

Dt. Institut für Lebensmitteltechnik e.V.

Name der Forschungsstelle(n)

14805 N /

IGF-Vorhaben-Nr. / GAG

01.07.2006 - 31.12.2008

Bewilligungszeitraum

## Schlussbericht für den Zeitraum : 01.07.06 - 31.12.08

zu dem aus Haushaltsmitteln des BMWi über die



geförderten IGF-Forschungsvorhaben

Normalverfahren

Fördervariante ZUTECH

Forschungsthema :

Entwicklung/Adaption einer speziellen Anlagen-Reinigungstechnologie für pulverförmige Produkte zur Vermeidung der Verschleppung allergener Lebensmittelbestandteile

Für ein ZUTECH-Vorhaben sind folgende zusätzliche Angaben zu machen:

Der fortgeschriebene Plan zum Ergebnistransfer in die Wirtschaft

ist beigefügt

liegt bereits vor

wird fristgerecht nachgereicht

Quakenbrück, den 22.04.09

Ort, Datum

Unterschrift der/des Projektleiter(s)

## Zusammenfassung

### **Entwicklung/Adaption einer speziellen Anlagen-Reinigungstechnologie für pulverförmige Produkte zur Vermeidung der Verschleppung allergener Lebensmittelbestandteile**

In der Richtlinie 2003/89/EG hinsichtlich der Angabe der in Lebensmitteln enthaltenen Zutaten wurden grundlegende Änderungen für die Kennzeichnung von Lebensmitteln in Bezug auf das potenzielle Vorkommen von Lebensmittelallergenen fixiert. Backmischungen und Fertigcompounds für Bäckerhandwerk und Industrie sind eine Produktgruppe, für die diese verschärfte Allergen Kennzeichnung von Bedeutung ist, wobei Eier, Milch und Haselnüsse die relevanten allergenen Substanzen darstellen. Die besondere Problematik liegt hier in der Trockenreinigung als einzig wirtschaftlich vertretbarem Verfahren. Einen erfolgversprechenden Ansatz bietet die vom Deutschen Institut für Lebensmitteltechnik e.V. (DIL), dem Institut für Energie- und Umwelttechnik e.V. (IUTA) und der Universität Hamburg, Institut für Biochemie und Lebensmittelchemie, vorgenommene Übertragung eines Reinigungsverfahrens aus der Biotechnologie basierend auf einer konzentrierten Lösung mit filmbildenden Hydrokolloiden (u.a. Gelatine). Diese Reinigungslösung trocknet nach dem Aufbringen ab, löst sich dann von der Oberfläche und lässt sich zusammen mit den gebundenen Verunreinigungen manuell leicht entfernen. Der Einsatz von Gelatine als Basis für die Reinigungslösung kann in Bezug auf das allergene Potenzial als unbedenklich angesehen werden.

Im Rahmen der durchgeführten Untersuchungen zum analytischen Nachweis allergener Proteine in verschiedenen Matrices wurden geeignete Extraktionsmittel und -bedingungen für die Gewinnung der allergenen Proteine aus der Matrix bestimmt. Wenn die Matrix, z.B. Weizenmehl, nicht unerhebliche Mengen an anderen Proteinen enthielt, verringerte sich die Trennschärfe bei den Immunoblot-Verfahren und die Nachweisgrenze erhöhte sich. Zudem konnte gezeigt werden, dass bei der Anwendung von Patientenseren auf Extrakte aus diesen Matrices falsch-positive Ergebnisse bedingt durch Reaktionen der Antikörper hoch sensibilisierter Allergiker auf Matrixproteine auftreten können. Die Nachweisgrenzen der ELISA-Testkits, insbesondere unter Berücksichtigung der optimierten Extraktionsmittel, waren niedriger als die der Immunoblot-Verfahren.

Die Fließeigenschaften der Reinigungslösungen konnten durch Änderung der Gelatinekonzentration in einem weiten Bereich variiert und damit an die Versprühbedingungen angepasst werden. Der Zusatz von Emulgatoren, insbesondere Tween 80, verbesserte das Benetzungsverhalten der Lösungen und die Partikeleinbindung deutlich und hatte nur einen relativ geringen Einfluss auf das Verfestigungsverhalten der Gele.

Die Untersuchungen zur Auftragung der Reinigungslösungen mittels Zerstäuber ergaben nur für die Zweistoffdüse mit Druckluft als Versprühmedium bei ausreichender Temperierung des Gesamtsystems akzeptable Filme auf den Edelstahloberflächen. Das Auftragen von 20%igen Gelatinelösungen war dann mit handelsüblichen Kesselpistolen relativ einfach möglich und führte nach einer Gelierzeit von ca. 30 min bei einer Mindestschichtdicke von 2 mm zu gut ablösbaren Filmen, welche die erforderliche Festigkeit für deren manuelle Entfernung (Abziehen) aufwiesen.

Die praxisnahe Erprobung des alternativen Reinigungsverfahrens erfolgte in einem Pflugscharmischer im Technikum mit eiproteinreichem Trockenmaterial. Dabei zeigten sich in der Nachfolgecharge erhebliche Kontaminationen an Eiproteinen, wenn zuvor nur mittels Ausfegen und/oder Aussaugen, gereinigt wurde. Deutlich bessere Ergebnisse ergab die Reinigung mit einer Zwischencharge „Reinigungszucker“. Die Anwendung des alternativen Verfahrens ermöglichte eine annähernd vollständige Vermeidung der Verschleppung, wobei auch hier ein positiver Einfluss des Emulgatorzusatzes auf die Partikeleinbindung (Reinigungsergebnis) und die Ablöseigenschaften des Films feststellbar war.

Mit diesem innovativen Reinigungsverfahren steht den kleinen und mittelständischen Verarbeitern pulverförmiger Mischungen eine Reinigungsmethode zur Verfügung, mit der Verschleppungen aus einem Produkt in das nachfolgend verarbeitete Produkt vermieden werden können, ohne dass eine aufwendige Nassreinigung erforderlich ist. Daraus resultiert eine erhöhte Produktsicherheit, so dass Fehlchargen oder Rückrufaktionen reduziert werden können. Das Ziel des Vorhabens wurde erreicht.

## **Entwicklung/Adaption einer speziellen Anlagen-Reinigungstechnologie für pulverförmige Produkte zur Vermeidung der Verschleppung allergener Lebensmittelbestandteile**

### **Gliederung**

1.	Wissenschaftliche Problemstellung und Stand der Forschung.....	1
2.	Forschungsziel.....	6
3.	Material und Methoden.....	7
3.1.	Istzustandsanalyse bezüglich Reinigung und Verschleppung bei der Herstellung von Backmitteln und Backmischungen.....	7
3.1.1.	Beschreibung von bisher angewendeten Prozess- und Reinigungsabläufen.....	7
3.1.2.	Bewertung der Verschleppung allergener Komponenten in Backmischungen bei Produktwechsel.....	7
3.2.	Nachweis allergener Lebensmittelbestandteile.....	8
3.2.1.	Proteinextraktion.....	8
3.2.1.1.	Auswahl der Extraktionsmittel.....	8
3.2.1.2.	Extraktionsansätze.....	13
3.2.2.	Bestimmung des Proteingehalts.....	13
3.2.2.1.	Methode nach Kjeldahl.....	13
3.2.2.2.	Methode nach Lowry.....	13
3.2.2.3.	Methode nach Bradford.....	14
3.2.3.	Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA).....	14
3.2.4.	SDS-PAGE.....	15
3.2.5.	Western-Blotting mit immunochemischer Detektion.....	15
3.3.	Herstellung und Charakterisierung der Reinigungslösung.....	17
3.3.1.	Bestimmung der Grenzflächeneigenschaften.....	18
3.3.2.	Bestimmung der Fließeigenschaften.....	19
3.3.3.	Bestimmung des Gelierverhaltens.....	19
3.3.4.	Bestimmung des Trocknungsverhaltens.....	20
3.4.	Untersuchungen zur Optimierung des Reinigungsverfahrens.....	21
3.4.1.	Randbedingungen für den Einsatz in der betrieblichen Praxis.....	21
3.4.2.	Zerstäuben von Flüssigkeiten.....	22
3.4.2.1.	Düsenbauarten und Anwendungsbereiche.....	22
3.4.2.2.	Beschreibung des Stahlzerfalls bzw. der Tropfenbildung.....	25
3.4.3.	Haftkräfte zwischen Partikeln und Oberflächen.....	28
3.4.4.	Haften und Erstarren des aufgetragenen Gelatinefilms.....	35
3.4.5.	Entfernen des aufgebrachtten Gelatinefilms und der immobilisierten Partikel.....	38
3.4.6.	Auftragungs- und Zerstäubungsuntersuchungen mit Gelatinelösungen.....	39

3.4.6.1. Ansetzen der Gelatinelösungen.....	39
3.4.6.2. Randbedingungen der experimentellen Untersuchungen.....	40
3.5. Beurteilung des Reinigungseffektes.....	43
3.6. Reinigungsversuche im Technikumsmaßstab.....	46
3.7. Erprobung alternativer Reinigungslösungen.....	48
3.7.1. Herstellung und rheologische Charakterisierung der alternativen Reinigungslösung... 48	
3.7.2. Sprühversuche mit der alternativen Reinigungslösung.....	48
4. Ergebnisse und Diskussion.....	50
4.1. Auswertung der Istzustandsanalyse.....	50
4.1.1. Auswertung der Unternehmensbefragung.....	50
4.1.2. Ergebnisse der Untersuchungen zur Beurteilung der Verschleppung allergener Komponenten bei Produktwechseln.....	52
4.2. Ergebnisse der Optimierung der Proteinextraktion.....	60
4.2.1. Untersuchungsmaterialien Kuhmilch, Hühnerei und Haselnuss.....	60
4.2.2. Quantitative und qualitative Beurteilung unterschiedlicher Extraktionsmittel.....	61
4.2.2.1. Kriterien zur Beurteilung von Extraktionsmitteln.....	61
4.2.2.2. Extraktionsmittel-Screening Milchmaterialien.....	62
4.2.2.3. Extraktionsmittel-Screening Eimaterialien.....	66
4.2.2.4. Extraktionsmittel-Screening Haselnussmaterialien.....	71
4.2.2.5. Zusammenfassende Darstellung der Beurteilung der Extraktionsmittel.....	75
4.2.3. Optimierung von Extraktionstemperatur und pH-Wert des Extraktionsmittels.....	77
4.2.3.1. Temperatur- und pH-Wert Einfluss auf die Extraktion von Milchproteinen.....	77
4.2.3.2. Temperatur- und pH-Wert Einfluss auf die Extraktion von Eiweißen.....	83
4.2.3.3. Temperatur- und pH-Wert Einfluss auf die Extraktion von Haselnussproteinen.....	87
4.2.3.4. Zusammenfassende Beurteilung der Optimierung von Extraktionstemperatur und pH-Wert des Extraktionsmittels.....	93
4.2.4. Optimierung der Extraktionsdauer.....	96
4.3. Ergebnisse der Charakterisierung der Reinigungslösung.....	100
4.3.1. Grenzflächeneigenschaften der Gelatinelösungen.....	100
4.3.2. Fließigenschaften der Gelatinelösungen.....	102
4.3.3. Gelierverhalten der Gelatinelösungen.....	104
4.3.4. Trocknungsverhalten der Gelatinelösungen.....	108
4.4. Optimierung der Aufbringung der Reinigungslösung.....	116
4.4.1. Voruntersuchungen.....	116
4.4.2. Sprühuntersuchungen.....	116
4.4.2.1. Untersuchungen mit Airless Auftragverfahren, max. 50 bar.....	116

