121-60	624.96	0.313	72	122.2
	62.496	0.637	41	
	6.2496	0.712	34	
	0.6250	0.906	15	
	0.0625	1.012	5	
AV-E-140-20	615.47	0.176	85	105.3
	61.547	0.654	39	
	6.1547	0.771	28	
	0.6155	0.968	9	
	0.0616	1.012	5	
OA	989.9	1.109	-	-
B_0	-	1.060	-	-
NSB	-	0.025	-	-

Tab. 7.16 (3/3): Autoklavierung (Kapitel: 4.1.7, Tab. 4.11), Festphase: „Maxigolt“

Inhibitor	Konz. [µg/ml]	Ext. [Skt]	Inhib. [%]	C_{50} [µg/ml]
AV-E-140-40	608.41	0.193	84	97.6
	60.841	0.633	41	
	6.0841	0.847	21	
	0.6084	0.989	7	
	0.0608	1.007	5	
AV-E-140-60	763.58	0.167	86	145.2
	76.358	0.688	36	
	7.6358	0.891	16	
	0.7636	1.000	6	
	0.0764	1.041	2	
OA	989.9	1.109	-	-
B_0	-	1.060	-	-
NSB	-	0.025	-	-

Tab. 7.17 (1/2): Mikrowelle (Kapitel: 4.1.8, Tab. 4.12), Festphase: „Maxigolt“

Inhibitor	Konz. [µg/ml]	Ext. [Skt]	Inhib. [%]	C_{50} [µg/ml]
MW-E-N	1090.4	0.039	95	1.2
	109.04	0.061	92	
	10.904	0.186	74	
	1.0904	0.357	49	
	0.1090	0.600	14	
	0.0109	0.695	0	
MW-E-1	1177.4	0.032	96	2.0
	117.74	0.058	92	
	11.774	0.170	76	
	1.1774	0.404	42	
	0.1178	0.650	6	
	0.0118	0.697	0	
MW-E-2	934.01	0.020	98	3.8
	93.401	0.068	91	
	9.3401	0.263	63	
	0.9340	0.483	31	
	0.0934	0.642	8	
	0.0093	0.685	1	
MW-E-3	1076.7	0.027	97	9.9
	107.67	0.098	87	
	10.767	0.344	51	
	1.0767	0.499	28	
	0.1077	0.646	7	
	0.0108	0.696	0	
MW-E-4	1007.7	0.029	97	5.2
	100.77	0.134	81	
	10.077	0.295	58	
	1.0077	0.485	30	
	0.1008	0.598	14	
	0.0101	0.685	1	
OA	989.9	0.776	-	-
B_0	-	0.694	-	-
NSB	-	0.005	-	-

Tab. 7.17 (2/2): Mikrowelle (Kapitel: 4.1.8, Tab. 4.12), Festphase: „Maxigolt“

Inhibitor	Konz. [µg/ml]	Ext. [Skt]	Inhib. [%]	C_{50} [µg/ml]
MW-E-5	1097.1	0.027	97	5.2
	109.71	0.067	91	
	10.971	0.262	63	
	1.0971	0.529	24	
	0.1097	0.644	7	
	0.0110	0.682	2	
MW-E-6	1001.7	0.026	97	3.8
	100.17	0.104	86	
	10.017	0.249	65	
	1.0017	0.488	30	
	0.1002	0.664	4	
	0.0100	0.692	0	
MW-E-7	1034.5	0.047	94	7.7
	103.45	0.151	79	
	10.345	0.330	53	
	1.0345	0.484	30	
	0.1035	0.651	6	
	0.0103	0.690	1	
MW-E-8	871.89	0.031	96	7.1
	87.189	0.097	87	
	8.7189	0.336	52	
	0.8719	0.489	30	
	0.0872	0.636	8	
	0.0087	0.668	4	
MW-E-9	821.88	0.096	87	25.3
	82.188	0.257	63	
	8.2188	0.438	37	
	0.8219	0.675	3	
	0.0822	0.689	1	
	0.0082	0.697	0	
OA	989.9	0.776	-	-
B_0	-	0.694	-	-
NSB	-	0.005	-	-

Tab. 7.18 (1/2): Magenverdauung (Kapitel: 4.1.9, Tab. 4.13), Festphase: „Maxigolt“

Inhibitor	Konz. [µg/ml]	Ext. [Skt]	Inhib. [%]	C_{50} [µg/ml]
Pep	178.62	0.765	11	n.e.
	17.862	0.768	11	
	1.7862	0.799	7	
	0.1786	0.806	6	
	0.0179	0.845	1	
	0.0018	0.834	3	
MV-E-N	978.68	0.062	99	2.3
	97.868	0.102	94	
	9.7868	0.268	73	
	0.9787	0.562	37	
	0.0979	0.742	14	
	0.0100	0.832	3	
OA	989.9	0.823	-	-
B_0	-	0.854	-	-
NSB	-	0.054	-	-

Tab. 7.18 (2/2): Magenverdauung (Kapitel: 4.1.9, Tab. 4.13), Festphase: „Maxigolt“

Inhibitor	Konz. [µg/ml]	Ext. [Skt]	Inhib. [%]	C_{50} [µg/ml]
MV-E-pH-120	946.59	0.062	99	2.5
	94.659	0.195	82	
	9.4659	0.324	66	
	0.9466	0.550	38	
	0.0947	0.705	19	
MV-E-pH-180	854.68	0.089	96	3.5
	85.468	0.199	82	
	8.5468	0.347	63	
	0.8547	0.624	29	
	0.0855	0.739	14	
MV-E-pH-240	945.68	0.094	95	2.8
	94.568	0.194	83	
	9.4568	0.295	70	
	0.9456	0.599	32	
	0.0946	0.764	11	
	0.0095	0.836	2	
MV-E-Pep-1	1008.6	0.105	94	15.8
	100.86	0.297	70	
	10.086	0.485	46	
	1.0086	0.687	21	
	0.1009	0.758	12	
	0.0101	0.836	2	
MV-E-Pep-2	927.99	0.120	92	16.1
	92.799	0.301	69	
	9.2799	0.502	44	
	0.9280	0.685	21	
	0.0928	0.824	4	
	0.0093	0.836	2	
MV-E-Pep-3	1063.8	0.132	90	19.4
	106.38	0.369	61	
	10.638	0.484	46	
	1.0638	0.702	19	
	0.1064	0.809	6	
	0.0106	0.821	4	
MV-E-Pep-4	942.51	0.142	89	14.4
	94.251	0.237	77	
	9.4251	0.503	44	
	0.9425	0.705	19	
	0.0943	0.769	11	
	0.0094	0.822	4	
MV-E-Pep-5	978.25	0.102	94	23.4
	97.825	0.272	73	
	9.7825	0.565	36	
	0.9783	0.699	19	
	0.0978	0.799	7	
	0.0098	0.811	5	
OA	989.9	0.823	-	-
B_0	-	0.854	-	-
NSB	-	0.054	-	-

Tab. 7.19 (1/2): Darmverdauung (Kapitel: 4.1.9, Tab. 4.14), Festphase: „Maxigolt“

Inhibitor	Konz. [µg/ml]	Ext. [Skt]	Inhib. [%]	C_{50} [µg/ml]
DV-E-Pep-1	978.68	0.062	99	2.3
	97.868	0.102	94	
	9.7868	0.268	73	
	0.9787	0.562	37	
	0.0979	0.742	14	
	0.0100	0.832	3	
DV-E-Pep-1 + Try-4	876.85	0.092	98	9.7
	87.685	0.222	82	
	8.7685	0.510	49	
	0.8769	0.762	19	
	0.0877	0.840	10	
	0.0088	0.913	1	
DV-E-Pep-1 + Try-4 + Chy-4	987.87	0.099	97	46.0
	98.787	0.395	62	
	9.8787	0.704	26	
	0.9879	0.750	20	
	0.0988	0.805	14	
	0.0099	0.896	3	
DV-E-Pep-1 + Try-4 + Chy-4 + Car-3	1002.4	0.109	96	60.1
	100.24	0.449	56	
	10.024	0.667	30	
	1.0024	0.784	16	
	0.1002	0.839	10	
	0.0100	0.911	2	
DV-E-Pep-1 + Pan-0.9	841.01	0.224	82	52.5
	84.101	0.446	56	
	8.4101	0.698	26	
	0.8410	0.793	15	
	0.0841	0.852	8	
	0.0084	0.904	2	
DV-E-Pep-1 + Pro-2	1124.3	0.287	75	199.1
	112.43	0.567	42	
	11.243	0.815	13	
	1.1243	0.872	6	
	0.1124	0.901	3	
	0.0112	0.915	1	
Trypsin	876.85	0.855	8	n.e.
	87.685	0.876	6	
	8.7685	0.888	4	
	0.8769	0.899	3	
	0.0877	0.912	1	
	0.0088	0.915	1	
α-Chymotrypsin	987.87	0.861	7	n.e.
	98.787	0.842	10	
	9.8787	0.899	3	
	0.9879	0.912	1	
	0.0988	0.911	2	
	0.0099	0.910	2	
OA	989.9	0.952	-	-
B_0	-	0.924	-	-
NSB	-	0.071	-	-

Tab. 7.19 (2/2): Darmverdauung (Kapitel: 4.1.9, Tab. 4.14), Festphase: „Maxigolt“

Inhibitor	Konz. [µg/ml]	Ext. [Skt]	Inhib. [%]	C_{50} [µg/ml]
Carboxy-peptidase A	1002.4	0.847	9	n.e.
	100.24	0.846	9	
	10.024	0.852	8	
	1.0024	0.900	3	
	0.1002	0.902	3	
	0.0100	0.905	2	
Pankreatin	841.01	0.824	12	n.e.
	84.101	0.888	4	
	8.4101	0.896	3	
	0.8410	0.901	3	
	0.0841	0.906	2	
	0.0084	0.909	2	
Proteinase K	1124.3	0.860	8	n.e.
	112.43	0.860	8	
	11.243	0.876	6	
	1.1243	0.875	6	
	0.1124	0.903	2	
	0.0112	0.901	3	
OA	989.9	0.952	-	-
B_0	-	0.924	-	-
NSB	-	0.071	-	-

Ergebnisse Gartenbohne:

Tab. 7.20 (1/2): Reifung (Kapitel: 4.2.2, Tab. 4.18)
Festphase: „Montano“, RS 10

Inhibitor	Konz. [µg/ml]	Ext. [Skt]	Inhib. [%]	C_{50} [µg/ml]
Gesamtextrakt „Montano“ Reifungsstufe 1 (Mo-1)	988.17	0.134	87	29.6
	98.817	0.234	65	
	9.8817	0.362	37	
	0.9882	0.475	12	
	0.0988	0.485	10	
	0.0099	0.483	10	
Gesamtextrakt „Montano“ Reifungsstufe 2 (Mo-2)	994.09	0.107	93	18.5
	99.409	0.184	76	
	9.9409	0.344	41	
	0.9941	0.451	17	
	0.0994	0.500	6	
	0.0099	0.514	3	
Gesamtextrakt „Montano“ Reifungsstufe 3 (Mo-3)	892.96	0.154	82	35.1
	89.296	0.226	66	
	8.9296	0.411	26	
	0.8930	0.513	4	
	0.0893	0.516	3	
	0.0089	0.528	0	
Gesamtextrakt „Montano“ Reifungsstufe 4 (Mo-4)	962.38	0.099	94	19.5
	96.238	0.217	68	
	9.6238	0.338	42	
	0.9624	0.478	11	
	0.0962	0.513	4	
	0.0096	0.523	1	
Gesamtextrakt „Montano“ Reifungsstufe 5 (Mo-5)	906.28	0.120	90	26.3
	90.628	0.179	77	
	9.0628	0.406	27	
	0.9063	0.490	9	
	0.0906	0.523	1	
	0.0091	0.529	0	
Gesamtextrakt „Montano“ Reifungsstufe 6 (Mo-6)	1060.0	0.134	87	23.6
	106.00	0.188	75	
	10.600	0.361	37	
	1.0600	0.500	6	
	0.1060	0.519	2	
	0.0106	0.523	1	
Gesamtextrakt „Montano“ Reifungsstufe 7 (Mo-7)	1024.9	0.070	101	13.3
	102.49	0.169	79	
	10.249	0.318	46	
	1.0249	0.472	13	
	0.1025	0.518	2	
	0.0103	0.488	9	
Gesamtextrakt „Montano“ Reifungsstufe 8 (Mo-8)	1020.5	0.087	97	15.0
	102.54	0.137	86	
	10.254	0.334	43	
	1.0254	0.485	10	
	0.1025	0.483	10	
	0.0103	0.498	7	
OA	959.7	0.507	-	-
B_0	-	0.529	-	-
NSB	-	0.073	-	-

Tab. 7.20 (2/2): Reifung (Kapitel: 4.2.2, Tab. 4.18)
Festphase: „Montano“, RS 10

Inhibitor	Konz. [µg/ml]	Ext. [Skt]	Inhib. [%]	C_{50} [µg/ml]
Gesamtextrakt „Montano“ Reifungsstufe 9 (Mo-9)	1068.1	0.063	102	6.9
	106.81	0.149	83	
	10.681	0.275	56	
	1.0681	0.410	26	
	0.1068	0.514	3	
	0.0107	0.497	7	
Gesamtextrakt „Montano“ Reifungsstufe 10 (Mo-10)	916.53	0.071	100	9.4
	91.653	0.131	87	
	9.1653	0.303	50	
	0.9165	0.445	18	
	0.0916	0.477	11	
	0.0092	0.495	7	
OA	959.7	0.507	-	-
B_0	-	0.529	-	-
NSB	-	0.073	-	-

Tab. 7.21 (1/2): Reifung (Kapitel: 4.2.2, Tab. 4.18)
Festphase: „Maxi“, RS 8

Inhibitor	Konz. [µg/ml]	Ext. [Skt]	Inhib. [%]	C_{50} [µg/ml]
Gesamtextrakt „Maxi“ Reifungsstufe 1 (Ma-1)	1032.0	0.126	93	38.7
	103.20	0.261	68	
	10.320	0.496	25	
	1.0320	0.618	3	
	0.1032	0.617	3	
	0.0103	0.590	8	
Gesamtextrakt „Maxi“ Reifungsstufe 2 (Ma-2)	1044.2	0.095	99	23.6
	104.42	0.232	74	
	10.442	0.432	37	
	1.0442	0.584	9	
	0.1044	0.628	1	
	0.0104	0.633	0	
Gesamtextrakt „Maxi“ Reifungsstufe 3 (Ma-3)	1038.7	0.145	90	21.8
	103.87	0.218	76	
	10.387	0.429	38	
	1.0387	0.592	8	
	0.1039	0.629	1	
	0.0104	0.630	1	
Gesamtextrakt „Maxi“ Reifungsstufe 4 (Mo-4)	1018.3	0.132	92	29.9
	101.83	0.238	73	
	10.183	0.469	30	
	1.0183	0.544	17	
	0.1018	0.632	0	
	0.0102	0.633	0	
Gesamtextrakt „Maxi“ Reifungsstufe 5 (Ma-5)	1044.8	0.111	96	33.0
	104.48	0.232	74	
	10.448	0.490	26	
	1.0448	0.583	9	
	0.1045	0.633	0	
	0.0105	0.603	6	
OA	959.7	0.548	-	-
B_0	-	0.634	-	-
NSB	-	0.088	-	-

