

I. Kurzbericht (max. 2 Seiten)

1. Aufgabenstellung und Ziele

Das Projekt ErdHase ist ein interdisziplinärer Ansatz, der darauf abzielt, klinisches, analytisches und produktionstechnisches Know-how zu verbinden, das normalerweise nicht miteinander verknüpft ist, aber für einen ganzheitlichen Ansatz in Bezug auf Lebensmittelallergene und Patientenmanagement notwendig ist. Ziel des Gesamtverbundes ist es, analytische Werkzeuge für das Management von Lebensmittelallergenen entlang der Wertschöpfungskette der Lebensmittelproduktion bereitzustellen. Diese analytischen Methoden werden mit dem Immunrepertoire einer Patientenkohorte zur Erkennung von Lebensmittelallergenen verknüpft. Ziel des Teilprojekts 1 ist die Etablierung definierter Lebensmittelherstellverfahren, die das Vorhandensein und die Wirkung allergener Proteine beeinflussen. Dies erfolgt bei den hochsensitiven Allergenen Erdnuss und Haselnuss. Dazu werden diese geröstet, in Keksen gebacken und auch als gezielte Kontamination in Schokolade eingesetzt. Rohe und definiert verarbeitete Erd- und Haselnüsse sollen zur Proteinreinigung und auch als Ausgangsmaterial für die Provokation von Patienten verwendet werden.

2. Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde

Betroffene Allergiker müssen Erdnüsse und Haselnüsse aufgrund der enthaltenden allergieauslösenden Proteine vermeiden. Diese stark die Lebensqualität beeinflussende Strategie berücksichtigt nicht die individuelle Schwellendosis jedes Patienten. Eine Integration der Analyse von Allergenen in Lebensmitteln und des Allergenstatus eines Patienten würde eine individuellere Beratung zum Verzehr oder zur Vermeidung bestimmter Lebensmittel ermöglichen. Die Verarbeitung von Lebensmitteln kann zu einer Verringerung oder Erhöhung der Allergenität der enthaltenen Lebensmittelallergene führen). Schutzrechte waren im Teilprojekt von ErdHase nicht zu beachten.

3. Planung und Ablauf des Vorhabens sowie die wesentlichen Ergebnisse

Der zeitliche Ablauf der Arbeiten des Teilprojektes der HGU inklusive der Meilensteine ist in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: Zeitlicher Ablauf der Arbeiten des Teilprojektes 1 der HGU inklusive der erfüllten Meilensteine (MS, ▼)

Teilprojekt Nr.	Meilenstein Nr.	Verantwortlicher Partner	Meilenstein (▼)	2021			2022			2023			2024
1	MS1.1	HGU	Rohstoffe zur Proteinreinigung					▼					
	MS1.2	HGU	Geröstete Materialien für die Proteinreinigung								▼		
	MS2	HGU	Definierte Lebensmittel für Antigen-ELISA und Allergenitäts-ELISA									▼	
	MS3	R-Bio	Validierung der Übereinstimmung von Rohstoffen und Lebensmittelverarbeitung										▼

Meilenstein 1.1: Rohstoffe zur Proteinreinigung

Die notwendigen Rohwaren an Erd- und Haselnüssen wurden direkt aus der Lebensmittelindustrie beschafft. Dabei wurden relevante Rohwaren für die industrielle Verarbeitung hinsichtlich der Sorten und der Herkunftsländer bezogen. Die Lagerung und das Handling erfolgte standardisiert.

Meilenstein 1.2: Verarbeitete Materialien für die Proteinreinigung

Die Verarbeitung von Erd- und Haselnüssen erfolgte unter industriellen Bedingungen der Lebensmittelproduktion. Nach Absprache mit den Projektpartnern und nach Empfehlungen von Stellvertretern der Lebensmittelindustrie wurden für Erd- und Haselnuss jeweils drei Verarbeitungstechnologien festgelegt: Für Erdnüsse wurden Fett-, Infrarot- und Trommelröstung, für Haselnüsse Infrarot-, Trommel- und Wirbelschichtröstung durchgeführt. Für jedes Röstverfahren wurden zwei Verarbeitungsstufen definiert, von denen eine Stufe die kommerziellen Produkte repräsentierte („Industrieröstung“, leicht geröstet) und eine Stufe als dunkler („Dunkle Röstung“, stark geröstet) angesehen wurde. Insgesamt wurden für Erdnuss 9 Proben und für Haselnuss 7 Proben bereitgestellt. Rohe und definiert verarbeitete Erd- und Haselnüsse wurden zur Proteinreinigung der Hochschule Fresenius (HSF) überlassen. Die hergestellten Nussproben und die dazu verwendeten Verfahren repräsentieren die industrielle Herstellungsweise und sind damit reproduzierbar, authentisch und führen zu homogenen Röstergebnissen.

Meilenstein 2: Definierte Lebensmittel für Antigen-ELISA und Allergenitäts-ELISA (für Provokationsstudien)

Nussfreie, authentische Lebensmittelmatrizes wie eine Zartbitterschokolade, ein Sahneersatzprodukt aus Buchweizen, ein Buchweizenkaramell, ein Buchweizenkeks und ein daraus hergestellter Schokoladenriegel wurden standardisiert hergestellt und dienten als Basis für das Spiken mit Nussextrakten bzw. für die Dotierung mit Nusspulvern. Die so variierten Lebensmittel wurden hinsichtlich der Konzentration und Wiederfindung der untersuchten Allergene im Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) getestet. Um die Wirkung des Röstens mit anschließender Back- oder Schokoladenzubereitung zu untersuchen, wurden Proteine aus rohen Nüssen, gerösteten Nüssen, gebackenen Keksen und Schokolade extrahiert und analysiert. Verschiedene rohe oder geröstete Erd- und Haselnüsse wurden für Provokationsstudien an Patienten an den Projektpartner Charité versandt. Die Herstellung von authentischem Probenmaterial von rohen und definiert gerösteten Erd- und Haselnüssen konnte somit umgesetzt werden.