4.4.2.2. Untersuchungen mit Zweistoff-Düsen (pneumatische Zerstäuber).....	120
4.4.2.3. Einbindung von Partikelmaterial in den Gelatinefilm.....	125
4.4.2.4. Besonderheit bei der reversiblen Filmauftragung.....	127
4.4.2.5. Beeinflussung der Anwendungseignung des Reinigungsverfahrens durch die Rezeptur.....	130
4.4.3. Technische Umsetzung der Ergebnisse.....	130
4.5. Charakterisierung des Reinigungseffekts.....	133
4.5.1. Bewertung verschiedener Reinigungsverfahren.....	135
4.5.2. Bewertung des Reinigungseffektes verschiedener Gelatinelösungen.....	135
4.6. Ergebnisse der Reinigungsversuche im Technikumsmaßstab.....	138
4.7. Ergebnisse der Erprobung alternativer Reinigungslösungen.....	143
4.7.1. Rheologische Eigenschaften der alternativen Reinigungslösungen.....	143
4.7.2. Hafteigenschaften der alternativen Reinigungslösungen.....	144
5. Zusammenfassung.....	148
6. Gegenüberstellung von Projektziel und erreichten Ergebnissen.....	153
7. Wirtschaftliche Bedeutung der Projektergebnisse für kleine und mittlere Unternehmen.....	156
8. Literaturverzeichnis.....	158

**Abkürzungsverzeichnis**

A	Adhäsionsabstand (m)
ATP	Adenosintriphosphat
BIS-TRIS	Bis-(2-hydroxyethyl)-imino-tris-(hydroxymethyl)-methan
BLL	Bund für Lebensmittelrecht und Lebensmittelkunde
Bo	Bondzahl
BSA	Bovines Serum Albumin
C	Interaktionskonstante ( $J/m^6$ )
CBB-G	Coomassi Brilliantblau-G
CIP	Cleaning in Place
d	Durchmesser (mm)
$d_d$	Düsendurchmesser (mm)
DGAI	Deutschen Gesellschaft für Allergologie und klinische Immunologie
DLVO-Theorie	Theorie nach Derjaguin, Landau, Verwey, Overbeek
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EAST	enzyme allergosorbent test
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
f	Frequenz (Hz)
F	Normalkraft (N)
$F_{Lifshitz}$	Haftkraft (N)
g	Erdbeschleunigung ( $9,81 \text{ m/s}^2$ )
$G'$	Speichermodul (Pa)
GME	Gelatin Manufacturers of Europe
h	Höhe des Messspalts (mm)
H	Hamaker-Konstante (J)
HVLP	high volume low pressure
IBR	Ingenieurbüro für Düsenttechnik
IEP	isoelektrischer Punkt
IgE	Immunglobulin Typ E
$m_{G0}$	Masse der in die Kunststoffform gefüllten Gelatinelösung (g)
$m_{Gt}$	Masse der Gelatinelösung zum Zeitpunkt der Probenahme (g)
$\dot{m}_l, \dot{m}_g$	Massenstrom (Index l: Fluid, Index g: Gas) (kg/s)
n	Drehzahl ( $\text{min}^{-1}$ )
Oh	Ohnesorgezahl (-)
$p_g$	Luftdruck (Pa)
$p_{g,0}$	Absolutdruck des Gases am Düsenaustritt (Pa)
$p_{l,0}$	Druck des Fluids vor der Entspannung (Pa)
$p_{l,1}$	Umgebungsdruck am Düsenaustritt (Pa)
P	Leistung (W)
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDA	Phasen-Doppler-Anemometrie
Q	Anzahl Moleküle pro Volumeneinheit ( $\text{m}^{-3}$ )

$R_a$	Mittelrauhwert ( $\mu\text{m}$ )
RAST	Radio Allergosorbent Test
$Re$	Reynoldszahl
RE	Reinigungseffizienz
r.F.	relative Feuchte (%)
RIA	radio immuno assay
RP	reduced pressure
RT	Raumtemperatur
r.TV.	relativer Trocknungsverlust (%)
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
t	Zeit (s)
T	Temperatur ( $^{\circ}\text{C}$ )
TBS	Tris gepufferte Kochsalzlösung
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TRIS-HCl	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethanhydrochlorid
u	Umfang (mm)
$u_g, u_l$ :	Geschwindigkeit (Index l: Fluid, Index g: Gas) (m/s)
U	Kontaktpotential (V)
v	Geschwindigkeit (m/s)
$v_{0,l}$	mittlere Strömungsgeschwindigkeit der Flüssigkeit in der Düse (m/s)
$\dot{V}_l$	Fluid-Volumenstrom (l/h)
$\dot{V}_{g,1}$	Volumenstrom des Gases unter Umgebungsbedingungen (l/h)
We	Weberzahl (-)
$\alpha$	Kegelöffnungswinkel ( $^{\circ}$ )
$\Delta p_l$	Druckverlust über die Düse (Pa)
$\varepsilon$	rel. Permittivität (-)
$\dot{\gamma}$	Schergeschwindigkeit ( $\text{s}^{-1}$ )
$\eta_l$	Viskosität der Flüssigkeit (Pas)
$\varphi$	Auslenkung (-)
$\varphi$	Geschwindigkeitsbeiwert (-)
$h\omega$	Lifshitz-Konstante (Nm)
$\kappa$	Isentropenexponent (-)
$\rho_l$	Dichte der Flüssigkeit ( $\text{g}/\text{cm}^3$ )
$\sigma_l$	Oberflächenspannung der Flüssigkeit (mN/m)
$\zeta_D$	Druckverlustbeiwert der Düse (-)

## 1. Wissenschaftliche Problemstellung und Stand der Forschung

Der Begriff *Allergie* bezeichnet eine spezifische Änderung der Immunitätslage im Sinne einer krank machenden Überempfindlichkeit. Die Voraussetzung für die Entstehung einer stets dosisunabhängigen Allergie ist der Kontakt des Organismus mit einem Allergen und nach einer Sensibilisierungsphase die Bildung spezifischer Antikörper oder spezifisch sensibilisierter Immunzellen gegen das Allergen (RING, 1988). Die echte *Lebensmittelallergie* wird nach heutigem Kenntnisstand als nicht-toxische immunvermittelte Überempfindlichkeitsreaktion im Sinne einer Soforttyp(Typ I)-Reaktion klassifiziert und ist somit eindeutig von den nichtimmunvermittelten Lebensmittelintoleranzen abzugrenzen. Nach Überschreitung des individuell unterschiedlichen Schwellenwertes kommt es zum Auftreten der jeweiligen Symptome, wobei die Intensität unabhängig von der aufgenommenen Allergenmenge ist (WÜTHRICH, 1996).

*Lebensmittelintoleranzen* betreffen den Stoffwechsel des Körpers, aber nicht sein Immunsystem. Im Gegensatz zur Allergie ist die Intensität der durch eine Lebensmittelintoleranz hervorgerufenen Reaktion abhängig von der Dosis der jeweils auslösenden Substanz (JÄGER & WÜTHRICH, 2002). Die häufigsten Lebensmittelintoleranzen existieren bezüglich Lactose und Gluten (Zöliakie).

*Allergene* sind Antigene, welche bei sensibilisierten Individuen die Produktion von spezifischen IgE-Antikörpern induzieren und dadurch eine allergische Reaktion hervorrufen können. Dabei handelt es sich um Proteine oder Glycoproteine mit einer Molmasse von 4 bis 70 kDa (AULEPP & VIETHS, 1992). Die Symptome zeigen sich in 40 bis 60% der Fälle an der Haut. Sie können aber auch am Gastrointestinaltrakt, an den Atemwegen sowie am Herz-Kreislaufsystem auftreten und in gravierenden Fällen durch Atem- und Kreislaufstillstand zum Tode führen (anaphylaktische Reaktionen) (JÄGER & WÜTHRICH, 2002).

Unter Berücksichtigung der durch regional unterschiedliche Ernährungsgewohnheiten und variierende genetische Disposition zustande kommenden Abweichungen in der Häufigkeit von Lebensmittelallergien ergibt sich eine Prävalenz bei Erwachsenen von 0,3 bis 2,4% und bei Kindern von 1,3 bis 8,0% (LORENZ et al., 2001a).

Bisher wurden mehr als 160 Lebensmittel identifiziert, die allergische Reaktionen auslösen, wobei jedoch lediglich acht dieser Lebensmittel für mehr als 90% der Reaktionen verantwortlich sind (POMS et al., 2004a). Ausschlaggebend für die Bedeutung als Allergen sind sowohl die Häufigkeit des Auftretens allergischer Reaktionen und die Empfindlichkeit verschieden sensibilisierter Menschen als auch die Beeinflussung des allergenen Potenzials durch technologische Verarbeitung sowie der Einfluss der Lebensmittelmatrix (BESLER et al., 2001). Unter Berücksichtigung dieser Randbedingungen stellen sowohl Ei und Milch als auch Haselnuss wichtige Lebensmittelallergene bei der Herstellung von Backmischungen dar.

