

# **Isolierung und Charakterisierung von allergieauslösenden Substanzen aus Lebensmitteln**

## **Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades  
des Fachbereichs Chemie  
der Universität Hamburg

aus dem  
Institut für Lebensmittelchemie  
der Universität Hamburg

vorgelegt von

**Qi Chen**

Hamburg 2016



1. Gutachter: Prof. Markus Fischer
2. Gutachter: Prof. Bernward Bisping

Begutachtende der Disputation:

Prof. Dr. Markus Fischer

Dr. Angelika Paschke-Kratzin

Prof. Dr. Elisabeth Stahl-Biskup

Tag der Disputation: 26.02.2016

## **Eidesstattliche Versicherung**

*Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende  
Dissertationsschrift selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen  
Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.*

Hangzhou, den 7. Februar 2016

---

Qi Chen

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Januar 2009 bis Dezember 2015 unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Markus Fischer am Institut für Lebensmittelchemie der Universität Hamburg angefertigt.

# Danksagungen

Herrn Prof. Dr. Markus Fischer möchte ich für die Überlassung des Themas, der Bereitstellung geeigneter Rahmenbedingungen zur Durchführung der Arbeit und die gute Betreuung danken.

Ein besonderer Dank geht an Frau Dr. Angelika Paschke-Kratzin, die diese Dissertation im Arbeitskreis Lebensmittelallergie betreut hat und fachlich unterstützt.

Auch möchte ich mich herzlich Herrn Prof. Dr. Dr. Hans Steinhart bedanken, ohne den diese wunderschöne ausländische Studium Erfahrung und die Anfertigung der Arbeit niemals möglich gewesen wäre.

Außerdem möchte ich mich der Kollegen der Arbeitsgruppe Allergie, Marina Deckward und Carsten Carstens, für die gute Zusammenarbeit und Atmosphäre bedanken.

Zuletzt möchte ich all denen danken, die stets an mich geglaubt und mich unterstützt haben.

# Inhaltverzeichnis

1. Zusammenfassung.....	1
2. Einleitung.....	4
2.1 Aufgabenstellung.....	5
3. Grundlagen.....	6
3.1 Allergien.....	6
3.1.1 Allgemein.....	6
3.1.2 Lebensmittelallergien.....	7
3.1.3 Pathophysiologie.....	8
3.1.4 Prävalenz.....	10
3.2 Antikörper.....	11
3.2.1 Allgemein.....	11
3.2.2 Epitope.....	12
3.2.3 Herstellung von Antikörpern.....	12
3.3 Milch.....	13
3.3.1 Allgemein.....	13
3.3.2 Milchproteine.....	14
3.3.3 Milchallergie.....	14
3.4 Erdnüsse.....	15
3.4.1 Allgemein.....	15
3.4.2 Erdnussprotein.....	15
3.4.3 Erdnussallergie.....	15
3.5 Quantifizierungsmethode für allergieauslösende Lebensmittel.....	17
3.5.1 Polymerasekettenreaktion (PCR).....	17
3.5.2 ELISA.....	17
3.5.3 Massenspektrometrie (MS).....	19
4. Zielsetzung und Arbeitsplan.....	20

5. Material und Methoden .....	21
5.1 Herstellung der Modellebensmittel .....	21
5.1.1 Herstellung des mit Casein dotierten Modellebensmittels.....	21
5.1.2 Herstellung des Erdnussstandards und des mit Erdnuss dotierten Modellebensmittels .....	22
5.2 Methoden.....	22
5.2.1 Reduzierende SDS-PAGE.....	22
5.2.2 Silberfärbung .....	23
5.2.3 Western-Blot .....	23
5.2.4 Immunfärbung.....	24
5.2.5 Ponceau-Färbung.....	24
5.2.6 Proteinbestimmung nach Lowry .....	24
5.2.7 Sandwich-ELISA .....	25
5.2.8 Auswertung .....	25
5.3 Statistik.....	26
6. Ergebnisse.....	29
6.1 Entwicklung des indirekten Sandwich-ELISA für die Detektion des Caseins .....	29
6.1.1 Optimierung der Antikörperkonzentration .....	29
6.1.2 Optimierung der Inkubationszeit .....	30
6.1.3 Optimierung des Blockreagenz.....	31
6.1.4 Grundkalibrierung .....	34
6.2 Methodenentwicklungen zur Extraktion von Casein aus der Lebensmittelmatrix .....	37
6.2.1 Literaturübersicht zu Puffersystemen .....	37
6.2.2 Optimierung des pH-Wertes .....	41
6.2.3. Optimierung der Phosphat-Konzentration.....	43
6.2.4 Optimierung des Puffer-Systems mit weiteren Salzzusätzen.....	45
6.2.5. Optimierung durch Zugabe von Detergenzien .....	47
6.2.6 Optimierung durch Zugabe von Hühnereieiklar.....	49

6.2.7 Optimierung durch Zugabe von Reduktionsmitteln.....	51
6.2.8 Optimierung durch Zugabe von chaotropen Verbindungen .....	53
6.2.9 Zusammenfassung zur Optimierung des Puffersystems .....	59
6.2.10 Optimierung der physikalischen Extraktionsbedingungen .....	60
6.2.11 Enzymatischer Verdau der Matrices .....	64
6.2.12 Zusammenfassung der Ergebnisse zur Extraktion.....	73
6.3 Vergleiche unterschiedlicher Aufreinigungsmethoden für Casein haltige Probenextrakte ...	74
6.3.1 Dialyse .....	74
6.3.2 Ultrafiltration.....	76
6.3.3 Präzipitation .....	77
6.3.4 Zusammenfassung der Aufreinigung.....	79
6.4 Matrixkalibrierung und statistische Auswertung .....	80
6.5 Untersuchungen zur Temperaturstabilität des Caseins .....	85
6.6 Applikation der Methode bei anderen Muffin-Matrices.....	87
6.7 Einfluss von Zutaten und physikalischen Parametern während des Backprozesses auf die Wiederfindung von Casein .....	89
6.8 Entwicklung eines direkten Sandwich-ELISA für die quantitative Bestimmung von Erdnussprotein .....	92
6.8.1 Optimierung der Antikörper-Konzentration.....	92
6.8.2 Optimierung der Inkubationszeit .....	93
6.8.3 Optimierung des Blockreagenz.....	94
6.8.4 Grundkalibrierung .....	94
6.9 Entwicklung einer Extraktionsmethode für Erdnussprotein aus gerösteten Erdnüssen .....	97
6.9.1 Test von Puffersystemen aus der Literatur .....	97
6.9.2 Optimierung des pH-Wertes .....	101
6.9.3 Optimierung der Salzkonzentration .....	103
6.9.4 Optimierung der Protein-Wiederfindungen durch Zugabe von Detergenzien .....	105
6.9.5. Optimierung durch Zugabe von chaotropen Verbindungen .....	111
6.10 Applikation der Extraktionsmethode vom Standard auf die Lebensmittelmatrix .....	115

6.11 Matrixkalibrierung und Statistik.....	116
7. Diskussion.....	120
7.1 Probleme mit „versteckten“ Lebensmittelallergenen.....	120
7.2 Veränderungen von Allergenen während der Herstellung der Modellebensmittel .....	121
7.2.1 Dotierung der Modellebensmittel mit Allergenen.....	123
7.3 Extraktion der Allergene aus den Lebensmittelmatrices .....	124
7.3.1 Extraktionspuffer.....	124
7.3.2 Zusätze zum Extraktionspuffer .....	125
7.3.3 Aufreinigungsmethoden.....	126
7.4 Methodenentwicklung und Methodvalidierung.....	127
7.4.1 Methodenentwicklung .....	127
7.4.2 Methodvalidierung.....	128
7.5 Bestimmung der Allergene.....	128
7.5.1 Immunologische Bestimmung.....	128
7.5.2 Andere Methoden .....	129
8. Anhang.....	131
8.1 Rezeptur für die Herstellung des mit Casein kontaminierten Modellebensmittels.....	131
8.2 Rezeptur für die Herstellung des mit Erdnuss kontaminierten Modellebensmittels.....	131
8.3 SDS-PAGE.....	132
8.3.1 Lösungen .....	132
8.3.2 Zusammensetzung des Proteinmarkers .....	133
8.3.3 Durchführung .....	134
8.4 Silberfärbung .....	135
8.4.1 Lösungen .....	135
8.4.2 Durchführung .....	136
8.5 Western-Blot .....	137
8.5.1 Lösungen .....	137
8.5.2 Durchführung .....	138

8.6 Immunfärbung.....	138
8.6.1 Lösungen .....	138
8.6.2 Durchführung .....	139
8.7 Ponceau-Färbung.....	139
8.7.1 Lösungen .....	139
8.7.2 Durchführung .....	140
8.8 Proteinbestimmung nach Lowry .....	140
8.8.1 Lösungen .....	140
8.8.2 Durchführung .....	140
8.9 Sandwich-ELISA.....	141
8.9.1 Lösungen .....	141
8.9.2 Detektion des Caseins .....	142
8.9.3 Detektion der Erdnuss.....	142
8.10 Extraktion und Reinigung der Proben .....	143
8.10.1 Die Zusammensetzung des Puffersystems aus der Literatur .....	143
8.10.2 Lösung.....	144
8.10.3 Durchführung .....	144
8.11 Enzymatischer Verdau der Lebensmittelmatrices.....	145
8.11.1 Lösungen .....	145
8.11.3 Amylaseaktivitätsbestimmung .....	146
8.12 Rezeptur der Eier-, Schokoladen- und Haselnuss-Muffins.....	146
8.13 Rezeptur des Modellebensmittel für die Untersuchung der Caseingehalts in Abhängigkeit von Zutaten und physikalischen Parametern.....	147
8.14 Entfernung des SDS aus dem Erdnussextrakt.....	148
8.14.1 Präzipitation .....	148
8.14.2 Elektrophoretische Dialyse.....	148
8.15 Proteinbestimmung nach Kjeldahl .....	148
8.15.1 Lösungen .....	148

8.15.2 Durchführung .....	149
8.16 Einzelwerte .....	150
8.17 Geräte .....	203
8.18 Verbrauchsmaterialien .....	203
8.19 Chemikalien .....	204
9. Literaturverzeichnis .....	208

## Abkürzungsverzeichnis:

°C: Grad Celsius

%: Prozent

$\alpha$ -LA:  $\alpha$ -Lactalbumin

$\beta$ -LG:  $\beta$ -Lactoglobulin

$\mu$ g: Mikrogramm

2ME: 2-Mercaptoethanol

APS: Ammoniumpersulfat

BSA: Bovine Serum Albumin

bzw.: beziehungsweise

ca.: circa

CBB: Commasie Brilliant Blue

CHAPS: 3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonium]-1-propansulfonat

DAB: 3,3'-Diaminobenzidin

DBPCFC-Test: placebokontrollierte Nahrungsmittelprovokationen, english: Double-blind, placebo-controlled food challenge

dest.: destilliert

DNA: Desoxyribonukleinsäure (english: deoxyribonucleic acid)

DONS: Dioctylnatriumsulfosuccinat

EDTA: Ethylendiamintetraessigsäure

ELISA: Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest (english: enzyme-linked immunosorbent assay)

et al.: et alii (lateinisch: und andere)

g: Gramm

$g$ : Schwerebeschleunigung=9.8 m/s<sup>2</sup>

h: Stunde

HRP: horseradish peroxidase

IEP: isoelektrische Punkt

Ig: Immunoglobulin

kDa: Kilodalton

L: Liter

M: Molar

mA: Milliampere

mg: Milligramm

min: Minute

mL: Milliliter

mM: Millimol

MS: Massenspektrometrie

MWCO: Molecular Weight Cut Off

nm: Nanometer

o.g.: oben genannt

PBS: Phosphatgepufferte Salzlösung (englisch: phosphate buffered saline)

PCR: polymerase chain reaction (englisch: Polymerasekettenreaktion)

PEG: Polyethylenglycol

R<sup>2</sup>: Bestimmtheitsmaß

rt-PCR: real time polymerase chain reaction

SDS: Natriumdodecylsulfat

SDS-PAGE: Natriumdodecylsulfat Polyacrylamid Gelelektrophorese

TCA: Trichloressigsäure

TMB: 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin

Tris: Tris(hydroxymethyl)aminomethan

V: Volt

W: Watt

WAO: World Allergy Organization

## 1. Zusammenfassung

Mit den allergenen Lebensmittelbestandteilen Casein aus Kuhmilch und Erdnuss wurden optimale Extraktions- und Quantifizierungsmethoden der Proteine aus Modellelementen entwickelt. Als Modellelemente wurden caseinhaltige Muffins und erdnusshaltige Schokolade hergestellt. Zunächst wurde ein Verfahren entwickelt, mit dem die Allergene gleichmäßig in die beiden Modellelemente eingearbeitet werden konnten. Der Casein-Teig wurde so hergestellt, dass eine caseinhaltige Lösung durch nachhaltiges Kneten in die Teigmatrix eingearbeitet wurde. Dieser Teig konnte gebacken werden und somit konnten die Veränderungen des Caseins während des Backprozesses studiert werden. Die Einarbeitung der Erdnüsse in die Schokoladenmatrix erfolgte durch Einrühren in die gelöste Matrix.

Zur Bestimmung der Allergene in den Modellelementen hat sich der Sandwich-ELISA als beste Quantifizierungsmethode herausgestellt. Aufgrund der statistisch gesicherten Ergebnisse der Grund- und Matrixkalibrierung war der Sandwich-ELISA als zuverlässig, reproduzierbar, selektiv und genau zu bewerten. Die Nachweisgrenze des Sandwich-ELISA für die Detektion des Caseins war im  $\mu\text{g}/\text{kg}$  Bereich sehr gut, während Erdnussproteine wegen des unten beschriebenen Problems mit den Antikörpern bei der Extraktion nur im  $\text{mg}/\text{kg}$  Bereich bestimmt werden konnten.

Die Voraussetzung für den Einsatz des ELISA als Methode zur Bestimmung von Allergenen ist allerdings, dass bei der Extraktion der Allergene aus den Lebensmitteln die intakten Strukturen der Allergene erhalten bleiben bzw. dass sich die Allergene nach der Extraktion renaturieren lassen. Casein und Erdnussprotein waren aus der nicht erhitzten Lebensmittelmatrix mit einem milden und neutralen Puffer relativ gut extrahierbar. Allerdings waren die Proteine aus beiden Lebensmitteln nach deren Erhitzung relativ schwer zu extrahieren. Es mussten daher andere Puffersysteme, z.B. basische, chaotrophaltige oder SDS-haltige Puffersysteme entwickelt werden als diejenigen, die für die nicht erhitzten Lebensmittel angewendet wurden. Die Protein-Wiederfindung wurde zwar nach Verwendung o.g. Puffer verbessert, aber insbesondere das Erdnussprotein war durch Veränderung der Tertiärstruktur mit Antikörpern schlecht detektierbar. Es konnte leider keine Methode gefunden werden, mit der es möglich gewesen wäre, das Protein wieder in den nativen Zustand zurückzuführen. Aus diesem Grund wurde das Erdnussprotein aus gerösteten Erdnüssen mit einem milden und neutralen Puffer extrahiert. Die Korrektur der

niedrigen Proteinausbeute war durch die Protein-Extraktion aus gerösteter Erdnuss mit demselben Extraktionspuffer erfolgreich möglich.

Casein wird weniger leicht denaturiert als Erdnussprotein. Daher konnte es mit einer 3 M Harnstofflösung bei pH 11,5 extrahiert werden. Die Wiederfindungsrate des Caseins in den Muffins war zunächst noch niedrig. Durch weitere Untersuchungen wurde festgestellt, dass Casein bei Backtemperaturen in großem Umfang abgebaut wird. Dieser Abbau kann durch Lebensmittelzusätze wie Hühnereieiprotein gehemmt bzw. durch Zucker gefördert werden.

## **Summary**

Optimal extraction and quantification methods for the allergic food ingredients casein in cow milk and peanuts in model foods have been developed. Casein containing muffins and peanut containing chocolate have been produced as model foods. The first step was, however, to develop a method to break the allergens equally in both model foods. The casein dough was produced by breaking in the casein containing solution into the dough matrix through intensive molding. This dough could become baked, and the changes of casein during the baking process could be studied. The breaking in of the peanuts into the chocolate matrix has been done by stirring them intensively into the solved chocolate matrix.

The best method to determine the allergens in the model foods was the sandwich ELISA. On the view of safe statistic results of the basic and the matrix calibration, the sandwich ELISA was reliable, reproducible, selective and exact. The detection limit of the sandwich ELISA for the detection of casein was very good in the range  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Peanut proteins, however, could only be determined in the  $\text{mg}/\text{kg}$  range because of the problems described later.

The condition to use the ELISA method as allergen detection method was, however, that the structures of the proteins are not changed during the extraction procedure of the allergens from the foods and/or if the protein structures have been changed that it is possible to renature them after the extraction procedure. Casein and peanut protein have been easily extracted with a mild, neutral buffer system from the not heated food matrix. The proteins of both foods have been, however, difficult to extract after heating of the foods. It was therefore necessary to develop different buffer systems, for instance basic, chaotrope

substances or SDS containing buffer systems. Through using these buffers the protein yield could be improved with these buffers but especially the peanut protein was difficult to determine with antibodies because of changing of the tertiary structure during the extraction procedure. No method could be found to renature the peanut protein into the native structure. This was the reason to extract the peanut protein from roasted peanuts with a mild and neutral buffer. The correction of the low protein yield has been successfully possible through protein extraction in roasted peanuts with the same extraction buffer.

Casein becomes less denatured compared with peanut protein. Therefore it could be extracted with a 3 M urea solution at pH 11.5. The yield of casein muffins was, however, low. Further experiments showed that casein will be degraded in high amounts at high baking temperatures. This degradation process of casein in foods during the baking process can be influenced through food additives. Hen egg protein for instance, inhibited the degradation whereas sugar increased the degradation process.

## 2. Einleitung

Unter einer Allergie wird eine Überempfindlichkeitsreaktion des menschlichen Körpers wegen der fehlerhaften Antwort des Immunsystems gegen ansonsten harmlose Stoffe verstanden (Geißler, 1972). Da sich die Umwelt ständig verändert, nehmen Allergien, insbesondere auch Lebensmittelallergien, zu. Nach verschiedenen Studien leiden etwa 1-2% der Erwachsenen und bis zu 8% der Kinder unter Lebensmittelallergien (Mine et al., 2002; Holzhauser et al.; 2003). Für Säuglinge und Kleinkinder sind die wichtigsten Allergene in Erdnüssen, Milch und Eiern enthalten (Bock et al., 1990). Daneben spielen weitere Nüsse, Fische, Krustentiere, Sojabohnen und Weizen eine wichtige Rolle, zusammen mit den erstgenannten Lebensmitteln sind sie für etwa 90% der Fälle verantwortlich (FAO, 1995). Diese Lebensmittel sind entsprechend der europäischen Richtlinie 2000/13/EG ebenso wie Sellerie, Senf, Lupinen, Weichtiere und Sesam in Lebensmitteln zu kennzeichnen.

Die Krankheitsbilder der Lebensmittelallergien sind sehr unterschiedlich. Sie reichen von Nesselsucht bis zum anaphylaktischen Schock, der in Einzelfällen zum Tod führen kann (Wüthrich et al., 2001; Bock et al., 2001).

„Versteckte“ Allergene sind solche, die über Zutaten bzw. als Kontaminanten in die Lebensmittel gelangen, aber auf der Verpackung nicht gekennzeichnet sind. Sie können beim Verzehr von Lebensmitteln Probleme verursachen. Ein Beispiel ist Milkschokolade, in der versteckte Erdnussallergene enthalten sein können, wenn die Produktionsanlagen vor der Umstellung der Produktion von Nuss- auf Milkschokolade nicht vollständig gereinigt wurden. Allein durch Staubübertragung können schon Spuren von Erdnussallergenen in Milkschokolade festgestellt werden (Hefle et al., 2004b)

Um den Verbraucher vor Lebensmittelallergien zu schützen, müssen potentielle Allergene, wie oben erwähnt, entsprechend der Richtlinie 2000/13/EG auf den Verpackungen deklariert werden.

Probleme bei der Analytik von Allergenen in Lebensmitteln treten insbesondere dadurch auf, dass in verschiedenen Lebensmitteln enthaltene Allergene während des Produktionsprozesses, wie z.B. bei der Fermentation oder beim Erhitzen, modifiziert und/oder maskiert werden können. Das kann dazu führen, dass insbesondere Allergene, die nur in Spuren vorkommen, nicht mehr extrahiert werden können und sich daher einer

Bestimmung entziehen (Poms et al., 2004a). Daher ist es erforderlich, eine Extraktions- und Aufarbeitungsmethode zu entwickeln, mit der auch diese Allergene detektiert werden können. Bei der zu entwickelnden Methode dürfen die Allergene, also im Wesentlichen die Proteine, nicht verändert werden, damit sie nach der Extraktion mit immunologischen Methoden, wie z.B. dem ELISA-Test oder dem Western-Blot, bestimmt werden können.

## **2.1 Aufgabenstellung**

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zuerst Modelllebensmittelmatrices hergestellt und diese mit Casein und Erdnussprotein dotiert. Anschließend wurden Extraktions- und Aufreinigungsmethoden entwickelt, mit denen die dotierten Proteine mit einer immunologischen Detektionsmethode bestimmt werden konnten. Die entwickelten Methoden wurden validiert.

### **3. Grundlagen**

#### **3.1 Allergien**

##### **3.1.1 Allgemein**

Der Begriff „Allergie“ wurde 1906 von dem Wiener Kinderarzt Clemens von Pirquet zum ersten Mal in die medizinische Fachsprache eingeführt. „Allergie“ wurde von der „World Allergy Organization (WAO)“ als eine Überempfindlichkeitsreaktion definiert, die durch spezifische immunologische Mechanismen ausgelöst wird (Johansson et al., 2004).

Das normale Abwehrsystem des menschlichen Körpers besteht aus mechanischen Barrieren wie z.B. der Haut oder den Schleimhäuten wie auch dem Immunsystem. Dadurch werden gesundheitsschädliche Stoffe erkannt und sie können unschädlich gemacht werden. Schadstoffe können jedoch durch die Nahrung, durch Insektenstiche oder durch Inhalation in den Körper gelangen. Der Körper bildet spezifische Antikörper oder spezifisch sensibilisierte T-Lymphozyten gegen diese Schadstoffe. Wenn diese Stoffe nochmals aufgenommen werden, „erinnert“ sich der Organismus und er kann schnell die entsprechenden immunologischen Abwehrmechanismen aktivieren.

Einige normalerweise unschädliche Stoffe, die sogenannten „Allergene“ (auch als Immunogene oder Antigene bezeichnet) können aber auch eine falsche Immunantwort verursachen, die zu typischen allergischen Symptomen wie Pruritus (Juckreiz), Erythema (Rötung der Haut), atopischen Ekzemen, Urticaria (Nesselsucht), Angioedema (Schwellungen der Haut und Schleimhäute), Koliken, allergischer Rhinitis (Fließ- oder Heuschnupfen), Magen-Darm-Beschwerden, allergischem Asthma oder anaphylaktischen Schockzuständen führen können (Wüthrich et al., 2001). Nach einer Studie von Sampson (1992) traten auch Todesfälle nach Verzehr von Lebensmitteln auf, die Allergene enthielten. Die Allergene sind Proteine und/oder Glykoproteine mit Molekulargewichten zwischen 10 und 90 kDa (Steinhart et al., 2001). Aus medizinischer Sicht verursachen allergische Reaktionen immer verschiedene Symptome, die in einem oder in mehreren Organen manifest werden. Brockow und Ring (2009) teilen Lebensmittelallergien je nach klinischen Symptomen, in vier Stufen ein (Tabelle 1).

Tabelle 1: Stufenmodell allergischer Reaktionen entsprechend klinischer Symptome (Brockow und Ring, 2009)

Stufe	Symptome			
	Haut	Gastrointestinaltrakt	Atmungssystem	Herz-Kreislaufsystem
I	Juckreiz Rötung der Haut Nesselsucht Schwellungen der Haut und der Schleimhäute			
II	Juckreiz Rötung der Haut Nesselsucht Schwellungen der Haut und der Schleimhäute	Übelkeit Bauchkrämpfe	Schnupfen Stimmstörung Atembeschwerden	Tachykardie Hypotonie Arrhythmie
III	Juckreiz Rötung der Haut Nesselsucht Schwellungen der Haut und der Schleimhäute	Erbrechen Durchfall Diarrhö	Schwellung des Kehlkopfs Verformung der Bronchen Zyanose	Schock
IV	Juckreiz Rötung der Haut Nesselsucht Schwellungen der Haut und der Schleimhäute	Erbrechen Durchfall Diarrhö	Atemstillstand	Herzstillstand

### 3.1.2 Lebensmittelallergien

Die häufigsten Allergene, denen der Mensch in seiner Umgebung ausgesetzt ist, sind Pollen, Kot der Hausstaubmilbe, Hautschuppen, Haare von Haustieren, Holzstaub und Lebensmittel. Da Lebensmittel regelmäßig verzehrt werden, können Lebensmittelallergene schwere Symptome auslösen. Allerdings zählen nicht alle Symptome nach Verzehr von Lebensmitteln zu den Allergien, es kann sich auch um Unverträglichkeiten handeln. Nach der Einteilung von Bruijzeel-Koomen et al. (1995) und Ring et al. (2001) werden Unverträglichkeitsreaktionen in nicht-toxische und in toxische Reaktionen eingeteilt. Die nicht-toxischen Reaktionen werden in nicht-immunologische Reaktionen, das sind die Lebensmittelunverträglichkeiten oder

-intoleranzen, und in immunologischen Reaktionen, das sind die Allergien, unterteilt (Abbildung 1).

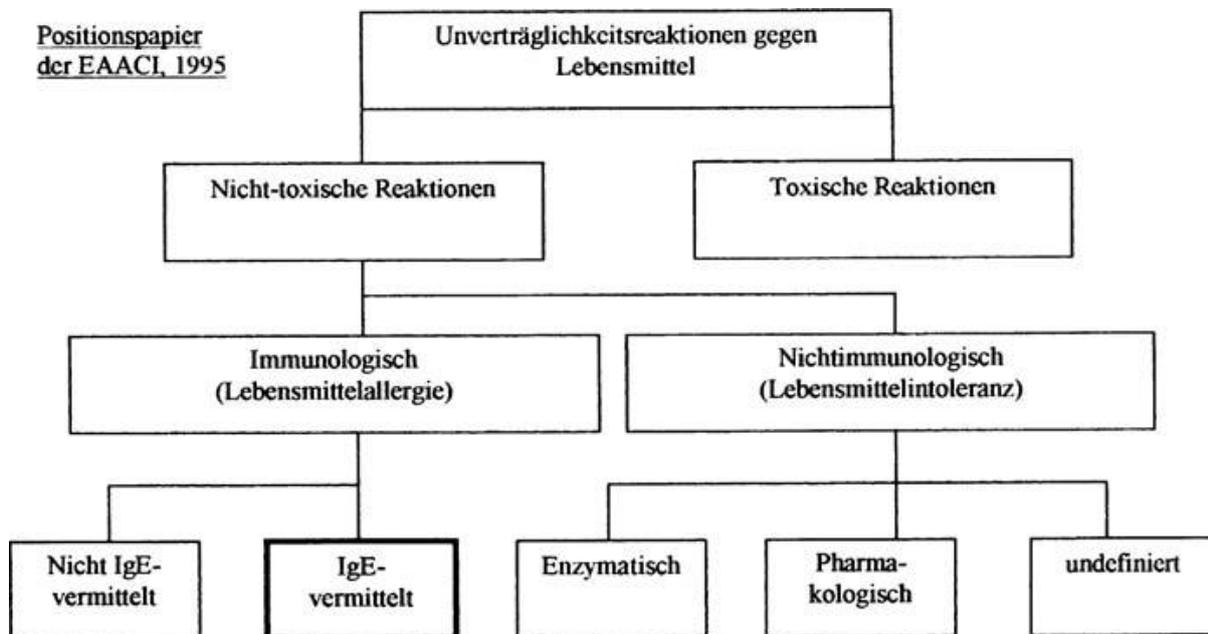


Abbildung 1: Einteilung von Lebensmittelunverträglichkeitsreaktionen der „Europäischen Akademie für Allergie und Klinische Immunologie (EAAC)“ (Baltes, 2007)

### 3.1.3 Pathophysiologie

Nach Coombs und Gell (1968) werden vier Mechanismen von allergischen Reaktionen unterschieden. Lebensmittelallergien werden von Immunoglobulin E (IgE) vermittelt, welche als Sofortreaktionen oder Typ I - Reaktionen bezeichnet werden. Allergische Reaktionen treten in der Regel 30 Minuten nach Verzehr des Lebensmittels auf. Sie können allerdings auch erst nach zwei bis drei Stunden nach dem Verzehr auftreten (Lorenz et al., 2001). Bei den Typ II - Reaktionen bilden sich Immunoglobulin G (IgG) oder Immunoglobulin M (IgM). Bei Typ III - Reaktionen werden Immunkomplexe gebildet, also mehrere Antikörper binden mehrere Antigene. Bei der Typ IV - Reaktion werden die allergenspezifischen T-Zellen aktiviert.

Der Ablauf der Typ I - Reaktion lässt sich in zwei Phasen einteilen: die Sensibilisierungsphase und die Effektphase.

Die Sensibilisierungsphase wird auch als Immunantwort bezeichnet (Abbildung 2). Beim ersten Kontakt des Allergens mit dem Immunsystem treten keine klinischen Symptome auf.

Die Allergene werden zunächst von antigenpräsentierenden Zellen, den Makrophagen, enzymatisch abgebaut und die Abbauprodukte anschließend den B-Zellen präsentiert. Die B-Zellen bilden dann allergen-spezifisches IgE und sie differenzieren sich teilweise zu IgE-sekretierenden Plasmazellen. Dieser Vorgang wird von Lymphokinen, von T-Lymphozyten gebildeten Botenstoffen, stimuliert. IgE bindet an die Oberfläche von Mastzellen und basophilen Granulozyten. Der Organismus ist somit gegen die Antigene (= Allergene) sensibilisiert (Esser und Radbruch, 1990; Roitt et al., 1991; Engelhard, 1994) (Abbildung 2).

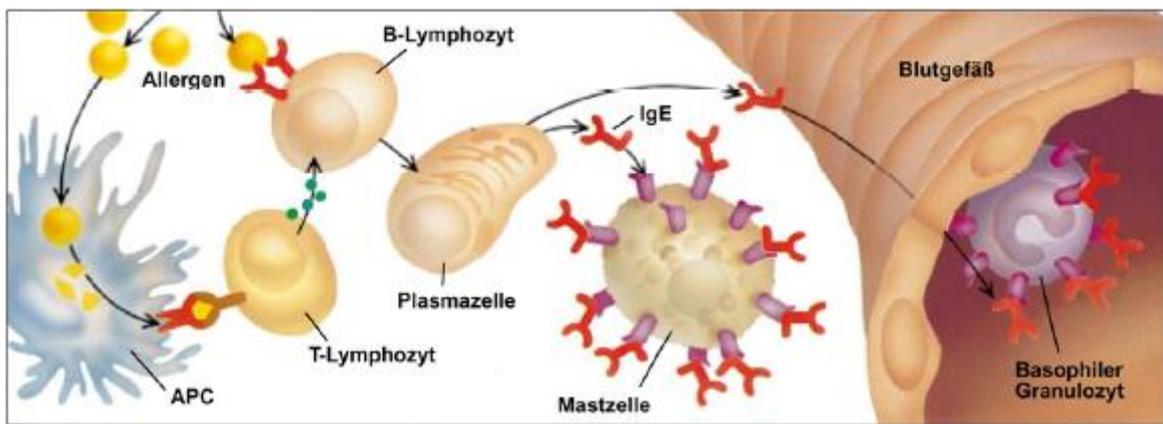


Abbildung 2: Sensibilisierungsphase der allergischen Typ - I Reaktion (Lichtenstein, 1993; Weber, 2009)

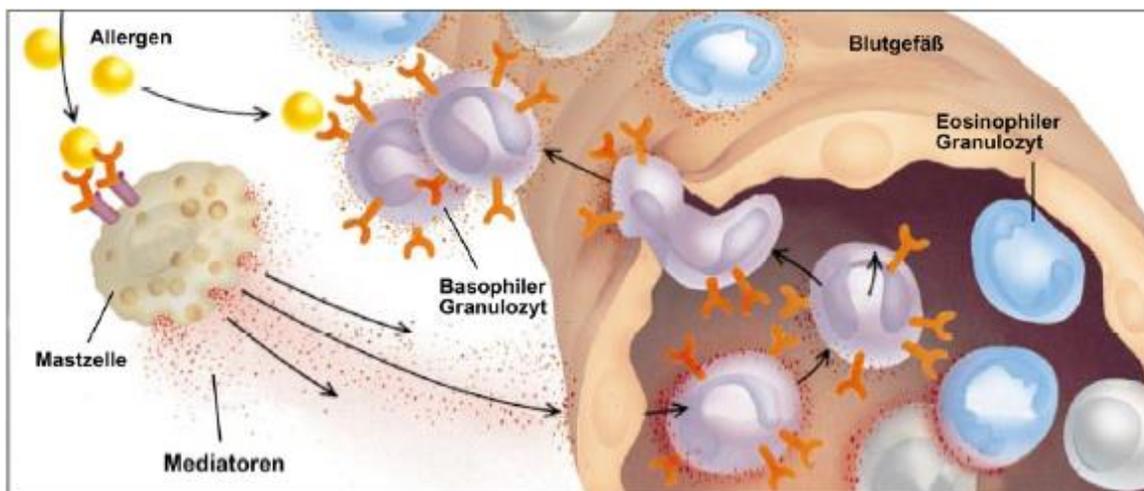


Abbildung 3: Pathophysiologie der Typ I - Reaktion (Lichtenstein, 1993; Weber, 2009)

Die Effektphase beginnt beim erneuten Kontakt des Organismus mit dem gleichen Allergen. Zwei IgE-Moleküle, die sich auf den Mastzellen oder den Granulozyten befinden, binden mit dem Allergen. Als Folge werden die Zelloberflächen verändert und Enzyme der Zellmembran

aktiviert. Dabei werden Mediatoren wie Histamin und/oder Serotonin freigesetzt, welche die typischen klinischen Symptome der Lebensmittelallergien auslösen (Klein, 1991; Roitt, 1991; Janeway et al., 2002; Rink et al., 2012) (Abbildung 3).

### **3.1.4 Prävalenz**

Etwa 1-2% der erwachsenen Bevölkerung und etwa 8% der Säuglinge und der Kinder leiden nach unterschiedlichen Studien an Lebensmittelallergien (Helm und Bruks, 2000). Allerdings bilden viele Kinder zwischen dem zweiten und dem sechsten Lebensjahr eine Toleranz gegen Lebensmittelallergene aus (Bishop et al., 1990; James und Sampson, 1992).

Lebensmittelallergiker können bislang nicht durch eine klinische Therapie geheilt werden. Einige Allergiker sind sehr empfindlich gegen allergieauslösende Lebensmittel. Es wurde beobachtet, dass ein Tropfen Milch auf der Unterlippe von Säuglingen allergische Reaktionen auslösen kann (Cantani, 1999). Des Weiteren konnte in einem DBPCFC-Test (placebokontrollierte Nahrungsmittelprovokationen, englisch: Double-blind, placebo-controlled food challenge) gezeigt werden, dass Lebensmittel in kleinen Mengen, wie z.B. 2 mg Erdnüsse oder 4 g Garnelen, allergische Reaktionen auslösen können (Daul et al., 1988; Hourihane et al., 1997).

Daher müssen Lebensmittelallergiker allergieauslösende Lebensmittel vermeiden. Damit sie das können, werden Bestandteile und die wichtigsten Allergene auf den Lebensmittelverpackungen gekennzeichnet. Leider werden aber Lebensmittel während der Verarbeitung unbewusst mit Allergenen kontaminiert. Nach einer Studie von Malmheden et al. (1994) konnten Haselnuss-, Eier-, Milch-, Soja- und Erdnussallergene aus Lebensmitteln, die theoretisch frei von solchen Allergenen sein sollten, identifiziert werden. Um die Verbraucher vor dem potenziellen Risiko zu schützen, müssen daher die wichtigsten Allergene entsprechend der Richtlinie 2000/13/EG und der Richtlinie 2007/68/EG auf den Verpackungen gekennzeichnet werden.

## 3.2 Antikörper

### 3.2.1 Allgemein

Antikörper (oder Immunglobuline Ig) sind Glykoproteine, die von B-Lymphozyten (oder B-Zellen) in Wirbeltieren als Reaktion auf Antigene produziert werden. Die Antikörper bestehen aus zwei identischen leichten Ketten mit Molekulargewichten von ca. 25 kDa und zwei identischen schweren Ketten mit Molekulargewichten von ca. 50-70 kDa. Die vier Ketten bilden über Disulfidbrücken eine Y-förmige Struktur (Abbildung 4). Des Weiteren können die Antikörper in zwei Fragmente, nämlich in die Fab-Fragmente und in die Fc-Fragmente unterteilt werden. Die Fab-Fragmente bilden sich aus den leichten Ketten mit einem Teil der schweren Ketten. Sie besitzen am N-terminalen Ende hypervariable Antigenbindungsstellen, sogenannte Paratope. Ihre Aminosäuresequenzen sind unterschiedlich und dadurch können sie Antigene spezifisch binden. Die Fc-Fragmente, das sind die übrigen Teile der Y-Struktur, können an Phagozyten binden. Bei den höheren Säugetieren kennt man nach Größe, elektrischer Ladung, Aminosäurezusammensetzung und Kohlenhydratanteil fünf verschiedene Klassen von Ig, nämlich IgA, IgD, IgE, IgG und IgM (Roitt et al., 1991). Das IgE spielt bei Lebensmittelallergien eine besondere Rolle (Kreft et al., 1995).

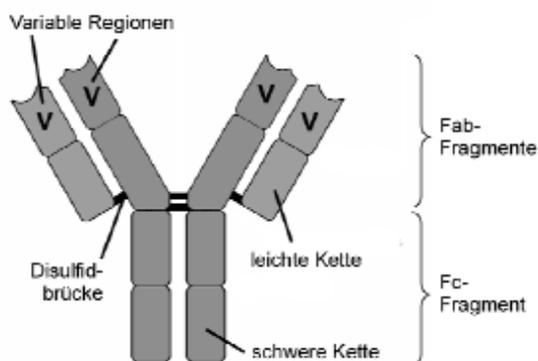


Abbildung 4: Schematische Darstellung eines monomeren Antikörpers (Weber, 2009)

### **3.2.2 Epitope**

Die Antikörper können an ihren Paratopen durch starke, nicht kovalente Wechselwirkungen hochspezifisch nach dem Schlüssel-Schloss Prinzip Antigene binden. Normalerweise besitzen Antigene mehrere Bindungsstellen, diese werden als Epitope bezeichnet. Epitope bestehen aus fünf bis sieben Aminosäuren (Belitz et al., 2007). Man unterscheidet Sequenzepitope, die durch die Primärstruktur der Proteine definiert sind oder Konformationsepitope, die durch Sekundär- bzw. Tertiärstruktur der Proteine definiert sind. Während der Be- und Verarbeitung von Lebensmitteln, z.B. bei Fermentation oder Erhitzen, können die Epitope so verändert werden, dass sie nicht mehr allergen wirksam sind (Paschke und Besler, 2002). Beim Erhitzen von Lebensmitteln tritt häufig eine Glykosylierung von Proteinen auf, dadurch werden Epitope verändert was zu einer Reduzierung des allergenen Potentials führt (Thomas et al., 2007). Dagegen erhöht sich das allergene Potential von Erdnüssen und Garnelen nach dem Erhitzen, da durch Konformationsänderung der Proteine neue Konformationsepitope gebildet werden können. Durch Glykosylierung könnte sich beispielsweise die Allergenität des Erdnussallergens Ara h 2 erhöhen, da die Glykosylierung vor enzymatischem Abbau der Proteine schützt. (Besler et al., 2001; Mills und Mackie, 2008; Nowak-Wegrzyn und Fiocchi, 2009).

### **3.2.3 Herstellung von Antikörpern**

Es gibt monoklonale und polyklonale Antikörper. Polyklonale Antikörper werden aus den Seren immunisierter Tiere gewonnen. Sie sind Gemische von Antikörpern, die als Folge der Immunisierung gegen verschiedene Epitope von den jeweiligen B-Lymphozyten gebildet werden. Zwar zeigen die polyklonalen Antikörper wegen ihrer Komplexität eine hohe Avidität (Summe der Affinitäten), daher neigen sie aber auch zu Kreuzreaktionen (Kiening, 2006; Kraus, 2010).

Im Gegensatz zu den polyklonalen Antikörpern haben monoklonale Antikörper eine relativ geringe Avidität, aber sie sind hoch spezifisch. Die für die Gewinnung monoklonaler Antikörper notwendige Immunisierung wird prinzipiell ähnlich wie bei der Gewinnung polyklonaler Antikörper durchgeführt. Die B-Zellen, die Antikörper sezernieren, werden aus der Milz immunisierter Tiere isoliert. Dann werden B-Zellen mit Myelomzellen fusioniert. Die fusionierten Zellen, Hybridomzellen genannt, werden in Platten vereinzelt und inkubiert.

Nach Untersuchung der sezernierten Antikörper werden die erwünschten Klone vermehrt, wobei kontinuierlich monoklonale Antikörper sezerniert werden (Abbildung 5). Monoklonale Antikörper reagieren theoretisch nur mit einem Epitop, da sie nur von einer B-Zelle produziert werden (Lidell und Weeks, 1996; Vollmar und Dingermann, 2005).

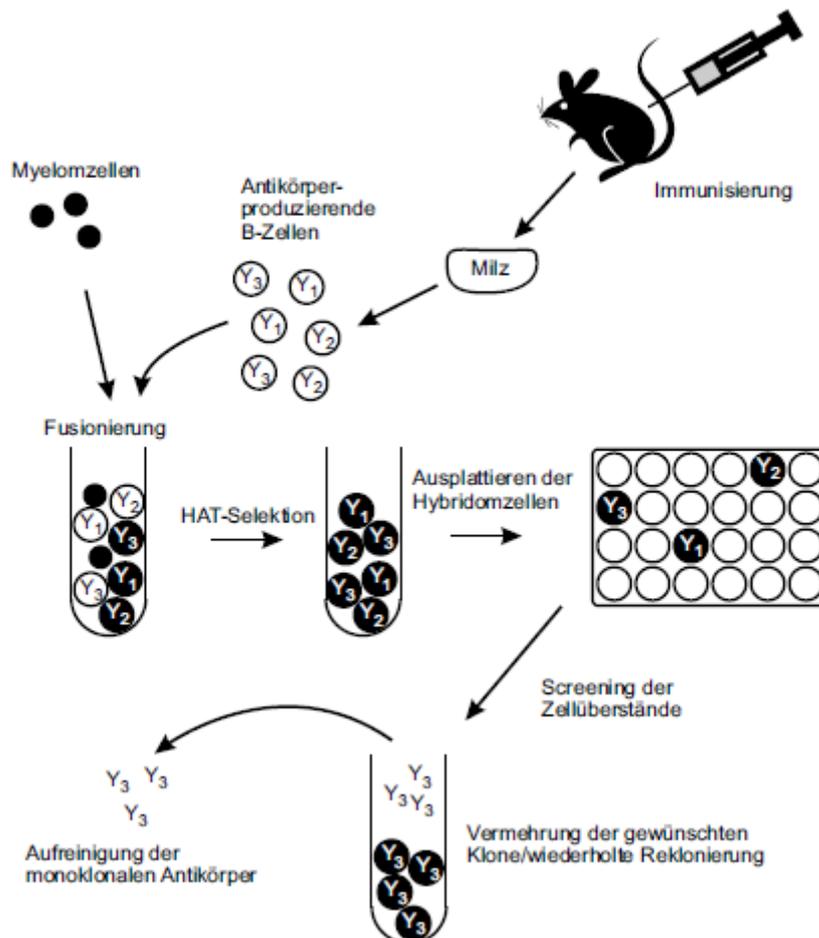


Abbildung 5: Herstellung von monoklonalen Antikörpern (Kiening, 2006)

### 3.3 Milch

#### 3.3.1 Allgemein

Milch ist die aus Milchdrüsen weiblicher Säugetiere abgesonderte Flüssigkeit. Heute versteht man unter Milch als Handelsware lediglich die Kuhmilch, während bei der Milch von anderen Säugetieren die Tierart mit angegeben werden muss. Kuhmilch enthält 87,2 % Wasser, 3,33 % Protein, 3,78 % Fett, 4,70 % Kohlenhydrate und 0,74 % Mineralstoffe (Souci et al., 2000).

### 3.3.2 Milchproteine

Milch enthält zwar nur geringe Mengen an Proteinen, diese spielen aber für Lebensmittelallergien eine große Rolle. Nach Zugabe von verdünnter Essigsäure werden die Proteine teilweise ausgeflockt. Es handelt sich dabei um Caseine, die bei pH 4,6 schlecht löslich sind (Belitz et al., 2007). Die Caseine bilden den Hauptteil der Milchproteine (ca. 80%). Sie können weiter in die Familien  $\alpha$ S1,  $\alpha$ S2,  $\beta$ ,  $\kappa$  und  $\gamma$  Caseine unterteilt werden.

Die 20% Proteine, die im sauren Bereich in Lösung bleiben, bezeichnet man als Molkenproteine. Neben den Hauptkomponenten  $\beta$ -Lactoglobulin ( $\beta$ -LG) und  $\alpha$ -Lactalbumin ( $\alpha$ -LA) enthält Molkenprotein noch Bovines Serum Albumin (BSA), Immunoglobuline (Ig) und Spuren von Lactoferrin. Die wichtigsten Proteine sind in Tabelle 2 zusammengefasst (Wal, 1998; Belitz et al., 2007).

Tabelle 2: Hauptproteine der Milch und Nomenklatur der Allergene nach „The WHO/IUIS Allergen Nomenclature Sub-Committee“ (2012)

	Protein	Anteil am Gesamtprotein [%]	Molekulargewicht [kDa]
Caseine (Bos d 8)	$\alpha$ S1 (Bos d 9)	34	23,6
	$\alpha$ S2 (Bos d 10)	8	25,2
	$\beta$ (Bos d 11)	25	24
	$\kappa$ (Bos d 12)	9	19
	$\gamma$	4	11,6 - 20,5
Molkenproteine	$\beta$ -LG (Bos d 5)	9	18,3
	$\alpha$ -LA (Bos d 4)	4	14,2
	BSA (Bos d 6)	1	66,3
	Ig (Bos d 7)	2	< 150
	Lactoferrin	Spuren	76,2

### 3.3.3 Milchallergie

Die Milchallergie ist die häufigste Allergie bei Kleinkindern (Restani et al., 2009). Es wird angenommen, dass  $\beta$ -LG das Hauptallergen in Kuhmilch ist, da es in Muttermilch in kleineren Mengen als in Kuhmilch enthalten ist.  $\beta$ -LG wird während des Verdauungsprozesses durch Magensäure und Proteasen nicht abgebaut und somit mit intakter Struktur absorbiert (Wal, 1998). Allerdings wurden auch Casein,  $\alpha$ -LG, BSA, Ig und Lactoferrin mittels DBPCFC-Test als

Allergene identifiziert (Host et al., 1992; Wal et al., 1995; Lefrance-Millot et al., 1996; Bernard et al., 1996).

Um die Haltbarkeit von Milch zu verlängern, wird sie stets homogenisiert und pasteurisiert. Host et al. (1988) stellten fest, dass die Allergenität durch diese mechanischen und thermischen Behandlungen im Vergleich zu Rohmilch nicht verändert wird. Allerdings zeigten Norgaard et al. (1996), dass die Allergenität von BSA und  $\beta$ -LG nach 10-minütigem Sieden abnimmt, diejenige von Casein jedoch relativ stabil bleibt. Durch Fermentation mit Milchsäurebakterien werden jedoch Milchallergene abgebaut (Jedrychowski und Wroblewska, 1999; Monaci et al., 2006).

### **3.4 Erdnüsse**

#### **3.4.1 Allgemein**

Die Erdnuss (*Arachis hypogaea* L.) gehört zur Familie der *Papilionaceae* (*Fabaceae*, *Leguminosae*, Schmetterlingsblütler), Subfamilie *Papilionoideae* (Lieberei et al., 2007). Erdnüsse sind eine der wichtigsten Protein- und Öl-Quellen weltweit. Rohe Erdnüsse enthalten 5,2 % Wasser, 29,8 % Proteine, 48,1 % Fette, 7,5 % Kohlenhydrate, 11,7 % Ballaststoffe und 2,2 % Mineralstoffe. Geröstete Erdnüsse enthalten 1,6 % Wasser, 30,2 % Proteine, 49,4 % Fette, 9,4 % Kohlenhydrate, 11,4 % Ballaststoffe und 2,6 % Mineralstoffe (Souci et al., 2000).

#### **3.4.2 Erdnussprotein**

Die Zusammensetzung des Erdnussproteins ist sehr komplex, es enthält bis zu 32 Komponenten (Dean, 1998). Es enthält hauptsächlich wasserlösliche Albumine und in verdünnter Kochsalzlösung lösliche Globuline. Die Globuline sind die Hauptspeicherproteine, sie können mittels Ammoniumsulfat-Fällung in Arachine und Conarachine unterteilt werden (Johns und Jones, 1916; Jones und Horn, 1930).

#### **3.4.3 Erdnussallergie**

Erdnüsse sind die häufigsten Auslöser lebensbedrohender oder sogar letaler allergischer Reaktionen (Loza und Brostoff, 1995). Bis zu 1,5% der Menschen leiden an einer

Erdnussallergie, die bereits in der Kindheit auftritt und lebenslang wirksam ist (Al-Muhsen et al., 2003; Burks, 2008).

Die bis heute bekannten Erdnussallergene sind Ara h 1 bis Ara h 11, dabei spielen Ara h 1 bis Ara h 3 die Hauptrolle (Finkelman, 2010). In Tabelle 3 ist die Nomenklatur der Erdnussallergene nach „The WHO/IUIS Allergen Nomenclature Sub-Committee“ (2012) dargestellt.

Tabelle 3: Nomenklatur der Erdnussallergene nach „The WHO/IUIS Allergen Nomenclature Sub-Committee“ (2012)

Allergen	Molekulargewicht [kDa]	Beschreibung	Literaturen
Ara h 1	64	Cupin (Vicillin-Typ, 7S Globulin)	Burks et al., 1991
Ara h 2	17	Conglutin (2S Albumin)	Burks et al., 1992
Ara h 3	60	Cupin (Legumin-Typ, 11S Globulin, Glycinin)	Rabjohn et al., 1999
Ara h 4	37	Cupin (Legumin-Typ, 11S, Glycinin)	KLEBER-JAHNKE et al., 1999; Becker et al., 2001
Ara h 5	15	Profilin	
Ara h 6	15	Conglutin (2S Albumin)	
Ara h 7	15	Conglutin (2S Albumin)	
Ara h 8	17	PR-10-Protein	Mittag et al., 2004
Ara h 9	9,8	unspezifisch Lipidtransfer-Protein 1	Lauer et al., 2009
Ara h 10	16	16 kDa Oleosin	Poms et al., 2002
Ara h 11	14	14 kDa Oleosin	

Die drei Hauptallergene Ara h 1 (Conarachin) bis Ara h 3 (Arachin) sind stabil gegenüber den meisten Reaktionsbedingungen. Bezogen auf das Gesamtprotein der Erdnuss beträgt der Gehalt an Ara h 1 und Ara h 2 etwa 12 - 16% (Koppelman et al., 2001). Diese beiden Proteine verbinden sich beim Erhitzen zu einem Trimer-Komplex, der stabil ist gegen enzymatischen Verdau (Becker, 1997; Maleki et al., 2000b). Ara h 3 liegt immer als Hexamer-Komplex vor. Koppelman et al. (2003) zeigten, dass Ara h 3 bis 91 °C stabil ist.

Etwa 20% der Erdnussproteine sind mit Wasser extrahierbar, nach Erhitzung können nur 10% Proteine extrahiert werden (Holzhauser und Vieths, 1999). Die Bindung der Erdnussallergene an IgE ist bei gerösteten Erdnüssen gegenüber rohen Erdnüssen etwa um den Faktor 90 erhöht (Maleki, 2000b; Poms und Anklam, 2003).

### **3.5 Quantifizierungsmethode für allergieauslösende Lebensmittel**

Die wichtigsten Analysenmethoden sind PCR (polymerase chain reaction, Polymerasekettenreaktion), die auf DNA- (Desoxyribonukleinsäure)-Bestimmung, und ELISA (enzyme linked immunosorbent assay), der auf Proteinbestimmung beruht. Es wird allerdings auch die MS (Massenspektrometrie) wegen der Genauigkeit und der Zuverlässigkeit eingesetzt (Poms et al., 2004b; van Hengel, 2007; Kirsch et al., 2009).

#### **3.5.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)**

Die PCR basiert auf der Bestimmung der DNA-Abschnitte, die die Allergene codieren. Somit können allerdings Allergene nicht direkt bestimmt werden. Vorteil des Einsatzes der PCR sind die hohe Selektivität bzw. Spezifität und die niedrige Nachweisgrenze. Theoretisch können zehn DNA-Abschnitte detektiert werden. In der Praxis liegt die Nachweisgrenze für z.B. Erdnuss bei 2,5 pg Erdnuss-DNA oder 10 mg Erdnusskontamination in 1 kg Matrix (Scaravelli et al., 2008). Die Quantifizierung der DNA mittels real time PCR (rt-PCR) ist durch Zugabe von Sonden oder einem Fluoreszenzfarbstoff möglich (Hird et al., 2003; Focke et al., 2011).

Nachteil der PCR-Analytik ist die oft unbefriedigende Genauigkeit und Richtigkeit der indirekten Quantifizierung. Es wird zuerst die Anzahl der Kopien der DNA-Abschnitte quantifiziert und dann die Allergene mittels eines Faktors quantifiziert (Kirsch et al., 2009).

Die PCR-Methode ist für DNA-haltige Lebensmittel wie z.B. Haselnuss, Cashewnuss, Walnuss und Erbse geeignet (Holzhauser et al., 2000; Brzezinski et al., 2006; Breqná et al., 2006a und 2006b). Für die Bestimmung von Milchallergenen ist die PCR nicht geeignet, da Milch und Milcherzeugnisse in der Regel kaum DNA enthalten.

#### **3.5.2 ELISA**

ELISA ist die klassische immunochemische Bestimmungsmethode von Allergenen. Der für die Durchführung des ELISA häufig verwendete Antikörper ist das IgG, das aus dem Serum immunisierter Tiere gewonnen wird. Für Testzwecke konnte auch das IgG von Allergikern gewonnen werden. Die Nachweisgrenze der Allergene liegt im mg/kg-Bereich (Engvall und Perlmann, 1971; van Weemen und Schuurs, 1971; Avrameas und Guilbert, 1971).

Problematisch bei Anwendung des ELISA ist die Kreuzreaktivität. Der Hauptgrund dafür ist, dass kein reines Allergen bei der Immunisierung der Tiere verwendet wird. Der polyklonale Anti-Casein-Antikörper ist gegenüber allen Milchproteinen aktiv. Daneben können unterschiedliche Lebensmittel mit ähnlichen oder identischen Proteinen Kreuzreaktionen verursachen. Typische Beispiele sind Mandel, Paranuss und Haselnuss, welche mit Anti-Erdnuss-Antikörper auch reagieren (De Leon et al., 2003 und 2007). Das Problem könnte durch Verwendung monoklonaler Antikörper vermindert werden.

Beim direkten ELISA (Abbildung 6) wird das Allergen zuerst durch nicht-kovalente Bindungen nicht spezifisch auf der Oberfläche der 96-Well-Platte immobilisiert. Die Detektion erfolgt oft durch Zugabe von mit HRP (horseradish peroxidase) gekoppeltem Antikörper. HRP reagiert z.B. mit TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin) oder DAB (3,3'-Diaminobenzidin) zu einem Farbstoff, der photometrisch bestimmt werden kann.

In einigen Fällen wurde kein geeigneter Detektions-Antikörper gefunden. In diesem Fall muss der indirekte ELISA angewendet werden (Abbildung 6). Beim indirekten ELISA wird der primäre Detektions-Antikörper zuerst an das Antigen gebunden. Der mit HRP gekoppelte sekundäre Antikörper wird anschließend dazu gegeben. Durch dieses indirekte System konnte der Anwendungsbereich des ELISA erweitert und die Herstellung des Antikörpers vereinfacht werden. Es muss dabei nicht jeder Detektions-Antikörper mit HRP gekoppelt sein.

Das Problem des direkten und indirekten ELISA ist, dass die bei der Extraktion der Allergene aus der Matrix mitextrahierten Begleitsubstanzen nicht spezifisch auf der Oberfläche der ELISA-Platte adsorbiert werden können. Dadurch können auch die Allergene weniger gut auf der Platte gebunden werden; dies ist die Ursache für die geringe Signalstärke. Um dieses Problem zu lösen, wurde der Sandwich-ELISA eingesetzt (Abbildung 6). Es wird vor Zugabe des Antigens auf die Platte diese mit einem Einfang-Antikörper immunisiert. Dadurch bindet der Einfang-Antikörper das Antigen der Matrix nach dessen Zugabe auf der Platte selektiv. Die Detektion des Antigens erfolgt dann wie beim direkten ELISA durch Zugabe von mit HRP gekoppelten Antikörpern. Es könnte auch der indirekte Sandwich-ELISA analog dem indirekten ELISA etabliert werden.

Der ELISA ist eine einfache, sensitive und vielseitige Quantifizierungsmethode für Allergene. Die Nachweisgrenze bei kommerziellen Kits liegt zwischen 1 - 10 mg/kg (R\_Biopharm, 2013).

Die Bestimmungsgrenze könnte nach Optimierung auf den  $\mu\text{g}/\text{kg}$ -Bereich abgesenkt werden (Crowther, 2009). Die Nachweisgrenze der Allergene in komplexen Lebensmitteln liegt bei 2  $\text{mg}/\text{kg}$ , allerdings mit einer großen Schwankungsbreite (Holzhauser und Vieths, 1999). Mit dem ELISA können nur extrahierbare Allergene bestimmt werden. Daher werden mittels ELISA viele Allergene, die z.B. während des Backvorgangs einer Aggregation oder der Maillard-Reaktion unterliegen, nicht detektiert, da sie dann aus den Lebensmitteln nicht mehr extrahiert werden können.

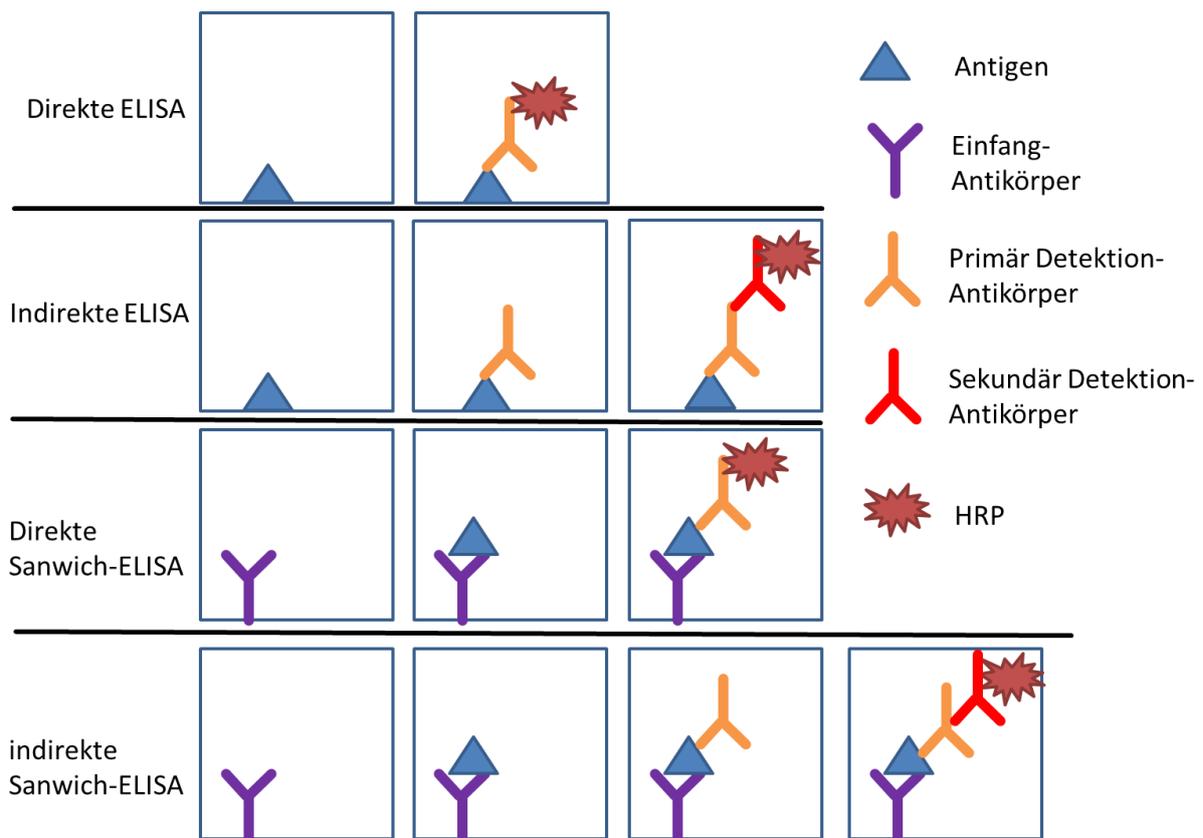


Abbildung 6: Schematische Darstellung des ELISA

### 3.5.3 Massenspektrometrie (MS)

Die MS wurde zuerst für die Identifizierung von Proteinen angewendet. Sie wurde jedoch weiter optimiert, so dass man damit auch qualitativ und quantitativ Allergene bestimmen kann (Monaci und Visconti, 2006b; Lutter, 2011). Es werden entweder die nativen Proteine oder Peptide nach enzymatischem Verdau analysiert (Shefcheck und Musser, 2004; Weber et al., 2006). Die Anwendung der MS zur Bestimmung von Allergenen dürfte in Zukunft an Bedeutung zunehmen, da sie sehr spezifische und quantitativ gute Ergebnisse liefert.

#### **4. Zielsetzung und Arbeitsplan**

Ziel dieser Arbeit ist es, Allergene aus Teigen und Backwaren, die Rindercasein und Erdnüsse als Zutaten enthalten, zu isolieren und zu reinigen. Des Weiteren sollen diese Allergene quantifiziert und charakterisiert werden.

Backen ist ein sehr komplexer Prozess. Dabei können vorhandene Allergene glykosyliert, denaturiert und/oder abgebaut werden und/oder sie können mit anderen Inhaltsstoffen reagieren. Als Folge davon ändern sich die Extrahierbarkeit und die Detektion der Allergene.

Zunächst wurden daher Modell-Backwaren hergestellt, die mit allergenen Kontaminanten dotiert wurden. Im Beispiel Casein wurde eine Casein-Lösung bei der Herstellung der dotierten Modelle eingesetzt. Bei der Dotierung mit Erdnussallergenen wurde Erdnusspulver zunächst in größeren Mengen in die Matrix eingemischt und dann homogenisiert. Anschließend wurde die stark dotierte Matrix stufenweise weiter verdünnt.

Zur Extraktion der Allergene wurden Puffersysteme durch Variation des pH-Wertes, der Ionenstärke, durch Zugabe von Detergenzien, chaotropen Verbindungen und reduzierenden Substanzen systematisch optimiert. Um die Ausbeute an den dotierten Allergenen zu erhöhen, wurden Enzyme eingesetzt und physikalische Methoden optimiert. Nach der Extraktion musste aufgereinigt werden, denn es wurden neben den Allergenen noch weitere Stoffe extrahiert, welche die Quantifizierung und die Charakterisierung der extrahierten Allergene stören konnten. Zur Aufreinigung wurden Dialyseverfahren, Affinitätschromatographie und Fällungsmethoden eingesetzt.

Für die Quantifizierung der extrahierten Allergene wurde ein Sandwich-ELISA entwickelt und validiert. Die weitere Charakterisierung der Allergene erfolgte mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE), gekoppelt mit spezifischen und unspezifischen Färbemethoden.

## **5. Material und Methoden**

### **5.1 Herstellung der Modellebensmittel**

Im Rahmen dieser Arbeit wurde versucht, mit Casein und/oder Erdnüssen in kleinen Mengen dotierte Modellebensmittel herzustellen. Klassische Lebensmittel, die Casein in geringen Mengen enthalten können, sind Kekse, Brot und Muffins. Die Kontamination mit Casein erfolgt sehr leicht, wenn bei der Produktion dieser Backwaren Werkzeuge, die mit Casein in Berührung kamen, nicht sauber gereinigt wurden. Muffins wurden als Modellebensmittel verwendet, da sie typische Zutaten wie Fett, Weizenmehl und Saccharose enthalten. Außerdem konnten Modellmuffins durch Veränderung der Mengen der genannten Zutaten und durch Zugabe weiterer Zutaten, wie z.B. Kakaopulver, Eier und Haselnuss variiert werden.

Milchschokolade ist theoretisch frei von Erdnüssen. Allerdings kann Milchschokolade mit Erdnüssen in geringsten Mengen kontaminiert sein, wenn die Produktionsstraßen für Milchschokolade nach Produktion von Nusschokolade nicht gründlichst gereinigt wurden oder durch Erdnussstaub, der in die Produktionshalle von Milchschokolade geweht wird. Aus diesem Grund wurde Milchschokolade als mit Erdnuss dotiertes Modellebensmittel gewählt.

#### **5.1.1 Herstellung des mit Casein dotierten Modellebensmittels**

Es wurden ca. 365 mg Casein aus Kuhmilch (Merck Darmstadt, Deutschland; Reinheit: nach Hammarstan) in ein Becherglas eingewogen und mit 30 mL basischem PBS-Puffer gelöst. Die Lösung wurde in einen 200 mL Messkolben überführt, wobei das Becherglas sorgfältig nachgewaschen wurde. Der Messkolben wurde bis zur Marke mit dest. Wasser aufgefüllt. 150 mL dieser Casein-Lösung wurden in 275 g Backmischung eingemischt (Zusammensetzung des PBS-Puffers und der Backmischung siehe Anhang 8.1). Die dotierte Backmischung wurde mit einem Handrührer (Fa. Bosch, Deutschland) homogenisiert. Im Weiteren wird die dotierte Backmischung als Casein-Teig bezeichnet.

Jeweils 25 g des Casein-Teiges wurden in Muffin-Formen eingewogen und bei 200 °C für 20 min gebacken. Es wurden jeweils zwei Muffins hergestellt. Die Produkte werden Casein-Muffins genannt.

Der Casein-Teig und die Casein-Muffins wurden lyophilisiert und fein vermahlen. Der Casein-Gehalt in den Casein-Muffins betrug 1026 und 976  $\mu\text{g}/\text{kg}$ .

### **5.1.2 Herstellung des Erdnussstandards und des mit Erdnuss dotierten Modellebensmittels**

Die im Handel erworbenen rohen Erdnüsse wurden bei 180 °C 12 min trocken geröstet. Die gerösteten Erdnüsse wurden zuerst per Hand in einem Porzellanmörser zerkleinert und danach in einem Marmormörser bis zu butterförmiger Konsistenz vermahlen. Es entstand der Erdnuss-Standard.

Als Matrix wurde Blockmilchschokolade aus dem Handel verwendet, die aus mindestens 35% Kakao und 15% Milch bestand. (Zusammensetzung siehe Anhang 8.2). Es wurden 340,9 mg Erdnuss-Standard in einen vorerwärmten Mörser eingewogen und mit ca. 3g Blockmilchschokolade, die vorher im Wasserbad bei 60 °C zum Schmelzen gebracht wurde, homogenisiert. Danach wurde die Probe stufenweise mit 30 und 300 g Blockmilchschokoladen mit einem Handrührer (Fa. Bosch, Deutschland) weitere zwei Stunden homogenisiert. Die Homogenisierung wurde im Wasserbad durchgeführt, damit die Blockmilchschokolade im geschmolzenen Zustand blieb. Bei einer Blockmilchschokoladen-Einwaage von 376 g betrug der Erdnuss-Gehalt 905  $\mu\text{g}/\text{kg}$ .

## **5.2 Methoden**

### **5.2.1 Reduzierende SDS-PAGE**

Als Elektrophorese bezeichnet man die Wanderung elektrisch geladener Teilchen in einem elektrischen Feld. Proteine können elektrophoretisch auf Grund unterschiedlicher Ladungen, Molekulargewichte und Tertiärstrukturen aufgetrennt werden. Bei der SDS-PAGE werden die Proteinladungen mit dem anionischen Detergenz SDS überdeckt. Die Disulfidbrücken, welche die Sekundär- bzw. Tertiärstrukturen der Proteine stabilisieren, werden durch Zugabe von reduzierendem 2-Mercaptoethanol (2ME) gespalten. Daher werden die Proteine ausschließlich entsprechend ihrem Molekulargewicht getrennt. Für die Trennung wurde ein diskontinuierliches Gelsystem verwendet, das durch unterschiedlichen pH-Wert und unterschiedlicher Polymerisationsstufe zwischen Sammel- und Trenngel liegt. Damit lässt

sich die Bandenschärfe erhöhen (Rehm, 2006; Laemmli, 1970; Matissek et al., 2010) (Durchführung siehe Anhang 8.3).

### 5.2.2 Silberfärbung

Die Silberfärbung ist eine unspezifische Färbung von Proteinen in Elektrophoresegelelen. Die proteinassoziierten Silberionen werden wegen des höheren Normalpotentials bevorzugt zu elementarem Silber reduziert, dabei werden die Proteinbanden dunkel gefärbt. Die Methode ist mit einer Nachweisgrenze von 0,05 bis 0,1 ng/mm<sup>2</sup> sehr empfindlich (Heukeshoven und Dernick, 1986) (Durchführung siehe Anhang 8.4).

### 5.2.3 Western-Blot

Als Western-Blot bezeichnet man den Transfer von Proteinbanden aus dem Elektrophoresegel auf eine Trägermembran (Renart et al., 1979). Als Trägermembranen werden ausschließlich Nitrocellulose-Membranen mit der Porengröße 0,2 µm verwendet, diese besitzen eine gute Bindungskapazität (Handman und Jarvis, 1985).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Semydry-Blot verwendet (Towbin und Gordon, 1984). Das Gel und die Membran befinden sich dabei zwischen zwei mit Elektrodenpuffern getränkten Tüchern aus 80% Viskose und 20% Polyester. Der Transfer erfolgt durch ein Gleichstromfeld aus zwei horizontal gestapelten Graphitelektroden (siehe Abbildung 7) (Durchführung siehe Anhang 8.5).