Meilenstein 3: Validierung der Übereinstimmung von Rohstoffen und Lebensmittelverarbeitung

Zur Bestimmung der Proteinzusammensetzung der Nussproben wurde ein optimiertes Proteinextraktionsprotokoll (Puffer, Temperatur-Zeit-Profile) entwickelt. Erd- und Haselnüsse aus verschiedenen Röstmethoden wurden mit dieser optimierten Methode extrahiert und charakterisiert. Ergebnisse der Gelelektrophorese zeigten, dass die Intensität der Proteinbanden im Gel je nach Verarbeitungsstufe variierte. Rohe bzw. durch „Industrie-Röstung“ geröstete Nüsse zeigten vergleichbare Proteinstreifen, während Proteine der Nussproben der „Dunklen Röstung“ teilweise nicht mehr zu sehen waren. Zusätzlich zeigten Western-Blots mit Blutseren aus Patienten, dass die Sensibilisierungsmuster der Allergiker sehr unterschiedlich waren.

4. Zusammenarbeit mit anderen Stellen.

Die Verbundpartner des Projektes ErdHase sind die Hochschule Geisenheim University (= HGU, Institut für Lebensmittelsicherheit), die R-Biopharm AG (= R-Bio), die YUMAB GmbH (= YUMAB), die Hochschule Fresenius (= HSF, Institute for Biomolecular Research, Idstein), die Charité - Universitätsmedizin Berlin (= Charité-D, Department of Dermatology, Venerology and Allergology, Freie Universität Berlin und Humboldt-Universität zu Berlin), die Charité - Universitätsmedizin Berlin (= Charité-PPI, Department of Pediatric Respiratory Medicine, Immunology and Critical Care Medicine, Freie Universität Berlin und Humboldt-Universität zu Berlin) und Deutscher Allergie- und Asthmabund e.V. (= DAAB). Industriepartner als Kooperationspartner waren die Intersnack Deutschland SE (Düsseldorf), die Ferrero oHG mbH (Stadtlendorf) und die Kreyenborg GmbH (Senden).

II. Eingehende Darstellung (maximal 20 Seiten)

1. der Verwendung der Zuwendung und des erzielten Ergebnisses im Einzelnen, mit Gegenüberstellung der vorgegebenen Ziele,

Erdnuss und Haselnuss gehören zu den häufig konsumierten Lebensmitteln, die nährstoffreich und geschmacksvoll sind. Allerdings können Erdnuss und Haselnuss eine Nahrungsmittelallergie auslösen, die mit komplexen klinischen Manifestationen zu erwarten ist. Dementsprechend lag der Fokus vom interdisziplinären Projekt ErdHase, das vom Bundesministerium für Bildung und Forschung im Zeitraum 2021-2024 gefördert wurde, auf der Verbesserung der Patientensicherheit. Hierzu sollten analytische Werkzeuge für das Management von Erdnuss- und Haselnussallergenen entlang der Wertschöpfungskette der Lebensmittelproduktion bereitgestellt werden.

Das Institut für Lebensmittelsicherheit an der Hochschule Geisenheim University (HGU) unterstützte die Forschungsarbeit in ErdHase mit der Expertise in der Lebensmitteltechnologie des Röstens, Backens, Kochens, der Schokoladenherstellung, in der Lebensmittelanalytik, -sensorik und -sicherheit sowie in der Entwicklung von authentischen Rezepturen. Dementsprechend beinhaltete das Forschungsvorhaben der HGU (01EA2107C) vor allem die Etablierung von definierten Prozessen und Parametern für die Verarbeitung von Erdnuss und Haselnuss, die Bewertung von Verarbeitungsstufen, die Optimierung der Proteinextraktion und die Bestimmung der Allergenwiederfindung von authentischen, dotierten Lebensmitteln.

Zielsetzung vom Teilprojekt 1: Etablierung von definierten Prozessen in der Lebensmittelverarbeitung

Das Ziel dieses Teilprojekts 1 ist es, verschiedene Lebensmittelherstellverfahren für Erd- und Haselnuss zu definieren, die sowohl ansatzweise industrienahe verwendet werden als auch einen Einfluss auf das Vorhandensein und auf das allergene Potenzial der Proteine haben. Dafür sollen rohe und verarbeitete Erd- und Haselnüsse zur Proteinreinigung und auch als Ausgangsmaterial für die Provokation von Patienten bereitgestellt werden. Des Weiteren sollen verschiedene authentische Lebensmittel für die Validierung von Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) hergestellt werden.

Ergebnisse vom Teilprojekt 1: Etablierung von definierten Prozessen in der Lebensmittelverarbeitung

Im Folgenden sind die Ergebnisse der Meilensteine der HGU beschrieben.

Ergebnisse zum Meilenstein 1.1: Rohstoffe für die Proteinreinigung

Durch Beratung seitens der Industriepartner Intersnack Deutschland SE (Düsseldorf, Deutschland) und Ferrero oHG mbH (Stadtallendorf, Deutschland) wurden diverse Erd- und Haselnüsse für das Projekt ErdHase aufgenommen (Tabelle 1, Abbildung 1A und B). Die Lagerung von den vorhandenen Rohwaren an Erd- und Haselnüssen erfolgte standardisiert (Verpackung in lebensmittelechten Polyethylen-Siegelrandbeuteln und luftdicht verschließbaren Weißblech-Containern, Dokumentation der Temperatur und der relativen Luftfeuchtigkeit). Bei Bedarf wurden die Lagerbedingungen durch Geräte zur Raumentfeuchtung und forcierten Luftzirkulation im für die Rohwaren festgelegten Bereich erhalten.