*Hühnereiweiß* ist einer der häufigsten Auslöser für das Auftreten von Abwehrreaktionen gegen Lebensmittel. So zeigen unter den Allergikern 35% der Kinder (CRESPO et al., 1995; RESANO et al., 1998) bzw. 12% der Erwachsenen (WÜTHRICH, 1993) Abwehrreaktionen gegen Eiweiße. In unterschiedlichen oralen Provokationsstudien wurden Schwellenwerte zwischen 1 und 200 mg Ei ermittelt (TAYLOR et al., 2002). Darüber hinaus beschreiben HEFLE et al. (2003) das Auftreten allergischer Symptome nach der Aufnahme von 0,03 mg sprühtrocknetem Vollei, wie es in Backmischungen häufig eingesetzt wird.

Die Häufigkeit des Auftretens einer *Kuhmilch*-Allergie bei Kindern unter 2 Jahren liegt im Bereich von 1,6 bis 2,8%. Bis zum 6. Lebensjahr tritt eine orale Toleranz bei 50 bis 90% dieser Patienten auf, wobei in den übrigen Fällen eine zum Teil massive Allergenität bis ins Erwachsenenalter verbleibt. Auch im Falle der Kuhmilch-Allergie reagiert ein erheblicher Anteil der Allergiker auf Mengen, die im Mikrogramm-Bereich liegen (BESLER et al., 2002a).

In Europa hat die *Haselnuss*-Allergie aufgrund der hohen Prävalenz von 0,1 bis 0,5% der Gesamtbevölkerung sowie dem häufigen Einsatz von Haselnusskomponenten als Lebensmittel-Zutat, z.B. in Gebäck, Süßwaren und Eiscreme, eine beträchtliche Bedeutung erlangt (POMS et al., 2004a; GROOT et al., 1996). Aktuelle Untersuchungen belegen Schwellenwerte

für das Auslösen von Abwehrreaktionen im Bereich von 1 bis 1000 mg Haselnussprotein (WENSING et al., 2002).

In der RICHTLINIE 2003/89/EG hinsichtlich der Angabe der in Lebensmitteln enthaltenen Zutaten zur Änderung der RICHTLINIE 2000/13/EG über die Etikettierung und Aufmachung von Lebensmitteln werden grundlegende Änderungen für die Kennzeichnung von Lebensmitteln in Bezug auf das potenzielle Vorkommen von Lebensmittelallergenen fixiert. Ziel dieser Neuerung ist es, den von Lebensmittelallergien betroffenen Verbraucher umfassend über mögliche Allergie auslösende Stoffe zu informieren und somit der wachsenden Bedeutung von Lebensmittelsicherheit und Verbraucherschutz nachzukommen. Die Bestimmungen sehen die Kennzeichnung von Zutaten, die weniger als 25% des Enderzeugnisses ausmachen, vor. Besondere Bedeutung kommt dabei den im Anhang IIIa der Richtlinie aufgeführten allergenen Stoffen zu. Hierzu gehören u.a. Eier, Milch und Schalenfrüchte sowie daraus hergestellte Erzeugnisse (RICHTLINIE 2003/89/EG). Es existiert eine Stellungnahme der Deutschen Gesellschaft für Allergologie und klinische Immunologie (DGAI) zur Deklaration versteckter Allergene mit folgendem Wortlaut: „Unabhängig von gesetzlichen Vorgaben sind Hersteller nicht nur dann zur Kennzeichnung allergener Stoffe verpflichtet, wenn sie diese dem Lebensmittel bewusst hinzufügen, sondern auch dann, wenn sie damit rechnen müssen, dass ein Lebensmittel - ohne Zutun - bestimmte Allergie auslösende Bestandteile enthalten kann („Cross Contact““ (VIETHS et al., 2001).

Der überwiegenden Zahl der Allergiker ist ihre Allergie bekannt und sie versuchen, den Verzehr der allergenen Lebensmittel zu vermeiden. Trotz dieses bewussten Umgangs mit Lebensmitteln bedeuten *versteckte Allergene* nicht selten ein erhebliches Gesundheitsrisiko und Allergiker erleiden häufig Reaktionen aufgrund der Aufnahme des Allergens durch Kontamination oder inadäquate Deklaration. Versteckte Allergene können den Lebensmitteln entweder bei der Herstellung aus ernährungsphysiologischen oder technologischen Gründen zugesetzt werden oder als unerwünschte Kontaminanten in diesen auftreten (VIETHS et al., 2001). MALMHEDEN YMAN (1999) berichtet, dass von insgesamt 120 registrierten Fällen schwerer Reaktionen durch versteckte Allergene in Lebensmitteln in 45 Fällen Kontaminationen als Ursache ermittelt wurden.

Schon der Verzehr geringer Mengen mit versteckten Allergenen belasteter Lebensmittel kann lebensbedrohliche oder tödlich verlaufende allergische Reaktionen auslösen (BESLER et al., 2001). Sowohl WILLIAMS (2004) als auch BURKS et al. (1999) berichten, dass allein in den USA jährlich mehr als 100 Todesfälle aufgrund anaphylaktischer Reaktionen gegen Lebensmittel auftreten. Diese Problematik tritt in ähnlicher Weise auch in anderen Ländern auf (WÜTHRICH, 2000). Bereits 100 µg eines Proteins können die Symptome einer Allergie auslösen. Bezogen auf 100 g Lebensmittel entspricht dies einer Konzentration von 1 ppm (HOURIHANE et al., 1997), die sehr leicht durch Verschleppung in das Produkt gelangen können.

Backmischungen und Fertigcompounds für Bäckerhandwerk und Industrie stellen eine Produktgruppe dar, für die diese verschärfte Allergen Kennzeichnung relevant ist. Aufgrund der Zusammensetzung dieser Produkte sind Eier, Milch und Schalenfrüchte (z.B. Haselnüsse) hier die relevanten allergenen Substanzen. Für die Unternehmen der betreffenden Branche sind folgende Aspekte problematisch:

- vielfältige Palette von Zutaten mit unterschiedlichen allergenen Bestandteilen
- Nutzung einer Anlage für unterschiedliche Rezepturen
- häufige Produktwechsel

Nach KESSLER (1996) bezeichnet *Reinigung* „den Vorgang, bei dem die Oberflächen vollständig von anhaftendem Produkt, Ablagerungen etc. befreit werden“. Nach einer Definition von WILDBRETT (1997) werden Reinigungen von lebensmittelberührten Oberflächen u.a. zum Schutz der Lebensmittel vor chemischen Einflüssen durchgeführt. Eine wesentlich größere Rolle spielt die Reinigung im Zusammenhang mit den hygienischen Anforderungen an Lebensmittel bzw. Anlagen zu deren Herstellung (DIN 10503, 1999).

Folgende Möglichkeiten der Anlagenreinigung werden bei MENG (2003) angegeben:

- Trockenreinigen
- Feuchtreinigen
- Nassreinigen
- CIP-Reinigung (Cleaning in Place)

Unter Trockenreinigen wird das Abwischen, Abkehren, Abschaben und Absaugen von trockenen Verschmutzungen, d.h. überwiegend Produktreste und Ablagerungen, verstanden. Beim Feuchtreinigen wird Schmutz mechanisch entfernt und danach die Anlage mit feuchten bzw. mit alkoholischen Desinfektionsmitteln imprägnierten Putztüchern abgewischt. Bei der Nassreinigung werden verschiedene in Wasser gelöste Chemikalien zur Reinigung der Oberfläche verwendet. Die CIP-Reinigung stellt eine spezielle Art der Nassreinigung in geschlossenen Anlagen dar, wobei die Reinigungsflüssigkeit über Pumpen und Düsen eingebracht wird.

Als Kontrollmethoden für den Erfolg der Reinigung in der Lebensmittelindustrie werden folgende Möglichkeiten genannt (WILDBRETT, 1997):

- Analytische Untersuchungen der Reinigungsflüssigkeit
- Bestimmung der Rückstände auf gereinigten Flächen durch:
  - Visuelle Prüfung
  - Prüfung der Benetzbarkeit, insbesondere bei fetthaltigen Rückständen
  - Analytische Untersuchung von Wischproben auf Fett/Stärke/Eiweiß/ATP
  - Mikrobiologische Untersuchungen
- Sensorische bzw. analytische Prüfung des Nachfolgeproduktes auf Rückstände des Vorgängerproduktes

Eine gesetzliche Vorgabe für die Art der Reinigung und deren Kontrolle existiert für die Lebensmittelindustrie nicht.

In der Herstellung von trockenen, pulverförmigen Mischungen erfolgt die Reinigung von Behältern und Anlagen nach Produktwechsel normalerweise trocken, wobei bisher vor allem die Hygiene (keine Wasserreste in der Anlage), die sensorische Qualität und die Einhaltung der deklarierten Mengen maßgeblich sind. Die überwiegend angewendeten Reinigungsverfahren sind:

- manuelle Reinigung (z.B. Absaugen, Abfegen)
- halbautomatische Reinigung (Ausblasen mit Druckluft und anschließendes Absaugen)

Eine Verschleppungsminimierung in Bezug auf die Allergenität von Lebensmittelbestandteilen wurde bisher nicht betrachtet. Für Lebensmittelproduzenten stellt sie damit eine neue Herausforderung dar, die in diesem Bereich noch nicht technologisch umgesetzt wird.

Die derzeit eingesetzten Reinigungsverfahren können nicht die Einhaltung der in RICHTLINIE 2003/89/EG geforderten Bedingungen bzw. die weitergehende Sorgfaltspflicht der Hersteller in Bezug auf „cross contact“ garantieren. Die besondere Problematik im Bereich der Backmischungen/Compounds liegt in der erforderlichen Trockenreinigung. Die erweiterten Möglichkeiten der CIP-Reinigung unter Einsatz von wässrigen Reinigungsflüssigkeiten bzw. Trinkwasser können für derartige Anlagen nicht umgesetzt werden. Dabei spielen insbesondere die zu reinigenden Anlagenvolumina sowie die notwendige vollständige Trocknung der Anlagen und der damit verbundene Zeit- und Energieaufwand eine entscheidende Rolle.

Ebenso ist aufgrund des Aufwands und der damit verbundenen Kosten auch eine direkte Übertragung der Reinigungskonzepte aus dem Pharmabereich, die vielfach nach der Nassreinigung unter CIP-Bedingungen eine Vakuumtrocknung und eine Spülung mit Inertgas anschließen, auf die Backmischungsherstellung nicht möglich.