Tab. 7.21 (2/2): Reifung (Kapitel: 4.2.2, Tab. 4.18) Festphase: „Maxi“, RS 8

Inhibitor	Konz. [µg/ml]	Ext. [Skt]	Inhib. [%]	C_{50} [µg/ml]
Gesamtextrakt „Maxi“ Reifungsstufe 6 (Ma-6)	920.22	0.105	97	21.6
	92.022	0.242	72	
	9.2022	0.431	37	
	0.9202	0.590	8	
	0.0920	0.625	2	
	0.0092	0.611	4	
Gesamtextrakt „Maxi“ Reifungsstufe 7 (Ma-7)	1034.7	0.157	87	28.3
	103.47	0.258	69	
	10.347	0.441	35	
	1.0347	0.560	14	
	0.1035	0.599	6	
	0.0104	0.632	0	
Gesamtextrakt „Maxi“ Reifungsstufe 8 (Ma-8)	958.41	0.105	96.9	31.5
	95.841	0.258	68.9	
	9.5841	0.471	29.9	
	0.9584	0.571	11.5	
	0.0958	0.630	0.7	
	0.0095	0.623	2.0	
OA	959.7	0.548	-	-
B_0	-	0.634	-	-
NSB	-	0.088	-	-

Tab. 7.22: Sortenvergleich (Kapitel: 4.2.3, Tab. 4.20); Festphase: „Salou“

Inhibitor	Konz. [µg/ml]	Ext. [Skt]	Inhib. [%]	C_{50} [µg/ml]
Gesamtextrakt „Salou“	924.12	0.134	99	25.5
	92.412	0.222	89	
	9.2412	0.849	19	
	0.9241	0.942	9	
	0.0924	0.975	5	
	0.0092	1.013	1	
Gesamtextrakt „Montano“	1052.5	0.131	99	27.4
	105.25	0.224	89	
	10.525	0.821	23	
	1.0525	0.952	8	
	0.1053	1.001	3	
	0.0105	1.020	0	
Gesamtextrakt „Admires“	1150.2	0.119	100	32.9
	115.02	0.295	81	
	11.502	0.806	24	
	1.1502	0.958	7	
	0.1150	1.002	2	
	0.0115	1.013	1	
Gesamtextrakt „Maxi“	984.23	0.131	99	40.1
	98.423	0.358	74	
	9.8423	0.909	13	
	0.9842	0.969	6	
	0.0984	0.999	3	
	0.0098	1.011	1	
OA	959.7	1.002	-	-
B_0	-	1.024	-	-
NSB	-	0.122	-	-

Tab. 7.23: Sortenvergleich (Kapitel: 4.2.3, Tab. 4.20); Festphase: „Montano“

Inhibitor	Konz. [µg/ml]	Ext. [Skt]	Inhib. [%]	C_{50} [µg/ml]
Gesamtextrakt „Salou“	947.89	0.100	100	12.3
	94.789	0.304	76	
	9.4789	0.562	47	
	0.9479	0.824	17	
	0.0948	0.908	7	
	0.0095	0.955	1	
Gesamtextrakt „Montano“	968.14	0.129	96	9.9
	96.814	0.287	78	
	9.6814	0.535	49.8	
	0.9681	0.952	2	
	0.0968	0.968	0	
	0.0097	0.951	2	
Gesamtextrakt „Admires“	824.23	0.135	96	15.2
	82.423	0.324	74	
	8.2423	0.609	41	
	0.8242	0.841	15	
	0.0824	0.965	0	
	0.0082	0.947	2	
Gesamtextrakt „Maxi“	907.84	0.129	96	14.1
	90.784	0.299	77	
	9.0784	0.588	44	
	0.9078	0.872	11	
	0.0908	0.886	9	
	0.0091	0.924	5	
OA	959.7	0.999	-	-
B_0	-	0.968	-	-
NSB	-	0.098	-	-

Tab. 7.24 (1/2): Sortenvergleich (Kapitel: 4.2.3, Tab. 4.20); Festphase: „Admires“

Inhibitor	Konz. [µg/ml]	Ext. [Skt]	Inhib. [%]	C_{50} [µg/ml]
Gesamtextrakt „Salou“	989.35	0.099	96	
	98.935	0.314	69	
	9.8935	0.675	24	
	0.9894	0.799	9	
	0.0989	0.824	5	
	0.0099	0.834	4	
Gesamtextrakt „Montano“	869.11	0.111	95	
	86.911	0.315	69	
	8.6911	0.700	21	
	0.8691	0.798	9	
	0.0869	0.841	3	
	0.0087	0.841	3	
Gesamtextrakt „Admires“	945.52	0.115	94	
	94.552	0.305	70	
	9.4552	0.628	30	
	0.9455	0.742	16	
	0.0946	0.800	8	
	0.0095	0.821	6	
OA	959.7	0.876	-	-
B_0	-	0.867	-	-
NSB	-	0.068	-	-

Tab. 7.24 (2/2): Sortenvergleich (Kapitel: 4.2.3, Tab. 4.20); Festphase: „Admires“

Inhibitor	Konz. [µg/ml]	Ext. [Skt]	Inhib. [%]	C_{50} [µg/ml]
Gesamtextrakt „Maxi“	968.50	0.109	95	25.6
	96.850	0.333	67	
	9.6850	0.566	38	
	0.9685	0.821	6	
	0.0969	0.821	6	
	0.0097	0.822	6	
OA	959.7	0.876	-	-
B_0	-	0.867	-	-
NSB	-	0.068	-	-

Tab. 7.25: Sortenvergleich (Kapitel: 4.2.3, Tab. 4.20); Festphase: „Maxi“

Inhibitor	Konz. [µg/ml]	Ext. [Skt]	Inhib. [%]	C_{50} [µg/ml]
Gesamtextrakt „Salou“	900.30	0.105	100	41.1
	90.030	0.378	66	
	9.0030	0.757	19	
	0.9003	0.845	8	
	0.0900	0.824	11	
	0.0090	0.891	3	
Gesamtextrakt „Montano“	1024.1	0.116	98	29.2
	102.41	0.299	76	
	10.241	0.681	29	
	1.0241	0.800	14	
	0.1024	0.814	12	
	0.0102	0.831	10	
Gesamtextrakt „Admires“	975.52	0.119	98	33.3
	97.552	0.324	73	
	9.7552	0.716	24	
	0.9755	0.764	18	
	0.0976	0.810	13	
	0.0098	0.862	6	
Gesamtextrakt „Maxi“	899.41	0.142	95	35.5
	89.941	0.348	70	
	8.9941	0.742	21	
	0.8994	0.796	14	
	0.0899	0.841	9	
	0.0090	0.863	6	
OA	959.7	0.912	-	-
B_0	-	0.913	-	-
NSB	-	0.101	-	-

Tab. 7.26 (1/3): Handelsprodukte (Kap.: 4.2.4, Tab. 4.21) Festphase „Maxi“

Inhibitor	Konz. [µg/ml]	Ext. [Skt]	Inhib. [%]	C_{50} [µg/ml]
Gesamtextrakt „Maxi“ N	888.21	0.084	94	5.1
	88.821	0.196	83	
	8.8821	0.479	55	
	0.8882	0.714	33	
	0.0888	0.940	11	
	0.0089	1.006	4	
OA	959.7	1.042	-	-
B_0	-	1.050	-	-
NSB	-	0.019	-	-

Tab. 7.26 (2/3): Handelsprodukte (Kap.: 4.2.4, Tab. 4.21) Festphase „Maxi“

Inhibitor	Konz. [µg/ml]	Ext. [Skt]	Inhib. [%]	C_{50} [µg/ml]
Weiße Bohne, getrocknet TB (oV)	1124.0	0.063	96	2.7
	112.40	0.121	85	
	11.240	0.217	68	
	1.1240	0.376	39	
	0.1124	0.441	27	
	0.0112	0.546	8	
Weiße Bohne, getrocknet TB (nZ)	772.34	0.059	97	6.4
	77.234	0.177	75	
	7.7234	0.299	53	
	0.7723	0.506	16	
	0.0772	0.548	8	
	0.0077	0.692	-18	
Weiße Bohne, getrocknet TB (KW)	928.87	0.044	99	21.4
	92.887	0.175	76	
	9.2887	0.397	35	
	0.9289	0.502	16	
	0.0929	0.525	12	
	0.0093	0.552	7	
OA	959.7	0.601	-	-
B_0	-	0.593	-	-
NSB	-	0.040	-	-

Inhibitor	Konz. [µg/ml]	Ext. [Skt]	Inhib. [%]	C_{50} [µg/ml]
Prinzessbohne Les Primeurs TKB (oV)	864.65	0.090	93	11.3
	86.465	0.313	71	
	8.6465	0.564	47	
	0.8647	0.728	31	
	0.0865	0.946	10	
	0.0086	0.974	7	
Prinzessbohne Les Primeurs TKB (nZ)	612.52	0.045	97	7.8
	61.252	0.385	64	
	6.1252	0.587	48	
	0.6125	0.750	35	
	0.0613	0.858	25	
	0.0061	0.867	13	
Prinzessbohne Les Primeurs TKB (KW)	204.41	0.136	89	6.9
	20.441	0.410	59	
	2.0441	0.641	40	
	0.2044	0.731	31	
	0.0204	0.869	18	
	0.0020	0.871	17	
Feine junge Brechbohnen GKB (oV)	356.74	0.220	80	27.0
	35.674	0.511	52	
	3.5674	0.704	34	
	0.3567	0.956	9	
	0.0357	0.923	12	
	0.0036	1.013	4	
Feine junge Brechbohnen GKB (nZ)	490.88	0.183	84	43.1
	49.088	0.525	51	
	4.9088	0.699	34	
	0.4909	0.828	22	
	0.0491	1.002	5	
	0.0049	1.036	1	
OA	959.7	1.050	-	-
B_0	-	1.042	-	-
NSB	-	0.019	-	-

Tab. 7.26 (3/3): Handelsprodukte (Kap.: 4.2.4, Tab. 4.21), Festphase „Maxi“

Inhibitor	Konz. [µg/ml]	Ext. [Skt]	Inhib. [%]	C_{50} [µg/ml]
Feine junge Brechbohnen GKB (KW)	444.13	0.2530	77	50.3
	44.413	0.5505	48	
	4.4413	0.7035	34	
	0.4441	0.8345	21	
	0.0444	0.9090	14	
	0.0044	1.1075	-6	
OA	959.7	1.050	-	-
B_0	-	1.042	-	-
NSB	-	0.019	-	-

Inhibitor	Konz. [µg/ml]	Ext. [Skt]	Inhib. [%]	C_{50} [µg/ml]
Grüne Bohnen, sehr fein DKB (oV)	340.87	0.0975	93	7.4
	34.087	0.4575	61	
	3.4087	0.6455	44	
	0.3409	0.8660	25	
	0.0341	0.9100	21	
	0.0034	1.0385	9	
Grüne Bohnen, sehr fein DKB (nZ)	460.45	0.1330	90	7.5
	46.045	0.4955	58	
	4.6045	0.6055	48	
	0.4605	0.8245	28	
	0.0461	0.8965	22	
	0.0046	1.1115	3	
Grüne Bohnen, sehr fein DKB (KW)	244.41	0.3050	75	17.7
	24.441	0.5465	53	
	2.4441	0.8025	30	
	0.2444	0.9975	13	
	0.0244	1.0640	7	
	0.0024	1.1650	-	
OA	959.7	1.146	-	-
B_0	-	0.944	-	-
NSB	-	0.019	-	-

Tab. 7.27 (1/2): Lagerung - 20 °C (Kap.: 4.2.5, Tab. 4.22), Festphase „Montano“

Inhibitor	Konz. [µg/ml]	Ext. [Skt]	Inhib. [%]	C_{50} [µg/ml]
LV-B-0	509.33	0.086	99	3.4
	50.933	0.113	94	
	5.0933	0.322	57	
	0.5093	0.563	15	
	0.0509	0.590	10	
	0.0051	0.637	2	
LV-B-2-20	496.41	0.088	98	3.0
	49.641	0.185	81	
	4.9641	0.278	65	
	0.4964	0.637	2	
	0.0496	0.620	5	
	0.0050	0.569	14	
OA	959.7	0.549	-	-
B_0	-	0.649	-	-
NSB	-	0.079	-	-

Tab. 7.27 (2/2): Lagerung - 20 °C (Kap.: 4.2.5, Tab. 4.22), Festphase „Montano“

Inhibitor	Konz. [µg/ml]	Ext. [Skt]	Inhib. [%]	C_{50} [µg/ml]
LV-B-4-20	415.22	0.088	98	1.8
	41.522	0.214	76	
	4.1522	0.291	63	
	0.4152	0.492	28	
	0.0415	0.586	11	
	0.0042	0.626	4	
LV-B-8-20	599.67	0.099	96	2.2
	59.967	0.093	98	
	5.9967	0.252	70	
	0.5997	0.506	25	
	0.0600	0.564	15	
	0.0060	0.618	5	
LV-B-12-20	442.88	0.132	91	2.2
	44.288	0.104	96	
	4.4288	0.308	60	
	0.4429	0.497	27	
	0.0443	0.600	9	
	0.0044	0.648	0	
LV-B-16-20	548.01	0.084	99	6.7
	54.801	0.183	82	
	5.4801	0.382	47	
	0.5480	0.555	16	
	0.0548	0.648	0	
	0.0055	0.624	4	
LV-B-20-20	473.63	0.102	96	2.3
	47.363	0.208	77	
	4.7363	0.284	64	
	0.4736	0.544	18	
	0.0474	0.621	5	
	0.0047	0.629	4	
LV-B-24-20	518.74	0.092	98	3.3
	51.874	0.181	82	
	5.1874	0.328	56	
	0.5187	0.506	25	
	0.0519	0.540	19	
	0.0052	0.644	1	
LV-B-28-20	575.50	0.080	100	5.3
	57.550	0.244	71	
	5.7550	0.356	51	
	0.5755	0.593	10	
	0.0576	0.621	5	
	0.0058	0.618	5	
OA	959.7	0.549	-	-
B_0	-	0.649	-	-
NSB	-	0.079	-	-

Tab. 7.28: Lagerung - 80 °C (Kap.: 4.2.5, Tab. 4.22), Festphase „Montano“

Inhibitor	Konz. [µg/ml]	Ext. [Skt]	Inhib. [%]	C_{50} [µg/ml]
LV-B-0	489.21	0.118	99	2.9
	48.921	0.189	86	
	4.8921	0.321	63	
	0.4892	0.630	7	
	0.0489	0.645	5	
	0.0049	0.658	2	
LV-B-2-80	439.55	0.113	100	5.5
	43.955	0.158	92	
	4.3955	0.416	46	
	0.4396	0.590	14	
	0.0440	0.648	4	
	0.0044	0.623	9	
LV-B-4-80	406.81	0.156	92	4.4
	40.681	0.156	92	
	4.0681	0.400	48	
	0.4068	0.530	25	
	0.0407	0.630	7	
	0.0041	0.627	8	
LV-B-8-80	598.03	0.122	98	3.5
	59.803	0.260	73	
	5.9803	0.316	63	
	0.5980	0.635	6	
	0.0598	0.624	8	
	0.0060	0.582	16	
LV-B-12-80	48374	0.137	95	2.5
	48.374	0.141	95	
	4.8374	0.332	61	
	0.4837	0.544	23	
	0.0484	0.587	15	
	0.0048	0.625	8	
LV-B-16-80	534.20	0.112	100	4.2
	53.420	0.199	84	
	5.3420	0.379	52	
	0.5342	0.493	32	
	0.0534	0.600	13	
	0.0053	0.658	2	
LV-B-20-80	409.63	0.120	98	4.5
	40.963	0.116	99	
	4.0963	0.402	48	
	0.4096	0.572	18	
	0.0410	0.582	16	
	0.0041	0.655	3	
LV-B-24-80	470.16	0.113	100	2.8
	47.016	0.242	77	
	4.7016	0.339	59	
	0.4702	0.567	19	
	0.0470	0.606	12	
	0.0047	0.637	6	
LV-B-28-80	533.99	0.145	94	2.0
	53.399	0.194	85	
	5.3399	0.278	70	
	0.5340	0.545	23	
	0.0534	0.642	5	
	0.0053	0.653	3	
OA	959.7	0.754	-	-
B_0	-	0.671	-	-
NSB	-	0.111	-	-