Tabelle 1: Rohwaren von Erdnuss und Haselnuss im Projekt ErdHase

Nuss	Sorte	Herkunft	Abkürzung	Erntejahr
Erdnuss (<i>Arachis hypogaea</i>)	Virginia	China	CN	2021, 2022
	Runner	USA	US	2021, 2022
	Runner	Argentinien	AR	2021
Haselnuss (<i>Corylus avellana</i>)	-	Türkei	TR	2020, 2021
	-	Chile	CL	2021

Hierbei wurde herausgestellt, dass China bzw. die Türkei in den Jahren 2021 und 2022 die führenden Erzeugungsländer für Erdnuss bzw. Haselnuss waren (FAO, 2023a, 2023b). Aufgrund dessen wurden nach Absprache Erdnüsse aus China (CN) und Haselnüsse aus der Türkei (TR), beide Erntejahr 2021, als Rohwaren für die Proteinreinigung verwendet. Vor der weiteren Verarbeitung der Erdnüsse wurden diese standardmäßig blanchiert (b).

Zur Charakterisierung der Rohwaren erfolgte die Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration mit Hilfe des Bradford-Assays und die Auftrennung der Proteinbanden mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE). Die rohen, blanchierten Erdnüsse aus China (CNb), aus den USA (USb) und aus Argentinien (ARb) zeigten vergleichbare Gesamtproteinkonzentrationen. Bei den rohen Haselnüssen war die Proteinkonzentration der Haselnuss aus Chile (CL) höher als die der Haselnuss aus der Türkei (TR). Beim Vergleich der Proteinzusammensetzung war auffällig, dass die Proteinbanden bei ungefähr 38 kDa von den rohen Erdnüssen USb und ARb eine deutlich höhere Intensität hatten als diese von der rohen Erdnuss CNb (Abbildung 2A). Somit scheinen die Erdnüsse aus Amerika einen höheren Anteil des Proteins Ara h 3 zu haben. Dies sollte auf eine höhere Menge an einem Ara h 3-Isoform zurückzuführen sein, welche abhängig vom Anbauggebiet unterschiedlich sein könnte. Bei beiden Haselnüssen wurde kein Unterschied in der Proteinzusammensetzung festgestellt.

Ergebnisse zum Meilenstein 1.2: Verarbeitete Materialien für die Proteinreinigung

Für Erdnuss bzw. Haselnuss sollten entsprechende Verarbeitungstechnologien festgelegt werden, die der industriellen Prozessierung entsprechen. Nach einer Umfrage vom Projektpartner DAAB im Rahmen von ErdHase und nach Empfehlungen von Industrievertretern wurden für Erdnuss und Haselnuss jeweils drei Verarbeitungsmethoden ausgewählt: Für Erdnuss waren dies die Fett- (Frittieren), die Infrarot- und die Trommelröstung; für Haselnuss die Infrarot-, die Trommel- und die Wirbelschicht- röstung (Abbildung 1C). Die Infrarotröstung wird als neue Technologie zunehmend in der Lebensmittelindustrie genutzt. Es wurden immer die zwei unterschiedlichen Röststufen „Industrieröstung“ und „Dunkle Röstung“ untersucht (Tabelle 2). Bezüglich der Nomenklatur der verarbeiteten Produkte wurden Erdnuss mit E, Haselnuss mit H, Trommelröstung mit T, Infrarotröstung mit I, Fettröstung (Frittieren) mit F und Wirbelschicht- röstung mit W abgekürzt. Zusätzlich wurde der Temperatur-Zeit-Profil in der Nomenklatur spezifiziert. Zum Beispiel wurde die frittierte Erdnuss CNb bei 140 °C, 10 min als EF14010CNb, die mit dem Infrarotröster bei 160 °C, 20 min geröstete Haselnuss wurde als HI16020 bezeichnet. Zusätzlich wurde die gekochte (K) Erdnuss noch ergänzt (EK20CNb), da vorhergehende Studien zeigten, dass gekochte Erdnüsse ein geringeres allergenes Potential haben. Ein Teil der gekochten, getrockneten Erdnüsse wurden anschließend mit dem Trommelröster auf die Stufe „Dunkle Röstung“ geröstet (EKT12020CNb).

Tabelle 2: Prozessierungen von Erdnuss und Haselnuss

Verarbeitungs- stufe	Erdnuss (China, blanchiert)			Haselnuss (Türkei)		
	Trommel- röstung	Fett- röstung	Infrarot- röstung	Trommel- röstung	Wirbelschicht- röstung	Infrarot- röstung
Industrie- röstung	115 °C, 5 min	130 °C, 10 min	130 °C, 20 min	120 °C, 10 min	135 °C, 15 min	140 °C, 20 min
Dunkle Röstung	120 °C, 20 min	140 °C, 10 min	150 °C, 20 min	120 °C, 20 min	150 °C, 25 min	160 °C, 20 min

Als Standard-Probenzustand wurden nach den Vorversuchen immer kryo-feinvermahlene Nusspulver verwendet. Die Messungen der jeweiligen Produktfarbe erfolgte mit der Colorette 4 (Probat) (Abbildung 1D). Insgesamt wurden für jede Nuss-Rösttechnik-Kombination 16 Röstungen durchgeführt, von denen 12 Proben für die Modellierung mittels Response-Surface-Methodology und 4 Proben für die Modellvalidierung benutzt wurden. Für die Response-Surface-Methodology waren Temperatur und Zeit die unabhängigen Variablen. Untersuchte Variablen waren der Feuchtegehalt, die Helligkeit (L^*) und der Browning-Index (BI) im CIELab-Farbraum sowie die totale Farbdifferenzierung (ΔE_{76} und ΔE_{2000}). Als Ergebnis zeigte sich, dass bezüglich der Bewertung der Röstproben L^* und BI zusammen ausgewertet werden müssen. Dementsprechend wurden Akzeptanzbereiche für L^* und BI anhand von kommerziellen Marktprodukten bzw. von Röstmodellen von der Industrie definiert mit denen eine Röstprobe als vergleichbar zu kommerziellen Produkten angesehen wurde. Dies gilt immer nur dann, wenn sich L^* und BI gleichzeitig innerhalb dieser definierten Bereiche befinden. Ansonsten gilt die Röstprobe als nicht vergleichbar zu kommerziellen Produkten. Im Zusammenhang mit der Modellierung mittels Response-Surface-Methodology konnte jeweils ein Temperatur-Zeit-Profil für jede Nuss-Rösttechnik-Kombination bestimmt werden mit dem eine optimale Röstprobe hergestellt werden kann.