Einen erfolgsversprechenden Ansatz für die Hersteller dieser Produkte bietet die Übertragung eines Reinigungsverfahrens aus der Biotechnologie basierend auf einer konzentrierten Lösung aus filmbildenden Hydrokolloiden (u.a. Gelatine) (AIF-FORSCHUNGSBERICHT 99 ZN/2, 2006). Diese Reinigungslösung trocknet nach dem Aufbringen ab, löst sich dann von der Oberfläche und lässt sich zusammen mit den eingebundenen Verunreinigungen durch Ab-

saugen leicht entfernen. Der Einsatz von Gelatine als Basis für die Reinigungslösung kann in Bezug auf das allergene Potenzial als unbedenklich angesehen werden.

Gelatine wird technologisch aus Haut und Knochen von Rind oder Schwein aber auch aus Fischhäuten durch sauren oder alkalischen Aufschluss und anschließende Wasserextraktion gewonnen. Beim Erhitzen von nativem Kollagen erfolgt dabei eine je nach Quervernetzung mehr oder weniger weitgehende Auffaltung der Tripelhelices unter Bildung von löslicher Gelatine, die bei der Abkühlung in geordnetere Strukturen übergeht (BELITZ et al., 2001). Je nach Konzentration, Temperatur und pH-Wert können somit Gelatineprodukte hergestellt werden, die sich in Bezug auf Quellvermögen und Konsistenz unterscheiden. Gelatine wird in Lebensmitteln hauptsächlich als Geliermittel verwendet. In Impfstoffen gegen Viruskrankheiten wird Gelatine auch eingesetzt, um den darin enthaltenen Virus zu stabilisieren (WANG & SICHERER, 2005).

Unterschiedliche Studien belegen, dass Gelatine mit Lebensmittelqualität nach Entfernung potenziell allergener Eiweiße keine allergenen Reaktionen hervorruft (GME, 2004). Aufgrund dessen wird Gelatine in einer Stellungnahme des Bundes für Lebensmittelrecht und Lebensmittelkunde als „Nicht-Allergen“ eingestuft (BLL, 2004). Die Anzahl der Veröffentlichungen, die über Gelatineüberempfindlichkeiten berichten, ist eher gering (WANG & SICHERER, 2005), obwohl Gelatine in einer Vielzahl von Lebens- und Arzneimitteln eingesetzt wird. Die Sensibilisierung der betreffenden Personen trat dabei in den wenigsten Fällen nach dem Genuss gelatinehaltiger Lebensmittel auf, sondern nach Verabreichung von gelatinehaltigen Impfstoffen. Die Veröffentlichungen berichten dabei lediglich über sehr kleine Personengruppen oder Einzelpersonen. Im Jahr 1983 wurde ein Artikel veröffentlicht, der von drei Personen berichtet, die allergische Symptome zeigten, nachdem ihnen eine Infusion verabreicht wurde, die modifizierte Gelatine enthielt (VERVOLETH et al., 1983). WAHL und KLEINHANS (1989) berichten über eine 32-jährige Frau, die auf den Verzehr von Gummibärchen mit urtikarischen Symptomen der Mundschleimhaut reagierte (KLEINHANS, 1987; WAHL & KLEINHANS, 1989). Ein erstmaliger Zusammenhang zwischen gelatinehaltigen Impfstoffen und der allergischen Reaktion nach Verzehr von ebenfalls gelatinehaltigen Lebensmitteln postulierten KELSO et al. (1993). In ihrer Veröffentlichung beschreiben sie eine 17-jährige Patientin, die unmittelbar nach einer Impfung mit einer gelatinehaltigen Formulierung anaphylaktische Reaktionen zeigte. Diese Patientin zeigte nicht nur positive Reaktionen auf Gelatine beim Hauttest, sondern es traten bei ihr regelmäßig nach dem Genuss von gelatinehaltigen Lebensmitteln Halskratzen und eine Schwellung der Zunge auf. In ihrem Blut waren gelatine-spezifische IgE nachweisbar. Die Wissenschaftler um SAKAGUCHI in Japan untersuchten daraufhin das Blutserum von 26 Kindern, die mit unmittelbaren allergischen Reaktionen auf gelatinehaltige Vakzinationen reagiert haben (SAKAGUCHI et al., 1995, 1996). Bei 24 dieser Kinder waren gelatine-spezifische IgE im Serum vorhanden. Bei sieben der untersuchten Kinder bildeten sich nach dem Verzehr gelatinehaltiger Nahrung auch Urtikaria aus. Bei fünf der untersuchten Kinder bildete sich die allergische Reaktion nach dem Verzehr solcher Lebensmittel erst aus, nachdem sie eine gelatinehaltige Impfung erhalten hatten. Die Studie von NAKAYAMA et al. (1999) bestätigt, dass eine Sensibilisierung gegen Gelatine durch eine Impfung mit gelatinehaltigen Rezepturen erfolgen kann.

An dieser Stelle soll darauf hingewiesen werden, dass die Herstellung bzw. der chemische Charakter der Gelatine einen großen Einfluss auf ihre Allergenität hat: Tierisches Kollagen, das einen hohen Hydrolysegrad aufweist, besitzt ein kleineres Molekulargewicht und einen tieferen Schmelzpunkt, wodurch die Allergenität erniedrigt werden kann (KELSO, 1999). Die These, dass die Gelatineeigenschaften einen Einfluss auf die Allergenität haben, wird durch den Vergleich der Publikationen der japanischen Forscher mit einer Arbeit von POOL et al. (2002) ebenfalls deutlich. Eine Veröffentlichung zur Untersuchung eines Epitopes von bovinem Typ 1 Kollagen ist von HORI et al. (2002) erschienen.

Gegenwärtig stehen unterschiedliche *analytische Methoden* für den Nachweis der Allergenität von Lebensmitteln zur Verfügung. Diese Methoden detektieren die Allergene direkt oder über einen Marker, der diese Allergene anzeigt, z.B. andere Proteine oder auch DNA. Proteinbasierte immunochemische Methoden sind u.a. radio allergosorbent test (RAST), en-

zyme allergosorbent test (EAST) oder enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), wobei nur der ELISA aufgrund seiner hohen Präzision, dem einfachen Handling und der guten Möglichkeit zur Standardisierung in der Routineanalytik angewendet wird. Hinzu kommen qualitative bzw. semiquantitative Methoden wie radio immuno assay (RIA) oder Immunoblotting bzw. die DNA-basierten Nachweise mittels polymerase chain reaction (PCR), real-time-PCR oder PCR-ELISA. Welche Methode angewendet wird, hängt dabei vom Lebensmittel selber einschließlich dessen Verarbeitung, der Verfügbarkeit der Antikörper bzw. DNA-Primer und der erreichbaren Bestimmungsgrenze ab (POMS et al., 2004a, 2004b; BESLER et al., 2002a). Bisher fehlt allerdings ein Vergleich der unterschiedlichen Methoden hinsichtlich des Nachweises allergener Bestandteile unter dem Aspekt Verschleppung in der Produktion.

In Bezug auf den Nachweis von Allergenen in Lebensmitteln steht sowohl der Verbraucherschutz als auch die Produktionssicherheit der Hersteller im Vordergrund. Diese sind nur dann gewährleistet, wenn verlässliche Nachweis- und Quantifizierungsmethoden vorliegen, so dass die neuen Kennzeichnungsregelungen auch überprüft werden können. Allerdings wird der Nachweis von Allergenen in Lebensmitteln dadurch erschwert, dass häufig nur Spuren enthalten sind und diese durch die Matrix, z.B. andere Proteine, maskiert werden. Darüber hinaus sind die Anforderungen an die Methoden hinsichtlich der Nachweisgrenzen noch in der Diskussion. Prinzipiell ist zu fordern, dass sich diese an den Schwellenwerten für die Auslösung von allergenen Reaktionen orientieren. Allerdings bleibt dabei die Frage der Verlässlichkeit dieser Schwellenwerte, da die vorhandenen Daten für eine abschließende Bewertung noch nicht ausreichend sind. Bisher werden in Abhängigkeit vom jeweiligen Lebensmittel als sinnvolle Nachweisgrenzen 1 bis 100 mg allergenes Protein pro kg Lebensmittel angegeben (BESLER et al., 2002b). Das heißt, auch im Bereich der Analytik allergener Lebensmittelbestandteile besteht entsprechender Bedarf an zuverlässigen und sicheren Methoden für die Produktionsüberwachung und Qualitätssicherung für die Hersteller.

## 2. Forschungsziel

Ziel des Projektes war die Erarbeitung der Grundlagen für die Entwicklung/Adaption von innovativen Reinigungstechnologien, die bei der Herstellung von trockenen Lebensmitteln eine neue Qualität in der Vermeidung von Verschleppungen allergener Lebensmittelbestandteile ermöglichen. Grundsätzlich wurde dabei die Minimierung der Verschleppung der relevanten Komponenten in Bereiche unterhalb der jeweiligen Schwellenwerte der einzelnen allergenen Lebensmittelbestandteile angestrebt, so dass das Auftreten von allergischen Reaktionen weitestgehend auszuschließen ist. In diesem Zusammenhang wurde ebenfalls die entsprechende Analytik unter Beachtung von Matrixeinflüssen und der Veränderung der Allergenität durch vorherige technologische Verarbeitungsprozesse (z.B. Sprühtrocknung) berücksichtigt und entsprechend validiert. Die Produktgruppe, die im Rahmen des Projektes bearbeitet wurde, waren Backmischungen, bei denen Ei, Milch und Haselnüsse als versteckte Allergene zu berücksichtigen waren. Eine Reduzierung der Untersuchungen auf lediglich ein Allergen und die anschließende Übertragung auf andere Bestandteile war nicht möglich, da sich die einzelnen Lebensmittel bzw. deren Verarbeitungsprodukte aufgrund unterschiedlicher Partikelgröße und -struktur in ihren Anhaftungs- sowie Ablöse- und damit auch Verschleppungseigenschaften wesentlich unterscheiden.