Tab. 7.29 (1/2): Trocknung (Kap.: 4.2.6, Tab. 4.24), Festphase „Montano“

Inhibitor	Konz. [µg/ml]	Ext. [Skt]	Inhib. [%]	C_{50} [µg/ml]
TV-B-0	424.85	0.073	98	3.3
	42.485	0.138	80	
	4.2485	0.235	54	
	0.4249	0.366	18	
	0.0425	0.420	3	
	0.0043	0.430	0	
TV-B-0.5	558.07	0.072	99	2.7
	55.807	0.157	75	
	5.5807	0.216	59	
	0.5581	0.321	30	
	0.0558	0.368	17	
	0.0056	0.429	0	
TV-B-1.0	405.11	0.106	89	2.6
	40.511	0.146	78	
	4.0511	0.230	55	
	0.4051	0.328	28	
	0.0405	0.387	12	
	0.0041	0.106	89	
TV-B-2.0	574.96	0.086	95	10.2
	57.496	0.086	95	
	5.7496	0.303	35	
	0.5750	0.408	6	
	0.0575	0.409	6	
	0.0058	0.430	0	
TV-B-4.0	451.74	0.075	98	6.4
	45.174	0.173	71	
	4.5174	0.262	46	
	0.4517	0.342	24	
	0.0452	0.431	0	
	0.0045	0.414	4	
TV-B-8.0	437.00	0.076	98	7.3
	43.700	0.089	94	
	4.3700	0.294	37	
	0.4370	0.339	25	
	0.0437	0.410	6	
	0.0044	0.425	1	
TV-B-12.0	434.22	0.102	90	6.2
	43.422	0.218	58	
	4.3422	0.254	48	
	0.4342	0.361	19	
	0.0434	0.409	6	
	0.0043	0.402	8	
TV-B-16.0	541.69	0.070	99	13.3
	54.169	0.196	64	
	5.4169	0.282	41	
	0.5417	0.383	13	
	0.0542	0.425	1	
	0.0054	0.424	2	
TV-B-20.0	547.71	0.076	98	9.3
	54.771	0.097	92	
	5.4771	0.294	37	
	0.5477	0.351	22	
	0.0548	0.386	12	
	0.0055	0.408	6	
OA	959.7	0.472	-	-
B_0	-	0.430	-	-
NSB	-	0.067	-	-

Tab. 7.29 (2/2): Trocknung (Kap.: 4.2.6, Tab. 4.24), Festphase „Montano“

Inhibitor	Konz. [µg/ml]	Ext. [Skt]	Inhib. [%]	C_{50} [µg/ml]
TV-B-24.0	541.16	0.076	98	11.0
	54.116	0.115	87	
	5.4116	0.308	34	
	0.5412	0.339	25	
	0.0541	0.397	9	
	0.0054	0.411	5	
OA	959.7	0.472	-	-
B_0	-	0.430	-	-
NSB	-	0.067	-	-

Tab. 7.30 (1/2): Autoklavierung (Kap.: 4.2.7, Tab. 4.25), Festphase „Montano“

Inhibitor	Konz. [µg/ml]	Ext. [Skt]	Inhib. [%]	C_{50} [µg/ml]
AV-B-0-0	896.95	0.119	91	1.6
	89.695	0.210	81	
	8.9695	0.378	64	
	0.8970	0.570	45	
	0.0897	0.859	16	
	0.0090	0.964	5	
AV-B-60-20	1204.3	0.090	93	1.1
	120.43	0.196	83	
	12.043	0.370	65	
	1.2043	0.508	51	
	0.1204	0.775	24	
	0.0120	0.871	15	
AV-B-60-40	1178.7	0.075	95	1.4
	117.87	0.183	84	
	11.787	0.319	70	
	1.1787	0.540	48	
	0.1179	0.770	25	
	0.0118	0.913	10	
AV-B-60-60	1158.5	0.114	91	1.1
	115.85	0.160	86	
	11.585	0.337	69	
	1.1590	0.515	51	
	0.1159	0.754	26	
	0.0116	0.914	10	
AV-B-85-20	925.77	0.173	85	1.3
	92.577	0.209	81	
	9.2577	0.342	68	
	0.9258	0.554	47	
	0.0926	0.711	31	
	0.0093	0.853	16	
AV-B-85-40	586.41	0.090	93	2.4
	58.641	0.281	74	
	5.8641	0.474	55	
	0.5864	0.595	42	
	0.0586	0.780	24	
	0.0059	0.871	15	
AV-B-85-60	1114.0	0.138	89	2.2
	111.40	0.232	79	
	11.140	0.349	67	
	1.1140	0.594	43	
	0.1114	0.824	19	
	0.0111	0.901	12	
OA	959.7	0.974	-	-
B_0	-	1.016	-	-
NSB	-	0.025	-	-

Tab. 7.30 (2/2): Autoklavierung (Kap.: 4.2.7, Tab. 4.25), Festphase „Montano“

Inhibitor	Konz. [µg/ml]	Ext. [Skt]	Inhib. [%]	C_{50} [µg/ml]
AV-B-100-20	958.37	0.067	96	2.2
	95.837	0.187	84	
	9.5837	0.370	65	
	0.9584	0.605	41	
	0.0958	0.846	17	
	0.0096	0.960	6	
AV-B-100-40	941.16	0.131	89	2.0
	94.116	0.260	76	
	9.4116	0.360	66	
	0.9412	0.601	42	
	0.0941	0.785	23	
	0.0094	0.813	20	
AV-B-100-60	1156.4	0.113	91	3.3
	115.64	0.292	73	
	11.564	0.402	62	
	1.1564	0.620	40	
	0.1156	0.748	27	
	0.0116	0.837	18	
AV-B-121-20	1034.3	0.142	88	6.9
	103.43	0.261	76	
	10.343	0.478	54	
	1.0343	0.721	30	
	0.1034	0.895	12	
	0.0103	0.953	6	
AV-B-121-40	1087.9	0.174	85	5.8
	108.79	0.306	72	
	10.879	0.459	56	
	1.0879	0.687	33	
	0.1088	0.857	16	
	0.0109	0.965	5	
AV-B-121-60	1068.0	0.248	77	6.2
	106.80	0.310	71	
	10.680	0.475	55	
	1.0680	0.665	35	
	0.1068	0.811	21	
	0.0107	0.961	6	
AV-B-140-20	1123.3	0.300	72	8.9
	112.33	0.378	64	
	11.233	0.498	52	
	1.1233	0.725	29	
	0.1123	0.803	21	
	0.0112	0.957	6	
AV-B-140-40	1023.8	0.215	81	12.6
	102.38	0.325	70	
	10.238	0.540	48	
	1.0238	0.752	27	
	0.1024	0.921	10	
	0.0102	1.014	0	
AV-B-140-60	1105.2	0.237	79	20.9
	110.52	0.388	63	
	11.052	0.571	45	
	1.1052	0.817	20	
	0.1105	0.969	5	
	0.0111	1.001	2	
OA	959.7	0.974	-	-
B_0	-	1.016	-	-
NSB	-	0.025	-	-

Tab. 7.31: Mikrowelle (Kap.: 4.2.8, Tab. 4.26), Festphase „Maxi“

Inhibitor	Konz. [µg/ml]	Ext. [Skt]	Inhib. [%]	C_{50} [µg/ml]
MW-B-N	564.12	0.043	97	0.8
	56.412	0.108	90	
	5.6412	0.273	70	
	0.5641	0.481	46	
	0.0564	0.741	15	
	0.0056	0.855	2	
MW-B-1	510.09	0.040	98	1.1
	51.009	0.091	92	
	5.1009	0.242	74	
	0.5101	0.541	39	
	0.0510	0.806	8	
	0.0051	0.829	5	
MW-B-2	393.99	0.054	96	1.8
	39.399	0.207	78	
	3.9399	0.375	58	
	0.3940	0.581	34	
	0.0394	0.776	11	
MW-B-3	524.84	0.102	90	2.3
	52.484	0.225	76	
	5.2484	0.377	58	
	0.5248	0.566	36	
	0.0525	0.741	15	
MW-B-4	130.77	0.154	84	2.5
	13.077	0.279	70	
	1.3077	0.512	42	
	0.1308	0.656	25	
	0.0131	0.758	13	
MW-B-5	416.22	0.091	92	2.6
	41.622	0.234	75	
	4.1622	0.397	56	
	0.4162	0.642	27	
	0.0416	0.736	16	
MW-B-6	373.58	0.150	85	4.2
	37.358	0.297	67	
	3.7358	0.454	49	
	0.3736	0.775	11	
	0.0374	0.835	4	
MW-B-7	682.05	0.075	93	3.7
	68.205	0.235	75	
	6.8205	0.354	61	
	0.6821	0.697	21	
	0.0682	0.761	13	
MW-B-8	636.39	0.077	93	4.9
	63.639	0.157	84	
	6.3639	0.413	54	
	0.6364	0.706	19	
	0.0636	0.784	10	
MW-B-9	730.71	0.069	94	7.3
	73.071	0.198	79	
	7.3071	0.446	50	
	0.7307	0.619	30	
	0.0731	0.810	7	
	730.71	0.069	94	
OA	959.7	0.926	-	-
B_0	-	0.872	-	-
NSB	-	0.019	-	-

Tab. 7.32: In-vitro-Verdauung (Kap.: 4.2.9, Tab. 4.27), Festphase „Maxi“

Inhibitor	Konz. [µg/ml]	Ext. [Skt]	Inhib. [%]	C_{50} [µg/ml]
IV-B-N	888.41	0.084	94	5.1
	88.841	0.196	83	
	8.8841	0.479	55	
	0.8884	0.714	33	
	0.0888	0.889	2	
	0.0089	0.899	1	
IV-B-pH-120	724.98	0.111	99	4.9
	72.498	0.287	79	
	7.2498	0.486	56	
	0.7250	0.814	19	
	0.0725	0.914	8	
IV-B-Pep-1	821.96	0.121	98	5.3
	82.196	0.222	86	
	8.2196	0.499	55	
	0.8220	0.732	29	
	0.0822	0.900	10	
	0.0082	0.921	7	
IV-B-Pep-1 + Try-4	875.25	0.138	96	5.1
	87.525	0.199	89	
	8.7525	0.498	55	
	0.8753	0.687	34	
	0.0875	0.786	23	
	0.0088	0.968	2	
IV-B-Pep-1 + Try-4 + Chy-4	847.15	0.099	99	24.0
	84.715	0.197	87	
	8.4715	0.795	19	
	0.8472	0.894	8	
	0.0847	0.899	7	
	0.0085	0.914	5	
IV-B-Pep-1 + Try-4 + Chy-4 + Car-3	868.39	0.208	86	44.1
	86.839	0.414	63	
	8.6839	0.789	20	
	0.8684	0.857	12	
	0.0868	0.904	7	
	0.0087	0.912	6	
IV-B-Pep-1 + Pan-0.9	942.14	0.118	96	7.3
	94.214	0.222	85	
	9.4214	0.499	53	
	0.9421	0.732	26	
	0.0942	0.900	7	
	0.0094	0.921	5	
IV-B-Pro-2	900.37	0.347	70	270.7
	90.037	0.687	31	
	9.0037	0.824	16	
	0.9004	0.868	11	
	0.0900	0.946	2	
	0.0090	0.957	1	
OA	959.7	0.975	-	
B_0	-	0.962	-	
NSB	-	0.087	-	

7.9 Elektrophorese

7.9.1 SDS-PAGE

Zur Durchführung der SDS-PAGE wird das NuPage™ Elektrophorese System in Kombination mit Fertiggelen und -lösungen der Firma Novex™ (San Diego, CA, USA) entsprechend der angegebenen Vorschriften verwendet.
Die Probenaufarbeitung erfolgt nach VIETHS et al. (1992c).

verwendete Lösungen:

Probenpuffer (pH 6.8):		• 3.03 g Tris • 2.5 ml 2-Mercaptoethanol • 5.0 ml Glycerin • 2.0 g SDS • 0.01 g Bromphenolblau • 150 µl Pyronin Y-Lösung (1 %ig in Wasser, w/v) • 40 ml bidest. Wasser • pH-Wert mit 4 M HCl auf 6.8 einstellen • mit bidest. Wasser ad 50 ml
MES-SDS-Elektrodenpuffer:	c(MES): 1 M c(Tris Base) : 1 M c(SDS) : 0.0693 M c(EDTA) : 0.0205 M	• 10 ml NuPage™ MES-SDS-Puffer • mit bidest. ad 200 ml
Tris-Acetat-SDS-Elektrodenpuffer:	c(Tricine): 1 M c(Tris Base): 1 M c(SDS) : 2 %	• 10 ml NuPage™ Tris-Acetat-SDS-Puffer • mit bidest. ad 200 ml

verwendete Fertiggele:

12 % Bis-Tris-Gel: (NuPage™)	Totalamidkonzentration:	12 %
	Puffer:	Bis-Tris-HCl
	Gel-Maße:	8 x 8 cm x 1 mm
	Gel-Typ:	10-, 12- oder 2-D-well
	optimaler Trennbereich:	2.5 bis 60 kDa
7% Tris-Acetat-Gel (NuPage™)	Totalamidkonzentration:	7 %
	Puffer:	Tris-Acetat
	Gel-Maße:	8 cm x 8 cm x 1 mm
	Gel-Typ:	10- oder 12-well
	optimaler Trennbereich:	36 bis 116 kDa

Durchführung:

- lyophilisierte PBS-Extrakte in bidest. Wasser aufnehmen und Proteinkonzentration einstellen
- rekonstituierte Extraktlösung im Verhältnis 1:1 mit Probenpuffer versetzen
- Proteingemisch des MG-Markers (Zusammensetzung siehe Tab. 7.33) in 1 ml Probenpuffer aufnehmen
- Lösungen 3 min bei 90 °C im Wasserbad reduzieren

- Gelkassette aus der Verpackung entnehmen
- Klebestreifen und Kamm entfernen
- Gelkassette in Elektrophorese-Kammer (Xcell II mini Cell) platzieren
- Elektrodenpuffer-Kammer mit Elektrodenpuffer befüllen
- Probenslots mit 5 bis 25 µl Probe- bzw. Markerlösung befüllen
- Elektrodenbrücke aufsetzen
- Spannung (Einstellungen siehe Tab. 7.34) anlegen (Power Ease 500)
- nach beendetem Lauf (Farbstoffe haben Anode des Gels erreicht) Stromfluss beenden
- Elektrodenbrücke entfernen und Gelkassette entnehmen
- Gelkassette öffnen und Gel vom Kunststoffträger ablösen
- Gel zur direkten unspezifischen Färbung oder zum Semidry-Blotting einsetzen

Tab. 7.33: Zusammensetzung des MG-Markers

Protein	MG [kDa]
Phosphorylase B	94.0
Rinderserumalbumin	67.0
Ovalbumin	43.0
Carboanhydrase	30.0
Trypsininhibitor	20.1
α-Lactalbumin	14.1

Tab. 7.34: Geräteeinstellung der SDS-PAGE

Gel-Typ	Schritt	Spannung [V]	Stromstärke [mA]	Leistung [W]	Laufzeit [min]
12 % Bis-Tris-Gel	1	200	120	25	35 - 45
7 % Tris-Acetat-Gel	1	150	50	12	50
	2	150	30	8	30