Des Weiteren gehörte zu diesem Meilenstein die Herstellung von authentischen, allergenfreien Lebensmitteln nach standardisierten Rezepten. Dies waren eine Zartbitterschokolade, ein Sahneersatzprodukt aus Buchweizen, ein Buchweizenkaramell, ein Buchweizenkeks und ein daraus hergestellter Schokoladenriegel. Diese sollten zum Spiken und zur Dotierung von Erdnuss- oder Haselnussproben verwendet werden. Spikeproben sind fertige Lebensmittelmatrizes, in denen eine bestimmte Menge an Nussextrakten hinzugegeben wurde. Im Unterschied dazu sind dotierte Proben Lebensmittelproben, die sonst frei von Erdnuss und Haselnuss sind und die bei der Herstellung eine bestimmte Menge an Erdnuss oder Haselnuss untergemischt wurden. Zur Messung dieser Proben wurde der Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) benutzt, um die Allergenwiederfindung zu bestimmen. Die Wiederfindung berechnet sich aus dem Quotienten zwischen der bestimmten Allergenkonzentration und der theoretischen Allergenkonzentration.

In der Bachelor-Thesis von Fey (2022) und der Master-Thesis von Keller (2023) wurden verschiedene Haselnuss-Konzentrationen verwendet, um diese authentischen und nussfreien Matrizes zu spiken. Ergebnisse zeigten eine höhere Wiederfindung im gespikten Karamell im Vergleich zur Zartbitterschokolade und zum Buchweizenkeks. Außerdem fiel auf, dass die Standardabweichung der Wiederfindung von den gespikten Schokoladenproben sehr niedrig war (Abbildung 3A). Gespiktes Karamell und gespikter Buchweizenkeks wiesen eine deutlich höhere Standardabweichung auf. Es deutete darauf hin, dass die Verteilung von Haselnuss-Allergenen nicht homogen war, wodurch große Schwankungen zwischen den Messungen verursacht wurden. Die Wiederfindung von Buchweizenkekse gespickt mit HW13515 bzw. HI14020 waren im ELISA-Test nicht bestimmbar. Dementsprechend wurden zuerst das Karamell genauer untersucht, indem eine Haselnuss-Dotierung statt Spiken verwendet wurde. Die Dotierung im Karamell erfolgte durch die Dotierung des Sahneersatzproduktes aus Buchweizen, welches eine Komponente bei der Herstellung von Karamell war. Für die Herstellung dieses Produktes wurde eine Mischung aus lebensmittelsicheren Enzymen verwendet und anschließend deaktiviert, um Buchweizen zu verflüssigen. Daraus folgte, dass die Haselnuss-Zugabe entweder vor oder nach der Enzymdeaktivierung gemacht wurde. Darüber hinaus wurde ein Hochdruck-Homogenisator eingesetzt, um potentiell die Homogenität zu verbessern (Abbildung 1E). Die Homogenität der Allergenverteilung wurde anhand der Wiederfindung und mit Hilfe vom Fearn-Thompson-Test sowie den Variationskoeffizienten überprüft (AOAC International, 2019; Fearn & Thompson, 2001).

Arens (2023) zeigte in ihrer Bachelor-Thesis, dass die Dotierung nach der Enzymzugabe bei der Buchweizensahne erfolgen sollte. War Dotierung vor der Enzymdeaktivierung, so war die Wiederfindung der dotierten Sahneersatzprodukten extrem niedrig (Abbildung 3B), wodurch es mit einer deutlich höheren Haselnussmenge bei der Dotierung rechnen müsste. Das Sahneersatzprodukt wurde jeweils mit einer Erdnussprobe EI13020CNb in drei unterschiedlichen Konzentrationen dotiert. Bei zwei Dotierungskonzentrationen waren die Wiederfindungen vergleichbar bei ungefähr 130 %. Bei der höchsten Konzentration wurde jedoch eine deutlich höhere Wiederfindung mit stärkerer Standardabweichung beobachtet (Abbildung 3C).

Zur Festlegung des Dotierungszeitpunktes des Buchweizenkekses wurden vom Mahlen bis zum Backen Testdotierungen durchgeführt (Abbildung 1F). Hierfür wurde zuerst der Effekt vom Backen auf die Allergenwiederfindung von dotiertem Buchweizenteig und dem daraus gebackenen Buchweizenkeks untersucht. Als Ergebnis folgte, dass das Backen die Wiederfindung sowohl von Erdnuss als auch von Haselnuss stark reduzierte. Für den Erdnuss-dotierten Keks nahm die Wiederfindung von 300 % auf 40 % ab, und beim Haselnuss-dotierten Keks hat sich die Wiederfindung von ungefähr 135 % auf 30 % geändert (Abbildung 3D).

Ebenfalls wurde die Homogenität nach Fearn-Thompson-Test und nach dem Variationskoeffizienten untersucht. Die Homogenität der Allergenverteilung in diesen Lebensmitteln unterscheidet sich, ob mit Erdnuss oder Haselnuss dotiert wurde. Die Verteilung von Haselnuss war homogener als die Verteilung von Erdnuss in den dotierten Lebensmittelmatrizes.

Buchweizenkekse wurden mit den verschiedenen Erdnuss- und Haselnussproben dotiert und analysiert. Es zeigte sich, dass Buchweizenkekse, die mit Infrarotröstung gerösteten Erdnüssen oder mit Trommelröstung gerösteten Haselnüssen dotiert wurden, die niedrigste Allergenwiederfindung im ELISA-Test aufwiesen (Abbildung 3E). Dies deutet darauf hin, dass die beiden Rösttechniken einen Einfluss auf die Reaktivität der Proteine mit den Antikörpern im ELISA-Test haben bzw. dass die Extrahierbarkeit der Proteine durch die Art und Weise des Energieeintrags und somit der Rösttechnik beeinflusst wurde.