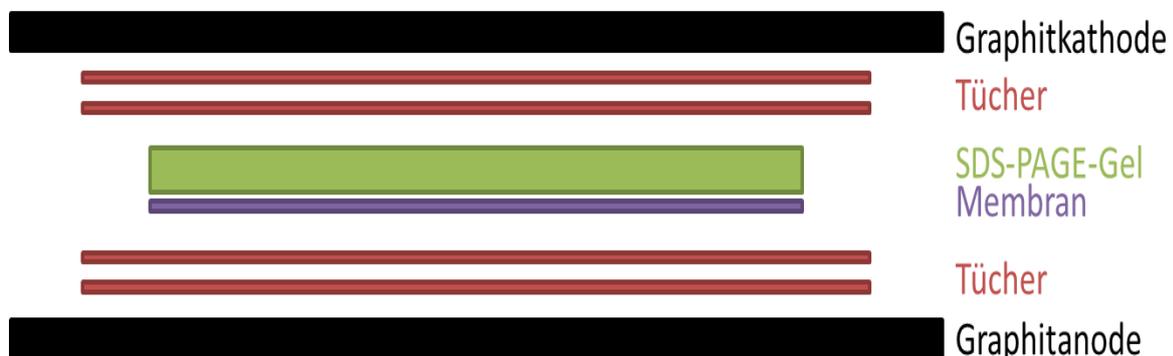


Abbildung 7: Schematische Darstellung des Semydry-Blot

#### **5.2.4 Immunfärbung**

Die auf die Nitrocellulose-Membranen transferierten Proteine können mit Antikörpern spezifisch detektiert werden. Mit Hilfe der Immunfärbung können daher antigene und nicht-antigene Proteine differenziert werden (Stott, 1989).

Die freien unspezifischen Bindungsstellen auf den Membranen werden zuerst blockiert. Ein häufig verwendetes Blockreagenz ist Magermilch (Johnson et al., 1984). Magermilch konnte aber im Rahmen dieser Arbeit wegen ihrer Aktivität gegen Anti-Casein-Antikörper nicht verwendet werden. An Stelle von Magermilch wurde daher Tween20 verwendet (Steinhof et al., 2011).

Bei der Detektion von Casein wird ein aus Kaninchen gewonnener Anti-Casein-Antikörper verwendet. Als sekundärer Antikörper wird der mit HRP dotierte Anti-Kaninchen-IgG-Antikörper aus Ziegen verwendet.

Bei der Detektion von Erdnuss wird ein biotinylierter Anti-Erdnuss-Antikörper verwendet. Die Signalverstärkung erfolgt auf Grund der Mehrfachbindungen von Biotin am Antikörper.

Angefärbt wurde mit TMB, Dioctylnatriumsulfosuccinat (DONS) und Wasserstoffperoxid (Durchführung siehe Anhang 8.6).

#### **5.2.5 Ponceau-Färbung**

Die Ponceau-Färbung ist eine unspezifische reversible Proteinfärbung auf der Membran. Sie dient hauptsächlich zur Färbung der Proteinmenge auf der Membran, da sie nicht mit dem Antikörper detektiert wird. Mit dieser Färbung kann vor allem der erfolgreiche Proteintransfer vom Gel auf die Matrix nachgewiesen werden. Der Ponceau-Farbstoff kann leicht ausgespült werden und stört damit die nachfolgende Immunfärbung nicht (Durchführung siehe Anhang 8.7).

#### **5.2.6 Proteinbestimmung nach Lowry**

Bei der Proteinbestimmung nach Lowry handelt es sich um eine unspezifische quantitative Methode (Lowry et al., 1951). Initialreaktion ist die Biuretreaktion, dabei bildet sich ein blauvioletter quadratisch-planarer Komplex zwischen den Peptidbindungen und den Kupfer(II)-

Ionen in alkalischer Lösung. Im zweiten Schritt werden Kupfer(II)-Ionen durch die aromatischen Gruppen des Proteins zu Kupfer(I)-Ionen reduziert. Kupfer(I) reduziert Molybdän(VI) und Wolfram(VI) im gelben Folin-Ciocalteu-Reagenz zu Molybdänblau, welches photometrisch bei 720 nm gemessen wird (Lottspeich und Engels, 2009). Die Extinktionen variieren je nach der Anzahl aromatischer Aminosäuren in den verschiedenen Proteinen. BSA als Standardprotein ist zwar gut geeignet, aber die mit dieser Methode ermittelten Ergebnisse weichen wegen der unterschiedlichen Aminosäurezusammensetzung des Zielproteins trotzdem leicht von der wahren Konzentration ab (Durchführung siehe Anhang 8.8).

### **5.2.7 Sandwich-ELISA**

Für die Bestimmung des Casein-Gehaltes in den Lebensmitteln wurde der indirekte Sandwich-ELISA verwendet. Dabei werden die Einfang-Antikörper auf der 96-Well-Platte über Nacht immobilisiert, wobei die freien Bindungsstellen blockiert werden. Magermilch als Blockreagenz eignete sich nicht für die Bestimmung von Casein. Auch Tween20 konnte die Platte nicht vollständig blockieren. Als geeignetes Blockreagenz erwies sich Weizenmehlextrakt.

Für die Bestimmung von Casein wurden Anti-Casein-Antikörper aus Kaninchen als primäre Antikörper und die mit HRP konjugierten Anti-Kaninchen-IgG-Antikörper aus Ziegen als sekundäre Antikörper verwendet.

Für die Bestimmung des Erdnussproteins wurde der direkte Sandwich-ELISA verwendet. In diesem Fall war Magermilch als Blockreagenz für die Bestimmung des Erdnussproteins geeignet. Zwei Anti-Erdnuss-Antikörper aus Kaninchen wurden als Einfang- und primäre Antikörper verwendet, davon waren die primären Antikörper biotinyliert. Zur Färbung wurde Avidin-HRP zugesetzt, da Biotin Avidin stark und spezifisch bindet (Durchführung siehe Anhang 8.9).

### **5.2.8 Auswertung**

Lösungen mit unterschiedlichen Casein- oder Erdnussgehalten wurden für die Kalibrierung verwendet. Eine typische Standardkurve ist in Abbildung 8 dargestellt (Schröter, 2011).

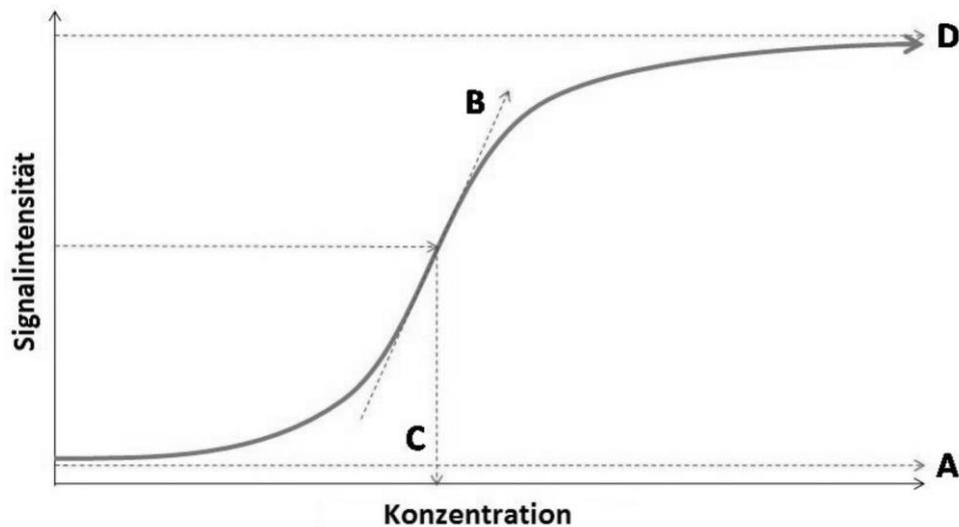


Abbildung 8: Sigmoidaler Kurvenverlauf einer 4-Parameter Messkurve (Schröter, 2011)

Die Standardkurve wird im Rahmen dieser Arbeit mit der 4-Parameter-Logistic-Kurvenanpassung mit der Software „SoftMax Pro“ ausgewertet. Die entsprechende Formel lautet (Rodbard und McClean, 1977; O’Connell et al., 1993).

$$y = \frac{(A - D)}{\left(1 + \left(\frac{x}{C}\right)^B\right)} + D$$

A: untere Asymptote

B: Steigung der Kurve am Wendepunkt

C: Wendepunkt

D: obere Asymptote

y: Extinktion

x: Konzentration

### 5.3 Statistik

Es werden alle Formeln dargestellt, die im Rahmen dieser Arbeit entsprechend der Literatur nach Walser (2011) angewandt wurden.

Berechnung des Mittelwertes:

$$\bar{x} = \frac{\sum x_i}{n}$$

$\bar{x}$ : arithmetischer Mittelwert

$x_i$ : Messwert

n: Anzahl der Messungen

Berechnung der Standardabweichung:

$$s = \sqrt{\frac{\sum(\bar{x}-x_i)^2}{n-1}}$$

s: Standardabweichung

$\bar{x}$ : arithmetischer Mittelwert

$x_i$ : Messwert

n: Anzahl der Messungen

Berechnung des Variationskoeffizienten:

$$Cv = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100\%$$

Cv: Variationskoeffizient [%]

s: Standardabweichung

$\bar{x}$ : arithmetischer Mittelwert

Berechnung der Wiederfindung:

$$WDF = \frac{\bar{x}}{x_r} \cdot 100\%$$

WDF: Wiederfindung [%]

$\bar{x}$ : arithmetischer Mittelwert des Gehalts

$x_r$ : dotierter Gehalt

Signifikanztest nach Zweistichproben-t-Test:

$$|t| = \sqrt{\frac{n_1 n_2 (n_1 + n_2 - 2)}{n_1 + n_2}} \cdot \frac{|\bar{x} - \bar{y}|}{\sqrt{n_1 s_1^2 + n_2 s_2^2}}$$

$n_1$  und  $n_2$ : Anzahl der Messungen

$s_1$  und  $s_2$ : Standardabweichungen der Messungen  $n_1$  und  $n_2$

$\bar{x}$  und  $\bar{y}$ : arithmetischer Mittelwert der Messungen  $n_1$  und  $n_2$

Alle Messungen  $n_1$  wurden dreimal wiederholt. Deshalb gibt es für  $n_1$  und  $n_2$  3 Werte. Die Freiheitsgrade  $n'$  wurden nach folgender Formel berechnet:

$$n' = n_1 + n_2 - 2 = 4$$

Nach der t-Test-Tabelle beträgt der t-Test-Wert bei vier Freiheitsgraden ( $p = 0,05$ , zweiseitig) 2,776. (Walser, 2011). Das heißt, falls  $|t| > 2,776$ , sind die beiden verglichenen Werte statistisch signifikant unterschiedlich.

## 6. Ergebnisse

### 6.1 Entwicklung des indirekten Sandwich-ELISA für die Detektion des Caseins

#### 6.1.1 Optimierung der Antikörperkonzentration

Um die Bestimmungsmethode zu etablieren, muss die Antikörperkonzentration optimiert werden. Entsprechend der Herstellerempfehlung wurde die Antikörperkonzentration in einem größeren Bereich getestet. Dabei wurde der Einfang-Antikörper (polyklonal gegen Rindercasein; Wirtstier: Schaf; GeneTex, USA) und der primäre Detektions-Antikörper (polyklonal gegen Rindercasein; Wirtstier: Kaninchen; GeneTex, USA) 1:5.000; 1:7.500; 1:10.000 und 1:12.500) verdünnt. Der sekundäre Detektions-Antikörper (polyklonal gegen Kaninchen-IgG; Wirtstier: Ziege; Abcam, UK) wurde 1:10.000; 1:15.000; 1:20.000 und 1:25.000 verdünnt, da die Konzentration der Stammlösung des sekundären Detektions-Antikörpers zweifach höher war als diejenige des Einfang- und des primären Detektions-Antikörpers. Die drei Antikörper wurden nacheinander einzeln optimiert. Die zunächst nicht betrachteten Verdünnungen sind bei Einfang- und primärem Antikörper 1:10.000 und bei dem sekundären Antikörper 1:20.000. Alle Antikörper wurden mit PBS-Tween20-Puffer verdünnt (siehe Anhang 8.6.1).

Die Casein-Konzentrationen für die Erstellung der Standardkurve lagen im Bereich von 0,4 - 300 mg/kg. Als Blockreagenz wurde PBS-Tween20-Puffer (siehe Anhang 8.6.1) verwendet. Die Bewertung der Kurvenanpassung erfolgte als Bestimmtheitsmaß ( $R^2$ ) aus der Standardreihe. Das Bestimmtheitsmaß wurde mit der Software „SoftMaxPro“ automatisch berechnet.

Tabelle 4: Bestimmtheitsmaß bei unterschiedlichen Konzentrationen der Antikörper

	Verdünnung			
	1:5000	1:7500	1:10000	1:12500
Einfang-Antikörper	1	0,998	0,999	0,999
Primärer Detektions-Antikörper	0,998	0,999	0,999	0,997
	1:10000	1:15000	1:20000	1:25000
Sekundärer Detektions-Antikörper	1	0,999	1	0,999

Aus Tabelle 4 folgen nur kleine Abweichungen des Bestimmtheitsmaßes bei den unterschiedlichen Verdünnungen der Antikörper. Die Konzentrationen der Antikörper spielten in den getesteten Bereichen von 1:5.000 bis 1:12.500 für den Einfang- und den primären Detektions-Antikörper bzw. von 1:10.000 bis 1:25.000 für den sekundären Detektions-Antikörper keine Rolle. Daher wurde den Angaben des Herstellers gefolgt und die Verdünnung 1:10.000 für den Einfang-Antikörper und den primären Detektions-Antikörper sowie 1:15.000 für den sekundären Detektions-Antikörper verwendet.

### **6.1.2 Optimierung der Inkubationszeit**

In einem Sandwich-ELISA-System findet theoretisch eine spezifische Bindung nur zwischen Antigen und Antikörper und eine unspezifische Bindung zwischen Plattenoberfläche und Antikörper bzw. Antigen statt. Aber in der Praxis entstehen auch viele unspezifische Bindungen, dadurch werden ein hoher Blindwert und eine hohe Streuung verursacht (Kenna et al., 1985; Dietzgen und Francki, 1987; Kim et al., 2007). Antikörper und Antigene können innerhalb einer Stunde vollständig reagieren, wohingegen die Reaktionen z.B. zwischen Plattenoberfläche und Proteinen länger dauern können. Eine lange Inkubationszeit der spezifischen Verbindung bzw. eine kurze Inkubationszeit der unspezifischen Verbindung sind für die Quantifizierung mittels ELISA nicht geeignet, daher wurde die Inkubationszeit optimiert.

Als Standardprotokoll wurden die Einfang-Antikörper für 24 h und andere Antikörper und Antigene für 60 min inkubiert. Die Optimierung der Inkubationszeit basierte auf dem Standardprotokoll. Der Einfang-Antikörper wurde 2 h, 4 h, 16 h und 24 h inkubiert, während die Inkubationszeit für die anderen Antikörper und die Standardlösung 10 min, 30 min, 60 min und 120 min betrug. Für die Optimierungsversuche wurde eine Standardlösung mit 5 mg/kg Casein hergestellt. Die Inkubationszeiten wurden schrittweise optimiert. Die Beschreibung der Optimierung der Inkubationszeiten für die bisher nicht erwähnten Konditionen befindet sich im Anhang 8.9. Die jeweiligen Inkubationszeiten wurden anhand der Mittelwerte der Extinktionen und der Variationskoeffizienten festgestellt. Die Formeln für die Ermittlung der Mittelwerte und der Variationskoeffizienten sind im Abschnitt 5.3 dargestellt.

Tabelle 5: Optimierung der Inkubationszeit

	IZ*	Ext.**	Cv***		IZ	Ext.	Cv
Einfang-Antikörper	2 h	0,684	3,8 %	Primärer Detektions-Antikörper	10 min	0,877	9,6 %
	4 h	0,928	7,6 %		30 min	1,532	5,4 %
	16 h	1,366	5,1 %		60 min	1,607	6,2 %
	24 h	1,475	7,0 %		120 min	1,579	4,0 %
5 mg/kg Casein-Lösung	10 min	0,569	13,5 %	Sekundärer Detektions-Antikörper	10 min	0,257	9,0 %
	30 min	1,253	7,9 %		30 min	1,875	5,8 %
	60 min	1,373	2,6 %		60 min	1,852	5,6 %
	120 min	1,367	3,5 %		120 min	1,729	3,6 %

\*IZ: Inkubationszeit

\*\* Ext.: Extinktion

\*\*\*Cv: Variationskoeffizient

Die Bindung zwischen Platte und Einfang-Antikörper dauerte länger, da sie unspezifisch war. Eine kurze Inkubationszeit des Einfang-Antikörpers bedingte eine niedrige Extinktion, da nicht genug Antikörper an die Platte gebunden wurden. Die Unterschiede zwischen 16 h und 24 h Inkubationszeit sind im Vergleich zu 2 h und 4 h klein. Daher wurden die Inkubationen aus arbeitstechnischen Gesichtspunkten 16 h über Nacht durchgeführt.

### 6.1.3 Optimierung des Blockreagenz

Das häufig verwendete Blockreagenz Magermilch kann wegen der Antigenität gegen Anti-Casein-Antikörper bei der Bestimmung von Casein nicht verwendet werden. Daher wurde PBS-Tween20-Puffer (siehe Anhang 8.6.1) als Blockreagenz gewählt, da Tween20 als Detergens effektiv auf der Oberfläche gebunden wird. Der in Abschnitt 5.1.1 beschriebene Casein-Teig wurde bei drei Wiederholungen mit PBS-Tween20-Puffer extrahiert. Die Extrakte wurden mit PBS-Tween20-Puffer im Verhältnis 1:10 bis 1:100 verdünnt und auf die ELISA-Platte, die mit Tween20 blockiert wurde, aufgetragen. Das weitere Vorgehen wird im Anhang 8.9 beschrieben. Die Mittelwerte und die Standardabweichungen der Wiederfindungen sind in Abbildung 9 dargestellt. Die berechneten Konzentrationen, die mit dem Verdünnungsfaktor berücksichtigt wurden, erhöhten sich mit der Steigerung des Verdünnungsfaktors. Die Wiederfindung erhöhte sich bis über 100% bei stärkerer Verdünnung des Extraktes. Wahrscheinlich wurde die Oberfläche der ELISA-Platten nicht vollständig blockiert. Kenna et al. (1985) beobachteten eine nicht spezifische Bindung zwischen Detektions-Antikörper und mit Tween20 blockierter ELISA-Platte. Der Fehler, der

durch Adsorption des Detektions-Antikörpers an der ELISA-Platte auftrat, wurde unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors verstärkt. Die Wiederfindungen waren bei einigen Verdünnungen, z.B. bei 1:60 und 1:80 zwar gut, aber wenn bei allen Verdünnungen die Wiederfindungen einbezogen wurden, waren die Ergebnisse als unzuverlässig zu bewerten.

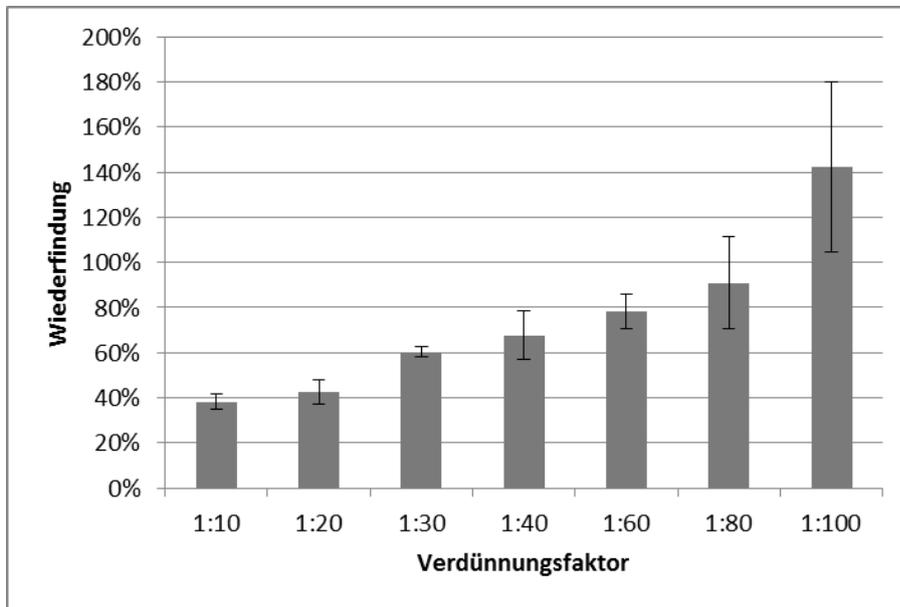


Abbildung 9: Wiederfindungen des Caseins bei unterschiedlichen Verdünnungsfaktoren, Wiederfindung bezogen auf den theoretischen Casein-Gehalt (siehe Tabelle 22 im Anhang 8.16)

Um das beschriebene Problem zu lösen, wurden andere Blockreagenzien getestet. In der Literatur wird empfohlen, die ELISA-Platte mit einem nicht reaktiven Protein zu blockieren (Kenna et al., 1975; Kim et al., 2007). Aus den beschriebenen Gründen konnte Magermilch nicht als Blockreagenz verwendet werden. Daher wurde Hühnereieiklar als Blockreagenz gewählt. Das Modellebenmittel Muffin enthielt als Backware Weizenmehl, daher war es sinnvoll, als Blockreagenz Weizenprotein zu verwenden. Es wurden 1 %, 5 % und 10 % Hühnereieiklar bzw. Weizenmehl in PBS-Tween20-Puffer gelöst. Nach Entfernung der unlöslichen Bestandteile wurde die ELISA-Platte mit diesen Reagenzien an Stelle PBS-Tween20 blockiert. Es wurden die gleichen Extrakte mit den gleichen Verdünnungsfaktoren vermessen, die auch schon bei Verwendung von Tween20 als Blockreagenz gewählt wurden. Die Mittelwerte und die Standardabweichungen sind in Abbildung 10 dargestellt.

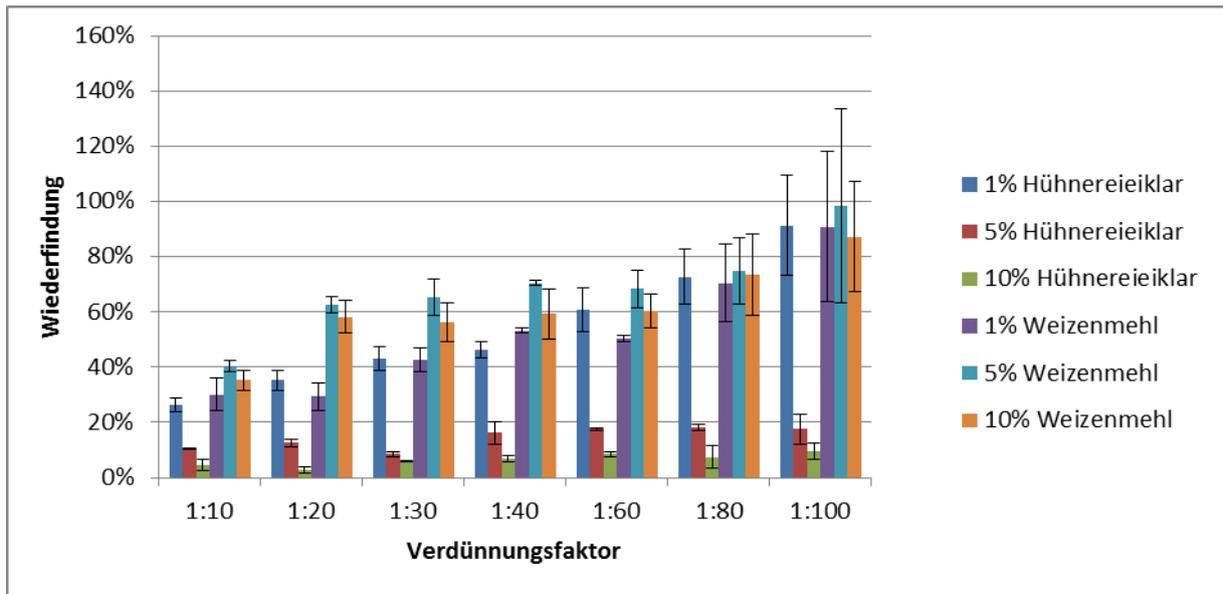


Abbildung 10: Hühnereiklar- und Weizenmehlextrakte als Blockreagenzien (X-Achse: Wiederfindung in Prozent; Y-Achse: Wiederfindungen bezogen auf den theoretischen Casein-Gehalt, die Säulen mit den verschiedenen Farben beschreiben die unterschiedlichen Blockreagenzien) (siehe Tabelle 23 im Anhang 8.16)

Die Ergebnisse der mit 1%igem Hühnereiklar- bzw. Weizenmehlextrakt blockierten ELISA-Platten waren ähnlich den Ergebnissen, die mit Tween20 erzielt wurden, d.h. dass die Wiederfindungen mit der Erhöhung der Verdünnungsfaktoren steigen. Offensichtlich wurde die Oberfläche der ELISA-Platten mit 1%igem Hühnereiklar- bzw. Weizenmehlextrakt nicht vollständig blockiert. Bei Blockierung der ELISA-Platten mit 5%igem bzw. 10%igem Hühnereiklarextrakt nahm die Wiederfindung signifikant ab. Die 5%igen bzw. 10%igen Hühnereiklarextrakte hafteten stark an der Oberfläche der ELISA-Platten und sie konnten daher nicht vollständig abgespült werden. Als Folge davon reagierte der Einfang-Antikörper nur wenig mit dem Antigen, das war die Ursache für die schlechte Wiederfindung. Das Hühnereiklar war daher als Blockreagenz ungeeignet. Die ELISA-Platte mit 5%igem Weizenmehlextrakt als Blockreagenz zeigte im Verdünnungsbereich 1:20 bzw. 1:80 eine stabile und zuverlässige Wiederfindung von etwa 70%. Die Wiederfindungen bei den Verdünnungsfaktoren 1:10 bzw. 1:100 waren besonders niedrig bzw. hoch. Die Erklärung könnte sein, dass die Casein-Konzentrationen bei den beiden Verdünnungen nicht mehr im Kalibrierungsbereich lagen. Die Ergebnisse aus den mit 5%igem und 10%igem Weizenmehlextrakt blockierten ELISA-Platten waren ähnlich. Aber die Wiederfindungen bei den mit 10%igen Weizenmehlextrakten blockierten ELISA-Platten waren niedriger als

diejenigen bei mit 5%igen Weizenmehlextrakten blockierten ELISA-Platten. Eine Erklärung könnte die unspezifische Bindung des Blockreagenz aus Weizenmehlextrakt an den Einfang-Antikörper sein. Die ELISA- und Wiederfindungssignale waren daher abgesenkt.

Aus den genannten Gründen wurde der 5%ige Weizenmehlextrakt in PBS-Tween20-Puffer als Blockreagenz verwendet.

#### **6.1.4 Grundkalibrierung**

Entsprechend der oben beschriebenen Optimierungen wurde eine indirekte Sandwich-ELISA-Methode für die Bestimmung des Caseins entwickelt. Die Beschreibung der Methode findet sich im Anhang 8.9.2. Zur Kalibrierung der indirekten Sandwich-ELISA-Methode wurde eine Grundkalibrierung durchgeführt. Die Versuche wurden vier Mal wiederholt. Casein wurde in PBS-Tween20-Puffer (siehe 8.6.1) gelöst und auf 1 mg/kg verdünnt. Des Weiteren wurden vier Kalibrierreihen mit 0,7; 2,4; 8,1; 27; 90; 300 und 1000 µg/kg Casein hergestellt. Der PBS-Tween20-Puffer wurde als Blindwert verwendet. Zusammen mit dem Blindwert wurden die vier Kalibrierreihen auf einer ELISA-Platte vermessen. Die vier Kalibrierreihen sind in Abbildung 11 dargestellt.

Das mit der beschriebenen Software automatisch ermittelte Bestimmtheitsmaß  $R^2$  beträgt 0,997, d.h. dass die vier Standardkurven sehr gut übereinstimmen.

Der Kalibrierungsbereich wurde mit Hilfe der Standardkurve berechnet. Die häufig verwendete Berechnung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze wird bezogen auf den Blindwert und seine Standardabweichungen. Diese Berechnung ist aber leider nur für einen linearen Kurvenverlauf geeignet, nicht aber für einen sigmoidalen Kurvenverlauf. Neben der unteren Bestimmungsgrenze zeigt auch der Bereich der oberen Bestimmungsgrenze einen sigmoidalen Kurvenverlauf. Die größere Veränderung der Konzentration in beiden flacheren Bereichen der 4-Parameter-Kurven verursachen nur kleinere Streuungen der Signalintensität. Für die Auswertung kann nur der Bereich herangezogen werden, in dem die Signalintensität parallel mit der Antigen-Konzentration ansteigt (Cammann, 2010). Entsprechend dieser Ableitung wurde das Präzisionsprofil berechnet (Ekins, 1981; Hintemann, 2006).

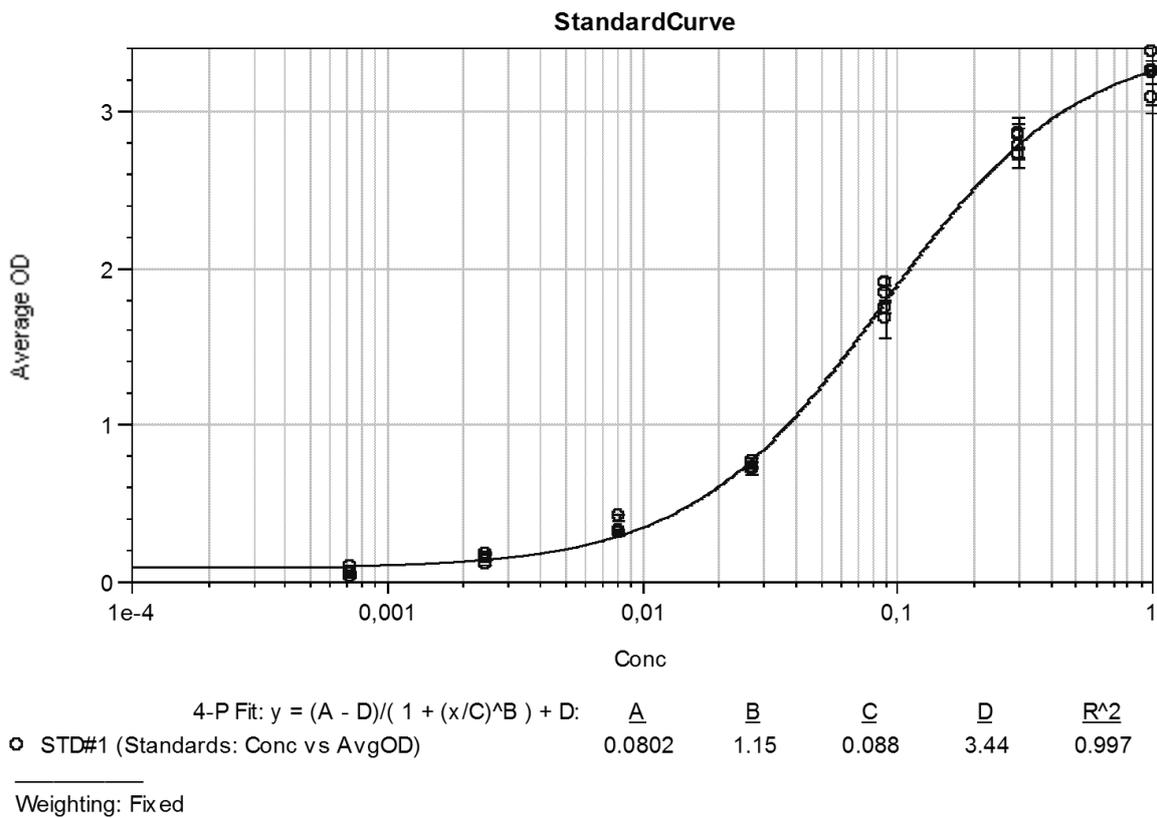


Abbildung 11: Grundkalibrierung des ELISA für die Bestimmung von Casein (X-Achse: logarithmischer Auftrag der Konzentrationen (Conc.: Konzentration, mg/L); Y-Achse: Extinktionen (Average OD: Mittelwert der optischen Dichte); Messwerte siehe Anhang 8.16, Tabelle 24)

Um das Präzisionsprofil zu berechnen, wurde die Steigung der Standardkurve mit folgender von Hintemann (2006) vorgeschlagenen Formel berechnet.

$$\frac{dOD}{dc} = \frac{B \cdot (D - A)}{C} \cdot \left(\frac{C}{c}\right)^{1-B} \cdot \left(1 + \left(\frac{c}{C}\right)^B\right)^{-2}$$

dOD/dc: Steigung der Kurve

A, B, C und D: von 4-Parameter-Kurvenanpassung ermittelte Werte

c: Konzentration

Das Präzisionsprofil wurde aus der Standardabweichung der Extinktion, der Konzentration und der Steigung der Kurve mit folgender Formel von Hintemann (2006) berechnet:

$$\Delta c = \frac{s}{c \cdot \left(\frac{dOD}{dc}\right)} \cdot 100\%$$

$\Delta c$ : Präzisionsprofil

$c$ : Konzentration

$dOD/dc$ : Steigung der Kurve

$s$ : Standardabweichung

Das Präzisionsprofil der Grundkalibrierung für die Detektion des Caseins ist in Abbildung 12 dargestellt.

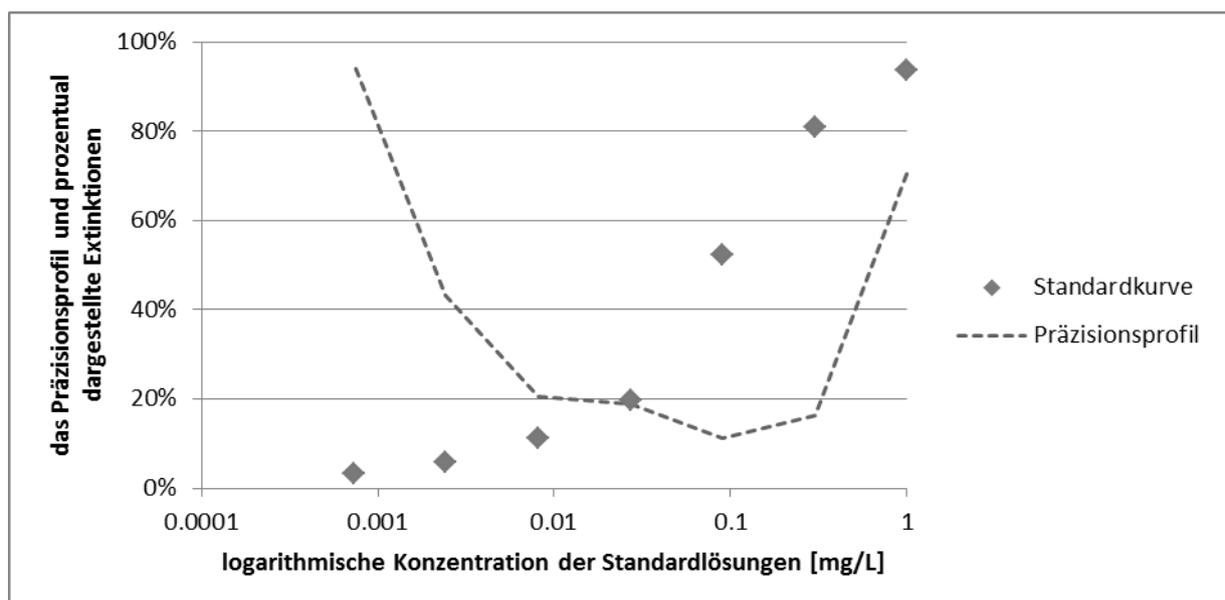


Abbildung 12: Präzisionsprofil der Grundkalibrierung für die Bestimmung des Caseins (X-Achse: logarithmische Konzentration der Standardlösungen [mg/L]; Y-Achse: Präzisionsprofil und prozentual dargestellte Extinktionen; Messwerte siehe Anhang 8.16, Tabelle 24)

Das Präzisionsprofil bestätigte die Erwartung, dass die Präzision bei größerer Steigung der Kurve besser ist. Es wurde ein Schwellenwert von 20% festgelegt, d.h. dass der Kalibrierungsbereich den Konzentrationsbereich umfasst, in dem das Präzisionsprofil < 20% ist. Daher betrug in diesem Beispiel der Kalibrierungsbereich für den indirekten Sandwich-

ELISA 14-310 µg/kg. Im Vergleich zum Kalibrierungsbereich des kommerziellen Kits der Fa. r-Biopharm von 0,5 - 13,5 µg/kg mit Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors (r-Biopharm, 2013), war der Kalibrierungsbereich in dieser Arbeit niedrig. Eine mögliche Erklärung wäre, dass der kommerzielle Kit auf monoklonalen Antikörpern und direktem Sandwich-ELISA basiert, welcher ein schwächeres Signal im Vergleich mit dem polyklonalen und dem indirekten Sandwich-ELISA in dieser Arbeit liefert.

Wie bereits erwähnt, konnte die Nachweisgrenze nicht mit Hilfe von Standardkurven mathematisch ermittelt werden. Als Nachweisgrenze festgelegt wurde die kleinste Konzentration, deren Extinktionswert abzüglich 3mal ihrer Standardabweichung noch höher ist als der Extinktionswert des Blindwertes zuzüglich 3mal seiner Standardabweichung. Dazu wurde eine 1000 µg/kg Casein-Standard-Lösung hergestellt, diese wurde mit PBS-Tween20-Puffer (siehe Anhang 8.6.1) im Verhältnis 1:10 verdünnt. Alle Lösungen wurden mit dem ELISA wie in Anhang 8.9.2 beschrieben. getestet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 6 dargestellt. Die Nachweisgrenze in der Standardlösung betrug 0,01 µg/kg.

Tabelle 6: Mittelwert und Standardabweichungen der Extinktionen

Konzentration [µg/kg]	Mittelwert	Standardabweichung
1000	3,780	0,115
100	3,332	0,035
10	2,174	0,045
1	1,278	0,020
0,1	0,704	0,025
0,01	0,509	0,006
0,001	0,458	0,006
Blindwert	0,424	0,010

## 6.2 Methodenentwicklungen zur Extraktion von Casein aus der Lebensmittelmatrix

### 6.2.1 Literaturübersicht zu Puffersystemen

Die meisten der in der Literatur beschriebenen Puffersystemen basieren auf Phosphat- oder Tris-Puffersystemen. Durch Zugabe von Salz, Detergenzien, reduzierenden Stoffen oder Harnstoff konnten die Extraktionseigenschaften des Puffers variiert werden. Neben den erwähnten Puffersystemen wurden einige ausgefallene Reagenzien, wie. z.B. Phenol und Zitronensäure, für die Extraktion des Caseins aus der Matrix verwendet. Im Rahmen dieser

Arbeit wurden die wichtigsten aus der Literatur bekannten Puffer-Systeme getestet. Zur Zusammensetzung der Puffersysteme siehe Anhang 8.10.1. Es wurden insgesamt 30 verschiedene Puffer aus der Literatur, ein kommerziell erhältlicher Extraktionspuffer (r-Biopharm, Deutschland) und dest. Wasser als Referenz wie im Anhang 8.10.2 beschrieben, getestet. Die Puffer 1-10 wurden von der Firma Eurofins (Hamburg, Deutschland) empfohlen. Alle Testungen wurden dreimal wiederholt. Jeweils 0,1 g Casein-Teig bzw. Casein-Muffins wurden in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß eingewogen und mit 1 mL des entsprechenden Puffers extrahiert. Die Extrakte wurden zentrifugiert und die unlöslichen Substanzen wurden entfernt. Um die Beeinflussung des Puffers zu minimieren, wurde zu je 0,1 mL der Extrakte 1 mL Acetat-Puffer (Zusammensetzung siehe Anhang 8.10.2) zugegeben. Der pH-Wert dieser Lösungen war 4,6, das ist der isoelektrische Punkt (IEP) des Caseins. Casein fällt beim IEP aus und es wurde durch Zentrifugation (7378 g; 1 h) abgetrennt. Anschließend wurde das Casein wieder in PBS-Tween20-Puffer (siehe Anhang 8.6.1) gelöst. Somit wurde der Extraktionspuffer aus dem Extrakt entfernt (Durchführung siehe Anhang 8.10.3). Die Detektion des extrahierten Caseins wurde mittels Sandwich-ELISA (siehe 8.9.2) durchgeführt. Anhand der Mittelwerte und der Standardabweichungen der Wiederfindungen wurde die Extraktionseigenschaft des jeweiligen Puffers beurteilt. Alle Ergebnisse sind in Abbildung 13 und in Abbildung 14 dargestellt.

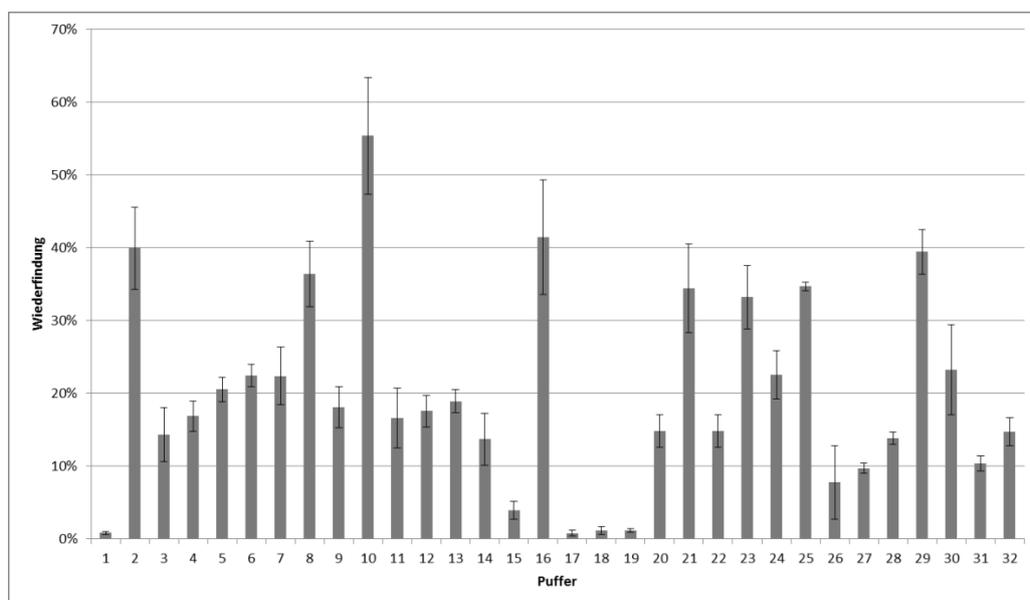


Abbildung 13: Wiederfindung von Casein aus den Extrakten des Casein-Teigs (X-Achse: getestete Puffer; Y-Achse: Wiederfindung bezogen auf den theoretischen Casein-Gehalt im Casein-Teig; Daten siehe Tabelle 25 im Anhang 8.16)

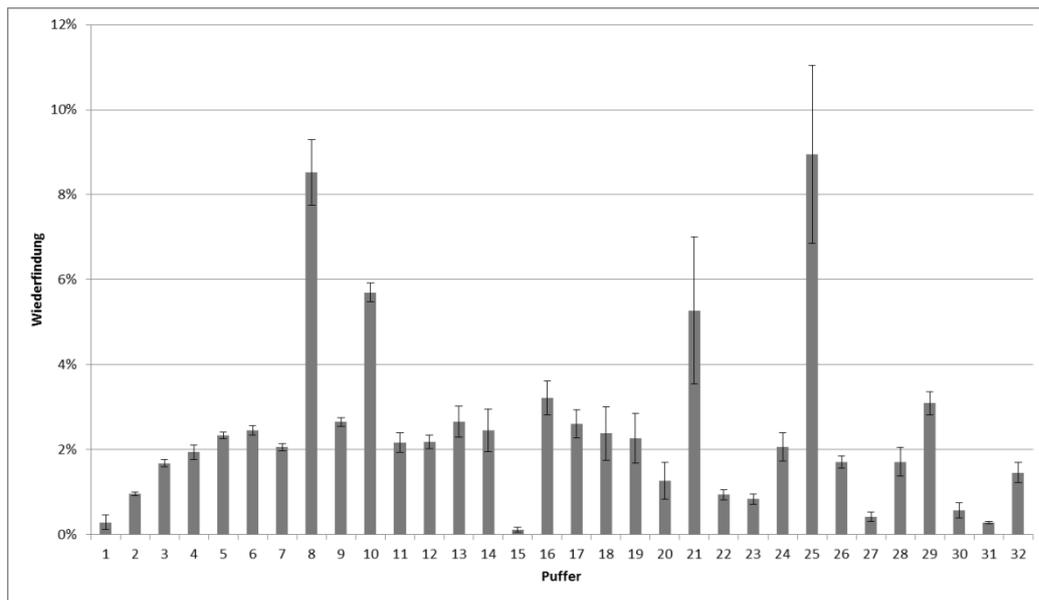


Abbildung 14: Wiederfindung von Casein aus den Extrakten der Casein-Muffins (X-Achse: getestete Puffer; Y-Achse: Wiederfindung bezogen auf den theoretischen Casein-Gehalt in Casein-Muffins; Daten siehe Tabelle 26 im Anhang 8.16)

Grundsätzlich kann man festhalten, dass die Extraktionen, die mit Puffern aus der Literatur durchgeführt wurden, nicht erfolgreich waren. Es konnten maximal 55 % Casein aus dem Casein-Teig (siehe Säule 10, Abbildung 13) und 9 % Casein aus den Casein-Muffins isoliert und detektiert werden (siehe Säule 25, Abbildung 14). Die Gründe für dieses Ergebnis sind vielfältig.

Bei der Extraktion von Casein aus dem Casein-Teig wurde Casein wahrscheinlich an den Matrices und eventuell auch an den Oberflächen der Reaktionsgefäße adsorbiert oder von Fett Tröpfchen umhüllt, was natürlich zu einer schlechteren Extrahierbarkeit des Caseins führte. Nach dem Backen wurde Casein zusätzlich auf Grund der Maillard-Reaktion chemisch an die Matrices gebunden, was die Extrahierbarkeit zusätzlich verschlechterte. Außerdem wurde die Struktur des Caseins während des Backvorganges so stark verändert, dass der Antikörper Casein nicht mehr erkannte.

Es zeigte sich aber auch, dass die Wiederfindung bei Einsatz eines basischen Puffers besser war als bei einem sauren Puffer. Der Grund ist, dass Casein im Basischen besser löslich ist als im Sauren. Casein löst sich im sauren Bereich deshalb schlecht, da sein IEP bei pH 4,6 liegt.

Daher war die Wiederfindung in Zitronensäurelösung besonders schlecht (siehe Säule 1, Abbildung 13 und Abbildung 14).

Mit SDS ließ sich Casein aus dem Casein-Teig schlecht, aber aus den Casein-Muffins gut extrahieren (siehe Säulen 17,18 und 19, Abbildung 13 und Abbildung 14). Vermutlich war das Casein in den Casein-Muffins gebunden und daher mit SDS besser extrahierbar. Das Casein im Casein-Teig konnte auch ohne SDS-Zugabe leicht extrahiert werden, da es im nativen Zustand und ungebunden vorlag. SDS wirkte nämlich außer als Detergens wie etwa Tween20 auch noch als denaturierende Verbindung. Da Casein durch SDS denaturiert werden kann, könnte dies die Reaktion mit dem Antikörper bei der Detektion mittels ELISA stören. Das könnte die Erklärung dafür sein, dass die Wiederfindungen bei den Säulen 17, 18 und 19 in Abbildung 13 niedrig waren. Tween20 (siehe Säulen 16, 20, 25 und 30, Abbildung 13 und Abbildung 14), Triton X100 (siehe Säulen 16, 22 und 23, Abbildung 13 und Abbildung 14) und CHAPS (3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonat) (siehe Säule 24, Abbildung 13 und Abbildung 14) wurden als nichtionische Tenside zugesetzt, weil sie das Fett in der Lebensmittelmatrix aufschließen können. Allerdings konnte kein positiver Effekt mit diesen Tensiden im Vergleich mit anderen Puffersystemen festgestellt werden. Die gute Wiederfindung der Puffer in Säulen 16 und 25 (Abbildung 13 und Abbildung 14) sind wahrscheinlich auf den basischen pH-Wert und/oder auf die Zugabe von SDS und 2ME zurückzuführen.

Harnstoff könnte die nicht-kovalenten Bindungen des Caseins lösen, was zu einer Freisetzung des Caseins aus der Matrix führt. Daher war auch die Wiederfindung bei Einsatz der Puffer in den Säulen 8 und 21 (Abbildung 13 und Abbildung 14) hoch. Harnstoff wirkte besonders gut bei den Casein-Muffins, da während des Backens viele nicht-kovalente Bindungen gebildet wurden.

2ME wirkt reduzierend, da es Disulfidbrücken spaltet. Zusätzlich könnte es die Proteine vor Oxidation schützen. Die Wiederfindungen bei 2ME-haltigen Puffern waren teilweise gut (siehe Säule 25, Abbildung 13 und Abbildung 14) und teilweise schlecht (siehe Säulen 18 und 28, Abbildung 13 und Abbildung 14). Eine Erklärung dafür ist nicht möglich.

Aufgrund der beobachteten und beschriebenen Effekte wurde versucht, ein Puffersystem auf Basis eines Phosphat-Puffers und durch Zugabe von verschiedenen Stoffen zu optimieren.

Phosphat-Puffer wurde deshalb gewählt, da er basisch ist, also bis in den pH-Bereich 12 noch puffert. Der pH-Wert dieses Puffers ist daher in weiten Bereichen bis zum Erreichen der Pufferkapazität stabil bei Zugabe von geringen Mengen Basen oder Säuren. Der Tris-Puffer war wegen des begrenzten Pufferbereiches von pH 7-9 nicht geeignet.

### 6.2.2 Optimierung des pH-Wertes

Es wurden jeweils 100 mM Phosphat-Puffer aus Natriumdihydrogenphosphat hergestellt, die mit Natriumhydroxid auf pH 4,3; 6,5; 7,3; 11,2; 11,5; 11,8; 12,1 und 12,3 eingestellt wurden. Die Extraktion, Aufreinigung und Detektion des Caseins erfolgte analog der Beschreibung in Abschnitt 6.2.1. Die Aufarbeitung wurde jeweils dreimal wiederholt. Die Mittelwerte und die Standardabweichungen der Wiederfindungen sind in Abbildung 15 und Abbildung 16 dargestellt.

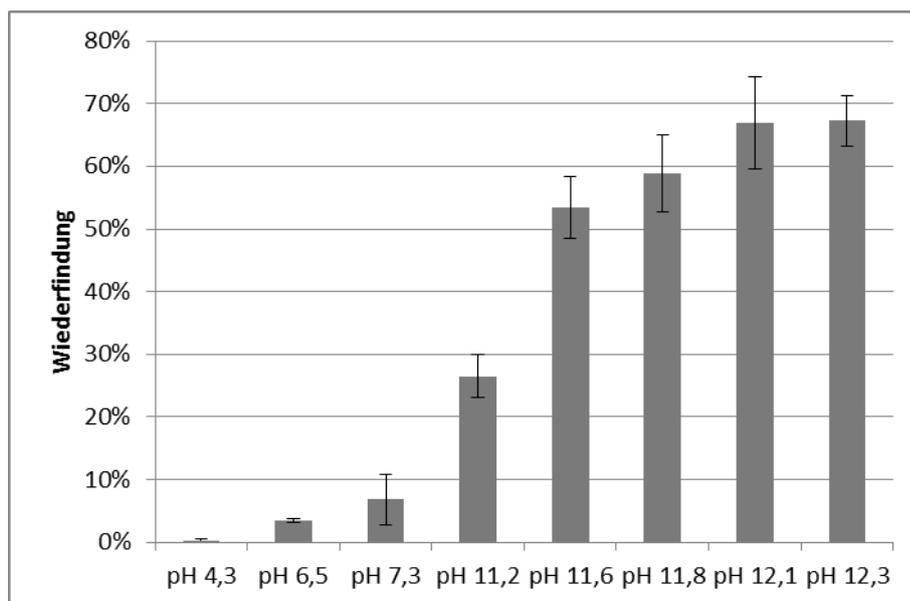


Abbildung 15: Wiederfindung des Caseins aus Casein-Teig, gelöst in Phosphat-Puffer mit unterschiedlichen pH-Werten (X-Achse: pH-Werte der Phosphat-Puffer; Y-Achse: Wiederfindung bezogen auf den theoretischen Casein-Gehalt in den Casein-Teigen; Einzelwerte siehe Tabelle 27 im Anhang 8.16)

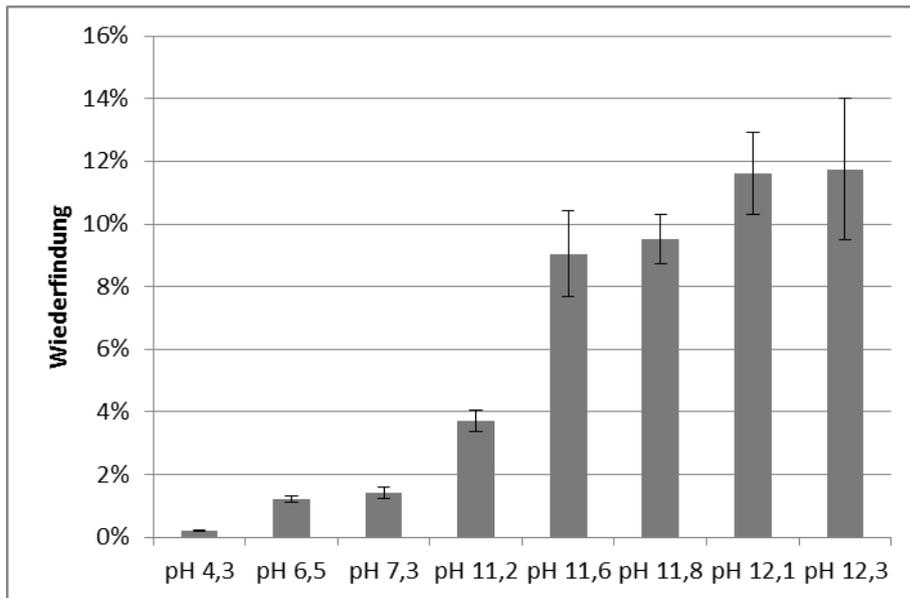


Abbildung 16: Wiederfindung des Caseins aus Casein-Muffins, gelöst in Phosphat-Puffer mit unterschiedlichen pH-Werten (X-Achse: pH-Werte der Phosphat-Puffer; Y-Achse: Wiederfindung bezogen auf den theoretischen Casein-Gehalt in den Casein-Muffins; Einzelwerte siehe Tabelle 28 im Anhang 8.16)

Die Ergebnisse zeigen, dass das Casein bei höheren pH-Werten besser extrahiert wurde als bei niedrigeren pH-Werten. Der Grund dafür ist die bessere Löslichkeit des Caseins bei höheren pH-Werten. Bei noch höheren pH-Werten als den hier verwendeten könnte die Extrahierbarkeit des Caseins sicherlich noch verbessert werden, allerdings standen geeignete Puffersysteme nicht zur Verfügung. Ein weiterer Grund war, dass die Standardabweichungen ab pH 12,1 parallel mit diesen pH-Werten anstiegen. Bei pH 12,3 war die Standardabweichung so groß, dass bei diesem pH-Wert eine Extraktion zu fehlerhaft gewesen wäre. In der Literatur wurde nichts über die Extrahierbarkeit von Casein bei basischen pH-Werten berichtet.

Auf Grund der Ergebnisse wurde im weiteren Verlauf der Arbeit der Puffer auf pH 12,1 eingestellt.

### 6.2.3 Optimierung der Phosphat-Konzentration

Es wurden 14,2g Dinatriumhydrogenphosphat in einen 100 mL Messkolben eingewogen und in ca. 80 mL dest. Wasser gelöst. Nach Einstellung des pH-Wertes auf pH 12,1 mit Natriumhydroxid wurde der Messkolben mit dest. Wasser bis zur Marke aufgefüllt. Die erhaltene Lösung wurde sodann mit dest. Wasser auf 700, 300, 100, 70, 30 und 10 mM Phosphat verdünnt. Der pH-Wert der verdünnten Puffer-Lösungen betrug jeweils pH 12,1. Die Extraktion, Aufreinigung und Detektion der Caseine erfolgte analog der Beschreibung in Abschnitt 6.2.1. Die Aufarbeitung wurde jeweils dreimal wiederholt. Die Mittelwerte und die Standardabweichungen der Wiederfindungen sind in Abbildung 17 und Abbildung 18 dargestellt.

Proteine besitzen bei einer hohen Salzkonzentration eine schlechtere Löslichkeit und Stabilität als bei einer niedrigen Salzkonzentration (Arakawa und Timasheff, 1984; Inyang und Iduh 1996; Whitford, 2008). Daher wurde relativ wenig Casein mit Puffern hoher Phosphat-Konzentrationen extrahiert. Die optimale Phosphat-Konzentration lag bei 70 mM. Bei dieser Phosphat-Konzentration blieb auch der pH-Wert bei  $\text{pH } 12,1 \pm 0,1$  stabil. Die Phosphat-Konzentration sollte allerdings nicht weiter gesenkt werden. Aus den Abbildungen 17 und 18 folgt, dass die Pufferkapazität bei einer Phosphat-Konzentration von 10 mM zu gering war.

Für die weiteren Versuche wurde daher ein Phosphat-Puffer mit 70 mM Dinatriumhydrogenphosphat hergestellt und auf pH 12,1 eingestellt.

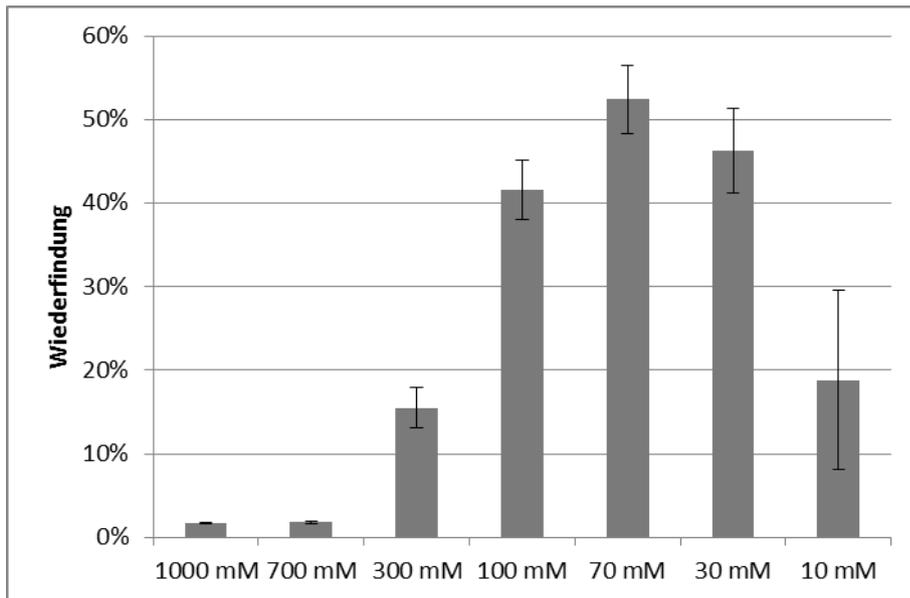


Abbildung 17: Wiederfindung des Caseins aus Casein-Teig, gelöst in Phosphat-Puffer pH 12,1 bei unterschiedlichen Phosphat-Konzentrationen (X-Achse: Konzentration der Phosphat-Puffer; Y-Achse: Wiederfindung bezogen auf den theoretischen Casein-Gehalt in den Casein-Teigen; Einzelwerte siehe Tabelle 29 im Anhang 8.16)

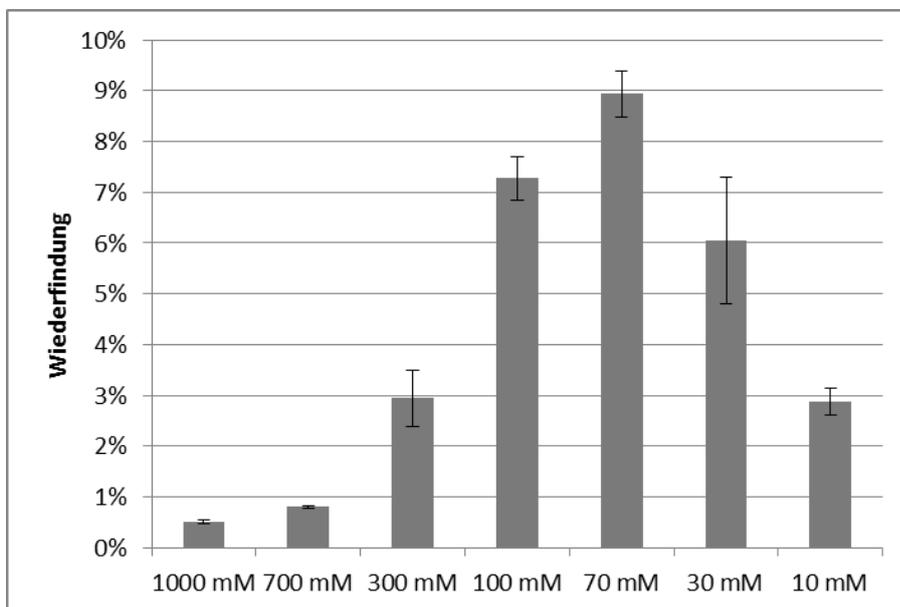


Abbildung 18: Wiederfindung des Caseins aus Casein-Muffins, gelöst in Phosphat-Puffer pH 12,1 bei unterschiedlichen Phosphat-Konzentrationen (X-Achse: Konzentration der Phosphat-Puffer; Y-Achse: Wiederfindung bezogen auf den theoretischen Casein-Gehalt in den Casein-Muffins; Einzelwerte siehe Tabelle 30 im Anhang 8.16)

#### **6.2.4 Optimierung des Puffer-Systems mit weiteren Salzzusätzen**

Ries-Kautt und Ducruix (1989) berichteten, dass die Extraktion auch durch Zugabe verschiedener Kationen verbessert werden kann. Daher wurde untersucht, ob die Extraktion von Casein durch Zusatz von Natriumchlorid bzw. Kaliumchlorid zum vorgestellten Puffer verbessert werden konnte. Es wurden 1000; 700; 300; 100; 70; 30; 10 und 0 mM NaCl und KCl in dem optimierten Puffer nach 6.2.3 gelöst. Die Extraktion, Aufreinigung und Detektion des Caseins erfolgte analog der Beschreibung in Abschnitt 6.2.1. Die Aufarbeitung wurde jeweils dreimal wiederholt. Die Mittelwerte und die Standardabweichungen der Wiederfindungen sind in Abbildung 19 und in Abbildung 20 dargestellt.

Wie bereits in Abschnitt 6.2.3 dargelegt, verschlechterte sich die Wiederfindung von Casein bei höheren Salzkonzentrationen. Die Wiederfindungen bei Salzzusätzen von 0 bis 100 mM verbesserten sich nicht signifikant, daher wurden im weiteren Verlauf der Arbeit NaCl und KCl dem Puffer nicht zugesetzt.

Des Weiteren wurde beobachtet, dass bei den beiden Extrakten ohne Salzzusätze unterschiedliche Wiederfindungen gefunden wurden, obwohl diese theoretisch gleich hoch sein sollten. Der Grund ist, dass die in verschiedenen ELISA-Platten erzielten Ergebnisse miteinander nicht vergleichbar sind. ELISA ist eine Methode, deren Ergebnisse stark von der Inkubationszeit und der Temperatur abhängen. Bei der manuellen Durchführung der Versuche ist es fast unmöglich, jeden Prozess exakt zu wiederholen, besonders die Aufgabe des Probenextraktes und der Stopplösung kann nicht sekundengenau durchgeführt werden. Daraus resultiert die Abweichung der Ergebnisse bei Verwendung von zwei Platten (Crowther, 2009). Um dieses Problem zu eliminieren, müssen daher Versuche, deren Ergebnisse verglichen werden sollen, mit der gleichen Platte durchgeführt werden.

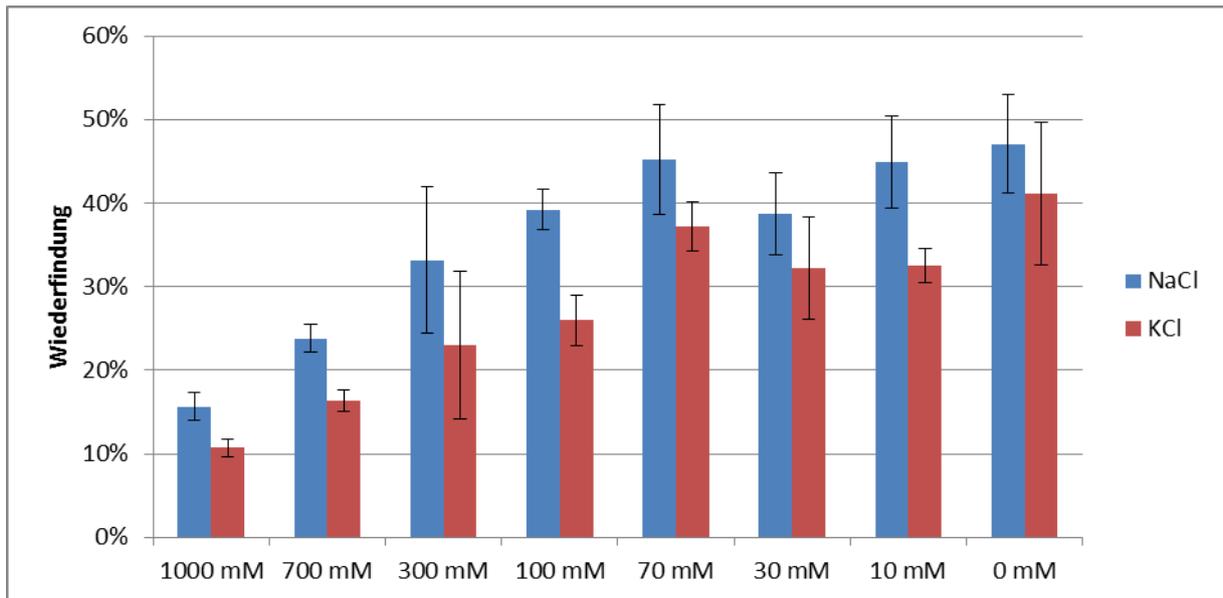


Abbildung 19: Wiederfindung des Caseins aus Casein-Teig, gelöst in Phosphat-Puffer pH 12,1 bei unterschiedlichen NaCl- und KCl-Zusätzen (X-Achse: NaCl- und KCl-Konzentrationen; Y-Achse: Wiederfindung bezogen auf den Casein-Gehalt in den Casein-Teigen; Einzelwerte siehe Tabelle 31 im Anhang 8.16)

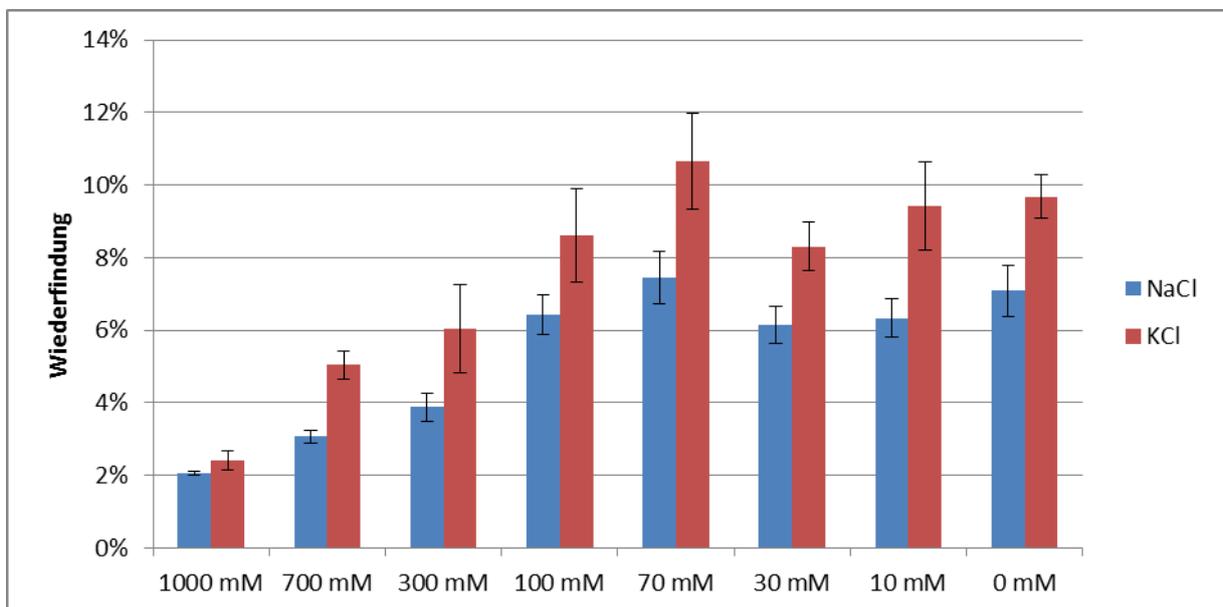


Abbildung 20: Wiederfindung des Caseins aus Casein-Muffins, gelöst in Phosphat-Puffer pH 12,1 bei unterschiedlichen NaCl- und KCl-Zusätzen (X-Achse: NaCl- und KCl-Konzentrationen; Y-Achse: Wiederfindung bezogen auf den Casein-Gehalt in den Casein-Muffins; Einzelwerte siehe Tabelle 32 im Anhang 8.16)

### 6.2.5. Optimierung durch Zugabe von Detergenzien

Detergenzien werden häufig zur Verbesserung der Extraktion in Puffer-Systemen eingesetzt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden das anionische Tensid SDS und nichtionische Tenside wie Tween20 (Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat) und Triton X100 ((p-tert-Octylphenoxy-)polyethoxyethanol) zum optimierten Phosphat-Puffer aus Abschnitt 6.2.3 in Konzentrationen von 10%, 7%, 3%, 1%, 0,7%, 0,3% und 0,1% zugegeben. Der pH-Wert wurde, wie beschrieben, bei pH 12.1 konstant gehalten. Die Extraktion, Aufreinigung und Detektion des Caseins erfolgte analog der Beschreibung in Abschnitt 6.2.1. Die Aufarbeitung wurde jeweils dreimal wiederholt. Die Mittelwerte und die Standardabweichungen der Wiederfindungen sind in Abbildung 21 und in Abbildung 22 dargestellt. Zum Vergleich wurde der Puffer ohne Zugabe von Detergenzien mitgetestet.

Detergenzien werden bei der Extraktion von Proteinen aus Zellen eingesetzt, da sie durch Auflösen der Phospholipid-Doppelmembranen diese leichter extrahierbar machen. In dieser Versuchsreihe wurde daher erwartet, dass die eingesetzten Detergenzien das in Fettmembranen eingehüllte Casein frei setzen und es daher leichter extrahierbar machen sollte. Leider konnte bei Zusatz von 10% bis 0,7% SDS fast kein Casein detektiert werden, da die Tertiärstruktur des Caseins verändert und damit auch die Epitope des Caseins verändert wurden, so dass die Antikörper die Antigene nicht mehr erkannten. Dadurch wurde die Antikörper-Antigen-Reaktion empfindlich gestört. Über ähnliche Phänomene berichteten auch Watanabe et al. (2005).