7.9.2 IEF

Zur Durchführung der IEF wird das NuPage™ Elektrophorese System in Kombination mit Fertiggelen und -lösungen der Firma Novex™ (San Diego, CA, USA) entsprechend der angegebenen Vorschriften verwendet.

verwendete Lösungen:

Glycerin/bidest. Wasser-Gemisch:	c: 1:1 (v:v)	• 1 ml Glycerin • 1 ml bidest. Wasser
Kathodenpuffer:	c(Lysin): 5.8 %	• 10 ml NuPage™ IEF Cathode Buffer (pH 3 - 7) • mit bidest. ad 100 ml
Anodenpuffer:	c(H_3PO_4): 2.04 %	• 10 ml NuPage™ IEF Anode Buffer • mit bidest. ad 100 ml

verwendete Fertiggele:

IEF-Gel (pH 3 - 7): (NuPage™)	pI:	3 - 7
	Gel-Maße:	8 x 8 cm x 1 mm
	Gel-Typ:	10- oder 12-well
	optimaler Trennbereich:	pH 3 - 7

Durchführung:

- lyophilisierte Proteinextrakte in bidest. Wasser aufnehmen und Proteinkonzentration einstellen
- rekonstituierte Extraktlösung im Verhältnis 1:1 mit Glycerin/bidest. Wasser-Gemisch versetzen
- Proteingemisch des pI-Markers (Zusammensetzung siehe Tab. 7.35) in 1 ml bidest. Wasser aufnehmen

- Gelkassette aus der Verpackung entnehmen
- Klebestreifen und Kamm entfernen
- Gelkassette in Elektrophorese-Kammer (Xcell II mini Cell) platzieren
- Kathodenpuffer-Kammer mit Kathodenpuffer befüllen
- Anodenpuffer-Kammer mit Anodenpuffer befüllen
- Probenslots mit 5 bis 25 µl Probe- bzw. Markerlösung befüllen
- Elektrodenbrücke aufsetzen
- Spannung (Einstellungen siehe Tab. 7.36) anlegen (Power Ease 500)
- nach beendetem Lauf Stromfluss beenden
- Elektrodenbrücke entfernen und Gelkassette entnehmen
- Gelkassette öffnen und Gel vom Kunststoffträger ablösen
- Gel zur direkten unspezifischen Färbung oder zum Semidry-Blotting einsetzen

Tab. 7.35: Zusammensetzung des pI-Markers

Protein	pI-Wert
Cytochrom C	10.7
Ribonuclease A	9.5
Lectin	8.3 8.0 7.8
Myoglobin	7.4 6.9
Carboanhydrase	6.0
β-Lactoglobulin	5.3 5.2
Trypsininhibitor	4.5
Glucoseoxidase	4.2
Amyloglucosidase	3.5

Tab. 7.36: Geräteeinstellung der IEF

Gel-Typ	Schritt	Spannung [V]	Stromstärke [mA]	Leistung [W]	Laufzeit [min]
IEF-Gel (pH 3 - 7)	1	100	50	15	60
	2	200	50	15	60
	3	500	50	15	30

7.10 Semidry-Blotting

7.10.1 Semidry-Blotting auf NC-Membranen

modifizierte Durchführung nach KHYSE-ANDERSEN (1984)

verwendete Lösungen:

Anodenpuffer I (pH 10.4):
c(Tris): 0.3 M
c(NaN_3): 0.01 % (w:v)
c(EtOH): 20 % (v:v)

- 18.15 g Tris
- 0.05 g NaN_3
- 100 ml Ethanol (96 %ig)
- mit bidest. Wasser ad 500 ml

Anodenpuffer II (pH 10.4):
c(Tris): 0.025 M
c(NaN_3): 0.01 % (w:v)
c(EtOH): 20 % (v:v)

- 1.52 g Tris
- 0.05 g NaN_3
- 100 ml Ethanol (96 %ig)
- mit bidest. Wasser ad 500 ml

Kathodenpuffer (pH 7.6):
c(EACA): 0.04 M
c(SDS): 0.01 % (w:v)
c(NaN_3): 0.01 % (w:v)
c(EtOH): 20 % (v:v)

- 2.6 g EACA
- 0.05 g SDS
- 0.05 g NaN_3
- 100 ml Ethanol (96 %ig)
- mit bidest. Wasser ad 500 ml

Durchführung:

- SDS-PAGE gemäß 7.9.1 bzw. IEF gemäß 7.9.2 durchführen
- NC-Blotmembran zurechtschneiden
- Graphitkathode mit bidest. Wasser anfeuchten
- 4 Lagen Haushaltstücher mit Kathodenpuffer tränken und auf die Kathode legen
- aus der Gelkasette entnommenes Gel auf die Haushaltstücher legen
- Blotmembran in Anodenpuffer II tränken und luftblasenfrei auf das Gel legen
- Bereiche, an denen kein Transfer stattfinden soll, mit Kunststoffstreifen abdecken
- 2 Lagen Haushaltstücher mit Anodenpuffer II tränken und auf die Blotmembran legen
- 4 Lagen Haushaltstücher mit Anodenpuffer I tränken und auf den Stapel legen
- mit Rolle Luftblasen aus dem Stapel drücken
- Graphitanode mit bidest. Wasser anfeuchten und auf die Graphitkathode legen
- Semidry-Blotting durchführen (Geräteparameter siehe Tab. 7.37)
- NC-Membran bei RT ca. 45 min trocknen lassen und anschließend zur Färbung einsetzen

Tab. 7.37: Geräteeinstellung für Semidry-Blotting auf NC-Membranen

Gel-Typ	Spannung [V]	Stromstärke [mA/cm]	Leistung [W]	Laufzeit [min]
SDS-Gel	30	0.8	10	80
IEF-Gel (pH 3 - 7)	15	0.25	5	130

7.10.2 Semidry-Blotting auf PVDF-Membranen

Durchführung nach WARD et al. (1990)

verwendete Lösungen:

Elektrodenpuffer (pH 11): c(CAPS): 10 mM
c(MeOH): 10 % (v:v)

- 0.554 g CAPS
- 25 ml Ethanol
- mit bidest. Wasser ad 250 ml

Durchführung:

- SDS-PAGE gemäß 7.9.1 durchführen
- PVDF-Blotmembran zurechtschneiden und 5 min in Methanol sowie 15 min in Elektrodenpuffer equilibrieren
- SDS-PAGE-Gel 30 min in Elektrodenpuffer equilibrieren
- Graphitkathode mit bidest. Wasser anfeuchten

- 6 Lagen Haushaltstücher mit Elektrodenpuffer tränken und auf die Kathode legen
- aus der Gelkasette entnommenes Gel auf die Haushaltstücher legen
- Blotmembran luftblasenfrei auf das Gel legen
- Bereiche, an denen kein Transfer stattfinden soll, mit Kunststoffstreifen abdecken
- 6 Lagen Haushaltstücher mit Elektrodenpuffer tränken und auf die Blotmembran legen
- mit Rolle Luftblasen aus dem Stapel drücken
- Graphitanode mit bidest. Wasser anfeuchten und auf die Graphitkathode legen
- Semidry-Blotting durchführen (Geräteparameter siehe Tab. 7.38)
- PVDF-Membran bei RT ca. 45 min trocknen lassen und anschließend zur Färbung einsetzen

Tab. 7.38: Geräteeinstellung für Semidry-Blotting auf PVDF-Membranen

Gel-Typ	Spannung [V]	Stromstärke [mA/cm]	Leistung [W]	Laufzeit [min]
SDS-Gel	30	0.8	10	70

7.11 Immunfärbung

Durchführung nach VIETHS et al. (1992a)

verwendete Lösungen:

PBS-Lösung:	pH: 7.4 c(NaCl): 0.15 M c(KCl): 0.0027 M c(K_2HPO_4): 0.01 M	• Puffertablette in bidest. Wasser lösen • mit bidest. Wasser ad 200 ml
Blockierlösung:	c(Magermilchpulver): 5 % (w:v) c(Tween 20): 0.1 % (v:v) c(PBS): 0.01 M	• 5 g Magermilchpulver • 0.1 ml Tween 20 • mit PBS-Lösung ad 100 ml
Inkubationspuffer:	c(BSA): 0.1 % (w:v) c(Tween 20): 0.05 % (v:v) c(PBS): 0.01 M	• 0.1 g BSA • 50 µl Tween 20 • mit PBS-Lösung ad 100 ml
Waschpuffer:	c(Tween 20): 0.05 % (v:v) c(PBS): 0.01 M	• 50 µl Tween 20 • mit PBS-Lösung ad 100 ml
Patientenseren:	c: 6.7 % (v:v)	• 100 µl Patientenserum • mit Inkubationspuffer ad 1.5 ml
Anti-Human-IgE:	c: 0.025 % (v:v)	• 25 µl Anti-Human-IgE • mit Inkubationspuffer ad 100 ml
Anti-Kaninchen-IgG: (biotinyliert)	c: 0.017 % (v:v)	• 16.7 µl Anti-Kaninchen-IgG • mit Inkubationspuffer ad 100 ml
Streptavidin-HRP:	c: 0.005 %	• 5 µl Streptavidin-HRP • mit Inkubationspuffer ad 100 ml

Umpufferlösung: (pH 6.0)	c(Tris): 0.01 M	• 121.2 mg Tris • in 80 ml bidest Wasser lösen • mit 4 M HCl auf pH 6.0 einstellen • mit bidest. Wasser ad 100 ml
Farbelösung I: (frisch ansetzen)	c(TMB): 0.24 % (w:v) c(DONS): 0.8 % (w:v)	• 24 mg TMB • 80 mg DONS • mit EtOH (96 %ig) ad 10 ml
Färbelösung II: (pH 5.0)	c(Citronensäure): 0.94 % c(Na_2HPO_4 • 2 H_2O): 1.82 % (w:v)	• 0.94 g Citronensäure • 1.82 g Na_2HPO_4 • 2 H_2O • in 80 ml bidest. Wasser lösen • mit 4 M HCl pH 5.0 einstellen • mit bidest. Wasser ad 100 ml
Färbelösungs- Gemisch:		• 10 ml Färbelösung I • 30 ml Färbelösung II • 20 µl H_2O_2

Durchführung:

- SDS-PAGE gemäß 7.9.1 bzw. IEF gemäß 7.9.2 durchführen
- Semidry-Blotting gemäß 7.10.1 durchführen
- getrocknete NC-Blotmembran ggf. zerschneiden und in Färbekammer einlegen

Die nachfolgenden Behandlungsschritte erfolgen unter stetigem Schütteln. Die Volumina der jeweils eingesetzten Lösungen werden entsprechend der Färbekammer so gewählt, dass eine ausreichende Benetzung der NC-Blotmembran gewährleistet ist.

- zum Unterbinden unspezifischer Färbungen 2 x 15 min mit Blockierlösung behandeln
- über Nacht mit Patientenserum inkubieren
- 3 x 5 min mit Waschpuffer behandeln
- 1 h mit anti-Human-IgE inkubieren
- 3 x 5 min mit Waschpuffer behandeln
- 1 h mit anti-Kaninchen-IgG inkubieren
- 3 x 5 min mit Waschpuffer behandeln
- 20 min mit Streptavindin-HRP inkubieren
- 3 x 5 min mit Waschpuffer behandeln
- 1 min mit Umpufferlösung konditionieren
- bis zur ausreichenden Färbung mit Färbelösungs-Gemisch behandeln
- 15 min mit bidest. Wasser spülen
- 45 min bei RT unter Lichtausschluss trocknen lassen
- gefärbte NC-Blotmembran digital archivieren

7.12 Proteinvisualisierung

7.12.1 Silberfärbung für Gele

Durchführung nach HEUKESHOVEN & DERNICK (1986)

verwendete Lösungen:

Fixierlösung: (frisch ansetzen)	c(EtOH): 30 % (v:v) c(HAc): 10 % (v:v)	• 15 ml EtOH (96 %ig) • 5 ml Eisessig • mit bidest. Wasser ad 50 ml
Inkubationslösung:	c(EtOH): 30 % (v:v) c(NaAc): 6.8 % (w:v) c(Glutardialdehyd): 0.0375 % (v:v) c(NaS_2O_3 • 5 H_2O): 0.2 % (w:v)	• 15 ml EtOH (96 %ig) • 3.4 g Natriumacetat • 0.1 g NaS_2O_3 • 5 H_2O • 0.3 ml Glutardialdehyd (25 %ig) • mit bidest. Wasser ad 50 ml
Versilberungslösung:	c($AgNO_3$): 0.2 % (w:v) c(Formaldehyd): 0.0075 % (v:v)	• 0.1 g $AgNO_3$ • 10 µl Formaldehyd (37 %ig) • mit bidest. Wasser ad 50 ml
Entwicklungslösung: (pH 11.8)	c(Na_2CO_3): 2.5 % (v:v) c(Formaldehyd): 0.0037 % (v:v)	• 1.25 g Na_2CO_3 • 5 µl Formaldehyd (37 %ig) • mit bidest. Wasser ad 50 ml
Stopplösung:	c(EDTA): 2 % (w:v)	• 0.93 g Titriplex III • mit bidest. Wasser ad 50 ml

Durchführung:

- SDS-PAGE gemäß 7.9.1 bzw. IEF gemäß 7.9.2 durchführen
- Gel in Färbekammer einlegen

Die nachfolgenden Behandlungsschritte erfolgen unter stetigem Schütteln.
Die Volumina der jeweils eingesetzten Lösungen werden entsprechend der Färbekammer so gewählt, dass eine ausreichende Benetzung des Gels gewährleistet ist.

- mind. 30 min mit Fixierlösung behandeln
- mind. 30 min mit Inkubationslösung konditionieren
- 3 x 5 min mit bidest. Wasser behandeln
- 20 min mit Versilberungslösung inkubieren
- 3 min mit bidest. Wasser waschen
- 1 min mit Entwicklungslösung behandeln
- mit Entwicklungslösung inkubieren bis Proteinbanden deutlich sichtbar (2 - 10 min)
- 15 min mit Stopplösung behandeln
- gefärbtes Gel digital archivieren

7.12.2 Coomassie-Brilliant-Blue-Färbung für Gele

Durchführung nach WARD (1990)

verwendete Lösungen:

Fixier-/Färbelösung:	c(Coomassie R-250) : 0.1 % (w :v) c(MeOH): 50 % (v:v) c(HAc): 12 % (v:v)	• 0.5 g Coomassie R-250 • 250 ml MeOH • 60 ml Eisessig • mit bidest. Wasser ad 500 ml
Entfärbelösung:	c(EtOH): 50 % (v:v)	• 50 ml MeOH • mit bidest. Wasser ad 100 ml

Durchführung:

- SDS-PAGE gemäß 7.9.1 bzw. IEF gemäß 7.9.2 durchführen
- Gel in Färbekammer einlegen

Die nachfolgenden Behandlungsschritte erfolgen unter stetigem Schütteln.
Die Volumina der jeweils eingesetzten Lösungen werden entsprechend der Färbekammer so gewählt, dass eine ausreichende Benetzung des Gels gewährleistet ist.