Zusätzlich wurde für vier Haselnuss-dotierte Buchweizenkekse ein Lagerungsstabilitätstest durchgeführt, indem sie fünf Monate entweder bei Raumtemperatur, bei 4 °C oder bei -20 °C luftdicht gelagert wurden. Das Ergebnis zeigte keinen Unterschied in der Wiederfindung nach fünf Monaten, unabhängig von der Lagerbedingung (Abbildung 3F). Somit haben diese Haselnuss-dotierten Buchweizenkekse den Stabilitätstest bestanden. Dementsprechend wären solche Haselnuss-dotierten Buchweizenkekse als Proben für zukünftige Interlabor-Validierungstestungen geeignet, die potentiell eine längere Transportzeit benötigen würden.

Anschließend wurde überprüft, ob die Zugabe eines lebensmittelsicheren Enzyms bei der ELISA-Extraktion zu einer Verbesserung der Allergenextraktion aus dotierten Lebensmitteln führt. Hierzu wurden verschiedene Enzyme getestet. Es zeigte sich, dass die Zugabe eines bestimmten Enzyms zu einer signifikanten Erhöhung der Allergenwiederfindung bis zu fünffach führte. Dieser Effekt wurde bei Erdnuss-dotierten Sahneersatzprodukten aus Buchweizen und bei Haselnuss-dotierten Buchweizenkekse beobachtet. Kontrollexperimente mit reinen Nussextrakten zeigten jedoch, dass die Erhöhung der OD₄₅₀ im ELISA-Test ebenfalls für diese beobachtet wurde. Im Falle, dass das Material, welches zur Herstellung der Kalibratoren verwendet wurden, mit dem Enzym extrahiert wird, wird die Wiederfindung potentiell wieder vergleichbar zum Ansatz ohne Enzym bleiben. Nichtsdestotrotz ließ sich daraus schließen, dass das Enzym einen positiven

Effekt auf die Extrahierbarkeit und Fragmentierung der Nussproteine hatte. Aufgrund dieser positiven Wirkung werden zukünftig weitere Untersuchungen bzgl. der Anpassung von ELISA-Komponenten benötigt, um diesen Effekt genauer zu charakterisieren.

Ergebnisse zum Meilenstein 2: Definierte Lebensmittel für Antigen-ELISA und Allergenitäts-ELISA (für Provokationsstudien)

Für den direkten basophilen Aktivierungstest und zum Skin-Prick-Test bei den Patienten wurden insgesamt 9 Erdnussproben und 7 Haselnussproben für die Projektpartner der Charité bereitgestellt (Abbildung 2C und D), von denen folgende ausgewählt wurden (Unterstrich=Kontrollprobe): Erdnuss – ungeröstet, ET12020, EI15020, gekocht, gekocht ET12020; Haselnuss – ungeröstet, HT12010, HT12020, HW13515, HW15025, HI14020, HI16020. an

Meistens hatten die verarbeiteten Nussproben eine niedrigere Gesamtproteinkonzentration im Vergleich zu der jeweiligen Rohware. Nüsse, die bei niedrigeren Temperaturen geröstet wurden („Industrie-Röstung“), zeigten eine sehr viel höhere Wiederfindung als bei höheren Temperaturen geröstete Nüsse. Es konnten mehr Proteine von den verarbeiteten Produkten mit „Industrieröstung“ im Wässrigen extrahiert werden, welches zu einer höheren Intensität der Proteinbanden im Gel führte (Abbildungen 2B, C und D). Bei Erdnuss reduzierte das Kochen und bei Haselnuss die Infrarotröstung am meisten die Gesamtproteinkonzentration der Produkte.

Bezüglich der Analyse der Proteinzusammensetzung wurde festgestellt, dass mit zunehmender Verarbeitungsstufe die Bandenintensität abnahm. Bei Erdnussproben war dieses Phänomen deutlich bei Ara h 1 (72 kDa) und Ara h 3 (42 und 25 kDa), besonders bei EI15020CNb and EKT12020CNb (Abbildung 2C). Bei Haselnussproben war dies beispielsweise bei Cor a 1 (20 kDa) und Cor a 11 (55 kDa) zu sehen. Außerdem fiel es auf, dass die Intensität der Proteinbande bei 70 kDa in prozessierten Haselnüssen höher war im Vergleich zur rohen Haselnuss aus der Türkei (Abbildung 2D). Es ließ sich vermuten, dass einerseits die Proteine durch die thermische Verarbeitung denaturiert oder durch Crosslinking modifiziert waren. Dementsprechend war die Menge, die anhand der Bandenintensität zu schätzen war, von diesen Proteinen geringer. Darüber hinaus konnten neue Proteinkomplexe gebildet werden, die als neue Banden im hohen Molekularbereich zu sehen waren. Andererseits konnten die Proteine durch die thermische Behandlung nicht mehr im Wässrigen extrahiert werden. Dies führte ebenfalls zu reduzierter Proteinmenge und Intensität der Proteinbande.

Ergebnisse zum Meilenstein 3: Validierung der Übereinstimmung von Rohstoffen und Lebensmittelverarbeitung

Im Meilenstein 3 konzentrierten sich die Forschungstätigkeiten an der HGU einerseits auf die Extraktion der Allergene und andererseits auf Western-Blots mit Blutseren aus Patienten.

Zur Optimierung der Extraktion der Erd- und Haselnuss-Allergene wurden verschiedene Faktoren die Pufferzusammensetzung, der pH-Wert, die Temperatur und die Extraktionsdauer variiert. Dabei wurde herausgestellt, dass Tris eine wichtige Komponente ist und der pH-Wert des Puffers im basischen Bereich sein sollte. Darüber hinaus erhöhte das Aufwärmen die Extraktionsausbeute signifikant. Zur Optimierung der Extraktionstemperatur und Zeit wurde Response-Surface-Methodology angewendet. Aufgrund des gleichen Verhaltens von Erdnuss und Haselnuss bei der Gesamtproteinextraktion wurden hierbei repräsentativ zwei Erdnussproben verwendet. Die rohe Erdnuss CNb und die Erdnussprobe EI15020CNb stellten die rohe und die stark-verarbeitete Probe dar, die zwei Extrema des Verarbeitungsspektrum beinhalten.