Die Wiederfindungen schwankten bei Zusatz der beiden nichtionischen Detergenzien Tween20 und Triton X100. Die Mittelwerte der Wiederfindungen bei Zugabe von 1% bis 10% Tween20 waren etwas höher als diejenigen ohne Zugabe. Dagegen waren die Wiederfindungen bei Zugabe von 1% bis 10% Triton X100 etwas kleiner als diejenigen ohne Zugabe. Diese Unterschiede konnten statistisch nicht gesichert werden. Es wird daher vermutet, dass Casein in den Matrices nicht, wie erwartet, von einer Fettmembran umhüllt war.

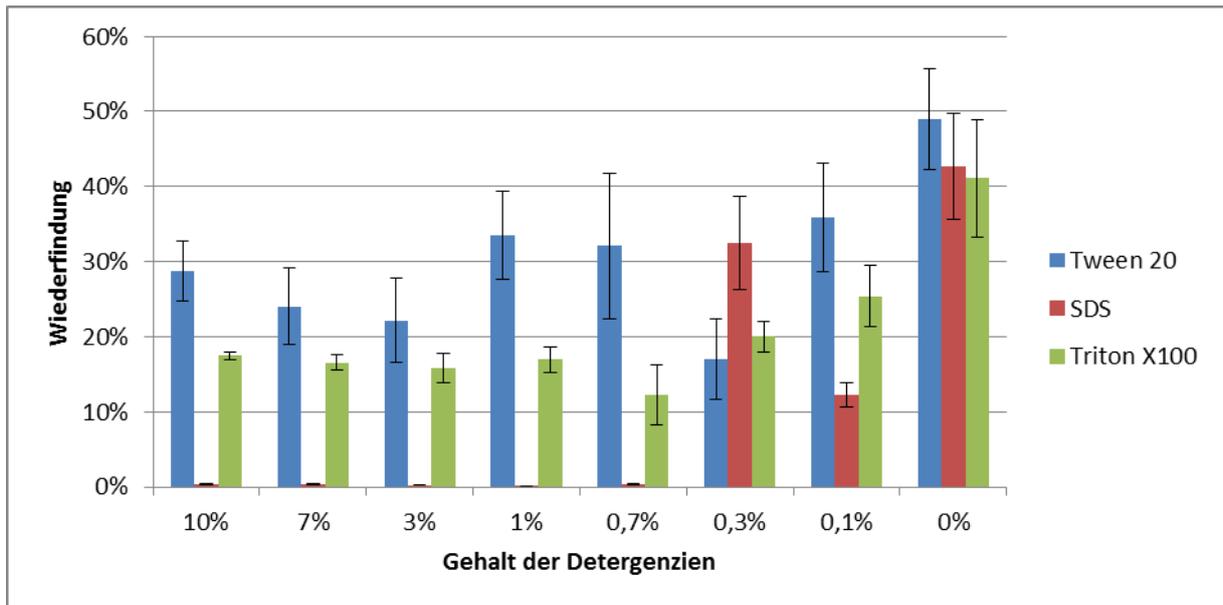


Abbildung 21: Wiederfindung des Caseins aus Casein-Teig bei Zugabe unterschiedlicher Detergenzien zum Phosphat-Puffer pH 12,1 (X-Achse: Gehalt der Detergenzien; Y-Achse: Wiederfindung bezogen auf den Casein-Gehalt in den Casein-Teigen; Einzelwerte siehe Tabelle 33 im Anhang 8.16)

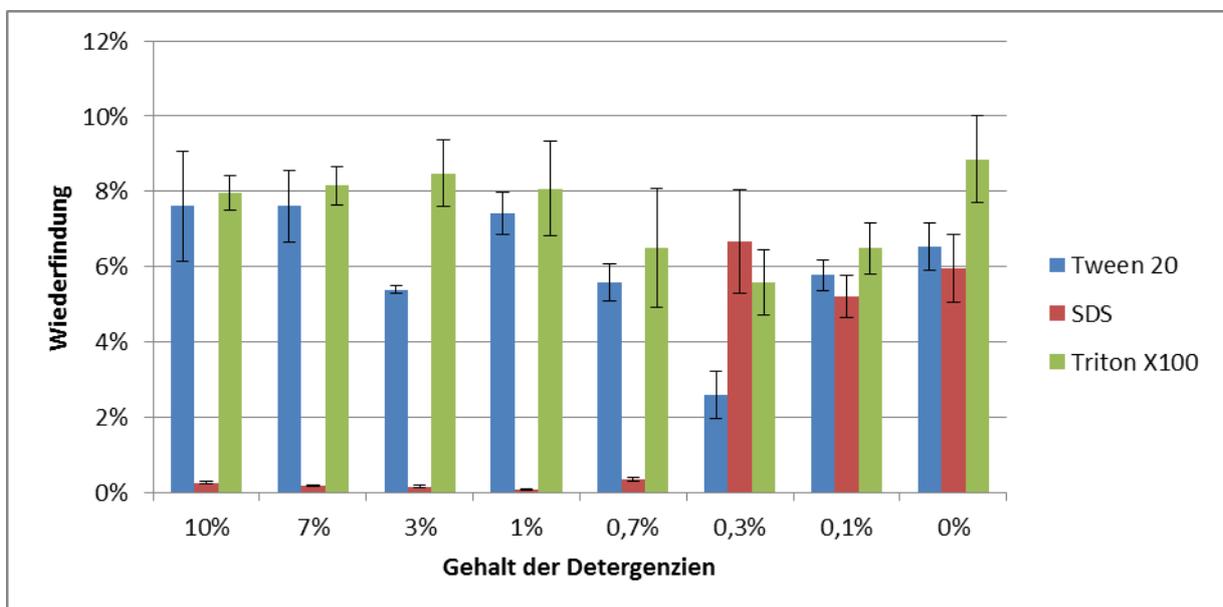


Abbildung 22: Wiederfindung des Caseins aus Casein-Muffins bei Zugabe unterschiedlicher Detergenzien zum Phosphat-Puffer pH 12,1 (X-Achse: Gehalt der Detergenzien; Y-Achse: Wiederfindung bezogen auf den Casein-Gehalt in den Casein-Muffins; Einzelwerte siehe Tabelle 34 im Anhang 8.16)

Außerdem könnte Tween20 die freie Bindungsstelle der Matrix kompetitiv hemmen, dadurch würde Casein im isolierten Zustand nicht mehr an die Matrix binden können. Die Ergebnisse bestätigen dies jedoch nicht, da Tween20 mit großer Wahrscheinlichkeit kein so starkes Blockreagenz war, um die Bindungsstelle blockieren zu können oder das an der Bindungsstelle gebundene Casein auszutauschen. Im Abschnitt 6.1.3 wurde bereits festgestellt, dass Tween20 kein gutes Blockreagenz war.

Da weder anionische noch nichtionische Detergenzien die Extraktion und die Detektion des Caseins aus den Matrices positiv beeinflusst haben, eher wurden diese noch blockiert, wurde in den weiteren Versuchen auf die Zugabe von Detergenzien zum Phosphat-Puffer verzichtet.

### **6.2.6 Optimierung durch Zugabe von Hühnereieiklar**

Bei einigen in der Literatur beschriebenen Methoden und einigen kommerziellen Kits wurde Magermilch für die Extraktion der Antigene, z.B. bei Walnuss und Erdnuss, im Extraktionsmittel eingesetzt (Niemann et al., 2009). Dadurch sollen die Bindungsstellen an den Matrices blockiert werden, so dass die Zielallergene nicht mehr an die Matrices binden können. Allerdings könnten die Milchproteine auch kompetitiv mit den zu analysierenden Antigenen in der Matrix bzw. dem Extraktionsmittel reagieren.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte jedoch kein Milchprotein verwendet werden, da es mit dem Anti-Casein-Antikörper reagieren kann. Aus diesem Grund wurde Hühnereieiklar in Konzentrationen von 2%; 1%; 0,7%; 0,3%; 0,1%; 0,07% und 0,03% in den Phosphat-Puffer bei pH 5,1 eingesetzt. Die Aufarbeitung wurde jeweils dreimal wiederholt. Die Mittelwerte und die Standardabweichungen der Wiederfindungen sind in Abbildung 23 und in Abbildung 24 dargestellt. Zum Vergleich wurde der Puffer ohne Zugabe von Hühnereieiklar mitgetestet.

Die Wiederfindungen des Caseins bei hohem Zusatz von Hühnereieiklar waren niedrig, da viel Hühnereieiklar bei der Aufreinigung mit Acetat-Puffer mit gefällt wurde, wodurch wahrscheinlich die weitere Detektion mittels ELISA gestört wurde. Außerdem löste sich das mit gefällte Hühnereieiklar nicht vollständig im PBS-Tween20-Puffer, es blieb vielmehr suspendiert. Daher wurde ein Teil des extrahierten Caseins in den Fettstoffkügelchen eingeschlossen, so dass es nicht an die Antikörper binden konnte.

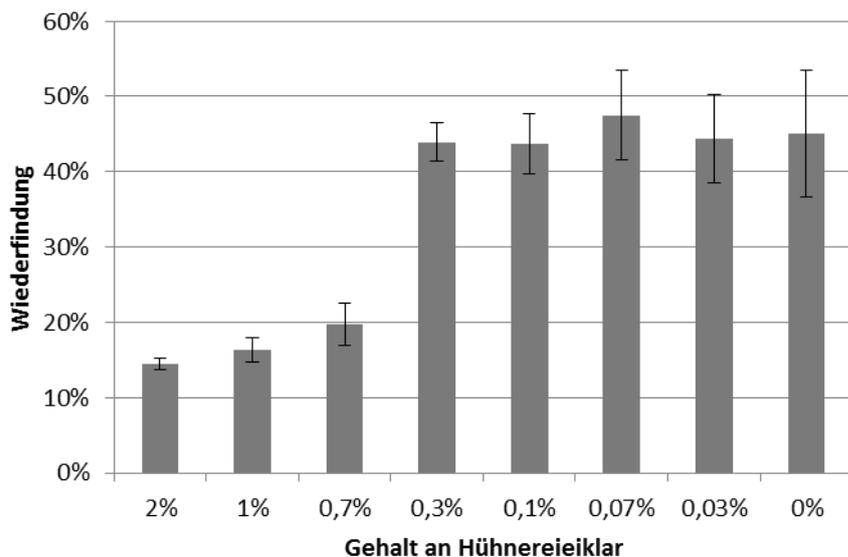


Abbildung 23: Wiederfindung des Caseins aus Casein-Teig bei Zugabe unterschiedlicher Mengen Hühnereieiklar (2-0,03%) zum Phosphat-Puffer pH 12,1 (X-Achse: Gehalt an Hühnereieiklar; Y-Achse: Wiederfindung bezogen auf den Casein-Gehalt in den Casein-Teigen; Einzelwerte siehe Tabelle 35 im Anhang 8.16)

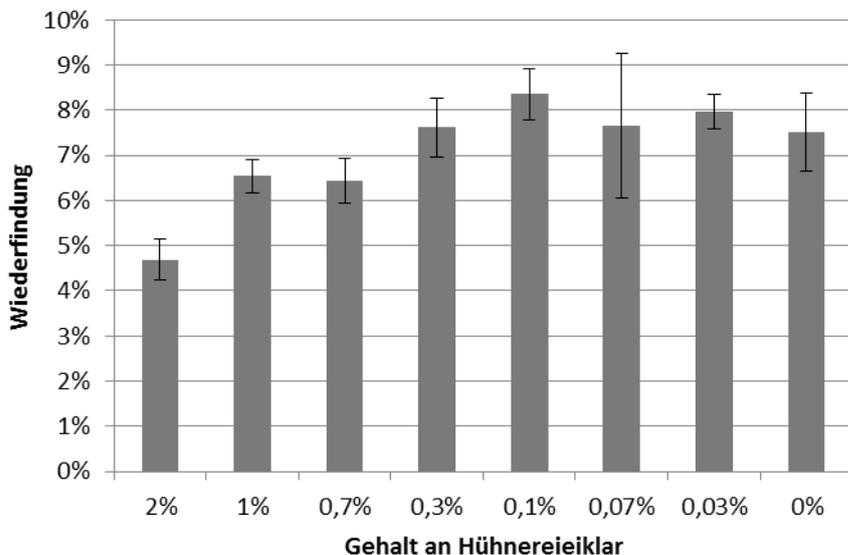


Abbildung 24: Wiederfindung des Caseins aus Casein-Muffins bei Zugabe unterschiedlicher Mengen Hühnereieiklar (2-0,03%) zum Phosphat-Puffer pH 12,1 (X-Achse: Gehalt an Hühnereieiklar; Y-Achse: Wiederfindung bezogen auf den Casein-Gehalt in den Casein-Muffins; Einzelwerte siehe Tabelle 36 im Anhang 8.16)

Wie aus den Abbildungen 23 und 24 zu ersehen ist, beeinflussen Konzentrationen < 0,3% Hühnereieiklar die Wiederfindungen teilweise positiv. Dieser Effekt konnte jedoch statistisch nicht gesichert werden. Daher wurde auf den Einsatz von Hühnereieiklar verzichtet.

### **6.2.7 Optimierung durch Zugabe von Reduktionsmitteln**

Kato et al. (2000 und 2001b) und Morishita (2008) berichteten, dass die Extraktion von Proteinen aus Matrices durch Zugabe von 2ME und Dithiothreitol (DTT) zum Extraktionspuffer verbessert werden kann. Es werden nur kleine Mengen der Reduktionsmittel eingesetzt, da bei größeren Mengen Disulfidbrücken der Proteine reduziert werden können und sich somit die Tertiärstruktur der Proteine ändern würde. Als Folge davon werden die Epitope an der Oberfläche des Proteins verändert und die Proteine verlieren ihre Allergenität. Es ist allerdings auch möglich, dass die Konformationsallergene durch Zugabe von Reduktionsmitteln frei gesetzt werden. Es könnten aber auch die an eine Matrix gebundenen Proteine durch Änderung der Tertiärstruktur ein allergenes Potential entwickeln. Durch Zugabe von Reduktionsmitteln zum Extraktionspuffer könnten die zu extrahierenden Proteine vor Oxidation während der Extraktion geschützt werden.

In diesen Versuchen wurde DTT in Konzentrationen von 30 mM; 10 mM; 7 mM; 3 mM; 1 mM; 0,7 mM und 0,3 mM dem Phosphat-Puffer zugesetzt. 2ME wurde in größeren Mengen dem Phosphat-Puffer zugesetzt, nämlich 10%, 7%, 3%, 1%, 0,7%, 0,3%, und 0,1%. Die Aufarbeitung wurde jeweils dreimal wiederholt. Die Mittelwerte und die Standardabweichungen der Wiederfindungen sind in Abbildung 25 und 26 dargestellt. Zum Vergleich wurde der Puffer ohne Zugabe von Reduktionsmitteln mitgetestet.

Aus den Abbildungen 25 und 26 folgt, dass die Zugabe von DDT zum Extraktionspuffer die Wiederfindungen des Caseins negativ beeinflusst. Zwar war die Wiederfindung des Caseins aus den Casein-Muffins bei einem Zusatz von 0,3 mM DDT leicht erhöht, diese Erhöhung konnte jedoch statistisch nicht gesichert werden.

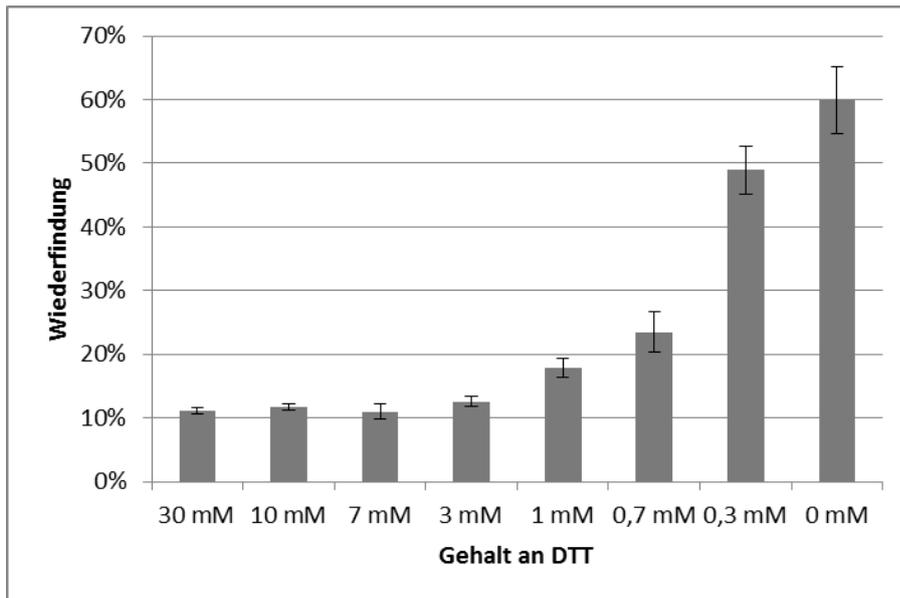


Abbildung 25: Wiederfindung des Caseins aus Casein-Teig bei unterschiedlichen DDT-Zugaben zum Phosphat-Puffer pH 12,1 (X-Achse: DDT-Konzentration; Y-Achse: Wiederfindung bezogen auf den Casein-Gehalt in den Casein-Teigen; Einzelwerte siehe Tabelle 37 im Anhang 8.16)

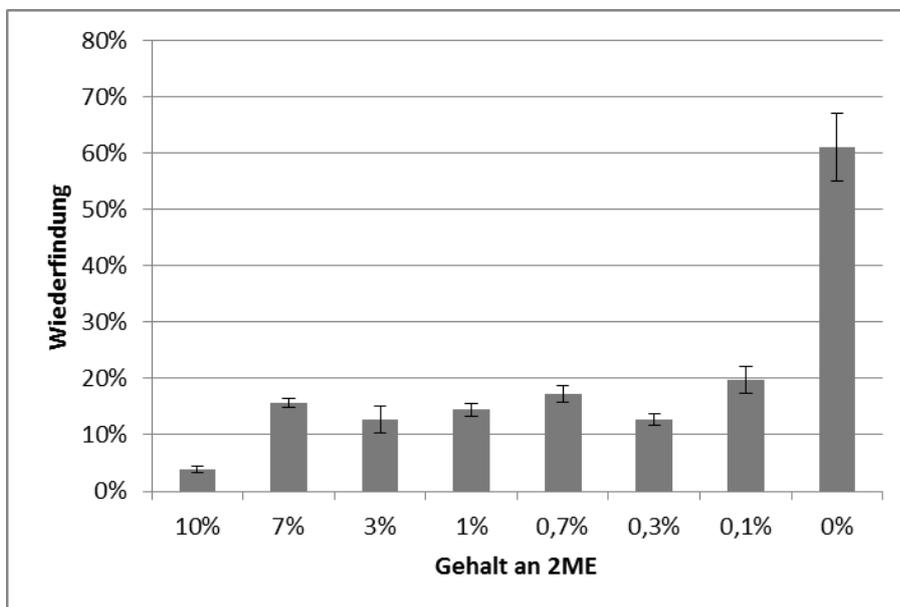


Abbildung 26: Wiederfindung des Caseins aus Casein-Teig bei unterschiedlichen 2ME-Zugaben zum Phosphat-Puffer pH 12,1 (X-Achse: 2ME-Konzentration; Y-Achse: Wiederfindung bezogen auf den Casein-Gehalt in den Casein-Teigen; Einzelwerte siehe Tabelle 38 im Anhang 8.16)

In der Literatur wird berichtet, dass 2ME in Konzentrationen von 2% eingesetzt wird (Watanabe et al., 2005). In diesen Versuchen wurde 2ME bis in einer Menge von 10% zugegeben. Die Ergebnisse in den Abbildungen 27 zeigen, dass Casein, auch bei Zugabe niedriger 2ME-Mengen, wegen starker Denaturierung schlechter extrahiert wurde als ohne Zugabe von 2ME. Es könnte auch sein, dass die eingesetzten Reduktionsmittel nach Aufreinigung noch in kleiner Menge vorhanden waren und die Antikörper möglicherweise denaturierten.

Reduktionsmittel wurden daher nicht für die Extraktion von Casein aus dem Casein-Teig und den Casein-Muffins eingesetzt.

### **6.2.8 Optimierung durch Zugabe von chaotropen Verbindungen**

Chaotrope Verbindungen sind Chemikalien, die Nebenvalenzbindungen wie Wasserstoffbrückenbindungen, Van-der-Waals-Bindungen und Bindungen auf Basis hydrophober Effekte spalten können. In Abschnitt 6.2.1 wurde bereits berichtet, dass Harnstoff als eine typische chaotrope Verbindung die Wiederfindung von Casein verbessern kann. Dieses Ergebnis lässt erwarten, dass auch andere chaotrope Verbindungen die Wiederfindungen verbessern könnten. Der Grund dafür ist, dass Nebenvalenzbindungen zwischen Matrix und Protein gespalten werden, im Falle dieser Arbeit könnten somit durch Zugabe von chaotropen Verbindungen Allergene frei gesetzt werden. Allerdings besteht auch die Gefahr, dass die frei gesetzten Allergene denaturiert und damit inaktiviert werden (Fountoulakis und Takács, 2001). In diesen Versuchen wurde daher versucht, durch Bestimmung einer optimalen Zusatzmenge an chaotropen Verbindungen zum Extraktionspuffer möglichst große Teile des Allergens frei zu setzen, aber deren Denaturierung so gering wie möglich zu halten.

Es wurden die Effekte der klassischen chaotropen Verbindungen Harnstoff, Guanidinhydrochlorid und Guanidinthiocyanat untersucht (Menzel, 1981; Tandon und Horowitz, 1987; Doyle, 1996; Tan und Yiap, 2009). Arginin wurde wegen seiner Guanidinium-Struktur in die Untersuchungen mit einbezogen. Guanidinthiocyanat und Harnstoff wurden im optimierten Puffer aus 6.2.3 in den Konzentrationsbereichen 6 bis 0,1 bzw. 8 bis 0,5 M eingesetzt. Guanidinhydrochlorid wurde in Wasser statt in Phosphat-Puffer im Konzentrationsbereich von 8 bis 0,1 M eingesetzt, da die Löslichkeit in basischem Puffer < 3

M ist. Arginin wurde wegen der schlechten Löslichkeit nur im Konzentrationsbereich 0,8 bis 0,1 M eingesetzt. Die Aufarbeitung wurde jeweils dreimal wiederholt. Die Mittelwerte und die Standardabweichungen der Wiederfindungen sind in Abbildung 27 bis Abbildung 33 dargestellt. Zum Vergleich wurde der Puffer ohne Zugabe von chaotropen Verbindungen mitgetestet.

Die Ergebnisse bestätigen die Hypothese, dass chaotrope Verbindungen die Wiederfindungen nur bei Zugabe der mittleren Konzentrationen verbessern. Die Harnstoff-Zugabe wird nach oben dadurch begrenzt, dass die Lösung geliert. Bei einer Harnstoff-Zugabe von 8 M erhielt man keine Lösung mehr sondern ein dickflüssiges Gel. Daher wurde auch ein Zusatz von 8 M Harnstoff nicht in das Untersuchungsprogramm aufgenommen. Auf der anderen Seite war jedoch die Gelbildung ein Vorteil für die Extraktion, da die Matrix bei Zugabe von 8 M Harnstoff vollständig aufgeschlossen wurde. Der Harnstoff könnte aber auch in höheren Konzentrationen die Detektion mittels ELISA stören. Die beste Wiederfindung wurde daher bei Zugabe von 3 M Harnstoff erreicht.

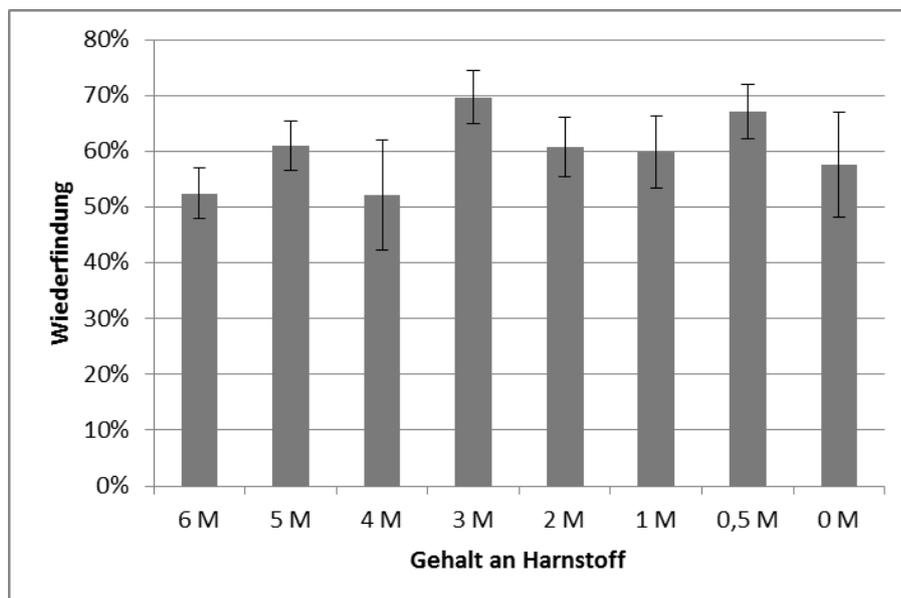


Abbildung 27: Wiederfindung des Caseins aus Casein-Teig bei unterschiedlichen Harnstoff-Zugaben zum Phosphat-Puffer pH 12,1 (X-Achse: Harnstoff-Konzentration; Y-Achse: Wiederfindung bezogen auf den Casein-Gehalt in den Casein-Teigen; Einzelwerte siehe Tabelle 39 im Anhang 8.16)

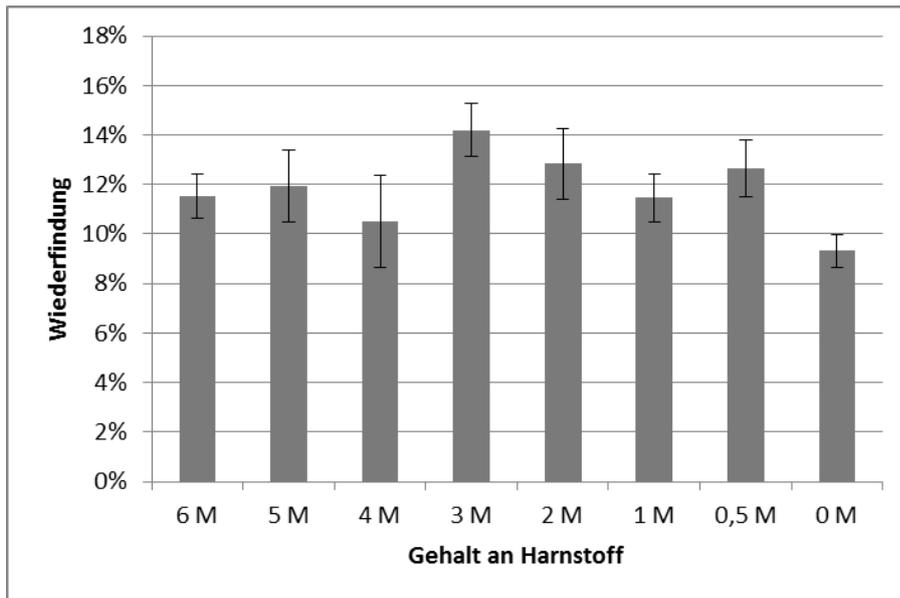


Abbildung 28: Wiederfindung des Caseins aus Casein-Muffins bei unterschiedlichen Harnstoff-Zugaben zum Phosphat-Puffer pH 12,1 (X-Achse: Harnstoff-Konzentration; Y-Achse: Wiederfindung bezogen auf den Casein-Gehalt in den Casein-Muffins; Einzelwerte siehe Tabelle 40 im Anhang 8.16)

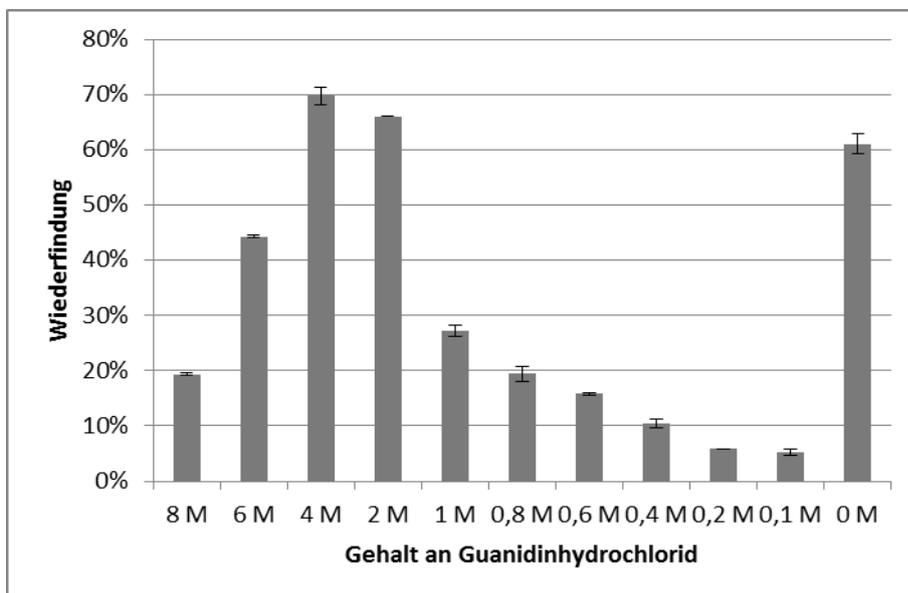


Abbildung 29: Wiederfindung des Caseins aus Casein-Teig bei unterschiedlichen Guanidinhydrochlorid-Zugaben zum Wasser (X-Achse: Guanidinhydrochlorid-Konzentration; Y-Achse: Wiederfindung bezogen auf den Casein-Gehalt in den Casein-Teigen; Einzelwerte siehe Tabelle 41 im Anhang 8.16)

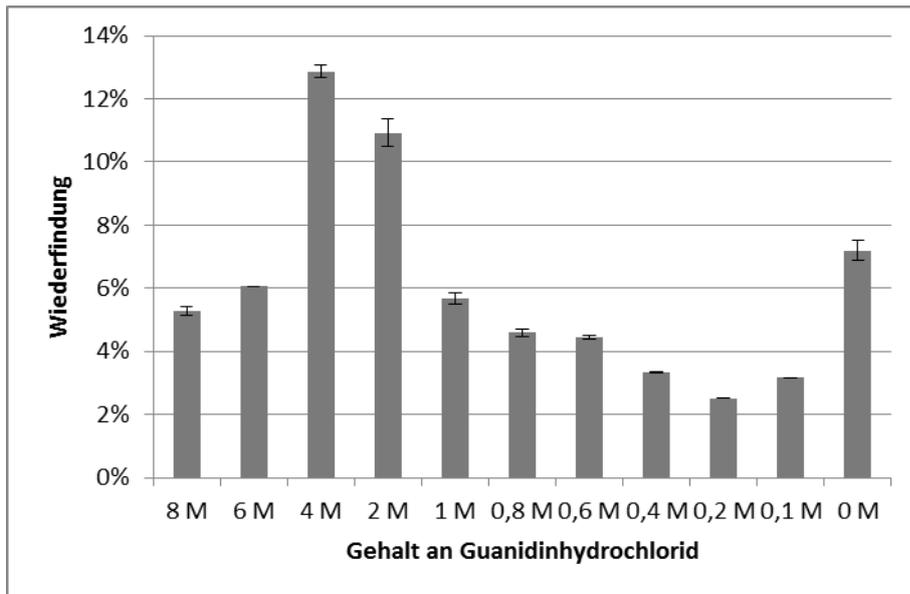


Abbildung 30: Wiederfindung des Caseins aus Casein-Muffins bei unterschiedlichen Guanidiniumhydrochlorid-Zugaben zum Wasser (X-Achse: Guanidiniumhydrochlorid-Konzentration; Y-Achse: Wiederfindung bezogen auf den Casein-Gehalt in den Casein-Muffins; Einzelwerte siehe Tabelle 42 im Anhang 8.16)

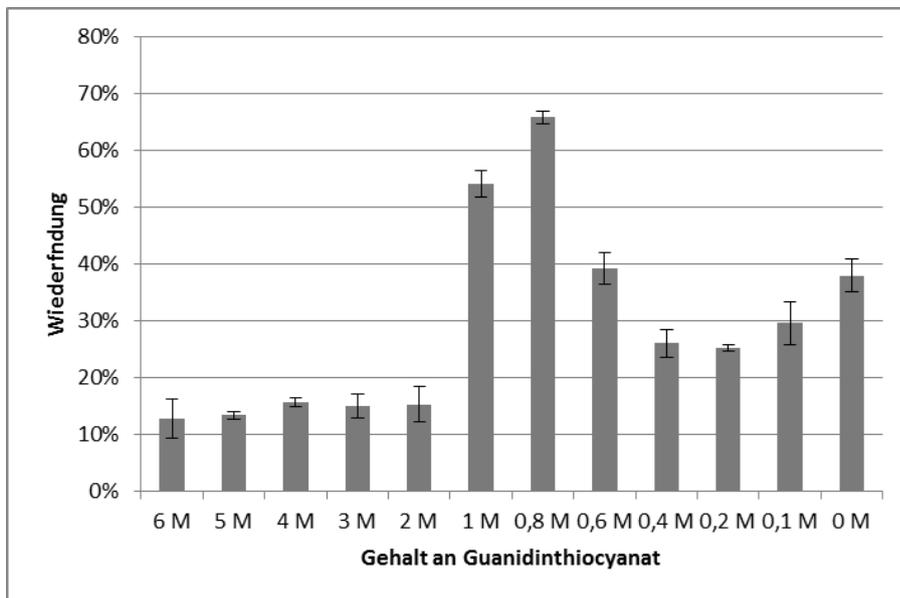


Abbildung 31: Wiederfindung des Caseins aus Casein-Teig bei unterschiedlichen Guanidinthiocyanat-Zugaben zum Phosphat-Puffer pH 12,1 (X-Achse: Guanidinthiocyanat-Konzentration; Y-Achse: Wiederfindung bezogen auf den Casein-Gehalt in den Casein-Teigen; Einzelwerte siehe Tabelle 43 im Anhang 8.16)

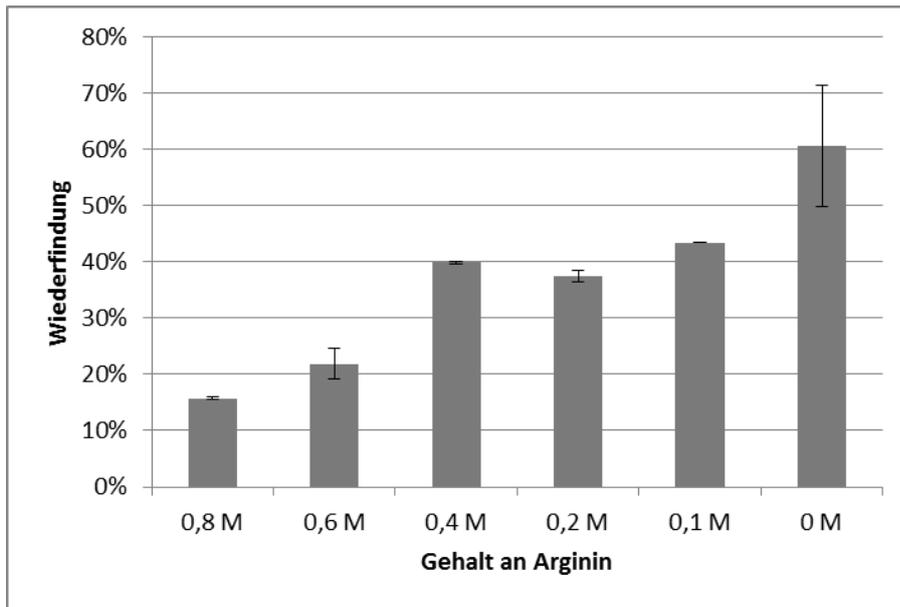


Abbildung 32: Wiederfindung des Caseins aus Casein-Teig bei unterschiedlichen Arginin-Zugaben zum Phosphat-Puffer pH 12,1 (X-Achse: Arginin-Konzentration; Y-Achse: Wiederfindung bezogen auf den Casein-Gehalt in den Casein-Teigen; Einzelwerte siehe Tabelle 44 im Anhang 8.16)

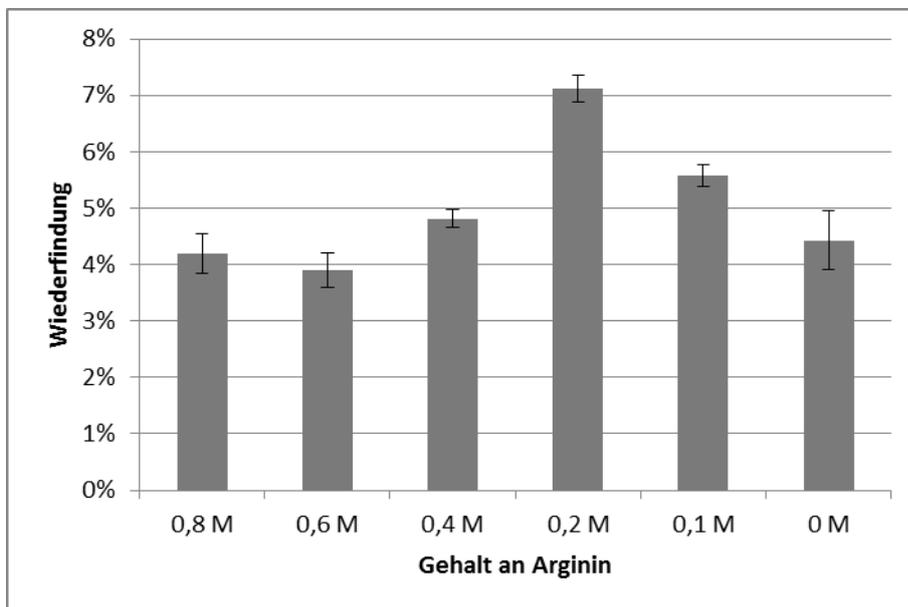


Abbildung 33: Wiederfindung des Caseins aus Casein-Muffins bei unterschiedlichen Arginin-Zugaben zum Phosphat-Puffer pH 12,1 (X-Achse: Arginin-Konzentration; Y-Achse: Wiederfindung bezogen auf den Casein-Gehalt in den Casein-Muffins; Einzelwerte siehe Tabelle 45 im Anhang 8.16)

Guanidinhydrochlorid wurde zuerst in Wasser gelöst und dann getestet. Die optimale Konzentration an Guanidinhydrochlorid in Wasser beträgt 2 bis 4 M. Da sich im basischen Phosphat-Puffer nur < 3 M Guanidinhydrochlorid lösen, wurden die weiteren Versuche in Phosphat-Puffer nur mit einer Konzentration von 2 M Guanidinhydrochlorid durchgeführt.

Die Ergebnisse bei Zugabe von Guanidinthiocyanat sind im Konzentrationsbereich 0,8 bis 1 M gut. Bei Zugabe von Arginin wurde die Wiederfindung von Casein im Casein-Teig erniedrigt. Aber die Zugabe von 0,2 M Arginin zu den Casein-Muffins erhöhte die Wiederfindung.

Auf Grund dieser Ergebnisse wurden die Konzentrationen der jeweiligen chaotropen Verbindungen auf die optimale Konzentration eingestellt und die Extrakte nach Probenaufarbeitung auf eine ELISA-Platte aufgetragen. Die Mittelwerte und die Standardabweichungen der Wiederfindungen sind in Abbildung 34 und Abbildung 35 dargestellt.

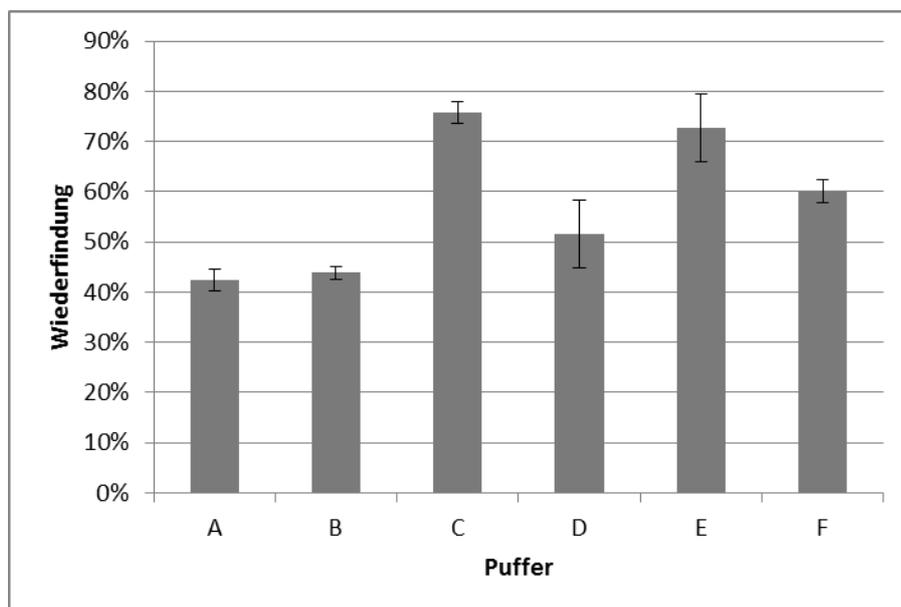


Abbildung 34: Wiederfindung des Caseins aus Casein-Teig bei unterschiedlichen Chaotrop-Zusätzen in PBS-Tween20-Puffer (X-Achse: A: Guanidinhydrochlorid 2 M, B: Arginin 0,2 M, C: Guanidinthiocyanat 1 M, D: Guanidinthiocyanat 0,8 M, E: Harnstoff 3 M, F: ohne Zusatz von chaotropen Verbindungen; Y-Achse: Wiederfindung bezogen auf den Casein-Gehalt in den Casein-Teigen; Einzelwerte siehe Tabelle 46 im Anhang 8.16)

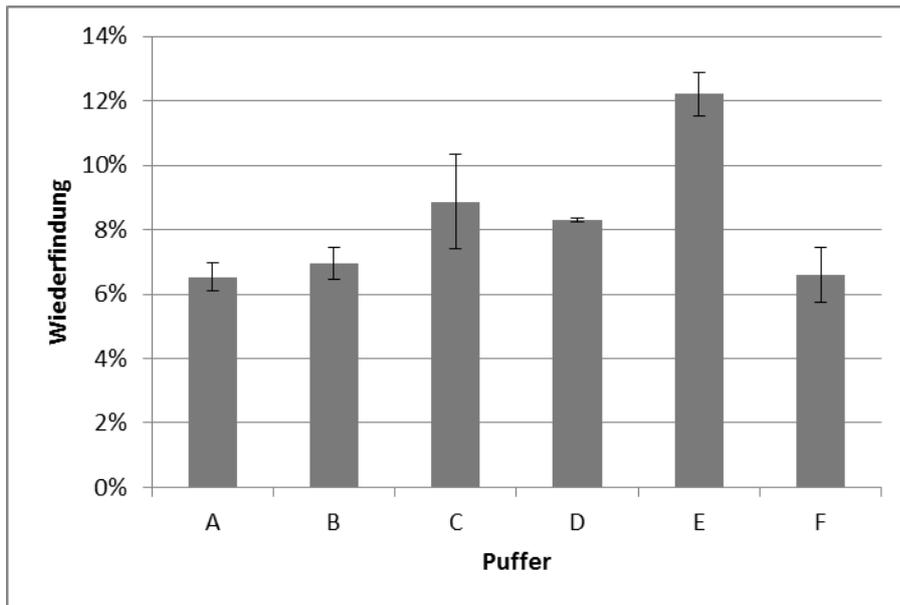


Abbildung 35: Wiederfindung des Caseins aus Casein-Muffins bei unterschiedlichen Chaotrop-Zusätzen in PBS-Tween20-Puffer (X-Achse: A: Guanidinhydrochlorid 2 M, B: Arginin 0,2 M, C: Guanidinthiocyanat 1 M, D: Guanidinthiocyanat 0,8 M, E: Harnstoff 3 M, F: ohne Zusatz von chaotropen Verbindungen; Y-Achse: Wiederfindung bezogen auf den Casein-Gehalt in den Casein-Muffins; Einzelwerte siehe Tabelle 47 im Anhang 8.16)

Guanidinhydrochlorid verbesserte zwar die Wiederfindung in Wasser (siehe Abbildung 29 und Abbildung 30), im basischen Puffer konnte jedoch keine statistisch gesicherte Verbesserung der Wiederfindung im Vergleich zum Puffer ohne Zusatz gefunden werden. Die Ergebnisse mit Zusatz von Arginin waren denjenigen mit Guanidinhydrochlorid vergleichbar.

Es wurde aber gefunden, dass die Zusätze von 1 M Guanidinthiocyanat und 3 M Harnstoff die Wiederfindungen beider Matrices verbesserten. Dabei verbesserte der Harnstoff die Extraktionen von Casein aus den Casein-Muffins besonders stark. Bei der angewandten Harnstoffkonzentration wurden wahrscheinlich viele Nebervalenzbindungen gespalten. Die Denaturierung des Caseins und damit verbunden die Zerstörung der Epitope hielten sich jedoch in Grenzen. Daher wurden dem Extraktionspuffer 3 M Harnstoff zugesetzt.

### 6.2.9 Zusammenfassung zur Optimierung des Puffersystems

Im Rahmen dieser Arbeit wurden mehrere in der Literatur beschriebene Puffer-Systeme getestet. Das beschriebene Phosphat-Puffersystem hat sich als optimal herausgestellt. Das

ausgewählte Puffer-System wurde dann durch die Testung der folgenden Parameter optimiert: Phosphat-Konzentration, pH-Wert, Salzzusätze, Zugabe von Detergenzien, Hühnereieiklar, Reduktionsmittel und chaotropen Verbindungen. Auf Grund dieser Testungen hat sich folgendes Puffer-System als optimal erwiesen:

Dinatriumhydrogenphosphat	1 g
Harnstoff	18 g

in 80 mL Wasser lösen, mit NaOH auf pH 12,1 einstellen und mit dest. Wasser auf 100 mL auffüllen.

Dieses Puffersystem wurde für die weitere Optimierung der Extraktions- und der Aufreinigungsmethode verwendet.

#### **6.2.10 Optimierung der physikalischen Extraktionsbedingungen**

Die Optimierung der physikalischen Bedingungen gehört zu den klassischen Möglichkeiten, die Wiederfindungen von Proteinen zu verbessern. Daher wurden in dieser Arbeit die Einflussmöglichkeiten von Temperatur des Extraktions-Puffers, Verlängerung der Extraktionsdauer und Einsatz eines Ultraschallbades auf die Extraktion untersucht.

##### **6.2.10.1 Temperatur des Extraktions-Puffers**

Durch Erwärmen des Extraktions-Puffers wird die Diffusionsgeschwindigkeit der Moleküle erhöht (Ackermann, 1992), dadurch könnten die Allergene schneller vom Puffer aus der Lebensmittelmatrix frei gesetzt werden. Allerdings muss beachtet werden, dass die Extraktionstemperatur nicht zu hoch sein darf, da sonst die Gefahr der Denaturierung der Allergene besteht. Aus diesem Grund werden im Allgemeinen relativ niedrige Temperaturen bei der Extraktion von Proteinen angewendet. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Extrakte aus dem Casein-Teig und den Casein-Muffins durch Mahlen in der Kugelmühle und Zentrifugation hergestellt. Die Extrakte wurden danach für 50 min im Eisbad, bei Raumtemperatur 23 °C und im Wasserbad bei 37 °C und bei 60 °C inkubiert. Die Versuche wurden jeweils dreimal wiederholt. Die Mittelwerte und die Standardabweichungen der Wiederfindungen sind in Abbildung 36 und Abbildung 37 dargestellt.

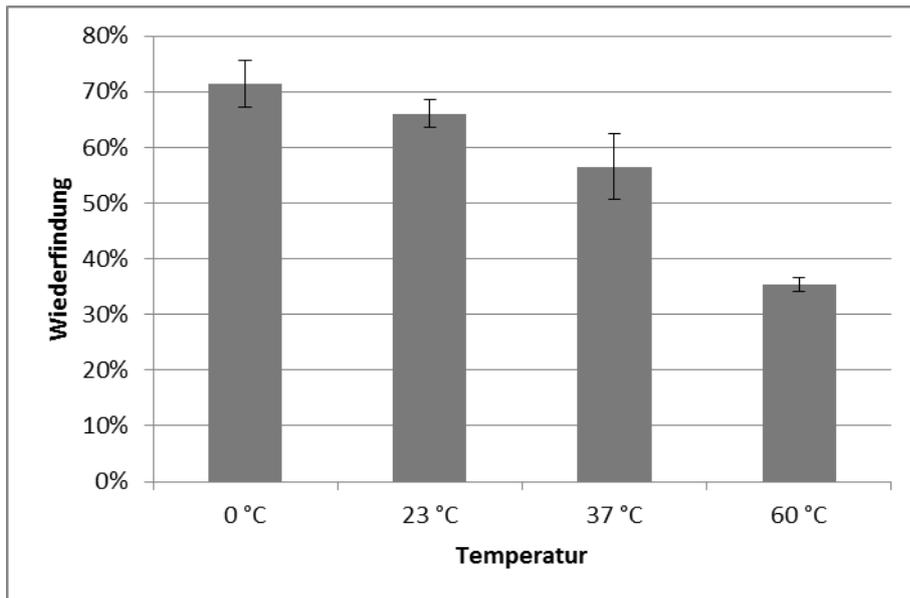


Abbildung 36: Wiederfindung des Caseins aus Casein-Teig bei unterschiedlichen Extraktionstemperaturen (X-Achse: Extraktionstemperatur; Y-Achse: Wiederfindung bezogen auf den Casein-Gehalt in den Casein-Teigen; Einzelwerte siehe Tabelle 48 im Anhang 8.16)

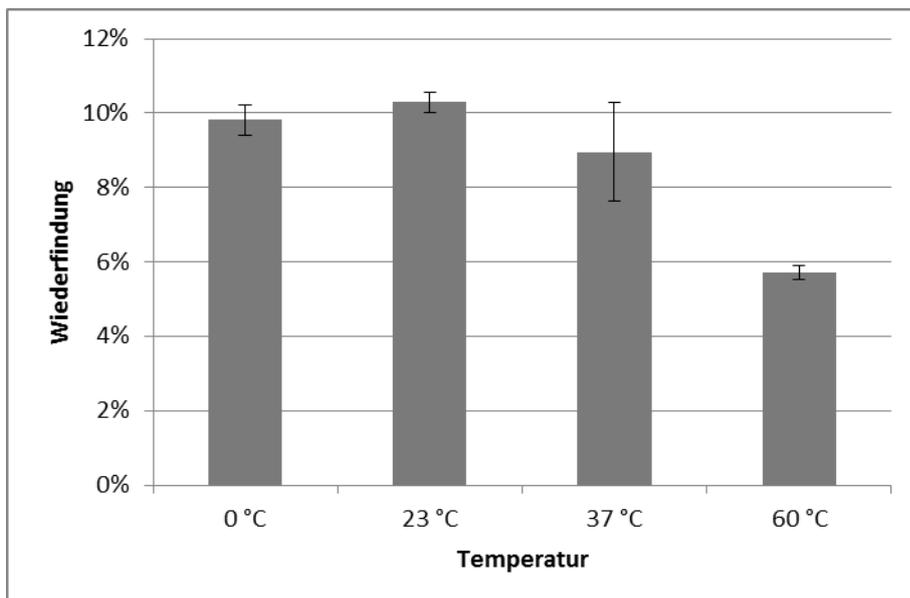


Abbildung 37: Wiederfindung des Caseins aus Casein-Muffins bei unterschiedlichen Extraktionstemperaturen (X-Achse: Extraktionstemperatur; Y-Achse: Wiederfindung bezogen auf den Casein-Gehalt in den Casein-Muffins; Einzelwerte siehe Tabelle 48 im Anhang 8.16)

Aus Abbildung 36 und Abbildung 37 folgt, dass die Extraktions-Temperaturen 37 °C und 60 °C zu einer Verschlechterung der Wiederfindung führten. Nach Extraktion im Eisbad und bei Raumtemperatur waren die Wiederfindungen vergleichbar, beim Casein-Teig war die Wiederfindung allerdings bei 0 °C etwas besser als bei Raumtemperatur. Dieses Ergebnis zeigt auch, dass Casein bei niedrigen Temperaturen stabil ist. Bei den Casein-Muffins war jedoch die Wiederfindung bei Raumtemperatur etwas besser als bei 0 °C. Der Grund könnte sein, dass die Casein-Muffins bei höherer Temperatur besser aufgeschlossen werden. Da diese Ergebnisse jedoch statistisch nicht gesichert werden konnten, eignen sich beide Temperaturen für die Extraktion.

#### **6.2.10.2 Verlängerung der Extraktionsdauer**

Theoretisch wäre zu erwarten, dass die Allergene aus der Matrix besser herausgelöst werden, je länger die Extraktionsdauer ist. Allerdings ist zu erwarten, dass es in Abhängigkeit von der Matrix eine optimale Extraktionsdauer gibt. Die Proben wurden in diesem Versuch nach dem Mahlen in einer Kugelmühle bei Raumtemperatur auf einem Schüttler 20 und 50 min bei 420 rpm extrahiert. Die Schüttelzeiten wurden dadurch begrenzt, dass ein längeres Schütteln in der Kugelmühle viel Wärme produziert und damit die Extraktion gestört hätte. Eine Probe wurde sofort nach dem Mahlen ohne weitere Behandlung im Schüttler weiter verarbeitet. Die hier nicht weiter erwähnten Aufarbeitungsschritte wurden wie im Anhang 8.10.3 beschrieben, durchgeführt. Die Versuche wurden jeweils dreimal wiederholt. Die Mittelwerte und die Standardabweichungen der Wiederfindungen sind in Abbildung 38 und Abbildung 39 dargestellt.

Aus Abbildung 38 und Abbildung 39 folgt, dass die Wiederfindung bei Verlängerung der Extraktionsdauer leicht zunahm. Diese Zunahme war jedoch statistisch nicht gesichert. Die Extraktion nach Mahlen der Proben in der Kugelmühle war ausreichend, eine Verlängerung der Inkubationszeit auf einem Schüttler war nicht erforderlich.

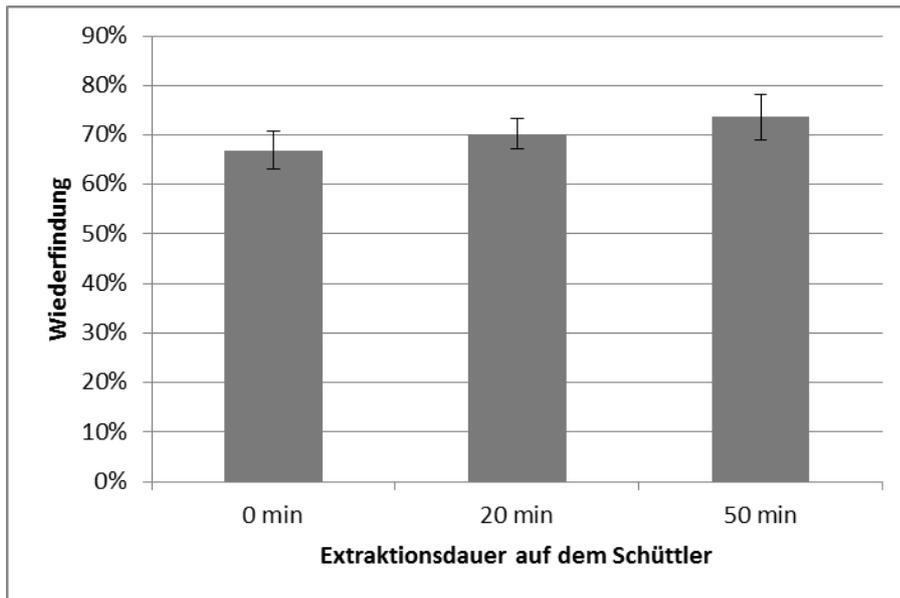


Abbildung 38: Wiederfindung des Caseins aus Casein-Teig bei unterschiedlicher Extraktionsdauer (X-Achse: Extraktionsdauer; Y-Achse: Wiederfindung bezogen auf den Casein-Gehalt in den Casein-Teigen; Einzelwerte siehe Tabelle 49 im Anhang 8.16)

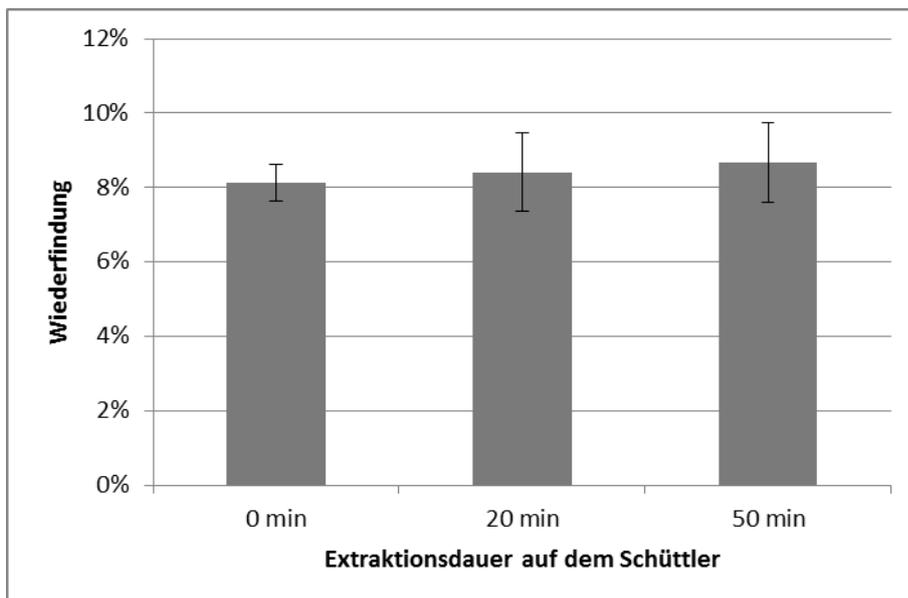


Abbildung 39: Wiederfindung des Caseins aus Casein-Muffins bei unterschiedlicher Extraktionsdauer (X-Achse: Extraktionsdauer; Y-Achse: Wiederfindung bezogen auf den Casein-Gehalt in den Casein-Muffins; Einzelwerte siehe Tabelle 49 im Anhang 8.16)

### 6.2.10.3 Einsatz eines Ultraschallbades

Die Proben wurden nach dem Mahlen in einer Kugelmühle für 20 min in ein Ultraschallbad gegeben. Eine Vergleichsprobe ohne Behandlung im Ultraschallbad wurde ebenfalls untersucht. Um eine Temperaturerhöhung im Ultraschallbad zu vermeiden, wurde Eis in das Ultraschallbad gegeben. Die hier nicht weiter erwähnten Aufarbeitungsschritte wurden wie im Anhang 8.10.3 beschrieben, durchgeführt. Die Versuche wurden jeweils dreimal wiederholt. Die Mittelwerte und die Standardabweichungen der Wiederfindungen sind in Abbildung 40 dargestellt.

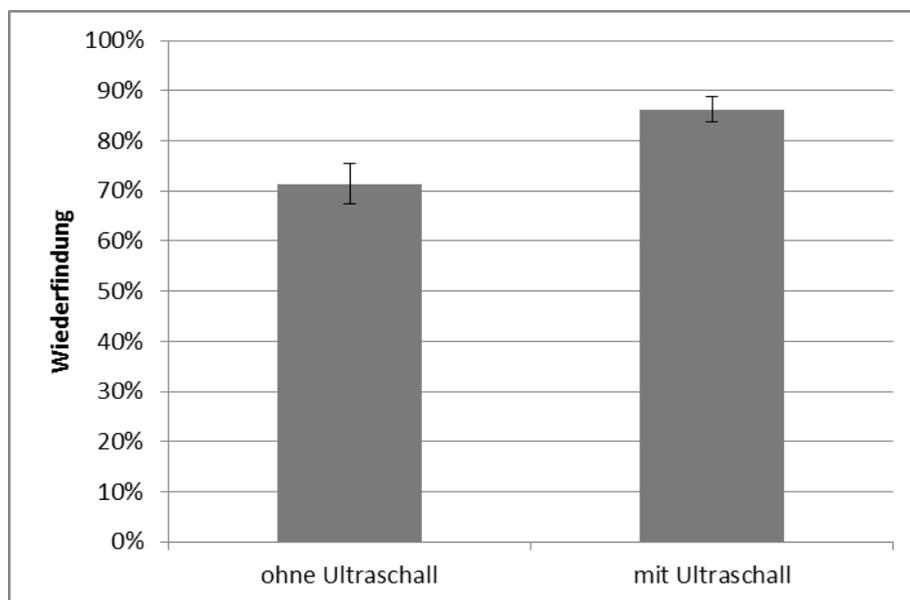


Abbildung 40: Wiederfindung des Caseins aus Casein-Teig mit und ohne Ultraschallbad-Behandlung (X-Achse: mit und ohne Ultraschallbad-Behandlung; Y-Achse: Wiederfindung bezogen auf den Casein-Gehalt in den Casein-Teigen; Einzelwerte siehe Tabelle 50 im Anhang 8.16)

Aus Abbildung 40 folgt, dass die Wiederfindungen durch Behandlung der Proben im Ultraschallbad signifikant erhöht wurden. Bei den weiteren Versuchen wurde daher eine Behandlung der Proben im Ultraschallbad vorgeschaltet.

### 6.2.11 Enzymatischer Verdau der Matrices

Aus den oben beschriebenen Versuchen folgt, dass der Großteil des Caseins in den Casein-Teigen nach dem Kneten noch im nativen Zustand vorhanden war. Das Casein konnte leicht

freigesetzt werden, da es weder chemisch an die Matrix gebunden noch physikalisch in den Matrices eingeschlossen war. Leider war aber die Wiederfindung nach dem Backen wegen der verschiedenen chemischen und physikalischen Reaktionen sehr niedrig. Vermutlich reagierten die nicht extrahierbaren Proteine teilweise mit Fetten und Kohlenhydraten der Matrices zu Lipo- bzw. Glykoproteinen oder sie wurden mit nicht-kovalenten Bindungen an diese gebunden. Daher wurde versucht, die Extrahierbarkeit der Proteine durch Verdau mit Lipase und Amylasen zu verbessern.

Die angewandten Methoden sowie die Zusammensetzung der Lösungen sind im Detail im Anhang 8.11 beschrieben.

### 6.2.11.1 Verdau mit Amylasen und Lipase

In diesem Versuch wurde 1 mL einer Casein Lösung (200 mg/kg) mit 0,1 mL den in Tabelle 7 beschriebenen 0,1%igen Enzymlösungen inkubiert. Die pH-Werte wurden mit Salzsäure auf die in Tabelle 7 angegebenen optimalen pH-Werte eingestellt. Die Reaktionen erfolgten über Nacht bei den in Tabelle 7 angegebenen optimalen Temperaturen. Die in der Tabelle 7 angegebenen pH-Werte und Temperaturen sind Herstellerangaben. Es konnte leider kein Casein nach Ende der Inkubation detektiert werden.

Tabelle 7: Optimale Bedingungen der verwendeten Enzyme

Enzym	optimaler pH-Wert	optimale Temperatur
Amylase aus <i>Aspergillus niger</i>	4,8	37 °C
Amylase aus Schweinepankreas	6,9	53 °C
Lipase aus Schweinepankreas	6,9	37 °C

Der Versuch wurde daher modifiziert. 20 µL Inkubationslösung wurden nach der in Tabelle 8 angegebenen Zeit aus dem Versuchsansatz entnommen und sofort mit dem Reduktionspuffer für die SDS-Page vermischt. Der Reduktionspuffer enthielt 2ME und SDS, welche die räumliche Struktur der Proteine zerstörten und somit auch die Enzyme inaktivierten. Die reduzierenden Lösungen wurden auf SDS-Page-Gele aufgetragen, nach Vorschrift im Abschnitt 8.3 elektrophoretisch getrennt und nach Vorschrift im Abschnitt 8.4 angefärbt. Die Gele sind in den Abbildung 41 und Abbildung 42 dargestellt und die

zugehörige Legende findet sich in Tabelle 8. Die Zusammensetzung des Proteinmarkers ist in Abbildung 73 im Anhang 8.3.2 beschrieben.

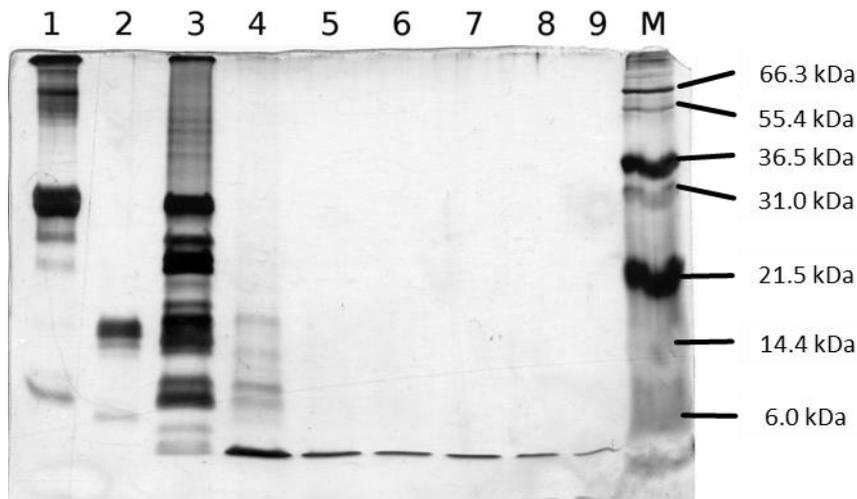


Abbildung 41: Exemplarisch SDS-Page-Gel für die Detektion des Caseins nach Verdau mit Amylase aus *Aspergillus niger*, in analoger Weise wurde ein SDS-Page-Gel für die Detektion des Caseins nach Verdau mit Lipase aus Schweinepankreas erstellt

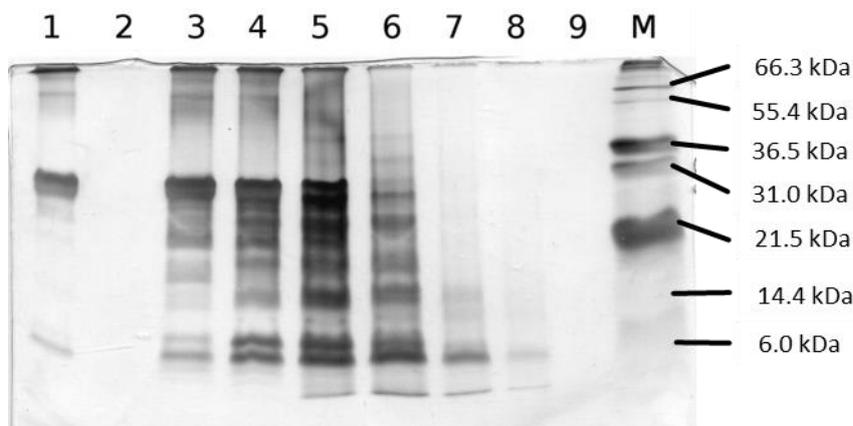


Abbildung 42: SDS-Page-Gel für die Detektion des Caseins nach Verdau mit Amylase aus Schweinepankreas

Tabelle 8: Legende für die Verdaue mit Amylasen und Lipase

Nr.	Substanz	Nr.	Substanz
1	Casein	6	Verdauprodukt nach 60 min
2	entsprechendes Enzym	7	Verdauprodukt nach 120 min
3	Verdauprodukt nach 0 min	8	Verdauprodukt nach 180 min
4	Verdauprodukt nach 10 min	9	Verdauprodukt über Nacht
5	Verdauprodukt nach 30 min	M	Marker

Auch nach Modifikation der Verdau-Versuche konnte kein Casein nachgewiesen werden. Casein wurde wahrscheinlich ebenfalls verdaut, so dass es elektrophoretisch nicht mehr nachgewiesen werden konnte. Da die eingesetzten Enzyme aus Tieren und Mikroorganismen offensichtlich mit Proteasen verunreinigt waren, wurde das Ziel, nur die Matrices zu verdauen und die Caseine nicht anzugreifen, nicht erreicht. Daher müssen die Proteasen vollständig entfernt werden. Es zeigte sich, dass die Lipase und die Amylase aus *Aspergillus niger* hohe Protease-Aktivitäten aufwiesen, die Casein meist schon nach 10 Minuten abbauten. Außerdem beträgt der optimale pH-Wert für die Amylase aus *Aspergillus niger* 4,8 und ist somit fast gleich dem IEP von Casein (pH 4,6). Da Casein am IEP schlecht löslich ist, war die Amylase nicht für diesen Versuch geeignet.

Der Abbau des Caseins war mit der Amylase aus Schweinepankreas weniger intensiv im Vergleich zu den beiden Enzymen aus *Aspergillus niger*. Daher wurde die Amylase aus Schweinepankreas als Modellenzym für die weitere Aufreinigung gewählt, um damit die proteolytischen Enzyme zu entfernen.

Klassische Aufreinigungsmethoden sind Gelfiltration, präparative HPLC und weitere Methoden. In dieser Arbeit wurde jedoch eine relativ einfache Methode verwendet, die Stärke-Affinitäts-Aufreinigung. Mit dieser Methode wurde die Amylase aus Schweinepankreas aufgereinigt.

#### **6.2.11.2 Aufreinigung der Amylase aus Schweinepankreas mittels Stärke-Affinitäts-Aufreinigung**

Die Substrate werden beim enzymatischen Abbau zuerst spezifisch im aktiven Zentrum des Enzyms als Enzym-Substrat-Komplex gebunden. Das Enzym ermöglicht die Umwandlung des Substrats in die Reaktionsprodukte bei niedriger Aktivierungsenergie. Die Reaktionsprodukte werden anschließend aus dem Komplex frei gesetzt. Bei einer tiefen Temperatur könnte zwar das Enzym an das Substrat binden, die Aktivierungsenergie wird jedoch nicht erreicht, so dass keine Umsetzung des Substrats erfolgt. Somit kann man diese Eigenschaft nutzen, um die Amylase von anderen begleitenden Proteinen abzutrennen. Durch Erwärmen wurde die Amylase aktiviert und kann dann die Stärke abbauen. Die Produkte der Amylasereaktion können anschließend extrahiert werden. (Lizotte et al., 1990; Shaw et al., 1995; Najafi et al., 2005a und 2005b).