- mit Fixier/Färbelösung bis zur deutlichen Färbung behandeln (0.5 - 2 h)
- mit Entfärbelösung bis zum deutlichen Hervortreten der Proteinbanden entfärben (durch Zugabe von Cellulosetüchern Entfärbung beschleunigen)
- gefärbtes Gel digital archivieren

7.12.3 Coomassie-Brilliant-Blue-Färbung für PVDF-Membranen

Durchführung modifiziert nach HANCOCK & TSANG (1986)

verwendete Lösungen:

Fixier-/Färbelösung:	c(Coomassie R-250) : 0.1 % (w :v) c(EtOH): 50 % (v:v) c(HAc): 12 % (v:v)	• 0.5 g Coomassie R-250 • 250 ml EtOH (96 %ig) • 60 ml Eisessig • mit bidest. Wasser ad 500 ml
Entfärbelösung:	c(EtOH): 18 % (v:v) c(HAc): 8 % (v:v)	• 90 ml EtOH (96 %ig) • 40 ml Eisessig • mit bidest. Wasser ad 500 ml

Durchführung:

- SDS-PAGE gemäß 7.9.1 bzw. IEF gemäß 7.9.2 durchführen
- Semidry-Blotting gemäß 7.10.2 durchführen
- getrocknete PVDF-Blotmembran in Färbekammer einlegen

Die nachfolgenden Behandlungsschritte erfolgen unter stetigem Schütteln.
Die Volumina der jeweils eingesetzten Lösungen werden entsprechend der Färbekammer so gewählt, dass eine ausreichende Benetzung des Gels gewährleistet ist.

- PVDF-Blotmembran 30 s mit Methanol konditionieren
- mit Färbelösung behandeln bis PVDF-Blotmembran deutlich gefärbt ist (ca. 10 min)
- mit Entfärbelösung bis zum deutlichen Hervortreten der Proteinbanden entfärben (durch Zugabe von Cellulosetüchern Entfärbung beschleunigen)
- 15 min mit bidest. Wasser behandeln
- 30 min bei RT trocknen lassen und anschließend gefärbtes Gel digital archivieren
- zur N-terminalen Sequenzierung vorgesehene Banden ausschneiden

7.12.4 Kolloidale Gold-Färbung für NC-Membranen

Durchführung modifiziert nach DANSCHER & NOORGARD (1983)

verwendete Lösungen:

TTBS-Lösung: (pH 7.5)	c(Tris) : 20 mM c(NaCl): 0.5 M c(Tween 20): 0.3 % (v:v)	• 1.21 g Tris • 14.61 g NaCl • 400 ml bidest. Wasser • mit 4 M HCl auf pH 7.5 einstellen • 1.5 ml Tween 20 • mit bidest. Wasser ad 500 ml
Färbelösung:		• Colloidal Gold Protein Stain-Färbelösung der Firma BioRad™

Durchführung:

- SDS-PAGE gemäß 7.9.1 bzw. IEF gemäß 7.9.2 durchführen
- Semidry-Blotting gemäß 7.10.1 durchführen
- getrocknete NC-Blotmembran ggf. zerschneiden und in Färbekammer einlegen

Die nachfolgenden Behandlungsschritte erfolgen unter stetigem Schütteln. Die Volumina der jeweils eingesetzten Lösungen werden entsprechend der Färbekammer so gewählt, dass eine ausreichende Benetzung der NC-Blotmembran gewährleistet ist.

- NC-Blotmembran 3 x 20 min mit TTBS-Lösung inkubieren
- 3 x 20 min mit bidest. Wasser behandeln
- mit Färbelösung behandeln bis Proteinbanden deutlich hervortreten (ca. 30 - 60 min)
- 3 x 5 min mit bidest. Wasser behandeln
- 30 min bei RT unter Lichtausschluss trocknen lassen und anschließend gefärbtes Gel digital archivieren

7.12.5 Brilliant-Black-Färbung für NC-Membranen

Durchführung modifiziert nach HANCOCK & TSANG (1983)

verwendete Lösungen:

Natronlauge:	c(NaOH): 0.2 M	• 8.0 g NaOH • mit bidest. Wasser ad 1000 ml
PBS-Tween-Lösung:	pH: 7.4 c(NaCl): 0.15 M c(KCl): 0.0027 M c(K_2HPO_4): 0.01 M c(Tween 20): 0.05 % (v:v)	• 5 Puffertablette in bidest. Wasser lösen • 0.5 ml Tween 20 • mit bidest. Wasser ad 1000 ml
Färbelösung:	c(Brilliant-Black): 0.1 % (v:v) c(HAc): 1 % (v:v)	• 0.25 ml Brilliant-Black-Tinte • 2.5 ml Eisessig • mit PBS-Tween-Lösung ad 250 ml

Durchführung:

- SDS-PAGE gemäß 7.9.1 durchführen
- Semidry-Blotting gemäß 7.10.1 durchführen
- getrocknete NC-Blotmembran ggf. zerschneiden und in Färbekammer einlegen

Die nachfolgenden Behandlungsschritte erfolgen unter stetigem Schütteln.
Die Volumina der jeweils eingesetzten Lösungen werden entsprechend der Färbekammer so gewählt, dass eine ausreichende Benetzung der NC-Blotmembran gewährleistet ist.

- NC-Blotmembran 5 min mit Natronlauge konditionieren
- 4 x 10 min mit PBS-Tween-Lösung behandeln
- mit Färbelösung behandeln bis Proteinbanden deutlich hervortreten (ca. 60 min)
- 3 x 5 min mit bidest. Wasser behandeln
- 30 min bei RT unter Lichtausschluss trocknen lassen und anschließend gefärbtes Gel digital archivieren

7.13 Gelpermeationschromatographie

Durchführung nach HAGEL et al. (1989) & AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH (1998)

verwendete Lösungen:

Eluent:	c(NaCl): 0.2 M c(Na_2HPO_4 • 2 H_2O): 0.01 M	• 1.7799 g Na_2HPO_4 • 2 H_2O • 1.7533 g NaCl • 900 ml bidest. Wasser • mit 4 M HCl auf pH 7 einstellen • mit bidest. Wasser ad 1000 ml
MG-Standardgemisch :	c(Blue Dextra) : 0.01 mg/ml c(BSA) : 0.1 mg/ml c(Ovalbumin): 0.1 mg/ml c(Ribonuclease A): 0.1 mg/ml	• 1 mg Blue Dextran • 10 mg BSA • 10 mg Ovalbumin • 10 mg Ribonuclease A • mit Eluent ad 100 ml
Gesamtproteinextrakt:	c: 1.0 mg/ml	• PBS-Extrakt nach 7.3.1 herstellen
Albuminextrakt:	c: 0.5 mg/ml	• Albumin-Extrakt nach 7.3.2 herstellen

Chromatographiebedingungen:

Trennsäule:	Pharmacia XK 26 Chromatographiesäule (Füllvolumen: 450 ml)
Gelmatrix :	Sephacryl S 100 HR
Flow.	2 ml/min
Probenaufgabevolumen:	1 ml mittels Probenschleife
Eluent:	0.03 M NaCl, 0.01 M Na_2HPO_4 • 2 H_2O, pH 7
Pumpe:	Pharmacia LKB Pump P-1
Detektor:	Merck Hitachi L 4000 UV-Detektor
Messwellenlänge:	280 nm
Auswerteeinheit:	PC mit Software ChromStar 4.14, Release 2

Durchführung:

- Trennsäule 30 min mit dem Eluenten equilibrieren
- 1 ml Standardprotein-, Gesamtprotein- bzw. Albuminextrakt injizieren und nach dokumentierten Bedingungen trennen
- ggf. Fraktionen manuell unter Eiskühlung sammeln
- vereinigte Fraktionen 3 h bei - 80 °C tiefgefrieren und anschließend lyophilisieren
- Lyophilisat nach 7.14 dialysieren für weitere Untersuchungen einsetzen bzw. bei - 20 °C lagern

7.14 Dialyse

Zur Durchführung der Dialyse werden die Slide-A-Lyzer® 10 K Dialyse-Kammern der Firma Pierce (Rockford, USA) entsprechend der angegebenen Vorschrift verwendet.

- lyophilisierte GPC-Eluate in maximal 2.5 ml bidest. Wasser aufnehmen
- erhaltene Lösung in Dialyse-Kammer injizieren
- über Nacht bei 4 °C gegen bidest. Wasser dialysieren
- Dialysat 3 h bei - 80 °C tiefgefrieren und anschließend lyophilisieren
- Lyophilisat nach für weitere Untersuchungen einsetzen bzw. bei - 20 °C lagern

7.15 N-terminale Sequenzanalyse

- PVDF-Membran gemäß 7.12.3 anfärben
- zu sequenzierende Proteinbanden (Mindestproteinmenge: 50 pmol) ausschneiden und in Tubes überführen
- nach erfolgter Sequenzierung erfolgt die Auswertung über vergleichende Betrachtungen zu unterschiedlichen Proteindatenbanken (z.B. SWISSPROT)

7.16 Chemikalien, Geräte, Verbrauchsmittel, Zubehör

7.16.1 Chemikalien

Tab. 7.39 (1/2): Verwendete Chemikalien

Chemikalie	Hersteller	Gef.-Symbol	R-Sätze	S-Sätze
Aceton	Merck	F	11	9-16-23.2-33
6-Aminohexansäure (EACA)	Merck	--	--	--
Anti-Human-IgE (Kaninchen)	Dako	--	--	--
Anti-Kaninchen-IgG, biotinyliert (Ziege)	Dako	--	--	--
Borsäure	Merck	--	--	--
Bovine Serum Albumin (BSA)	Serva	--	--	--
Brilliant Black	Pelikan	--	--	--
Bromcyan	Merck	T^+, C	26/27/28-34	9-26-45
Bromphenolblau	Merck	--	--	--
Citronensäure	Merck	--	--	--
Colloidal Gold Total Protein Stain, (kolloidale Goldlösung), (Fertiglösung)	Bio Rad	--	--	24/25
Coomassie Serva Blue R / G 250	Serva	--	--	--
Diethylether	Merck	F^+	12-19	9-16-28-33
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck	--	--	--
Dioctylnatriumsulfosuccinat (DONS)	Fluka	Xn	22	22-24/25
EAST-Testkit	Allergo-pharma	--	--	--
Essigsäure, > 99 %	Merck	C	10-35	2-23.2-26
Ethanol, 96 %	Merck	F	11	7-16
Ethanolamin	Merck	Xi	20-36/37/38	--
Formaldehyd, 37 %	Merck	T	23/24/25-40-43	26-36/37-44-51

Tab. 7.39 (2/2): Verwendete Chemikalien

Chemikalie	Hersteller	Gef.-Symbol	R-Sätze	S-Sätze
Glutardialdehyd, 25 %	Merck	T	25-36/37/38-42/43	36-44
Glycerin, 87 %	Fluka	--	--	--
Magermilchpulver	Glücks-klee	--	--	--
β-Mercaptoethanol	Serva	T	22-24-36/37/38	26-36/37-45
Methylenblau	Merck	--	--	--
Methylrot	Merck	--	--	--
LMW Gel Filtration Calibration Kit (13.7-2000 kDa)	Pharma-cia	--	--	--
MG-Marker, SDS-PAGE (14-94 kDa)	Serva	--	--	--
Natriumacetat-Trihydrat	Merck	--	--	--
Natriumazid	Merck	T^+	28-32	28.1
Natriumcarbonat, wasserfrei	Merck	Xi	36	22-26
Natriumchlorid	Merck	--	--	--
Natriumcitrat	Merck	--	--	--
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat	Merck	--	--	--
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva	Xn	20/22-36/38	26-28
Natriumhydrogencarbonat	Merck	--	--	--
di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Merck	--	--	--
Natriumhydrogensulfit	Fluka	Xn	7-22-31	7/8-26-28-43.11
Natriumhydroxid	Fluka	C	35	26-37/39-45
Natriumhypochlorit-Lösung	Fluka	C	31-34	28-45-50.1
Natriumthiosulfat-Pentahydrat	Merck	--	--	--
NuPAGE™ MES SDS Running Buffer (Fertiglösung)	Novex	--	--	--
NuPAGE™ Tris-Acetat-SDS-Puffer mit (Fertiglösung)	Novex	--	--	--
Ovalbumin	Fluka	--	--	--
o-Phosphorsäure, 85 %	Merck	C	34	26-36/37/39-45
PBS-Tabletten	Sigma	--	--	--
Pyronin Y	Fluka	--	--	--
Salzsäure, 37 %	Merck	C	34-37	26-36/37/39-45
Schwefelsäure, 98 %	Merck	C	35	2-26-30
Seesand	Merck	--	--	--
Selenreaktionsgemisch	Merck	--	--	--
Sephacryl S 100 HR	Pharma-cia	--	--	--
Silbernitrat	Merck	C	34	26-45
Streptavidin-HRP-Konjugat	Medac	--	--	--
3,3`,5,5`-Tetramethyl-Benzidin (TMB)	Fluka	--	--	--
Titriplex III (EDTA)	Serva	Xn	22	--
Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan (Tris)	Merck	Xi	36/38	--
Tween 20	Serva	--	--	--
Wasserstoffperoxid, 30 %	Merck	C	34	28-36/39

7.16.2 Geräte

Tab. 7.40: Geräte

Gerät	Modell	Hersteller
Autoklav	MCS-123 (max. 140 °C, 3 bar)	Sano clav
Blotting-Elektroden	Nova Blot 2117-250	Pharmacia
Elektrophorese-Kammer	EI 9001-Xcell II™ Mini Cell	Novex
ELISA-Reader	Microplate Reader MRX	Dynex Technologies
Kjeldahl Aufschlussblock	Digestion System 6, Digester 1007	Digestion System
Kjeldahl Destillationsapparatur	Vapodest 12	Vapodest
Lyophilisator	BETA 1-16	Christ
Magnetrührer	MR 2002	Heidolph
Mikrowelle	HF 1102 (500 W)	Siemens
pH-Elektrode	H 6160	Schott
pH-Meter	CG 801	Schott
Pumpe	LKB Pump P-1	Pharmacia
Säule	Pharmacia XK 26 Chromato-graphiesäule; Füllvolumen 450 mL	Pharmacia
Schüttler	Type 3016	GFL - Gesellschaft für Labortechnik m.b.H. & Co., Hannover-Vinnhorst
Stromversorger I	Power Ease 500	Novex
Stromversorger II	Multidrive XL	Pharmacia LKB
Thermostat	FS 2	Haake
Tiefkühltruhe - 20 °C	GTS 3663	Liebherr
Tiefkühltruhe - 80 °C	KLS 3085-1	Kryotec
Trockenschrank	Fab. Nr. 9108361	Heraeus Instruments
Ultra-Turrax	T 25	Jahnke & Kunkel
UV-Detektor	L-4000 UV-Detektor	Merck-Hitachi
Vortex	Vortex Genie 2™	Bender & Hobein Ag Zurich, Switzerland
Waage (fein)	Sartorius 1202 MP	Sartorius Werke GmbH, Göttingen
Waage (grob)	Sartorius 1602 004	Sartorius Werke GmbH, Göttingen
Zentrifuge	3 K 15	Sigma

7.16.3 Verbrauchsmittel und Zubehör

Tab. 7.41: Verbrauchsmittel und Zubehör

Verbrauchsmittel bzw. Zubehör	Modell/Ausführung	Hersteller
Blotmembran	Nitrocellulose, 0,2 µm Porengröße	Schleicher & Schuell
Färbe-Kunststoffschalen	8 Kammern zu 0,5 cm	Bio Rad
Filterpapierscheiben	Rundfilter, 6 mm	Schleicher & Schuell
Filterpapier	Rundfilter 50 mm	Schleicher & Schuell
NuPAGE™; 7 % Tris-Acetat-Gele	7 % Tris-Acetat-Gel	Novex
NuPAGE™ ;12 % Bis-Tris-Gele	12 % Bis-Tris-Gel	Novex
Mikrotiterplatten	Minisorb, 96 wells	Nunc
Membranfilter für GPC	ME 24; Porengröße: 0,2 µl;Ø: 47 mm	Schleicher und Schuell
Parafilm	M	American National CAn
Pipettenspitzen	diverse	Eppendorf
Reaktionsgefäße	Safe Lock	Eppendorf
Siedesteine	2 - 8 mm Durchmesser	Merck
Vials	4 ml	Eppendorf