Durch die Patientenrekrutierung an der Charité-D und Charité-PPI wurden insgesamt 11 Blutseren von Nussallergikern (10 Erwachsene, 1 Kind) abgenommen und im Projekt ErdHase zur Verfügung gestellt. Die Blutseren stammten aus Patienten, die mit primärer Erdnuss- bzw. Haselnussallergie diagnostiziert wurden. Sie wurden hinsichtlich des Vorkommens von IgE-Antikörpern im Western-Blot untersucht, um herauszufinden, ob die betroffenen Patienten eine Reaktivität der IgE-Antikörper zu der im Teilprojekt 1 isolierten Antigene (= Erdnuss- bzw. Haselnuss-Allergene unter den definierten Röstbedingungen) aufwiesen. Die Ergebnisse der Western-Blots zeigten, dass die Sensibilisierungsmuster der Patienten sehr individuell waren.

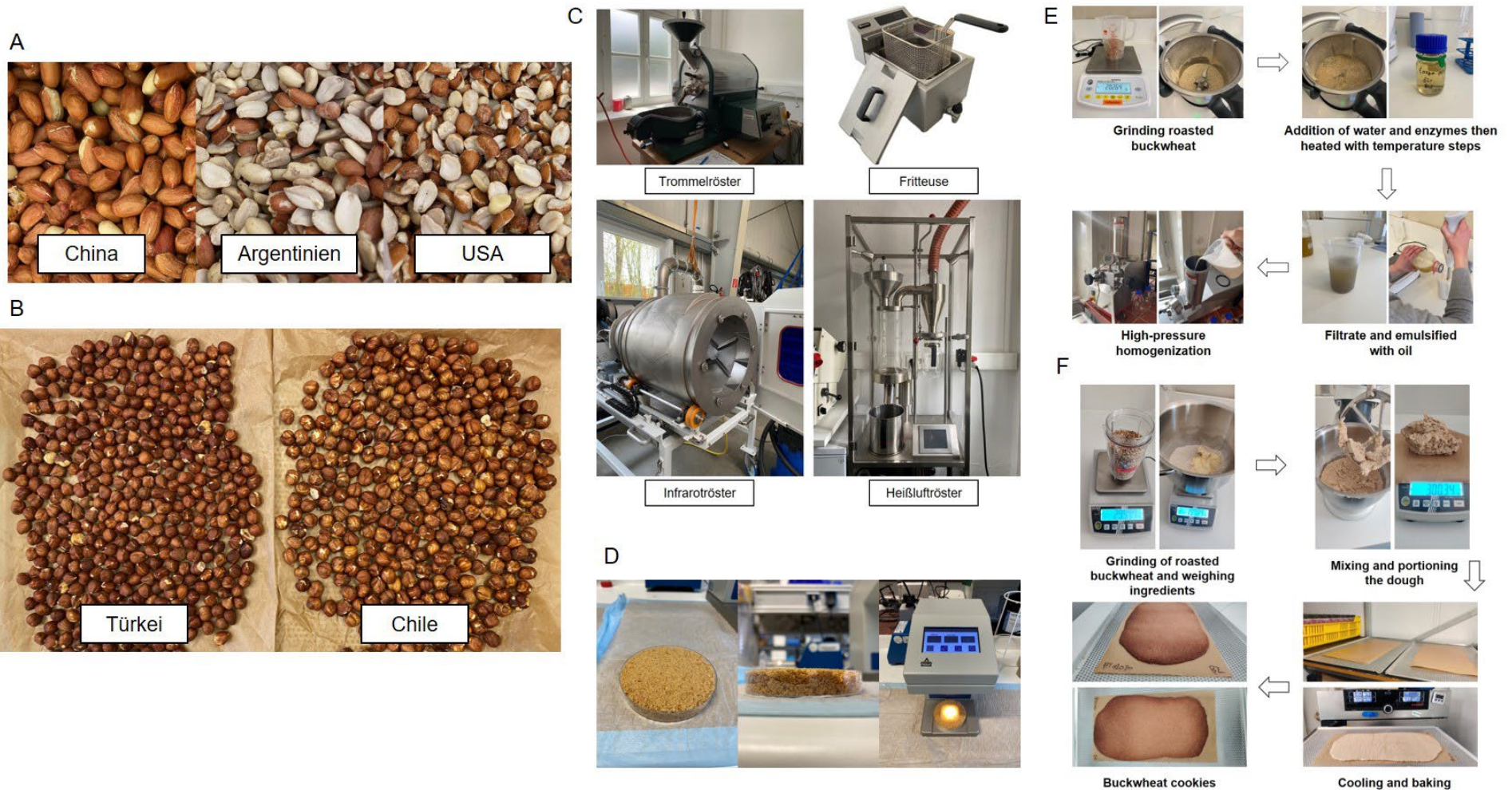


Abbildung 1: (A) Rohwaren von Erdnüssen, (B) Rohwaren von Haselnüssen, (C) Industrielle Prozessierungstechnologien zum Rösten, (C) Probenvorbereitung für die Farbmessung mit der Colorette 4 (PROBAT), (E) Verfahren zur Herstellung eines Sahneersatzproduktes aus Buchweizen, (F) Verfahren zur Herstellung von Buchweizenkeksen