Damit die Aktivität der Amylase bei dieser Behandlung nicht abnimmt, wurden die Versuche in einem 0,03 M Phosphat-Puffer, der auf pH 6,9 eingestellt wurde, durchgeführt. Mit diesem Puffer konnte die Situation im Dünndarm des Schweines *in vitro* simuliert werden. Der Puffer heißt demnach auch Darm-Simulations-Puffer (Lifshitz und Levitzki, 1976). Die genaue Zusammensetzung ist im Anhang 8.11.1 beschrieben.

Die folgenden Versuche wurden im Eisbad durchgeführt und alle verwendeten Lösungen wurden auf 4 °C abgekühlt. Die eingesetzte Stärke wurde zunächst mit dem 10-fachen Volumen des Darm-Simulations-Puffers gewaschen. Es wurden 0,2 g Amylase aus Schweinepankreas in 2 mL des Darm-Simulations-Puffers gelöst. Die fadenförmigen unlöslichen Bestandteile, die möglicherweise aus dem Pankreasgewebe stammten, wurden durch Zentrifugation entfernt. Nach mehreren Waschschritten mit dem Darm-Simulations-Puffer wurde die Suspension auf die vom Hersteller empfohlene optimale Temperatur von 53 °C im Wasserbad erwärmt und sofort zentrifugiert. Die klare Lösung wurde für die anschließenden Versuche aufbewahrt. Die genaue Versuchsdurchführung ist im Anhang 8.11.2 beschrieben.

Die Proteinkonzentration der Amylase ohne Aufreinigung und mit 2-6 Waschschritten wurde nach Lowry bestimmt. Um die Aktivität der Amylase zu bestimmen, wurde eine Zuckerbestimmung durchgeführt. Stärke besitzt theoretisch nur eine freie reduzierende Aldehydgruppe pro Molekül. Durch Zugabe von Amylase wird eine lange Stärkekette in mehrere kurze Ketten oder bis zu Maltose gespalten, wobei mehrere Aldehydgruppen freigesetzt werden. Damit kann die Amylase-Aktivität unter Verwendung von Maltose als Standard bestimmt werden. Eine Unit Amylase-Aktivität wird als die Menge Amylase definiert, die 1 µmol Maltose aus Stärke bei pH 6,9 und 53 °C freisetzt.

Die klassische Zuckerbestimmung nach Luff-Schoorl konnte nicht angewendet werden, da die anfallende Menge an Zucker nach dem Verdau zu gering war. Das Prinzip der Zuckerbestimmung in dieser Arbeit beruht auf der Reduktion des Cu(II) zu Cu(I) infolge der Anwesenheit des reduzierenden Endes der Maltose. Cu(I) reagiert weiter mit dem Folin-Ciocalteu-Reagenz entsprechend der Proteinbestimmung nach Lowry (siehe Abschnitt 5.2.6). Die genaue Beschreibung der Versuche zur Amylase-Aktivitäts- und zur Zucker-Bestimmung ist im Anhang unter 8.11.3 und 8.11.4 dargestellt.

Die Amylase Aktivität wurde mit folgender Formel berechnet (Burrell, 1993; Copeland, 2000):

$$U = \frac{c}{Mw \times t}$$

U: Aktivität der Amylase in der Lösung [Unit/mL]

c: Konzentration der Maltose in der Lösung [ $\mu\text{g}/\text{mL}$ ]

Mw: Molekulargewicht der Maltose = 342,3 g/mol

t: Inkubationszeit = 10 min

Eine weitere wichtige Kennzahl von Enzymen ist die spezifische Aktivität. Diese beschreibt den Anteil des entsprechenden Enzyms in einer Lösung, bezogen auf den gesamten Proteingehalt. Die spezifische Aktivität beschreibt somit die Reinheit eines Enzyms. Die spezifische Aktivität der Amylase wurde mit Hilfe folgender Formel ermittelt (Burrell, 1993; Copeland, 2000):

$$SA = \frac{U \times f}{P}$$

SA: spezifische Aktivität der Amylase [Unit/mg]

U: Aktivität der Amylase in der Lösung [Unit/mL]

f: Verdünnungsfaktor,  $\mu\text{g}$  auf mg = 1000

P: Proteinkonzentration [ $\mu\text{g}/\text{mL}$ ]

Der Proteingehalt, die Aktivität und die spezifische Aktivität der Amylase aus Schweinepankreas nach entsprechenden Waschschrte sind in Tabelle 9 dargestellt.

Die aus Schweinepankreas isolierte Amylase enthielt noch unerwünschte Begleitstoffe, z. B die beschriebenen fadenförmigen unlöslichen Stoffe, die bei der Lösung der Amylase im Darm-Simulations-Puffer auftraten. Die unlöslichen Stoffe wurden durch Zentrifugation entfernt, die löslichen Begleitstoffe wurden durch Stärke-Affinitäts-Aufreinigung entfernt.

Tabelle 9: Aktivität und Reinheit der Amylase aus Schweinepankreas nach 0 - 6 Wäschen

Wäschen	Proteingehalt [ $\mu\text{g}/\text{mL}$ ]	Aktivität [ $\text{Unit}/\text{mL}$ ]	Spezifische Aktivität [ $\text{Unit}/\text{mg}$ ]
0	3247	2,92	0,90
2	481	2,20	4,57
3	410	1,72	4,19
4	307	1,03	3,36
5	234	0,67	2,86
6	186	0,37	1,98

Der Gesamtproteingehalt der Amylase-Lösung wurde nach 2 Waschschrinen von 3247  $\mu\text{g}/\text{mL}$  auf 481  $\mu\text{g}/\text{mL}$  stark reduziert. In den Waschpuffern konnte keine Amylase-Aktivität mehr festgestellt werden, dennoch wurde die Aktivität der Lösung von 2,92  $\text{Unit}/\text{mL}$  auf 2,20  $\text{Unit}/\text{mL}$  abgesenkt. Es könnte sein, dass ein geringer Teil der Amylase ausgespült und durch mit gespülte Proteasen abgebaut wurde. Es konnte allerdings durch eine erhebliche Zunahme der spezifischen Amylase-Aktivität auch gezeigt werden, dass die Amylase fester und selektiver als die unerwünschten Proteine an die Stärke gebunden wurde. Nach weiteren Waschschrinen wurden sowohl das Gesamtprotein als auch die Amylase-Aktivität reduziert. Das bedeutet, dass auch die Amylase durch intensives Waschen eluiert wurde.

100  $\mu\text{L}$  der Amylase wurden ohne weitere Aufreinigung bzw. mit 2 - 6 Waschschrinen mit 900  $\mu\text{L}$  einer 1%igen Casein-Lösung vermischt und bei 53 °C für 1 h im Wasserbad inkubiert. 900  $\mu\text{L}$  einer 1%igen Casein-Lösung wurden mit 100  $\mu\text{L}$  Wasser vermischt und als Vergleich analog dem o.g. Versuch inkubiert. Die Inkubate wurden danach sofort abgekühlt, reduziert und zusammen mit dem Proteinmarker und dem Casein-Standard, also ohne Zugabe von Amylase und Erwärmung, mittels im Anhang unter 8.3 und 8.4 beschriebener SDS-Page-Methode aufgetrennt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 43 dargestellt.

Aus den Ergebnissen folgt, dass die Amylase aus Schweinepankreas zwar das Casein vor der Aufreinigung noch abbauen konnte, aber nach zwei Wäschen war keine Protease-Aktivität mehr vorhanden. Die meiste Protease wurde somit während der beiden ersten Wäschen entfernt, daher war die Abbauintensität des Caseins in den Kolonnen 3 - 6 mit der in Kolonne 2 vergleichbar. Kolonnen 7 und 8 zeigen, dass kein Casein während der Inkubation abgebaut wurde.

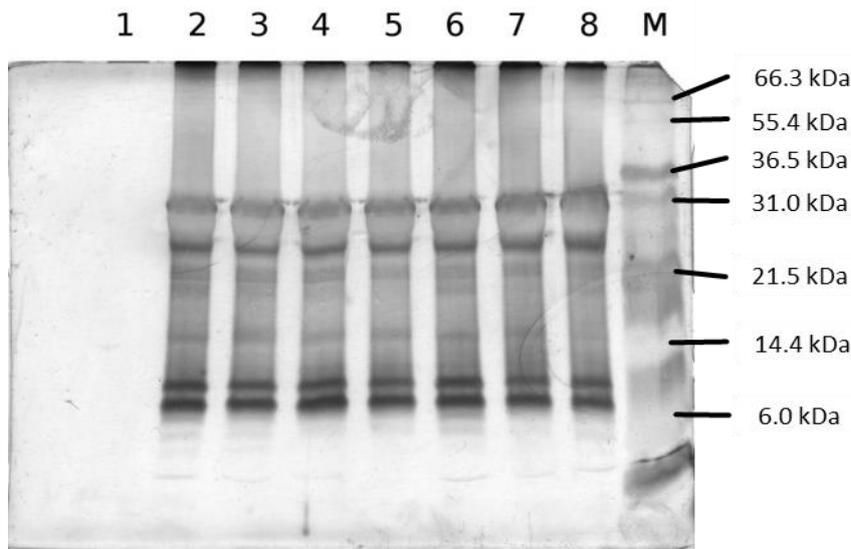


Abbildung 43: Verdau-Versuche der Amylase aus Schweinepankreas nach verschiedenen Waschschrinen (1: Ohne Aufreinigung; 2: 2 Wäschen; 3: 3 Wäschen; 4: 4 Wäschen; 5: 5 Wäschen; 6: 6 Wäschen; 7: Casein ohne Zugabe von Amylase inkubiert; 8: Casein-Standard; M: Proteinmarker)

Das Casein, das mit der aufgereinigten Amylase aus Schweinepankreas für 1 h inkubiert wurde, wurde mittels ELISA quantifiziert. Leider war die Extinktion niedrig, niedriger sogar als der Blindwert. Es wird daher vermutet, dass noch eine kleine Restmenge Protease in den Inkubaten vorhanden war. Neben dem Casein wurden die Antikörper, insbesondere die Einfang-Antikörper, während des ELISA abgebaut, daher wurde kein Casein detektiert. Um diese Vermutung zu bestätigen, wurde Casein über längere Zeit mit der Amylase aus Schweinepankreas inkubiert. Die 1%ige Casein-Lösung wurde mit der Amylase, die 2, 3, 4 und 6 Wäschen durchlief, über Nacht bei 53 °C im Wasserbad inkubiert. Drei Wiederholungen wurden mit der Casein-Lösung ohne Zugabe von Amylase durchgeführt. Die Inkubate wurden der SDS-Page zugeführt. Das Ergebnis ist in Abbildung 44 dargestellt.

Aus Abbildung 44 geht hervor, dass nach Aufreinigung der Amylase noch eine geringe Protease-Aktivität vorhanden war. Es wurde zwar kein Abbau des Caseins nach einstündiger Inkubation beobachtet, es konnte aber auch kein Casein nach der Inkubation über Nacht mehr detektiert werden.

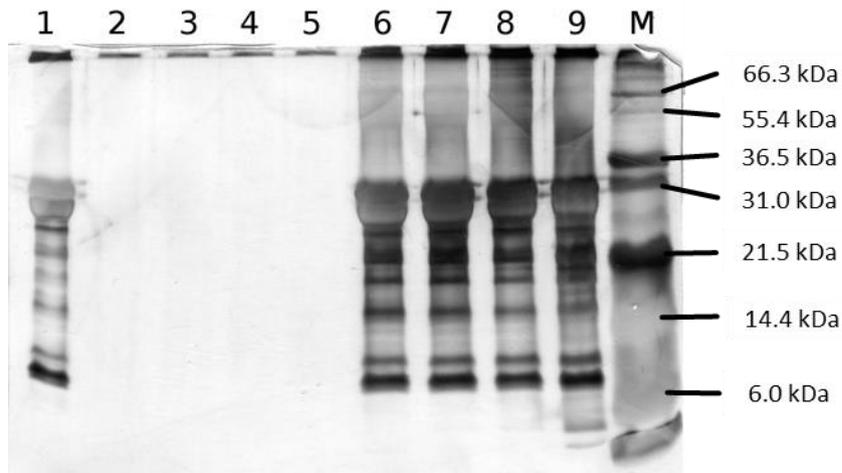


Abbildung 44: Verdau-Versuch von Casein mit Amylase aus Schweinepankreas über Nacht (1: Casein-Standard, 2: 2 Wäschen; 3: Wäschen; 4: 4 Wäschen; 5: 6 Wäschen; 6-8: Casein ohne Zugabe von Amylase inkubiert; 9: Casein-Standard; M: Proteinmarker)

In der Praxis werden Protease-Inhibitoren verwendet, um die Protease-Aktivitäten in biochemischen Versuchen zu reduzieren. In unseren Versuchen wurde Pefabloc SC(4-(2-Aminoethyl)benzenesulfonyl-fluorid-hydrochlorid, Roche, Schweiz) eingesetzt. Entsprechend den Herstellerangaben wurde die Casein-Amylase-Mischung mit 3 mM versetzt. Die in diesem Versuch verwendete Amylase aus Schweinepankreas wurde dreimal gewaschen und die 1%ige Casein-Lösung im Verhältnis 1:10 zugegeben. Die erhaltene Lösung wurde 3- 4,5 h im Wasserbad bei 53 °C inkubiert. Die Vergleichsuntersuchungen wurden ohne Zugabe von Pefabloc SC analog durchgeführt. Die Versuche wurden auch mit einer Casein-Lösung ohne Zugabe von Amylase und Pefabloc SC durchgeführt. Die Inkubate der Versuche wurden der SDS-Page zugeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 45 dargestellt.

Pefabloc SC verhindert, wie erwartet, die Protease-Aktivität in den Versuchsansätzen. Die Casein-Banden mit Pefabloc SC in Kolonne 6 waren nach 3 h Inkubation intensiver als diejenigen ohne Zugabe von Pefabloc SC in Kolonne 2. Nach 4,5 h Inkubation waren die Casein-Banden in Kolonne 9 noch gut sichtbar, während das Casein in Kolonne 5 ohne Zugabe von Pefabloc SC fast vollständig abgebaut wurde. Im Vergleich zu den Casein-Lösungen, die ohne Amylase und Pefabloc SC inkubiert wurden, konnte in der aufgereinigten Amylase noch eine Protease-Aktivität festgestellt werden.

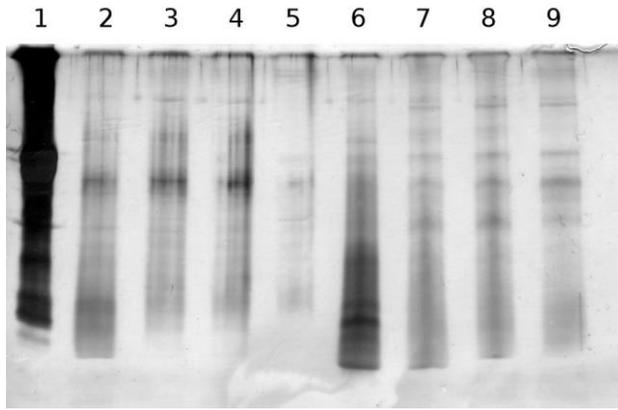


Abbildung 45: Verdau-Versuche mit Pefabloc SC (1: Casein ohne Amylase und Pefabloc SC; 2-5: ohne Pefabloc SC; 6-9: mit Pefabloc SC; 2 und 6: für 3 h inkubiert; 3 und 7: für 3,5 h inkubiert; 4 und 8: für 4 h inkubiert; 5 und 9: für 4,5 h inkubiert)

Fasst man die Ergebnisse zusammen, dann muss man feststellen, dass die Idee des enzymatischen Verdaus nicht realisiert werden konnte, da die Begleitproteine bzw. die Protease-Aktivität nicht vollständig entfernt werden konnten.

### 6.2.12 Zusammenfassung der Ergebnisse zur Extraktion

Für die weiteren Untersuchungen wurde als Ergebnis der bisher durchgeführten Versuche folgende Extraktionsmethode etabliert und angewendet:

0,1 g Probe genau einwiegen;

Mit 1 mL Extraktionspuffer (siehe 5.2.9) und 2 Edelstahlkugeln (Durchmesser 3.18 mm) versetzen;

für 10 min bei 2400 rpm in Kugelmühle zerkleinern und weiter für 20 min im Ultraschallbad inkubieren; die Temperatur im Ultraschallbad durch Zugabe von Eis bei 0 °C konstant halten;

für 5 min bei 5976 g zentrifugieren;

obere Lösung vorsichtig in andere Reaktionsgefäße überführen.

## **6.3 Vergleiche unterschiedlicher Aufreinigungsmethoden für Casein haltige Probenextrakte**

Wie in Abschnitt 6.1.3 diskutiert wurde, enthalten die Casein haltigen Probenextrakte unerwünschte Begleitstoffe, die aus den Extraktionsreagenzien und der Matrix stammen. Diese Begleitstoffe können die Detektion mittels ELISA stören, daher müssen die Extrakte vor der Detektion aufgereinigt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden folgende Methoden zur Aufreinigung getestet: Dialyse, Ultrafiltration, Präzipitation (Rehm, 2006). Diese Versuche wurden mit einer Standardlösung von 100 mg/kg Casein durchgeführt, um Einflüsse anderer Prozesse, z.B. der Extraktion, zu vermeiden. Alle Versuche wurden dreimal wiederholt.

### **6.3.1 Dialyse**

Unter Dialyse versteht man den Stoffaustausch durch eine Membran, wobei sich auf der einen Seite der Membran die zu dialysierenden Substanzen und auf der anderen Seite die Dialyselösung befindet. Stoffe mit kleineren Molekulargewichten als die Poren der Membran können diese passieren. In diesen Versuchen wurde eine Membran mit MWCO (englisch: Molecular Weight Cut Off, Einheit: Dalton, Da) 6000-8000 Da verwendet. Mit dieser Membran könnten kleinere Begleitstoffe, wie z.B. Harnstoff, Tenside usw., die Membran passieren, während Casein mit einem größeren Molekulargewicht zurück gehalten wird.

1 mL der 5 mg/kg Casein-Lösung wurde in einen Dialysierschlauch aus Cellulose (Carl Roth, Deutschland) pipettiert und gegen den PBS-Tween20-Puffer dialysiert (siehe Abschnitt 8.6.1). Der PBS-Tween20-Puffer wurde verwendet, da er auch im ELISA für die Verdünnung des Standards und der Antikörper eingesetzt wurde. Während des gesamten Dialyseprozesses wurde der Puffer viermal ausgetauscht. Die Zeit, in der der Dialysepuffer zweimal gewechselt wurde, betrug mindestens 2 h. Die Dialyselösung wurde mittels ELISA getestet. Die Wiederfindung betrug leider nur  $53,6\% \pm 8,3\%$ . Um die Wiederfindung zu verbessern, wurde der Dialysierschlauch zusätzlich nachgespült. Damit konnte die Wiederfindung leicht auf  $56,2\% \pm 9,3\%$  verbessert werden. Auch diese Wiederfindung war nicht ausreichend.

Vermutlich wurde Casein am Dialysierschlauch adsorbiert und es konnte daher nicht mehr bestimmt werden (Blumenkrantz et al., 1981). Ein ähnliches Phänomen wurde auch in Abschnitt 6.1.3 bei der Blockierung der ELISA-Platte diskutiert. Dabei wurde die Dialysemembran in 1-10%igem Weizenmehlextrakt und Hühnereieiklarlösung, die mit PBS-

Tween20-Puffer analog Abschnitt 6.1.3 hergestellt wurden, für 2 h in PBS-Tween20-Puffer blockiert. Zum Vergleich wurde die Dialysemembran für 2 h in PBS-Tween20-Puffer und dest. Wasser inkubiert. Die anderen Parameter des Dialyseprozesses wurden nicht verändert. Die Casein-Wiederfindung ist in Abbildung 46 dargestellt.

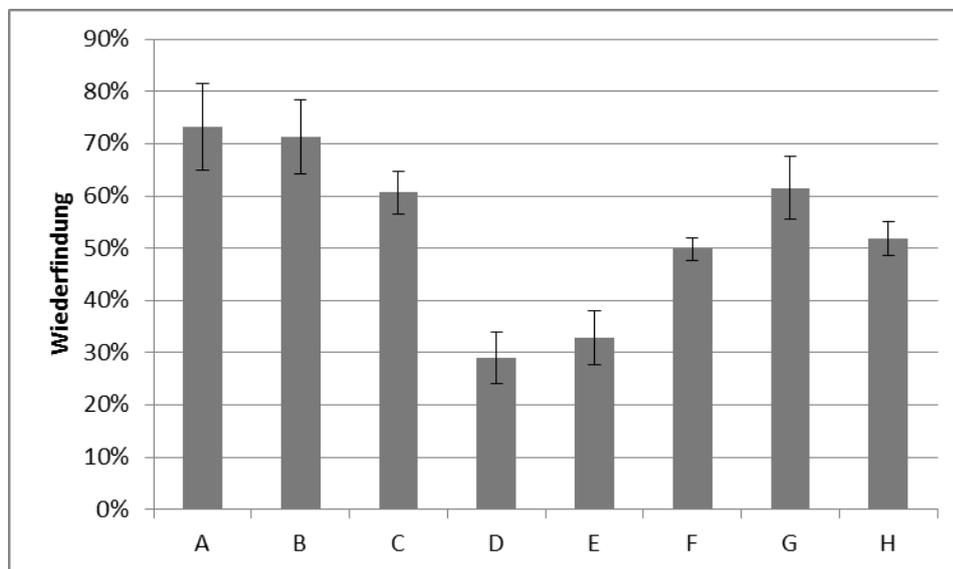


Abbildung 46: Wiederfindung des Caseins nach Dialyse; die Dialysemembran wurde mit unterschiedlichen Stoffen blockiert (X-Achse: A: 10% Weizenmehlextrakt; B: 5% Weizenmehlextrakt; C: 1% Weizenmehlextrakt; D: 10% Hühnereieiklar; E: 5% Hühnereieiklar; F: 1% Hühnereieiklar; G: PBS-Tween- 20-Puffer; H: dest. Wasser; Y-Achse: Wiederfindung des Caseins, 5 mg/kg waren 100 %; Einzelwerte siehe Tabelle 51 im Anhang 8.16)

Die Ergebnisse waren vergleichbar denjenigen, die bei der Blockierung der ELISA-Platten erzielt wurden. Die Membran konnte mit PBS-Tween20-Puffer nur teilweise blockiert werden. Hühnereieiklarlösung konnte wegen der hohen Viskosität nicht untersucht werden. Die mit dem Weizenmehlextrakt erzielten Ergebnisse zeigten, dass die Wiederfindung zwar um 10-20 % erhöht werden konnte, die erzielte Wiederfindung von ca. 70 % war aber nach wie vor unbefriedigend. Das bedeutet, dass die Dialyse weiter verbessert werden musste.

Es wurde daher versucht, die Oberfläche der Dialysemembran zu verkleinern. Dabei wurde der Deckel des Reaktionsgefäßes an der in Abbildung 47 A gezeigten Stelle abgeschnitten. 200 µL der zu dialysierenden Lösung wurden in den Deckel pipettiert (Abbildung 47 B). Die mit 10%igem Weizenmehlextrakt blockierte Dialysemembran wurde auf den Deckel

gespannt und mit dem abgeschnittenen Teil des Reaktionsgefäßes verschlossen (Abbildung 47 C).

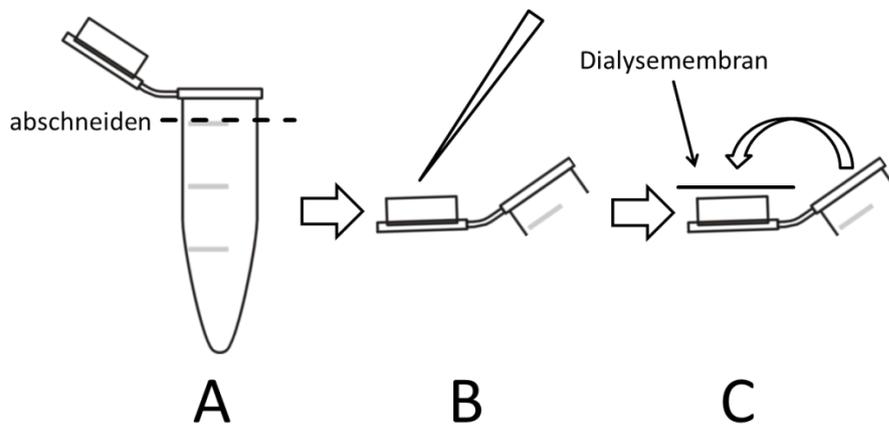


Abbildung 47: Dialyse mit dem Deckel des Reaktionsgefäßes (A: Deckel des Reaktionsgefäßes am Rand abschneiden; B: Dialyselösung in den Deckel pipettieren; C: Dialysemembran auf den Deckel spannen und verschließen)

Die Oberfläche der Dialysemembran, die mit der Dialyselösung in Kontakt kam, betrug nur ca.  $3 \text{ cm}^2$  im Vergleich zu den Versuchen mit dem Dialysierschlauch, bei dem die Oberfläche ca.  $40 \text{ cm}^2$  war. Die Adsorptionsfläche war dementsprechend sehr klein. Mit dieser Methode konnte die Wiederfindung des Caseins auf  $93,3\% \pm 11,7\%$  verbessert werden. Diese Methode war daher für die Aufreinigung des Extrakts bestens geeignet.

Die optimierte Dialysemethode wurde daher wie folgt durchgeführt:  $200 \mu\text{L}$  der Dialyselösung wurden in den Deckel des Reaktionsgefäßes pipettiert. Der Deckel wurde mit der Dialysemembran, welche mit 10%igem Weizenmehlextrakt für 2 h blockiert wurde, verschlossen. Es wurde 8 h gegen den PBS-Tween20-Puffer dialysiert, wobei der Puffer alle zwei Stunden ausgetauscht wurde.

### 6.3.2 Ultrafiltration

Das Prinzip der Ultrafiltration ähnelt demjenigen der Dialyse. Der Unterschied zwischen Dialyse und Ultrafiltration besteht darin, dass bei der Dialyse die kleineren Moleküle einer Lösung durch Diffusion durch eine Membran entfernt werden. Bei der Ultrafiltration wird

mit Hilfe der Schwerkraft durch Zentrifugieren diese Diffusion beschleunigt. Daher ist der Zeitaufwand bei der Ultrafiltration kleiner als bei der Dialyse.

In unseren Versuchen wurde als Ultrafiltrationgefäß Vivaspin 500 µL (Sartorius Stedim Biotech, Deutschland) verwendet, welches mit einer MWCO 5000 Da Membran versehen war. Die Versuchsdurchführung war im Vergleich zu den anderen Versuchen einfach: 500 µL einer 5 mg/kg Casein-Lösung wurden in das Obergefäß des Vivaspins pipettiert. Nach 30 min Zentrifugieren bei 8928 g wurden 500 µL des PBS-Tween-20-Puffers in das Obergefäß pipettiert. Der Aufreinigungsprozess wurde anschließend wiederholt. Dann wurde die restliche Lösung aus dem Obergefäß entnommen und dem ELISA zugeführt. Die Wiederfindung war mit  $26,9\% \pm 6,3\%$  allerdings enttäuschend gering. Die geringe Wiederfindung ist wahrscheinlich auf die unspezifische Bindung des Caseins an die Membran zurückzuführen (Huisman et al., 2000).

Um die Wiederfindung zu verbessern, wurde das Vivaspin zuerst mit 500 µL des Weizenmehlextraktes inkubiert und blockiert. Die Blockierungslösung wurde anschließend durch einstündige Zentrifugation bei 8928 g entfernt. Dann wurden 500 µL 5 mg/kg Casein-Lösung in das Obergefäß pipettiert und bei 8928 g für 30 min zentrifugiert. Nach Entnahme der Lösung aus dem Obergefäß wurde das Obergefäß mit PBS-Tween20-Puffer nachgespült. Die beiden Lösungen wurden zusammengeführt und dem ELISA zugeführt. Die Wiederfindung des Caseins wurde leicht auf  $30,6\% \pm 6,4\%$  verbessert. Als Ergebnis dieser Versuche wird festgestellt, dass die Ultrafiltration somit kein geeignetes Aufreinigungsverfahren darstellt.

### **6.3.3 Präzipitation**

Bei biochemischen Versuchen wird die Methode der Präzipitation häufig verwendet, um Proteine aus Lösungen zu entfernen. Die Proteine werden durch Zugabe von Salz, organischen Lösungsmitteln oder durch Änderung des pH-Wertes ausgefällt (Johnson, 1941; Rothenberg und Nachmansohn, 1947). Die Lösung wird dann zentrifugiert, so dass sich die ausgefällten Proteine am Boden der Reaktionsgefäße befinden. Während der Präzipitation werden die Proteine teilweise bzw. vollständig denaturiert, so dass sie nicht mehr mit Hilfe des ELISA quantifiziert werden können. Daher muss nach der Präzipitation eine Renaturierung durchgeführt werden.

In unseren Versuchen wurden als Präzipitationsreagenzien Methanol, Ethanol und Aceton eingesetzt. Des Weiteren wurde ein Acetatpuffer bei einem pH-Wert von 4,6, dem IEP des Caseins, als Präzipitationsreagenz eingesetzt (siehe Anhang 8.10.2). Weitere Präzipitationsreagenzien waren eine gesättigte und eine halbgesättigte Ammoniumsulfatlösung. Es wurden 100 µL 100 mg/kg Casein-Lösung mit 1 mL eines der oben genannten Präzipitationsreagenzien versetzt und bei 8928 g eine Stunde zentrifugiert. Nach Entfernen der klaren Flüssigkeit aus dem Zentrifugenröhrchen und dem eventuellen Abdampfen des organischen Lösungsmittels unter Vakuum bei Raumtemperatur wurde 1 mL des PBS-Tween-20-Puffers zu dem Pellet gegeben. Die Reaktionsgefäße wurden sodann über Nacht mit einem Schüttler mit 400 rpm geschüttelt um die Proteine in dem Pellet wieder in Lösung zu bringen bzw. zu renaturieren. Die mittels ELISA ermittelten Wiederfindungen des Caseins sind in Abbildung 48 dargestellt.

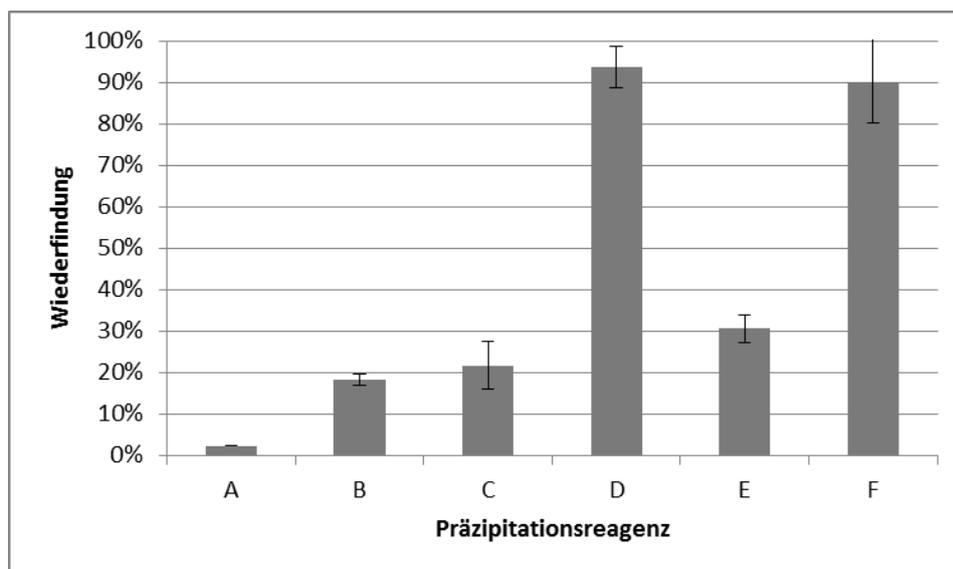


Abbildung 48: Wiederfindung des Casein-Standards nach Präzipitation mit unterschiedlichen Präzipitationsreagenzien (Y-Achse: prozentuale Wiederfindung des Caseins nach Präzipitation mit A: Methanol; B: Ethanol; C: Aceton; D: Acetat-Puffer; E: halbgesättigte Ammoniumsulfatlösung; F: gesättigte Ammoniumsulfatlösung; Einzelwerte siehe Tabelle 52 im Anhang 8.16)

Nach Zugabe der Präzipitationsreagenzien zur Casein-Lösung wurde Casein in den Lösungen A-D und F sofort ausgefällt. Die Pellets wiesen in diesen Versuchen mit bloßem Auge erkennbare gleiche Größen auf. Nach der Renaturierung waren in den Reaktionsgefäßen, die mit organischen Lösungsmitteln versetzt wurden, noch unlösliche, nicht renaturierte

Bestandteile vorhanden. Wie aus Abbildung 48 folgt, waren die Wiederfindungen für Casein bei Einsatz der organischen Präzipitationsreagenzien und bei der halbgesättigten Ammoniumsulfatlösung niedrig (siehe Abbildung 48, Säulen A-C, E). Die Wiederfindungen bei Verwendung des Acetatpuffers und der gesättigten Ammoniumsulfatlösung waren ähnlich hoch, die Schwankungen beim Einsatz der gesättigten Ammoniumsulfatlösung waren jedoch relativ hoch.

Ein weiterer Versuch wurde mit dem Extrakt aus dem in Abschnitt 6.2.12 beschriebenen Casein-Teig durchgeführt. Es wurden 100 µL Extrakt zu jeweils 1 mL Acetatpuffer und gesättigter Ammoniumsulfatlösung gegeben. Die Präzipitation wurde, wie oben beschrieben, durchgeführt. Die Pellets aus der Fällung mit gesättigter Ammoniumsulfatlösung waren sehr groß, da diese Fällung unspezifisch war und daher alle Proteine, somit auch diejenigen aus Weizenmehl, mitgefällt wurden. Allerdings waren alle Pellets etwas größer als diejenigen, die beim Einsatz des Casein-Standards erhalten wurden. Offenbar wurden Proteine nicht nur wegen Erreichen des IEP ausgefällt, sondern weil sie generell im Sauren denaturiert werden. Die Wiederfindungen nach Quantifizierung via ELISA betragen beim Acetatpuffer  $80,2\% \pm 5,4\%$  und bei der gesättigten Ammoniumacetatlösung  $78,3\% \pm 11,0\%$ . Die Wiederfindungen waren somit vergleichbar, allerdings ist die Standardabweichung beim Einsatz der gesättigten Ammoniumsulfatlösung höher. Die Erklärung könnte sein, dass mitgefällte Proteine die Quantifizierung via ELISA störten.

#### **6.3.4 Zusammenfassung der Aufreinigung**

Die Wiederfindungen bei der Aufreinigung waren bei der Dialyse und bei der Präzipitation vergleichbar gut. Die Präzipitation bot jedenfalls gegenüber der Dialyse Vorteile hinsichtlich des Zeitaufwandes und der Anzahl der durchzuführenden Einzelschritte. Daher wurde bei den nachfolgenden Untersuchungen das Verfahren der Präzipitation angewendet. Die Aufreinigung wurde daher wie folgt durchgeführt:

100 µL des Extraktes in 1 mL Acetatpuffer pipettieren, mischen;

bei 8928 g für 1 h zentrifugieren;

Überstand dekantieren;

1 mL PBS-Tween20-Puffer zu Pellets pipettieren und auf dem Schüttler bei 420 rpm über Nacht renaturieren.

#### **6.4 Matrixkalibrierung und statistische Auswertung**

Zur Beurteilung von Matrixeinflüssen auf die Kalibrierfunktion des ELISA wurde eine Matrixkalibrierung durchgeführt. Dazu wurden ein Blindwert-Teig und Blindwert-Muffins analog der Herstellung des Casein- und Muffin-Teigs aber ohne Dotierung mit Casein hergestellt (siehe Abschnitt 5.1.1). In den Blindwert-Teig wurden Casein-Teig und Casein-Muffins in unterschiedlichen Mengen eingearbeitet, um Proben mit unterschiedlichen Casein-Gehalten zu simulieren. Diese Proben mussten nicht homogenisiert werden, da die Gesamtansätze gemeinsam extrahiert wurden. Die Gesamteinwaage betrug ca. 0,1 g. Die Extraktion und die Aufreinigung wurden entsprechend den in den Abschnitten 6.2.12 und 6.3.4 beschriebenen Verfahren durchgeführt. Die Kurvenanpassung und die Berechnung des Präzisionsprofils wurden wie die in Abschnitt 6.1.4 beschriebene Grundkalibrierung durchgeführt. Die Ergebnisse sind in den Abbildung 49-Abbildung 52 dargestellt. In den Abbildungen wurden mehr Werte bzw. Punkte dargestellt als in der Grundkalibrierung, da es bei drei Wiederholungen schwierig war, exakt die gleichen Gewichte in die jeweiligen Versuchsansätze einzuwiegen. Die beiden Kurvenanpassungen bei der Matrixkalibrierung sind linear im Gegensatz zu den S-förmigen Kurvenanpassungen bei der Grundkalibrierung. Das bedeutet aber nicht, dass die Kurvenanpassung bei der Matrixkalibrierung wirklich linear ist, denn dieser Bereich umfasst nur einen Teil der Grundkalibrierung. Eine Vergrößerung des Kalibrierbereiches der Matrixkalibrierung war nicht möglich, da die maximale Konzentration für die Versuche nur ca. 1000 mg/kg betrug und die mit Casein dotierte Probe bereits 1000 mg/kg Casein enthielt. Die kleinste Einwaage bei der Analysenwaage betrug 1 mg. Daher konnten 99 mg Blindprobe nur mit 1 mg Casein dotiert werden. Aus diesem Grund wurde die Matrixkalibrierung im Bereich von ca. 10-1000 mg/kg durchgeführt. Das Bestimmtheitsmaß der beiden Kurven der Matrixkalibrierung war beim Casein-Teig kleiner als bei der Grundkalibrierung, da wahrscheinlich eine Wechselwirkung des Caseins mit den Lebensmittelmatrices auftrat. Das Bestimmtheitsmaß war bei den Casein-Muffins noch niedriger als beim Casein-Teig. Der Grund dafür ist, dass während des Backprozesses eine noch stärkere Wechselwirkung zwischen dem Casein und den Lebensmittelmatrices stattgefunden hat. Dennoch sind die beiden Bestimmtheitsmaße noch als „gut“ zu bewerten.

Alle Messwerte im Präzisionsprofil sind <20% und sie liegen damit im Kalibrierbereich. Unter Berücksichtigung der Verdünnung bei der Extraktion wurden die Kalibrierbereiche für den Casein-Teig auf 2-97 mg/kg und für die Casein-Muffins auf 9-926 mg/kg festgelegt. Eigentlich könnten die Kalibrierbereiche noch größer sein, aber auf Grund der erwähnten Probleme bei der Einwaage der Proben waren entsprechende Messungen nicht möglich.

Aus o.g. Grund des Problems mit der Einwaage konnte eine Probe mit einer sehr kleinen Casein-Konzentration nicht hergestellt werden. Daher wurde die Bestimmung der Nachweisgrenze mit Extrakten durchgeführt. Dazu wurden die Extrakte aus den Casein-Teig Proben, den Casein-Muffin Proben und den Blindwert Proben getrennt hergestellt und in unterschiedlichen Verhältnissen miteinander gemischt. Die mittels ELISA ermittelten Casein-Mengen aus den Casein-Teigen und den Casein-Muffins sind in Tabelle 10 dargestellt. Zur Grundkalibrierung siehe Abschnitt 6.1.4. Die Nachweisgrenze des Caseins betrug bei den Casein-Teigen 0,1 mg/kg, bei den Casein-Muffins 1 mg/kg.

Tabelle 10: Mittelwerte und Standardabweichungen der Extinktionen bei verschiedenen Verhältnissen von Casein-Teig und Blindwert-Teig bzw. Casein-Muffin und Blindwert-Muffin

Konzentration[mg/kg]	Casein-Teig		Casein-Muffin	
	Mittelwert	Standardabweichung	Mittelwert	Standardabweichung
1000	3,564	0,024	2,073	0,063
100	2,606	0,068	1,611	0,067
10	1,741	0,053	1,127	0,027
1	1,044	0,027	0,675	0,017
0,1	0,600	0,009	0,517	0,016
0,01	0,495	0,009	0,519	0,004
0,001	0,473	0,011	0,494	0,014
Blindwert	0,445	0,013	0,453	0,020

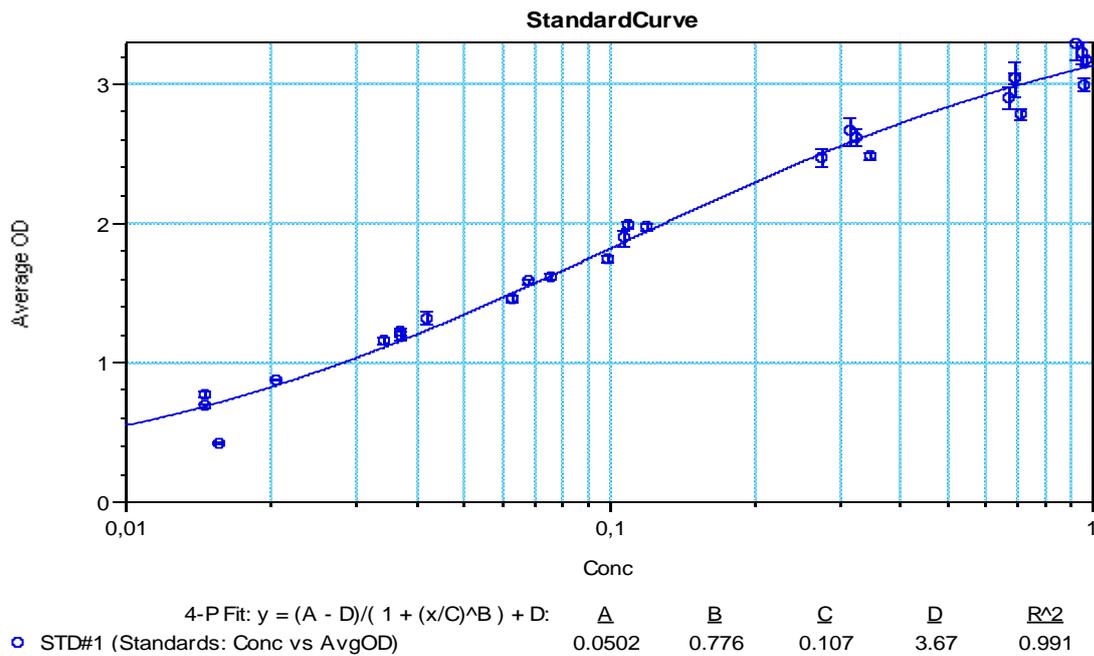


Abbildung 49: Matrixkalibrierung des ELISA für die Detektion des Caseins aus dem Casein-Teig (X-Achse: logarithmischer Auftrag der Konzentrationen (Conc.: Konzentration, mg/L) Y-Achse: Extinktionen (Average OD: Mittelwert des optischen Dichts); Einzelwerte siehe Tabelle 53 im Anhang 8.16)

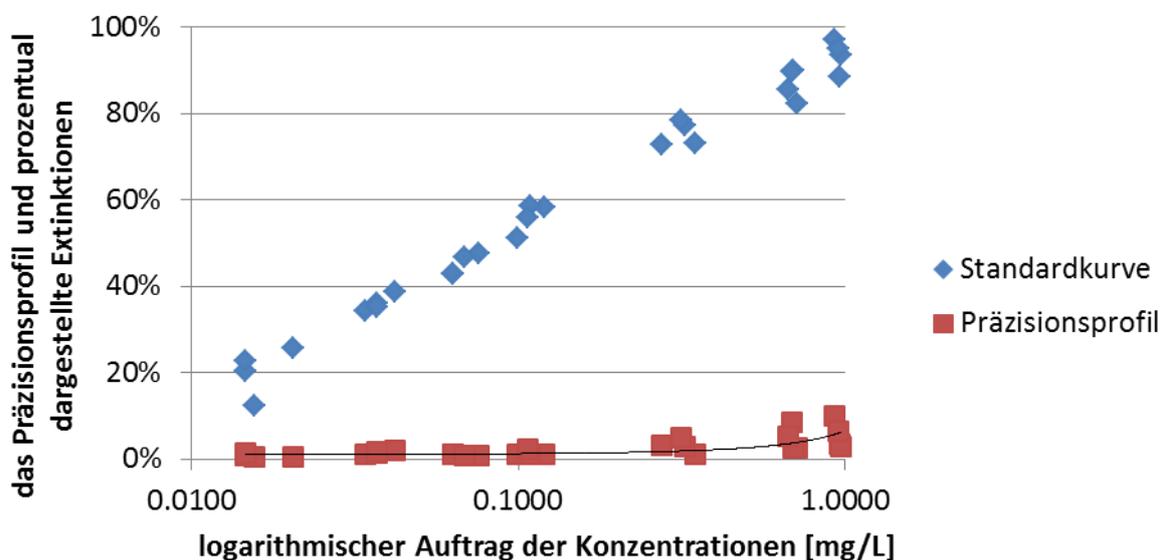


Abbildung 50: Präzisionsprofil der Matrixkalibrierung für die Detektion des Caseins aus dem Casein-Teig (X-Achse: logarithmische Konzentration der Standardlösungen [mg/L]; Y-Achse: das Präzisionsprofil und prozentual dargestellte Extinktionen; Einzelwerte siehe Tabelle 53 im Anhang 8.16)

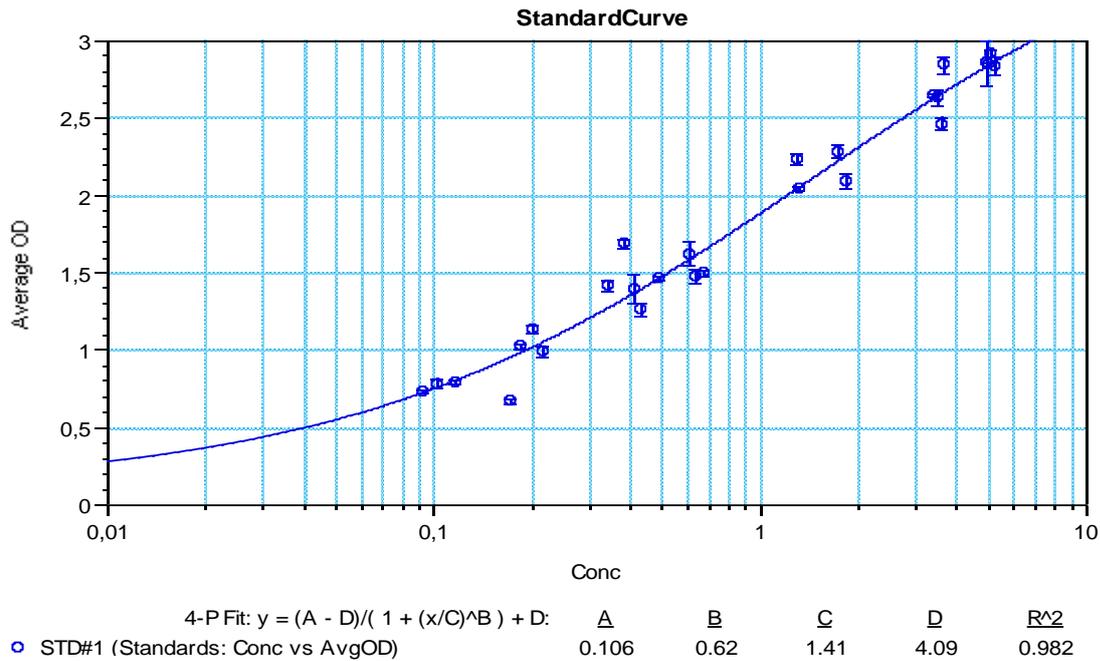


Abbildung 51: Matrixkalibrierung des ELISA für die Detektion des Caseins aus den Casein-Muffins ((X-Achse: logarithmischer Auftrag der Konzentrationen (Conc.: Konzentration, mg/L) Y-Achse: Extinktionen (Average OD: Mittelwert des optischen Dichte); Einzelwerte siehe Tabelle 54 im Anhang 8.16)

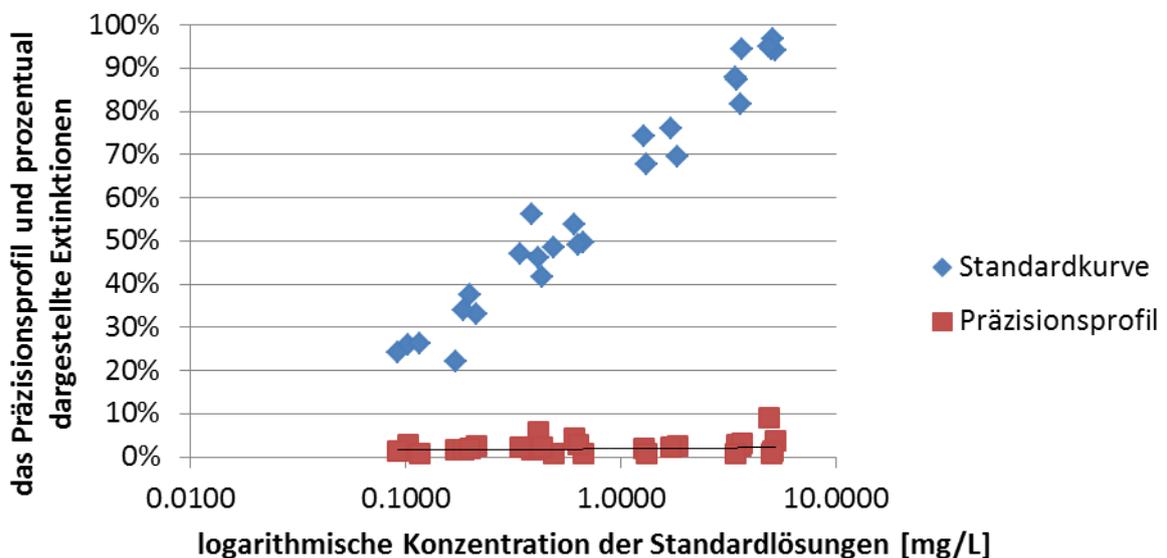


Abbildung 52: Präzisionsprofil der Matrixkalibrierung für die Detektion des Caseins aus Casein-Muffins (X-Achse: logarithmische Konzentration der Standardlösungen [mg/L]; Y-Achse: das Präzisionsprofil und prozentual dargestellte Extinktionen; Einzelwerte siehe Tabelle 54 im Anhang 8.16)

Des Weiteren wurden Untersuchungen zur Vergleichbarkeit von Ergebnissen mehrerer Versuchsansätze mit denselben Methoden durchgeführt (Walser, 2011). Dazu wurden Casein-Teige und Casein-Muffins entsprechend den Ausführungen in den Abschnitten 6.2.12 und 6.3.4 mit 10000 mg/kg, 100 mg/kg und 10 mg/kg Casein hergestellt. Die Versuche wurden 12mal wiederholt. Die Proben, deren Ergebnisse miteinander verglichen wurden, wurden auf einer ELISA-Platte vermessen, da sonst die Ergebnisse nicht gut vergleichbar gewesen wären (Weber et al., 2007). Die Ergebnisse mit Hilfe des ELISA wurden von Parametern wie Inkubationszeit, Inkubationstemperatur, Färbezeit usw beeinflusst. Es war daher faktisch unmöglich, die Platten bei allen durchgeführten Versuchen gleich zu bearbeiten. Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe sind in Tabelle 11 dargestellt.

Tabelle 11: Zusammenfassung der Ergebnisse mehrerer Versuchsansätze mit derselben Methode

Konzentration	Wiederfindung aus Casein-Teig			Wiederfindung aus Casein-Muffin		
	1000 mg/kg	100 mg/kg	10 mg/kg	1000 mg/kg	100 mg/kg	10 mg/kg
Replikate	80,3%	69,3%	54,8%	10,6%	7,4%	2,7%
	73,7%	65,1%	49,5%	9,9%	8,8%	4,9%
	78,9%	57,4%	64,9%	12,6%	9,6%	5,9%
	79,5%	57,8%	47,0%	13,7%	10,5%	5,9%
	72,2%	49,2%	53,6%	10,3%	7,8%	4,4%
	81,2%	61,3%	49,4%	9,3%	11,1%	3,5%
	77,4%	78,0%	52,9%	11,7%	11,0%	5,0%
	73,3%	65,3%	57,2%	10,6%	7,9%	4,5%
	74,9%	73,2%	55,5%	10,0%	7,0%	4,8%
	80,0%	65,6%	49,7%	8,6%	10,0%	3,3%
	71,6%	67,6%	55,2%	9,0%	8,3%	6,4%
	71,1%	71,9%	57,7%	11,6%	9,3%	5,4%
Mittelwert	76,2%	65,1%	53,9%	10,6%	9,0%	4,7%
Standard-abweichung	3,8%	7,9%	4,9%	1,5%	1,4%	1,1%

\*Werte wurde aufgrund der begrenzten Genauigkeit gerundet.

Die Wiederfindung des Caseins aus den Casein-Teigen betrug bei einer Dotierung mit 1000 mg/kg 76,2%, dies ist bei einer biochemischen Methode noch akzeptabel. Jedoch sank die Wiederfindung mit Abnahme der Dotierung. Der Grund ist, dass die Matrixeffekte nicht gleichmäßig mit der Dotierung abgenommen haben. Außerdem konnten die Extrakte mit

den niedrigeren Casein-Gehalten nicht so gut wie diejenigen mit den höheren Casein-Gehalten verdünnt werden. Damit wurde das ELISA-System durch die Matrices, die durch die Aufreinigung nicht vollständig entfernt werden konnten, stärker beeinflusst. Die Standardabweichungen der Ergebnisse innerhalb einer ELISA-Platte betragen 3,8%-5,9%, so dass die Ergebnisse auf einer Platte als reproduzierbar gelten.

Die Wiederfindungen betragen bei den Casein-Muffins nur 4,7%-10,6%. Im Vergleich zu den Casein-Teigen sind diese Wiederfindungen niedrig. Der Grund dafür ist, dass Casein-Muffins bei 200 °C für 20 min gebacken wurden. Dadurch wurde das Casein größtenteils abgebaut bzw. denaturiert oder es reagierte mit der Matrix.

In weiteren Versuchen wurde die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse ermittelt, wenn das Casein von Tag 1 bis Tag 12 aus den Versuchsansätzen extrahiert wurde. Dazu wurden die Casein-Teige und die Casein-Muffins jeweils mit 1000 mg/kg Casein dotiert. Das Casein wurde 12mal extrahiert und auf 12 ELISA-Platten aufgetragen und quantifiziert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 12 dargestellt.

Tabelle 12: Zusammenfassung der Ergebnisse bei Extraktion des Caseins an mehreren Tagen und Quantifizierung mit unterschiedlichen ELISA-Platten

	Wiederfindung aus Casein-Teig	Wiederfindung aus Casein-Muffin
Tag 1	70,4±7,4%	13,4±1,3%
Tag 2	78,7±4,1%	13,4±0,5%
Tag 3	70,6±5,9%	10,6±0,7%
Tag 4	61,7±8,5%	14,5±0,6%
Tag 5	73,5±6,8%	9,8±0,6%
Tag 6	64,0±7,1%	8,9±0,9%
Tag 7	61,7±7,8%	13,3±1,2%
Tag 8	67,6±8,4%	11,3±0,9%
Tag 9	90,0±5,2%	13,9±0,7%
Tag 10	91,5±6,0%	7,9±0,8%
Tag 11	69,9±5,8%	10,5±0,9%
Tag 12	86,4±9,3%	14,0±0,7%
Mittelwert	73,8%	11,8%
Standardabweichung	10,5%	2,2%

\*Werte wurde aufgrund der begrenzten Genauigkeit gerundet.

Die Wiederfindungen und die Standardabweichungen betragen bei diesem Test 73,8% ± 10,5% für die Casein-Teige und 11,8% ± 2,2% für die Casein-Muffins. Damit sind die

Wiederfindungen der beiden zuletzt genannten Versuchsreihen gut miteinander vergleichbar, die Standardabweichungen haben sich jedoch verdoppelt. Der Grund wurde oben bereits diskutiert, die Ergebnisse bei Verwendung mehrerer ELISA-Platten sind miteinander nur eingeschränkt vergleichbar. Trotz der Nachteile beim Einsatz von ELISA-Platten wurde diese Methode noch als akzeptierbar betrachtet.

## **6.5 Untersuchungen zur Temperaturstabilität des Caseins**

Wie in Abschnitt 6.4 gezeigt wurde, war die Wiederfindung von Casein aus den Casein-Muffins wegen der geringen Temperaturstabilität der Proteine sehr gering (Ehn et al., 2004; Taheri-Kafrani et al., 2009; Morisawa et al., 2009). Aufgrund dieser Literaturzitate wurde hier die Temperaturstabilität des Caseins überprüft. Es wurde versucht, ein Matrixmodell analog dem Casein-Teig zu entwickeln, wobei aber darauf geachtet wurde, dass das Casein nicht mit der Matrix reagierte. Das wurde erreicht, indem 10 mL 10 g/L Casein mit 100 g handelsüblichem Sand vermischt wurden. Der Sand wurde vorher mit dem zehnfachen Volumen dest. Wasser und mit Ethanol gewaschen und anschließend im Trockenschrank getrocknet. Anschließend wurde der Sand von Hand homogenisiert und die Restflüssigkeit mittels Gefriertrockner entfernt. Somit betrug der theoretische Casein-Gehalt im Sand 1000 mg/kg.

Der mit Casein dotierte Sand wurde in drei Teile geteilt. Der erste Teil wurde bei 100 °C im Wasserbad 20 min erhitzt. Der zweite Teil wurde bei 180°C im Trockenschrank 12 min erhitzt. Der dritte Teil wurde nicht erhitzt. Die Versuche wurden jeweils dreimal wiederholt und analog den Versuchen mit den Casein-Teigen und den Casein-Muffins extrahiert, aufgereinigt und quantifiziert. Der Sand wurde ohne Dotierung mit Casein parallel wie beschrieben aufgearbeitet und detektiert.

Die Wiederfindung von Casein in dem nicht erhitzten mit Casein dotierten Sand betrug  $89,8\% \pm 0,7\%$ . Damit wurde bestätigt, dass die entwickelte Methode für die Detektion des Caseins genau und zuverlässig ist. Die Wiederfindung von Casein bei den Versuchen im Wasserbad betrug  $35,9\% \pm 1,6\%$ . Dieses Ergebnis ist ein Hinweis auf die geringe Temperaturstabilität des Caseins. Die Wiederfindung von Casein bei den Versuchen im Trockenschrank betrug nur  $5,2\% \pm 0,5\%$  und sie war damit noch schlechter als die Wiederfindung von Casein bei den bei 200 °C für 20 min gebackenen Casein-Muffins. Die

Erklärung ist, dass die Kerntemperatur in den Casein-Muffins niedriger ist als an den Oberflächen, daher wurde in diesen weniger Casein abgebaut als bei den Versuchen im Trockenschrank.

Damit konnte eindeutig gezeigt werden, dass Casein nicht temperaturstabil ist. Casein wird durch Erhitzung verändert, wobei auch die Epitope verändert werden, so dass sie nicht mehr durch caseinspezifische Antikörper erkannt werden.

## 6.6 Applikation der Methode bei anderen Muffin-Matrices

Um typische in der Praxis verwendete Muffin-Matrices zu simulieren, wurden Matrices aus Eier-, Schokoladen- und Haselnuss-Muffins hergestellt. Die Muffin-Teige, die entsprechend der im Anhang 8.12 angegebenen Rezepte hergestellt wurden, wurden jeweils mit 1000 mg/kg Casein dotiert. Die Homogenisierung, die Teig- und Muffin-Herstellung und die Gefriertrocknung wurden wie in Abschnitt 5.1.1 beschrieben, durchgeführt. Die Extraktion des Caseins sowie dessen Quantifizierung erfolgte wie bei den Casein-Teigen und den Casein-Muffins. Die Versuche wurden jeweils dreimal wiederholt. Die Mittelwerte mit Standardabweichungen der Casein-Wiederfindungen sind in Tabelle 13 dargestellt.

Tabelle 13: Wiederfindungen des Caseins aus verschiedenen Muffin-Matrices

	Teig	Muffin
Eier-Muffin	86,6 ± 5,7 %	32,3 ± 4,4 %
Schokolade-Muffin	13,4 ± 0,7 %	0,8 ± 0,1 %
Haselnuss-Muffin	71,4 ± 5,0 %	16,4 ± 2,2 %
Muffin nach Abschnitt 5.1.1 hergestellt	76,2 ± 3,8 %	10,6 ± 1,5 %

\*Werte wurde aufgrund der begrenzten Genauigkeit gerundet.

Die Casein-Wiederfindungen bei den Eier- und Haselnuss-Muffin Teigen waren vergleichbar mit denjenigen der Muffins aus Casein-Teigen. Die Casein-Wiederfindungen aus den Schokoladen-Muffin Teigen war jedoch sehr niedrig. Die Protein Pellets waren nach der Fällung am IEP noch braun gefärbt, was als Hinweis interpretiert wurde, dass die Kakao-Bestandteile nur unvollständig entfernt wurden. Kakao enthält Polyphenole, die die Antikörper-Antigen-Reaktion beim ELISA beeinflussen können (Poms et al., 2005). Daher konnte die entwickelte Methode nicht bei den Schokolade-Muffins angewendet werden.

Die Wiederfindung bei den Eier-Muffins war ca. dreimal besser als bei den Casein-Muffins. Diese Verbesserung war ausschließlich auf die Zugabe von Eipulver zur Matrix erklärbar. Des Weiteren wurde auch die Wiederfindung der Haselnuss-Muffins gegenüber den Casein-Muffins deutlich verbessert. Dies ist auch auf die Zugabe von 2,5 g Eipulver zum Teig verständlich. Vermutlich traten konkurrierende Wechselwirkungen des Eiproteins und des Caseins mit den Matrices während des Backens auf, so dass weniger Casein als bei den Versuchen ohne Zugabe von Eiprotein verändert wurde. Außerdem könnten die Eilecithine, die sich im Eigelb befinden, in den Matrices enthaltene Fette aufschließen und damit Casein freisetzen.

Um die positive Wirkung der Eier auf die Casein-Wiederfindungen zu überprüfen, wurden zusätzliche Versuche durchgeführt. Die Casein- bzw. die Muffin-Teige, die aus 5 g Backpulver, 150 g Weizenmehl Type 405, 80 g Zucker und 40 g Palmöl hergestellt wurden, wurden vor dem Backen mit 1%, 5% und 10% Eipulver dotiert. Die Teige enthielten theoretisch 1000 mg/kg Casein. Zusätzlich wurden Versuche mit Zugabe von 10% Eiklarpulver bzw. 10% Eigelbpulver zu den Teigen durchgeführt, damit untersucht werden konnte, ob die Eiproteine oder die Eilecithine die Hauptrolle bei den Casein-Wiederfindungen spielten. Die Ergebnisse sind in Abbildung 53 dargestellt.

Da die Teige bzw. die Muffins ohne Dotierung mit Eiern denjenigen der Casein-Teige und Casein-Muffins vergleichbar waren, sollten die Casein-Wiederfindungen auch ähnlich sein. Die Wiederfindungen bei den Muffins waren in der Tat vergleichbar, diejenigen im Teig waren jedoch niedriger. Die schlechtere Wiederfindung war wahrscheinlich auf die Streuung des ELISA bei Verwendung unterschiedlicher Platten zurückzuführen. Die Casein-Wiederfindungen in den mit Ei und Eiklar dotierten Teigen war im Vergleich zu den Teigen ohne Eiprodukte besser. Damit wurde bestätigt, dass die Zugabe von Eiern bei der Herstellung der Teige einen schützenden Effekt auf das Casein in Bezug auf Wechselwirkungen mit der Matrix ausübt. Der genaue Mechanismus ist allerdings unklar. Wahrscheinlich wurden die Eiproteine kompetitiv zu Casein an die Lebensmittelmatrix adsorbiert, was bedeutet, dass weniger Casein an die Lebensmittelmatrix gebunden wurde und somit mehr Casein quantitativ bestimmt werden konnte.

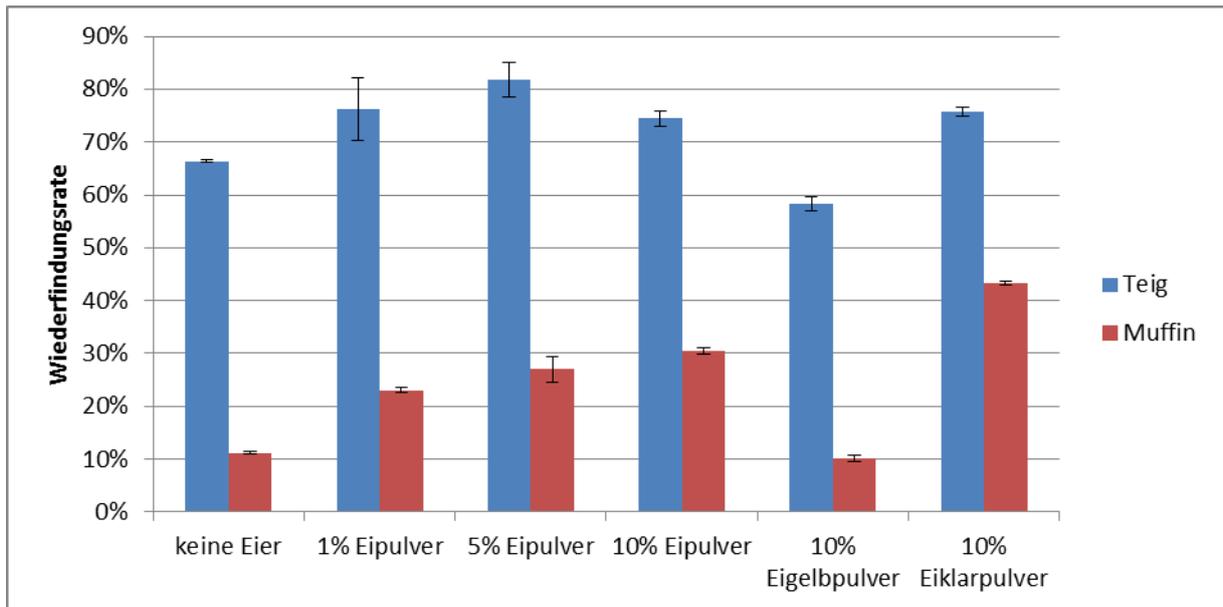


Abbildung 53: Casein-Wiederfindungen in Eier-Muffins mit unterschiedlichem Eierzusatz (X-Achse: Dotierung der Teige mit Eiern bzw. Eiprodukten vor dem Backen; Y-Achse: Casein-Wiederfindung bezogen auf dessen theoretischen Gehalt; Einzelwerte siehe Tabelle 55 im Anhang 8.16)

Es stiegen auch die Casein-Wiederfindungen aus den Muffins bei höherer Zugabe von Eiern an. Damit wurde die Schutzwirkung der Eier auch beim Backprozess nachgewiesen. Die Wiederfindungen bei Zugabe von Eigelb waren allerdings vergleichbar denjenigen ohne Zugabe von Eiern. Allerdings waren die Wiederfindungen bei Zugabe von Eiklar viermal so hoch wie ohne Zugabe von Eiern. Das bedeutet, dass offensichtlich die Eiroteine den Schutz des Caseins bewirkten und nicht die im Eigelb enthaltenen Substanzen.

### 6.7 Einfluss von Zutaten und physikalischen Parametern während des Backprozesses auf die Wiederfindung von Casein

Während des Backprozesses reagiert das Casein mit der jeweiligen Lebensmittelmatrix oder es wird thermisch verändert. Diese Prozesse hängen sehr stark von der Erhitzungsintensität ab, also der Temperatur und der Zeitdauer der Erhitzung (Paschke und Besler, 2002). Die chemischen Reaktionen des Caseins mit der Lebensmittelmatrix hängen auch sehr stark von deren Bestandteilen ab (Thomas et al., 2007). Bekannt ist die Maillard-Reaktion von Proteinen mit reduzierenden Zuckern. In diesem Kapitel wurde die Beziehung zwischen

Casein-Gehalt, Matrix-Zutaten, Backzeit und Backtemperatur zur Wiederfindung des Proteins untersucht.

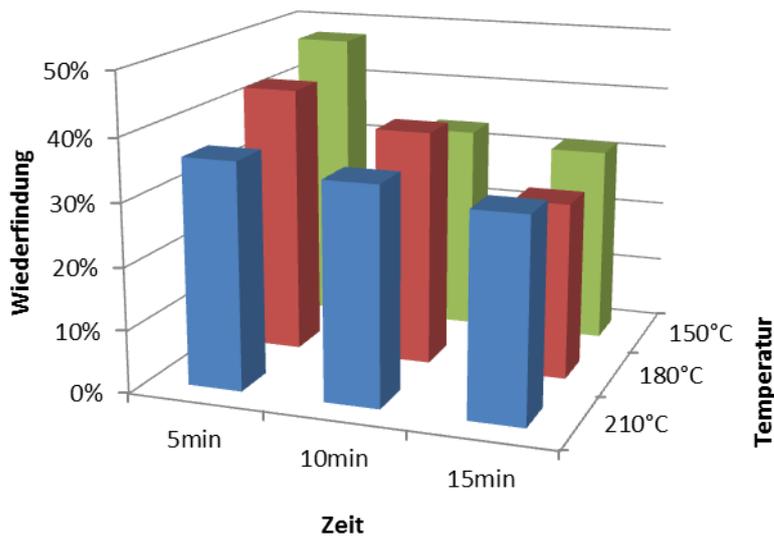


Abbildung 54: Casein-Wiederfindungen bei unterschiedlichen Backzeiten und Backtemperaturen (X-Achse: Backzeit; Y-Achse: Casein-Wiederfindungen bezogen auf den theoretischen Gehalt; Z-Achse: Backtemperatur; Einzeldaten siehe Tabelle 56 im Anhang 8.16)

Es wurden als Modell-Lebensmittel Casein-Teige und Casein-Muffins hergestellt, die mit 1000 mg/kg Casein dotiert wurden. Das Rezept dieser Modell-Lebensmittel befindet sich im Anhang 8.13. Die Teige wurden bei 150-210 °C für 5-15 min gebacken. Die Casein-Gehalte in den Muffins wurden bestimmt und in Abbildung 54 dargestellt.

Tendenziell nahm die Wiederfindung mit Zunahme der Backzeit ab. Die Abnahme war bei den niedrigeren Backtemperaturen stärker als bei der Backtemperatur 210 °C. Eine mögliche Erklärung dieses Ergebnisses ist, dass der Kern der Muffins bei den niedrigeren Backtemperaturen noch nass und damit die Kerntemperatur relativ niedrig war. Bei 210 °C Backtemperatur waren die Muffins bereits nach fünf Minuten durcherhitzt, so dass die Wiederfindungen nach fünf bzw. 15 min ähnlich waren.

Die Abnahme der Casein-Wiederfindung konnte nur während der ersten fünf min Backzeit beobachtet werden. Die Wiederfindungen bei zehn und 15 min Backzeit waren vergleichbar. Das bedeutet, dass die Muffins nach zehn min Backzeit durcherhitzt waren. Das Casein

reagierte daher nach zehn min Backzeit bei allen drei Backtemperaturen mit der Matrix ähnlich.