Die innovative Reinigungstechnologie basierte auf dem Ansatz, eine hoch konzentrierte, filmbildende Reinigungslösung mittels geeigneter Düsensysteme auf die produktseitigen Anlagenoberflächen aufzubringen. Über die Zusammensetzung der Lösung ließen sich die Eigenschaften so einstellen, dass der entstandene Film nach der Trocknung zusammen mit den im Film immobilisierten Produktrückständen leicht entfernt werden konnte. Die Basis für die Filme bildete Gelatine mit weiteren Zusätzen. Durch diesen Reinigungsansatz wurde vermieden, frei verfügbares Wasser in die Anlagen einzubringen, so dass ein Verklumpen oder Verbacken des Produktes durch Wasserreste an unzugänglichen Stellen nicht auftreten konnte.

Im Rahmen des Projektes wurden folgende Ergebnisse angestrebt:

1. Wesentliches Forschungsergebnis sollte die Vermeidung der Verschleppung von allergenen Lebensmittelbestandteilen bei der Herstellung trockener, pulverförmiger Produkte, wie z.B. Backmischungen, durch eine neue Reinigungstechnologie sein. Auf diese Weise sollte eine deutlich höhere Qualität in der Produktion von Backmischungen erreicht werden.
2. Im Zuge dieser Entwicklungen wurden Lösungen zur optimierten Zusammensetzung des Reinigungsfilms, zur Auftragung, Trocknung und Ablösung des Films erarbeitet. Diese Ergebnisse waren eine wesentliche Grundlage für die Anwendung der Technologie auch über den Bereich der Backmischungen hinaus.
3. Weiterhin wurden Fragen bezüglich der Beeinflussung des analytischen Nachweises von allergenen Proteinen durch Matrixbestandteile genauer untersucht. Die Ergebnisse dieser Arbeiten sind nicht nur für die Hersteller von Backmischungen im Zusammenhang mit der Reinigung relevant, sondern sind darüber hinaus auch in anderen Bereichen der Lebensmittelwirtschaft, in denen trockene Produkte verarbeitet werden, von Bedeutung.

Die erwarteten Projektergebnisse hinsichtlich der Adaption einer neuen Reinigungstechnologie in der Herstellung von Backmischungen, wo durch einen verbesserten Reinigungseffekt die Kontamination mit allergenen Lebensmittelkomponenten aus dem Vorgängerprodukt vermieden wird, führen zu einer Senkung des Allergierisikos und somit zu einer besseren Produktqualität. Eine weitere Steigerung der Produktsicherheit wurde durch die Erarbeitung des Einflusses von Matrix und Verarbeitungsprozess auf die analytische Nachweisbarkeit von Allergenen, und der damit erzielten Optimierung des Allergennachweises erreicht. Nach einer erfolgreichen Umsetzung der neuen Reinigungstechnologie für die Backmischungsherstellung kann das Verfahren auch für die Anwendung im Herstellungsprozess anderer trockener, pulverförmiger Lebensmittel optimiert werden.

### **3. Material und Methoden**

#### **3.1. Istzustandsanalyse bezüglich Reinigung und Verschleppung bei der Herstellung von Backmitteln und Backmischungen**

Die Erfassung des Istzustands bezüglich Reinigung und Verschleppung in den Unternehmen, die Backmittel und Backmischungen herstellen, umfasste sowohl die Beschreibung der Prozess- und Reinigungsabläufe in den betreffenden Unternehmen als auch die Quantifizierung der Verschleppung von allergenen Komponenten bei Produktwechseln.

##### **3.1.1. Beschreibung von bisher angewendeten Prozess- und Reinigungsabläufen**

Bedingt durch die Vielzahl an Ausführungen von Apparaten und Behältern für die Herstellung von Backmischungen war es im Sinne einer effektiven Bearbeitung des Vorhabens notwendig, die Aufgabenstellung auf eine repräsentative Anlage, an der das Potenzial der neuen Technologie demonstriert werden konnte, zu fokussieren. Dementsprechend wurde zunächst der Istzustand bezüglich Reinigung und Verschleppung in den im Projektbegleitenden Ausschuss mitarbeitenden Unternehmen erfasst. Dazu wurde ein Fragebogen (siehe Anlage 1) entworfen, mit dessen Hilfe die Bereiche

- Rohstoffe / Wareneingang
- Produktion
- Reinigung
- Personal

bezüglich möglicher Auswirkungen auf die Verschleppung allergener Lebensmittelbestandteile detailliert beschrieben werden sollen. Dieser Fragebogen wurde an die Projektteilnehmer, die Trockenmischungen herstellen, versendet.

Nach Auswertung der ausgefüllten Fragebögen wurden in enger Abstimmung mit dem Projektbegleitenden Ausschuss folgende Randbedingungen bezüglich der Projektbearbeitung fixiert:

- relevante Produktgruppe unter Berücksichtigung der Einzelrohstoffe
- Apparate (Mischer, Behälter) und deren Anbindung in die Anlage
- Festlegung der Anforderungen an die Reinigung
  - Grenzwerte für Verschleppungen
  - Dauer, Aufwand der Reinigung

##### **3.1.2. Bewertung der Verschleppung allergener Komponenten in Backmischungen bei Produktwechsel**

Anhand von Proben aus Mitgliedsunternehmen des Projektbegleitenden Ausschusses wurde untersucht inwieweit von ihnen produzierte pulverförmige Mischungen durch Verschleppung allergener Komponenten aus dem Vorgängerprodukt verunreinigt waren. Dazu wurden den Forschungspartnern Proben mit detaillierten Angaben zu den Inhaltsstoffen sowie zu den jeweiligen Vorgängerprodukten, die auf den betreffenden Anlagen produziert worden waren, zur Verfügung gestellt. Die Proben wurden mit Hilfe der in Abschnitt 3.2 (Nachweis allergener Lebensmittelbestandteile) beschriebenen Methoden auf das Vorhandensein der Allergene Ei, Milch und Haselnuss untersucht.

## 3.2. Nachweis allergener Lebensmittelbestandteile

### 3.2.1. Proteinextraktion

#### 3.2.1.1. Auswahl der Extraktionsmittel

Bei dem Großteil der Lebensmittelallergene handelt es sich um Glykoproteine mit einer Masse von etwa 5 bis 70 kDa (BREDEHORST & DAVID, 2001). Je nach Aufgabe im Organismus können diese Proteine sehr unterschiedlich in ihrem physikochemischen Verhalten sein, was sich in einer andersartigen Extrahierbarkeit äußern kann (GOODWIN, 2004). Die optimale Extrahierbarkeit von Allergenen aus dem unverarbeiteten oder verarbeiteten Lebensmittel ist abhängig von der Extraktionslösung, wobei es nicht ein Extraktionsmittel gibt, welches für alle Allergene gleichermaßen geeignet ist (WESTPHAL et al., 2004). Wird das Allergen nicht oder nur unvollständig aus der Matrix extrahiert, sind falsch negative Ergebnisse oder zu geringe ermittelte Allergengehalte die Folge. Es ist somit zu untersuchen, welches Extraktionsmittel unter welchen Extraktionsbedingungen die jeweiligen Allergene aus den Lebensmitteln zu extrahieren vermag. In der Literatur sind zahlreiche Methoden zur Extraktion von Allergenen aus unverarbeiteten Lebensmitteln beschrieben. Ob die erfolgreiche Übertragung des Extraktionsverfahrens von Allergenen aus unveränderten Lebensmitteln auf Allergene technologisch verarbeiteter Natur möglich ist, ist fraglich. Auch die Matrix der zu untersuchenden Probe hat einen entscheidenden Einfluss auf die Extraktion der darin enthaltenen Allergene. Proteine können dazu neigen, an Kohlenhydrate, Fette oder andere Proteine zu binden, was die Ausbeute der Extraktion verringern kann (GOODWIN, 2004). Gerade die Matrix einer Backmischung, die aus einem großen Anteil an Getreidemehl besteht, kann durch den hohen Anteil an Getreideproteinen und Getreidestärke die quantitative Extraktion der Allergene von Haselnuss, Milch oder Ei aus dem Produkt heraus behindern. Aber auch andere Matrixbestandteile wie andere Kohlenhydrate, Fette und Öle, oder Phenole in Material pflanzlicher Herkunft können die Extraktion bzw. die Trennung mittels SDS-PAGE erheblich erschweren (PASTORELLO & TRAMBAIOLI, 2001). Gelangen allergene Bestandteile durch Kontamination während des Produktionsprozesses in das Produkt, sind die Mengen an Allergenen im Endprodukt entsprechend gering. Welche Menge an Allergen ausreicht, um bei einem Allergiker Symptome hervorzurufen, ist sehr individuell und kann von weniger als 1 mg bis zu mehr als 1 g variieren, je nachdem, wie viel von dem Lebensmittel verzehrt wird und wie empfindlich der Allergiker auf das Allergen reagiert (LORENZ et al., 2001b, POMS & ANKLAM, 2004, VIELUF et al, 2002).

#### *Extraktion von Allergenen der Kuhmilch*

Kuhmilch enthält etwa 3,44% Proteine, wobei sich dieser Proteinanteil zu 76 bis 86% aus der Gruppe der Caseine und zu 14 bis 24% aus Molkenproteinen zusammensetzt. Bei den Hauptallergenen der Kuhmilch handelt es sich um die Molkenproteine  $\alpha$ -Lactalbumin (14,2 kDa) und  $\beta$ -Lactoglobulin (18,3 kDa) und die Caseine gefolgt von bovinem Serumalbumin und den Immunglobulinen (BALTES, 2000, KREFT et al., 1995, WAL, 2004). Zu den Caseinen zählen zahlreiche unterschiedliche Proteine, die den Untergruppen  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -, und  $\kappa$ -Casein zugeordnet werden. Die Caseine weisen mit Massen von 11,6 bis 25,3 kDa sehr ähnliche Molekülgrößen auf (BELITZ et al., 2001). Während zahlreiche Veröffentlichungen über die Isolierung und Untersuchung von Milchproteinen an sich vorliegen, gibt es zur Zeit kaum Veröffentlichungen über den Nachweis von geringen Mengen an Milchallergenen in Lebensmitteln (MONACI et al., 2006). Die Methodik der Isolierung lässt sich dabei nicht ohne weiteres übertragen. Während in nativer Milch die Milchallergene durch isoelektrische Präzipitation isoliert werden können (BLEUMINK & YOUNG, 1968, MAUBOIS & OLLIVIER, 1997), ist diese Methode für sehr geringe Gehalte in komplexen Lebensmitteln kaum geeignet. Die Löslichkeit der Proteine ist am isoelektrischen Punkt zwar am geringsten, jedoch reicht die geringe Konzentration der versteckten Allergene in der Probe für eine Fällung nicht aus (LEHNINGER, 1977).