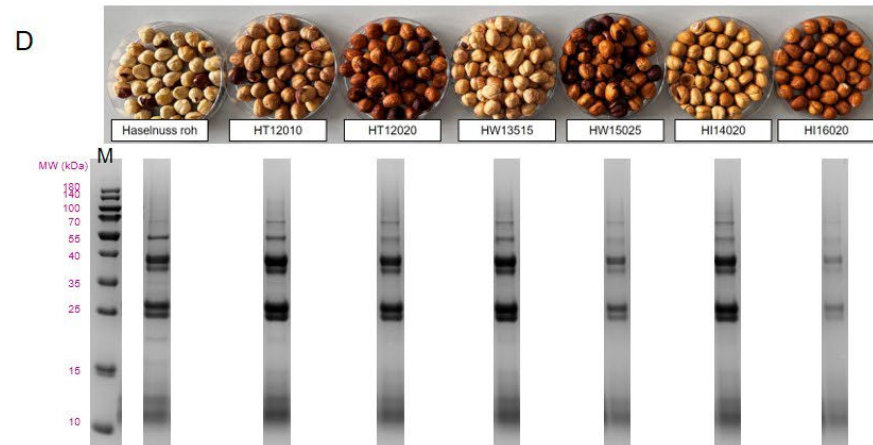
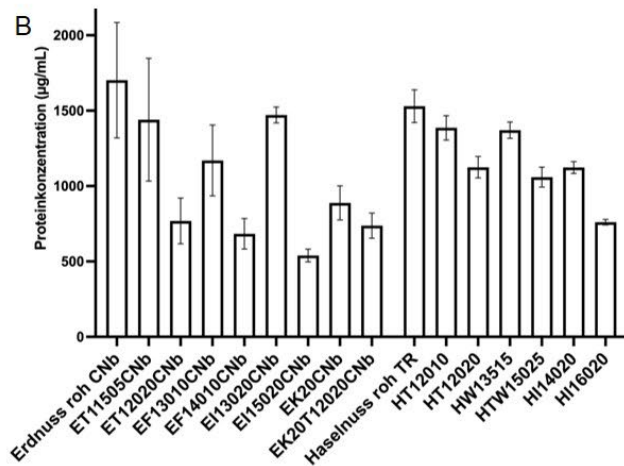
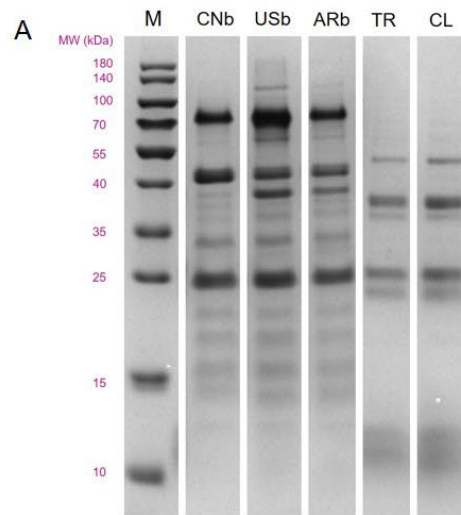


Abbildung 2: Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration und SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese. (A) Proteinzusammensetzung von Erdnuss- und Haselnuss-Rohwaren, (B) Gesamtproteinkonzentrationen der rohen und verarbeiteten Erdnüsse und Haselnüsse, (C) Ausgewählte Erdnussproben für die Provokationsstudien und ihre Proteinzusammensetzung, (D) Ausgewählte Haselnussproben für die Provokationsstudien und ihre Proteinzusammensetzung. Bolt™ 4-12 % Bis-Tris Plus Minigel, M = PageRuler™ vorgefärbte Proteinmarker, E = Erdnuss, H = Haselnuss, AR = Argentinien, CL = Chile, CN = China, TR = Türkei, US = USA, b = blanchiert, F = Fettröstung (Frittieren), I = Infrarotröstung, T = Trommelröstung, W = Wirbelschichtröstung, K = gekocht.