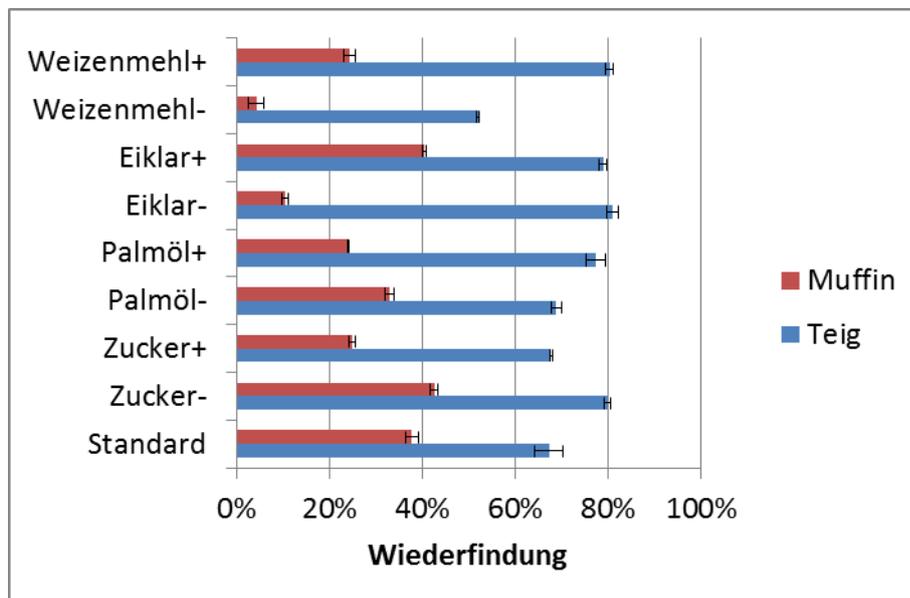


Abbildung 55: Casein-Wiederfindungen in Abhängigkeit der An- bzw. Abwesenheit einzelner Teig-Inhaltsstoffe (X-Achse: Casein-Wiederfindungen bezogen auf dessen theoretischen Gehalt; Y-Achse: Symbole „+“ und „-“, bedeuten die Verdoppelung bzw. das Weglassen des jeweiligen Inhaltsstoffes in den Teigen; Einzeldaten siehe Tabelle 57 im Anhang 8.16)

In einem weiteren Versuch wurden die Casein-Wiederfindungen in Abhängigkeit zu den Inhaltsstoffen der Casein-Teige untersucht. Vom Standard-Teig wurden entweder das Weizenmehl, das Eiklar, das Palmöl bzw. der Zucker weggelassen. Die Ergebnisse dieses Versuches sind in Abbildung 55 dargestellt.

Die Casein-Wiederfindungen in den Teigen ohne Zugabe von Weizenmehl waren sehr niedrig. Alle anderen Casein-Wiederfindungen in den Teigen waren ähnlich. Die kleinen Schwankungen waren statistisch nicht gesichert.

Die Casein-Wiederfindungen in den Muffins betragen ca. 38%, das sind Werte, die zwischen denjenigen ohne Zucker und mit doppelter Zuckerzugabe lagen. Dieses Ergebnis ist ein Hinweis, dass Casein teilweise mit Zucker in einer Maillard-Reaktion reagiert. Bei hohem Zuckergehalt ist daher die Casein-Wiederfindung erniedrigt. In diesem Versuch wurde wiederum bestätigt, dass das Eiklar den Verlust von Casein reduziert. Die Casein-Wiederfindungen bei An- bzw. Abwesenheit von Palmöl unterschieden sich nur unwesentlich.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Anwesenheit von Zucker die Wiederfindung des Caseins negativ, diejenige von Eiklar positiv beeinflusst.

## 6.8 Entwicklung eines direkten Sandwich-ELISA für die quantitative Bestimmung von Erdnussprotein

### 6.8.1 Optimierung der Antikörper-Konzentration

Das ELISA-System für die Detektion von Erdnuss besteht aus dem Einfang-Antikörper (polyklonal, Wirtstier: Ziege, Vektor Laboratories, USA) und dem biotinylierten Detektions-Antikörper (1 mg/mL, polyklonal, Wirtstier: Ziege, Vector Laboratories, USA). Das an den Detektions-Antikörper gebundene Biotin reagiert weiter mit Avidin-HRP (Bio-Rad Laboratories, USA), wodurch dieser Komplex mit TMB angefärbt werden kann. Entsprechend den Empfehlungen des Herstellers der Antikörper wurden die Verdünnungen 1:1000, 1:5000, 1:10000 und 1:15000 getestet. Für das Avidin-HRP wurde keine Verdünnung empfohlen, daher wurde das Avidin-HRP mit der gleichen Verdünnungsreihe getestet. Der Test wurde wie in Tabelle 14 beschrieben durchgeführt. Das durch die Software „SoftMax Pro“ ermittelte Bestimmtheitsmaß wurde in Tabelle 14 dargestellt.

Tabelle 14: Bestimmtheitsmaß bei unterschiedlichen Konzentrationen des Antikörpers

	Verdünnung			
	1:1000	1:5000	1:10000	1:15000
Einfang-Antikörper	0,998	0,993	0,986	0,983
Detektions-Antikörper	0,991	0,992	0,993	0,989
Avidin-HRP	0,999	0,998	1	0,999

Es konnte gezeigt werden, dass die Bestimmtheitsmasse bei hoher Antikörper-Konzentration besser waren als bei niedriger Antikörper-Konzentration. Der Einfang-Antikörper besaß ab einer Verdünnung von 1:10000 bzw. 1:15000 mit 0,986 bzw. 0,983 kein besonders gutes, für biochemische Versuche allerdings auch kein schlechtes Bestimmtheitsmaß. Das Bestimmtheitsmaß beim Avidin-HRP war bei allen Verdünnungen sehr gut. Mit Rücksicht auf den Chemikalienverbrauch wurde beim Avidin-HRP, beim Einfang- und beim Detektions-Antikörper die Verdünnung 1:5000 eingesetzt.

## 6.8.2 Optimierung der Inkubationszeit

Die Optimierung der Inkubationszeit für die Detektion der Erdnuss wurde wie in Abschnitt 5.1.2 beschrieben durchgeführt. Dazu wurden die Antikörper und das Avidin-HRP 1:5000 mit PBS-Tween20-Puffer (siehe Abschnitt 8.6.1) verdünnt. Ein Erdnussextrakt aus 0,1 g gerösteten Erdnüssen (siehe Abschnitt 5.1.2) wurde mit 1 mL PBS-Tween20-Puffer (siehe Abschnitt 8.6.1) hergestellt. Nach der Proteinbestimmung nach Lowry wurde die Lösung auf 50 mg/L Erdnussprotein-Konzentration eingestellt. Die Inkubationszeiten wurden wie in Tabelle 15 optimiert. Es wurde immer nur eine Inkubationszeit bei einem Versuch variiert, daher betragen die noch nicht betrachteten Inkubationszeiten 120 min für die Standardlösung, den Detektions-Antikörper und das Avidin-HRP und die ganze Nacht für den Einfang-Antikörper.

Die Ergebnisse waren ähnlich denjenigen, die bei der Optimierung der Inkubationszeit für die Detektion des Caseins erzielt wurden. Die Extinktionen bei einer niedrigen Inkubationszeit waren niedrig und sie zeigten eine große Streuung. Daher wurde der Einfang-Antikörper über Nacht, der Detektions-Antikörper sowie der Standard bzw. die Probe für 1 h inkubiert. Avidin zeigte eine sehr hohe Affinität zu Biotin, so dass das Avidin-HRP in 30 min vollständig mit dem biotinylierten Detektions-Antikörper reagierte. Die Inkubationszeit für das Avidin-HRP konnte daher auf 30 min gekürzt werden.

Tabelle 15: Optimierung der Inkubationszeit für die Detektion der Erdnuss

	IZ*	Ext.**	Cv***		IZ	Ext.	Cv
Einfang-Antikörper	2 h	1,132	11,2%	Detektion-Antikörper	10 min	1,632	6,3%
	4 h	1,469	6,9%		30 min	1,948	5,0%
	16 h	2,100	4,9%		60 min	1,912	2,8%
	24 h	2,126	2,2%		120 min	2,008	3,9%
Standard	10 min	1,432	8,8%	Avidin-HRP	10 min	1,877	9,6%
	30 min	1,986	3,2%		30 min	2,014	5,6%
	60 min	2,231	4,9%		60 min	2,059	4,1%
	120 min	2,311	4,2%		120 min	2,104	4,0%

\*IZ: Inkubationszeit;

\*\* Ext.: Extinktion;

\*\*\*Cv: Variationskoeffizient

### 6.8.3 Optimierung des Blockreagenz

Beim klassischen ELISA wurde Magermilchpulver als Blockreagenz verwendet (Hefle et al., 1994; Kiening et al., 2005; Koch et al., 2010). Daher wurde auch in diesen Versuchen eine 5%ige Lösung von Magermilchpulver im PBS-Tween20-Puffer (Herstellung siehe Abschnitt 8.6.1) getestet.

Zuerst wurde die Kreuzreaktivität zwischen Anti-Erdnuss-Antikörper und Magermilch geprüft. Die 5%ige Magermilch-Lösung wurde an Stelle des Standards auf die ELISA-Platte aufgetragen und detektiert. Der PBS-Tween20-Puffer wurde als Vergleich analog detektiert. Die Versuche wurden dreimal wiederholt. Der Extinktionen waren  $0,213 \pm 0,011$  und  $0,190 \pm 0,008$ .

Des Weiteren wurden 12,5 mg/kg, 25 mg/kg und 50 mg/kg Erdnuss-Lösungen aus einem in Abschnitt 6.8.2 beschriebenen Erdnuss-Extrakt in einer mit der oben beschriebenen Magermilchpulver-Lösung blockierten ELISA-Platte quantitativ bestimmt. Der Versuch wurde 9mal wiederholt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 16 dargestellt.

Tabelle 16: Wiederfindungen von Erdnussprotein bei Einsatz unterschiedlicher Blockreagenzien

Blockreagenz	Magermilch			PBS-Tween20-Puffer			
	Konzentration	50 mg/kg	25 mg/kg	12,5 mg/kg	50 mg/kg	25 mg/kg	12,5 mg/kg
Replikate		95,2%	83,9%	92,6%	66,7%	87,6%	90,5%
		93,6%	90,3%	90,9%	75,3%	90,0%	88,0%
		98,7%	90,3%	92,9%	68,3%	84,2%	86,3%
		100,5%	87,1%	94,4%	66,8%	85,6%	94,3%
		97,7%	91,8%	93,1%	65,7%	86,4%	90,1%
		98,9%	95,5%	94,5%	74,2%	89,7%	88,4%
		100,9%	92,0%	92,0%	74,8%	84,0%	85,1%
		93,2%	88,6%	93,5%	71,4%	86,9%	92,6%
		93,8%	95,0%	91,6%	76,0%	87,3%	82,0%
Mittelwert	97,0%	90,5%	92,8%	71,0%	86,8%	88,6%	
Standardabweichung	3,0%	3,7%	1,2%	4,2%	2,1%	3,8%	

\*Werte wurde aufgrund der begrenzten Genauigkeit gerundet.

Wie bei der Bestimmung von Casein stiegen auch bei diesen Versuchen die Wiederfindungen mit der Verdünnung an. In der mit PBS-Tween20-Puffer blockierten Platte betrug die Wiederfindung von 50 mg/kg Erdnuss-Extrakt ca. 70%, während die Wiederfindung von 12,5

mg/kg Erdnuss-Extrakt, welcher durch vierfache Verdünnung aus dem 50 mg/kg Erdnuss-Extrakt gewonnen wurde, sich auf knapp 90% erhöhte. Dieses Ergebnis könnte auf die nicht vollständig blockierte ELISA-Platte zurückzuführen sein. Nach der vollständigen Blockierung der ELISA-Platte mit Magermilch-Lösung wurden ähnliche Wiederfindungen bei unterschiedlichen Verdünnungen gefunden. Die Wiederfindungen von 90,5% bis 97,0% waren gut.

Die Vorschrift zur Durchführung der Versuche mit Erdnuss-Extrakt ist im Anhang 8.9.3 beschrieben. Die weiteren Versuche wurden entsprechend dieser Vorschrift durchgeführt.

#### **6.8.4 Grundkalibrierung**

Um die entwickelte Methode zu validieren, wurde eine Grundkalibrierung durchgeführt. Es wurden vier Serien von Erdnussprotein-Lösungen hergestellt, welche aus gerösteten Erdnüssen mit PBS-Tween20-Puffer (siehe Abschnitt 8.6.1) extrahiert wurden, nach Proteinbestimmung nach Lowry auf 2000, 600, 180, 54, 16,2, 4,86, 1,46 mg/L Protein eingestellt. Die Bestimmung des Erdnussproteins wurde nach der im Anhang 8.9.3 beschriebenen Methode durchgeführt. Die vier Kalibrierungskurven werden in einem Diagramm dargestellt und ihre Parameter mittels Software „SoftMax Pro“ automatisch ermittelt (siehe Abbildung 56) .

Der sigmoidale Kurvenverlauf wurde, wie in Abschnitt 6.1.4 beschrieben, mittels der Software „SoftMax Pro“ automatisch ermittelt. Da das Bestimmtheitsmaß 0,999 betrug, stimmten die vier Kalibrierreihen vollständig überein.

Wie bei der Etablierung der Methode für die Detektion des Caseins besprochen, wurde der Kalibrierungsbereich mittels des Präzisionsprofils ermittelt. Es wurde der Schwellenwert des Präzisionsprofils 20% eingesetzt. Damit wurde die obere und die untere Grenze des Kalibrierungsbereiches mit Hilfe der Schnittpunkte des Präzisionsprofils berechnet. Das Präzisionsprofil ist in Abbildung 57 dargestellt. Der Kalibrierungsbereich liegt zwischen 16 und 282 mg/L Erdnussprotein.

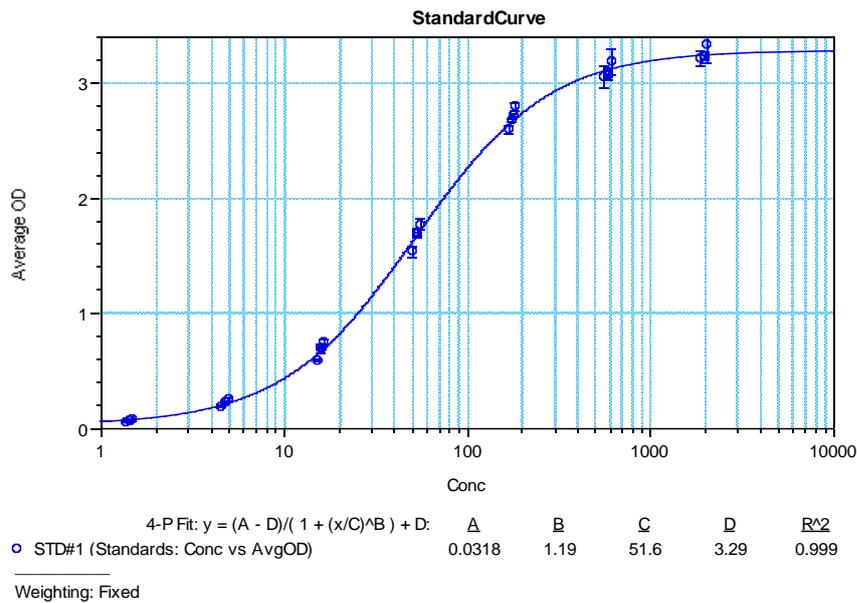


Abbildung 56: Grundkalibrierung für die Detektion des Erdnussproteins (X-Achse: logarithmischer Auftrag der Konzentrationen (Conc.: Konzentration, mg/L) Y-Achse: Extinktionen (Average OD: Mittelwert des optischen Dichte); Einzelwerte siehe Tabelle 58 im Anhang 8.1.6)

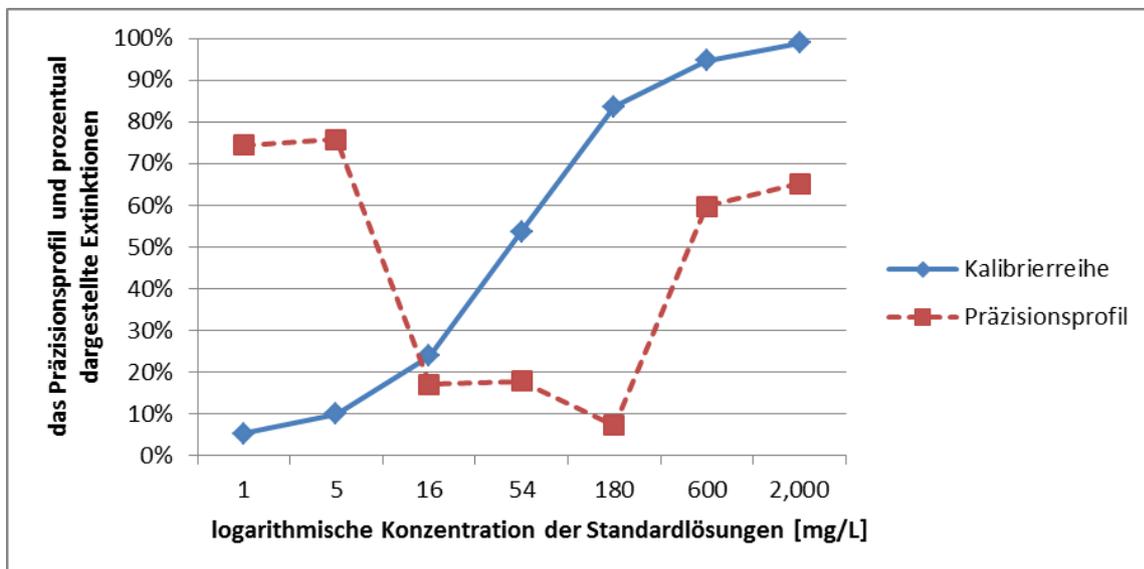


Abbildung 57: Präzisionsprofil der Grundkalibrierung für die Detektion des Erdnussproteins (X-Achse: logarithmische Konzentrationen der Standardlösungen [mg/L]; Y-Achse: Das Präzisionsprofil und prozentual dargestellte Extinktionen; Einzelwerte siehe Tabelle 58 im Anhang 8.16)

Um die Nachweisgrenze von Erdnussprotein zu ermitteln, wurde eine Erdnussprotein-Lösung von 1000 mg/kg stufenweise mit PBS-Tween20-Puffer im Verhältnis 1:5 verdünnt. Die Konzentrationen von Erdnussprotein und die ermittelten Extinktionen sind in ~~错误!书签自引用无效~~ dargestellt. Die Nachweisgrenze von Erdnussprotein wurde wie im Abschnitt 6.1.4 berechnet und sie beträgt 1,6 mg/kg. Diese Nachweisgrenze ist vergleichbar mit den kommerziellen Kits RIDASCREEN®FAST Peanut (r-Biopharm, Deutschland, 2013).

Tabelle 17: Mittelwerte und Standardabweichungen der Extinktionen von Erdnussprotein

Konzentration [mg/kg]	Mittelwert	Standardabweichung
1000	3,669	0,160
200	3,401	0,059
40	2,039	0,037
8	0,736	0,024
1,6	0,310	0,020
0,32	0,210	0,010
0,064	0,195	0,015
Blindwert	0,192	0,016

## 6.9 Entwicklung einer Extraktionsmethode für Erdnussprotein aus gerösteten Erdnüssen

### 6.9.1 Test von Puffersystemen aus der Literatur

Bei der Etablierung der ELISA-Methode wurden die gerösteten Erdnüsse mit dem PBS-Tween20-Puffer (siehe Abschnitt 8.6.1) extrahiert, da dieser Puffer als Inkubationspuffer bei Durchführung des ELISA nicht entfernt werden musste. Leider betrug die Wiederfindung des Proteins nach Lowry bei Verwendung dieses Puffers nur  $7,8\% \pm 0,5\%$ . Diese Wiederfindung ist wesentlich niedriger als die in der Literatur berichtete von 23,8% bis 26,7% (Souci et al., 2000), wobei die Extraktion mit 32 Puffern durchgeführt wurde. Die in der Literatur verwendeten Puffer, die im Anhang 8.10.1 beschrieben sind, wurden in unsere Untersuchungen einbezogen. Um zu überprüfen, inwieweit die Erdnussproteine während der Röstung abgebaut wurden, wurde der Proteingehalt nach Kjeldahl der rohen und der gerösteten Erdnüsse ermittelt. Die Versuchsbeschreibung befindet sich im Anhang 8.15. Der Nachteil der Proteinbestimmung nach Lowry ist, dass mit dieser Methode nur die extrahierbaren Proteine erfasst werden, während bei der Methode nach Kjeldahl alle Proteine, also auch die unlöslichen, erfasst werden. Der Unterschied zwischen beiden

Methoden liegt in den zugrundeliegenden chemischen Reaktionen. Das Prinzip der Bestimmung nach Lowry beruht auf der Farbreaktion zwischen aromatischen Aminosäuren, Kupferionen und dem Folin-Ciocalteu-Reagenz. Auf der Basis von BSA als Standard wird dann der Proteingehalt der Proben berechnet. Nach der Kjeldahl Methode wird der Stickstoffgehalt einer Probe bestimmt und dieser mit einem Faktor multipliziert, dieser Faktor beschreibt den Stickstoffgehalt des Proteins. Bei der Methode nach Kjeldahl werden die Proteine durch Behandlung mit Schwefelsäure vollständig zerstört und in der erhaltenen Lösung der Stickstoff bestimmt.

In Tabelle 18 sind die Wiederfindungen des Erdnussproteins in rohen und gerösteten Erdnüssen dargestellt. Dabei wurden die Proteine sowohl nach der Methode nach Lowry als auch nach der Methode nach Kjeldahl bestimmt. Die Ergebnisse zeigen, dass während des Röstens zwar kein Stickstoff verloren ging (siehe Werte bei der Bestimmung mit der Kjeldahl-Methode), allerdings nahm die Löslichkeit des Proteins nach dem Rösten deutlich ab. Die Abnahme des Proteingehaltes ist wahrscheinlich auf Reaktionen des Proteins mit anderen Erdnussbestandteilen während der Röstung zurückzuführen. Zwar konnten die Proteine der rohen Erdnüsse mit hoher Ausbeute wiedergefunden werden, da sie aber während der Röstung stark verändert wurden, konnten sie im Rahmen dieser Arbeit allerdings nicht als Standard verwendet werden, da sich dabei natürlich auch die Epitope veränderten. Als Standard mussten daher im Rahmen dieser Arbeit Proteine der gerösteten Erdnüsse eingesetzt werden (siehe Abschnitt 5.1.2). Die Voraussetzung für die Verwendung von Proteinen als Standard ist, dass sie vollständig aus der Matrix extrahierbar sind und dass sich die Epitope während der Extraktion nicht verändern.

Tabelle 18: Proteingehalte (in %) der rohen und der gerösteten Erdnüsse nach Bestimmung mit den Methoden nach Lowry und nach Kjeldahl

	Proteinbestimmung nach Lowry	Proteinbestimmung nach Kjeldahl
Rohe Erdnuss	26,0 ± 1,1%	25,4% ± 0,3%
Geröstete Erdnuss	7,8 ± 0,5%	26,0% ± 0,3%

\*Werte wurde aufgrund der begrenzten Genauigkeit gerundet.

Aus den o.g. Gründen wurden die Proteine aus den gerösteten Erdnüssen mit dem Puffer aus der Literatur (siehe Anhang 8.10.1) extrahiert. Die Extraktion der Proteine wurde folgendermaßen durchgeführt: Die gerösteten Erdnüsse wurden in einer Kugelmühle

(Qiagen, Deutschland) 10 min bei 2400 rpm zerkleinert und dann 20 min bei 420 rpm in einem Schüttler (Biometra, Deutschland) geschüttelt. Die Proteine wurden nach der Methode von Lowry und der etablierten ELISA bestimmt. Um den Einfluss des Puffers (SDS verhindert z. B. die Antigen-Antikörper-Bindung) zu vermeiden, wurde eine Dialyse statt der Präzipitation am IEP durchgeführt. Die Begründung für diese Vorgehensweise ist, dass das Erdnussprotein eine Mischung unterschiedlicher Proteine mit unterschiedlichen IEP darstellt, daher ist die isoelektrische Fällung wie bei der Casein-Aufreinigung hier nicht möglich. Die Dialyse wurde gegen PBS-Tween20-Puffer entsprechend Abschnitt 6.3.1 in den Deckeln der Reaktionsgefäße durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 58 dargestellt. Dabei stellen die Werte nach Lowry die Protein-Wiederfindungen dar, während die Ergebnisse des ELISA die Antigenität im Hinblick darauf darstellen, ob sie bei der Extraktion irreversibel zerstört wurde oder nicht.

Die Ergebnisse waren in Abhängigkeit von den verwendeten Puffern sehr unterschiedlich. Die meisten Ergebnisse lagen bei Einsatz der Puffer 1-5, 7, 11-14, 22-24, 26-28, 30-32) sowohl nach Lowry als auch mit dem ELISA um die 10% Proteinwiederfindung. Diese Ergebnisse waren unabhängig von der Bestimmungsmethode praktisch identisch. Die untersuchten Puffer waren daher wegen der geringen Wiederfindung bei der Proteinbestimmung zur Herstellung eines Erdnussprotein-Standards nicht als Extraktionspuffer einsetzbar. Geeignet waren die SDS-haltigen Puffer 17, 18, 19 und 25, mit denen das Erdnussprotein nach der Methode nach Lowry sehr gut, mit der ELISA-Methode schlecht, bestimmbar war. Des Weiteren konnten die Puffer 8, 9, 10, 21 und 29, die Harnstoff enthielten oder basisch waren, noch als gut bewertet werden. Die Protein-Wiederfindungen erreichten zwar nicht den in der Literatur beschriebenen Wert, aber diese Werte könnten durch weitere Optimierungsverfahren noch erhöht werden.

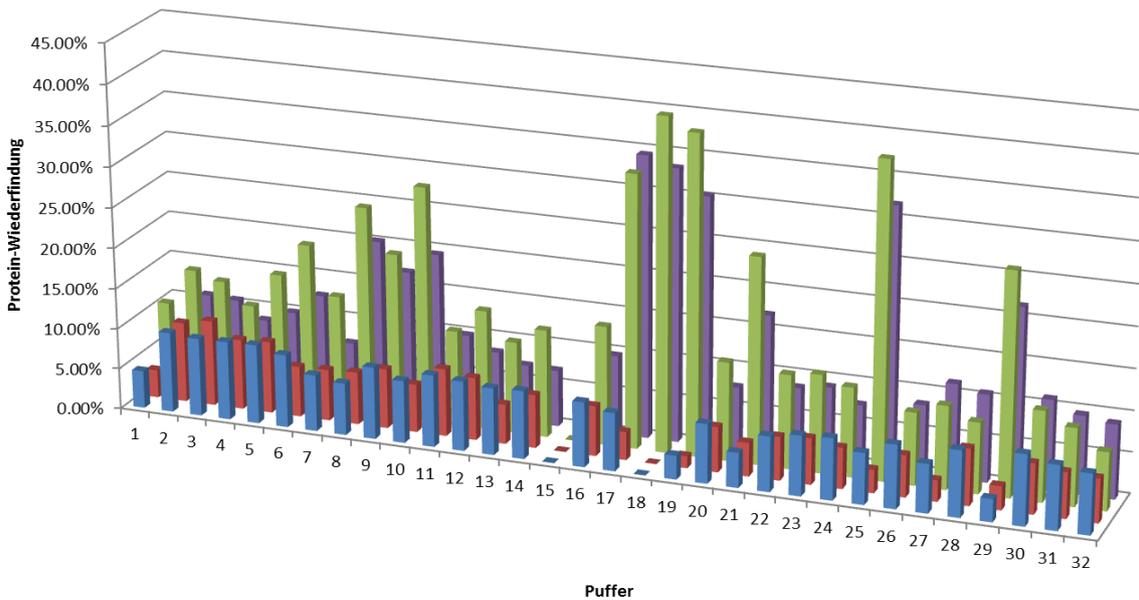


Abbildung 58: Protein-Wiederfindung aus gerösteten Erdnüssen nach Proteinextraktion mit 32 in der Literatur beschriebenen Puffern (X-Achse: Puffer aus der Literatur siehe Anhang 8.10.1; Y-Achse: Protein-Wiederfindung aus gerösteten Erdnüssen, blaue Säule: ohne Dialyse, mittels ELISA; rote Säule: mit Dialyse, mittels ELISA; grüne Säule: ohne Dialyse, nach Lowry; violette Säule: mit Dialyse, nach Lowry; Einzelwerte siehe Tabelle 59 im Anhang 8.1.6)

Der große Unterschied zwischen den mit dem ELISA und dem Verfahren nach Lowry erzielten Ergebnissen konnte wahrscheinlich nur auf die Pufferkomponenten zurückzuführen sein, welche die Epitope zerstören oder die Antikörper beim ELISA beeinflussten. Nach Einsatz der Dialyse konnten die mit dem ELISA erzielten Ergebnisse nicht verbessert werden, man muss vielmehr die Extraktions- und die Aufreinigungs-Verfahren weiter optimieren, um die Proteine bei der Extraktion vor der Denaturierung zu schützen und um sie nach der Aufreinigung optimieren zu können. Nach der Aufreinigung könnten nämlich noch Spuren schädlicher Pufferkomponenten vorhanden sein, welche die Proteinbestimmung stören könnten. Es muss in diesem Fall also entweder ein Puffer ohne Störsubstanzen gefunden werden oder Methoden entwickelt werden, mit denen die Störsubstanzen vollständig entfernt werden können.

Die Proteinextraktion wurde daher durch eine Änderung der Pufferzusammensetzung optimiert, wobei die pH-Werte, die Salzkonzentration und weitere Zusätze wie Detergenzien oder chaotrope Verbindungen verändert wurden. Alle Versuche wurden, wie schon bei den Versuchen mit Casein beschrieben, dreimal wiederholt. Die Ergebnisse werden durch die

Angabe der Mittelwerte und der Standardabweichungen der Protein-Wiederfindung angegeben.

### **6.9.2 Optimierung des pH-Wertes**

Wie im Abschnitt 6.9.1 diskutiert, war das Erdnussprotein bei basischen pH-Werten des Extraktionspuffers besser extrahierbar als bei sauren pH-Werten. Daher wurde in einem weiteren Versuch der basische pH-Wert weiter optimiert. Es wurden zur Erreichung dieses Zieles zwei Puffersysteme auf der Basis 0,1 M Natriumdihydrogenphosphat und Tris (Tris(hydroxymethyl-)aminomethan) hergestellt. Der pH-Wert wurde jeweils durch Zugabe von 0,2 M Natriumhydroxid und 0,1 M Tris-HCl kontrolliert. Die Protein-Wiederfindungen in Abhängigkeit der eingestellten pH-Werte sind in der Abbildung 59 und der Abbildung 60 dargestellt.

Die Ergebnisse mit dem Phosphat-Puffer und der Proteinbestimmung nach Lowry waren ähnlich wie die bereits berichteten Ergebnisse bei der Casein-Bestimmung, d.h. dass die Proteinextraktion bei basischen pH-Werten besser ist als bei weniger basischen pH-Werten. Der einzige Unterschied bestand darin, dass das bei basischem pH-Wert extrahierte Protein schlechter mittels ELISA bestimmt werden konnte. Dieses Ergebnis ist auf die geringere Stabilität der Konformation des Proteins bei basischen pH-Werten zurückzuführen. Auch nach der Dialyse wurde die Wiederfindung nicht verbessert, was darauf hindeutet, dass die Proteine irreversibel denaturiert wurden. Bei sauren pH-Werten des Extraktionspuffers waren nicht nur die Wiederfindungen beim ELISA, sondern auch diejenigen mit der Bestimmung nach Lowry schlecht. Im sauren Bereich sind die Proteine schlechter löslich und sie werden zusätzlich denaturiert. Im neutralen pH-Bereich zwischen pH 6,1 und pH 7,9 war die Wiederfindung ähnlich, sie schwankte nur um etwa 2%, was wahrscheinlich auf die Systemstreuung zurückzuführen ist. Die Wiederfindungen waren bei diesen pH-Werten mit dem ELISA sogar etwas höher als nach der Methode nach Lowry. Bei neutralem pH-Wert ist die Gefahr der Denaturierung von Proteinen geringer als bei sauren oder basischen pH-Werten. Bei Einsatz von Tris-Puffer wurden ähnliche Ergebnisse erzielt wie mit dem Phosphat-Puffer.

Als Fazit der Ergebnisse wurde für die weiteren Untersuchungen der neutrale pH-Wert 7,0 für die Extraktion der Proteine gewählt. Bei diesem pH-Wert gelingt die Proteinbestimmung

mit dem ELISA am besten. Da das Puffersystem keinen Einfluss auf die Wiederfindungen hatte, wurde für die weiteren Versuche das Phosphat-Puffersystem verwendet, da die ELISA-Platten auch mit Phosphat-Puffer inkubiert und gespült wurden.

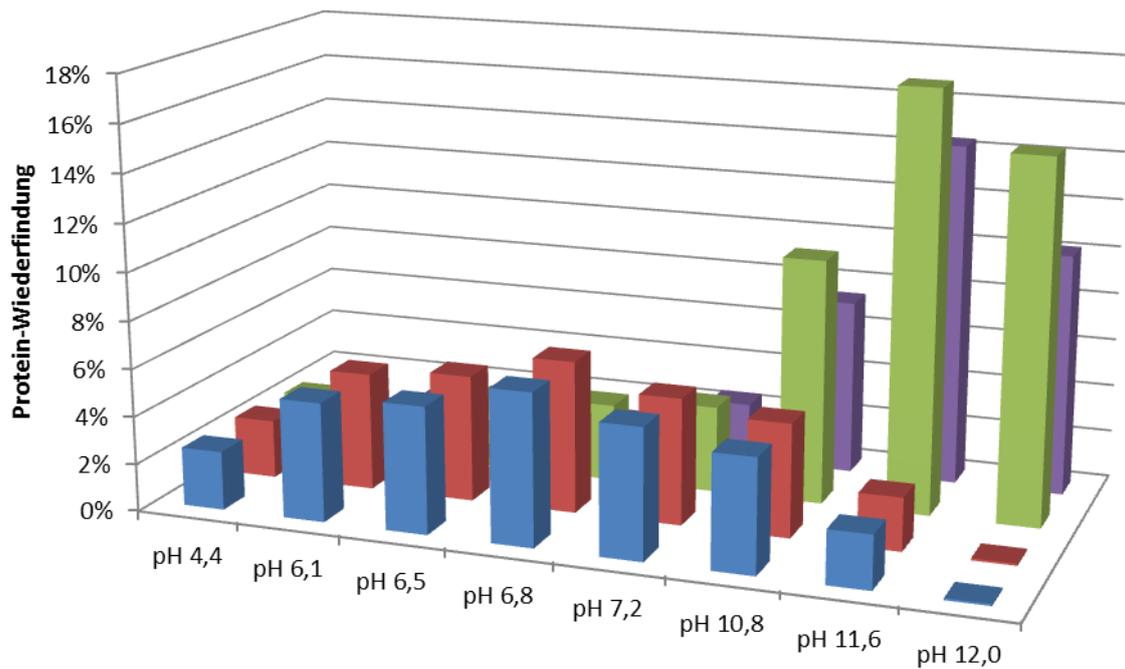


Abbildung 59: Protein-Wiederfindung bei Verwendung von Phosphatpuffer als Extraktionspuffer bei unterschiedlichen pH-Werten. X-Achse: pH-Werte; Y-Achse: Protein-Wiederfindung; blaue Säule: ohne Dialyse, mittels ELISA; rote Säule: mit Dialyse, mittels ELISA; grüne Säule: ohne Dialyse, nach Lowry; violette Säule: mit Dialyse, nach Lowry; Einzelwerte siehe Tabelle 60 im Anhang 8.16)

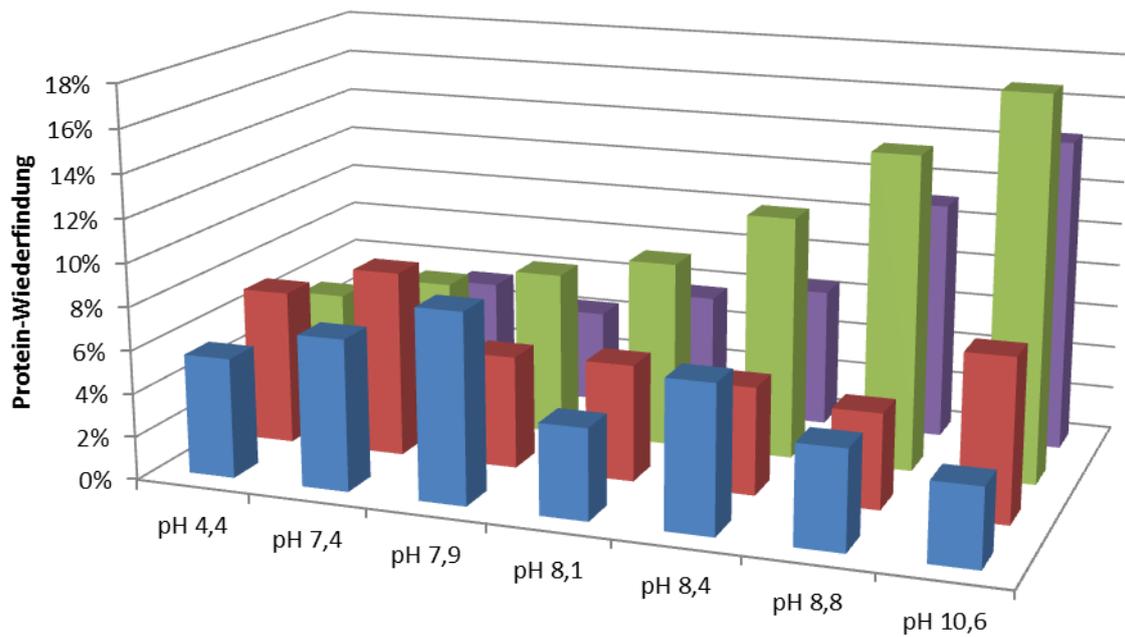


Abbildung 60: Protein-Wiederfindung bei Verwendung von Tris-Puffer als Extraktionspuffer bei unterschiedlichen pH-Werten. X-Achse: pH-Werte; Y-Achse: Protein-Wiederfindung; blaue Säule: ohne Dialyse, mittels ELISA; rote Säule: mit Dialyse, mittels ELISA; grüne Säule: ohne Dialyse, nach Lowry; violette Säule: mit Dialyse, nach Lowry; Einzelwerte siehe Tabelle 61 im Anhang 8.16)

### 6.9.3 Optimierung der Salzkonzentration

Um den Einfluss der Phosphat- und Natrium-Konzentration im Puffersystem auf die Wiederfindung des Proteins zu untersuchen, wurden deren Konzentrationen variiert. Dazu wurde eine 500 mM Natriumdihydrogenphosphat-Lösung hergestellt und mit Natriumhydroxid auf pH 7 eingestellt. Die Lösung wurde weiter auf 300 mM bis 10 mM verdünnt. Die pH-Werte aller hergestellten Lösungen wurden kontrolliert. Alle Versuchsansätze wurden wie in Abschnitt 6.9.1 beschrieben für 10 min bei 2400 rpm in einer Kugelmühle zerkleinert und 20 min bei 420 rpm im Schüttelbad geschüttelt. Die Proteine in den Extrakten wurden nach der Lowry-Methode und mittels ELISA-Test bestimmt, wobei die Extrakte vor der Bestimmung mittels ELISA zusätzlich gegen PBS-Tween20-Puffer entsprechend Abschnitt 6.3.1 in den Deckeln der Reaktionsgefäße dialysiert wurden. Die Versuche wurden dreimal wiederholt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 61 dargestellt.

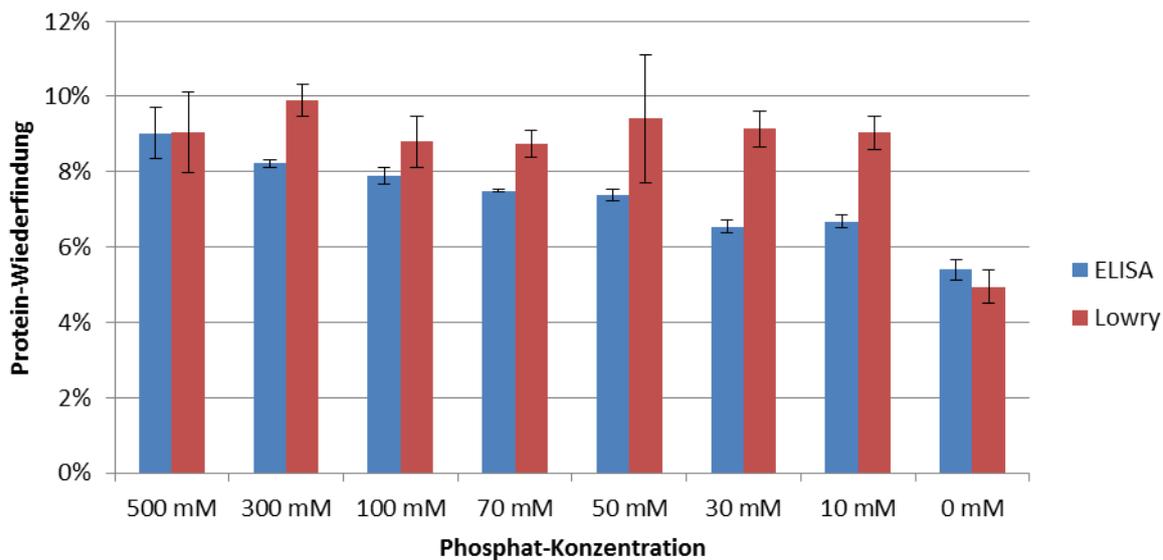


Abbildung 61: Optimierung der Phosphat-Konzentration im Extraktionspuffer (X-Achse: Phosphat-Konzentration; Y-Achse: Protein-Wiederfindung; 0 mM bedeutet dest. Wasser; Einzelwerte siehe Tabelle 62 im Anhang 8.17)

Die Protein-Wiederfindung war bei allen Phosphat-Konzentrationen nahezu identisch. Leider nahm die Antigenität, die mit dem ELISA ermittelt wurde, parallel mit der Phosphat-Konzentration ab. Wegen der schlechten Löslichkeit des Dinatriumhydrogenphosphats konnte der Test allerdings nicht mit höheren Phosphat-Konzentrationen durchgeführt werden.

Die Optimierung der Natrium-Konzentration im Puffer wurde daher bei einem Phosphatgehalt von 500 mM durch Zugabe von NaCl durchgeführt. Die pH-Werte aller getesteten Puffer wurden kontrolliert. Die Extraktion wurde analog der Optimierung der Natriumhydrogenphosphat-Konzentration durchgeführt. Alle Protein-Extrakte wurden mittels ELISA-Test und nach der Lowry-Methode bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 62 dargestellt.

Die Ergebnisse zeigen, dass zwischen dem ELISA und der Lowry-Methode kaum Unterschiede bestanden. Die Protein-Wiederfindungen waren bei niedriger und bei hoher Natrium-Konzentration hoch, bei mittlerer Natrium-Konzentration jedoch geringer. Die Mittelwerte der Protein-Wiederfindungen waren bei 1000 bis 300 mM NaCl zwar etwas höher als die ohne NaCl-Zugabe, aber dieser Unterschied konnte nicht statistisch gesichert werden. Das

optimale Puffersystem enthielt daher 500 mM Natriumhydrogenphosphat und es wurde auf einen pH-Wert 7,0 eingestellt.

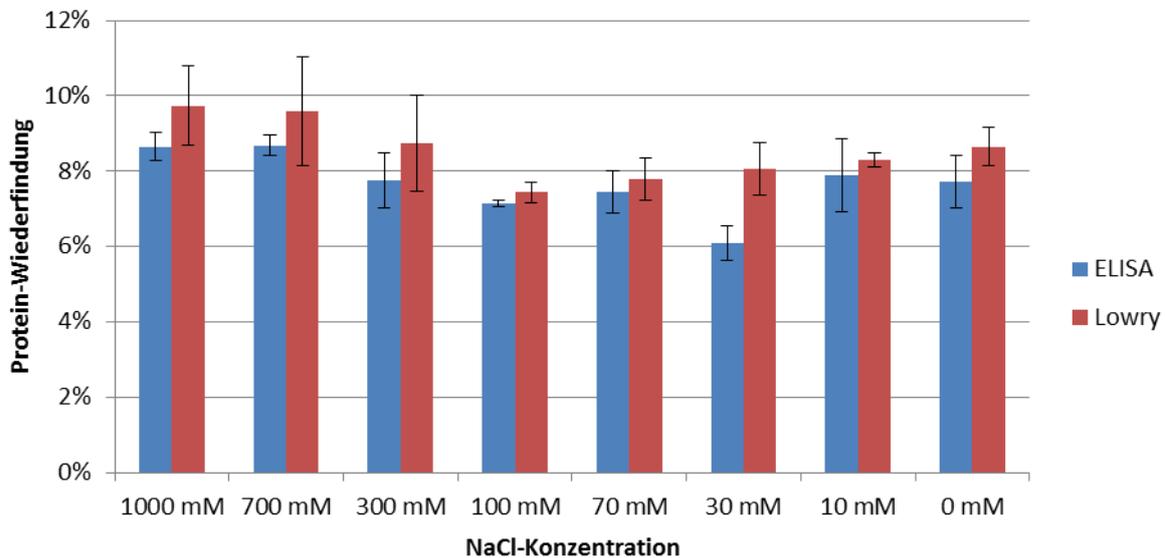


Abbildung 62: Optimierung der Natrium-Konzentration im Extraktionspuffer, (X-Achse: NaCl-Konzentration; Y-Achse: Protein-Wiederfindung; 0 mM bedeutet dest. Wasser; Einzelwerte siehe Tabelle 63 im Anhang 8.17)

#### 6.9.4 Optimierung der Protein-Wiederfindungen durch Zugabe von Detergenzien

Aus den in Abschnitt 6.9.1 berichteten Ergebnissen folgt, dass die Proteine aus gerösteten Erdnüssen mit der 4%igen SDS-Lösung ohne Zugabe eines weiteren Puffersystems extrahierbar waren. Es wurde ein weiterer Versuch mit Einsatz von 138 mM Lithiumdodecylsulfat-Lösung durchgeführt, wobei diese Lösung äquimolar der SDS-Lösung war. Die Protein-Wiederfindung war derjenigen mit der SDS-Lösung identisch. Damit konnte gezeigt werden, dass der Einfluss auf die Protein-Wiederfindung auf den Einfluss des Dodecylsulfats zurückzuführen war.

Da die in Abschnitt 6.9.1 gefundenen Ergebnisse für die Extraktion mit SDS sehr niedrig waren, wurde versucht, eine Konzentration der SDS-Lösung zu finden, mit der ähnlich gute Wiederfindungen wie in Abschnitt 6.9.1 berichtet, erreicht werden konnten, die aber den ELISA nicht mehr stören sollten. Es wurden zu diesem Zweck Lösungen von 10% bis 0,5% SDS

in Wasser hergestellt. Die Aufarbeitung der Versuchsansätze wurde analog Abschnitt 6.9.1 durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 63 dargestellt.

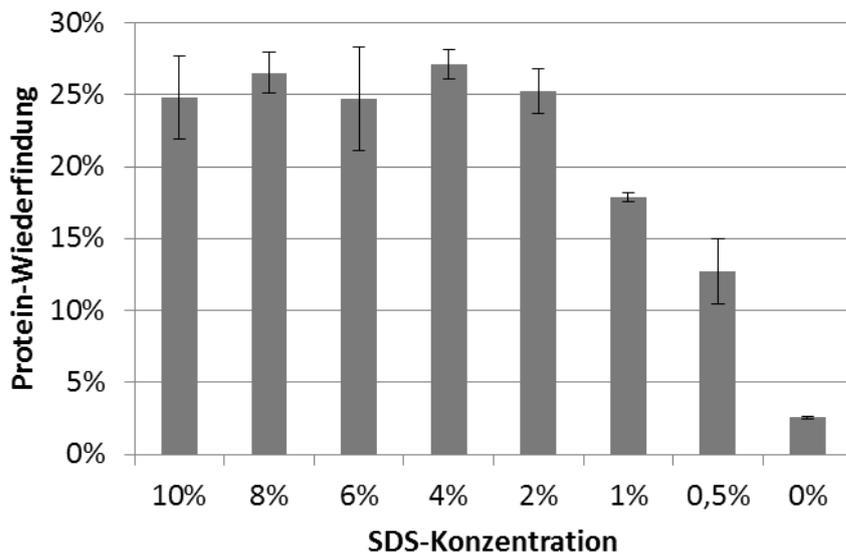


Abbildung 63: Protein-Wiederfindung in % bei unterschiedlichen SDS-Konzentrationen (X-Achse: SDS-Konzentration; Y-Achse: Protein-Wiederfindung; 0 mM bedeutet dest. Wasser; Einzelwerte siehe Tabelle 64 im Anhang 8.17)

In Abbildung 63 sind nur die mit der Lowry-Methode erzielten Ergebnisse dargestellt, da die Proteinbestimmung mit dem ELISA nach SDS-Extraktion nur zu sehr niedrigen Ergebnissen führte. Es wurde auch, leider erfolglos versucht, SDS mittels Dialyse zu entfernen, um doch noch eine Proteinbestimmung mittels ELISA durchführen zu können. Alle Extinktionen mittels ELISA lagen unterhalb des Kalibrierbereiches, so dass keine sicheren Ergebnisse erzielt werden konnten. Aus den in Abbildung 63 dargestellten Ergebnissen kann abgeleitet werden, dass die SDS-Konzentration mindestens 2% betragen muss um eine maximale Protein-Wiederfindung zu erreichen.

SDS hatte bei der Proteinextraktion aus den gerösteten Erdnüssen eine zweifache Bedeutung. Die wichtigste Wirkung des SDS war seine Eigenschaft als Detergenz. SDS bewirkte somit, dass Fett bei Anwesenheit von SDS gelöst blieb. Damit könnte auch das in den Fettmizellen eingeschlossene Protein frei gesetzt werden. Erdnüsse gelten als fettreiche Samen, damit könnte auch durch SDS die Protein-Wiederfindung erhöht werden. Des Weiteren wirkt SDS denaturierend. Das könnte bedeuten, dass nicht kovalente Bindungen zwischen Proteinen bzw. zwischen Proteinen und der Matrix gelöst werden können.

In einem weiteren Versuch wurde anstelle der SDS-Lösung als Extraktionsmittel eine Tween20-Lösung verwendet um die Wirkung von SDS als Detergenz zu überprüfen. Dabei war die Tween20-Konzentration die gleiche wie im SDS-Puffer. Die mittels ELISA und der Lowry-Methode ermittelten Ergebnisse sind in Abbildung 64 dargestellt.

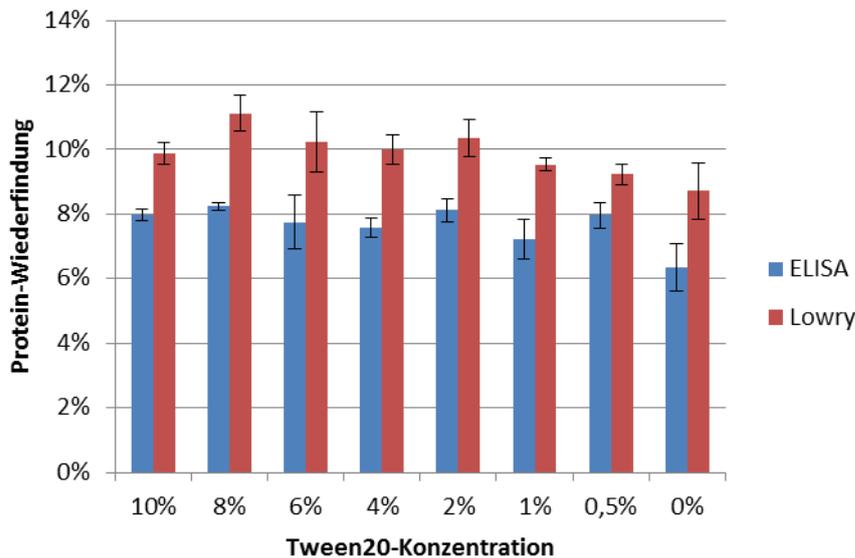


Abbildung 64: Protein-Wiederfindung in Tween20 Lösungen (X-Achse: Tween20-Konzentrationen, 0 mM bedeutet dest. Wasser; Y-Achse: Protein-Wiederfindung; Einzelwerte siehe Tabelle 65 im Anhang 8.17)

Die Ergebnisse zeigen leider, dass die Protein-Wiederfindung nach Zugabe von 2% bis 8% Tween20 nur wenig verbessert werden konnte. Es wurden des Weiteren eine Lösung mit 8% Triton X 100 und CHARPS als Extraktionsmittel eingesetzt. Die Ergebnisse waren denjenigen mit Tween20 vergleichbar. Es wird daher vermutet, dass die Protein-Wiederfindungen aus den gerösteten Erdnüssen hauptsächlich auf Grund der Wirkung des SDS als Detergenz zu erklären waren. Der Einfluss der denaturierenden Wirkung auf die Protein-Wiederfindungen wurde in weiteren Versuchen mit chaotropen Verbindungen überprüft (siehe Abschnitt 5.9.5).

Eine Protein-Wiederfindung von ca. 25% aus gerösteten Erdnüssen mittels SDS-Lösung wurde als sehr gut bewertet, so dass dieses Extraktionsmittel als geeignet angesehen wurde. Das Problem mit dem Einsatz des ELISA sollte daher durch Entwicklung von Aufreinigungsstrategien gelöst werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei Aufreinigungsstrategien getestet, nämlich die Präzipitation und die Dialyse.

Da die extrahierten Proteine eine Mischung sehr verschiedener Proteine mit unterschiedlichen IEP darstellen, ist eine Präzipitation an einem bestimmten IEP nicht möglich. Es wurde daher die in der Literatur beschriebene unspezifische Präzipitation gewählt, bei der die Erdnussproteine in einer gesättigten Ammoniumsulfatlösung, in Aceton und in 20%iger Trichloressigsäure (TCA) ausgefällt wurden (Polson et al., 2003; Carpentier et al., 2005; Chen et al., 2005). Die Versuchsdurchführung ist im Anhang 8.14.1.1 und 8.14.1.2 beschrieben. Die Protein-Wiederfindungen nach der Präzipitation wurden mit dem ELISA und der Lowry-Methode ermittelt. Als Vergleich wurde eine Lösung ohne Aufreinigung mit untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 65 dargestellt.

Wie bereits erwähnt, wurde die Protein-Wiederfindung ohne Aufreinigung nur mit der Lowry-Methode bestimmt, weil der ELISA nicht angewendet werden konnte. Aus Abbildung 70 folgt, dass die Protein-Wiederfindung nach TCA- und Aceton-Fällung drastisch sanken. Hinzu kam, dass die Standardabweichung bei TCA-Fällung sehr hoch war, so dass diese Methode als nicht reproduzierbar angesehen werden musste. Im mit TCA und Aceton gefällten Extrakt konnte man mit bloßem Auge unlösliche Partikel erkennen. Das bedeutet, dass nach der Aufreinigung offensichtlich ein Teil der Proteine denaturiert wurde und dass diese denaturierten Proteine sich nicht mehr in Wasser lösten.

Die Fällung mit Ammoniumsulfat zeigte keinen Verlust an bestimmbarem Protein gegenüber dem Ergebnis des unbehandelten Extraktes, da die Denaturierung des Proteins nach Zugabe von Ammoniumsulfat reversibel war. Leider funktionierte der ELISA nicht. Vermutlich konnte SDS nicht vollständig entfernt werden, so dass der ELISA gestört wurde.

Die besten Ergebnisse wurden mit dem ELISA bei Fällung mit Aceton erzielt, obwohl sie immer noch schlechter waren als die mit der Lowry-Methode erzielten Protein-Wiederfindungen. Die Wiederfindungen bei Einsatz des ELISA könnten noch verbessert werden, wenn die Aufreinigung, wie bei vielen biochemischen Experimenten üblich, bei  $-20^{\circ}\text{C}$  durchgeführt werden würde, da bei dieser tiefen Temperatur die Proteine nicht denaturiert werden (Jiang et al., 2004). So tiefe Temperaturen sind jedoch bei Einsatz von Ammoniumsulfat und TCA nicht möglich, da diese Lösungen gefrieren würden.

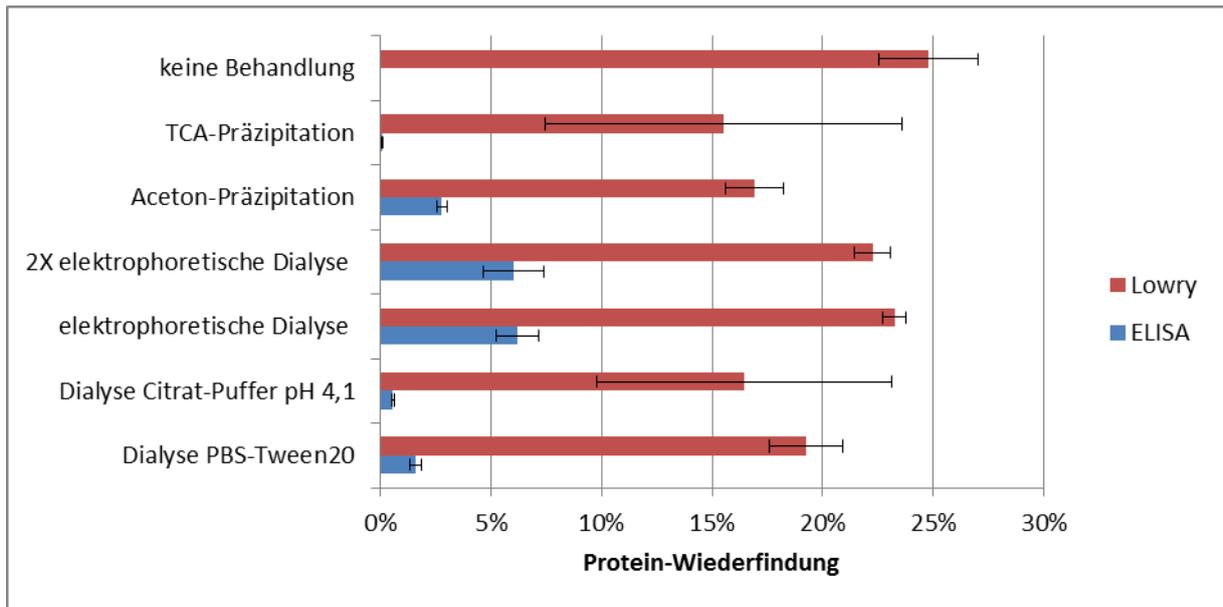


Abbildung 65: Aufreinigung des Erdnussextraktes mit verschiedenen Verfahren; (X-Achse: Protein-Wiederfindung, 0 mM bedeutet dest. Wasser; Y-Achse: Aufreinigungsmethode; Einzelwerte siehe Tabelle 66 im Anhang 8.17)

In einem weiteren Versuch wurde daher die Fällung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  neben Aceton auch mit Methanol und Ethanol durchgeführt (Jiang et al., 2004). Zum Vergleich wurde die Fällung zusätzlich im Kühlschrank bei  $4^{\circ}\text{C}$  und bei Raumtemperatur (RT) durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 66 dargestellt.

Die mit der Lowry-Methode erzielten Protein-Wiederfindungen sind ähnlich. Leider funktionierte der ELISA auch bei niedrigen Temperaturen nicht besonders gut. Die wichtigste Frage war, ob die Proteine nach der Aufreinigung noch nativ oder denaturiert waren. Die Ergebnisse mit Aceton waren dabei etwas besser als die mit Methanol bzw. Ethanol erzielten. Die Protein-Wiederfindungen waren bei  $-20^{\circ}\text{C}$  nur unwesentlich besser als bei RT. Als Ergebnis kann daher festgehalten werden, dass die Fällung mit organischen Lösungsmitteln nicht zu einer besseren Protein-Wiederfindung führt, so dass sie im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter angewendet wurde.

Als eine weitere Aufreinigungsmethode wurde versucht, mit Hilfe der Dialyse das restliche SDS zu entfernen. Neben dem PBS-Tween20-Puffer (siehe Abschnitt 8.6.1) wurden die Erdnussextrakte gegen einen Citrat-Puffer pH 4,1 dialysiert, da SDS besser im sauren Bereich dialysierbar ist (Tuszynski und Warren, 1975; Kapp und Vinogradov, 1978). Die Dialyse wurde

wie im Abschnitt 6.3.1 beschrieben durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 65 dargestellt. Leider waren die Standardabweichungen größer als bei der Proteinbestimmung nach Lowry. Die Ergebnisse mit dem ELISA zeigten, dass die Proteine nur wenig Epitope besaßen. Zusammen mit den Ergebnissen beim Einsatz von TCA als Fällungsmittel zeigte sich, dass die Erdnussproteine im sauren Bereich leicht denaturiert wurden. Die Ergebnisse im sauren Bereich waren schlecht und kaum reproduzierbar.

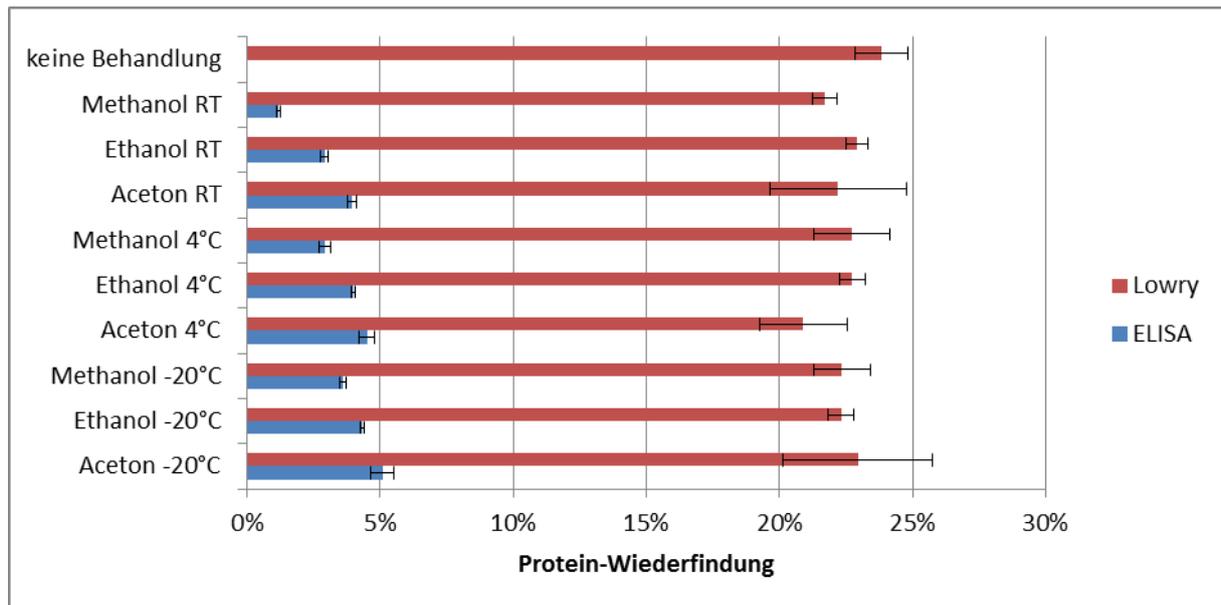


Abbildung 66: Aufreinigung des Erdnuss-Extraktes mit verschiedenen Fällungsmitteln bei unterschiedlichen Temperaturen; (X-Achse: Protein-Wiederfindung, Y-Achse: Aufreinigungsmethode; RT = Raumtemperatur; Einzelwerte siehe Tabelle 67 im Anhang 8.17)

Die Dialyse muss in einem neutralen Puffersystem durchgeführt werden. Aber die mit dem ELISA erzielte Wiederfindung war auch nach Dialyse gegen den PBS-Tween20-Puffer niedrig, da auch mit dieser Methode SDS nicht vollständig entfernt wurde. Die Dialyse wurde daher in einer Elektrophorese-Kammer unter Spannung durchgeführt, da dadurch das negativ geladene SDS zur Anode wanderte. Die Durchführung der elektrophoretischen Dialyse ist im Anhang 8.14.2 beschrieben.

Das in Abbildung 65 dargestellte Ergebnis zeigt, dass der Verlust an Protein nach einstündiger elektrophoretischer Dialyse im PBS-Tween20 Puffer kleiner war als bei allen anderen Aufreinigungsmethoden bei Anwendung des ELISA. Es wurde deshalb versucht, ob sich die Protein-Wiederfindung mit dem ELISA bei längeren Dialysezeiten verbessern ließ. Es

wurde daher eine Dialysezeit von zwei Stunden gewählt (in Abbildung 65 als „2 X elektrophoretische Dialyse“ bezeichnet). Die Protein-Wiederfindung war etwas schlechter als nach einstündiger Dialyse, wahrscheinlich wurde ein Teil des Proteins an den Dialyseschlauch gebunden. Zusätzlich wurde auch eine größere Standardabweichung gefunden. Diese Ergebnisse zeigen, dass das noch entfernbare SDS bereits nach einstündiger Dialyse aus dem Extrakt entfernt werden konnte. Allerdings bleibt wahrscheinlich noch ein Teil des SDS an das Protein gebunden.

Aus o.g. Gründen konnten die Protein-Wiederfindungen aus SDS-haltigen Lösungen nicht mit dem ELISA durchgeführt werden.

#### **6.9.5. Optimierung durch Zugabe von chaotropen Verbindungen**

Wie in Abschnitt 5.9.4 besprochen, könnten die Protein-Wiederfindungen wahrscheinlich durch die denaturierenden Eigenschaften der Puffer erhöht werden. Eine solche Eigenschaft besitzt nach Abbildung 58 nicht nur SDS sondern auch Harnstoff. Harnstoff kann somit als Chaotrop nicht-kovalente Bindungen spalten. Diese Eigenschaft wurde ausgenutzt, wobei es darauf ankam, die Konzentration des Harnstoffs zu optimieren. Es wurden daher Harnstoff-Lösungen mit Konzentrationen von 8 M bis 0,5 M hergestellt. Die Proteinextraktion und die Dialyse wurden, wie in Abschnitt 6.9.1 beschrieben, durchgeführt. Die Proteinbestimmung in den Extrakten und den Dialysaten wurde mit der Lowry-Methode bzw. mittels des ELISA durchgeführt. Des Weiteren wurden mit den gleichen Methoden weitere chaotrope Verbindungen wie Guanidiniumhydrochlorid und Guanidiniumthiocyanat getestet. Die Ergebnisse sind in den Abbildung 67 bis Abbildung 69 dargestellt.