Zur Ernährung von Säuglingen und Kleinkindern mit Milchallergie sind Milchersatzprodukte entwickelt worden, so genannte hypoallergene Babynahrung. Bei diesen Produkten werden die Milchproteine zur Reduzierung der Allergenität partiell hydrolysiert. Um die Restallerge-

nität dieser Produkte zu ermitteln, wurden immunologische Untersuchungen durchgeführt. NIGGEMANN et al. (1999) verwendeten zur Herstellung der Proteinextrakte die so genannte „Coca´s Solution“ (COCA, 1922), die zur Untersuchung von Pollenallergien entwickelt wurde und neben Natriumchlorid und Natriumhydrogencarbonat auch Phenol enthält. Ebenfalls zur Untersuchung von Restallergenitäten hypoallergener Babynahrung verwendeten DOCENA et al. (2002) PBS (Phosphatgepufferte Kochsalzlösung) zur Extraktion. Neben 8 M Harnstoff als Extraktionsmittel verwendeten auch NATARAJAN et al. (2005) einen phenolhaltigen Extraktionspuffer zur Isolierung von Proteinen aus der Sojabohne und Getreide. HEFLE & LAMBRECHT (2004) verwendeten einen PBS-Puffer in ELISA-Untersuchungen (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) zum Nachweis von Milchproteinen in Produkten, die als „milchfrei“ deklariert worden waren. Unverarbeitete Kuhmilch und unverarbeitetes Hühnerei wurden in Untersuchungen zu Allergenextrakten für Hautpricktests mit physiologischer Natriumchloridlösung extrahiert (NORGAARD et al., 1992). Sollen Milchproteine aus einer Weizenmehlmatrix isoliert werden, kann die unterschiedliche Löslichkeit der Proteine in Wasser ausgenutzt werden. Während die Molkenproteine sehr gut wasserlöslich sind, lösen sich nach Osborne nur etwa 15% (Weizenalbumine) der Weizenproteine in Wasser (BELITZ et al., 2001). Komplexer stellt sich die Löslichkeit der Caseine dar. Die Komponenten der Caseinfraktion liegen in Milch aggregiert zu Caseinmicellen vor. Die jedoch bei der Herstellung von Trockenmilcherzeugnissen entstehenden Caseinate weisen eine gute Wasserlöslichkeit auf (BELITZ et al., 2001).

Nach Auswertung der einschlägigen Literatur wurden zur Extraktion der Milchmaterialien Extraktionsmittel ausgewählt, deren Zusammensetzung ein möglichst umfassendes Spektrum an unterschiedlichen extraktionswirksamen Substanzen präsentieren. Neben NaCl-Lösungen mit geringer Ionenstärke (z.B. dest. Wasser, physiologische NaCl-Lösung) wurden auch Lösungen verwendet, die eine vergleichsweise höhere Salzkonzentration aufwiesen, wie z.B. die PBS-Puffer A, B und C. PBS-Puffer sind sehr weit verbreitet zur Probenaufarbeitung unterschiedlichster Ausgangsmaterialien. Ihnen gemeinsam ist, dass sie aus verschiedenen Phosphaten bzw. Hydrogenphosphaten zusammengesetzt werden und pH-Werte zwischen etwa 7 und 8 aufweisen. Ihre Zusammensetzung kann dabei durchaus stark differieren (BERNHISEL-BROADBENT et al., 1994, DOCENA et al., 2002, HEFLE & LAMBRECHT, 2004, KATO et al., 2001, KIM et al., 2002, LEDUC et al., 1999). Ebenfalls wurde ein großer pH-Bereich abgedeckt. So wurde neben einem Acetatpuffer mit pH 3,8 eine 4%ige SDS-Lösung mit einem pH-Wert von 8,5 verwendet. Weitere Extraktionsmittel, wie z.B. die unterschiedlichen PBS-Puffer besitzen einen etwa neutralen pH-Wert. Des Weiteren wurden detergenzienhaltige Extraktionsmittel eingesetzt, die neben Natriumdodecylsulfat (SDS) und Triton X-100<sup>®</sup> auch Tween 20<sup>®</sup> enthalten. Als zusätzliche organische Komponenten in den Extraktionsmitteln wurden Harnstoff und Phenol eingesetzt. Eine Übersicht der zur Extraktion von Milchmaterialien (und Eimaterialien; vergl. folgenden Abschnitt) verwendeten Extraktionsmittel zeigt Tabelle 3.2.1.

Tab. 3.2.1: Zusammensetzung der Extraktionsmittel zur Extraktion der Allergene aus Kuhmilch und Hühnerei

Bezeichnung des Extraktionsmittels	pH-Wert	Zusammensetzung des Extraktionsmittels (bezogen auf 1L)	Quelle
1. PBS-Puffer A	pH 7,4	1,44 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 0,20 g KCl, 0,20 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 7,95 g NaCl (einstellen des pH mit 0,1M NaOH)	(SCHUBERT, 2003b)
2. PBS-Puffer B	pH 7,4	1,14 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 0,28 g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 8,5 g NaCl (einstellen des pH mit 0,1M NaOH)	(HEFLE & TAYLOR, 2004)
3. PBS-Puffer C	pH 7,2	2,84 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 17,52 g NaCl (einstellen des pH mit 0,1M NaOH)	(LEDUC et al., 1999)
4. physiol. NaCl-Lösung	pH 6,6	9 g NaCl (pH gemessen)	(LANGELAND, 1982a)
5. Tween 20 <sup>®</sup> 1%ig	pH 6,0	10 g Tween 20 <sup>®</sup> (pH gemessen)	(FERNANDEZ et al., 1999)
6. Urea 8 M	pH 7,7	480 g Harnstoff (Urea) (pH gemessen)	(NATARAJAN et al., 2005)
7. Acetatpuffer	pH 3,8	6 mL Eisessig (einstellen des pH mit 0,1M NaOH)	(HIROSE et al., 2004)
8. „Coca´s Solution“	pH 8,2	5 g NaCl 2,5 g NaHCO <sub>3</sub> 4 g Phenol (pH gemessen)	(COCA, 1922)
9. „Extraction Buffer“	pH 7,4	16,4 g NaCl, 5,52 g NaHPO <sub>4</sub> , 10 g Tween 20 <sup>®</sup> , 4 g Triton X-100 <sup>®</sup> (einstellen des pH mit 0,1M NaOH)	(YEUNG et al., 2000)
10. SDS 4%ig	pH 8,5	40 g Natriumdodecylsulfat (pH gemessen)	(KATO et al., 2001)
11. Wasser	pH 6,5	Wasser (bidest.) (pH gemessen)	****

### Extraktion von Allergenen des Hühnereis

Bei den Hauptallergenen des Hühnereis handelt es sich hauptsächlich um die Proteine des Eiklars. Bei Eiklar handelt es sich um eine 10%ige wässrige Lösung verschiedener globulärer Proteine, von denen in Bezug auf Lebensmittelallergie vor allem Ovalbumin (44,5 kDa), Ovomuroid (28 kDa), Ovotransferrin (Conalbumin 76 kDa) und das Lysozym (14,3 kDa) von Interesse sind (BELITZ et al., 2001, HOLEN & ELSAYED, 1990, KREFT et al., 1995). Im Gegensatz zum Eiklar sind die charakteristischen Proteine des Eidotters das Lipovitellin und das Phosvitin. Zum Lipovitellin zählt eine aus zwei Polypeptidketten bestehende  $\alpha$ -Form (85 und 111 kDa) sowie die  $\beta$ -Form (110 kDa). Beim Phosvitin unterscheidet man ebenfalls zwischen  $\alpha$ - (160 kDa) und  $\beta$ -Variante (190 kDa) (BELITZ et al., 2001).

Zur Isolierung der Hauptallergene des Hühnereis wurden bereits mehrere Methoden in der Literatur beschrieben. Von LANGELAND (1982a, 1982b) und NORGAARD et al. (1992) wurde als Extraktionsmittel eine physiologische Natriumchloridlösung verwendet, während LEDUC et al. (1999) zum Nachweis dieser Allergene in Fleischprodukten PBS zur Extraktion verwendete. Zur Herstellung von Proteinextrakten wurde im Vorfeld für vergleichende Untersuchungen bezüglich der Allergenität von Ovomuroid und Ovalbumin ebenfalls PBS verwendet (BERNHISEL-BROADBENT et al., 1994). Prinzipiell wurde festgestellt, dass die Löslichkeit von Proteinen des Hühnereiweißes mit steigender Salzkonzentration und steigendem pH-Wert

zunimmt (KAKALIS & REGENSTEIN, 1986). Bei diesen Untersuchungen wurden die Extraktionsausbeuten von Natriumchlorid-, Natriumiodid- und Natriumpyrophosphat-Lösungen bei pH-Werten von 3,0 bis 9,0 verglichen. Bei Untersuchungen in Bezug auf den Hitzeeinfluss auf die Struktur von Ovomucoïd wurde hingegen natives Hühnerei mit einem Acetatpuffer von pH 3,8 extrahiert (HIROSE et al., 2004). Eine Reihe von Extraktionen von Hühnereiproteinen erfolgte unter Verwendung von tensidhaltigen Extraktionsmitteln. So haben KATO et al. (2001) zur Isolierung von Ovomucoïd aus einer Nudelteigmatrix u.a. eine 4%ige SDS-Lösung verwendet. Beim Nachweis von Eiproteinen in verschiedenen Lebensmitteln wurde ein „Extraction -Buffer“ verwendet, der neben Triton 100<sup>®</sup> auch Tween 20<sup>®</sup> enthält (BAUMGARTNER et al., 2002, YEUNG et al., 2000), während jedoch auch Tween 20<sup>®</sup> ohne weitere Detergentien in Extraktionsmitteln verwendet worden ist (FERNANDEZ et al., 1999). Sowohl unterschiedliche NaCl-Lösungen als auch tensidhaltige Extraktionsmittel verwendeten GREMEL & PASCHKE (2007) zur Extraktion von rohem Ei. Eine Übersicht der zur Extraktion der Eimaterialien zeigt Tabelle 3.2.1. Da es sich sowohl bei den Eiallergenen als auch den Milchallergenen um Proteine tierischen Ursprungs handelt, wurden hier für die Extraktionsversuche mit Milch- und Eimaterialien dieselben Extraktionsmittel gewählt. Hier war ebenfalls das Auswahlkriterium eine möglichst umfassende Auswahl an sehr unterschiedlichen Extraktionsmitteln zusammenzustellen.