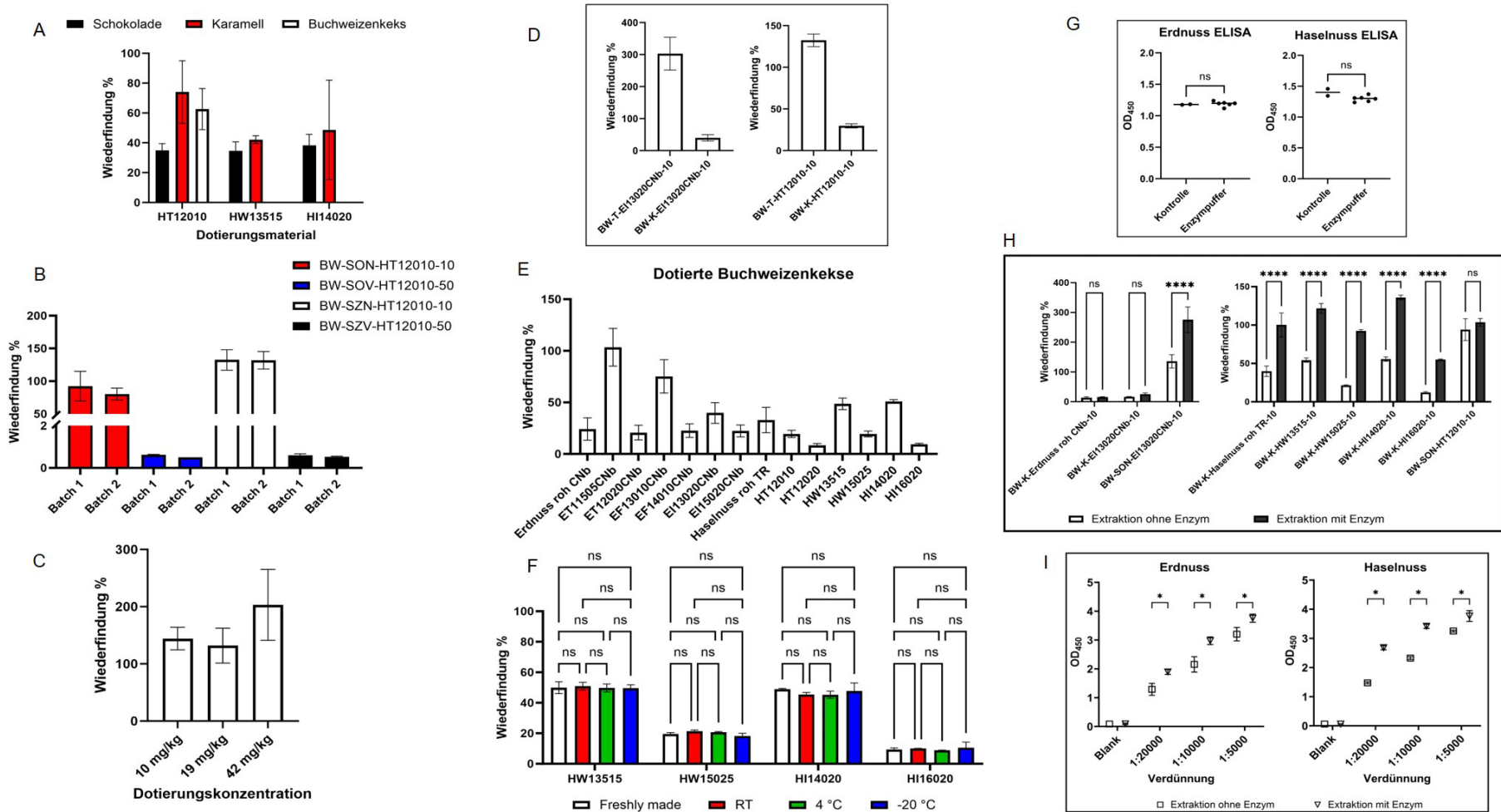


Abbildung 3: ELISA-Tests mit der jeweiligen Bestimmung der Allergenwiederfindung.

2. der wichtigsten Positionen des zahlenmäßigen Nachweises,

Ein Wissenschaftler und ein administrativ-technischer Mitarbeiter zur Planung und Durchführung der Experimente, Bewertung der experimentellen Daten und Berichterstattung des Projektes.

Die Ausgaben im Teilprojekt 1 der Hochschule Geisenheim sind in folgender Tabelle dargestellt:

Position	Positionsbezeichnung	Ausgaben
0812 + 0817	Personal	200.653,24 €
0831	Gegenstände bis 800/410/400€	3.969,29 €
0843	Sonstige allgemeine Verwaltungsausgaben	22.378,26 €
0846	Dienstreisen	3.783,97 €
	Gesamtsumme	230.784,76 €

3. der Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit,

Die Ziele des Teilprojektes an der HGU wurden erreicht. Dies war nur möglich durch die finanzielle Unterstützung im Rahmen dieses Projektes ErdHase.

4. des voraussichtlichen Nutzens, insbesondere der Verwertbarkeit des Ergebnisses im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplans,

Vorstellung auf Kongressen:

- Fresenius Praxistage 2021/2022
- DAAB Runder Tisch „Lebensmittelallergien und Allergenmanagement“ 2022/2023
- Lebensmittelverband: Update Lebensmittelallergien 2022
- EAACI FAAM Eurobat 2022
- WAPPA-Klausurtagung in Bensberg 2023
- Deutscher Allergie Kongress in Bonn 2023
- Choco Tec 2022
- Geisenheimer Forschungsforum 2023
- HGU Summer School, Hochschule Geisenheim 2023
- Wissenschaftstag Hochschule Fresenius 2023
- ALB Treffen der Verbraucherschutzministerien der Länder 2023
- FAAM Athen 2024

5. des während der Durchführung des Vorhabens dem ZE bekannt gewordenen Fortschritts auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen,

In einem weiteren Drittmittelprojekt (ZeBaP), welches zur gleichen Zeit unterstützt wurde, konnte eine Dissertation von Lars Störmer verfasst werden. Die in diesem Projekt untersuchten gerösteten Nussproben

wurden im Rahmen von ErdHase in Teilprojekt 1 an der Hochschule Geisenheim hergestellt. Auch hier ging es um die Verarbeitung und Röstung von Erdnüssen. In diesem Projekt wurden die gerösteten Erdnüsse chemisch analysiert. Die Daten daraus wurden durch eine enge Zusammenarbeit offen kommuniziert und halfen beim Verständnis bei der Extrahierbarkeit von Erdnussproteinen.

6. der erfolgten oder geplanten Veröffentlichungen des Ergebnisses nach Nr. 5 NABF.

Im Rahmen des Projektes ErdHase sind folgende Abschlussarbeiten an der Hochschule Geisenheim University abgeschlossen worden (in zeitlicher Reihenfolge):

- Lotz, T. (2021): Validierung der Reinigung eines Wirbelschichtrösters für das Rösten von Haselnüssen, Bachelor-Thesis, Hochschule Geisenheim University
- Mitterberger, C. (2021): Nachweis von Proteinen in verarbeitetem Buchweizen am Beispiel von Gebäck, Fallstudienprojekt, Hochschule Geisenheim University
- Muno, A. (2021): Alternative Extraktionsmethoden zur Isolierung von Haselnussproteinen, Bachelor-Thesis, Hochschule Geisenheim University
- Moritz-Schöpe, L. (2021): Investigation of factors affecting the stability of protein oligomers by SEC and TSA, Bachelor-Thesis, Hochschule Fresenius Idstein (gemeinsame Betreuung mit der Hochschule Geisenheim University)
- Schmitz, K. (2022): Untersuchungen zum Röstgrad von Erdnüssen, Bachelor-Thesis, Hochschule Geisenheim University
- Fey, N. (2022): Nachweis des allergenen Potenzials von Haselnüssen in einem Schokoladenriegel, Bachelor-Thesis, Hochschule Geisenheim University
- Keller, L. (2023): Prozessierung von Haselnüssen und deren allergenes Potenzial in Schokoladenprodukten, Master-Thesis, Hochschule Geisenheim University
- Arens, C. (2023): Homogenität von Haselnussallergenen in Buchweizensahne, Bachelor-Thesis, Hochschule Geisenheim University
- Dittrich, J. (2023): Einfluss von Proteasen auf das Proteinmuster von Erdnuss- und Haselnussallergenen, Fallstudienprojekt, Hochschule Geisenheim University
- Dittrich, J. (2023): Einfluss von Proteasen auf den immunologischen Nachweis von Erdnuss- und Haselnussallergenen, Bachelor-Thesis, Hochschule Geisenheim University

Le Ngoc, D. (2024): Dissertation; Die Abgabe der schriftlichen Dissertation erfolgte im April 2024; die Disputation ist in den nächsten Monaten geplant

Weitere Publikationen aus der Dissertation von Duc Le Ngoc sind in Bearbeitung.