8 Literatur

AALBERSE, RC (2000) Structural biology of allergens. *J Allergy Clin Immunol*, **106**, 228-238

AAS, K; BACKMANN, A; BELIN, L; WEEKE, B (1978) Standardization of allergen extracts with appropiate methods. The combined use of skin prick testing and radio-allergo-sorbent tests. *Allergy*, **33**, 130-137

AHLROTH, K; ALENIUS, H; TURJANMAA; K; MÄKINEN-KILJUNEN, S; REUNALA, T; PALOSUO, T (1995) Crossreacting allergens in natural rubber latex and avocado. *J Allergy Clin Immunol*, **96**, 167-173

ALLERGOPHARMA (2000) Allergopharma Spez. IgE TR (RV), Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von allergenspezifischem IgE in Serum oder Plasma, Mikrotiterversion für 100 In-vitro-Tests. Joachim Ganzer KG, D-21462 Reinbek, Germany

AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH (1998) Gel filtration: Principles and methods. 8th edition, Uppsala - Sweden

ASTWOOD, JD; LEACH, JN; FUCHS, RL (1996) Stability of food allergens to digestion in vitro. *Nature Biotechnol*, **14**, 1269-1273

AULEPP, H; VIETHS, S (1992) Probleme der Nahrungsmittelallergie. *Dtsch Lebensm Rundsch*, **88**, 171-179

BALTES, W (2000) Lebensmittelchemie. 5. Auflage, Springer Verlag, Berlin

BARGMAN, TJ; RUPNOW, JH; TAYLOR, SL (1992) IgE binding proteins in almonds (*Prunus amygdalus*); Identification by immunoblotting with sera from almond-allergic adults. *J Food Sci*, **57**, 717-720

BARKHOLT, V; JÖRGENSEN, PB; SÖRENSEN, D; BAHRENSCHEER, J; HAIKARA, A; LEMOLA, E; LAITILA, A; FRÖKIAER, H (1998) Protein modification by fermentation: effect of fermentation on the potential allergenicity of pea. *Allergy*, **53**, 106-108

BARNETT, D; BALDO, BA; HOWDEN, MEH (1983) Multiplicity of allergens in peanut. *J Allergy Clin Immunol*, **72**, 61-68

BARNETT, D; HONS, BS; BONHAM,B; HOWDEN, MEH (1987) Allergenic cross-reactions among legume foods - An in vitro study. *J Allergy Clin Immunol*, **79**, 433-438

BAUR, X; HÄBERLE, M; SAUER, W; WEISS, W (1988) Verborgene Inhalations- und Nahrungsmittelallergene: Leguminosenproteine. *Prax Klein Pneumol*, **42**, 701-704

BECKER, WM (1997) Characterization of Ara h 1 by two-dimensional electrophoresis immunoblot and recombinant techniques: new digestion experiments with peanuts imitating the gastrointestinal tract. *Int Arch Allergy Immunol*, **113**, 118-121

BELITZ, HD; GROSCH, W; SCHIEBERLE, P (2001) Lehrbuch der Lebensmittelchemie, 5. Auflage, Springer Verlag, Berlin

BERNHISEL-BROADBENT, J; SAMPSON, HA (1989) Cross-allergenicity in the legume botanical family in children with food hypersensitivity, *J Allergy Clin Immunol*, **83**, 435-440

BERNHISEL-BROADBENT, J; TAYLOR, S; SAMPSON, HA (1989) Cross-allergenicity in the legume botanical family in children with food hypersensitivity, *J Allergy Clin Immunol*, **84**, 701-709

BERNHISEL-BROADBENT, J; SCANLON, SM; SAMPSON, HA (1992) Fish hypersensitivity. I. In vitro and oral challenge results in fish-allergic patients. *J Allergy Clin Immunol*, **89**, 730-737

BERNHISEL-BROADBENT, J; DINTZIS, HM; DINTZIS, RS; SAMPSON, HA (1994) Allergenecity and antigenicity of chicken egg ovomucoid (Gal d 3) compared with ovalbumin (Gal d 1). *J Allergy Clin Immunol*, **93**, 1047-1059

BESLER, M; STEINHART, H; PASCHKE, A (2001) Stability of food allergens and allergenicity of processed foods. *J Chromatogr B*, **756**, 207-228

BHALLA, PL; SWOBODA, I; SINGH, MB (2001) Reduction in Allergenicity of grass pollen by genitic engineering. *Int Arch Allergy Immunol*, **124**, 51-54

BHUSHAN, R; REDDY, KRN (1990) Complete amino acid sequence of arachin subunit of molecular weight 21000. *Int J Pept Protein Res*, **35**, 406-415

BLEUMINK, E; BERRENS, L; YOUNG, E (1967) Studies on the atopic allergen in ripe tomato fruits. II: Further chemical characterization of the purified allergen. *Int Arch Allergy Appl Immunol*, **31**, 25-27

BOCK, SA; ATKINS, FM (1988) Allergenic cross-reactivity among legume foods. *J Allergy Clin Immunol*, **82**, 310-312

BOWLES, DJ (1990) Defense-related proteins in higher plants. *Annual review of biochemistry*, **59**, 873-907

BRADFORD, MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, **72**, 248-254

BRENNA, O; POMPEI, C; ORTOLANI, C; PRAVETTONI, V; FARIOLI, L; PASTORELLO, E (2000) Technological processes to decrease the allergenicity of peach juice and nectar. *J Agric Food Chem*, **48**, 493-497

BROCKHAUS (2001) Bibliographisches Institut & F.A. Brockhaus AG

BRUIJNZEEL-KOOMEN, C; ORTOLANI, C; AAS, K; BINDSLEV-JENSEN, C; BJÖRKSTEN, B; WÜTHRICH, B (1995) Adverse reactions to food. *Position paper of the European Academy of Allergy and Clin Immunol*, **50**, 623-635

BUNDESSORTENAMT (2003): http://www.bundessortenamt.de

BURKS, A JR; BROOKS, JR; SAMPSON, HA (1988) Allergenicity of major component proteins of soybean determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and immunoblotting in children with atopic dermatitis and positive soy challenges. *J Allergy Clin Immunol*, **81**, 1135-1142

BURKS, AW; WILLIAMS, LW; HELM, RM CONNAUGHTON, C.; COCKRELL, G.; O´BRIEN, T (1991) Identification of a major peanut allergen, Ara h I, in patients with atopic dermatitis and positive peanut challenges. *J Allergy Clin Immunol*, **88**, 172-179

BURKS, AW; WILLIAMS, LW; CONNAUGHTON, C.; COCKRELL, G.; O´BRIEN, T (1992a) Identification and characterization of a second major peanut allergen, Ara h II, with the use of the sera of patients with atopic dermatitis and positive challenges. *J Allergy Clin Immunol*, **90**, 962-969

BURKS, AW; WILLIAMS, LW; THRESHER, W; CONNAUGHTON, C.; COCKRELL, G.; HELM, J (1992b) Allergenicity of peanut and soybean extracts altered by chemical or thermal denaturation in patients with atopic dermatitis and positive food challenge. *J Allergy Clin Immunol*, **90**, 889-897

BURKS, AW; SAMPSON, H (1993) Food allergies in children. *Curr Probl Pediatr*, **23**, 230-252

BURKS, AW; COCKRELL, G; STANLEY, JS; HELM, RM; BANNON, GA (1995) Recombinant peanut allergen Ara h 1 expression and IgE binding in patients with peanut hypersensitivity. *J Clin Invest*, **96**, 1715-1721

BURKS, AW; FUCHS, RL (1995) Assessment of the endogenous allergens in glyphosphate-tolerant and commercial soybean varieties. *J Allergy Clin Immunol*, **96**, 1008-1010

BURKS, AW; WILLIAMS, LW; HELM, RM; THRESHER, W; BROOKS, JR; SAMPSON, HA (1999) Identification of soy protein allergens in patients with atopic dermatitis and positive soy challenges; determination of change in allergenicity after heating or enzyme digestion. *Adv Exp Med Miol*, **289**, 295-305

BUSH, RK; SCHROECKENSTEIN, D; MEIER-DAVIS, S; BALMES, J; REMPEL, D (1988) Soybean flour asthma: detection of allergens by immunoblotting. *J Allergy Clin* Immunol, **82 (2)**, 251-255

CARRILLO, T; CUEVAS, M; DIEZ, ML; LOSADA, E; MONEO, I (1986) Diagnostico immunologico in vitro en la hipersensibilidad a legumbres. *Allergol Immunopathol*, **14**, 139-146

CASTILLO, R; DELGARDO, J; QUIRALTE, J; BLANCO, C; CARRILLO, T (1996) Food hypersensitivity among adult patients: epidemological and clinical aspects. *Allergol Immunopathol*, **24**, 93-97

CESKA, M; LUNDKVIST, U (1972) A new and simple radioimmunoassay method for the determination of IgE. *Immunochem*, **9**, 1021-1030

CHANDRA, RK (1997) Food hypersensitivity and allergic disease: a selective review. *Am J Clin Nutr*, **66**, 526S-529S

CLEMENTS, RL (1965) Fruit proteins: extraction and electrophoresis. *Anal Biochem*, **13**, 390-401

CODINA, R; LOCKEY, RF; FERNANDEZ-CALDAS, E; RAMA, R (1997) Purification and characterization of a soybean hull allergen responsible for the Barcelona asthma outbreaks. II. Purification and sequencing of the Gly m 2 allergen. *Clin Exp Allergy*, **27**, 424-430

COOMBS, RRA; GELL, PGH (1963) The classification of allergic reactions underlaying disease. in: COOMBS, RRA (Hrsg.) Clinical aspects of immunology. Davis, Philadelphia

CRESPO, JF; PASCUAL, C; BURKS, AW; HELM, RM; ESTEBAN, MM (1995) Frequency of food allergy in a pediatric population from Spain. *Pediatr Allergy Immunol*, **6**, 39-43

DANIELSSON, CE (1952) A contribution to the study of the synthesis of the reserve proteins in ripening pea seeds. *Acta chem Scand*, **6**, 149

DANIELSSON, CE; LIS, H (1952) Differences in the chemical composition of some pea proteins. *Acta Chem Scand*, **6**, 139

DANSCHER, G; NOORGARD, JOR (1983) Light microscopic visualization of colloidal gold on resin-embedded tissue. *J Histochem Cytochem*, **31**, 1394

DAROCA, P; CRESPO, JF; REANO, M; JAMES, JM; LOPEZ-RUBIO, A; RODRIGUEZ, J (2000) Asthma and rhinitis induced by exposure to raw green beans and chards. *Ann Allergy Asthma Immunol*, **85**, 215-218

DAUL, CB; SLATTERY, M; REESE, G; LEHRER SB (1994) Identification of the major brown shrimp (*Penaeus aztecus*) allergen as the muscle protein tropomyosin. *Int Arch Allergy Immunol*, **105**, 49-55

DELINCEE, H (1983) Recent advances in radiation chemistry of proteins. In: Elias, PS; Cohen, AJ (eds.) Recent advances in food irradiation, 129-147. Elsevier, Amsterdam

DIEHL, JF (1990) Saftey of irradiated foods. Marcel Dekker, New York

DYBKAER, R.; JÖRGENSEN, K. (1967) Quantities and Units in Clinical Chemistry, IUPAC Recommendations 1966, Munksgaard, Copenhagen

EDMAN, P; BEGG, G (1967) A protein sequenator. *Eur J Biochem*, **1**, 80-91

EGGER, D; BIENZ, K (1987) Colloidal gold staining and immunoprobing of proteins on the same nitrocellulose blot. *Anal Biochem*, **166**, 413-417

EIGENMANN, PA; BURKS, AW; BANNON, GA; SAMPSON, HA (1996) Identification of unique peanut and and soy allergens in sera adsorbed with cross-reacting antibodies. *J Allergy Clin Immunol*, **98**, 969-978

ELSAYED, S; APOLD, J; HOLEN, E; VIK, H; FLOORVAAG, E; DYBENDAL, T (1991) The structural requirements of epitopes with IgE binding capacity demonstrated by three major allergens from fish, egg and tree pollen. *Scand J Lab Invest*, **51** (Suppl 204), 17-31

ELSAYED, S; STAVSENG, L (1994) Epitope mapping of region 11-70 of ovalbumin (Gal d I) using five synthetics peptides. *Int Arch Allergy Appl Immunol*, **104 (1)**, 65-71

ENGELHARD, VH (1994) Die Antigen-Prozessierung. *Spektrum der Wissenschaft*, **10**, 48-56

FAO (2003) http://apps.fao.org/page/collections?subset=agriculture

FLING, PS; GREGERSON, DS (1986) Peptide and protein molecular weight determination by using a high molarity tris buffer system without urea. *Anal Biochem*, **155**, 83-88

FRANKE, W (1997) Nutzpflanzenkunde. 6. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart

FRIES, JH (1982) Peanut: Allergic and other untoward reactions. *Ann Allergy*, **48**, 220-226

FU, TJ; ABBOTT, UR; HATZOS, C (2002) Digestibility of Food Allergens and noallergenic Proteins in Simulated Gastric Fluid and Simulated Intestinal Fluid - A Comparative Study. *J Agric Food Chem*, **50**, 7154-7160

GACIA-OLMEDO, F; MOLINA, A; SEGURA, A; MORENO,M (1995) The defense role of nonspecific lipid transfer proteins in plants. *Trends in Microbiology*, **3**, 72-74

GALLATI, H; PRACHT, L (1985) Peroxidase aus Meerrettich: Klinische Studien und Optimierung der Peroxidase-Aktivitätsbestimmung mit den Substraten H_2O_2 und 3,3`,5,5`-Tetramethylbenzidin. *J Clin Chem Clin Biochem*, **23**, 453-460

GEHA, R (1995) Immunreaktion in Abwesenheit einer Infektion. in: JANEWAY, C; TRAVERS, P (Hrsg.) Immunologie. Spektrum Akademischer Verlag-Heidelberg, 489-538

GLICK, BR; PASTERNAK, JJ (1995) Molekulare Biotechnologie. Spektrum Akademischer Verlag-Heidelberg

GONZALES, R; POLO, F; ZAPATERO, L; CARAVACA, F; CARREIRA, J (1992) Purification and characterization of major inhalant allergens from soybean hulls. *Clin Exp Allergy*, **22**, 748-755

GOVOROV, LJ (1929/30) Erbsen in Abessinien. Zum Problem des Ursprungs der kultivierten Erbsen. *Bull Appl Bot Gen Plant Breed*, **24**, 399-431

GUTTMAN, A (1996) Capillary sodium dodecyl-sulfate gel electrophoresis of Proteins. *Electrophoresis*, **17**, 1333-1341

HAGEL, L; LUNDSTRÖM, H; ANDERSSON, T; LINDBLOM, H (1989) Properties, in theory and practice, of novel gel filtration media for standard liquid chromatography. *J Chromatogr*, **104**, 329-344

HAHN, H; MICHAELSEN, I (1996) Mikroskopische Diagnostik pflanzlicher Nahrungs-, Genuß- und Futtermittel, einschließlich Gewürze. Springer Verlag, Berlin

HANDMAN, E; JARVIS, HM (1985) Nitrocellulose-Based Assays for the Detection of Glycolipids and other Antigens: Mechanism of Binding to Nitrocellulose. *J Immunol Meth*, **83**, 113-123

HANCOCK, K; TSANG, VCW (1983) India Ink Staining of Proteins on Nitrocellulose Paper. *Anal Biochem*, **133**, 157-162

HAYAKAWA, K; LINKO, YY; LINKO, P (1999) Mechanism and control of food allergy. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, **32**, 1-11