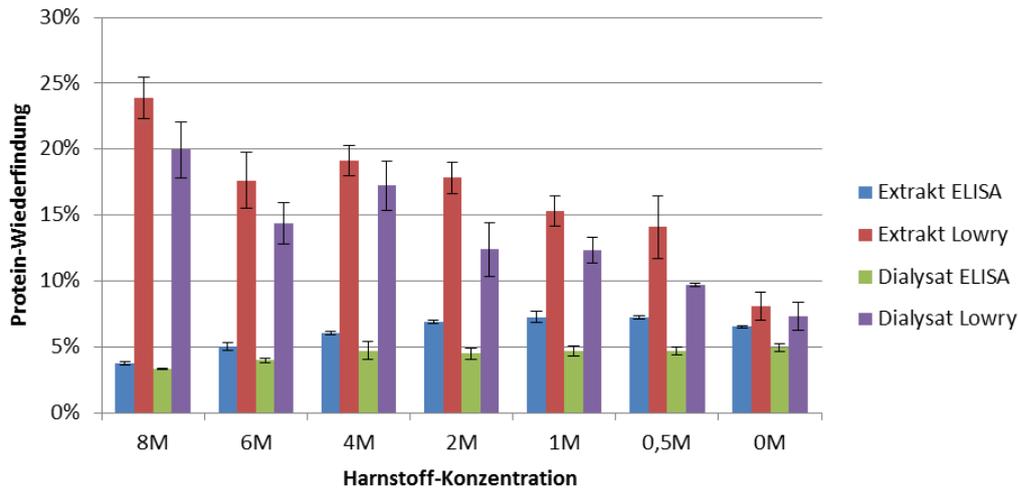


Abbildung 67: Protein-Wiederfindung in gerösteten Erdnüssen in Harnstoff-Lösungen (X-Achse: Konzentration des Harnstoffs; Y-Achse: Protein-Wiederfindung; blaue Säule: Extrakt vor Dialyse mittels ELISA bestimmt; rote Säule: Extrakt vor Dialyse mit der Lowry-Methode bestimmt; grüne Säule: Extrakt nach Dialyse mittels ELISA-Test bestimmt; violette Säule: Extrakt nach Dialyse mit der Lowry-Methode bestimmt; Einzelwerte siehe Tabelle 68 im Anhang 8.17)

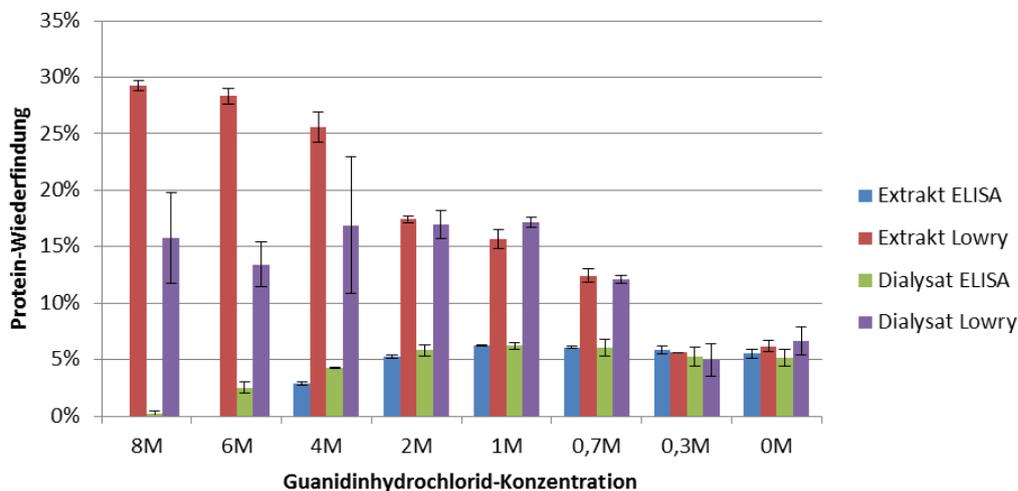


Abbildung 68: Protein-Wiederfindung in gerösteten Erdnüssen in Guanidinhydrochlorid-Lösungen (X-Achse: Konzentration der Guanidinhydrochlorid-Lösungen; Y-Achse: Protein-Wiederfindung; blaue Säule: Extrakt vor Dialyse mittels ELISA bestimmt; rote Säule: Extrakt vor Dialyse mit der Lowry-Methode bestimmt; grüne Säule: Extrakt nach Dialyse mittels ELISA-Test bestimmt; violette Säule: Extrakt nach Dialyse mit der Lowry-Methode bestimmt; Einzelwerte siehe Tabelle 69 im Anhang 8.17)

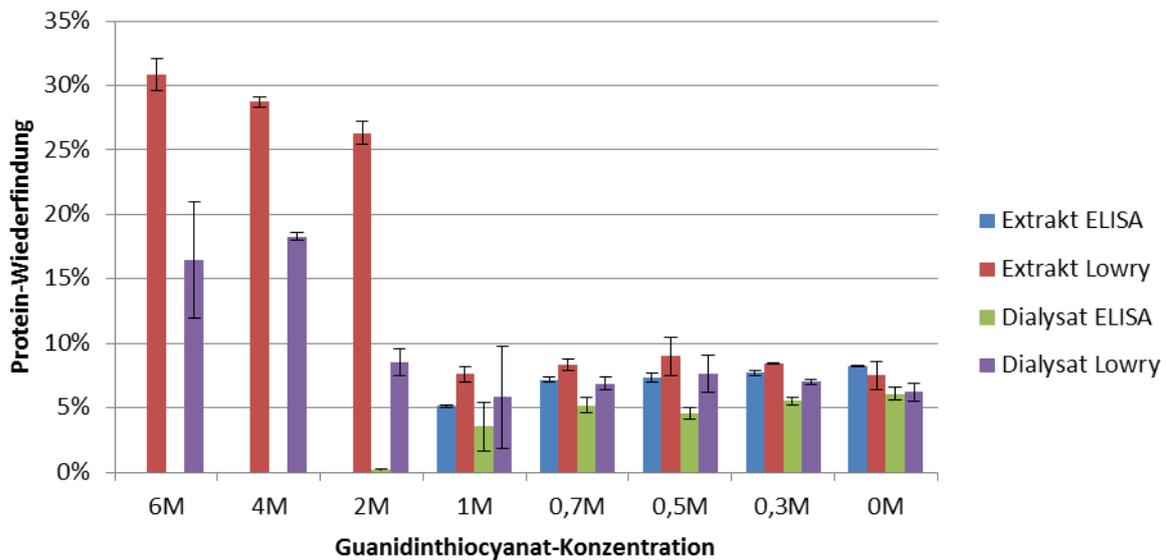


Abbildung 69: Protein-Wiederfindung in gerösteten Erdnüssen in Guanidinthiocyanat-Lösungen (X-Achse: Konzentration der Guanidinthiocyanat-Lösungen; Y-Achse: Protein-Wiederfindung ; blaue Säule: Extrakt vor Dialyse mittels ELISA bestimmt; rote Säule: Extrakt vor Dialyse mit der Lowry-Methode bestimmt; grüne Säule: Extrakt nach Dialyse mittels ELISA-Test bestimmt; violette Säule: Extrakt nach Dialyse mit der Lowry-Methode bestimmt; Einzelwerte siehe Tabelle 70 im Anhang 8.17)

Bei hoher Konzentration der chaotropen Verbindungen, also bei 8 M Harnstoff, 4 - 8 M Guanidiniumhydrochlorid und 2- 6 M Guanidinthiocyanat, wurde fast das gesamte Protein in den Erdnüssen gefunden. Allerdings war die Proteinbestimmung mittels ELISA schwierig oder unmöglich. Bei dieser Methode mussten ja die chaotrope Verbindungen möglichst vollständig aus den Lösungen entfernt werden. Daher wurden die Extrakte gegen PBS-Tween20-Puffer (s. Abschnitt 8.6.1) dialysiert. Nach der Dialyse war der Extrakt gelförmig und er ließ sich nicht im Puffer lösen. Die Bestimmung des Proteins mit der Lowry-Methode und mittels des ELISA erfolgte daher mit einer Suspension des Dialysates. Dadurch wurde die Protein-Wiederfindung deutlich gesenkt und die Standardabweichung erhöht. Die Erklärung dieses Phänomens ist, dass die nicht kovalenten Bindungen, die durch die chaotrope Verbindungen gespalten wurden, sich nach Entfernung der chaotropen Verbindungen wieder regenerierten. Nicht-kovalente Bindungen entstehen nicht nur in der ursprünglichen Form sondern es entstehen auch neue nicht-kovalente Bindungen zwischen den Proteinen. Das ist der Grund, dass die Proteine polymerisieren und aggregieren und als Folge die

Löslichkeit verschwindet (Mirzahoseini et al., 2003; Mirzahoseini und Alibolandi, 2009; Alibolandi et al., 2010).

Die Polymerisation der Proteine könnte allerdings durch Zugabe von Kohlenhydraten (Yazdanparast et al., 2007), freien Aminosäuren (Buchner et al., 1991; Lin und Traugh, 1993; Meng et al., 2001), Polyolen (Sawano et al., 1992; Sato et al., 1996) oder Polyethylenglykol (PEG) (Cleland et al., 1992; Kozlowski und Harris, 2001; Roberts et al., 2002) vermindert werden. Diese Substanzen tragen zur Renaturierung der Proteine bei, so dass sie wieder die native Konfiguration annehmen können. Für den gleichen Zweck könnten auch chaotrope in niedriger Konzentration (Orsini und Goldberg, 1978), Salze (Richter et al., 2002) und Detergenzien eingesetzt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden sie jedoch nicht verwendet, da die Extrakte chaotrope Verbindungen und der Dialysepuffer Salze und Detergenzien bereits enthielten.

In einem weiteren Versuch wurde das Erdnussprotein mit einer 8 M Harnstoff-Lösung extrahiert. Der Proteingehalt im Extrakt wurde mit der Lowry-Methode bestimmt. Die Protein-Wiederfindung betrug  $26,7\% \pm 0,1\%$ . Der Extrakt wurde danach gegen die in Abbildung 70 aufgelisteten Lösungen über Nacht dialysiert.

Durch die Zugabe der in der Abbildung 70 aufgelisteten Substanzen zu der Dialyse konnte die Polymerisation der Erdnussinhaltsstoffe nicht vermieden werden. Die Gele waren auch nach Dialyse gegen den PBS-Tween20-Puffer noch unlöslich, so dass die in Abbildung 70 dargestellten Ergebnisse mit den Gelen ermittelt wurden. Die Protein- Wiederfindung im Vergleichsansatz war mit 3% ähnlich niedrig derjenigen mit den meisten Zusätzen. Nur die Protein-Wiederfindungen in den Extrakten, die gegen 25% Saccharose, 25 - 50 % Glycerol und 0,1% - 0,5% PEG dialysiert wurden, waren mit bis zu 7% besser, aber im Vergleich mit dem erwarteten Wert von 25% immer noch mangelhaft. Daher waren Zugaben von chaotropen Verbindungen zu den Extrakten nicht geeignet, die Protein-Wiederfindungen zu verbessern.

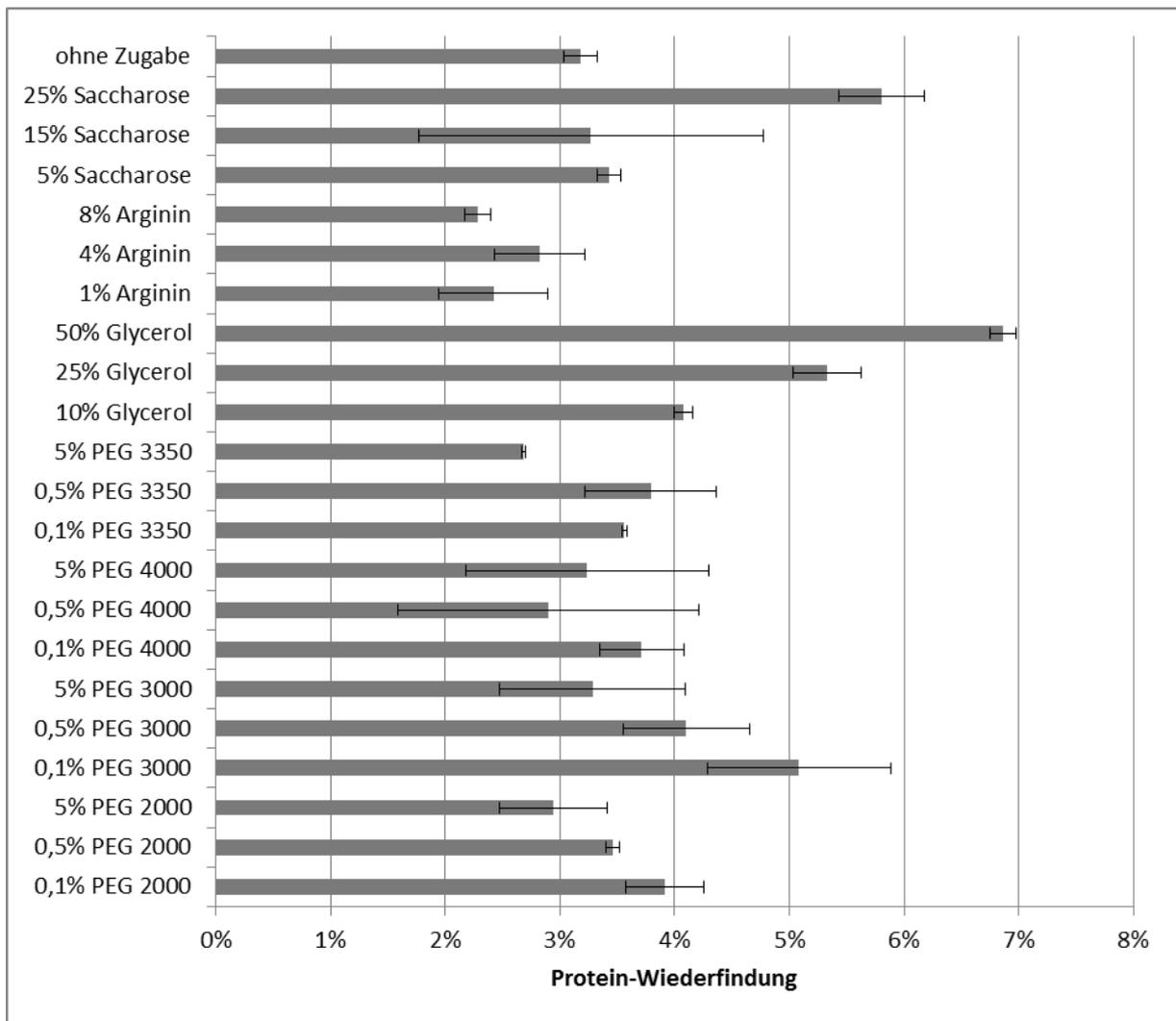


Abbildung 70: Renaturierung des Erdnussproteins nach Extraktion mit Harnstoff (X-Achse: Protein-Wiederfindung; Y-Achse: zugegebene Stoffe und deren Konzentration; Einzelwerte siehe Tabelle 71 in Anhang 8.16.)

### 6.10 Applikation der Extraktionsmethode vom Standard auf die Lebensmittelmatrix

Wie weiter oben diskutiert, war das Protein aus rohen Erdnüssen nicht als Standard geeignet, da dessen Epitope während des Backprozesses verändert, möglicherweise inaktiviert, wurden. Wurde dagegen das Protein der gerösteten Erdnüsse als Standard gewählt, gab es zwei andere Probleme. Protein aus gerösteten Erdnüssen war mit dem ELISA-geeigneten Puffer nur schwer extrahierbar bzw. der Extraktionspuffer mit einer hohen Protein-Wiederfindung war nicht für den ELISA geeignet. Aus diesem Grund wurden Erdnüsse an Stelle von Erdnussprotein als Zielanalyte gewählt. Der PBS-Tween20-Puffer (siehe Abschnitt

8.6.1) wurde als Extraktionspuffer gewählt. Standard und Probe wurden mit dem gleichen PBS-Tween20-Puffer extrahiert und mit der gleichen Methode aufgearbeitet.

Als Standard wurden 0,1029 g geröstete Erdnüsse mit 1 mL PBS-Tween20-Puffer versetzt. Die Extraktion erfolgte durch 10 min Zerkleinern bei 2400 rpm in der Kugelmühle und 20 min Schütteln bei 420 rpm im Schüttler. Um die Kalbrierlösungen einzusetzen, wurde der Extrakt mit PBS-Tween20-Puffer verdünnt. Als Einheit der Konzentration wurde „µg Erdnuss pro mL Lösung“ statt „µg Erdnussprotein pro mL Lösung“ verwendet.

Die entsprechend Abschnitt 5.1.2 hergestellte Schokolade, die 905 mg/kg Erdnüsse enthielt, wurde geschmolzen und dann im Verhältnis von ca. 1:9 mit den Schokoladen, die keine Erdnüsse enthielten, vermischt. Der Erdnussgehalt in der neuen Probe betrug somit 92 mg/kg. Der Versuch wurde 12-mal wiederholt und zusammen mit dem Erdnussextrakt als Standard auf einer Platte detektiert. Die Wiederfindungen betragen  $94,5\% \pm 3,2\%$  bei einer Dotierung mit 100 mg/kg und  $86,3\% \pm 2,4\%$  bei einer Dotierung mit 10 mg/kg. Diese Wiederfindungen sind gut. Die Werte könnte man auch als die Reproduzierbarkeit im Intraassay verstehen. Alle Werte sind in Tabelle 20 im Abschnitt 6.11 dargestellt.

### **6.11 Matrixkalibrierung und Statistik**

Die im Abschnitt 5.1.2 beschriebene Schokoladenprobe wurde in verschiedenen Verhältnissen mit der Blindprobe vermischt und mit PBS-Tween20-Puffer extrahiert. Es wurden vier Wiederholungen parallel durchgeführt und der Erdnussgehalt auf einer Platte quantifiziert. Die Werte sind in Abbildung 71 dargestellt.

Die Kurve der Matrixkalibrierung ist sehr gut, da das Bestimmtheitsmaß 0,99 beträgt. Des Weiteren wurde das Präzisionsprofil mit Hilfe der Matrixkalibrierung ermittelt und in Abbildung 72 dargestellt. Die Bestimmungsgrenze von 8 mg/kg wurde beim 20% Wert des Präzisionsprofils ermittelt. Die obere Bestimmungsgrenze konnte nicht ermittelt werden, da alle Präzisionsprofile in diesem Bereich unter 20% lagen.

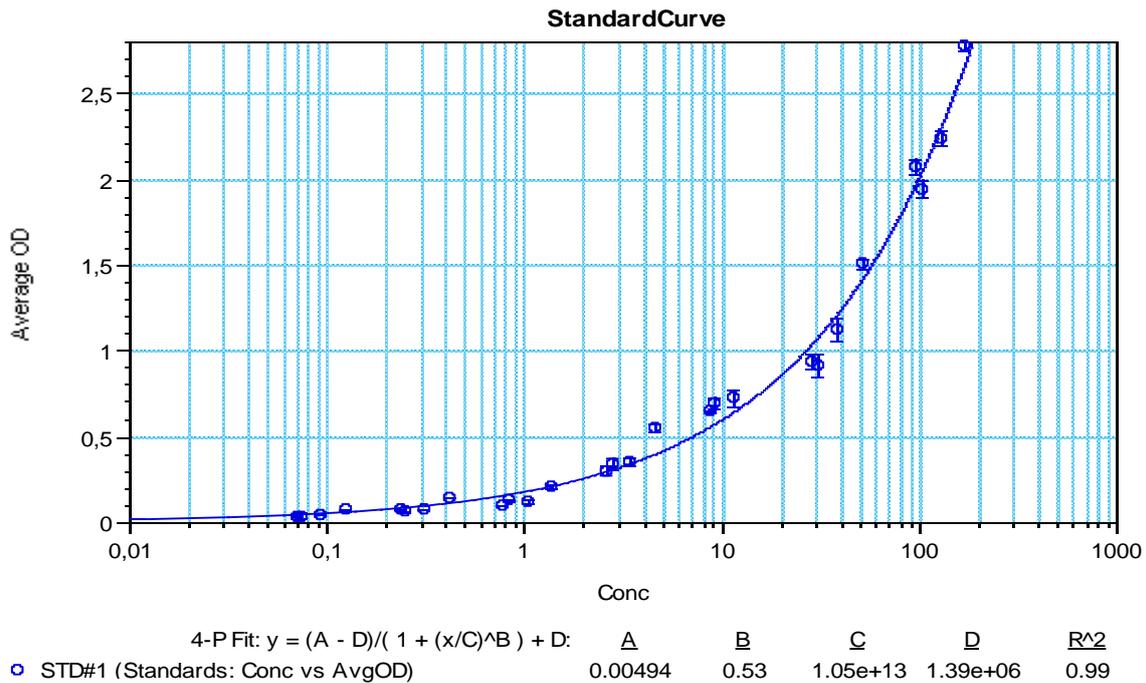


Abbildung 71: Matrixkalibrierung für die Detektion der Erdnuss (X-Achse: logarithmischer Auftrag der Konzentrationen (Conc.: Konzentration, mg/L) Y-Achse: Extinktionen (Average OD: Mittelwert des optischen Dichte); Einzelwerte siehe Tabelle 72 im Anhang 8.16)

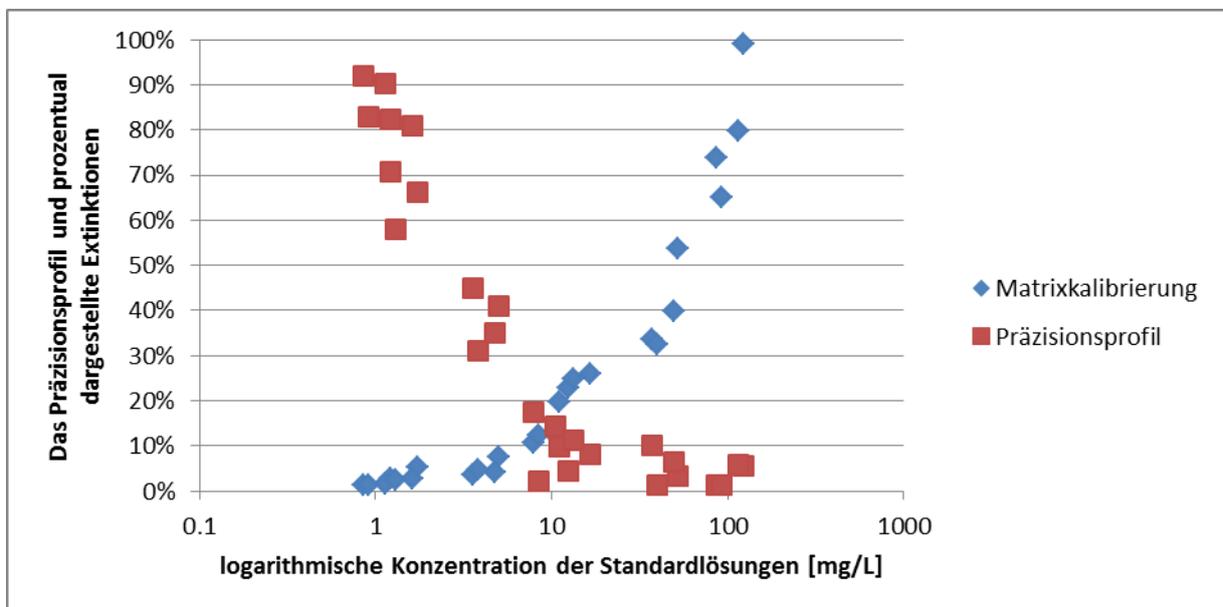


Abbildung 72: Präzisionsprofil der Matrixkalibrierung (X-Achse: logarithmische Konzentration der Standardlösungen [mg/L]; Y-Achse: das Präzisionsprofil und prozentual dargestellte Extinktionen; Einzelwerte siehe Tabelle 72 im Anhang 8.16)

Um die Nachweisgrenze von Erdnuss in Schokoladen zu ermitteln, wurden Extrakte aus der Schokoladenprobe und der Blindprobe hergestellt. Die Extrakte der Schokoladenprobe wurden stufenweise mit der Blindprobe im Verhältnis 1:5 verdünnt. Die so hergestellten Lösungen wurden mit dem Extrakt der Blindprobe auf eine Platte aufgetragen und der Erdnussgehalt in Schokoladen detektiert. Die resultierenden Extinktionen sind in Tabelle 19 dargestellt. Die Nachweisgrenze von Erdnuss in Schokoladen wurde nach der in Abschnitt 6.1.4 beschriebenen Vorschrift zu 3,6 mg/kg berechnet. Im Vergleich zu den von der Firma r-Biopharm in den kommerziellen Kits angegebenen Nachweis- (1,5 mg/kg) und Bestimmungsgrenzen (2,5 mg/kg) waren die mit der hier entwickelten Methode bestimmten Werte schlechter. Eine Erklärung könnte die schlechtere Empfindlichkeit unseres Antikörpers sein.

Tabelle 19: Mittelwert und Standardabweichung der Extinktionen von Erdnuss

Konzentration [mg/kg]	Mittelwert	Standardabweichung
89,2	1,075	0,027
17,8	0,365	0,005
3,6	0,211	0,003
0,71	0,184	0,005
0,14	0,180	0,004
0,03	0,177	0,005
0,01	0,185	0,002
Blindwert	0,189	0,004

Des Weiteren wurde die Reproduzierbarkeit des Inter- und Intraassay-Tests bei zwei Erdnuss-Konzentrationen überprüft. Die Reproduzierbarkeit des Intraassay-Tests wurde in Abschnitt 6.10 überprüft. Die Reproduzierbarkeit des Interassay-Tests wurde mit den gleichen Proben wie im Intraassay-Test auf 12 unterschiedlichen Platten durchgeführt. Die erhaltenen Werte sind in Tabelle 20 dargestellt. Die Wiederfindungen der Erdnuss betragen bei einer Dotierung mit 100 mg/kg 91,1%, bei einer Dotierung mit 10 mg/kg 88,6%. Im Vergleich zum Intraassay-Test war die Reproduzierbarkeit im Interassay-Test schlechter, trotzdem war sie noch als zufriedenstellend zu bewerten.

Tabelle 20: Reproduzierbarkeit der Bestimmung des Erdnussgehaltes im Interassay- und Intraassay-Test

Intraassay			Interassay		
	100 mg/kg	10 mg/kg		100 mg/kg	10 mg/kg
Replikate 1	90,4±2,4%	84,6±2,86%	Tag 1	85,7±1,82%	90,9±3,6%
Replikate 2	88,9±1,2%	86,1±2,54%	Tag 2	98,9±4,15%	92,0±3,7%
Replikate 3	93,8±3,1%	80,9±2,16%	Tag 3	95,9±4,21%	83,6±1,0%
Replikate 4	93,3±3,9%	84,4±2,72%	Tag 4	89,2±3,57%	99,7±2,9%
Replikate 5	93,2±3,8%	87,4±1,84%	Tag 5	84,7±4,11%	85,8±2,1%
Replikate 6	99,0±4,0%	89,9±1,74%	Tag 6	95,3±3,62%	91,5±4,1%
Replikate 7	93,7±3,8%	88,1±2,75%	Tag 7	87,8±3,94%	85,6±3,2%
Replikate 8	94,8±2,5%	85,9±3,44%	Tag 8	99,9±1,95%	92,4±4,1%
Replikate 9	95,8±4,1%	84,8±3,93%	Tag 9	87,4±2,44%	82,6±2,5%
Replikate 10	98,7±1,7%	88,4±3,32%	Tag 10	94,7±3,45%	84,6±2,1%
Replikate 11	98,7±2,8%	86,1±2,03%	Tag 11	80,7±2,94%	90,9±4,1%
Replikate 12	93,3±2,0%	88,6±2,10%	Tag 12	93,2±1,95%	83,2±2,9%
Mittelwert	94,5%	86,3%		91,1%	88,6%
Standardabweichung	3,2%	2,4%		6,1%	5,1%

\*Werte wurde aufgrund der begrenzten Genauigkeit gerundet.

## 7. Diskussion

### 7.1 Probleme mit „versteckten“ Lebensmittelallergenen

Lebensmittelallergien nehmen in entwickelten Ländern immer stärker zu, aber auch in den sogenannten Schwellenländern bedeuten sie ein echtes Problem (Mine et al., 2002; Holzhauser et al., 2003). Geringe Mengen von Allergenen in Lebensmitteln können bereits starke allergische Reaktionen hervorrufen. Bei schweren Fällen treten sogar Todesfälle auf (Sampson, 1992). Eine besondere Gefahr geht von den sogenannten „versteckten“ Allergenen in Lebensmitteln auf, da sie oft analytisch nicht erfasst werden oder erfasst werden können. Allergiker konsumieren daher häufig unbewusst solche „versteckten“ Allergene aus ansonsten harmlosen Lebensmitteln.

Wie bereits erwähnt sind „versteckte“ Allergene häufig analytisch schwer zu bestimmen. Die geringen Mengen Allergene in den verschiedenen Lebensmittelmatrices entziehen sich dem Nachweis, da ihre Konzentration unterhalb der Nachweis- und Bestimmungsgrenze der angewendeten Methoden liegen. Daneben können Matrixbestandteile, z.B. Polyphenole, die Extraktion und damit die Bestimmung dieser Allergene beeinflussen (Makkar et al., 1987; Siebert et al., 1996). Da die meisten Allergene Proteine sind, können sie beim Erhitzen der Lebensmittel koagulieren oder mit der Lebensmittelmatrix reagieren. Diese Reaktionen bewirken in der Regel eine Veränderung der Proteinstruktur und damit auch eine Veränderung der Epitope. Des Weiteren kann sich damit auch das Löslichkeitsverhalten ändern.

In unseren Untersuchungen wurden Muffins und Schokolade als Modellebensmittel gewählt, da Muffins als Backprodukt häufig mit „versteckten“ Allergenen aus der Milch und Schokolade mit „versteckten“ Erdnussallergenen kontaminiert sein können (Vierk et al., 2002; Hefle et al., 2004b).

Das mit Casein dotierte Modellebensmittel Muffin wurde vor und nach dem Backen auf das Vorhandensein von Casein als „verstecktes“ Allergen analysiert. Damit sollte getestet werden, ob Casein nach der Teigherstellung und dem Backprozess noch richtig analysiert werden kann. Beim mit Erdnüssen dotierten Modellebensmittel Schokolade ist ein Problem, dass Erdnüsse vor der Dotierung geröstet werden, wodurch Veränderungen der potentiellen

Allergene stattfinden können. Da die Schokoladenmatrix reich an Polyphenolen ist, können potentielle Allergene an diese binden und damit die Extraktion mit den gängigen Extraktionsmitteln erschweren. In unseren Untersuchungen wurden daher Versuche gemacht, um die Extrahierbarkeit der „versteckten“ Allergene bei den erwähnten Verarbeitungsschritten in beiden Lebensmitteln zu optimieren.

Eine wichtige Voraussetzung für die Extraktion von Allergenen aus den Modelllebensmitteln ist die richtige Dotierung mit Allergenen und die Homogenisierung dieser Lebensmittel vor der Extraktion der „versteckten“ Allergene. Daher wurde in dieser Arbeit ein Hauptaugenmerk auf diese Probleme gelegt. Die Dotierung des Muffin-Teiges mit Casein konnte durch Zubereitung des Teiges unter Zugabe einer wässrigen Casein-Lösung erfolgreich durchgeführt werden. Die Erdnüsse wurden vor der Dotierung sehr fein gemahlen und unter Kneten und Rühren in die geschmolzene Schokoladenmatrix gegeben. Mit diesen beiden Methoden konnten Modellebenmittel hergestellt werden, in denen die Allergene homogen in den Matrices verteilt waren.

## **7.2 Veränderungen von Allergenen während der Herstellung der Modellebenmittel**

Aus der Literatur folgt, dass die Allergenität des Caseins nach Beendigung des Backprozesses von Weizenmehlprodukten bei Anwendung des DBPCFC-Tests noch vorhanden ist. Casein-Allergene sind daher offensichtlich gegen Hitzeeinwirkung stabil (Nowak-Wegrzyn und Fiocchi 2009). Allerdings konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Wiederfindung des Caseins in Muffins von 80% in den ohne Eier hergestellten Teigen in den gebackenen Muffins auf nur noch 10% abnimmt. Diaz-Amigo (2010) dotierte in kommerziellen Kits Erdnussbutterkekse mit 500 mg/kg Magermilchpulver. Nach einer Backzeit von 15 min waren weniger als 10% des ursprünglich zugegebenen Milchproteins nachweisbar. Downs und Taylor (2010) wendeten vier Erhitzungsmethoden des mit Magermilchpulver dotierten Teiges an: Kochen in Wasser, Backen, Braten und Dämpfen. Die Ergebnisse mit dem gebackenen Teig waren gut vergleichbar mit den von Diaz-Amigo (2010) berichteten und unseren Ergebnissen. Downs und Taylor (2010) fanden auch, dass die Wiederfindung der Milchproteine besonders bei trockenen Erhitzungsprozessen (Backen und Braten) reduziert wurde.

Es gibt mehrere Erklärungsmöglichkeiten für die Abnahme der Wiederfindung von Casein nach dem Backen. Demnach könnte Casein mit anderen Proteinen in der Lebensmittelmatrix während der Erhitzung aggregieren (Iametti et al., 1996; Singh, 2004). Dadurch ist das Casein nicht mehr löslich, so dass es nicht extrahierbar ist und sich daher einer nachfolgenden Bestimmung entzieht. Des Weiteren könnten während der Erhitzung Maillard-Reaktionen zwischen Casein und Lebensmittelmatrix stattfinden, wobei die Löslichkeit des Caseins natürlich reduziert werden würde. Ge Pan und Melton (2007) berichteten, dass die Maillard-Reaktionen besonders schnell beim Backen stattfinden, wenn die Teige einen mittleren Wassergehalt hatten und beim Backprozess hohe Temperaturen angewendet wurden. Wenn Casein mittels des ELISA bestimmt werden soll, kann damit nur das lösliche Casein analytisch erfasst werden.

Eine andere Erklärungsmöglichkeit für die Abnahme der Wiederfindung von Casein nach dem Backen könnte sein, dass während des Erhitzungsprozesses die Struktur des Caseins verändert wird. Der zum Nachweis verwendete Antikörper reagiert ja nur auf das native Casein, auf strukturverändertes Casein spricht er nicht an. Allerdings berichten Thompson et al. (2009), dass die Struktur des Caseins beim Erhitzungsprozess relativ stabil ist.

Somit liegt der Hauptgrund für die schlechte Wiederfindung des Caseins nach dem Backprozess auf der Zunahme der Unlöslichkeit des Caseins, was zu einer Reduzierung der Extrahierbarkeit führt. Aber das unlösliche Casein könnte trotzdem allergische Reaktionen beim Konsumenten hervorrufen, da ja, wie Nowak-Wgrzyn et al. (2008) berichteten, die Allergenität des Caseins nach dem Backen nicht verschwunden war.

Auch nach Erhitzen von Erdnussprotein sinkt dessen Löslichkeit. Bei Bestimmung des Erdnussproteins nach Erhitzen mit der Lowry-Methode konnten nur noch 30% des ursprünglich vorhandenen Erdnussproteins gefunden werden. Auch Poms et al. (2004c) berichteten, dass die Protein-Wiederfindung nach Röstung der Erdnüsse im Vergleich zu rohen Erdnüssen um 75-80% abgenommen hatte.

### 7.2.1 Dotierung der Modellebensmittel mit Allergenen

Das Problem bei der Dotierung der Modellebensmittel mit Allergenen besteht darin, dass sehr geringe Mengen von Allergenen in eine komplexe Lebensmittelmatrix homogen eingearbeitet werden müssen.

Deckwart (2009) und Steinhoff (2011) lösten das Problem allerdings auf eine andere Weise, die jedoch für unsere Versuche nicht anwendbar war. Sie wogen sowohl die Allergene als auch die Lebensmittelmatrix in ein Reaktionsröhrchen gemeinsam ein. Dann extrahierten sie aus diesem Reaktionsröhrchen die eingemischten Allergene. Mit dieser Methode konnten jedoch Versuche wie in unserem Fall die Simulation der Teigherstellung und des Backprozesses mit anschließender Extraktion der Allergene nicht durchgeführt werden.

Heick et al. (2011) beschrieben eine elegante Methode zur Herstellung einer homogenen Mischung von Lebensmittelmatrix und Allergenen. Sie wogen das fein vermahlte Allergen zusammen mit der Lebensmittelmatrix in ein Gefäß ein, das anschließend in einem 360° Schüttler lange Zeit geschüttelt wurde, bis die Mischung homogen war. Diese Methode konnte jedoch in unseren Untersuchungen nicht angewendet werden, da kein Rotationsschüttler zur Verfügung stand.

Bei der Dotierung der von uns untersuchten Modellebensmittel haben wir daher folgende Vorgehensweise gewählt, die schlussendlich auch erfolgreich war. Im Fall der Lebensmittelmatrix Muffin stellten wir eine Casein-Lösung her, in der das Casein homogen verteilt war. Die Teigherstellung erfolgte durch Ersetzen des Wassers mit dieser Casein-Lösung. Der so hergestellte Teig wurde lange Zeit geknetet, so dass man sicher war, dass das Casein im Teig homogen verteilt war.

Im Fall der Lebensmittelmatrix Schokolade musste zunächst ein Erdnuss-Standard im Labor hergestellt werden, da es diesen käuflich nicht zu erwerben gab. Dazu wurden die Erdnüsse einer trockenen Röstung unterworfen und dann in einem Porzellanmörser zerkleinert. Die Erdnüsse konnten jedoch in diesem Porzellanmörser nicht völlig homogenisiert werden, das Zerkleinerungsgut war immer noch stückig. Daher wurde anschließend ein Marmormörser eingesetzt. Das so erhaltene Mahlgut mit butterförmiger Konsistenz wurde als Standard-Allergen eingesetzt.

Die anschließende Dotierung der Schokolademasse mit dem Erdnuss-Standard war dann relativ einfach durchzuführen. Schokoladenmasse und Erdnussbutter schmolzen nämlich bei hohen Temperaturen. Damit konnte die Erdnussbutter mit Hilfe eines Handrührers bei 60 ° C bei 2 h Rührzeit homogen in die Schokoladenmasse eingerührt werden.

Die so gewonnenen, mit Allergenen homogen dotierten Proben, wurden dann mit der Blindwertprobe in unterschiedlichen Verhältnissen in das von Deckwart (2009) und Steinhoff (2011) beschriebene Reaktionsröhrchen eingewogen. Damit waren die Allergene in verschiedenen Konzentrationen in den Proben enthalten.

### **7.3 Extraktion der Allergene aus den Lebensmittelmatrices**

An die zu entwickelnde Extraktionsmethode mussten drei Anforderungen gestellt werden. Zunächst musste die Methode eine sehr gute Extraktionseffizienz besitzen. Der verwendete Extraktionspuffer durfte zweitens nicht die Detektionsmethode stören, in unserem Fall durfte dieser Puffer insbesondere keinen negativen Einfluss auf die angewandte ELISA-Methode ausüben. Schließlich durfte der Extraktionspuffer die zu extrahierenden Allergene nicht irreversibel denaturieren, da sonst die Antigenität verloren gegangen wäre.

Basierend auf diesen Anforderungen wurde eine Extraktionsmethode entwickelt, wobei der Extraktionspuffer optimiert wurde, des Weiteren wurden Zusätze zum Extraktionspuffer geprüft und insgesamt eine Optimierung der Gesamtmethode durchgeführt.

#### **7.3.1 Extraktionspuffer**

In der Literatur wird bisher nichts über geeignete Extraktionspuffer zur Extraktion von Casein aus Backprodukten berichtet. Daher wurde in dieser Arbeit eine Reihe von Puffern getestet, die zur Extraktion von Proteinen aus unterschiedlichen Matrices eingesetzt wurden. Keiner dieser in der Literatur beschriebenen Puffer war jedoch geeignet, Casein mit hoher Wiederfindung aus den Muffins zu extrahieren. Es konnten mit den besten Puffern aus der Literatur lediglich 55% des Caseins aus dem Casein-Teig und 9% des Caseins aus den Muffins wiedergefunden werden. Der am besten geeignete Puffer war ein Phosphatpuffer. Die systematische Optimierung ergab, dass der optimale pH-Wert dieses Puffers bei pH 12.1 lag. Bei diesem pH-Wert war die Extraktionslösung klar oder anders ausgedrückt, die Trübung der Extraktionslösung nahm von pH 6,0 bis pH 12,1 stetig ab. Ein ähnliches Ergebnis haben

Liu et al. (2013) berichtet. Eine Denaturierung des Caseins fand bei diesem pH-Wert nicht statt. Bei diesem pH-Wert konnte die Casein-Bestimmung mit dem ELISA durchgeführt werden.

Zur Extraktion der Erdnussproteine aus der Schokoladenmatrix wurden die gleichen in der Literatur beschriebenen Puffer getestet, die auch schon zur Extraktion von Casein aus dem Casein-Teig und den Muffins eingesetzt wurden. Aus den rohen Erdnüssen konnte das gesamte Protein bereits mit dest. Wasser extrahiert werden. Die Löslichkeit der Erdnussproteine nahm jedoch nach Erhitzung stark ab, dies wurde auch in der Literatur berichtet (Poms et al., 2004c). Die weitere Optimierung der Extraktion der Erdnussproteine aus der Schokoladenmatrix wurde daher mit gerösteten Erdnüssen durchgeführt. In diesem Beispiel konnte die Proteinbestimmung mit der Lowry-Methode durchgeführt werden, da keine Matrices enthalten waren. Es musste daher nicht darauf geachtet werden, eine Extraktionsmethode zu entwickeln, die zu keiner Konformationsänderung der Proteine führt. Daher wunderte das Ergebnis nicht, dass mit der Lowry-Methode fast 100 % der Erdnussproteine bestimmt werden konnten, mit dem ELISA war die Wiederfindung der Erdnussproteine jedoch niedrig. Die besten Extraktionspuffer enthielten stets SDS oder Harnstoff im basischen Bereich. Die Extraktion erfolgte daher bei pH 12,0 und die Proteinbestimmung nach der Lowry-Methode. Der ELISA konnte nicht angewendet werden, da entweder der verwendete Puffer nicht ELISA-tauglich war oder die Proteine bei der Extraktion denaturiert wurden.

### **7.3.2 Zusätze zum Extraktionspuffer**

Es wurde versucht, die Extraktion des Caseins aus dem Casein-Teig und den Muffins durch Zugabe von Salz, Detergentien, Hühnereieiklar, Reduktionsmitteln und chaotropen Verbindungen zum Phosphatpuffer zu optimieren. Der optimale Zusatz war die Zugabe von 3 M Harnstoff zum Extraktionspuffer. Harnstoff löst nicht-kovalente Bindungen der Proteine an die Lebensmittelmatrix, denaturiert aber damit auch Proteine. Im Endeffekt wurden aber durch diese Freisetzung die Proteine aus der Lebensmittelmatrix besser extrahierbar. Durch Entfernen des Harnstoffs nach der Extraktion renaturierten die Proteine wieder. Die Harnstoffzugabe zum Extraktionspuffer hatte aber noch einen weiteren Vorteil, schon

geringe Mengen an Harnstoff verhinderten die Polymerisierung der Proteine. Dies wurde bereits von Orsini und Goldberg (1978) berichtet.

Die Zugabe von Harnstoff zum Extraktionspuffer erhöhte die Protein-Wiederfindung auch bei den gerösteten Erdnüssen aus der Schokoladen-Matrix. Das Erdnussprotein konnte allerdings nicht mit dem ELISA bestimmt werden, da das zugesetzte SDS und der Harnstoff die Proteinbestimmung störten (Bata et al., 1964; Anderson et al., 2009).

### **7.3.3 Aufreinigungsmethoden**

Da sowohl das Casein als auch das Erdnussprotein nach der Extraktion mit SDS- und harnstoffhaltigen Extraktionsmitteln zwar gut extrahierbar waren, aber die Bestimmung mittels ELISA wegen dessen Störanfälligkeit durch die Gegenwart dieser beiden Zusätze scheiterte, sollten die extrahierten Proteine einer Aufarbeitung unterzogen werden. Ziel dieser Aufarbeitung war, die störenden Zusätze vollständig zu entfernen bzw. die Denaturierung der Proteine rückgängig zu machen, damit die Proteine mit dem ELISA bestimmt werden konnten. Es wurden folgende Verfahren geprüft: Dialyse, Ultrafiltration, Präzipitation und elektrophoretische Dialyse. In der Literatur liegen zu dieser Fragestellung bisher keine Ergebnisse vor.

Mit der Ultrafiltration, die problemlos durchgeführt werden konnte, konnten jedoch keine positiven Ergebnisse erzielt werden. Der Grund könnte sein, dass die Proteine sich unspezifisch an die Dialysemembran binden (Huisman et al., 2000). Die Methode konnte durch Blockierung der Oberfläche und Nachspülen nicht verbessert werden.

Es wurde die unspezifische Protein-Präzipitation mit einer Ammoniumsulfat-Lösung und die spezifische Präzipitation beim IEP durchgeführt. Mit der Präzipitation des Caseins am IEP gelang die Aufreinigung des Caseins am besten. Dabei fällt zwar das Casein aus, aber die Konfiguration wurde nicht irreversibel verändert. Die Renaturierung konnte daher durch die Einstellung des pH-Wertes mit neutralem PBS-Tween20-Puffer leicht durchgeführt werden. Ein weiterer Vorteil der spezifischen IEP-Fällung war, dass wenig Protein aus der Lebensmittelmatrix ausgefällt wurde, so dass die Casein-Bestimmung mittels ELISA damit kaum gestört wurde.

Zusätzlich wurde eine Dialysemethode für die Aufreinigung des Caseins entwickelt. Da Casein an der Dialysemembran adsorbieren konnte (Blumenkrantz et al., 1981), wurde die Oberfläche der Dialysemembran auf 3 cm<sup>2</sup> verkleinert und mit Weizenmehlextrakt blockiert. Die Wiederfindung des Proteins war bei der Dialyse und der Präzipitation vergleichbar gut. Die Präzipitation bot jedoch gegenüber der Dialyse hinsichtlich des Zeitaufwandes und der Anzahl der durchzuführenden Einzelschritte Vorteile. Daher wurde das Verfahren der Präzipitation angewendet.

Bei der Aufreinigung der Erdnussproteine gab es jedoch ein zusätzliches Problem, diese Proteine haben durchweg unterschiedliche IEP's. Eine Präzipitation an einem bestimmten IEP war somit nicht möglich. Daher wurde versucht, an Stelle der IEP-Fällung die Dialyse-Methode anzuwenden. Es wurde also versucht, das im Erdnussextrakt vorhandene SDS, das den ELISA empfindlich störte, mittels Dialyse zu entfernen. Leider konnte SDS aus dem Erdnussextrakt nicht vollständig entfernt werden. Daher wurde die elektrophoretische Dialyse eingesetzt, damit die negativ geladenen SDS-Ionen im elektrischen Feld zur Anode wandern sollten. Allerdings blieb offensichtlich ein Teil des SDS an die Proteine gebunden, so dass auch diese Aufreinigungsmethode nicht zum erwünschten Ergebnis beim Erdnussprotein führte.

## **7.4 Methodenentwicklung und Methodvalidierung**

### **7.4.1 Methodenentwicklung**

Bei der Entwicklung eines ELISA zur Bestimmung des Caseins wurde festgestellt, dass das häufig verwendete Blockreagenz Magermilch wegen der Antigenität gegen den Anti-Casein-Antikörper bei der Bestimmung von Casein nicht verwendet werden konnte. Daher wurden Tween20, Hühnereiklar und Weizenmehlextrakt als Blockreagenz getestet. Die Blockierung mit Tween20 war nicht vollständig, es resultierten bei den verschiedenen Verdünnungsfaktoren der Proben unstabile Ergebnisse. Hühnereiklar war als Blockierungsreagenz wegen der Dickflüssigkeit nicht geeignet. Am besten funktionierte eine 5%ige Weizenmehlextrakt-Lösung, sie wurde daher als Blockreagenz verwendet. Die weitere Methodenentwicklung zur Bestimmung des extrahierten Caseins war problemlos.

Bei der Bestimmung des Erdnussproteins trat ein anderes Problem auf. Auf dem Markt war kein Erdnussstandard zu erhalten, daher musste dieser im Labor selbst hergestellt werden. Die Extraktion und die Aufreinigung des Proteins aus gerösteten Erdnüssen waren, wie im Abschnitt 6.3 berichtet wurde, nicht erfolgreich. Daher wurde Erdnuss an Stelle von Erdnussprotein als Zielanalyt eingesetzt. Es wurde also Erdnussprotein an Stelle von gerösteter Erdnuss als Biomarker für die ELISA-Bestimmung eingesetzt.

#### **7.4.2 Methodvalidierung**

Da der Kurvenverlauf für den ELISA sigmoidal und nicht linear verläuft, durfte im Rahmen dieser Arbeit keine klassische Validierungsmethode für einen linearen Kurvenverlauf verwendet werden. Daher wurde der Kalibrierbereich durch das Präzisionsprofil berechnet (Hintemann, 2006). Die ermittelten Kalibrierbereiche und die Nachweisgrenzen sind vergleichbar gut oder sogar besser als die bei kommerziellen Kits ermittelten Werte. Die Matrixkalibrierung erfolgte durch Mischung der Blindwertprobe mit den allergenhaltigen Proben. Die Matrixkalibrierung konnte wegen der Begrenztheit der zur Verfügung stehenden Analysenwaage nur in einem begrenzten Bereich durchgeführt werden.

### **7.5 Bestimmung der Allergene**

#### **7.5.1 Immunologische Bestimmung**

Die Methode der Wahl zur Bestimmung von Allergenen ist der ELISA. Gegenüber vielen anderen Methoden bietet der ELISA erhebliche Vorteile. Auf Grund der spezifischen Antigen-Antikörper-Reaktion können Zielproteine eindeutig von Matrixproteinen unterschieden werden. Die Bestimmung der Zielproteine ist quantitativ, empfindlich, schnell und leicht durchzuführen. Ein Nachteil des ELISA bei der Bestimmung von Allergenen in Lebensmitteln ist jedoch, dass bei der Be- und Verarbeitung von Lebensmitteln Allergene denaturiert werden können und damit können sie mit dem ELISA nicht mehr detektiert werden.

Antikörper erkennen die spezifischen Antigene nicht nur auf Grund ihrer linearen Struktur, sondern auch auf der Basis ihrer räumlichen Struktur. Da die räumliche Struktur der Antigene nach dem Produktionsprozess, z.B. dem Backprozess, oft verändert wurde, können die so veränderten Antigene nicht mehr an die Antikörper gebunden werden und somit

können solche veränderten Allergene mit dem ELISA auch nicht mehr bestimmt werden. Ein weiteres Problem besteht darin, dass Proteine, z.B. während eines Erhitzungsprozesses, koagulieren können und damit unlöslich werden. Auch diese Proteine können nicht mehr mit dem ELISA bestimmt werden. Wendet man aber dennoch in diesen Fällen als Detektionsmethode den ELISA an, dann wird die Gefahr des Auftretens allergischer Reaktionen bei Patienten unterschätzt. Nowak-Wegrzyn et al. (2008) berichten über einen Fall, in dem das in Frage stehende Lebensmittel erhitzt wurde, die Proteine koagulierten und die enthaltenen Allergene konnten nicht mehr mit dem ELISA bestimmt werden. Trotzdem traten bei den Testpersonen allergische Reaktionen auf. Bezogen auf unsere Versuche ist daher leicht verständlich, dass bei Anwendung des ELISA im Falle der Bestimmung von Casein in Muffins die Wiederfindung des Caseins bei nur 10% lag.

### **7.5.2 Andere Methoden**

Andere Bestimmungsmethoden für Allergene in Lebensmitteln sind die PCR- und die MS-Analytik sowie der Einsatz von HPLC und Kapillarelektrophorese. Die PCR-Analytik beruht auf der Bestimmung der den Allergenen zu Grunde liegenden DNA. Bei dieser Methode wird zuerst die Anzahl der DNA-Kopien quantifiziert und dann mittels eines Faktors die Allergene bestimmt. Der Vorteil dieser Methode besteht darin, dass die DNA im Gegensatz zu den exprimierten Proteinen thermisch stabil ist (Scaravelli et al., 2009). Wenn in Lebensmitteln die entsprechende DNA noch vorhanden ist, können Allergene auch noch in erhitzten Lebensmitteln bestimmt werden. Nachteilig bei der PCR-Analytik ist jedoch die oft unbefriedigende Genauigkeit und Richtigkeit dieser indirekten Detektion von Allergenen in Lebensmitteln. Wenn ein Fehler bei der DNA-Bestimmung aufgetreten ist, dann multipliziert der sich während der weiteren Amplifikationen der DNA (Kirsch et al., 2009).

Die PCR-Analyse könnte bei unseren Untersuchungen bei der Bestimmung der Erdnussproteine ein geeignetes Verfahren sein, nicht jedoch bei der Bestimmung des Caseins, da in der Milch nur geringe DNA-Mengen vorhanden sind (Murphy et al., 2002). Leukozyten und Epithelzellen in der Milch sind die wichtigsten DNA-Quellen. Daher ist der benötigte Faktor für die Umrechnung der mit der PCR-Analytik erhaltenen Kopien auf Casein nicht möglich. Das in dieser Arbeit eingesetzte Casein wurde so stark aufgereinigt, so dass

praktisch keine DNA mehr enthalten war. Daher konnte die DNA-Analytik bei diesen Untersuchungen nicht angewendet werden.

Die Anwendung der MS zur Bestimmung von Allergenen in Lebensmitteln ist eine relativ neue Methode, die sicherlich noch weiter entwickelt werden kann. Native Proteine werden durch Einsatz der HPLC aus der Matrix abgetrennt und mittels MS quantifiziert (Czerwenka et al., 2007; Ren et al., 2010). Allerdings sind mit dieser Methode denaturierte Proteine, und damit auch Allergene z. B. nach Erhitzung, nicht detektierbar, da das Molekulargewicht durch Polymerisierung bzw. durch Glykolisierung verändert werden kann (Zhang et al., 2012). Heick et al. (2011) und Lutter et al. (2011) publizierten kürzlich eine Verbesserung dieser Methode. Sie verdauten die Allergene mit Trypsin und bestimmten dann die erhaltenen Peptide mittels MS. Zwar wird bei Erhitzungsprozessen auch die räumliche Struktur der Peptide zerstört, die Primärstruktur bleibt jedoch erhalten. Auch die Gefahr der Polymerisierung und der Glykosilierung ist bei diesem Verfahren gering. Zhang et al. (2012) berichten über eine stabile Wiederfindung von Peptiden nach tryptischem Verdau von  $\alpha$ -Lactoglobulin nach unterschiedlichen Erhitzungszeiten, während die Wiederfindung von nativem  $\alpha$ -Lactoglobulin nach Erhitzen drastisch absinkt.

Weitere Methoden zur Bestimmung von Allergenen in Lebensmitteln sind der Einsatz der HPLC (Basha, 1988; Wedholm et al., 2006) und der Kapillarelektrophorese (De Jong et al., 1993; Basha, 1997). Die Proteine wurden nur in den jeweiligen Säulen getrennt und bei 280 nm vermessen. Diese beiden Methoden sind allerdings für die Bestimmung von Allergenen in Lebensmitteln kaum geeignet, da sie zu unspezifisch und zu ungenau sind.

## 8. Anhang

### 8.1 Rezeptur für die Herstellung des mit Casein kontaminierten Modellebensmittels

- Rezeptur des basischen PBS-Puffers:

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>                      70.98 g

NaOH                              1.60 g

mit dest. Wasser auf 500 mL auffüllen

pH-Wert auf 11,5 einstellen

- Rezeptur der Backmischung:

Weizenmehl Typ 405 150 g

Saccharose                      80 g

Palmöl                             40 g

Backpulver                       5 g

### 8.2 Rezeptur für die Herstellung des mit Erdnuss kontaminierten Modellebensmittels

- Inhaltsstoffe der kommerziell erworbenen Schokolade:

Zucker

Kakaobutter

Magermilchpulver

Kakaomasse

Süßmolkenpulver

Butterreinfett

Emulgator (Sojalecithin, E 476)

Aroma (Vanillin)

### 8.3 SDS-PAGE

#### 8.3.1 Lösungen

- Sammelgelpuffer:

Tris-Base                      7,58 g

SDS                              0,5 g

mit dest. Wasser auf 250 mL auffüllen;

pH-Wert auf 6,3 einstellen.

- Trenngelpuffer:

Tris-Base                      45,43 g

SDS                              1 g

mit dest. Wasser auf 250 mL auffüllen;

pH-Wert auf 8,8 einstellen.

- Ammoniumperoxodisulfat (APS)-Lösung: 10 % in dest. Wasser;

- Isopropanol-Lösung: 30 % in dest. Wasser;

- Laufpuffer:

Tris-Base                      3,03 g

SDS                              1 g

Glycin                            14,41 g

mit dest. Wasser auf 1 L auffüllen;

pH-Wert auf 8,3 einstellen.

- Probenreagenz:

Tris-HCl	3,33 g
Tris-Base	3,41 g
SDS	4,24 g
EDTA	0,03 g
Glycerin	20 g
Phenolrot	12,5 mg
CBB-G250	37,5 mg

mit dest. Wasser auf 100 mL auffüllen.

- Acrylamidlösung (kommerzielle Lösung, Carl Roth, Deutschland):

Acrylamid	38.7 g
Bisacrylamid	1.3 g

mit dest. Wasser auf 100 mL auffüllen.

### **8.3.2 Zusammensetzung des Proteinmarkers**

Der Proteinmarker wurde von der Firma Invitrogen bezogen [Invitrogen, 2013]. Zur Zusammensetzung des Proteinmarkers siehe Abbildung 73.



- 3,5 mL Sammelgel in Gelgießapparatur auf Trenngel pipettieren, mit 1 mL 30 %iger Isopropanol-Lösung überschichten und für 45 min polymerisieren lassen;
- Isopropanol auskippen, Kamm einsetzen;
- Sammelgel wie folgt herstellen:

dest Wasser	2 mL
Sammelgelpuffer	2,5 mL
Acrylamidlösung	0,5 mL
APS-Lösung	50 µL
TMB	5 µL

- Sammelgel in Gelgießapparatur pipettieren bis sie voll ist; 45 min polymerisieren lassen;
- Gel aus der Gießapparatur entfernen und auf Laufapparatur übertragen;
- Laufpuffer in Laufapparatur gießen;
- Probe 1:1 mit Probenreagenz versetzen und für 15 min reagieren lassen;
- Kamm aus Gel entfernen, 1-10 µL Probe und 10 µL Marker in Tasche pipettieren;
- Laufapparat an Spannungsquelle anschließen;
- Gel für ca. 35 min bei 35 mA pro Gel laufen lassen;
- Hinweis: Gel muss täglich frisch hergestellt und sofort verwendet werden.

## 8.4 Silberfärbung

### 8.4.1 Lösungen

- Fixierlösung:

Ethanol 96%ig	15 mL
Essigsäure 96%ig	5 mL
dest. Wasser	30 mL

- Inkubationslösung:

Natriumacetat        68 g

Ethanol 96%ig        300 mL

mit dest. Wasser auf 1 L auffüllen

100 mg Natriumthiosulfat und 250 µL 25%ig Glutardialdehyd-Lösung  
(wässrige Lösung) vor der Verwendung in 50 mL o.g. Lösung zugeben.

- Silberlösung:

AgNO<sub>3</sub>                2 g

mit des.t Wasser auf 1L auffüllen

20 µL 36 %ige Formaldehyd-Lösung vor der Verwendung in 50 mL o.g. Lösung  
zugeben.

- Entwicklerlösung:

Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>                25 g

mit dest Wasser auf 1L auffüllen

pH-Wert auf 11,8 einstellen

20 µL 36%igeFormaldehyd-Lösung vor der Verwendung in 100 mL o.g. Lösung  
zugeben.

- Stopplösung:

EDTA                    18,6 g

mit dest. Wasser auf 1 L auffüllen

#### **8.4.2 Durchführung**

- Alle Prozesse wurden auf einem Schüttler bei Raumtemperatur durchgeführt;
- in 50 mL pro Gel Fixierlösung fixieren;
- in 50 mL pro Gel Inkubationslösung inkubieren;

- 5mal mit dest. Wasser 5 min waschen;
- in 50 mL pro Gel Silberlösung versilbern;
- in dest. Wasser 1 min waschen;
- in 10 mL Entwicklerlösung kurz schwenken und Lösung abgießen;
- 40 mL Entwicklerlösung erneut zugeben und Färben bis die Banden gut sichtbar werden;
- 10 min in Stopplösung inkubieren.

## 8.5 Western-Blot

### 8.5.1 Lösungen

- Anodenpuffer I:

Tris-Base                    18,15 g

Ethanol 96%ig            100 mL

mit dest. Wasser auf 500 mL auffüllen

- Anodenpuffer II:

Tris-Base                    1,52 g

Ethanol 96%ig            100 mL

mit dest. Wasser auf 500 mL auffüllen

- Kathodenpuffer:

Amoniumhexansäure 2,6 g

SDS                            0,05 g

Ethanol 96%ig            100 mL

mit dest. Wasser auf 500 mL auffüllen

## 8.5.2 Durchführung

- Graphitanode vollständig mit dest. Wasser anfeuchten
- Vier Lagen Tücher mit Anodenpuffer I tränken und auf Anode legen;
- Zwei Lagen Tücher mit Anodenpuffer II tränken und auf o.g. Tücher legen;
- Membran mit Anodenpuffer II anfeuchten und auf o.g. sechs Lagen Tücher legen;
- SDS-PAGE-Gel auf Membran aufbringen;
- Bereiche an denen kein Transfer erfolgen soll, mit Kunststofffolien abdecken;
- Vier Lagen Tücher mit Kathodenpuffer tränken und auf Gel legen;
- Graphitkathode vollständig mit dest. Wasser anfeuchten und auf Tücher stapeln;
- Alle o.g. Tücher, Membran und Gel müssen luftblasenfrei aufeinander gelegt werden;
- Elektrode an Spannungsquelle anschließen, bei 30 V, 60 mA und 22 W 120 min blotten

## 8.6 Immunfärbung

### 8.6.1 Lösungen

- PBS-Tween20-Puffer:

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	6,90 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	49,69 g
$\text{NaCl}$	43,83 g
Tween20	25 mL

mit dest. Wasser auf 5 L auffüllen

- Citrat-Puffer:

Citronensäure	4,7 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	7,26 g

mit dest. Wasser auf 500 mL auffüllen

- Färbereagenz (muss unmittelbar vor Gebrauch hergestellt werden):

TMB                      12 mg

DONS                      40 mg

in 5 mL 96%igem Ethanol lösen

Citrat-Puffer              15 mL

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>                      10 µL

### 8.6.2 Durchführung

- 2mal in 20 mL PBS-Tween20-Puffer 15 min inkubieren;
- über Nacht mit primärem Antikörper (polyclonal gegen Bovine-Casein, Wirtstier: Kaninchen, GeneTex, USA, 1:2000 in PBS-Tween20-Puffer) inkubieren;
- 3mal mit 20 mL PBS-Tween20-Puffer 5 min waschen;
- 60 min mit sekundärem Antikörper (für die Detektion des Caseins, polyclonal gegen Kanninchen-IgG, Wirtstier: Ziege, Abcam, UK, 1:10000 in PBS-Tween20-Puffer) oder Streptavidin (für die Detektion der Erdnuss, 1:2000 in PBS-Tween20-Puffer) inkubieren;
- 3mal mit 20 mL PBS-Tween20-Puffer 5 min waschen;
- 1min in Citrat-Puffer umpuffern;
- in Färbereagenz bis zur Sichtbarkeit entwickeln.

### 8.7 Ponceau-Färbung

#### 8.7.1 Lösungen

- Ponceau-Färbereagenz:

Ponceau S                      2 g

Trichloressigsäure        3 g

mit dest. Wasser auf 100 mL auffüllen

### 8.7.2 Durchführung

- Membran in Ponceau-Färbe-Reagenz mindestens 30 min inkubieren;
- Membran mit dest. Wasser waschen bis Banden sichtbar werden.

## 8.8 Proteinbestimmung nach Lowry

### 8.8.1 Lösungen

- Lösung A:

$\text{Na}_2\text{CO}_3$                       10 g

$\text{NaOH}$                               2 g

mit dest. Wasser auf 500 mL auffüllen

- Lösung B:

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$               0,5 g

mit dest. Wasser auf 50 mL auffüllen

- Lösung C:

Natriumkaliumtartrat 1,35 g

mit dest. Wasser auf 50 mL auffüllen

### 8.8.2 Durchführung

- Lösung A, B und C vor Gebrauch frisch 100:1:1 herstellen;
- 20  $\mu\text{L}$  Standard- und Probe-Lösung und 800  $\mu\text{L}$  o.g. gemischte Lösung in 1,5-mL-Reaktionsgefäß pipettieren, vermischen und 10 min stehen lassen;
- 40 mL Folin-Ciocalteu-Reagenz in Reaktionsgefäß pipettieren und sofort verschließen und vermischen;
- Lösungen 20 min stehen lassen;
- 200  $\mu\text{L}$  je Lösung in die Wells einer Mikrotiterplatte überführen;

- Nach 20 min bei 720 nm messen.

## 8.9 Sandwich-ELISA

### 8.9.1 Lösungen

- Carbonat-Puffer:

Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>                      7,95 g

NaHCO<sub>3</sub>                      14,7 g

mit dest. Wasser auf 1 L auffüllen;

pH-Wert auf 9,6 einstellen.

- Blockreagenz für die Detektion des Caseins

5 g Weizenmehlextrakt mit 100 mL PBS-Tween20-Puffer 2 h extrahieren;

bei 903 *g* für 10 min zentrifugieren;

Rückstand entfernen.

- Blockreagenz für die Detektion der Erdnuss

5 g Magermilchpulver in 100 mL PBS-Tween20-Puffer lösen.

- Farbreagenz (vor Gebrauch frisch herstellen):

TMB                              5 mg

in 0,2 mL Aceton lösen und 0,8 mL Methanol verdünnen

Citrat-Puffer                      20 mL

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>                              7 µL

### 8.9.2 Detektion des Caseins

- je 200 µL Einfang-Antikörper (polyclonal gegen Bovine-Casein, Wirtstier: Schaf, GeneTex, USA, 1:10000 in Carbonat-Puffer) in Wells auf Platte über Nacht inkubieren;
- 3mal mit 300 µL PBS-Tween20-Puffer waschen;
- mit 300 µL Blockreagenz blockieren;
- 3mal mit 300 µL PBS-Tween20-Puffer waschen;
- 200 µL Standard- und Probe-Lösung auf Platte pipettieren und 1 h inkubieren;
- 3mal mit 300 µL PBS-Tween20-Puffer waschen;
- je 200 µL primären Detektions-Antikörper (polyclonal gegen Bovine-Casein, Wirtstier: Kaninchen, GeneTex, USA, 1:10000 in PBS-Tween20-Puffer) auf Platte 1 h inkubieren;
- 3mal mit 300 µL PBS-Tween20-Puffer waschen;
- je 200 µL sekundären Detektions-Antikörper (polyclonal gegen Kaninchen-IgG, Wirtstier: Ziege, Abcam, UK, 1:10000 in PBS-Tween20-Puffer) auf Platte 1 h inkubieren;
- 3mal mit 300 µL PBS-Tween20-Puffer waschen;
- 200 µL Färbereagenz zugeben und ca. 3 min entwickeln;
- mit 100 µL 10 % H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> stoppen;
- bei 450 nm photometrisch vermessen.

### 8.9.3 Detektion der Erdnuss

- je 200 µL Einfang-Antikörper (polyclonal, Wirtstier: Ziege, Vektor Laboratories, USA, 1:5000 in Carbonat-Puffer) in Wells auf Platte über Nacht inkubieren;
- 3mal mit 300 µL PBS-Tween20-Puffer waschen;
- mit 300 µL Blockreagenz für die Detektion der Erdnuss blockieren;
- 3mal mit 300 µL PBS-Tween20-Puffer waschen;
- 200 µL Standard- und Probe-Lösung auf Platte pipettieren und 1 h inkubieren;
- 3mal mit 300 µL PBS-Tween20-Puffer waschen;
- je 200 µL Detektion-Antikörper (1 mg/mL, polyclonal, biotinyliert, Wirtstier: Ziege, Vektor Laboratories, USA, 1:5000 in PBS-Tween20-Puffer) auf Platte 1 h inkubieren;
- 3mal mit 300 µL PBS-Tween20-Puffer waschen;

- je 200 µL Streptavidin-HRP (1:5000 in PBS-Tween20-Puffer) auf Platte 30 min inkubieren;
- 3mal mit 300 µL PBS-Tween20-Puffer waschen;
- 200 µL Färbereagenz zugeben und ca. 3 min entwickeln;
- mit 100 µL 10 % H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> stoppen;
- bei 450 nm photometrisch vermessen.

## 8.10 Extraktion und Reinigung der Proben

### 8.10.1 Die Zusammensetzung des Puffersystems aus der Literatur

Tabelle 21: Zusammensetzung des Puffersystems aus der Literatur

Nr.	Zusammensetzung	pH	Literaturen
1	Citronensäure·H <sub>2</sub> O 21,01 g/L	4,0	Fa. Eurofins, Hamburg
2	Tris-HCl 78,8 g/L	5,5	
3	Tris-HCl 31,52 g/L; NaCl 8,77 g/L	7,4	
4	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,204 g/L; Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,114 g/L; NaCl 8,01 g/L; KCl 0,224 g/L	7,4	
5	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 9,61 g/L	8,1	
6	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 9,61 g/L / SDS 10 g/L	8,1	
7	Tris-Base 24,23 g/L / NaCl 8,77 g/L	8,2	
8	Harnstoff 360,33 g/L	8,7	
9	Dinatriumtetraborat·10H <sub>2</sub> O 19,07 g/L	9,4	
10	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 10,6 g/L	10,8	
11	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,19 g/L / Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,61 g/L / NaCl 8,01 g/L / KCl 0,201 g/L	7,4	Kim et al., 2002
12	NaCl 8,77 g/L / NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O 1,56 g/L	7,2	Leduc et al., 1999
13	NaCl 8,77 g/L	n.e.	Langeland, 1982; Guo et al., 2009
14	Natriumacetat 8,2 g/L	8,3	Hirose et al., 2004
15	NaCl 50 g/L / NaHCO <sub>3</sub> 25 g/L / Phenol 40 g/L	n.e.	Coca, 1922; Niggemann et al., 1999
16	Tween20 10 g/L; Triton X100 4 g/L in Puffer 11	7,4	Baumgartner et al., 2002
17	SDS 40 g/L in Puffer 11	7,4	Kato et al., 2001a, modifiziert
18	SDS 40 g/L; 2ME 100 g/L	n.e.	Kato et al., 2000; 2001b
19	SDS 40 g/L	n.e.	Kato et al., 2001a
20	Tween20 10 g/L	n.e.	Fernandez et al., 1999
21	Harnstoff 480 g/L	7,7	Natarajan et al., 2005
22	Triton X100 4 g/L	n.e.	Baumgartner et al., 2002, modifiziert

Nr.	Zusammensetzung	pH	Literaturen
23	Triton X100 4 g/L in Puffer 11	7,4	Baumgartner et al., 2002, modifiziert
24	CHAPS 4 g/L in Puffer 11	7,4	Guerrier et al., 2007
25	Tris-HCl 18,9 g/L; Tween20 0,5 g/L; SDS 40 g/L; 2ME 20 g/L	7,4	Morishita, 2008
26	Glycerin 300 g/L	n.e.	Bollag und Edeslstein, 1991
27	EDTA 5 g/L in Puffer 11	7,4	Bollag und Edelstein, 1991
28	2ME 1 g/L in Puffer 11	7,4	Deckwart, 2009
29	Puffer 11	9,6	Kim et al., 2002, modifiziert
30	Tween20 10 g/L in Puffer 11	7,4	Fernandez et al., 1999, modifiziert
31	kommerzielle Extraktionspuffer	n.e.	r-Biopharm, 2013
32	dest. Wasser	n.e.	

n.e.: pH-Wert muss nicht eingestellt werden.

### 8.10.2 Lösung

- Acetat-Puffer:

Natriumacetat      9,68 g

mit dest. Wasser auf 1 L auffüllen;

pH-Wert mit Essigsäure auf 4,6 einstellen.

### 8.10.3 Durchführung

- 0,1 g Probe in 2-mL-Reaktiongefäß einwiegen;
- 2 Edelstahlkugeln (Durchmesse: 3.18 mm) und 1 mL Extraktionspuffer zugeben;
- 10 min bei 2400 rpm in Kugelmühle (Qiagen, Deutschland) mahlen und weiter 50 min bei 420 rpm auf Schüttler schütteln;
- 5 min bei 7378 g zentrifugieren
- 100 µL der o.g. klaren Lösung in 1 mL Acetat-Puffer pipettieren und vermischen;
- bei 7378 g 1 h zentrifugieren
- Überstand dekantieren;
- Casein mit 1 mL PBS-Tween20-Puffer aufnehmen.

## 8.11 Enzymatischer Verdau der Lebensmittelmatrices

### 8.11.1 Lösungen

- Darm-Simulations-Puffer:

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>                      3,60 g

mit dest. Wasser auf 1 L auffüllen;

pH-Wert auf 6,9 einstellen.

### 8.11.2 Stärke-Affinitäts-Aufreinigung (Najafi et al, 2005a und 2005b)

- Ca. 0,5 g Stärke mit 5 mL Darm-Simulations-Puffer mittels Schüttler bei 120 rpm 1 h inkubieren;
- Die Suspension bei 7378 g 5 min zentrifugieren, Überstand dekantieren und in Eisbad kühlen;
- 0,2 g Amylase aus Schweinpankreas in 2 mL vorgekühltem Darm-Simulations-Puffer lösen, die unlöslichen Bestandteile bei 7378 g 5 min zentrifugieren;
- 0,5 mL der Amylaselösung mit gewaschener Stärke mittels Schüttler bei 120 rpm unter Eiskühlung 1 h inkubieren;
- Die Amylaselösung durch Zentrifugieren bei 7378 g 5 min entfernen, und die Stärke mit vorgekühltem Darm-Simulations-Puffer wie oben 30 min inkubieren, diesen Schritt 2-6 mal wiederholen;
- Die Stärke mit 0,5 mL Darm-Simulations-Puffer versetzen, im Wasserbad bei 53 °C 5 min erwärmen und sofort bei 7378 g 5min zentrifugieren;
- Die obere klare Lösung in ein anderes Reaktionsgefäß umfüllen und im Kühlschrank aufbewahren.

### 8.11.3 Amylaseaktivitätsbestimmung

- 2 g Stärke in 100 mL heißem Darm-Simulations-Puffer lösen und einige Sekunden sieden lassen;
- 1 µL Amylase-Lösung zu 100 µL Stärkelösung geben und bei 53 °C im Wasserbad 10 min inkubieren;
- Die Lösung sofort im Eisbad kühlen.