#### *Extraktion von Allergenen der Haselnuss*

Unter der Bezeichnung Cor a 1 (18 kDa) werden zur Zeit vier Isoformen zusammengefasst. Drei dieser Isoformen (Cor a 1.01, 1.02 und 1.03) sind die Hauptallergene des Haselpollens, während die Isoform Cor a 1.04 mit ihren sub-Isoformen das Hauptallergen der eigentlichen Nuss darstellt (ROUX et al., 2003). Alle Formen des Cor a 1 stellen Homologe des Hauptallergens Bet v 1 des Birkenpollens dar (VIETHS et al., 2002). Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit der Allergene wird die Haselnussallergie durch die Manifestation einer Überempfindlichkeit gegen die Pollen der Birke, der Hasel und der Erle erworben (SENTI et al., 2000). Alle Allergene, die strukturelle Ähnlichkeit mit dem Hauptallergen des Birkenpollens aufweisen, werden zur so genannten „Bet v 1-Familie“ zusammengefasst (VIETHS et al., 2002). Das Nebenallergen Cor a 2 der Haselnuss mit einer Masse von 14 kDa weist ebenfalls eine Ähnlichkeit zu einem Allergen des Haselpollens auf (HIRSCHWEHR et al., 1992). In der Literatur gibt es Hinweise darauf, dass es sich bei den Allergenen Cor a 1 und Cor a 2 um hitzelabile Allergene handelt, die nach Erhitzung auf eine bestimmte Temperatur ihre Allergenität verlieren (WIGOTZKI et al., 2000). Des Weiteren wurden bisher die Nebenallergene Cor a 8 mit einer Masse von 9 kDa (PASTORELLO et al., 2002, SCHOCKER et al., 2000), Cor a 9 mit einer Masse von 38 kDa (BEYER et al., 2002, PASTORELLO et al., 2002) und das Nebenallergen Cor a 11 mit einer Masse von 47 kDa (LAUER et al., 2004, PASTORELLO et al., 2002) identifiziert.

Die meisten der sehr zahlreichen Veröffentlichungen zur Untersuchung von Haselnussallergenen basieren auf einer Extraktion des Proteinanteils mit PBS (BEYER et al., 2002, PASTORELLO et al., 2002, VIETHS et al., 1999, WIGOTZKI et al., 2000). Es wurden aber nicht nur Allergene aus der nativen oder gerösteten Haselnuss isoliert, sondern auch aus einer Reihe an Handelsprodukten, wie Schokolade, Kekse und Kuchen (HOLZHAUSER et al., 2002). Ähnliche Produkte wurden mit einem TBS-Puffer (TRIS gepufferte Kochsalzlösung) extrahiert, der neben TRIS (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan) Magnesium- und Natriumchlorid enthält (HOLZHAUSER & VIETHS, 1999, KOPPER et al., 2005). Weitere Extraktionsversuche zur Untersuchung der Haselnussproteine in Handelsprodukten sind mit einem TRIS-HCl-haltigen (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethanhydrochlorid) „Extraction Buffer“ (SCHEIBE et al., 2001) bzw. mit TRIS-Lösung (KOPPELMANN et al., 1999) als Extraktionsmittel durchgeführt worden. Ebenfalls mit einem TRIS-haltigen Extraktionsmittel (TRIS-TRICIN-Buffer) erfolgte die Probenextraktion aus der nativen Nuss heraus im Vorfeld zu immunochemischen Bestimmungen von Haselnussprotein mit Hilfe der Elektroimmundiffusion (KLEIN & GUENTHER, 1985, KLEIN et al., 1985). POMS et al., (2004b) veröffentlichte Ergebnisse zu Untersuchungen bezüglich des Einflusses unterschiedlicher Röstungsbedingungen auf die Allergenität von Erdnussproteinen. Wie in entsprechender Literatur beschrieben, wurden in den folgenden Untersuchungen neben zwei unterschiedlichen Zitrat- und TBS-Puffern u.a. auch zwei Natrium-

borat-Lösungen auf ihre Eignung zur Extraktion von Haselnussallergenen getestet (POMS et al., 2004b). Des Weiteren wurden Proteine der Haselnuss durch Extraktion mit einer Ammoniumcarbonat-Lösung aus nativem Ausgangsmaterial isoliert (SCHOCKER & BECKER, 2001), während WESTPHAL et al. (2004) mit einer Natriumcarbonatlösung Proteine aus Erdnuss, Sesam und Soja extrahiert haben.

Zur Isolierung der Haselnussmaterialien wurden mehrere Extraktionslösungen mit einem nahezu neutralen pH-Wert von 7,4, eine Natriumborat-Lösung, Sulfolan-Lösung sowie die stark basische Carbonat-Lösung ausgewählt, um einen breiten pH-Bereich abzudecken. Die Sulfolan-Lösung stellt darüber hinaus eine Extraktionslösung mit einem Gehalt an schwefelhaltigem, organischem Lösungsmittel dar. Die NaCl-Lösung weist aufgrund des sehr hohen Gehaltes an Natriumchlorid eine sehr hohe Ionenstärke auf. Weiterhin wurden hier die Extraktionsmittel SDS 4%ig, TBS-Puffer und der so genannte „Extraction Buffer“ verwendet, um auch die Eignung von detergenzienhaltigen Extraktionsmitteln zu untersuchen. In Tabelle 3.2.2 werden die zur Extraktion von Haselnussmaterial verwendeten Extraktionsmittel zusammengestellt.

Tab. 3.2.2: Zusammensetzung der Extraktionsmittel zur Extraktion der Allergene aus Haselnussmaterialien

Bezeichnung des Extraktionsmittels	pH-Wert	Zusammensetzung des Extraktionsmittels (bezogen auf 1L)	Quelle
1. PBS-Puffer D	pH 7,4	1,742 g $K_2HPO_4$ 8,766 g NaCl (einstellen des pH mit NaOH 0,1M)	(WIGOTZKI et al., 2000)
2. TBS-Puffer	pH 7,4	12,11 g Tris 5,844 g NaCl 0,508 g $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ (einstellen des pH mit NaOH 0,1M)	(HOLZHAUSER & VIETHS, 1999)
3. Ammoniumcarbonat-Lösung	pH 8,0	9,61 g $(NH_4)_2CO_3$ (pH gemessen)	(SCHOCKER et al., 2000)
4. Tris-Tricin-Lösung	pH 8,6	8,6 g Tricin 19,6 g Tris 0,15 mL Milchsäure (90% reinst) (einstellen des pH mit NaOH 0,1M)	(KLEIN & GUENTHER, 1985)
5. PBS-Puffer E	pH 8,5	1,742 g $K_2HPO_4$ 8,766 g NaCl (pH gemessen)	nach (WIGOTZKI et al., 2000)
6. Carbonat-Lösung	pH 11,0	10,6 g $Na_2CO_3$ (pH gemessen)	(WESTPHAL et al., 2004)
7. Na-Borat-Lösung	pH 9,0	3 g $Na_2B_4O_7$ (einstellen des pH mit NaOH 0,1M)	(POMS et al., 2004b)
8. NaCl-Lösung;	pH 7,4	1,742 g $K_2HPO_4$ 58,44 g NaCl (pH gemessen)	nach (WIGOTZKI et al., 2000)
9. Sulfolan-Puffer	pH 9,2	5,3 g $Na_2CO_3$ 300 g Sulfolan (Tetramethylensulfon) (pH gemessen)	(HIRD et al., 2000)
10. SDS 4%ig	pH 8,5	40 g Natriumdodecylsulfat (pH gemessen)	(KATO et al., 2001)
11. „Extraction Buffer“	pH 7,4	16,4 g NaCl, 5,52 g $NaHPO_4$ , 10 g Tween 20 <sup>®</sup> , 4 g Triton X-100 <sup>®</sup> (einstellen des pH mit 0,1M NaOH)	(YEUNG et al., 2000)

### 3.2.1.2. Extraktionsansätze

Für die Extraktionsansätze zur Beurteilung der Eignung unterschiedlicher Extraktionsmittel und des Matrixeinflusses auf die Extrahierbarkeit der jeweiligen Proteine bzw. Allergene wurden die Einwaagen der Milch-, Ei- bzw. Haselnussmaterialien so gewählt, dass der Proteingehalt der hergestellten Extrakte theoretisch zwischen 500 – 600 mg/L Gesamtprotein liegt. Die Ermittlung der jeweiligen Soll einwaagen basierte dabei auf den mittels Kjeldahl ermittelten Proteingehalten der eingesetzten Materialien (vergleiche Tabelle 4.2.2). Die entsprechenden Einwaagen wurden jeweils mit 20 mL Extraktionsmittel bei Raumtemperatur über Nacht extrahiert, um die Extraktionsausbeuten nicht aufgrund einer zu kurzen Extraktionsdauer zu verringern. Die mit Matrix hergestellten Extrakte unterschieden sich von den matrixfreien Extrakten ausschließlich durch 1 g Matrixzusatz (Weizenstärke, Weizenmehl, Fettpulver, nachgestellte Backmischung). Die so im Vergleich zum allergenen Material im Überschuss zugesetzte Matrix soll dem Mengenverhältnis „versteckter Allergene“ in einer Matrix gerecht werden. Bei der simultanen Untersuchung des Einflusses des pH-Wertes des Extraktionsmittels und der Extraktionstemperatur wurden zwei unterschiedliche Extraktionsmittel ausgewählt und zwei weitere Chargen des jeweiligen Extraktionsmittels mit verändertem pH-Wert hergestellt, die dann zur Extraktion eingesetzt worden sind. Dieser Extraktionsansatz wurde zur Untersuchung des Einflusses der Extraktionstemperatur bei Umgebungstemperaturen von 4°C, Raumtemperatur (RT) und 40°C eingesetzt. Nach Auswahl der geeigneten Extraktionsmittel und der Optimierung der Parameter Extraktionstemperatur und pH-Wert wurde anschließend der Einfluss der Extraktionsdauer untersucht, indem bei sonst konstanten Extraktionsbedingungen allein die Extraktionszeit variiert wurde.