HERIAN, AM; TAYLOR, SL; BUSH, RK (1990) Identification of soybean allergens by immunoblotting with sera from soy-allergic adults. *Int Arch Allergy Appl Immunol*, **92**, 193-198

HEFLE, SL; LEMANSKE, RF; BUSH, RK (1994) Adverse reactions to lupine-fortified pasta. *J Allergy Clin Immunol*, **94**, 167-172

HEFLE, SL (1996) The chemistry and biology of food allergens. *Food Technol*, **50**, 86-92

HEGI, G (1964a) *Phaseolus* L. Gartenbohne, Fisole und *Phaseolus vulgaris* L. In: Illustr Flora von Mitteleuropa, 2. Auflage, Bd IV/3, 1626-1636, Verlag Paul Parey, Berlin

HEGI, G (1964b) *Pisum* L. Erbse. In: Illustr Flora von Mitteleuropa, 2. Auflage, Bd IV/3, 1610-1619, Verlag Paul Parey, Berlin

HEINER, DC; NEUCERE, NJ (1975) RAST analysis of peanut allergens. *J Allergy Clin Immunol*, **55**, 82-83

HEISS, R; EICHNER, K (2002) Haltbarmachen von Lebensmitteln. 4. Auflage, Springer Verlag, Berlin

HELBING, A (1994) Nahrungsmittelallergie. *Therapeutische Umschau*, **51**, 31-37

HENZGEN, M; RUDESCHKO, O; SCHLENVOIGT, G; JÄGER, L (1998) Mangoallergie als Ausdruck einer Kreuzreaktion? *Allergologie*, **21 (7)**, 338-343

HEUKESHOVEN, J; DERNICK, R (1986) Neue Ergebnisse zum Mechanismus der Silberfärbung. In: Radola, BJ (ed.) *Elektrophoreseforum*, TU München, 22-27

HILL, DJ; HOSKING, CS; ZHIE, CY; LEUNG, R; BARATWIDJAJA, K; IIKURA, Y (1997) The frequency of food allergy in Australia and Asia. *Environ Toxicol Pharmacol*, **4**, 101-110

HILL, DJ; HOSKING, CS; HEINE, RG (1999) Clinical spectrum of food allergy in children in australia and south-east asia: identification and targets for treatment. *Ann Med*, **31**, 272-281

HOFER, T; WÜTHRICH, B (1985) Nahrungsmittelallergien II, Häufigkeit der Organmanifestation und der allergieauslösenden Nahrungsmittel. *Schweiz Med Wschr*, **115**, 1437-1442

HSIEH, LS; MOOS JR, M; LIN, Y (1995) Characterization of apple 18 and 31 kd allergens by microsequencing and evaluation of their content during storage and ripening. *J Allergy Clin Immunol*, **96**, 960-970

IBANEZ, MD; MARTINEZ, M; FERNANDEZ-CALDAS, E; SANCHEZ, JJ; MARANON, F; ALONSO, E; MUNOZ, MC; LASO, MT (1997) Allergy to legumes. Clinical and immunological studies. *Cuadernos Imunoalergologia Pediatrica*, **12**, 57-58

IBANEZ SANDIN, D; MARTINEZ SAN IRENEO, M; MARANON LIZANA, F; FERNANDEZ-CALDAS, E; ALONSO LEBRERO, E; LASO BORREGO, T (1999) Specific IgE determinations to crude and boiled lentil (*Lens culinaris*) extracts in lentil-sensitive children and controls. *Allergy*, **54**, 1209-1214

IGEA, JM; FERNANDEZ, M; QUIRCE, S; DE LA HOZ, B; DIEZ GOMEZ, ML (1994) Green bean hypersensitivity: an occupational allergy in a homemaker. *J Allergy Clin Immunol*, **94**, 33-35

INTERNATIONAL UNION OF BIOCHEMISTRY (1961) Report of the Commission on Enzymes. Pergamon Press, Oxford

JACOBS, MB (1951) The chemistry and technology of food and food products. 2. edition, New York, *Interscience Publishers*, Vol. 2

JENSEN-JAROLIM, E; SANTNER, B; LEITNER, A; GRIMM, R; SCHEINER, O; EBNER, C; BREITENEDER, H (1998) Bell peppers (*Capsicum annuum*) express allergens (profilin, pathogenesis-related protein P23 and Bet v 1) depending on the horticultural strain. *Int Arch Allergy Immunol*, **116**, 103-109

JOHNSON, DA; GAUTSCH, JW; SPORTSMAN, JR; ELDER, JH (1984) Improved technique utilizing nonfat dry milk for analysis of proteins and nucleic acids transferred to nitrocellulose. *Gene Anal Technol*, **1**, 3-11

JONG, EC DE; ZIJVERDEN, M VAN; SPANHAAK, S; KOPPELMAN, SJ; PELLEGROM, H; PENNINKS, AH (1998) Identification and partial characterization of multiple major allergens in peanut proteins. *Clin Exp Allgery*, **28**, 743-751

KADER, JC (1996) Lipid transfer proteins in plants. *Annu Physiol Plant Mol Biol*, **47**, 627-654

KAY, AB (1997) Concepts of allergy and hypersensitivity. In: Kay, AB: Allergy and allergic disease. Blackwell Science, London

KEATING, MU; JONES, RT; WORLEY, NJ; SHIVELY, CA; YUNGINGER, JW (1990) Immunoassays of peanut allergens in food-processing materials and finished foods. *J Allergy Clin Immunol*, **86**, 41-44

KELLER, R (1987) Immunologie und Immunpathologie. 3. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart

KHYSE-ANDERSEN, J (1984) Electroblotting of multiple gels: A simple horizontal apparatus without buffer tank for electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamid to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Methods*, **10**, 203-209

KINDER, H (1999) DIE TYP I Allergie gegen Mangofrüchte unter Berücksichtigung von Kreuzreaktionen. Dissertation Universität Hamburg

KLEBER, H; SCHLEE, D (1991) Biochemie I – allgemeine und funktionelle Biochemie, 2. Auflage, UTB, Gustav-Fischer-Verlag, Jena

KÖRBER-GROHNE, U (1987) Grüne Bohne, Gewöhnliche Gartenbohne (*Phaseolus vulgaris* L.) . In: Nutzpflanzen in Deutschland. Kulturgeschichte und Biologie, 99-114, Verlag Konrad Theiss, Stuttgart

KONAN, KN; VIQUEZ, OM (2002) Downregulation or Ara h 2, a major peanut allergen in transgenic peanut plants. *J Allergy Clin Immunol*, **109**, 163

KONDO, Y; URISUS, A; TOKUDA, R (2001) Identification and characterization of the allergen in the tomato fruit by immunoblotting. *Int Arch Allergy Immunol*, **126**, 294-299

KOPPELMAN, SJ; BRUIJNZEEL-KOOMEN, CA; HESSING, M; JONGH, HH DE (1998) Heat-induced conformational changes of Ara h 1, a major peanut allergen, do not affect its allergenic properties. *J Biol Chem*, **274**, 4770-4777

KOPPELMAN, SJ; VLOOSWIJK, RAA; KNIPPELS, LMJ; HESSING, M; KNOL, EF; VAN REIJSEN, FC; BRUIJNZEEL-KOOMEN, CAFM (2001) Quantification of major peanut allergens Ara h 1 and Ara h 2 in the peanut varieties runner, Spanish, Virginia, and Valencia, bred in different parts of the world. *Allergy*, **56**, 132-137

KORTEKANGAS-SAVOLAINEN, O; SAVOLAINEN, J; EINARRSON, R (1993) Gastrointestinal stability of baker's yeast allergens: an in vitro study. *Clin Exp Allergy*, **23**, 587-590

KREFT, D; BAUER, R; GÖHRLICH, R (1995) Nahrungsmittelallergene – Charakteristika und Wirkungsweise. de Gruyter, Berlin/New York

LALLES, JP; PELTRE, G (1996) Biochemical features of grain legume allergens in human and animals. *Nutr Rev*, **54**, 101-107

LEBENSMITTELRECHT (STAND JANUAR 2003) Verlag CH Beck, München

LMKV (1992) Verordnung über die Kennzeichnung von Lebensmitteln i.d.F. der Neufassung vom 06.09.1984 (BGBl. I, S. 1221), zuletzt geändert durch die Verordnung zur Änderung der Lebensmittelkennzeichnungs-VO und anderen lebensmittelrechtlichen Bestimmungen (LMKV) vom 29.01.1998 (BGBl. I, S. 230)

LMBESTRV (2000) Verordnung über die Behandlung von Lebensmitteln mit Elektronen-, Gamma- und Röntgenstrahlen, Neutronen oder ultravioletten Strahlen vom 14.12.00 (BGBl. I, Nr. 55, 1730-1733)

ASU, Nr. L 00.90-6 (2002) Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG, Übernahme der gleichnamigen Deutschen Norm DIN 10964

ASU, Nr. L 06.00-3 (2002) Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG, Referenzmethoden Trockenmassebestimmung
(Durchführung nach § 35 LMBG i. V. m. ASU Nr. L 06.00-3)

ASU, Nr. L 06.00-7 (2002) Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG, Referenzmethoden Gesamtstickstoffbestimmung
(Durchführung nach § 35 LMBG i. V. m. ASU Nr. L 06.00-7)

LEHRER, SB; HORNER, WE; REESE, G (1996) Why are some proteins allergenic? Implications for biotechnology. *Cri Rev Food Sci Nutr*, **36 (6)**, 553-564

LEMANSKE, RF; TAYLOR, SL (1987) Standardized extracts, foods. *Clin Rev Allergy*, **5**, 23-36

LI, KW; GERAERTS, WP; ELK, R VAN; JOOSE, J (1989) Quantification of proteins in the subnanogram and nanogram range: comparison of the Auto Dye, Ferri Dye and India Ink staining method. *Anal Biochem*, **182**, 44-47

LÖFFLER, G (1983) Grundzüge der physiologischen Chemie. 1. Auflage, Springer Verlag, Berlin

MAHMOUD, MI; MALONE, WT; CORDLE, CT (1992) Enzymatic Hydrolysis of Casein: Effect of Degree of Hydrolysis on Allergenicity and Physical Properties. *J Food Sci*, **57**, 1223-1229

MAIER, HG (1990) Lebensmittel- und Umweltanalytik, Methoden und Anwendungen. Steinkopff Verlag Darmstadt

MALANIN, K; LUNDNERG, M; JOHANSSON, SGO (1995) Anaphylactic reaction caused by neoallergens in heated pecan nut. *Allergy*, **50**, 88-91

MALLEY, A.; BAECHER, L.; MACKLER, B.; PERLMAN, F. (1975) The isolation of allergens from the green pea. *J Allergy Clin Immunol*, **56**, 282-290

MALLEY, A.; BAECHER, L.; MACKLER, B.; PERLMAN, F. (1976) Further characterization of low molecular weight allergen fragment isolated from the green pea. *Clin Exp Immunol*, **25**, 159-164

MARTIN, JA; COMPAIRED, JA; DE LA HOZ, B; QUIRCE, S; ALONSO, MD; IGEA, JM; LOSADA, E (1992) Bronchial asthma induced by chick pea and lentil. *Allergy*, **47**, 185-187

MARTINEZ SAN IRENEO, M; IBANEZ DANDIN, MD; FERNANDEZ-CALDAS, E (2000) Hypersensitivity to members of the botanical order Fabales (legumes). *Invest Allergol Clin Immunol*, **10**, 187-199

MATHEU, V; BARRIO, M DE; SIERRA, Z ; GRACIA-BARA, MT ; TORNERO, P ; BAEZA, ML (1999) Lupine-induced anaphylaxis. *Ann Allergy Asthma Immunol*, **83**, 406-408

MATSUDA, T; NAKASHIMA, I; KATO, Y; NAKAMURA, R (1987) Antibody response to haptenic sugar antigen: Immunodominancy of protein-bound lactose formed by amino-carbonyl reaction. *Mol Immunol*, **24**, 421-425

MATSUDA, T; ISHIGURO, H; OHKUBO, I; SASAKI, M; NAKAMURA, R (1992) Carbohydrate binding specificity of monoclonal antibodies raised against lactose-protein maillard adducts. *J Biochem*; **111**, 383-387

MATSUDA, T; NAKAMURA, R (1993) Molecular structure and immunologic properties of food allergens. *Trends Food Sci Technol*, **41**, 289-293

MCEVILY, AJ; IYENGAR, R; OTWELL, WS (1992) Inhibition of enzymatic browning in foods and beverages. *Crit Rev Food Sci Nutr*, **32**, 253-273

MEKORI, YA (1996) Introduction to allergic diseases. *Crit Rev Food Sci Nutr*, **36**, 1-18

MÖLLER, M; KAYMA, M; STEINHART, H; PASCHKE, A (1997a) Isolation and characterization of a major allergen in kiwi fruit. *Z Lebensm Unters Forsch*, **205**, 364-369

MÖLLER, M; PASCHKE, A; VIELUF, D; KAYMA, M; VIETHS, S; STEINHART, H (1997b) Characterization or allergens in kiwi fruit and detection of cross-reactivity with allergens of birch pollen and related fruit allergens. *Food Agric Immunol*, **9**, 107-121

MONERET-VAUTRIN, DA (1998) Modifications of allergenicity linked to food technologies. *Allergie et Immunologie*, **30**, 9-16

MONERET-VAUTRIN, DA; GUERIN, L; KANNY, G; FLABBEE, J; FREMONT, S; MORISSET, M (1999) Cross-allergenicity of peanut and lupine: the risk of lupine allergy in patients allergic to peanuts. *J Allergy Clin Immunol*, **104**, 883-888

MOROZ, LA; YANG, WA (1980) Kunitz soybean trypsin inhibitor. A specific allergen in food anaphylaxis. *New Engl J Med*, **302**, 1126-1128

MÜLLER, U; WEBER, W; HOFFMANN, A; FRANKE, S; LANGE, R; VIETHS, S (1998) Commercial soybean lecithins. a source of hidden allergens? *Z Lebensm Unters Forsch A*, **207**, 341-351

NACLERIO, RM, BAROODY, F (1998) Understanding the inflammatory processes in upper allergic airway disease and asthma. *J Allergy Clin Immunol*, **101**, 345-351

NIEMEIJER, NR; DE MONCHY, JGR; MEIJER, GH (1996) Optimization, standardization and control of allergens. In: Wüthrich, B; Ortolani, C (eds): Highlights in Food Allergy. Karger, Basel, 50-56

NIESTIJL JANSEN, JJ; KARDINAAL, AFM; HUIJBERS, G; VLIEG-BOERSTRA, BJ; MARTENS, BP; OCKHUIZEN, T (1994) Prevalence of food allergy and intolerance in the adult Dutch population. *J Allergy Clin Immunol*, **93**, 446-456

NIPHADKAR, PV; PATIL, SP; BAPAT, MM (1992) Legumes the most important food allergen in India. *Allergy*, **47**, 318

NIPHADKAR, PV; PATIL, SP; BAPAT, MM (1997) Chickpea-induced anaphylaxis. *Allergy*, **52**, 115-116

NORDLEE, JA; TAYLOR, SL; JONES, RT; YUNGINGER, JW (1981) Allergenicity of various peanut products as determined by RAST inhibition. *J Allergy Clin Immunol*, **68**, 376-382

ORTOLANI, C; ISPANO, M; ANSALONI, R; ROTONDO, F; INCORVAIA, C; PASTORELLO, EA (1998) Diagnostic problems due to cross-reactions. *Allergy*, **53**, 58-61

PASCHKE, A; KINDER, H; ZUNKER, K; WIGOTZKI, M; WEßBECHER, R; VIELUF, D; STEINHART, H (2001) Characterization of allergens in mango fruit and ripening dependence of the allergenic potency. *Food Agric Immunol*, **13**, 51-61