### 8.11.4 Zuckerbestimmung

- Lösung A, B und C aus 8.8.1 vor Gebrauch frisch im Verhältnis 100:1:1 mischen;
- 20 µL Blindwertlösung (Darm-Simulations-Puffer), Standardlösung (0,05% - 1% Maltose in Darm-Simulations-Puffer) bzw. Probenlösung aus 8.11.3 in ein 1,5-mL-Reaktionsgefäß pipettieren und mit 0,8 mL o.g. Lösung mischen;
- 10 min bei 100°C im Wasserbad inkubieren;
- 40 µL Folin-Ciocalteu-Reagenz in Reaktionsgefäß pipettieren und sofort verschließen und mischen;
- Lösungen 20 Minuten bei Raumtemperatur stehen lassen;
- 200 µL je Messlösung in die Wells einer Mikrotiterplatte überführen;
- nach 20-30 min bei 720 nm vermessen.

### 8.12 Rezeptur der Eier-, Schokoladen- und Haselnuss-Muffins

Eier-Muffins:

- |                      |      |
|----------------------|------|
| - Backpulver         | 2 g  |
| - Weizenmehl Typ 405 | 70 g |
| - Zucker             | 6 g  |
| - Palmöl             | 7 g  |
| - Eipulver           | 10 g |

#### Schokloaden-Muffins:

- Backpulver 2 g
- Weizenmehl Typ 405 50 g
- Zucker 25 g
- Palmöl 10 g
- Kakao 5 g

#### Haselnuss-Muffins:

- Backpulver 2 g
- Weizenmehl Typ 405 60 g
- Zucker 10 g
- Palmöl 5 g
- Eipulver 2,5 g
- Haselnuss 11 g

### **8.13 Rezeptur des Modellebensmittel für die Untersuchung der Caseingehalts in Abhängigkeit von Zutaten und physikalischen Parametern**

- Backpulver 5 g
- Weizenmehl Typ 405 175 g
- Zucker 25 g
- Palmöl 25 g
- Eiklarpulver 25 g

## 8.14 Entfernung des SDS aus dem Erdnussextrakt

### 8.14.1 Präzipitation

#### 8.14.1.1 Präzipitationsreagenz

- gesättigte Ammoniumsulfat-Lösung
- Aceton
- 20 % TCA-Lösung in Wasser

Die pH-Werte der o.g. Lösungen werden nicht kontrolliert.

#### 8.14.1.2 Durchführung

- 100 µL des SDS-haltigen Erdnussextrakts mit 900 µL Präzipitationsreagenz mischen;
- 30 min bei 7378 *g* zentrifugieren, Überstand dekantieren;
- 900 µL Präzipitationsreagenz zugeben, Pellets waschen;
- Präzipitationsreagenz durch Zentrifugation bei 7378 *g* 30 min entfernen;
- Waschschrift wiederholen;
- Pellets in 100 µL PBS-Tween20-Puffer aufnehmen.

#### 8.14.2 Elektrophoretische Dialyse

- 10 cm des Dialyseschlauchs in PBS-Tween20-Puffer mit 5 %iger Magermilchpulver-Lösung einweichen und blockieren;
- 1 mL Extrakt in Dialyseschlauch pipettieren;
- Dialyseschlauch verschließen und in Elektrophoresekammer legen;
- Strom auf 13 V, 70 mA und 0,9 W einstellen und 1 h dialysieren.

## 8.15 Proteinbestimmung nach Kjeldahl

### 8.15.1 Lösungen

Natronlauge:

Natriumhydroxid                      350 g  
mit dest. Wasser auf 1 L auffüllen



## 8.16 Einzelwerte

Tabelle 22: Casein-Wiederfindung bei unterschiedlichen Verdünnungen in Prozent

Verdünnungen	Mittelwerte	Standardabweichungen
1:10	38,3%	3,5%
1:20	42,6%	5,5%
1:30	60,3%	2,2%
1:40	67,7%	10,5%
1:60	78,3%	7,5%
1:80	90,8%	20,4%
1:100	142,3%	37,9%

Tabelle 23: Casein-Wiederfindung bei Anwesenheit von Hühnereieiklar- und Weizenmehlextrakt als Blockreagenz

Verdünnung	Wiederfindung					
	1% Hühnereieiklar	5% Hühnereieiklar	10% Hühnereieiklar	1% Weizenmehl	5% Weizenmehl	10% Weizenmehl
1:10	26,4± 2,6%	10,4± 0,2%	4,6± 2,0%	30,1± 6,1%	40,3± 2,0%	35,3± 3,5%
1:20	35,2± 3,5%	12,5± 1,3%	2,8± 1,3%	29,5± 5,2%	62,6± 3,1%	58,3± 5,8%
1:30	43,2± 4,3%	8,5± 0,9%	5,9± 0,3%	42,5± 4,3%	65,3± 6,5%	56,4± 7,2%
1:40	46,2± 3,0%	16,2± 4,5%	6,7± 1,4%	53,3± 1,1%	70,5± 1,4%	59,3± 8,6%
1:60	60,6± 8,3%	17,5± 0,3%	8,6± 0,9%	50,4± 1,5%	68,3± 6,8%	60,2± 6,0%
1:80	72,6± 10,1%	18,2± 1,2%	7,5± 4,2%	70,4± 14,1%	75,0± 12,2%	73,6± 14,7%
1:100	91,3± 18,2%	17,5± 5,3%	9,5± 2,8%	90,9± 27,3%	98,4± 35,0%	87,2± 19,9%

Tabelle 24: Extinktionen und Präzisionsprofil der Grundkalibrierung

Extinktion								
Replikate	1 mg/kg	0,3 mg/kg	0,09 mg/kg	0,027 mg/kg	0,0081 mg/kg	0,00243 mg/kg	0,000729 mg/kg	Blindwert
1	3,523	2,951	1,950	0,777	0,484	0,246	0,177	0,067
2	3,260	2,833	1,891	0,743	0,448	0,232	0,127	0,060
3	3,119	2,697	1,838	0,780	0,481	0,243	0,139	0,063
4	3,155	2,812	1,819	0,823	0,389	0,203	0,115	0,060
5	3,046	2,780	1,830	0,847	0,387	0,207	0,112	0,061
6	3,222	2,750	1,769	0,790	0,381	0,200	0,117	0,058
7	3,319	2,910	1,979	0,811	0,376	0,208	0,117	0,064
8	3,310	3,013	1,979	0,796	0,373	0,205	0,112	0,061
9	3,328	2,752	1,912	0,734	0,364	0,200	0,103	0,062
10	3,377	2,824	1,684	0,447	0,372	0,174	0,091	0,057
11	3,469	2,932	1,637	0,397	0,371	0,170	0,096	0,059
12	3,469	2,959	1,866	0,348	0,357	0,168	0,089	0,054
Mittel-wert	3,300	2,851	1,846	0,691	0,399	0,205	0,116	0,061
Präzisionsprofil								
	70,4%	16,4%	11,3%	18,8%	20,7%	43,2%	95,0%	

Tabelle 25: Casein-Wiederfindung aus den Extrakten des Casein-Teigs bezogen auf den theoretischen Casein-Gehalt

Puffer	Replikate									Mittelwert	Standardabweichung
1	1,0%	1,1%	1,0%	0,5%	0,5%	0,7%	0,8%	0,8%	0,9%	0,8%	0,2%
2	37,3%	42,4%	41,5%	41,7%	46,8%	48,0%	32,7%	36,4%	32,2%	39,9%	5,7%
3	15,7%	16,8%	15,5%	16,0%	19,1%	16,5%	9,8%	8,3%	10,9%	14,3%	3,7%
4	15,4%	14,9%	14,6%	18,0%	20,9%	19,1%	16,1%	15,9%	16,5%	16,8%	2,1%
5	21,3%	20,2%	20,8%	23,3%	19,6%	22,8%	18,7%	18,9%	19,0%	20,5%	1,7%
6	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
7	26,2%	22,8%	20,8%	19,0%	19,3%	15,6%	26,3%	26,8%	24,5%	22,4%	3,9%
8	35,4%	38,0%	37,5%	36,0%	43,1%	41,9%	29,2%	34,6%	31,3%	36,3%	4,5%
9	15,7%	14,3%	14,2%	19,6%	18,3%	17,8%	21,0%	21,5%	20,4%	18,1%	2,8%
10	55,7%	50,4%	60,7%	55,6%	61,6%	70,9%	49,6%	47,5%	46,0%	55,3%	8,0%
11	18,5%	18,8%	18,9%	11,1%	11,8%	10,8%	18,8%	19,0%	21,3%	16,5%	4,1%
12	19,1%	21,0%	17,0%	18,6%	18,2%	17,6%	15,1%	17,4%	13,6%	17,5%	2,2%
13	19,8%	20,9%	18,8%	20,7%	19,0%	20,0%	17,7%	16,4%	16,9%	18,9%	1,6%
14	9,3%	8,6%	9,8%	17,5%	15,5%	13,6%	17,6%	15,9%	15,1%	13,7%	3,5%
15	2,9%	2,5%	2,8%	3,9%	3,8%	3,8%	4,1%	6,8%	4,4%	3,9%	1,3%
16	37,0%	36,2%	31,5%	44,7%	57,9%	48,0%	40,9%	37,3%	39,3%	41,4%	7,8%

Puffer	Replikate									Mittelwert	Standardabweichung
17	0,8%	0,4%	0,5%	0,6%	0,5%	0,5%	1,5%	1,1%	1,1%	0,8%	0,4%
18	2,1%	1,9%	1,6%	0,8%	0,8%	0,7%	1,0%	0,6%	0,9%	1,1%	0,6%
19	1,2%	1,2%	1,2%	1,2%	1,1%	0,5%	1,1%	1,6%	1,2%	1,1%	0,3%
20	19,5%	16,1%	15,3%	15,4%	15,3%	14,0%	13,0%	12,7%	12,1%	14,8%	2,2%
21	34,1%	32,8%	35,3%	44,1%	41,2%	38,7%	28,1%	26,9%	28,2%	34,4%	6,1%
22	13,4%	12,3%	14,1%	14,6%	13,6%	12,7%	18,6%	17,8%	16,2%	14,8%	2,2%
23	35,1%	32,5%	31,7%	40,4%	38,0%	31,5%	33,8%	30,3%	25,5%	33,2%	4,4%
24	27,2%	27,6%	24,4%	21,9%	19,1%	21,8%	20,8%	21,8%	18,0%	22,5%	3,3%
25	0,4%	0,5%	0,7%	0,4%	0,5%	0,5%	1,6%	1,7%	1,6%	0,9%	0,6%
26	14,2%	11,2%	11,5%	1,2%	1,3%	1,4%	9,7%	10,1%	9,0%	7,7%	5,1%
27	10,5%	9,1%	9,6%	10,5%	9,5%	9,7%	9,2%	10,3%	8,5%	9,7%	0,7%
28	13,7%	12,4%	13,7%	14,2%	15,4%	14,2%	13,8%	13,1%	13,3%	13,8%	0,8%
29	43,0%	39,1%	43,4%	40,3%	40,6%	40,2%	36,7%	37,2%	34,0%	39,4%	3,1%
30	25,4%	24,8%	24,2%	28,7%	28,4%	31,1%	15,4%	15,5%	15,5%	23,2%	6,2%
31	9,9%	9,4%	9,6%	11,5%	12,1%	11,5%	10,0%	9,5%	9,6%	10,4%	1,1%
32	16,7%	17,3%	16,7%	15,2%	14,4%	14,3%	12,5%	12,6%	12,6%	14,7%	1,9%

Tabelle 26: Casein-Wiederfindung aus den Extrakten de Casein-Muffins bezogen auf den theoretischen Casein-Gehalt

Puffer	Replikate									Mittelwert	Standardabweichung
1	0,4%	0,4%	0,4%	0,0%	0,0%	0,0%	0,4%	0,3%	0,4%	0,3%	0,2%
2	1,0%	0,9%	1,0%	1,0%	0,9%	1,0%	1,0%	0,9%	1,0%	1,0%	0,0%
3	1,7%	1,7%	1,9%	1,7%	1,7%	1,6%	1,7%	1,6%	1,6%	1,7%	0,1%
4	2,1%	1,7%	1,7%	1,9%	2,0%	1,8%	2,2%	2,0%	2,0%	1,9%	0,2%
5	2,3%	2,4%	2,3%	2,4%	2,3%	2,5%	2,3%	2,3%	2,4%	2,3%	0,1%
6	0,3%	0,3%	0,3%	0,0%	0,0%	0,0%	0,2%	0,2%	0,2%	0,2%	0,1%
7	1,9%	2,0%	2,1%	2,0%	2,1%	2,0%	2,2%	2,1%	2,1%	2,1%	0,1%
8	7,7%	7,8%	8,1%	8,7%	9,3%	8,9%	9,9%	8,7%	7,8%	8,5%	0,8%
9	2,6%	2,5%	2,6%	2,6%	2,8%	2,6%	2,7%	2,7%	2,7%	2,7%	0,1%
10	5,6%	5,8%	5,8%	5,4%	5,6%	5,4%	6,0%	6,0%	5,9%	5,7%	0,2%
11	2,4%	2,6%	2,3%	1,9%	2,0%	2,0%	2,1%	2,2%	2,1%	2,2%	0,2%
12	2,0%	2,1%	2,2%	2,3%	2,1%	2,3%	2,0%	2,2%	2,5%	2,2%	0,2%
13	2,4%	2,5%	2,5%	2,6%	3,6%	2,8%	2,6%	2,6%	2,4%	2,7%	0,4%
14	2,2%	2,1%	2,1%	2,1%	2,0%	2,2%	3,2%	3,0%	3,2%	2,5%	0,5%
15	0,1%	0,1%	0,1%	0,1%	0,1%	0,1%	0,2%	0,2%	0,2%	0,1%	0,1%
16	3,5%	3,9%	3,7%	3,2%	3,2%	2,9%	3,1%	2,7%	2,8%	3,2%	0,4%

Puffer	Replikate									Mittelwert	Standardabweichung
17	2,3%	2,0%	2,5%	2,9%	2,7%	3,0%	2,9%	2,5%	2,7%	2,6%	0,3%
18	2,8%	2,5%	3,0%	2,8%	2,9%	2,7%	1,6%	1,6%	1,5%	2,4%	0,6%
19	3,1%	2,9%	2,8%	2,2%	2,2%	2,4%	1,4%	1,7%	1,8%	2,3%	0,6%
20	1,4%	1,6%	1,3%	1,6%	1,7%	1,6%	0,7%	0,7%	0,8%	1,3%	0,4%
21	4,4%	4,6%	9,8%	5,5%	5,0%	4,8%	4,8%	5,0%	3,8%	5,3%	1,7%
22	1,0%	1,0%	0,9%	1,1%	0,8%	0,7%	1,0%	1,0%	0,9%	0,9%	0,1%
23	1,0%	0,9%	1,0%	0,7%	0,7%	0,8%	0,8%	0,9%	0,8%	0,8%	0,1%
24	2,7%	2,3%	2,0%	2,2%	1,9%	2,3%	1,7%	1,9%	1,6%	2,1%	0,3%
25	6,5%	5,8%	6,4%	10,2%	10,2%	10,0%	10,1%	10,5%	11,0%	9,0%	2,1%
26	1,8%	1,9%	1,7%	1,5%	1,7%	1,5%	1,6%	1,9%	1,7%	1,7%	0,1%
27	0,5%	0,5%	0,5%	0,5%	0,5%	0,4%	0,3%	0,3%	0,2%	0,4%	0,1%
28	1,3%	1,6%	1,2%	1,7%	1,8%	1,7%	2,0%	2,3%	1,8%	1,7%	0,3%
29	3,2%	3,3%	2,6%	3,0%	3,5%	3,3%	3,1%	2,9%	3,0%	3,1%	0,3%
30	0,8%	0,8%	0,9%	0,5%	0,5%	0,5%	0,5%	0,5%	0,4%	0,6%	0,2%
31	0,3%	0,3%	0,2%	0,3%	0,3%	0,3%	0,3%	0,3%	0,3%	0,3%	0,0%
32	1,8%	1,5%	1,3%	1,7%	1,5%	1,6%	1,6%	1,2%	1,1%	1,5%	0,2%

Tabelle 27: Casein-Wiederfindung in Prozent aus Casein-Teig in Phosphat-Puffer bei unterschiedlichen pH-Werten

pH-Wert	4,30	6,50	7,30	11,16	11,55	11,84	12,08	12,30
Replikate	0,4%	3,6%	9,4%	20,9%	55,2%	71,7%	59,0%	61,8%
	0,3%	3,7%	8,8%	27,6%	57,7%	50,7%	62,7%	72,9%
	0,4%	4,0%	15,2%	23,3%	44,8%	60,7%	64,8%	67,4%
	0,1%	3,2%	6,0%	26,8%	48,2%	54,0%	73,5%	70,3%
	0,1%	3,5%	6,0%	27,1%	53,0%	53,4%	58,6%	69,0%
	0,1%	3,2%	7,2%	26,2%	44,4%	61,8%	72,0%	69,0%
	0,6%	3,2%	2,7%	30,8%	52,3%	59,3%	80,5%	66,0%
	0,5%	3,2%	3,1%	31,6%	46,1%	59,3%	61,9%	68,2%
	0,5%	3,3%	3,0%	24,1%	49,1%	59,3%	69,5%	60,5%
Mittelwert	0,3%	3,4%	6,8%	26,5%	53,4%	58,9%	67,0%	67,2%
Standardabweichung	0,2%	0,3%	4,0%	3,4%	4,9%	6,1%	7,4%	4,0%

Tabelle 28: Casein-Wiederfindung in Prozent aus Casein-Muffins in Phosphat-Puffer bei unterschiedlichen pH-Werten

pH-Wert	4,30	6,50	7,30	11,16	11,55	11,84	12,08	12,30
Replikate	0,2%	1,3%	1,5%	3,2%	9,2%	9,1%	11,1%	14,3%
	0,2%	1,3%	1,6%	3,4%	9,2%	8,8%	11,4%	11,9%
	0,2%	1,3%	1,6%	3,4%	7,4%	9,8%	10,5%	9,3%
	0,2%	1,1%	1,6%	3,7%	9,4%	10,2%	12,9%	12,2%
	0,2%	1,1%	1,5%	3,8%	12,3%	10,3%	10,1%	11,0%
	0,3%	1,1%	1,5%	3,7%	8,9%	8,2%	10,7%	9,3%
	0,2%	1,3%	1,1%	4,2%	8,5%	10,4%	14,3%	16,2%
	0,2%	1,4%	1,3%	4,1%	8,4%	9,1%	11,5%	11,4%
	0,2%	1,3%	1,2%	3,9%	8,3%	9,8%	12,1%	10,2%
Mittelwert	0,2%	1,2%	1,4%	3,7%	9,1%	9,5%	11,6%	11,8%
Standardabweichung	0,0%	0,1%	0,2%	0,3%	1,4%	0,8%	1,3%	2,3%

Tabelle 29: Casein-Wiederfindung in Prozent aus Casein-Teig bei unterschiedlichen Konzentrationen des Phosphat-Puffers

Phosphat-Konzentration	1000 mM	700 mM	300 mM	100 mM	70 mM	30 mM	10 mM
Replikate	1,6%	1,9%	17,5%	41,0%	48,9%	52,5%	15,6%
	1,6%	1,7%	19,0%	41,5%	60,5%	47,8%	47,2%
	1,6%	1,7%	17,9%	37,8%	51,7%	42,8%	13,4%
	1,7%	2,1%	15,6%	40,0%	54,5%	50,8%	16,2%
	1,5%	2,0%	15,8%	45,1%	48,7%	42,9%	15,3%
	1,6%	1,8%	15,9%	38,3%	47,3%	37,8%	14,9%
	1,8%	1,9%	12,6%	40,4%	55,2%	49,6%	17,3%
	1,6%	1,8%	12,0%	49,2%	53,9%	50,3%	15,9%
	1,6%	1,7%	13,1%	40,8%	51,2%	41,5%	13,9%
Mittelwert	1,6%	1,8%	15,5%	41,6%	52,4%	46,2%	18,9%
Standardabweichung	0,1%	0,1%	2,5%	3,6%	4,1%	5,1%	10,7%

Tabelle 30: Casein-Wiederfindung in Prozent aus Casein-Muffins bei unterschiedlichen Konzentrationen des Phosphat-Puffers

Phosphat-Konzentration	1000 mM	700 mM	300 mM	100 mM	70 mM	30 mM	10 mM
Replikate	0,5%	0,8%	3,5%	7,2%	9,3%	7,9%	3,0%
	0,5%	0,8%	3,8%	7,1%	8,7%	7,6%	2,8%
	0,6%	0,8%	3,6%	6,8%	7,9%	7,5%	2,7%
	0,5%	0,8%	2,7%	7,4%	9,3%	5,7%	3,4%
	0,5%	0,8%	3,0%	7,7%	9,2%	4,7%	2,9%
	0,5%	0,8%	2,8%	6,9%	9,0%	5,2%	2,6%
	0,5%	0,8%	2,4%	7,8%	9,3%	5,4%	3,1%
	0,5%	0,8%	2,4%	7,8%	9,1%	5,1%	3,0%
	0,6%	0,8%	2,5%	6,8%	8,7%	5,4%	2,6%
Mittelwert	0,5%	0,8%	3,0%	7,3%	8,9%	6,1%	2,9%
Standardabweichung	0,0%	0,0%	0,6%	0,4%	0,5%	1,2%	0,3%

Tabelle 31: Casein-Wiederfindung in Prozent aus Casein-Teig bei unterschiedlichen Salzzusätzen

	Salzkonzentration	1000 mM	700 mM	300 mM	100 mM	70 mM	30 mM	10 mM	0 mM
	Natriumchlorid	Replikate	16,0%	26,1%	42,6%	40,1%	53,5%	39,8%	42,2%
13,0%			25,3%	44,6%	40,3%	55,5%	34,1%	42,8%	43,2%
13,3%			21,8%	37,8%	36,8%	44,2%	40,7%	42,1%	36,8%
17,0%			25,8%	39,3%	36,6%	42,6%	39,6%	48,3%	47,7%
15,5%			23,2%	33,9%	42,7%	44,1%	46,2%	41,1%	54,0%
15,1%			23,8%	33,0%	35,5%	41,6%	32,3%	39,6%	42,4%
16,6%			23,5%	21,9%	39,0%	33,7%	45,2%	57,3%	53,4%
16,3%			21,4%	22,4%	40,6%	42,5%	35,6%	48,1%	52,6%
18,0%		23,3%	23,2%	41,2%	48,9%	34,8%	42,4%	49,3%	
Mittelwert		15,7%	23,8%	33,2%	39,2%	45,2%	38,7%	44,9%	47,0%
Standardabweichung	1,6%	1,7%	8,8%	2,4%	6,6%	4,9%	5,5%	5,9%	
Kaliumchlorid	Replikate	8,8%	15,3%	27,8%	19,9%	34,3%	40,3%	32,0%	33,7%
		10,2%	14,8%	26,6%	26,2%	34,3%	38,2%	30,7%	31,5%
		9,2%	14,4%	25,1%	22,4%	33,3%	41,8%	33,3%	28,1%
		10,9%	16,2%	22,5%	26,8%	36,1%	26,0%	33,5%	42,9%
		11,4%	17,9%	40,3%	27,8%	38,7%	27,3%	31,1%	43,4%
		11,2%	17,0%	24,6%	25,3%	40,7%	27,9%	33,8%	41,0%
		11,1%	16,5%	12,8%	27,5%	41,3%	29,5%	36,3%	52,1%
		11,9%	17,9%	13,0%	29,8%	39,2%	29,8%	32,4%	52,1%
		11,7%	17,4%	14,0%	27,9%	36,3%	28,9%	29,5%	45,5%
	Mittelwert	10,7%	16,4%	23,0%	26,0%	37,1%	32,2%	32,5%	41,1%
Standardabweichung	1,1%	1,3%	8,9%	3,1%	3,0%	6,1%	2,0%	8,5%	

Tabelle 32: Casein-Wiederfindung in Prozent aus Casein-Muffin bei unterschiedlichen Salzzusätzen

	Salzkonzentration	1000 mM	700 mM	300 mM	100 mM	70 mM	30 mM	10 mM	0 mM
	Natriumchlorid	Replikate	2,0%	3,0%	4,3%	5,8%	7,7%	5,8%	6,2%
2,0%			3,0%	4,3%	6,4%	6,8%	6,0%	6,2%	7,0%
2,0%			2,8%	4,0%	5,6%	7,1%	7,1%	5,7%	6,3%
2,2%			2,9%	4,3%	7,0%	7,2%	5,7%	6,5%	6,5%
2,1%			3,2%	4,1%	6,2%	9,2%	6,9%	6,2%	7,2%
2,1%			3,0%	3,6%	6,0%	7,1%	5,7%	6,1%	6,2%
2,0%			3,4%	3,6%	7,2%	7,1%	6,1%	7,5%	7,1%
2,0%			3,2%	3,3%	7,0%	7,2%	6,1%	6,6%	8,4%
2,1%			3,0%	3,5%	6,6%	7,6%	6,0%	6,0%	7,8%
Mittelwert		2,1%	3,1%	3,9%	6,4%	7,4%	6,1%	6,3%	7,1%
Standardabweichung	0,1%	0,2%	0,4%	0,5%	0,7%	0,5%	0,5%	0,7%	
Kaliumchlorid	Replikate	2,2%	4,8%	7,8%	7,6%	11,4%	9,1%	8,9%	10,1%
		2,1%	5,1%	7,5%	7,5%	10,1%	7,8%	9,0%	10,1%
		2,1%	4,8%	6,6%	7,2%	9,6%	9,1%	7,9%	9,4%
		2,7%	5,7%	5,9%	8,6%	11,5%	8,2%	10,5%	9,7%
		2,6%	5,3%	6,7%	8,0%	10,8%	7,1%	10,3%	10,0%
		2,3%	5,5%	6,1%	7,9%	13,3%	8,2%	8,2%	8,7%
		2,6%	4,7%	4,7%	10,2%	8,6%	8,8%	11,5%	10,7%
		2,8%	4,8%	4,6%	10,2%	10,3%	8,7%	10,0%	9,6%
		2,4%	4,7%	4,6%	10,4%	10,5%	7,8%	8,5%	9,0%
	Mittelwert	2,4%	5,0%	6,0%	8,6%	10,7%	8,3%	9,4%	9,7%
Standardabweichung	0,3%	0,4%	1,2%	1,3%	1,3%	0,7%	1,2%	0,6%	

Tabelle 33: Casein-Wiederfindung in Prozent aus Casein-Teig bei unterschiedlichen Detergenzienkonzentrationen

Tween20	Konzentration	10%	7%	3%	1%	0,7%	0,3%	0,1%	0%
	Replikate	28,1%	19,8%	20,4%	39,8%	27,0%	10,8%	32,1%	47,8%
		25,0%	28,0%	23,5%	39,7%	33,9%	10,1%	35,9%	59,2%
		23,5%	32,7%	20,4%	31,6%	33,1%	10,9%	35,6%	53,8%
		29,6%	15,4%	16,6%	36,6%	56,5%	23,3%	32,1%	47,6%
		24,7%	19,8%	16,0%	28,2%	28,7%	19,6%	30,5%	52,8%
		28,2%	24,9%	16,5%	24,1%	30,1%	24,3%	49,3%	47,8%
		35,9%	25,1%	26,1%	30,1%	29,4%	18,0%	45,8%	37,1%
		31,0%	25,2%	31,8%	40,7%	26,7%	16,8%	35,4%	53,5%
	32,8%	25,3%	28,2%	31,2%	23,7%	19,2%	26,6%	41,3%	
Mittelwert	28,8%	24,0%	22,2%	33,6%	32,1%	17,0%	35,9%	49,0%	
Standardabweichung	4,1%	5,1%	5,6%	5,9%	9,7%	5,4%	7,3%	6,8%	
SDS	Konzentration	10%	7%	3%	1%	0,7%	0,3%	0,1%	0%
	Replikate	0,3%	0,4%	0,2%	0,1%	0,3%	27,7%	14,6%	41,4%
		0,3%	0,3%	0,2%	0,1%	0,4%	27,4%	12,1%	41,5%
		0,3%	0,3%	0,2%	0,0%	0,4%	20,4%	9,5%	27,8%
		0,4%	0,4%	0,2%	0,1%	0,4%	36,0%	14,5%	51,6%
		0,4%	0,4%	0,2%	0,1%	0,4%	34,7%	12,4%	51,1%
		0,4%	0,4%	0,2%	0,1%	0,3%	33,7%	11,9%	46,5%
		0,3%	0,2%	0,2%	0,1%	0,4%	36,9%	12,2%	43,1%
		0,3%	0,2%	0,2%	0,1%	0,4%	40,1%	12,3%	40,6%
	0,4%	0,2%	0,2%	0,1%	0,4%	35,5%	10,6%	40,5%	
Mittelwert	0,3%	0,3%	0,2%	0,1%	0,4%	32,5%	12,2%	42,7%	
Standardabweichung	0,1%	0,1%	0,0%	0,0%	0,0%	6,1%	1,6%	7,1%	

Triton X100	Konzentration	10%	7%	3%	1%	0,7%	0,3%	0,1%	0%
	Replikate	17,3%	17,4%	15,9%	17,2%	12,5%	17,6%	23,5%	39,7%
		17,7%	16,4%	14,2%	20,8%	11,8%	23,8%	22,3%	43,8%
		18,0%	16,7%	15,7%	16,1%	12,4%	17,0%	25,8%	29,9%
		18,2%	14,6%	12,5%	15,2%	15,6%	21,0%	23,0%	43,0%
		17,8%	17,0%	14,5%	17,2%	3,0%	20,3%	34,3%	47,4%
		17,5%	17,9%	16,7%	15,5%	15,4%	20,2%	29,8%	52,8%
		17,2%	15,9%	16,6%	17,8%	15,2%	18,8%	22,4%	37,1%
		17,2%	17,5%	18,9%	16,8%	10,2%	19,9%	23,0%	46,5%
		16,6%	15,6%	17,5%	15,7%	14,1%	21,6%	24,7%	29,9%
	Mittelwert	17,5%	16,6%	15,8%	16,9%	12,3%	20,0%	25,4%	41,1%
Standardabweichung	0,5%	1,0%	1,9%	1,7%	3,9%	2,1%	4,1%	7,8%	

Tabelle 34: Casein-Wiederfindung in Prozent aus Casein-Muffins bei unterschiedlichen Detergenzienkonzentrationen

Tween20	Konzentration	10%	7%	3%	1%	0,7%	0,3%	0,1%	0%
	Replikate	8,3%	8,0%	5,1%	7,6%	6,2%	1,7%	6,5%	7,5%
		7,2%	9,1%	5,1%	7,2%	6,2%	1,8%	5,2%	7,2%
		7,5%	7,9%	5,1%	6,7%	5,9%	1,9%	5,4%	6,7%
		8,6%	7,9%	5,2%	7,1%	5,2%	3,4%	6,0%	6,6%
		4,0%	8,4%	5,2%	7,6%	5,9%	3,2%	6,1%	6,8%
		7,8%	7,7%	5,0%	6,8%	5,1%	2,9%	6,1%	6,3%
		8,1%	6,2%	5,3%	7,8%	5,0%	2,9%	5,6%	5,4%
		8,3%	6,9%	5,3%	8,5%	5,2%	2,9%	5,6%	6,4%
		8,9%	6,3%	5,3%	7,3%	5,6%	2,5%	5,7%	6,0%
Mittelwert	7,6%	7,6%	5,2%	7,4%	5,6%	2,6%	5,8%	6,5%	
Standardabweichung	1,5%	1,0%	0,1%	0,6%	0,5%	0,6%	0,4%	0,6%	
SDS	Konzentration	10%	7%	3%	1%	0,7%	0,3%	0,1%	0%
	Replikate	0,3%	0,2%	0,2%	0,1%	0,4%	5,2%	5,6%	7,7%
		0,3%	0,2%	0,1%	0,1%	0,4%	4,5%	5,1%	6,9%
		0,3%	0,2%	0,1%	0,1%	0,4%	5,1%	4,7%	6,0%
		0,2%	0,2%	0,1%	0,1%	0,3%	7,5%	6,4%	6,2%
		0,2%	0,2%	0,1%	0,1%	0,3%	6,8%	5,1%	6,1%
		0,2%	0,2%	0,2%	0,0%	0,3%	7,3%	4,6%	5,2%
		0,3%	0,2%	0,1%	0,1%	0,3%	8,6%	5,3%	5,4%
		0,3%	0,2%	0,1%	0,1%	0,3%	7,7%	5,3%	5,4%
		0,3%	0,2%	0,1%	0,1%	0,3%	7,2%	4,7%	4,7%
Mittelwert	0,3%	0,2%	0,2%	0,1%	0,4%	6,7%	5,2%	6,0%	
Standardabweichung	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,1%	1,4%	0,6%	0,9%	

Triton X100	Konzentration	10%	7%	3%	1%	0,7%	0,3%	0,1%	0%
	Replikate	8,1%	8,7%	7,7%	9,3%	5,1%	4,6%	6,0%	8,1%
		7,5%	8,5%	9,5%	9,6%	5,6%	4,8%	6,5%	8,5%
		7,6%	8,2%	8,4%	8,2%	8,1%	4,9%	6,4%	8,5%
		8,0%	7,9%	8,1%	8,9%	7,4%	6,8%	6,9%	8,3%
		8,2%	8,7%	8,2%	6,9%	6,2%	6,8%	7,0%	7,4%
		7,1%	8,5%	6,9%	8,0%	5,6%	6,5%	7,9%	9,5%
		8,1%	7,3%	9,3%	7,8%	7,1%	5,0%	5,9%	11,5%
		8,7%	8,0%	8,7%	7,3%	7,1%	5,3%	6,2%	8,9%
		8,3%	7,5%	9,5%	6,1%	5,0%	5,6%	5,7%	9,2%
	Mittelwert	8,0%	8,2%	8,5%	8,0%	6,3%	5,6%	6,5%	8,9%
Standardabweichung	0,5%	0,5%	0,9%	1,2%	1,1%	0,9%	0,7%	1,2%	

Tabelle 35: Casein-Wiederfindung in Prozent aus Casein-Teig bei unterschiedlichen Hühnereieiklarkonzentrationen

Hühnereieiklar-konzentration	2%	1%	0,7%	0,3%	0,1%	0,07%	0,03%	0%
Replikate	13,4%	16,0%	19,0%	43,1%	49,0%	48,0%	48,7%	39,3%
	14,2%	18,2%	19,9%	49,0%	47,0%	35,9%	49,8%	41,8%
	13,5%	16,5%	19,3%	44,4%	41,6%	50,0%	54,9%	38,4%
	15,0%	15,8%	18,5%	43,2%	46,5%	55,3%	39,5%	42,5%
	14,9%	17,9%	16,1%	45,5%	48,5%	41,2%	38,0%	40,0%
	14,0%	18,0%	17,2%	39,3%	39,4%	50,7%	40,0%	58,6%
	14,4%	13,6%	23,4%	43,0%	39,3%	44,7%	45,2%	48,5%
	15,6%	16,6%	19,7%	45,1%	41,1%	49,7%	38,7%	37,6%
	15,4%	14,2%	24,6%	43,0%	40,5%	51,8%	45,2%	59,1%
Mittelwert	14,5%	16,3%	19,7%	44,0%	43,6%	47,5%	44,4%	45,1%
Standardabweichung	0,8%	1,6%	2,7%	2,6%	4,0%	6,0%	5,9%	8,4%

Tabelle 36: Casein-Wiederfindung in Prozent aus Casein-Muffins bei unterschiedlichen Hühnereieiklarkonzentration

Hühnereieiklar-konzentration	2%	1%	0,7%	0,3%	0,1%	0,07%	0,03%	0%
Replikate	4,3%	7,3%	6,3%	7,3%	9,0%	7,5%	8,1%	7,6%
	4,2%	6,2%	6,5%	7,9%	8,8%	6,0%	8,5%	8,5%
	4,5%	6,8%	6,6%	7,9%	7,8%	4,3%	7,8%	7,3%
	5,2%	6,1%	6,5%	7,7%	8,2%	9,8%	8,1%	7,1%
	5,1%	6,5%	6,0%	7,3%	7,5%	7,9%	7,9%	7,9%
	5,1%	6,3%	5,5%	7,3%	9,1%	8,3%	7,6%	7,7%
	4,5%	6,3%	6,6%	9,1%	8,0%	8,3%	7,7%	7,3%
	4,1%	6,8%	6,7%	7,1%	8,3%	8,4%	8,5%	8,6%
	5,2%	6,6%	7,3%	6,9%	8,4%	8,4%	7,5%	5,7%
Mittelwert	4,7%	6,5%	6,4%	7,6%	8,4%	7,7%	8,0%	7,5%
Standardabweichung	0,5%	0,4%	0,5%	0,7%	0,6%	1,6%	0,4%	0,9%

Tabelle 37: Casein-Wiederfindung in Prozent aus Casein-Teig bei unterschiedlichen DTT-Konzentrationen

DTT-Konzentration	30 mM	10 mM	7 mM	3 mM	1 mM	0,7 mM	0,3 mM	0 mM
Replikate	11,0%	11,4%	11,4%	11,4%	17,4%	24,6%	50,4%	62,6%
	11,1%	12,1%	13,6%	12,5%	17,7%	18,7%	54,8%	58,6%
	12,0%	12,3%	11,6%	11,5%	16,4%	21,5%	48,8%	55,7%
	10,9%	11,7%	9,3%	12,5%	20,8%	25,7%	54,8%	55,9%
	10,6%	12,0%	10,7%	13,4%	19,0%	21,5%	48,8%	54,6%
	10,7%	11,9%	10,1%	13,3%	19,5%	22,2%	46,6%	55,9%
	11,2%	11,1%	10,3%	12,7%	16,8%	29,8%	46,7%	69,6%
	10,6%	10,8%	10,9%	13,1%	17,2%	23,3%	43,7%	61,1%
	11,9%	11,6%	11,1%	13,0%	16,5%	24,1%	45,8%	65,8%
Mittelwert	11,1%	11,7%	11,0%	12,6%	17,9%	23,5%	48,9%	60,0%
Standardabweichung	0,5%	0,5%	1,2%	0,7%	1,5%	3,1%	3,8%	5,2%

Tabelle 38: Casein-Wiederfindung in Prozent aus Casein-Teig bei unterschiedlichen 2ME-Konzentrationen

2ME-Konzentration	10%	7%	3%	1%	0,7%	0,3%	0,1%	0%
Replikate	3,2%	15,8%	14,9%	13,2%	18,0%	13,8%	19,9%	61,3%
	3,4%	15,2%	15,0%	13,7%	19,1%	13,5%	18,3%	68,5%
	3,9%	15,9%	14,6%	12,9%	16,6%	13,6%	17,3%	58,2%
	3,0%	14,4%	14,3%	14,6%	19,0%	13,4%	21,3%	62,7%
	3,5%	16,2%	14,4%	15,3%	18,7%	11,7%	19,6%	53,5%
	4,4%	15,9%	12,3%	13,9%	17,0%	13,3%	16,9%	68,8%
	3,7%	14,9%	8,9%	16,2%	15,3%	12,9%	23,6%	58,9%
	4,9%	16,6%	9,5%	15,4%	15,8%	12,2%	22,9%	52,0%
	4,5%	16,2%	10,7%	14,6%	15,8%	10,5%	18,6%	65,4%
Mittelwert	3,8%	15,7%	12,7%	14,4%	17,3%	12,8%	19,8%	61,0%
Standardabweichung	0,6%	0,7%	2,4%	1,1%	1,5%	1,1%	2,4%	6,0%

Tabelle 39: Casein-Wiederfindung in Prozent aus Casein-Teig bei unterschiedlichen Harnstoffkonzentrationen

Harnstoff-Konzentration	6 M	5 M	4 M	3 M	2 M	1 M	0,5 M	0 M
Replikate	47,8%	57,1%	47,0%	71,0%	64,4%	57,1%	71,5%	80,5%
	50,4%	54,8%	57,0%	78,0%	56,8%	51,2%	72,4%	55,9%
	49,1%	68,0%	49,7%	69,6%	72,7%	59,8%	64,9%	56,5%
	51,7%	65,0%	43,4%	67,3%	61,2%	65,8%	63,8%	54,9%
	56,5%	61,4%	44,4%	63,7%	62,7%	55,4%	68,5%	56,9%
	49,9%	66,0%	39,3%	68,5%	57,3%	54,2%	63,3%	52,4%
	48,3%	59,3%	55,6%	69,7%	59,1%	69,9%	70,6%	59,0%
	57,6%	59,3%	66,6%	67,5%	55,0%	68,0%	71,0%	55,8%
	60,3%	58,2%	66,6%	69,1%	57,4%	57,6%	57,8%	46,3%
Mittelwert	52,4%	61,0%	52,2%	69,4%	60,8%	59,9%	67,1%	57,6%
Standardabweichung	4,5%	4,4%	9,9%	3,9%	5,4%	6,5%	4,9%	9,3%

Tabelle 40: Casein-Wiederfindung in Prozent aus Casein-Teig bei unterschiedlichen Harnstoffkonzentrationen

Harnstoff-Konzentration	6 M	5 M	4 M	3 M	2 M	1 M	0,5 M	0 M
Replikate	10,7%	12,8%	11,2%	13,0%	14,8%	10,9%	13,3%	9,6%
	10,5%	13,7%	11,8%	14,1%	14,1%	10,1%	12,2%	9,1%
	10,8%	13,8%	12,3%	12,2%	14,2%	11,6%	11,3%	9,0%
	11,6%	9,8%	7,8%	14,6%	12,7%	12,6%	12,9%	9,8%
	11,1%	10,2%	8,6%	15,1%	13,4%	10,8%	12,1%	10,2%
	11,3%	10,6%	7,9%	14,2%	13,1%	11,1%	10,9%	9,0%
	12,0%	11,7%	11,9%	15,3%	11,1%	12,9%	13,6%	9,0%
	12,5%	12,5%	11,7%	15,3%	10,9%	12,3%	12,9%	10,2%
	13,1%	12,4%	11,4%	14,1%	11,5%	10,8%	14,7%	8,1%
Mittelwert	11,5%	11,9%	10,5%	14,2%	12,9%	11,5%	12,7%	9,3%
Standardabweichung	0,9%	1,5%	1,9%	1,1%	1,4%	1,0%	1,2%	0,7%

Tabelle 41: Casein-Wiederfindung in Prozent aus Casein-Teig bei unterschiedlichen Guanidinhydrochloridkonzentrationen

Guanidinhydrochloridkonzentrationen	Replikate						Mittelwert	Standardabweichung
8 M	19,5%	19,1%	19,5%	19,1%	19,0%	19,6%	19,3%	0,3%
6 M	44,5%	44,0%	44,1%	44,3%	44,3%	44,0%	44,2%	0,2%
4 M	67,9%	70,3%	70,6%	71,2%	70,4%	69,6%	70,0%	1,2%
2 M	66,0%	66,2%	66,2%	66,1%	66,1%	66,1%	66,1%	0,1%
1 M	28,2%	27,9%	27,8%	27,4%	28,5%	27,8%	27,9%	0,4%
0,8 M	17,0%	22,2%	17,4%	17,0%	20,9%	17,4%	18,6%	2,3%
0,6 M	16,1%	15,7%	16,1%	16,1%	15,6%	16,1%	15,9%	0,3%
0,4 M	10,7%	12,1%	11,7%	10,1%	11,6%	9,4%	10,9%	1,1%
0,2 M	5,8%	5,8%	5,9%	5,8%	5,9%	5,8%	5,8%	0,1%
0,1 M	6,0%	5,8%	6,2%	4,7%	5,0%	4,4%	5,4%	0,7%
0 M	59,0%	63,7%	61,3%	59,4%	58,8%	63,1%	60,9%	2,2%

Tabelle 42: Casein-Wiederfindung in Prozent aus Casein-Muffins bei unterschiedlichen Guanidinhydrochloridkonzentrationen

Guanidinhydrochloridkonzentrationen	Replikate						Mittelwert	Standardabweichung
8 M	5,4%	5,3%	5,3%	5,2%	5,4%	5,6%	5,4%	5,3%
6 M	6,1%	6,1%	6,1%	6,1%	6,1%	6,1%	6,1%	6,1%
4 M	13,2%	13,1%	13,1%	13,0%	13,1%	13,0%	13,2%	13,1%
2 M	11,3%	11,7%	11,0%	10,2%	10,5%	11,6%	11,3%	11,7%
1 M	5,3%	5,6%	5,9%	5,8%	5,3%	5,6%	5,3%	5,6%
0,8 M	4,4%	4,7%	4,4%	4,5%	4,4%	4,8%	4,4%	4,7%
0,6 M	4,4%	4,5%	4,5%	4,3%	4,5%	4,4%	4,4%	4,5%
0,4 M	3,3%	3,3%	3,3%	3,3%	3,3%	3,4%	3,3%	3,3%
0,2 M	2,5%	2,5%	2,5%	2,5%	2,5%	2,5%	2,5%	2,5%
0,1 M	3,2%	3,2%	3,2%	3,2%	3,2%	3,2%	3,2%	3,2%
0 M	6,8%	7,5%	7,1%	7,8%	6,9%	7,0%	6,8%	7,5%

Tabelle 43: Casein-Wiederfindung in Prozent aus Casein-Teig bei unterschiedlichen Guanidinthiocyanatkonzentrationen

Guanidinthiocyanatkonzentrationen	Replikate						Mitte-wert	Standardabweichung
6 M	5,8%	14,4%	8,4%	9,2%	5,8%	10,3%	9,0%	3,2%
5 M	14,2%	14,4%	13,9%	13,4%	13,0%	13,5%	13,8%	0,5%
4 M	16,9%	16,7%	14,8%	17,3%	17,4%	14,2%	16,2%	1,4%
3 M	13,8%	14,8%	19,1%	14,7%	18,8%	14,9%	16,0%	2,3%
2 M	13,3%	18,8%	20,5%	17,9%	20,4%	19,4%	18,4%	2,7%
1 M	51,6%	53,8%	49,9%	51,6%	55,7%	51,2%	52,3%	2,1%
0,8 M	66,1%	67,2%	67,0%	65,9%	64,0%	64,4%	65,8%	1,3%
0,6 M	38,2%	37,8%	36,9%	43,7%	42,5%	35,9%	39,2%	3,2%
0,4 M	22,6%	23,8%	22,3%	25,6%	22,3%	26,6%	23,9%	1,8%
0,2 M	24,3%	24,3%	25,7%	24,2%	25,7%	25,1%	24,9%	0,7%
0,1 M	25,9%	32,2%	26,0%	23,4%	31,0%	22,3%	26,8%	4,0%
0 M	33,1%	43,5%	41,2%	37,8%	41,1%	33,0%	38,3%	4,4%

Tabelle 44: Casein-Wiederfindung in Prozent aus Casein-Teig bei unterschiedlichen Argininkonzentrationen

Arginin-Konzentration	0,8 M	0,6 M	0,4 M	0,2 M	0,1 M	0 M
Replikate	15,7%	24,4%	39,4%	37,8%	43,6%	55,3%
	16,1%	25,7%	39,7%	36,8%	43,4%	71,0%
	15,9%	26,5%	39,5%	38,8%	43,5%	73,3%
	15,8%	19,3%	40,2%	39,1%	43,3%	52,0%
	15,8%	17,6%	39,9%	37,3%	43,4%	76,8%
	16,0%	25,2%	40,1%	37,4%	43,4%	60,1%
Mittelwert	15,9%	23,1%	39,8%	37,9%	43,4%	64,8%
Standardabweichung	0,1%	3,7%	0,3%	0,9%	0,1%	10,3%

Tabelle 45: Casein-Wiederfindung in Prozent aus Casein-Muffins bei unterschiedlichen Argininkonzentrationen

Arginin-Konzentration	0,8 M	0,6 M	0,4 M	0,2 M	0,1 M	0 M
Replikate	4,0%	3,5%	4,8%	7,4%	5,8%	3,5%
	4,4%	4,3%	4,9%	7,6%	5,6%	5,2%
	4,6%	3,9%	4,9%	7,0%	5,5%	5,0%
	4,1%	3,5%	4,7%	7,4%	5,3%	4,2%
	3,7%	4,3%	4,8%	7,5%	5,5%	3,9%
	4,3%	3,5%	4,8%	6,7%	5,7%	3,8%
Mittelwert	4,2%	3,8%	4,8%	7,3%	5,6%	4,3%
Standardabweichung	0,1%	3,7%	0,3%	0,9%	0,1%	10,3%

Tabelle 46: Casein-Wiederfindung in Prozent aus Casein-Teig bei unterschiedlichen Zusätzen von chaotropen Verbindungen in PBS-Tween20-Puffer

	Replikate						Mittelwert	Standardabweichung
Guanidinhydrochlorid 2 M	45,0%	44,9%	44,2%	40,5%	39,9%	40,9%	42,5%	2,4%
Arginin 0,2 M	44,7%	42,5%	46,0%	44,0%	46,0%	41,6%	44,1%	1,8%
Guanidinthiocyanat 1 M	78,9%	79,5%	77,1%	77,1%	80,0%	73,5%	77,7%	2,4%
Guanidinthiocyanat 0,8 M	46,1%	49,7%	45,4%	44,1%	65,1%	45,2%	49,3%	8,0%
Harnstoff 3 M	79,7%	72,9%	75,1%	64,7%	82,5%	81,2%	76,0%	6,7%
ohne Zusatz	58,3%	63,4%	61,7%	62,9%	57,4%	62,3%	61,0%	2,5%

Tabelle 47: Casein-Wiederfindung in Prozent aus Casein-Muffins bei unterschiedlichen Zusätzen von chaotropen Verbindungen in PBS-Tween20-Puffer

	Replikate						Mittelwert	Standardabweichung
Guanidinhydrochlorid 2 M	6,54%	7,00%	6,52%	6,91%	7,03%	6,60%	6,77%	0,24%
Arginin 0,2 M	6,70%	6,78%	7,75%	7,78%	6,77%	7,29%	7,18%	0,50%
Guanidinthiocyanat 1 M	8,60%	6,88%	11,18%	9,10%	6,37%	7,61%	8,29%	1,75%
Guanidinthiocyanat 0,8 M	8,37%	8,30%	8,42%	8,36%	8,40%	8,34%	8,37%	0,04%
Harnstoff 3 M	13,17%	12,21%	12,41%	13,16%	11,59%	13,24%	12,63%	0,67%
ohne Zusatz	5,98%	8,13%	6,37%	8,06%	7,18%	5,83%	6,93%	1,02%

Tabelle 48: Casein-Wiederfindung bei unterschiedlicher Temperatur

Temperatur	Teig				Muffin			
	0 °C	23 °C	37 °C	60 °C	0 °C	23 °C	37 °C	60 °C
Replikate	66,2%	65,0%	51,8%	32,9%	9,3%	10,5%	10,1%	5,4%
	59,5%	64,7%	51,5%	38,4%	9,4%	10,0%	11,1%	5,6%
	64,8%	72,8%	52,6%	34,5%	9,6%	10,4%	9,2%	5,7%
	75,0%	65,5%	46,6%	34,9%	10,0%	10,4%	9,6%	5,6%
	69,4%	65,2%	49,0%	35,1%	10,5%	10,7%	9,9%	6,0%
	79,6%	72,9%	48,3%	32,3%	10,3%	10,0%	8,2%	5,5%
	75,1%	59,3%	69,0%	38,1%	9,8%	10,0%	7,5%	5,9%
	73,2%	63,5%	70,0%	37,0%	9,5%	10,3%	7,5%	5,9%
Mittelwert	71,4%	66,1%	56,5%	35,3%	9,8%	10,3%	9,0%	5,7%
Standardabweichung	4,1%	2,5%	5,9%	1,3%	0,4%	0,3%	1,3%	0,2%

Tabelle 49: Casein-Wiederfindung bei unterschiedlicher Extraktionsdauer

Zeit	Teig			Muffin		
	0 min	20 min	50 min	0 min	20 min	50 min
Replikat	67,8%	72,8%	85,5%	8,3%	9,3%	8,6%
	57,4%	77,1%	85,9%	7,6%	8,9%	8,7%
	57,0%	67,6%	75,4%	8,6%	6,8%	7,4%
	74,0%	73,3%	71,8%	8,1%	8,9%	8,6%
	66,3%	74,8%	70,0%	7,7%	8,3%	8,5%
	66,4%	63,8%	65,0%	7,8%	7,6%	7,6%
	75,5%	71,7%	72,9%	8,5%	9,9%	10,7%
	71,2%	69,3%	73,4%	9,0%	8,9%	10,0%
Mittelwert	66,9%	70,2%	73,7%	8,1%	8,4%	8,7%
Standardabweichung	3,8%	3,1%	4,6%	0,5%	1,1%	1,1%

Tabelle 50: Casein-Wiederfindung mit oder ohne Ultraschallbehandlung

Behandlung	ohne Ultraschall	mit Ultraschall
Replikate	66,2%	105,0%
	59,5%	86,8%
	64,8%	84,5%
	75,0%	92,0%
	69,4%	82,7%
	79,6%	87,3%
	75,1%	81,5%
	73,2%	79,4%
	80,2%	77,6%
Mittelwert	71,4%	86,3%
Standardabweichung	4,1%	4,9%

Tabelle 51: Wiederfindung des Casein-Standards nach Dialyse

Blockreagenz	Mehlextrakt			Hühnereieiklar			PBS-Tween20-Puffer	ohne Blockierung
	10 %	5 %	1 %	10 %	5 %	1 %		
Replikate	83,5%	67,6%	52,6%	24,6%	41,7%	53,3%	63,4%	57,2%
	69,5%	81,6%	54,9%	27,4%	40,7%	47,6%	57,0%	47,2%
	76,5%	76,6%	66,7%	21,6%	39,2%	47,4%	67,1%	47,8%
	72,5%	79,7%	64,3%	29,9%	41,5%	46,4%	59,0%	46,9%
	73,9%	70,5%	67,4%	33,4%	25,4%	52,0%	58,7%	49,9%
	76,9%	59,6%	53,5%	21,3%	41,9%	53,6%	68,2%	56,9%
Mittelwert	75,5%	72,6%	59,9%	26,4%	38,4%	50,1%	62,2%	51,0%
Standardabweichung	4,8%	8,3%	7,0%	4,8%	6,4%	3,3%	4,7%	4,8%

Tabelle 52: Wiederfindung des Casein-Standards nach Präzipitation mit unterschiedlichen Präzipitationsreagenzien

Reagenz	Methanol	Ethanol	Aceton	Acetat-Puffer	halbgesättigte Ammoniumsulfat-Lösung	gesättigte Ammoniumsulfat-Lösung
Replikate	2,2%	18,3%	29,1%	93,2%	37,2%	82,7%
	2,6%	18,6%	18,9%	89,0%	34,6%	79,5%
	2,5%	19,8%	11,5%	95,1%	25,9%	84,2%
	2,6%	18,5%	13,1%	102,2%	31,8%	90,0%
	2,3%	16,0%	32,5%	95,9%	29,9%	92,3%
	2,3%	20,6%	27,8%	102,3%	34,1%	93,6%
	2,4%	18,3%	19,9%	90,5%	27,3%	108,4%
	2,7%	19,4%	30,5%	94,7%	25,9%	94,1%
	2,4%	19,8%	29,7%	103,5%	31,3%	86,8%
Mittelwert	2,5%	18,8%	23,7%	96,3%	30,9%	90,2%
Standardabweichung	0,2%	1,3%	7,9%	5,3%	4,0%	8,5%

Tabelle 53: Extinktionen und Präzisionsprofil der Matrixkalibrierung aus Casein-Teig

	Konzentration [mg/kg]	Extinktion			Präzisionsprofil		Konzentration [mg/kg]	Extinktion			Präzisionsprofil
Replikate 1	0,964	3,013	2,943	3,022	3,5%	Replikate 3	0,929	3,149	3,337	3,387	9,9%
	0,710	2,742	2,807	2,801	2,5%		0,691	2,893	3,086	3,131	8,6%
	0,348	2,455	2,500	2,483	1,2%		0,316	2,547	2,701	2,726	4,8%
	0,100	1,715	1,734	1,765	1,1%		0,109	1,956	2,005	1,997	1,1%
	0,063	1,436	1,434	1,480	1,1%		0,076	1,604	1,635	1,600	0,8%
	0,034	1,142	1,150	1,188	1,3%		0,042	1,278	1,365	1,304	2,1%
	0,015	0,676	0,683	0,696	0,7%		0,020	0,869	0,882	0,873	0,4%
	Blindwert	0,075	0,073	0,084			Blindwert	0,054	0,053	0,054	
Replikate 2	0,974	3,201	3,161	3,131	2,9%	Replikate 4	0,951	3,292	3,137	3,237	6,3%
	0,693	3,081	3,046	3,004	2,6%		0,669	2,987	2,839	2,860	5,4%
	0,324	2,650	2,544	2,646	3,0%		0,275	2,455	2,415	2,541	3,1%
	0,120	1,990	1,948	1,985	1,0%		0,107	1,922	1,827	1,923	2,3%
	0,063	1,468	1,420	1,466	1,2%		0,068	1,590	1,559	1,594	0,8%
	0,037	1,246	1,189	1,220	1,4%		0,037	1,222	1,196	1,155	1,7%
	0,016	0,416	0,410	0,423	0,5%		0,015	0,756	0,791	0,761	1,4%
	Blind-wert	0,057	0,054	0,050			Blindwert	0,055	0,059	0,052	

Tabelle 54: Extinktionen und Präzisionsprofil der Matrixkalibrierung aus Casein-Muffins

	Konzentration [mg/kg]	Extinktion			Präzisionsprofil		Konzentration [mg/kg]	Extinktion			Präzisionsprofil
Replikate 1	5,264	2,815	2,788	2,900	3,7%	Replikate 3	5,025	2,833	2,857	2,845	0,8%
	3,591	2,507	2,434	2,435	2,5%		3,669	2,83	2,801	2,903	3,1%
	1,849	2,124	2,034	2,107	2,6%		1,293	2,192	2,246	2,257	1,9%
	0,673	1,486	1,49	1,513	0,8%		0,487	1,457	1,45	1,473	0,7%
	0,385	1,658	1,69	1,713	1,7%		0,341	1,433	1,377	1,444	2,3%
	0,214	0,96	0,998	1,026	2,5%		0,185	1,041	1,002	1,029	1,6%
	0,102	0,763	0,771	0,816	2,8%		0,117	0,782	0,792	0,797	0,7%
	Blindwert	0,103	0,094	0,101			Blindwert	0,09	0,099	0,091	
Replikate 2	5,108	2,932	2,921	2,893	1,3%	Replikate 4	4,918	3,009	2,842	2,714	9,2%
	3,488	2,572	2,668	2,654	3,0%		3,420	2,654	2,627	2,648	0,8%
	1,727	2,239	2,292	2,324	2,3%		1,312	2,025	2,052	2,042	0,7%
	0,609	1,546	1,627	1,698	4,4%		0,634	1,477	1,527	1,423	3,0%
	0,414	1,291	1,403	1,482	5,9%		0,429	1,297	1,221	1,256	2,3%
	0,170	0,683	0,648	0,68	1,6%		0,200	1,127	1,162	1,112	2,0%
	0,092	0,728	0,747	0,721	1,4%		0,092	3,444	3,444	3,481	1,9%
	Blindwert	0,124	0,12	0,12			Blindwert	0,148	0,107	0,107	

Tabelle 55: Casein-Wiederfindung in Eiermuffins bei unterschiedlichem Eierzusatz

	Zusatz	kein	1 % Eipulver	5 % Eipulver	10 % Eipulver	10 % Eigelbpulver	10 % Eiklarpulver
Teig	Replikate	66,8%	67,5%	83,6%	73,5%	55,6%	75,6%
		66,5%	86,7%	82,2%	76,5%	58,8%	77,0%
		66,1%	81,5%	77,6%	72,8%	58,0%	74,4%
		66,8%	79,3%	79,3%	75,5%	57,6%	75,4%
		66,8%	71,9%	86,0%	74,5%	55,8%	75,3%
		66,5%	85,5%	87,6%	71,5%	59,4%	76,2%
		66,0%	74,7%	87,9%	76,6%	56,0%	76,8%
		66,6%	70,3%	85,2%	73,7%	58,0%	77,1%
		66,5%	78,2%	76,3%	72,5%	55,6%	76,8%
	Mittelwert	66,5%	77,3%	82,9%	74,1%	57,2%	76,1%
Standardabweichung	0,3%	6,7%	4,3%	1,8%	1,5%	0,9%	
Muffin	Replikate	10,8%	23,4%	24,2%	31,0%	11,1%	43,1%
		11,5%	23,3%	30,6%	29,4%	10,0%	43,5%
		11,2%	23,5%	28,6%	30,3%	10,0%	42,7%
		11,2%	23,3%	26,0%	30,0%	10,8%	43,3%
		11,3%	23,1%	24,8%	31,1%	9,6%	44,0%
		11,0%	23,1%	28,8%	30,2%	9,3%	43,4%
		11,6%	23,5%	29,9%	30,5%	9,9%	43,7%
		11,6%	23,4%	23,4%	31,3%	11,3%	43,2%
		11,0%	22,5%	25,3%	30,3%	11,0%	43,4%
	Mittelwert	11,2%	23,2%	26,8%	30,4%	10,3%	43,4%
Standardabweichung	0,3%	0,3%	2,7%	0,6%	0,7%	0,4%	

Tabelle 56: Casein-Wiederfindung in Muffins bei unterschiedlichen Backbedingungen

Backtemperatur	Backzeit		
	5min	10min	15min
210°C	36,2±3,2%	34,5±0,9%	32,0±1,0%
180°C	42,9±1,6%	37,6±5,2%	28,1±3,0%
150°C	47,6±3,9%	33,3±1,7%	31,5±2,9%

Tabelle 57: Casein-Wiederfindung im Abhängig von Zutaten

	Teig	Muffin
Standardrezept	67,3±3,1%	37,8±1,4%
Zucker entfernen	79,8±0,6%	42,5±0,7%
Zucker verdoppeln	67,7±0,2%	24,9±0,8%
Palmöl entfernen	68,8±1,1%	32,9±0,9%
Palmöl verdoppeln	77,3±2,1%	24,0±0,1%
Eiklar entfernen	80,9±1,1%	10,4±0,7%
Eiklar verdoppeln	78,9±0,7%	40,5±0,5%
Weizenmeh entfernen	52,1±0,3%	4,3±1,7%
Weizenmehl verdoppeln	80,3±0,8%	24,4±1,3%

Tabelle 58: Extinktionen und Präzisionsprofil der Grundkalibrierung für die Detektion des Erdnussproteins

Konzentration[mg/kg]	2000	600	180	54	16	5	1	Blindwert
Replikate	3,620	3,420	2,903	1,910	0,881	0,373	0,193	0,122
	3,337	3,194	2,932	1,901	0,871	0,365	0,177	0,113
	3,347	3,252	2,870	1,827	0,833	0,352	0,177	0,108
	3,337	3,155	2,810	1,801	0,813	0,330	0,174	0,108
	3,377	3,208	2,830	1,779	0,802	0,346	0,175	0,105
	3,301	3,229	2,839	1,854	0,805	0,336	0,178	0,106
	3,367	3,194	2,796	1,808	0,766	0,330	0,169	0,105
	3,337	3,194	2,772	1,798	0,844	0,327	0,176	0,107
	3,301	3,119	2,793	1,777	0,788	0,333	0,170	0,105
	3,252	3,086	2,682	1,639	0,709	0,300	0,167	0,105
	3,319	3,125	2,682	1,593	0,697	0,295	0,164	0,100
	3,387	3,268	2,738	1,694	0,693	0,302	0,170	0,101
Mittelwert	3,357	3,204	2,804	1,782	0,792	0,332	0,174	0,107
Standardabweichung	0,091	0,087	0,079	0,097	0,064	0,025	0,007	0,006
Präzisions-profil	65,2%	59,7%	7,2%	17,9%	17,1%	75,8%	74,4%	

Tabelle 59: Protein-Wiederfindung bezogen auf die Gesamterdnuss aus gerösteter Erdnuss mit Literaturpuffern

Puffer	ELISA		Bestimmung nach Lowry		Puffer	ELISA		Bestimmung nach Lowry	
	Extrakt	Dialysat	Extrakt	Dialysat		Extrakt	Dialysat	Extrakt	Dialysat
1	8,3±0,4%	12,3±0,8%	10,6±0,6%	6,8±1,2%	17	12,8±1,3%	12,4±0,7%	33,4±1,5%	34,5±5,2%
2	17,8±1,6%	35,4±3,9%	15,2±0,3%	10,8±0,3%	18	0,0±0,0%	0,0±0,0%	40,6±0,8%	33,3±5,4%
3	17,8±0,9%	37,8±0,9%	14,2±0,5%	10,6±1,1%	19	5,3±1,4%	5,2±2,5%	39,0±3,0%	30,4±2,0%
4	17,4±0,2%	31,1±1,6%	11,6±0,5%	8,6±0,6%	20	13,1±0,3%	20,0±0,6%	12,0±0,7%	7,7±0,5%
5	17,5±0,2%	31,8±1,6%	15,9±1,2%	10,0±0,2%	21	7,7±0,1%	14,8±1,7%	25,2±0,7%	17,0±1,1%
6	16,2±0,6%	22,3±0,2%	20,1±1,3%	12,5±0,6%	22	12,2±0,3%	19,2±1,9%	11,5±0,9%	8,6±1,0%
7	12,5±0,3%	22,6±1,6%	14,2±0,2%	7,0±2,0%	23	13,2±0,2%	20,4±1,7%	12,0±0,1%	9,1±0,5%
8	11,5±0,1%	23,2±1,2%	25,5±1,4%	20,2±0,1%	24	13,6±0,7%	18,0±1,5%	10,9±0,5%	7,5±0,6%
9	15,9±1,1%	26,3±4,5%	20,2±1,7%	16,8±0,1%	25	11,3±1,5%	10,2±1,1%	38,4±0,7%	31,9±1,2%
10	13,8±0,1%	21,2±4,1%	28,9±6,5%	19,4±5,5%	26	14,0±0,4%	18,4±0,7%	8,9±0,9%	8,4±0,1%
11	15,9±0,3%	29,8±0,6%	11,6±1,3%	9,9±0,6%	27	10,7±0,3%	9,3±2,1%	10,2±0,7%	11,5±2,1%
12	15,4±0,9%	27,6±0,1%	14,6±0,1%	8,2±0,4%	28	14,6±0,1%	25,0±1,5%	8,7±0,7%	10,7±1,8%
13	14,8±0,9%	17,5±2,6%	11,2±1,7%	7,1±1,4%	29	5,0±0,5%	10,5±1,2%	27,2±2,7%	21,6±1,3%
14	15,0±0,1%	23,5±1,1%	13,2±0,6%	6,9±0,0%	30	15,5±0,5%	22,2±0,7%	11,0±0,1%	11,0±0,6%
15	0,0±0,0%	0,0±0,0%	0,0±0,0%	0,0±0,0%	31	14,2±0,1%	20,2±0,8%	9,5±0,3%	9,6±0,6%
16	14,3±0,3%	22,1±2,1%	14,5±2,7%	9,7±0,2%	32	13,3±0,4%	19,4±1,1%	7,1±0,2%	9,1±0,5%

Tabelle 60: Protein-Wiederfindung bezogen auf die Gesamterdnuss in Phosphat-Puffer bei unterschiedlichen pH-Werten

pH	ELISA				Bestimmung nach Lowry			
	Extrakt	Mittelwert	Dialyse	Mittelwert	Extrakt	Mittelwert	Dialyse	Mittelwert
4,4	1,5%	2,5±0,0%	1,4%	2,5±0,1%	1,8%	2,3±0,5%	0,5%	0,6±0,3%
	1,5%		1,5%		2,6%		0,9%	
	1,5%		1,5%		2,4%		0,5%	
6,1	3,3%	5,0±0,2%	3,3%	4,9±0,3%	1,7%	2,1±0,4%	1,6%	1,4±0,2%
	2,8%		2,8%		2,0%		1,3%	
	2,9%		2,9%		2,5%		1,3%	
6,5	3,3%	5,3±0,1%	3,3%	5,3±0,1%	3,1%	3,0±0,5%	1,7%	1,5±0,1%
	3,1%		3,1%		3,4%		1,5%	
	3,2%		3,2%		2,5%		1,4%	
6,8	3,6%	6,4±0,5%	3,7%	6,4±0,4%	3,2%	3,3±0,7%	1,3%	1,1±0,2%
	3,4%		3,5%		2,6%		1,0%	
	4,4%		4,3%		4,0%		1,0%	
7,2	3,7%	5,5±0,3%	3,4%	5,3±0,2%	3,5%	3,6±0,6%	2,0%	2,5±0,6%
	3,1%		3,1%		3,1%		3,1%	
	3,1%		3,0%		4,3%		2,4%	
10,8	2,3%	4,8±0,4%	2,3%	4,7±0,5%	10,4%	10,3±0,4%	7,3%	7,4±0,3%
	3,1%		3,1%		9,9%		7,7%	
	3,1%		3,2%		10,6%		7,2%	
11,6	1,4%	2,3±0,1%	1,4%	2,2±0,1%	17,5%	17,6±0,3%	15,3%	14,4±1,1%
	1,4%		1,4%		17,8%		14,6%	
	1,2%		1,2%		17,3%		13,2%	
12,0	0,0%	0,1±0,1%	0,0%	0,1±0,1%	15,3%	15,2±0,7%	9,8%	10,2±0,6%
	0,2%		0,2%		15,8%		9,8%	
	0,0%		0,0%		14,4%		10,9%	

Tabelle 61: Protein-Wiederfindung bezogen auf die Gesamterdnuss in Tris-Puffer bei unterschiedlichen pH-Werten

pH	ELISA				Bestimmung nach Lowry			
	Extrakt	Mittelwert	Dialyse	Mittelwert	Extrakt	Mittelwert	Dialyse	Mittelwert
4,4	7,2%	5,6±1,5%	6,0%	7,2±1,1%	5,4%	5,7±0,4%	3,0%	2,7±0,3%
	5,0%		7,7%		5,5%		2,6%	
	4,5%		7,9%		6,1%		2,5%	
7,4	5,3%	7,0±2,0%	9,3%	8,6±0,6%	7,2%	6,7±0,6%	4,6%	5,3±1,2%
	6,6%		8,4%		6,9%		6,7%	
	9,2%		8,2%		6,1%		4,7%	
7,9	11,3%	8,8±3,8%	7,2%	5,2±1,7%	8,2%	7,7±0,5%	5,1%	4,4±0,8%
	10,6%		4,0%		7,5%		3,5%	
	4,5%		4,5%		7,3%		4,5%	
8,1	3,7%	4,2±0,6%	4,4%	5,4±1,1%	9,1%	8,7±0,4%	4,8%	5,7±1,2%
	4,1%		6,6%		8,6%		6,9%	
	4,9%		5,2%		8,4%		5,3%	
8,4	6,1%	6,8±0,6%	5,9%	5,0±2,7%	11,0%	11,3±0,5%	9,0%	6,5±3,8%
	7,3%		7,0%		11,9%		8,3%	
	7,0%		2,0%		11,0%		2,1%	
8,8	7,1%	4,6±2,2%	5,9%	4,4±1,6%	15,5%	14,6±0,9%	11,8%	11,1±1,8%
	3,5%		2,7%		14,6%		9,1%	
	3,2%		4,6%		13,7%		12,4%	
10,6	3,3%	3,6±0,4%	6,1%	7,5±1,2%	17,7%	17,7±0,9%	14,5%	14,5±0,2%
	3,4%		8,1%		16,8%		14,7%	
	4,1%		8,3%		18,6%		14,2%	