PASCUAL, CY; FERNANDEZ-CRESPO, J; SANCHEZ-PASTOR, S; PADIAL, MA; DIAZ-PENA, JM; MARTIN-MUNOZ, F; MARTIN-ESTEBAN, M (1999) Allergy to lentils in Mediterranean pediatric patients. *J Allergy Clin Immunol*, **103**, 154-158

PETERSEN, A; VIETHS, S; AULEPP, H; SCHLAAK, M; BECKER, WM (1996) Ubiquitous structures responsible for IgE cross-reactivity between tomato fruit and grass pollen allergens. *J Allergy Clin Immunol*, **98**, 805-815

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

READ, SM; NORTHCOTE, DH (1981) Minimization of variation in the response to different proteins of the Coomassie Blue G dye binding assay for protein. *Anal Biochem*, **116**, 53-64

REICH, S (1993) Nahrungsmittelallergien – Allergien und pseudoallergische Reaktionen. *AID Verbraucherdienst*, **38**, 51-56

RING, J (1988) Klinik und Einteilung allergischer Erkrankungen. in: Angewandte Allergologie, Medizin Verlag GmbH, München

RING, J (1989) Nahrungsmittelallergien und andere nahrungsbedingte Unverträglichkeitsreaktionen. *Akt Ernährung*, **14**, 49-56

RING, J ; BROCKOW, K; BEHRENDT, H (2001) Adverse reactions to food. *J Chromatogr B*, **756**, 3-10

ROITT, IM (1993) Leitfaden der Immunologie. 4. Auflage, Blackwell Wissenschaft, Berlin

ROTH, L; DAERER, M; KORMAN, K (1988) Giftpflanzen-Pflanzengifte: Vorkommen-Wirkung-Therapie/Allergische, phytotoxische Reaktionen. 3. Auflage, ecomed Verlagsgesellschaft mbH, Landsberg

SACHS, MI; O´CONNELL, EJ (1988) Cross-reactivity of food mechanisms and clinical significance. *Ann Allergy*, **61**, 36-40

SAMPSON, HA (1991) Immunologic mechanism in adverse reactions to foods. *Immunology and Allergy Clinics of North America*, **11**, 701-716

SAMPSON, HA (1992) Food Hypersensitivity: Manifestations, Diagnosis and Natural History. *Food Technol*, **46**, 141-144

SANCHEZ-MONGE, R; LOMBARDERO, M; GARCIA-SELLES, FJ; BARBER, D; SALCEDO, G (1999) Lipid-transfer proteins are relevant allergens in fruit allergy. *J Allergy Clin Immunol*, **103**, 514-519

SANCHEZ-MONGE, R; PASCUAL, CY; DIAZ-PERALES, A; FERNANDEZ-CRESPO, J; MARTIN-ESTEBAN, M; SALCEDO, G (2000) Isolation and characterization of relevant allergens from boiled lentils. *J Allergy Clin Immunol*, **106**, 955-961

SCHLIEPER, CA (2001) Grundfragen der Ernährung. Verlag Dr. Felix Büchner – Verlag Handwerk und Technik GmbH, Hamburg

SCHMIDT, RF; THEWS, G (1995) Physiologie des Menschen. 26. Auflage, Springer Verlag, Berlin

SCHUSTER, W (2000) Universität Giessen. http://bibd.uni-giessen.de/gdoc/2000/uni/p00000/erbse.htm

SCHWANITZ, F (1967) Die Evolution der Kuturpflanzen. Bayer Landw Verlag, München

SHIBASAKI, M; SUZUKI, S; TAJIMA, S; NEMOTO, H; KUROUME,T (1980) Allergenicity of major component proteins of soybean. *Int Arch Allergy Immunol*, **61**, 441-448

SON, DY; SCHEURER, S; HOFFMANN, A; HAUSTEIN, D; VIETHS, S (1995) Pollen-related food allergy: cloning and immunological analysis of isoforms and mutants of Mal d 1, the major apple allergen, and Bet v 1, the major birch pollen allergen. *Eur J Nutr*, **38**, 201-215

SOUCI, SW; FACHMANN, W; KRAUT, H (1991) Lebensmitteltabellen für die Praxis; herausgegeben von der Deutschen Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie, Garching bei München, 2. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart

SPREITZER, H (1996) Nahrungsmittelallergene, *ÖAZ*, **50**, 248-253

STAINES, N; BROSTOFF, J; JAMES, K (1997) Immunologisches Grundwissen. 3. Auflage, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart

STINITZ, A; HEITZ, T; PRASEAD, V; WIEDERMANN-MERDINOGLU, S; KAUFFMANN, S; GEOFFROY, P; LEGRAND, M; FRITIG, B (1993) Plant `pathogenisis related` proteins and their role in defense against pathogens. *Biochemie*, **75**, 687-692

STOTT, DI (1989) Immunoblotting and dot blotting. *J Immunol Meth*, **119**, 153-187

SUTTON, BJ; GOULD, HJ (1993) The human IgE network. *Nature*, **366**, 421-428

SWISSPROT (2003) http://www.expasy.ch

TÄUFEL, A,; TERNES, W; TUNGER, L; ZOBEL, M (1998) Lebensmittellexikon, 3., neubearbeitete und aktualisierte Ausgabe, Behr´s Verlag, Hamburg

TAN, JZ; LOU, CF; HIRANO, H (1999) Analysis of leginsulin gene in soybean culitvar (Glycine max) and wild species (Glycine soja). *Chin J Appl Environ Biol*, **5**, 259-263

TAYLOR, SL; NORDLEE, JA; YUNGINGER, JW (1982) Evidence for the existence of multiple allergens in peanut (Abstract). *J Allergy Clin Immunol*, **69**, 128

TAYLOR, SL; LEMANSKE, RF JR; BUSH, RK (1987) Food allergens: structure and immunologic properties. *Ann Allergy*, **59**, 93-99

TAYLOR, SL (1992) Chemistry and detection of food allergens. *Food Technol*, **46**, 421-428

TAYLOR, SL; LEMANSKE, RF JR; BUSH, RK; BUSSE, WW (1997) Food allergens: structure and immunologic properties. *Ann Allergy*, **59**, 93-99

THIEL, C (1985) Nahrungsmittel-Allergien und Intoleranzen; *Ern Umsch*, **32**, 88-93

THIEL, C (1988) Nahrungsmittelallergien bei Pollenallergikern (sogenannte pollenassozierte Nahrungsmittelallergien). *Allergologie*, **11**, 397-410

THOMAS, WR; SMITH, W; HALES, BJ (1998) House dust mite allergen characterisation: Implications for T-cell response and immunotherapy. *Int Arch Allergy Immunol*, **115**, 9-14

UHLEMANN, L; BECKER, WM; SCHLAAK, M (1993) Nahrungsmittelallergie: Identifizierung und Charakterisierung von Erdnußallergenen mit Patientenseren und monoklonalen Antikörpern. *Z Ernährungswiss*, **32**, 139-151

UNIVERSITÄT BASEL (2003) Bilddatenbank des Botanischen Institutes. http://www.unibas.ch/botimage/art.htm

VAVILOV, N.J. (1928) Geographische Genzentren unserer Kulturpflanzen. *J Abst und Vererbungsl*, **Suppl Bd 1**, 342-369

VIELUF, D; BEIL, D; BEAUREGARD, K; VIELUF, I; KINDER, H; BEHRENDT, H; STEINHART, H; RING, J (1997) Xenobiotics and food allergy: in vivo and in vitro studies in patients with apple allergy. *Int Arch Allergy Immunol*, **113**, 352-354

VIETHS, S; SCHÖNING, B; BROCKMANN, A; AULEPP, H (1992a) Untersuchungen zur Allergie gegen Lebensmittel pflanzlicher Herkunft: Herstellung und Charakterisierung von Obst- und Gemüseextrakten für serologische Untersuchungen. *Dtsch Lebensm Rundsch*, **88**, 239-243 u. 273-279

VIETHS, S; SCHÖNING, B; BALTES, W (1992b) Allergy to fruits and vegetables in pollen-sensitive patients: Allergen characterization by IgE immunoblotting and peroxidase staining. *Food Agric Immunol*, **4**, 181-197

VIETHS, S; BROCKMANN, S; SCHÖNING, B (1992c) Nahrungsmittelallergie gegen Obst und Gemüse: Eine aktuelle serologische Untersuchung zur Sensibilisierung von Pollenallergikern. *Allergologie*, **15**, 367-379

VIETHS, S; SCHÖNING, B; AULEPP, H; BALTES, W (1993a) Identifizierung kreuzreagierender Allergene in Pollen und pflanzlichen Lebensmitteln. *Lebensmittelchemie*, **47**, 49-53

VIETHS, S; SCHÖNING, B; JANKIEWICZ, A (1993b) Occurence of IgE binding allergens during ripening of apple fruits. *Food Agric Immunol*, **5**, 93-105

VIETHS, S; FISCHER, K; DEHNE, LI; AULEPP, H; WOLLENBERGER, H; BÖGL, KW (1994a) Versteckte Allergene in Lebensmitteln, *Bundesgesundhbl*, **2**, 51-60

VIETHS, S; FISCHER, K; DEHNE, LI; BÖGL, KW (1994b) Allergenes Potential von verarbeiteten Lebensmitteln. Teil 1: Beeinflussung durch lebensmitteltechnologische Verfahren und Zubereitungstechniken. *Ernährungs-Umschau*, **41**, 140-143

VIETHS, S; FISCHER, K; DEHNE, LI; BÖGL, KW (1994c) Allergenes Potential von verarbeiteten Lebensmitteln. Teil 2: Wesentliche Lebensmittel und Fazit. *Ernährungs-Umschau*, **41**, 186-190

VIETHS, S; JANKIEWICZ, A; SCHÖNING, B; AULEPP, H (1994d) Apple allergy: the IgE-binding potency of apple strains is related to the occurrence ot the 18 kDa allergen. *Allergy*, **49**, 262-271

VIETHS, S; AULEPP, H; BECKER, WM; BUSCHMANN, L (1996) Characterization of labile and stable allergens in food of plant origin. in: EISENBRAND, G; AULEPP, H; DAYAN, AD; ELIAS, PS; GRUNOW, W; RING, J; SCHLATER, J: Food allergies and intolerances. *Verlag Chemie* – Weinheim, 130-148

VIETHS, S; JANKIEWICZ, A; AULEPP, H; HAUSTEIN, D (1997) Allergy to Heated and Processed Foods. *Arbeiten aus dem Paul-Ehrlich-Institut*, **91**, 250-262

VIETHS, S; REINDL, J; MÜLLER, U; HOFFMANN, A; HAUSTEIN, D (1999) Digestibility of peanut and hazelnut allergens investigated by a simple in vitro procedure. *Eur Food Res Technol*, **209**, 379-388

VIOQUE, J; SÁNCHEZ-VIOQUE, R; CLEMENTE, A; PEDROCHE, J; BAUTISTA, J; MILLAN, F (1999) Purification and partial characterization of chickpea 2S Albumin. *J Agric Food Chem*; **47**, 1405-1409

WARD, LD; REID, GE; MORITZ, RL; SIMPSON, RJ (1990) Strategies for internel amino acid sequence analysis of proteins separated by polyacrylamid gel electrophoresis. *J Chromatogr*, **519**, 199-216

WATANABE, Y; BARBASHOV, SF; KOMATSU, S; HEMMINGS, AM; MIYAGI, M; TSUNASAWA, S; HIRANO, H (1994) A peptide that simulates phosphorylation of the plant-insulin-binding protein. Isolation, primary structure and cDNA cloning. *Eur J Biochem*, **224**, 167-172

WEBERLING, H; SCHWANTES, A (2000) Pflanzensystematik, 7. Auflage, Ulmer-Verlag, Stuttgart

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

WHO (2003) World Health Organisation/IUIS allergen list: http://www.allergen.org

WIGOTZKI, M (2001) Einfluß der technologischen Verarbeitung auf das allergene Potential der birkenpollenassozierten Lebensmittel Haselnuß, Apfel und Karotte. Dissertation an der Universität Hamburg

WÜTHRICH, B (1993) Zur Nahrungsmittelallergie - Häufigkeit der Symptome und der allergieauslösenden Nahrungsmittel bei 402 Patienten. *Allergologie*, **7**, 280-287

WÜTHRICH, B; SCHMID-GRENDELMEIER, P (1995) Nahrungsmittelallergien. *Internist*, **36**, 1054-1062

WÜTHRICH, B (1996) Zur Nahrungsmittelallergie: Begriffsbestimmungen, Diagnostik, Epidemilogie, Klink. *Schw med Wschr*, **126**, 770-776

YAGAMI, T; HAISHIMA, Y; NAKAMURA, A; OSUNA, H; IKEZAWA, Z (2000) Digestibility of allergens extracted from natural rubber latex and vegetable foods. *J Allergy Clin Immunol*, **106**, 752-762

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

ZACHARISEN, MC; KURUP, V (1998) Anaphylaxis to beans. *J Allergy Cllin Immunol*, **101**, 556-557

ZUNKER, K (2001) Untersuchungen zur Allergenität der Mango und der Litchi. Dissertation Universität Hamburg

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name:	Marco Sell
Geburtsdatum:	23.April 1971
Geburtsort:	Husum
Familienstand:	verheiratet, 1 Kind

Ausbildung

Schulbildung:	08/77 – 06/81:	Grund- und Hauptschule Mildstedt
	07/81 – 06/91:	Hermann-Tast-Gymnasium; Husum
	06/91:	Abschluss: Allgemeine Hochschulreife
Berufsausbildung:	07/91 – 06/93:	Ausbildung zum Milchwirtschaftlichen Laboranten, Adelbyer Nordfrieslandmilch eG
	06/93:	Abschluss: Milchwirtschaftlicher Laborant
Ersatzdienst:	10/93 - 12/94	AWO-Sozialstation; Mildstedt
Studium:	04/95 – 03/00:	Studium der Lebensmittelchemie; Universität Hamburg
	03/00:	Abschlüsse: Erste Lebensmittelchemische Staatsprüfung Diplom in Lebensmittelchemie
Promotion:	04/00 - 03/03:	Themengebiet Lebensmittelallergien; Universität Hamburg

Berufstätigkeit

07/93 - 09/93:	Milchwirtschaftlicher Laborant; Adelbyer Nordfrieslandmilch eG
04/00 - 03/03:	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Bio- und Lebensmittelchemie der Universität Hamburg
seit 06/03:	Wissenschaftlicher Mitarbeiter in Forschung und Analytik am Deutschen Institut für Lebensmitteltechnik e.V. in Quakenbrück

Vorträge, Poster, Publikationen

M. SELL, H. STEINHART, A. PASCHKE

Vortrag - Jahrestagung Regionalverband Nord der GdCh, Fachgruppe Lebensmittelchemie; Kiel 2002

Veränderung der Allergenität von Gartenerbsen (*Pisum sativum* L.) im Verlauf der Reifung

M. SELL, H. STEINHART, A. PASCHKE

Poster - Deutscher Lebensmittelchemiker-Tag; Frankfurt/Main 2002

Einfluss der Konservierung auf das allergene Potential der Gartenerbse (*Pisum sativum* L.)

M. SELL, H. STEINHART, A. PASCHKE

Publikation - J Agric Food Chem (submitted)

Influence of maturation on the alteration of allergenicity of green pea (*Pisum sativum* L.)

M. SELL, H. STEINHART, A. PASCHKE

Publikation - J Agric Food Chem (submitted)

Influence of drying, autoclaving and microwave treatment on the allergenicity of green pea (*Pisum sativum* L.)