Tabelle 62: Optimierung der Phosphatkonzentration

Phosphatkonzentration	ELISA		Bestimmung nach Lowry	
	Protein-Wiederfindung	Mittelwert	Protein-Wiederfindung	Mittelwert
500 mM	9,6%	9,0±0,7%	11,3%	11,0±1,1%
	9,2%		11,9%	
	8,3%		9,9%	
300 mM	8,2%	8,2±0,1%	9,9%	9,9±0,4%
	8,3%		10,3%	
	8,1%		9,5%	
100 mM	7,6%	7,9±0,2%	8,6%	8,8±0,7%
	8,1%		8,2%	
	7,9%		9,5%	
70 mM	7,5%	7,5±0,0%	8,7%	8,7±0,4%
	7,4%		8,4%	
	7,5%		9,2%	
50 mM	7,2%	7,4±0,2%	9,0%	9,4±1,7%
	7,5%		11,3%	
	7,4%		8,0%	
30 mM	6,6%	6,5±0,2%	8,8%	9,1±0,5%
	6,4%		9,0%	
	6,7%		9,7%	
10 mM	6,5%	6,7±0,2%	8,5%	9,0±0,4%
	6,7%		9,3%	
	6,9%		9,3%	
0 mM	5,7%	5,4±0,3%	4,1%	4,4±0,4%
	5,4%		4,2%	
	5,1%		4,9%	

Tabelle 63: Optimierung der Natriumchloridkonzentration

Natriumchlorid-konzentration	ELISA		Bestimmung nach Lowry	
	Protein-Wiederfindung	Mittelwert	Protein-Wiederfindung	Mittelwert
1000 mM	8,2%	8,6±0,4%	10,9%	9,7±1,1%
	8,8%		8,8%	
	8,9%		9,6%	
700 mM	8,4%	8,7±0,3%	12,4%	9,6±2,5%
	8,6%		7,7%	
	9,0%		8,7%	
300 mM	8,5%	7,8±0,7%	7,9%	8,7±1,3%
	7,1%		8,1%	
	7,7%		10,2%	
100 mM	7,2%	7,1±0,1%	7,5%	7,4±0,3%
	7,2%		7,7%	
	7,1%		7,1%	
70 mM	7,9%	7,4±0,6%	7,2%	7,8±0,6%
	6,8%		8,2%	
	7,6%		8,1%	
30 mM	6,5%	6,1±0,5%	7,5%	8,1±0,7%
	5,6%		7,8%	
	6,3%		8,9%	
10 mM	7,4%	7,9±1,0%	8,1%	8,3±0,2%
	9,0%		8,4%	
	7,3%		8,4%	
0 mM	6,4%	5,7±0,7%	8,1%	8,6±0,5%
	5,8%		9,1%	
	5,0%		8,7%	

Tabelle 64: Protein-Wiederfindung bezogen auf die Gesamterdnuss mit SDS-Lösung

SDS-konzentration	10 %	8 %	6 %	4 %	2 %	1 %	0,5 %	0 %
Replikate	29,3%	29,1%	24,4%	27,4%	26,8%	17,3%	16,8%	2,5%
	27,0%	24,3%	22,7%	27,7%	24,8%	17,4%	15,2%	2,5%
	22,9%	29,1%	24,4%	28,5%	22,9%	17,3%	12,8%	2,6%
	20,2%	24,6%	19,5%	28,2%	27,9%	17,9%	15,6%	2,7%
	23,9%	29,3%	27,0%	26,1%	26,7%	17,3%	15,8%	2,7%
	25,2%	25,7%	26,5%	27,4%	22,3%	17,7%	11,0%	2,7%
	23,2%	27,7%	20,2%	28,8%	26,1%	18,1%	10,3%	2,4%
	23,8%	27,3%	26,7%	26,2%	23,7%	17,9%	11,5%	2,5%
	22,1%	25,6%	31,1%	27,4%	26,8%	17,4%	15,1%	2,4%
Mittelwert	24,2%	27,0%	24,7%	27,5%	25,3%	17,6%	13,8%	2,6%
Standardabweichung	2,7%	2,0%	3,6%	0,9%	2,0%	0,3%	2,4%	0,1%

Tabelle 65: Optimierung der Tween20-Konzentration

Tween20-Konzentration	ELISA		Bestimmung nach Lowry	
	Protein-Wiederfindung	Mittelwert	Protein-Wiederfindung	Mittelwert
10 %	7.8%	8.0±0.2%	10.2%	10.0±0.3%
	8.2%		9.6%	
	7.9%		9.9%	
8 %	8.2%	8.2±0.1%	10.6%	11.1±0.5%
	8.1%		11.7%	
	8.4%		11.1%	
6 %	8.5%	7.7±0.8%	10.7%	10.2±0.9%
	7.9%		10.8%	
	6.9%		9.2%	
4 %	7.9%	7.6±0.3%	10.2%	10.0±0.5%
	7.4%		10.3%	
	7.4%		9.5%	
2 %	7.7%	8.1±0.4%	10.9%	10.3±0.6%
	8.2%		9.8%	
	8.4%		10.4%	
1 %	7.9%	7.2±0.6%	9.6%	9.5±0.2%
	6.9%		9.7%	
	6.8%		9.3%	
0.5 %	8.0%	8.0±0.4%	9.3%	9.2±0.3%
	8.4%		8.9%	
	7.6%		9.5%	
0 %	7.1%	6.3±0.7%	9.3%	8.7±0.9%
	6.2%		7.7%	
	5.7%		9.1%	

Tabelle 66: Aufreinigung des Erdnussextrakts mittels Dialyse und Präzipitation

Aufreinigung	ELISA		Bestimmung nach Lowry	
	Protein-Wiederfindung	Mittelwert	Protein-Wiederfindung	Mittelwert
Dialyse PBS-Tween20	1,8%	1,6±0,3%	19,7%	19,2±1,7%
	1,7%		20,6%	
	1,3%		17,4%	
Dialyse Citrat-Puffer pH 4,1	0,6%	0,6±0,1%	9,4%	16,5±6,7%
	0,5%		17,3%	
	0,6%		22,7%	
elektrophoretische Dialyse	7,2%	6,2±1,0%	23,6%	23,3±0,5%
	6,2%		23,5%	
	5,3%		22,6%	
2X elektrophoretische Dialyse	6,5%	6,0±1,4%	22,2%	22,3±0,8%
	7,2%		23,3%	
	4,6%		21,4%	
Aceton-Präzipitation	3,0%	2,8±0,2%	24,8%	16,9±7,3%
	2,6%		10,4%	
	2,8%		15,6%	
TCA-Präzipitation	0,1%	0,1±0,0%	10,3%	15,5±8,1%
	0,1%		24,8%	
	0,0%		11,4%	
Ammoniumsulfat-Präzipitation	2,1%	1,5±0,7%	22,8%	22,7±0,9%
	1,5%		21,7%	
	0,7%		23,6%	
keine Purifikation	0,0%	0,0±0,0%	23,8%	24,8±2,2%
	0,0%		23,2%	
	0,0%		27,3%	

Tabelle 67: Aufreinigung des Erdnussextrakts mittels Präzipitation mit organischen Lösungsmitteln

Aufreinigung	ELISA		Bestimmung nach Lowry	
	Protein-Wiederfindung	Mittelwert	Protein-Wiederfindung	Mittelwert
Aceton -20°C	5,5%	5,1±0,5%	26,1%	22,9±2,8%
	5,2%		20,9%	
	4,6%		21,8%	
Ethanol -20°C	4,2%	4,3±0,1%	22,1%	22,3±0,5%
	4,3%		22,0%	
	4,4%		22,8%	
Methanol -20°C	3,7%	3,6±0,1%	21,5%	22,3±1,1%
	3,6%		23,5%	
	3,5%		22,0%	
Aceton 4°C	4,6%	4,5±0,3%	21,2%	20,9±1,6%
	4,2%		19,1%	
	4,7%		22,4%	
Ethanol 4°C	4,1%	4,0±0,1%	23,3%	22,7±0,5%
	4,0%		22,7%	
	3,9%		22,3%	
Methanol 4°C	2,9%	2,9±0,2%	23,8%	22,7±1,4%
	2,7%		23,3%	
	3,2%		21,1%	

Aufreinigung	ELISA		Bestimmung nach Lowry	
	Protein-Wiederfindung	Mittelwert	Protein-Wiederfindung	Mittelwert
Aceton rt	3,8%	3,9±0,2%	23,7%	22,2±2,6%
	3,9%		23,6%	
	4,1%		19,2%	
Ethanol rt	3,0%	2,9±0,1%	23,2%	22,9±0,4%
	3,0%		23,1%	
	2,8%		22,5%	
Methanol rt	1,3%	1,2±0,1%	22,2%	21,7±0,5%
	1,2%		21,4%	
	1,1%		21,4%	
keine Behandlung	0,0%	0,0±0,0%	24,6%	23,8±1,0%
	0,0%		22,7%	
	0,0%		24,2%	

Tabelle 68: Protein-Wiederfindung bezogen auf die Gesamterdnuss mit Harnstoff-Lösung

konzentration	Extrakt				Dialysat			
	ELISA		Bestimmung nach Lowry		ELISA		Bestimmung nach Lowry	
	Protein-Wiederfindung	Mittelwert	Protein-Wiederfindung	Mittelwert	Protein-Wiederfindung	Mittelwert	Protein-Wiederfindung	Mittelwert
8 M	3,9%	3,8±0,1%	25,0%	23,9±1,6%	3,3%	3,3±0,0%	19,7%	19,9±2,1%
	3,7%		22,1%		3,3%		18,0%	
	3,7%		24,6%		3,3%		22,2%	
6 M	5,4%	5,1±0,3%	20,1%	17,6±2,1%	4,1%	4,0±0,2%	16,0%	14,4±1,6%
	4,8%		16,2%		3,7%		12,8%	
	4,9%		16,5%		4,1%		14,4%	
4 M	5,9%	6,0±0,2%	17,8%	19,1±1,2%	5,4%	4,7±0,6%	18,4%	17,2±1,8%
	6,2%		19,7%		4,5%		18,2%	
	6,0%		19,9%		4,2%		15,1%	
2 M	7,0%	6,9±0,1%	18,1%	17,8±1,2%	---	4,5±0,4%	---	12,4±2,0%
	6,8%		16,5%		4,2%		11,0%	
	6,7%		18,9%		4,8%		13,8%	
1 M	7,0%	7,3±0,4%	14,3%	15,3±1,1%	4,6%	4,7±0,4%	12,1%	12,3±1,0%
	7,7%		16,6%		4,3%		11,5%	
	7,1%		15,1%		5,1%		13,4%	
0,5 M	7,2%	7,2±0,1%	13,0%	14,1±2,4%	4,4%	4,7±0,3%	9,6%	9,7±0,1%
	7,1%		12,4%		5,0%		9,8%	
	7,4%		16,8%		4,8%		9,7%	
0 M	6,5%	6,5±0,1%	7,4%	8,1±1,1%	4,8%	4,9±0,3%	8,5%	7,3±1,0%
	6,6%		9,3%		4,7%		6,9%	
	6,4%		7,6%		5,3%		6,6%	

Tabelle 69: Protein-Wiederfindung bezogen auf die Gesamterdnuss mit Guanidinhydrochlorid-Lösung

Konzentration	Extrakt				Dialysat			
	ELISA		Bestimmung nach Lowry		ELISA		Bestimmung nach Lowry	
	Protein-Wiederfindung	Mittelwert	Protein-Wiederfindung	Mittelwert	Protein-Wiederfindung	Mittelwert	Protein-Wiederfindung	Mittelwert
8 M	0,0%	0,0±0,0%	29,0%	29,3±0,4%	0,5%	0,3±0,2%	12,0%	15,8±4,0%
	0,0%		29,8%		0,1%		15,3%	
	0,0%		29,1%		0,1%		20,0%	
6 M	0,0%	0,0±0,0%	27,6%	28,3±0,7%	2,3%	2,5±0,5%	11,3%	13,4±2,0%
	0,0%		28,5%		3,1%		15,1%	
	0,0%		28,9%		2,2%		14,0%	
4 M	3,0%	2,9±0,2%	27,2%	25,6±1,4%	4,3%	4,3±0,1%	15,0%	16,9±6,0%
	2,7%		24,9%		4,2%		23,6%	
	3,0%		24,7%		4,2%		12,0%	
2 M	5,3%	5,2±0,2%	17,4%	17,5±0,3%	5,9%	5,8±0,5%	16,6%	16,9±1,2%
	5,3%		17,8%		6,3%		18,3%	
	5,1%		17,2%		5,3%		15,9%	
1 M	6,2%	6,3±0,1%	16,5%	15,7±0,8%	6,3%	6,2±0,3%	17,2%	17,1±0,4%
	6,2%		14,8%		5,9%		17,5%	
	6,3%		15,6%		6,5%		16,7%	
0,7 M	6,0%	6,1±0,1%	12,4%	12,4±0,6%	6,6%	6,1±0,8%	12,4%	12,1±0,4%
	6,1%		11,9%					
	6,2%		13,0%		5,5%		11,9%	
0,3 M	6,2%	5,9±0,3%	5,6%	5,6±0,0%	5,5%	5,3±0,8%	4,8%	5,0±1,5%
	5,9%		5,6%		6,0%		6,5%	
	5,5%		5,6%		4,4%		3,6%	
0 M	6,0%	5,5±0,4%	6,0%	6,2±0,5%	5,5%	5,2±0,7%	8,0%	6,6±1,2%
	5,4%		5,9%		5,6%		6,0%	
	5,3%		6,8%		4,3%		5,9%	

Tabelle 70: Protein-Wiederfindung bezogen auf die Gesamterdnuss mit Guanidinthiocyanat-Lösung

Konzentration	Extrakt				Dialysat			
	ELISA		Bestimmung nach Lowry		ELISA		Bestimmung nach Lowry	
	Protein-Wiederfindung	Mittelwert	Protein-Wiederfindung	Mittelwert	Protein-Wiederfindung	Mittelwert	Protein-Wiederfindung	Mittelwert
6 M	0,0%	0,0±0,0%	32,0%	30,8±1,2%	0,0%	0,0±0,0%	21,6%	16,5±4,5%
	0,0%		31,1%		0,0%		14,6%	
	0,0%		29,5%		0,0%		13,2%	
4 M	0,0%	0,0±0,0%	28,8%	28,7±0,4%	0,0%	0,0±0,0%	18,6%	18,3±0,3%
	0,0%		28,3%		0,0%		18,2%	
	0,0%		29,1%		0,0%		18,0%	
2 M	0,0%	0,0±0,0%	26,8%	26,3±0,9%	0,1%	0,2±0,1%	8,2%	8,5±1,0%
	0,0%		25,4%		0,3%		9,7%	
	0,0%		26,9%		0,2%		7,7%	
1 M	5,2%	5,1±0,1%	8,3%	7,6±0,6%	1,4%	3,5±1,9%	1,7%	5,8±4,0%
	5,1%		7,2%		4,4%		6,1%	
	5,0%		7,2%		4,8%		9,7%	
0,7 M	7,2%	7,2±0,2%	7,8%	8,3±0,5%	4,7%	5,2±0,6%		6,9±0,5%
	7,4%		8,4%		5,0%		7,2%	
	7,0%		8,7%		5,8%		6,5%	
0,5 M	7,6%	7,3±0,4%	7,7%	9,0±1,5%	4,0%	4,5±0,5%	6,0%	7,6±1,5%
	7,4%		10,7%		4,7%		8,8%	
	6,9%		8,6%		4,9%		8,1%	
0,3 M	7,6%	7,7±0,2%	8,4%	8,5±0,1%	5,3%	5,5±0,3%	7,2%	7,0±0,2%
	7,6%		8,5%		5,4%		6,8%	
	8,0%		8,4%		5,8%		7,1%	
0 M	8,2%	8,3±0,0%	7,7%	7,5±1,1%	6,6%	6,1±0,5%	6,9%	6,2±0,7%
	8,3%		6,4%		5,6%		5,5%	
	8,3%		8,5%		6,1%		6,4%	

Tabelle 71: Renaturierung des Erdnussproteins nach Extraktion mit Harnstoff

	Replikate		Mittelwert	Standardabweichung
0,1% PEG 2000	4,2%	3,7%	3,9%	0,3%
0,5% PEG 2000	3,5%	3,4%	3,5%	0,1%
5% PEG 2000	2,6%	3,3%	2,9%	0,5%
0,1% PEG 3000	4,5%	5,7%	5,1%	0,8%
0,5% PEG 3000	4,5%	3,7%	4,1%	0,6%
5% PEG 3000	2,7%	3,9%	3,3%	0,8%
0,1% PEG 4000	3,5%	4,0%	3,7%	0,4%
0,5% PEG 4000	3,8%	2,0%	2,9%	1,3%
5% PEG 4000	4,0%	2,5%	3,2%	1,1%
0,1% PEG 3350	3,6%	3,6%	3,6%	0,0%
0,5% PEG 3350	4,2%	3,4%	3,8%	0,6%
5% PEG 3350	2,7%	2,7%	2,7%	0,0%
10% Glycerol	4,0%	4,1%	4,1%	0,1%
25% Glycerol	5,1%	5,5%	5,3%	0,3%
50% Glycerol	6,8%	7,0%	6,9%	0,1%
1% Arginin	2,8%	2,1%	2,4%	0,5%
4% Arginin	3,1%	2,6%	2,8%	0,4%
8% Arginin	2,4%	2,2%	2,3%	0,1%
5% Saccharose	3,4%	3,5%	3,4%	0,1%
15% Saccharose	2,2%	4,3%	3,3%	1,5%
25% Saccharose	6,1%	5,5%	5,8%	0,4%
ohne Zugabe	3,3%	3,1%	3,2%	0,2%

Tabelle 72: Extinktion und Präzisionsprofil der Matrixkalibrierung

	Konzentration [mg/kg]	Extinktion				Präzisionsprofil	
		Replikate			Mittelwert		Standardabweichung
Replikate 1	122,42	2,996	2,979	2,928	2,968	0,035	5,5%
	52,47	1,663	1,707	1,71	1,693	0,026	3,4%
	17,49	1,224	1,263	1,308	1,265	0,042	1,5%
	11,13	0,714	0,734	0,764	0,737	0,025	9,8%
	5,03	0,403	0,395	0,389	0,396	0,007	40,8%
	1,72	0,336	0,333	0,331	0,333	0,003	66,3%
	1,21	0,27	0,258	0,25	0,259	0,010	82,5%
	Blindwert	0,206	0,197	0,198	0,200	0,005	
Replikate 2	87,08	2,221	2,244	2,306	2,257	0,044	1,2%
	37,32	1,106	1,098	1,179	1,128	0,045	10,1%
	12,44	0,834	0,83	0,832	0,832	0,002	4,5%
	7,92	0,512	0,466	0,492	0,490	0,023	17,5%
	3,58	0,291	0,291	0,289	0,290	0,001	44,8%
	1,23	0,266	0,259	0,263	0,263	0,004	70,7%
	0,86	0,224	0,216	0,224	0,221	0,005	92,1%
	Blindwert	0,198	0,19	0,188	0,192	0,005	

	Konzentration [mg/kg]	Extinktion					Präzisionsprofil
		Replikate			Mittelwert	Standardabweichung	
Replikate 3	115,63	2,463	2,431	2,382	2,425	0,041	5,9%
	49,55	1,371	1,313	1,245	1,310	0,063	6,4%
	16,52	0,892	0,969	0,879	0,913	0,049	8,0%
	10,51	0,522	0,563	0,528	0,538	0,022	14,3%
	4,75	0,291	0,313	0,314	0,306	0,013	35,1%
	1,63	0,27	0,266	0,264	0,267	0,003	80,9%
	1,14	0,23	0,228	0,228	0,229	0,001	90,3%
	Blindwert	0,184	0,189	0,188	0,187	0,003	
Replikate 4	92,97	2,163	2,094	1,774	2,010	0,208	1,2%
	39,85	1,143	1,14	1,025	1,103	0,067	1,4%
	13,28	0,872	0,921	0,858	0,884	0,033	11,3%
	8,45	0,562	0,538	0,493	0,531	0,035	2,1%
	3,82	0,316	0,317	0,312	0,315	0,003	31,0%
	1,31	0,254	0,257	0,244	0,252	0,007	57,9%
	0,92	0,228	0,235	0,208	0,224	0,014	83,0%
	Blindwert	0,185	0,182	0,14	0,169	0,025	

## 8.17 Geräte

Tabelle 73: List der verwendeten Geräte

Bezeichnung	Hersteller
Analysenwaage	Kern AGB, 210.4, d=0.1 mg (Deutschland)
Grobwaage	Sartorius, 1202 MP (Deutschland)
Magnetrührer	A. Hartstein, Hotplate stirrer L-81
Kühlschrank	Bosch (Deutschland)
Mikrotiterplatten-Reader	Dynex Technologies, MRX (Deutschland)
pH-Meter	Sartorius, PB-11 (Deutschland)
Schüttler	Biometra, Typ KL 2 Nr. 6115 (Deutschland)
Zentrifuge	Sigma Laboratory Centrifuge 3K 15, Sigma Laborzentrifuge GmbH (Deutschland)
Gefriertrockner	Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH (Deutschland)
Gieß-Geräte für Elektrophorese	Hoefler, Multiple Gel Casters (USA)
Lauf- Geräte für Elektrophorese	Hoefler, Mighty Small II (USA)
Mikrotiterplatten-Wascher	Bio-Tek, ELx50, (USA)
Trockenschrank	Heraeus Instruments (Deutschland)
Wasserbad	Medingen, W 6 Nr. 10015 (Deutschland)

## 8.18 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 74: Liste des Verbrauchsmaterials

Bezeichnung	Hersteller
Blotmembran	Whatman (USA)
Dialysemembran	Carl Roth (Deutschland)
Reaktionsgefäße	Sarstedt (Deutschland)
Pipettenspitzen	Sarstedt (Deutschland)
Mikrotiterplatten	Sarstedt (Deutschland) Nunc, Maxisorp, (Dänemark)
Ultrafiltrationgefäße	Sartorius, (Deutschland)

## 8.19 Chemikalien

Tabelle 75: Liste der verwendeten Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller	H-Sätze	P-Sätze
Aceton	Merck	H225 H319 H336	P210 P280 P305+P351+P338
Acrylamid-Fertig-Lösung für Elektrophorese	Carl Roth	H350 H340 H361f H301 H372 H312+H332 H319 H315 H317	P201 P281 P302+P352 P304+P340 P305+P351+P338 P309+P310
6-Aminohexansäure	Merck	-	-
Ammoniumcarbonat	Merck	H302	P301+P312
Ammoniumhydrogencarbonat	Applichem	H302	P301+P312
Ammoniumsulfat	Merck	-	-
Borsäure	Merck	H360FD	P201 P281 P308+P313
bovines Serumalbumin	Merck	-	-
Carboxymethylcellulose	Merck	-	-
CHAPS	Applichem	-	-
Citronensäure-monohydrat	Merck	H318	P280 P305+P351+P338 P309+P310
Coomassie-Brilliant-Blue G250	Merck	-	-
diNatriumhydrogenphosphat	Merck	-	-
di-Natriumtetraborat-Decahydrat	Merck	H360FD	P201 P281 P308+P313
Dioclylnatriumsulfosuccinat	Sigma-Aldrich	-	-
Dithiothreitol	BDH Prolabo	H302 H319 H335 H315	P280 P302+P352 P305+P351+P338 P309+P311
EDTA	Applichem	H319	P280 P305+P351+P338
Eisessig	Merck	H226 H314	P210 P243 P280 P301+P330+P331 P304+P340 P309+P310
Ethanol	Merck	H225	P210 P243 P280
Folin-Ciocalteus Phenolreagenz	Merck	H319 H315	P280 P302+P352 P305+P351+P338

Bezeichnung	Hersteller	H-Sätze	P-Sätze
Formaldehyd	Merck	H351 H301+H311+H331 H314 H317	P201 P281 P301+P330+P331 P302+P352 P304+P340 P309+P310
Glutardialdehyd	Merck	H301+H331 H314 H335 H334 H317 H400	P280 P285 P273 P301+P330+P331 P302+P352 P304+P340 P309+P310
Glycerin	Merck	-	-
Glycin	Merck	-	-
Harnstoff	Merck	-	-
Isopropanol	Merck	H225 H319 H336	P210 P280 P305+P351+P338
Kaliumchlorid	Merck	-	-
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck	-	-
Kupfer(II)-sulfat-Pentahydrat	Merck	H302 H319 H315 H410	P280 P273 P302+P352 P305+P351+P338 P309+P311
2-Mercaptoethanol	Merck	H310+H330 H301 H315 H318 H410	P280 P284 P273 P302+P350 P304+P340 P305+P351+P338 P309+P310
Methanol	Merck	H225 H301+H311+H331 H370	P210 P243 P280 P302+P352 P304+P340 P309+P310
Methylenblau	Merck	H302 H319 H335 H315	P261 P305+P351+P338
Methylrot	Merck	-	-
Natriumacetat	Merck	-	-
Natriumazid	Merck	H300 H410	P273 P301+P310
Natriumcarbonat	Merck	H319	P280 P305+P351+P338
Natriumchlorid	Merck	-	-
tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Merck	-	-

Bezeichnung	Hersteller	H-Sätze	P-Sätze
Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat	Merck	-	-
Natriumdodecylsulfat	Merck	H228 H311 H302 H319 H335 H315	P210 P240 P280 P302+P352 P304+P340 P305+P351+P338 P309+P311
Natriumhydrogencarbonat	Merck	-	-
Natriumhydroxid	Merck	H314	P280 P301+P330+P331 P305+P351+P338 P309+P310
Natrium-Kaliumtartrat	Merck	-	-
Natriumthiosulfat-Pentahydrat	Merck	-	-
n-Hexan	Merck	H225 H361f H304 H373 H315 H336 H411	P201 P210 P243 P281 P273 P301+P331 P302+P352 P304+P340 P309+P310
Orthophosphorsäure 85%	BDH Prolabo	H314	P280 P301+P330+P331 P305+P351+P338 P309+P310
Phenol	Merck	H341 H301+H311 +H331 H373 H314	P201 P281 P301+P330+P331 P302+P352 P304+P340 P309+P310
Phenolrot	Merck	-	-
Ponceau S	Merck	H319 H335 H315	P280 P302+P352 P304+P340 P305+P351+P338 P309+P31
Salzsäure	Merck	H314 H335	P280 P301+P330+P331 P305+P351+P338 P309+P310
Schwefelsäure	Merck	H314 H290	P280 P301+P330+P331 P305+P351+P338 P309+P310
SDS	Merck	H228 H311 H302 H319 H335 H315	P210 P240 P280 P302+P352 P304+P340 P305+P351+P338 P309+P311
Selenreaktionsgemisch	Merck	-	-

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>	<b>H-Sätze</b>	<b>P-Sätze</b>
Silbernitrat	Merck	H272 H314 H410	P210 P280 P273 P301+P330+P331 P304+P340 P309+P310
Streptavidin/HRP	Bio-Rad	-	-
TCA	Merck	H314 H335 H410	P280 P273 P301+P330+P331 P305+P351+P338 P309+P310
3,3'-5,5'-Tetramethylbenzidin	Merck	-	-
TRIS Base	Merck	H319 H335 H315	P280 P302+P352 P304+P340 P305+P351+P338 P309+P311
TRIS-HCl	Merck	H319 H335 H315	P280 P302+P352 P304+P340 P305+P351+P338 P309+P311
Triton X-100	BDH Prolabo	H302 H318 H411	P280 P273 P305+P351+P338 P309+P310
Tween20	Merck	-	-
Wasserstoffperoxid	BDH Prolabo	H271 H302+H332 H314	P210 P280 P301+P330+P331 P304+P340 P309+P310

## 9. Literaturverzeichnis

Ackermann T.: Physikalische Biochemie : Grundlagen der physikalisch-chemischen Analyse biologischer Prozesse, Springer Verlag, (1992)

Alibolandi M., Mirzahoseini H., Abad M.A.K., Movahed M.A.: High level expression of human basic fibroblast growth factor in Escherichia coli: evaluating the effect of the GC content and rare codons within the first 13 codons, Afr J Biotechnol **9**, 2456-2462 (2010)

Al-Muhsen S., Clarke A.E., Kagan R.S.: Peanut allergy: an overview, Can Med Assoc J **168**, 1279-1285 (2003)

Andersen K.K., Oliveira C.L., Larsen K.L., Poulsen F.M. Callisen T.H., Westh P., Pedersen J.S., Otzen D.: The role of decorated SDS micelles in sub-CMC protein denaturation and association, J mol biol **391**, 207-226 (2009)

Arakawa T., Timasheff S.N.: Mechanism of protein salting in and salting out by divalent cation salts: balance between hydration and salt binding, Biochemistry **23**, 5912-5923 (1984)

Baltes W.: Lebensmittelchemie, 6. Auflage, Springer Verlag, Berlin, 2007

Basha S. M.: Resolution of peanut seed proteins by high-performance liquid chromatography, J Agr Food Chem **36**, 778-781. (1988)

Basha S. M.: Separation of peanut proteins by capillary electrophoresis, J Agr Food Chem **45**, 400-402. (1997)

Bata J., Gyenes L., Sehon A.H., The effect of urea of antibody-antigen reactions." Immunochem **1**, 289-293 (1964)

Baumgartner S., Steiner I., Kloiber S., Hirmann D., Krska R., Yeung J.: Towards the development of a dipstick immunoassay for the detection of trace amounts of egg proteins in food, *Eur Food Res Technol* **214**, 168-170 (2002)

Becker W., Kleber-Janke T., Lepp U.: Four Novel Recombinant Peanut Allergens: More Information, More Problems, *Int Arch Allergy Immunol* **124**, 100-102 (2001)

Becker W.M.: Characterization of Ara h1 by Two-Dimensional Electrophoresis Immunoblot and Recombinant Techniques: New Digestion Experiments with Peanuts Imitating the Gastrointestinal Tract, *International Int Arch Allergy Immunol* **113**, 118-121 (1997)

Belitz H-D., Grosch W., Schieberle P.: *Lehrbuch der Lebensmittelchemie*, 6. Auflage, Springer Verlag, Berlin, (2007)

Bernard H., Creminon C., Yvon M., Wal J-M.: Specificity of the Human IgE Response to the Different Purified Caseins in Allergy to Cow's Milk Proteins, *Int Arch Allergy Immunol* **115**, 235-244 (1998)

Besler M., Steinhart H., Paschke A.: Stability of food allergens and allergenicity of processed foods, *J Chromatogr B* **25**, 207-228 (2001)

Bishop J.M., Hill D.J., Hosking C.S.: Natural history of cow milk allergy: clinical outcome, *J Pediatr*, **116**, 862-867 (1990)

Blumenkrantz M.J., Gahl G.M., Kopple J.D., Kamdar A.V. JonesM.R., Kessel M., CoburnJ.W.: Protein losses during peritoneal dialysis, *Kidney Int* **19**, 593-602 (1981)

Bock S.A., Atkins F.M.: The natural history of peanut allergy, *J Allergy Clin Immunol* **83**, 900-904 (1989)

Bock, S.A., Atkins, F.M.: Patterns of food hypersensitivity during sixteen years of doubleblind, placebo-controlled food challenges, *J Pediatr* **117**, 561-567 (1990)

Bock S.A., Munoz-Furlong A., Sampson H.A.: Fatalities due to anaphylactic reactions to foods, *Allergy Clin Immunol* **107**, 191-193 (2001)

Bollag D.M., Edelman S.J.: *Protein Methods*, 2. Auflage, Wiley-Liss Verlag, New York (1991)

Brezná B., Hudecová L., Kuchta T.: A novel real-time polymerase chain reaction (PCR) method for the detection of walnuts in food, *Eur Food Res Technol* **223**, 373-377 (2006a)

Brezná B., Hudecová L., Kuchta T.: Detection of pea in food by real-time polymerase chain reaction (PCR), *Eur Food Res Technol* **222**, 600-603 (2006b)

Brockow K., Ring J.: Food anaphylaxis, *Anal Bioanal Chem* **395**, 17-23 (2009)

Bruijnzeel-Koomen C., Ortolani C., Aas K., Bindslev-Jensen C., Björkstén B., Wüthrich B.: Adverse reactions to food, *Allergy* **50**, 623-635 (1995)

Brzezinski J.L.: Detection of Cashew Nut DNA in Spiked Baked Goods Using a Real-Time Polymerase Chain Reaction Method, *J AOAC Int* **89**, 1035-1038 (2006)

Buchner J., Rudolph R.: Renaturation, purification and characterization of recombinant Fab-fragments produced in *Escherichia coli*, *Nat Biotechnol* **9**, 157-162 (1991)

Burks A.W., Williams L.W., Helm R.M., Connaughton C., Cockrell G., O'Brien T.: 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 (1991)

Burks A.W., Williams L.W., Connaughton C., Cockrell G., O'Brien T., Helm R.M.: Identification and characterization of a second major peanut allergen, Ara h II, with use of the sera of patients with atopic dermatitis and positive peanut challenge, *J Allergy Clin Immunol* **90**, 962-969 (1992)

Burks A.W.: Peanut allergy, *Lancet* **371**, 1538-1546 (2008)

Burrell M.M.: *Enzymes of Molecular Biology*, Humana Press, (1993)

Cammann K.: *Instrumentelle Analytische Chemie*, 1. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, (2010)

Cantani A.: Hidden presence of cow's milk proteins in foods, *J Invest Allergol Clin Immunol*, **9**, 141-145 (1999)

Carpentier S.C., Witters E., Laukens K., Deckers P., Swennen R., Panis B.: Preparation of protein extracts from recalcitrant plant tissues: An evaluation of different methods for two-dimensional gel electrophoresis analysis, *Proteomics* **5**, 2497-2507 (2005)

Chen Y.-Y., Lin S.-Y., Yeh Y.-Y., Hsiao H.-H., Wu C.-Y., Chen S.-T., Wang A.H.-J.: A modified protein precipitation procedure for efficient removal of albumin from serum, *Electrophoresis* **26**, 2117-2127 (2005)

Cleland J.L., Builder S.E., Swartz J.R., Winkler M., Chang J.Y., Wang D.I.C.: Polyethylene glycol enhanced protein refolding, *Nat Biotechnol* **10**, 1013-1019 (1992)

Coca A.F.: The preparation of fluid extracts and solutions for use in the diagnosis and treatment of the allergies with notes on the collection of pollens, *J Immunol* **7**, 163-178 (1922)

Coombs R.R.A., Gell P.G.H.: *Classification of Allergic Reactions Responsible for Clinical Hypersensitivity and Disease*, *Clinical Aspects of Immunology*, Blackwell Scientific Publications, (1968)

Copeland R.A.: *Enzymes, A Practical Introduction to Structure, Mechanism, and Data Analysis*, 2. Auflage, Wiley-VCH, (2000)

Crowther J.R.: The ELISA Guidebook, 2. Auflage, Humana Press, (2009)

Czerwenka C., Maier I., Potocnik N., Pittner F., Lindner W.: Absolute quantitation of  $\beta$ -lactoglobulin by protein liquid chromatography-mass spectrometry and its application to different milk products, Anal Chem **79**, 5165-5172 (2007)

Daul C.B., Morgan J.E., Hughes J., Lehrer S.B.: Provocation-challenge studies in shrimp-sensitive individuals, J Allergy Clin Immunol **81**, 1180-1186 (1988)

De Jong N., Visser S., Olieman C.: Determination of milk proteins by capillary electrophoresis, J Chromatogr A **652**, 207-213 (1993)

De Leon M.P., Glaspole I.N., Drew A.C., Rolland J.M., O'Hehir R. E., Suphioglu C.: Immunological analysis of allergenic cross-reactivity between peanut and tree nuts, Clin Exp Allergy **33**, 1273-1280 (2003)

De Leon M.P., Drew A.C., Glaspole I.N., Suphioglu C., O'Hehir R.E., Rolland J.M.: IgE cross-reactivity between the major peanut allergen Ara h 2 and tree nut allergens, Mol Immunol **44**, 463-471 (2007)

Dean T.P.: Immunological Responses in Peanut Allergy, Clin Exp Allergy **28**, 7-9 (1998)

Deckwart M.: Nachweis von Milchallergenen in verschiedenen Bäckereiprodukten, Diplomarbeit, Institut für Lebensmittelchemie, Universität Hamburg, (2009)

Diaz-Amigo, C.: Towards a Comprehensive Validation of ELISA Kits for Food Allergens. Case 2-Milk, Food anal method **3**, 351-356 (2010)

Dietzgen R.G., Francki R.I.B.: Nonspecific binding of immunoglobulins to coat proteins of certain plant viruses in immunoblots and indirect ELISA, J Virol Methods **15**, 159-164 (1987)

Doyle K.: The Source of Discovery: Protocols and Applications Guide, Promega, (1996)

Downs M.L., Taylor S.L., Effects of thermal processing on the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) detection of milk residues in a model food matrix, *J Agr Food Chem* **58**, 10085-10091 (2010)

Ehn B-M., Ekstrand B., Bengtsson U., Ahlstedt S.: Modification of IgE Binding during Heat Processing of the Cow's Milk Allergen alpha-Lactoglobulin, *J Agr Food Chem* **52**, 1398-1403 (2004)

Ekins R.P.: The "Precision Profile": Its use in RIA assessment and design, *The Ligand Quarterly* **4**, 33-44 (1981)

Engelhard V.H.: Die Antigen-Prozessierung, *Spektrum der Wissenschaft* **10**, 48-56 (1994)

Engvall E., Perlmann P.: Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) Quantitative assay of immunoglobulin G, *Immunochemistry* **8**, 871-874 (1971)

Esser C., Radbruch A.: Immunoglobulin class switching: molecular and cellular analysis, *Annu Rev Immunol* **8**, 717-753 (1990)

Fernandez S.S., Padilla A.P., Mucciarelli S.: Protein extraction from *Atriplex lampa* leaves: Potential use as forage for animals used for human diets, *Plant Food Hum Nutr* **54**, 251-259 (1999)

Finkelman F.D.: Peanut allergy and anaphylaxis, *Curr Opin Immunol* **22**, 783-788 (2010)

Focke F., Haase I., Fischer M.: Nachweis pflanzlicher Kontaminationen in Lebensmitteln mittels Real-time-PCR, *Deutsche Lebensmittel-Rundschau* **107**, 221-224 (2011)

Food and Agriculture Organization of the United Nations, World Health Organization (FAO): Report of the FAO technical consultation on food allergens, Rome, (1995)

Fountoulakis M., Takács B.: Effect of strong detergents and chaotropes on the detection of proteins in two-dimensional gels, *Electrophoresis* **22**, 1593-1602 (2001)

Ge Pan, G., Melton, L.D.: Nonenzymatic browning of lactose and caseinate during dry heating at different relative humidities, *J Agr Food Chem* **55** 10036-10042 (2007)

Geißler, E.: Taschenlexikon Molekularbiologie, Verlag Harri Deutsch, (1972)

Guerrier L., Lomas L., Boschetti E.: A new general approach to purify proteins from complex mixtures, *J Chromatogr A* **1156**, 188-195 (2007)

Guo F., Kothary M.H., Wang Y., Yu X., Howard A.J., Fu t., Zhang Y.: Purification and crystallization of Cor a 9, a major hazelnut allergen, *Acta Cryst* **65**, 42-46 (2009)

Handman E., Jarvis H.M.: Nitrocellulose-based assays for the detection of glycolipids and other antigens: Mechanism of binding to nitrocellulose, *J Immunol Meth* **83**, 113-123 (1985)

Hefle S.L., Bush R.K., Yunginger J.W., Chu F.S.: A Sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) for the Quantitation of Selected Peanut Proteins in Foods, *J Food Protect* **57**, 419-423 (1994)

Hefle S.L., Lambrecht D.M.: Validated sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for casein and its application to retail and milk-allergic complaint foods, *J Food Prot* **67**, 1933-1938 (2004a)

Hefle, S.L., Taylor, S.L.: Food allergy and the food industry, *Curr Allergy Asthma Rep* **4**, 55-59 (2004b)

Heick J., Fischer M., Pöpping B.: First screening method for the simultaneous detection of seven allergens by liquid chromatography mass spectrometry, *J Chromatogr A* **1218**, 938-943 (2011)

Helm, R.M., Burks, A.W.: Mechanisms of food allergy, *Curr Opin Immunol* **12**, 647-653 (2000)

Heukeshoven J., Dernick R.: Neue Ergebnisse zum Mechanismus der Silberfärbung, in *Elektrophorese forum '86*, Technische Universität München, 22-27, (1986)

Hildebrandt, S., Steinhart, H., Paschke, A.: Comparison of different extraction solutions for the analysis of allergens in hen's egg, *Food Chem* **108**, 1088-1093 (2008)

Hintemann T.: Entwicklung, Optimierung, Validierung und Automatisierung eines Immunoassays zur sensitiven Detektion des endokrinen Disruptors 17 $\beta$ -Östradiol im Wasserkreislauf, Dissertation, Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität zu Bonn, (2006)

Hird H., Lloyd J., Goodier R., Brown J., Reece P.: Detection of Peanut Using Real-Time Polymerase Chain Reaction, *Eur Food Res Technol* **217**, 265-268 (2003)

Hirose J., Kitabatake N., Kimura A., Narita H.: Recognition of native and/or thermally induced denatured forms of the major food allergen, ovomucoid, by human IgE and mouse monoclonal IgG antibodies, *Biosc Biotechnol Biochem* **68**, 2490-2497 (2004)

Holzhauser T., Vieths S.: Indirect Competitive ELISA for Determination of Traces of Peanut (*Arachis hypogaea* L.) Protein in Complex Food Matrices, *J Agr Food Chem* **47**, 603-611 (1999)

Holzhauser T., Wangorsch A., Vieths S.: Polymerase chain reaction (PCR) for detection of potentially allergenic hazelnut residues in complex food matrixes, *Eur Food Res Technol* **211**, 360-365 (2000)

Holzhauser, T., Mergemeier, S., Kuhn, M.: Significance and detection of hidden allergens in processed foods, *Aktuelle Ernährungsmedizin* **28**, 93-98 (2003)

Host A., Husby S., Gjesing B., Larsen JN., Lowenstein H.: Prospective estimation of IgG, IgG subclass and IgE antibodies to dietary proteins in infants with cow milk allergy. Levels of

antibodies to whole milk protein, BLG and ovalbumin in relation to repeated milk challenge and clinical course of cow milk allergy, *Allergy* **47**, 218-29 (1992)

Host A., Samuelsson E.G.: Allergic reactions to raw, pasteurized, and homogenized/pasteurized cow milk: a comparison. A double-blind placebo-controlled study in milk allergic children, *Allergy* **43**, 113-118 (1988)

Hourihane J.O'B., Kilburn S.A., Nordlee J.A., Hefle S.L., Taylor S.L., Warner J.O.: An evaluation of the sensitivity of subjects with peanut allergy to very low doses of peanut protein: a randomized, double-blind, placebo-controlled food challenge study, *J Allergy Clin Immunol* **100**, 596-600 (1997)

Huisman I.H., Prádanos P., Hernández A.: The effect of protein-protein and protein-membrane interactions on membrane fouling in ultrafiltration, *J Membrane Sci* **179**, 79-90 (2000)

Iametti S., Gregori B., Vecchio G., Bonomi F.: Modifications Occur at Different Structural Levels During the Heat Denaturation of  $\beta$ -Lactoglobulin, *Eur J Biochem* **237**, 106-112 (1996)

Inyang U.E., Iduh A.O.: Influence of pH and salt concentration on protein solubility, emulsifying and foaming properties of sesame protein concentrate, *J Am Oil Chem Soc* **73**, 1663-1667 (1996)

Invitrogen, Internet: <http://www.invitrogen.com>, Stand (2013)

James J.M., Sampson H.A.: Immunologic changes associated with the development of tolerance in children with cow milk allergy, *J Pediatr* **121**, 371-377 (1992)

Janeway C.A., Travers P., Walport M., Shlomchik M.: *Immunologie*, 5. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, (2002)

Jedrychowski L., Wroblewska B.: Reduction of antigenicity of whey proteins by lactic acid fermentation, *Food Agric Immunol* **11**, 91-99 (1999)

Jiang L., He L., Fountoulakis M.: Comparison of protein precipitation methods for sample preparation prior to proteomic analysis, *J Chromatogr A* **1023**, 317-320 (2004)

Johansson, S.G.O., Bieber, T., Dahl, R., Friedmann, P.S., Lanier, B.Q., Lockey, R.F., Motala, C., Ortega, M.J.A., Platts-Mills, T.A.E., Ring, J., Thien, F., Van Cauwenberge, P., Williams, H.C.: Revised nomenclature for allergy for global use: report of the nomenclature review committee of the world allergy organization, October 2003, *J Allergy Clin Immunol* **113**, 832-836 (2004)

Johns C.O., Jones D.B.: The proteins of the peanut, *Arachis Hypogaea*, *J Biol Chem* **28**, 77-87 (1916)

Johnson D.A., Gautsch J.W., Sportsman J.R., Elder J.H.: Improved technique utilizing nonfat dry milk for analysis of proteins and nucleic acids transferred to nitrocellulose, *Gene Anal Technol* **1**, 3-11 (1984)

Johnson M.J.: Isolation and properties of a pure yeast polypeptidase, *J Biol Chem* **137**, 575-586 (1941)

Jones D.B., Horn M.J.: The properties of Arachin and Conarachin and their proportionate occurrence in the peanut, *J Agric Res* **40**, 673-682 (1930)

Kapp O.H., Vinogradov S.N.: Removal of sodium dodecyl sulfate from proteins, *Anal Biochem* **91**, 230-235 (1978)

Kato Y., Watanabe H., Matsuda T.: Ovomuroid rendered insoluble by heating with wheat gluten but not with milk casein, *Biosci Biotechnol Biochem* **64**, 198-201 (2000)

Kato Y., Suginozawa K., Fujiwara M.: A novel and simple method of insolubilization of ovomucoid in cookies prepared from batter containing egg white, Food Sci Technol Res **7**, 35-38 (2001a)

Kato Y., Oozawa E., Matsuda T.: Decrease in Antigenic and Allergenic Potentials of Ovomucoid by Heating in the Presence of Wheat Flour: Dependence on Wheat Variety and Intermolecular Disulfide Bridges, J Agr Food Chem **49**, 3661-3665 (2001b)

Kenna J.G., Major G.N., Williams R.S.: Methods for reducing non-specific antibody binding in enzyme-linked immunosorbent assays, J Immunol Methods **85**, 409-419 (1985)

Kiening M., Niessner R., Drs E., Baumgartner S., Krska R., Bremer M., Tomkies V., Reece P., Danks C., Immer U., Weller M.G.: Sandwich Immunoassays for the Determination of Peanut and Hazelnut Traces in Foods, J Agr Food Chem **53**, 3321-3327 (2005)

Kiening M.: Immunanalytische Methoden zur Detektion von Erdnuss- und Haselnuss Spuren in Lebensmitteln, Institut für Wasserchemie und chemische Balneologie, Lehrstuhl für Hydrogeologie, Hydrochemie und Umweltanalytik, Technische Universität München, München, (2006)

Kim T-E., Park S-W., Cho N-Y., Choi S-Y., Yong T-S., Nahm B-H., Lee S., Noh G.: Quantitative Measurement of Serum Allergen-Specific IgE on Protein Chip, Exp Mol Med **34**, 152-158 (2002)

Kim W.S., Nishizawa T., Yoshimizu M.: Non-specific adsorption of fish immunoglobulin M (IgM) to blocking reagents on ELISA plate wells, Dis Aquat Org **78**, 55-59 (2007)

Kirsch S., Fourdrilis S., Dobson R., Scippo M-L., Maghuin-Rogister G., Pauw E.D.: Quantitative methods for food allergens: a review, Anal Bioanal Chem **395**, 57-67 (2009)

Kleber-Janke T., Crameri R., Appenzeller U., Schlaak M., Becker W.: Selective Cloning of Peanut Allergens, Including Profilin and 2S Albumins, by Phage Display Technology, *Int Arch Allergy Immunol* **119**, 265-274 (1999)

Klein J.: *Immunologie*, 2. Auflage, Verlag Chemie, (1991)

Koch P., Schäppi G.F., Poms R.E., Wüthrich B., Anklam E., Battaglia R.: Comparison of commercially available ELISA kits with human sera-based detection methods for peanut allergens in foods, *Food Addit Contam* **20**, 797-803 (2010)

Koppelman S.J., Vlooswijk R.A., Knippels L.M.J., Hessing M., Knol E.F., van Reijssen F.C., Bruijnzeel-Koomen C.: Quantification of Major Peanut Allergens Ara h1 and Ara h2 in the Peanut Varieties Runner, Spanish, Virginia, and Valencia, Bred in Different Parts of the World, *Allergy* **56**, 132-137 (2001)

Koppelman S.J., Knol E.F., Vlooswijk R.A.A., Wensing M., Knulst A.C., Hefle S.L., Gruppen H., Piersma S.: Peanut Allergen Ara h3: Isolation from Peanuts and Biochemical Characterization, *Allergy* **58**, 1144-1151 (2003)

Kozlowski A., Harris J.M., Improvements in protein PEGylation: pegylated interferons for treatment of hepatitis C, *J Control Release* **72**, 217-224 (2001)

Kraus O.: *Immunologischer Nachweis von Allergenen in Wein: Vergleich photometrischer und fluorimetrischer Detektionsmethoden*, Diplomarbeit, Universität Hamburg, (2010)

Kreft, D., Bauer, R., Goerlich, G.: *Nahrungsmittelallergene: Charakteristika und Wirkungsweisen*, 1. Auflage, Walter de Gruyter Verlag, (1995)

Kushnirov V.V.: Rapid and reliable protein extraction from yeast, *Yeast* **16**, 857-860 (2000)

Laemmli U.K.: Cleavage of structural proteins during assembly of the head of the bacteriophage T4, *Nature* **227**, 680-685 (1970)

Langeland T.: A Clinical and Immunological Study of Allergy to Hen's Egg White, *Allergy* **37**, 323-333 (1982)

Lauer L., Dueringer N., Pokoj S., Rehm S., Zoccatelli G., Reese G., Miguel-Moncinz M.S., Cistero-Bahima A., Enriquez E., Lidholm J., Vieths S., Scheurer S.: The non-specific lipid transfer protein, Ara h 9, is an important allergen in peanut, *Clin Exp Allergy* **39**, 1427-1437 (2009)

Leduc V., Demeulemester C., Polack B., Guizard C., Le Guern L., Peltre G.: Immunochemical detection of egg-white antigens and allergens in meat products, *Allergy* **54**, 464-472 (1999)

Lee K.J., Mower R., Hollenbeck T., Castelo J., Johnson N., Gordon P., Sinko P.J., Holme K., Lee Y-H.: Modulation of Nonspecific Binding in Ultrafiltration Protein Binding Studies, *Pharm Res* **20**, 1015-1021 (2003)

Lefranc-Millot C., Vercaigne-Marko D., Wal J-M., Lepretre A., Peltre G., Dhulster P., Guillochon D.: Comparison of the IgE titers to bovine colostral G immunoglobulins and their F(ab')<sub>2</sub> fragments in sera of patients allergic to milk, *Int Arch Allergy Immunol* **110**, 156-62 (1996)

Lichtenstein L.: Allergy and the immune system, *Sci Am* **9**, 85-93 (1993)

Lidell E., Weeks I.: Antikörpertechniken, Spektrum Akademischer Verlag, (1996)

Lieberei R., Reisdorff C., Franke W.: Nutzpflanzenkunde, 7. Auflage, Thieme Verlag, (2007)

Lifshitz R., Levitzki A.: Identity and properties of the chloride effector binding site in hog pancreatic  $\alpha$ -amylase, *Biochemistry* **15**, 1987-1993 (1976)

Lin W.J., Traugh J.A.: Renaturation of casein kinase II from recombinant subunits produced in Escherichia coli: purification and characterization of the reconstituted holoenzyme, Protein Expres Purif **4**, 256-264 (1993)

Liu H., Zhang C., Zhang H., Guo H., Wang P., Zhu Y., Ren F.: pH treatment as an effective tool to select the functional and structural properties of yak milk caseins, J Dairy Sci **96**, 5494-5500 (2013)

Lizotte P.A., Henson C.A., Duke S.H.: Purification and Characterization of Pea Epicotyl  $\beta$ -Amylase, Plant Physiol **92**, 615-621 (1990)

Lorenz A.R., Reese G., Haustein D., Vieths S.: Versteckte Allergene in Lebensmitteln-noch immer ein Problem, Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz **44**, 666-675 (2001)

Lottspeich F., Engels J.W.: Bioanalytik, Spektrum Akademischer Verlag, (2009)

Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J.: Protein measurement with the folin phenol reagent, J Biol Chem **193**, 265-275 (1951)

Loza C., Brostoff J.: Peanut allergy, Clin Exp Allergy **25**, 493-502 (1995)

Lutter P., Parisod V., Weymuth H.: Development and Validation of a Method for the Quantification of Milk Proteins in Food Products Based on Liquid Chromatography with Mass Spectrometric Detection, J AOAC Int **94**, 1043-1059 (2011)

Makkar H.P.S., Dawra R.K., Singh B.: Protein precipitation assay for quantitation of tannins: determination of protein in tannin-protein complex, Anal Biochem **166**, 435-439 (1987)

Maleki S.J., Kopper R.A., Shin D.S., Park C.W., Compadre C.M., Sampson H., Burks A.W., Bannon G.A.: Structure of the Major Peanut Allergen Ara h1 May Protect IgE-Binding Epitopes from Degradation, J Immunol **164**, 5844-5849 (2000a)

Maleki S.J., Chung S-Y., Champagne E.T., Raufman J-P.: The effects of roasting on the allergenic properties of peanut proteins, *Allergy Clin Immunol* **106**, 763-768 (2000b)

Malmheden Y.I., Eriksson A., Everitt G., Yman L., Karlsson T.: Analysis of food proteins for verification of contamination or mislabelling Food, *Agric Immunol* **6**, 167-172 (1994)

Matissek R., Steiner G., Fischer M.: *Lebensmittelanalytik*, 4. Auflage, Springer Verlag, 2010

Meng F.G., Park Y.D., Zhou H.M.: Role of proline, glycerol, and heparin as protein folding aids during refolding of rabbit muscle creatine kinase, *Intl J Biochem Cell B* **33**, 701-709 (2001)

Menzel E.J.: Biochemische Grundlagen der Bestimmung von Soja-protein mit immunologischen Methoden, *Zeitschrift für Ernährungswissenschaft* **20**, 55-68 (1981)

Mills E.N.C., Mackie A.R.: The impact of processing on allergenicity of food, *Curr Opin Allergy Clin Immunol* **8**, 249-253 (2008)

Mine, Y., Zhang, J.W.: Comparative studies on antigenicity and allergenicity of native and denatured egg white proteins, *J Agr Food Chem* **50**, 2679-2683 (2002)

Mirzahoseini H., Alibolandi M.: Stability of recombinant proteins in *Escherichia coli*: the effect of co-expression of five different chaperone sets, *Journal of Sciences of Islamic Republic of Iran* **20**, 305-310 (2009)

Mirzahoseini H., Omumi A., Omidinia E.: Investigation of reasons that imply the diminished Inclusion Bodies in *E. coli*, *Journal of Sciences of Islamic Republic of Iran* **14**, 113-119 (2003)

Mittag D., Akkerdaas J., Ballmer-Weber B.K., Vogel L., Wensing M., Becker W., Koppelman S.J., Knulst A.C., Helbling A., Hefle S.L., van Ree R., Vieths S.: Ara h 8, a Bet v 1-homologous allergen from peanut, is a major allergen in patients with combined birch pollen and peanut allergy, *J Allergy Clin Immunol* **114**, 1410-1417 (2004)

Monaci L., Tregoat V., van Hengel A.J., Anklam E.: Milk allergens, their characteristics and their detection in food: A review, *Eur Food Res Technol* **223**, 149-179 (2006a)

Monaci L., Visconti A.: Mass spectrometry-based proteomics methods for analysis of food allergens, *Trends Anal Chem* **28**, 581-591 (2006b)

Morisawa Y., Kitamura A., Ujiharaw T., Zushi N., Kuzumez K., Shimanouchi Y., Tamura S., Wakiguchi H., Saitoz H., Matsumotoz K.: Effect of heat treatment and enzymatic digestion on the B cell epitopes of cow's milk proteins, *Clin Exp Allergy* **39**, 918-925 (2009)

Morishita N., Kamiya K., Matsumoto T., Sakai S., Teshima R., Urisu A., Moriyama T., Ogawa T., Akiyama H., Morimatsu F.: Reliable Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Determination of Soybean Proteins in Processed Foods, *J Agr Food Chem* **56**, 6818-6824 (2008)

Mrsa V., Seidl T., Gentsch M., Tanner W.: Specific labeling of cell wall proteins by biotinylation. Identification of four covalently linked O-mannosylated proteins of *Saccharomyces cerevisiae*, *Yeast* **13**, 1145-1154 (1997)

Murphy, M.A., Shariflou M.R., Moran C.: High quality genomic DNA extraction from large milk samples, *J Dairy Res* **69**, 645-649 (2002)

Najafi M.F., Deobagkar D., Deobagkar D.: Purification and characterization of an extracellular  $\alpha$ -amylase from *Bacillus subtilis* AX20, *Protein Expres Purif* **42**, 349-354 (2005a)

Najafi M.F., Kembhavi A.: One step purification and characterization of an extracellular  $\alpha$ -amylase from marine *Vibrio* sp., *Enzyme Microb Tech* **36**, 535-539 (2005b)

Natarajan S., Xu C., Caperna T.J., Garrett W.M.: Comparison of protein solubilization methods suitable for proteomic analysis of soybean seed proteins, *Anal Biochem* **342**, 214-220 (2005)

Niemann L., Taylor S.L., Hefle S.L.: Detection of Walnut Residues in Foods Using an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, *J Food S* **74**, 51-57 (2009)

Niggemann B., Binder C., Klettke U., Wahn U.: In vivo and in vitro studies on the residual allergenicity of partially hydrolysed infant formulae, *Acta Paediatr* **88**, 394-398 (1999)

Norgaard A., Bernard H., Wal JM., Peltre G., Skov PS., Poulsen LK., Bindslev-Jensen C.: Allergenicity of individual cow milk proteins in DBPCFC-positive milk allergic adults[abstract 218], *J Allergy Clin Immunol* **97**,237 (1996)

Nowak-Wegrzyn, A., Bloom K.A., Sicherer S.H., Schreffler W.G., Noone S., Wanich N., Sampson H.A.: Tolerance to extensively heated milk in children with cow's milk allergy, *J Allergy Clinl Immun* **122** 342-347 (2008)

Nowak-Wegrzyn A., Fiocchi A.: Rare, medium, or well done? The effect of heating and food matrix on food protein allergenicity, *Curr Opin Allergy Clin Immunol* **9**, 234-237 (2009)

O'Connell M.A., Belanger B.A., Haaland P.D.: Calibration and assay development using the four-parameter logistic model, *Chemometr Intell Lab* **20**, 97-114 (1993)

Orsini G., Goldberg M.E.: The renaturation of reduced chymotrypsinogen A in guanidine HCl. Refolding versus aggregation, *J Biol Chem* **253**, 3453-3458 (1978)

Paschke A., Besler A.: Stability of bovine allergens during food processing, *Ann Allergy Asthma Immunol* **89**, 16-20 (2002)

Polson C., Sarkar P., Incledon B., Raguvaran V, Grant R.: Optimization of protein precipitation based upon effectiveness of protein removal and ionization effect in liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *J Chromatogr B* **785**, 263-275 (2003)

Poms R.E., Anklam E.: Detection of peanut allergens in food products: effect of processing on protein extraction efficiency, *Lebensmittelchemie* **57**, 153 (2003)

Poms R.E., Anklam, E.: Effects of chemical, physical, and technological processes on the nature of food allergens, *J AOAC Int* **87**, 1466-1474 (2004a)

Poms R.E., Klein C.L., Anklam E.: Methods for allergen analysis in food: a review, *Food Addit Contam* **21**, 1-31 (2004b)

Poms, R.E., Capelletti C., Anklam E.: Effect of roasting history and buffer composition on peanut protein extraction efficiency, *Mol Nutr Food Res* **48**, 459-464 (2004c)

Poms R.E., Agazzi M.E., Bau A., Brohee M., Capelletti C., Nørgaard J.V., Anklam E.: Inter-laboratory validation study of five commercial ELISA test kits for the determination of peanut proteins in biscuits and dark chocolate, *Food Addit Contam* **22**, 104-112 (2005)

Pons L., Chery C., Romano A., Namour F., Artesani M.C., Gueant J-L.: The 18 kDa peanut oleosin is a candidate allergen for IgE-mediated reactions to peanuts, *Allergy* **57**, 88-93 (2002)

r-Biopharm, Internet: <http://www.r-biopharm.com/de>, Stand (2013)

Rabjohn P., Helm E.M., Stanley J.S., West C.M., Sampson H.A., Bruks A.W., Bannon G.A.: Molecular cloning and epitope analysis of the peanut allergen Ara h 3, *J Clin Invest* **103**, 535-542 (1999)

Rehm H.: *Der Experimentator-Proteinbiochemie/Proteomics*, 5. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, (2006)

Ren Y., Han Z., Chu X., Zhang J., Cai Z., Wu Y.: Simultaneous determination of bovine  $\alpha$ -lactalbumin and  $\beta$ -lactoglobulin in infant formulae by ultra-high-performance liquid chromatography-mass spectrometry, *Anal Chim Acta* **667**, 96-102 (2010)

Renart J., Reiser J., Stark G.R.: Transfer of proteins from gels to diazobenzoyloxymethyl-paper and detection with antisera: A method for studying antibody specificity and antigen structure, Proc Natl Acad Sci USA **76**, 3116-3120 (1979)

Restani P., Ballabio C., Lorenzo C.D., Tripodi S., Fiocchi A.: Molecular aspect of milk allergens and their role in clinical events, Anal Bioanal Chem **395**, 47-56 (2009)

Richter W., Hermsdorf T., Kronbach T., Dettmer D.: Refolding and purification of recombinant human PDE7A expressed in Escherichia coli as inclusion bodies, Protein Express Purif **25**, 138-148 (2002)

Richtlinie 2000/13/EG des Europäischen Parlaments und des Rates, (2000)

Richtlinie 2007/68/EG der Kommission, (2007)

Ries-Kautt M.M., Ducruix A.F.: Relative effectiveness of various ions on the solubility and crystal growth of lysozyme, J Biol Chem **264**, 745-748 (1989)

Ring, J., Brockow, K., Behrendt, H.: Adverse reactions to foods, J Chromatogr B **756**, 3-10 (2001)

Rink L., Kruse A., Haase H.: Immunologie für Einsteiger, Spektrum Akademischer Verlag, (2012)

Roberts M.J., Bentley M.D., Harris J.M.: Chemistry for peptide and protein PEGylation, Adv Drug Deliver Rev **54**, 459-476 (2002)

Rodbard D., McClean S.W.: Automated computer analysis for enzyme-multiplied immunological techniques, Clin Chem **23**, 112-115 (1977)

Roitt I.M., Brostoff J., Male D.K.: kurzes Lehrbuch der Immunologie, 2. Auflage, Georg Thieme Verlag, (1991)

Rothenberg M.A., Nachmansohn D.: Studies on cholinesterase III. Purification of the enzyme from electric tissue by fractional ammonium sulfate precipitation, J Biol Chem **168**, 223-231 (1947)

Sampson H.A., Mendelson L., Rosen J.P.: Fatal and near-fatal anaphylactic reaction to food in children and adolescents, N Engl J Med **327**, 380-384 (1992)

Sato S., Ward C.L., Krouse M.E., Wine J.J., Kopito R.R.: Glycerol reverses the misfolding phenotype of the most common cystic fibrosis mutation, J Biol Chem **271**, 635-638 (1996)

Sawano H., Koumoto Y., Ohta K., Sasaki Y., Segawa S.I., Tachibana H.: Efficient in vitro folding of the three-disulfide derivatives of hen lysozyme in the presence of glycerol, FEBS Lett **303**, 11-14 (1992)

Scaravelli E., Brohee M., Marchelli R., van Hengel A.J.: Development of three real-time PCR assays to detect peanut allergen residue in processed food products, Eur Food Res Technol **227**, 857-869 (2008)

Scaravelli E., Brohee M., Marchelli R., van Hengel A.J.: The effect of heat treatment on the detection of peanut allergens as determined by ELISA and real-time PCR, Anal Bioanal Chem **395**, 127-137 (2009)

Schröter F.A.: Etablierung eines immunologischen Verfahrens zum Nachweis allergener ovalbuminhaltiger Weinbehandlungsmittel in Rotwein, Diplomarbeit, Universität Hamburg, (2011)

Shaw J.F., Lin F.P., Chen S.C., Chen H.C.: Purification and properties of an extracellular  $\alpha$ -amylase from *Thermos* sp., Bot Bull Acad Sin **36**, 195-200 (1995)

Shelfcheck K., Musser S.M.: Confirmation of the Allergenic Peanut Protein, Ara h 1, in a Model Food Matrix Using Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry (LC/MS/MS), J Agr Food Chem **52**, 2785-2790 (2004)

Siebert K.J., Troukhanova N.V., Lynn P.Y.: Nature of polyphenol-protein interactions, J Agr Food Chem **44**, 80-85 (1996)

Singh, H.: Heat stability of milk, Int J Dairy Technol **57**, 111-119 (2004)

Souci S.W., Fachmann W., Kraut H.: Die Zusammensetzung der Lebensmittel Nährwert-Tabellen, medpharm Verlag, (2000)

Steinhart H., Paschke A., Zunker K.: Wenn das Immunsystem falsch reagiert, Lebensmittelallergie-eine individuelle Gefahr, Biologie in unserer Zeit **31**, 398-407 (2001)

Steinhoff M., Fischer M., Paschke-Kratzin A.: Comparison of extraction conditions for milk and hen's egg allergens, Food Addit Contam **28**, 373-383 (2011)

Stott D.I.: Immunoblotting and dot blotting, J Immunol Meth **119**, 153-187 (1989)

Taheri-Kafrani A., Gaudin J-C., Rabesona H., Nioi C., Agarwal D., Drouet M., Chobert J-M., Bordbar A-K., Haertle T.: Effects of Heating and Glycation of  $\beta$ -Lactoglobulin on Its Recognition by IgE of Sera from Cow Milk Allergy Patients, J Agr Food Chem **57**, 4974-4982 (2009)

Tan S.C., Yiap B.C.: DNA, RNA, and Protein Extraction: The Past and The Present, J Biomed Biotechnol **2009**, 1-10 (2009)

Tandon S., Horowitz P.M.: Detergent-assisted refolding of guanidinium chloride-denatured rhodanese. The effects of the concentration and type of detergent, J Biol Chem **262**, 4486-4491 (1987)

Thomas K., Herouet-Guicheney C., Ladics G., Bannon G., Cockburn A., Crevel R., Fitzpatrick J., Mills C., Privalle L., Vieths S.: Evaluating the effect of food processing on the potential human allergenicity of novel proteins: international workshop report, *Food Chem Toxicol* **45**, 1116-1122 (2007)

Thompson, A., Boland, M., Singh, H.: *Milk Proteins: From Expression to Food*, Academic Press, (2009)

Towbin H., Gordon J.: Immunoblotting and dot blotting-current status and outlook, *J Immunol Meth* **72**, 313-3140 (1984)

Tuszynski G.P., Warren L.: Removal of sodium dodecyl sulfate from proteins, *Anal Biochem* **67**, 55-65 (1975)

van Hengel A.J.: Food allergen detection methods and the challenge to protect food-allergic consumers, *Anal Bioanal Chem* **389**, 111-118 (2007)

van Weemen B.K., Schuurs A.H.W.M.: Immunoassay using antigen-enzyme conjugates, *FEBS Lett* **15**, 232-236 (1971)

Vierk K., Falci K., Wolyniak C., Klontz K.C.: Recalls of foods containing undeclared allergens reported to the US Food and Drug Administration, fiscal year 1999, *J Allergy Clin Immun* **109**, 1022-1026 (2002)

Vollmar A., Dingermann T.: *Immunologie Grundlagen und Wirkstoffe*, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mgH, (2005)

Wal J-M., Bernard H., Creminon C., Hamberger C., David B., Peltre G.: Cow's milk allergy: the humoral immune response to eight purified allergens, *Adv Exp Med Biol* **371**, 879-881 (1995)

Wal J-M.: Cow's milk allergens, *Allergy* **53**, 1013-1022 (1998)

Walser H.: Statistik für Naturwissenschaftler, 1. Auflage, UTB, (2011)

Watanabe Y., Aburatani K., Mizumura T., Sakai M., Muraoka S., Mamegosi S., Honjoh T.: Novel ELISA for the detection of raw and processed egg using extraction buffer containing a surfactant and a reducing agent, J Immunol Methods **300**, 115-123 (2005)

Weber D., Raymond P., Ben-Rejeb S., Lau B.: Development of a Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Method Using Capillary Liquid Chromatography and Nanoelectrospray Ionization-Quadrupole Time-of-Flight Hybrid Mass Spectrometer for the Detection of Milk Allergens, J Agr Food Chem **54**, 1604-1610 (2006)

Weber P.: Chemische Evaluierung des allergenen Potentials tierischer Proteine in Weinen durch immunologische, elektrophoretische und chromatographische Verfahren, Dissertation, Universität Hamburg, (2009)

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

Wedholm A., Hallén E., Bach Larsen L., Lindmark-Mansson H., Hans Karlsson A., Allere T.: Comparison of milk protein composition in a Swedish and a Danish dairy herd using reversed phase HPLC, Acta Agr Scand A **56**, 8-15 (2006)

Whitford D.: Proteins: structure and function, Wiley Verlag, (2008)

The WHO/IUIS Allergen Nomenclature Sub-committee: <http://www.allergen.org/>, Stand (2012)

Wüthrich, B., Ballmer-Weber B.K.: Food-induced anaphylaxis, Allergy **56**, 102-104 (2001)

Yazdanparast R., Esmaili M.A., Khodaghali F.: Control of aggregation in protein refolding: cooperative effects of artificial chaperone and cold temperature, Int J Biol Macromol **40**, 126-133 (2007)

Zhang J., Lai S., Zhang Y., Huang B., Li D., Ren Y.: Multiple reaction monitoring-based determination of bovine  $\alpha$ -lactalbumin in infant formulas and whey protein concentrates by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry using tryptic signature peptides and synthetic peptide standards, *Anal Chim Acta* **727**, 47-53 (2012)