## 3.2.2. Bestimmung des Proteingehalts

### 3.2.2.1. Methode nach Kjeldahl

Bei der Proteinquantifizierung nach Kjeldahl handelt es sich um eine § 64 LFGB Methode, die aminoid gebundenen Stickstoff erfasst. Nach Aufschluss des Probenmaterials mit konzentrierter Schwefelsäure und einem Katalysatorgemisch wird der Stickstoff in Ammoniak überführt, der aufgrund des Überschusses an Schwefelsäure als Ammoniumsulfat vorliegt. Im Anschluss an diesen sauren Aufschluss erfolgt eine Wasserdampfdestillation der Aufschlusslösung, bei der durch Zugabe von konzentrierter Natronlauge Ammoniak ausgetrieben wird, der nach Destillation über einen Kühler in eine Borsäurevorlage geleitet wird. Das entstehende Ammoniumborat ist weniger flüchtig als Ammoniak und verhindert Verluste während der anschließenden titrimetrischen Bestimmung des Stickstoffgehaltes, der dem Proteingehalt proportional ist. Die Umrechnung des Stickstoffgehaltes erfolgt über einen Faktor, der differierende Stickstoffgehalte unterschiedlicher Proteine berücksichtigt (MATISSEK et al., 1992). Über die Kjeldahl-Methode werden die Proteingehalte der zu untersuchenden Milch-, Ei- und Haselnussprodukte sowie der zu untersuchenden Matrices Weizenstärke und Weizenmehl ermittelt. Anhand dieser Ergebnisse und der Einwaagen zur Herstellung der Extrakte werden die maximalen, theoretischen Proteingehalte der Extrakte bestimmt. Diese theoretische, größtmögliche Ausbeute wird zur Berechnung einer Wiederfindung herangezogen.

### 3.2.2.2. Methode nach Lowry

Bei der Lowry-Methode handelt es sich um eine sensitive, photometrische Methode, die auch zur quantitativen Bestimmung sehr geringer Proteinmengen geeignet ist (LOWRY et al., 1951). Bei der Methode wird zunächst ein Kupfer-Proteinkomplex in alkalischer Lösung gebildet, bei dem vor allem die aromatischen Tyrosin-Reste involviert sind (KNIGHT & CHAMBERS, 2003). Anschließend erfolgt ein Reduktionsschritt des Kupfers (von  $\text{Cu}^{2+}$  zu  $\text{Cu}^+$ ) durch Zusatz des Folin-Ciocalteus-Phenol-Reagenzes (enthält Phosphomolybdat-Phosphotungstomsäure), wobei eine intensive Blaufärbung auftritt. Die Extinktion des blauen Komplexes wird bei 720 nm vermessen. Das Farbreagenz detektiert bei dieser Reaktion die Tyrosin-Reste im Protein. Da der Tyrosingehalt von Protein zu Protein meist unterschiedlich ist, sollte als Vergleichsprotein der Kalibrierung ein Protein gewählt werden, das dem Tyrosingehalt

der Proben entspricht. Bei der Proteinquantifizierung der Extrakte der Eiprodukte wurden Ovalbumin-Lösungen als Vergleichsprotein verwendet, da das Eiweiß zum größten Teil aus Ovalbumin besteht (BELITZ et al., 2001). Für die Messung des Proteingehaltes in Milchprodukten wurde wie allgemein üblich Rinderserumalbumin (BSA) verwendet, da es sich hierbei um ein Milchprotein handelt. Auch die Extrakte der Haselnussmaterialien wurden gegen BSA als Vergleichsprotein gemessen, da kein isoliertes Haselnussprotein zur Verfügung stand. Durch Verwendung dieser Vergleichsproteine in der Proteinquantifizierung ließ sich nicht der absolute Proteingehalt der Extrakte bestimmen, jedoch war es so möglich, die unterschiedlichen Proteingehalte qualitativ zu vergleichen. Möglicherweise hatten auch die verwendeten Extraktionsmittel einen gewissen Einfluss auf die Intensität der Farbreaktion. Da die Extraktionsmittel zum Teil denaturierende Eigenschaften gegenüber Proteinen hatten, wurden die Kalibrierlösungen mit den Lösungen hergestellt, die als jeweiliges Extraktionsmittel verwendet worden sind. An dieser Stelle soll darauf hingewiesen werden, dass der Proteingehalt der Extrakte, die mit „Coca´s Solution“ hergestellt worden sind, aufgrund des Phenolanteils nicht mittels Lowry sondern mittels Bradford bestimmt werden müsste.

### **3.2.2.3. Methode nach Bradford**

Der Methode nach BRADFORD (1976) liegt eine Farbänderung des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blue G 250 (CBB G250) als Folge der Bindung an das Eiweiß zu Grunde. Der Farbstoff lagert sich dabei an basische Aminosäuren der Proteine an, insbesondere bindet der Farbstoff an Arginyl- und Lysyl-Reste. Das Absorptionsmaximum des Farbstoffes verschiebt sich bei der Komplexbildung von rot nach blau. Die gefärbte Lösung kann bereits wenige Minuten nach Farbstoffzugabe ohne weitere Aufarbeitung bei 590 nm photometrisch vermessen werden. Die Quantifizierung der Proteine erfolgt anhand einer Kalibriergeraden mit BSA als Referenzprotein. Aufgrund verschiedener Absorptionseigenschaften und daraus resultierender unterschiedlich starker Färbung verschiedener Proteine bietet dieses Verfahren jedoch keine Möglichkeit zur absoluten Proteingehaltsbestimmung, sondern lediglich zur relativen Quantifizierung. Eine Verbesserung der Richtigkeit des ermittelten Proteingehaltes kann dadurch erreicht werden, dass als Vergleichsprotein zur Erstellung der Kalibriergeraden ein Protein verwendet wird, welches dem zu bestimmenden Protein strukturell ähnlicher ist als BSA. Die Farbreaktion dieser Methode wird jedoch u.a. stark von den Detergentien Tween 20<sup>®</sup>, SDS und Triton X-100<sup>®</sup> beeinflusst. Da diese Detergentien in den verwendeten Extraktionsmitteln enthalten sind, wird zur Proteinquantifizierung alternativ die Methode nach Lowry (LOWRY et al., 1951) verwendet. Diese Methode beruht ebenfalls auf der Entwicklung eines farbigen Komplexes, jedoch wird dieser von den oben genannten Substanzen nicht merklich gestört. Die Proteinausbeuten nach Bradford sind nur bedingt mit denen, die mittels Lowry bestimmt worden sind, vergleichbar. Versuche haben gezeigt, dass die Methode nach Bradford prinzipiell geringere Wiederfindungen ergab.

### **3.2.3. Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)**

Der sogenannte Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) bezeichnet ein immunologisches Nachweisverfahren (Assay), das auf einer enzymatischen Farbreaktion basiert. Mit Hilfe des ELISA können Proteine, Viren aber auch niedermolekulare Verbindungen, wie Hormone, Toxine und Pestizide, in einer Probe (Blutserum, Milch, Urin, etc.) nachgewiesen werden. Hierbei macht man sich die Eigenschaft spezifischer Antikörper zu Nutze, die an den nachzuweisenden Stoff (Antigen) binden. Antikörper oder Antigen werden zuvor mit einem Enzym markiert. Die durch das Enzym katalysierte Reaktion dient als Nachweis für das Vorhandensein des Antigens. Bekannte Varianten sind der Sandwich-ELISA und der kompetitive Immunoassay.

Zum Nachweis versteckter Allergene wird zunächst das Protein aus dem Muster extrahiert. Dazu wird die Probe mit Extraktionspuffer (Carbonat-Bicarbonat-Lösung) versetzt und in dem Puffer homogen dispergiert. Anschließend muss eine Separation der wässrigen und der festen Phase, die durch Zentrifugieren beschleunigt werden kann, erfolgen. Das Protein liegt nun gelöst in der wässrigen Phase, mit der die weitere Analytik erfolgt, vor. Der Allergennachweis erfolgt mit zertifizierten, spezifischen Testkits der Fa. r-biopharm (z.B. RIDA-

SCREEN® Haselnuss-EIA). Dabei wird die wässrige Proteinlösung auf mit den entsprechenden Antikörpern beschichtete Mikrotiterplatten pipettiert. Nach abgeschlossener Inkubation werden durch einen Waschschrift nicht gebundene Anteile entfernt. Nach Zugabe eines Peroxidase-gekoppelten Antikörpers wird mit den an die spezifischen Antikörper gebundenen Proteinen ein Antikörper-Antigen-Komplex gebildet. Nach erneuter Inkubation und anschließender Auswaschung überschüssiger Reagenzien erfolgt der Allergennachweis durch Zugabe von Substrat-Chromogen-Lösung. Eine Farbreaktion des Chromogens, die das an den Antikörper gebundene Enzym auslöst, wird photometrisch bei 450 nm quantifiziert. Die Nachweisgrenzen der ELISA-Testkits sind abhängig vom nachzuweisenden Allergen. Sie liegen im Bereich 0,6 ppm für Eiklarprotein bis 1,6 ppm für Casein. Die Bestimmungsgrenzen, oberhalb derer eine Quantifizierung des Allergengehalts möglich ist, liegen im Bereich 1 ppm für Eiklarprotein bis 2,5 ppm für Gliadin.

### 3.2.4. SDS-PAGE

Bei der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) werden Proteine einer Proteinmischung in einem elektrischen Gleichstromfeld aufgrund ihres unterschiedlichen Molekulargewichtes getrennt. Um eine Auftrennung der Proteine nach dem Molekulargewicht zu erreichen, müssen diese die gleiche geometrische Form (eindimensional) und die gleiche Ladung (negativ) aufweisen. Bei der Probenvorbereitung werden die Proben dazu mit einem Überschuss von SDS auf 90°C erhitzt, und so die Tertiär- und Sekundärstrukturen durch Aufspalten der Wasserstoffbrücken und durch Streckung der Moleküle aufgelöst. SDS ist ein anionisches Detergenz, das die Eigenladung von Proteinen so effektiv überdeckt, dass Micellen mit konstanter negativer Ladung pro Masseneinheit entstehen (GUTTMANN, 1996). Disulfidbrückenbindungen zwischen Cysteinresten werden durch Zugabe der Thiolverbindung  $\beta$ -Mercaptoethanol reduktiv gespalten (Auflösen der Quartärstruktur). Für die Reduktion der Proteine wird ein Probenpuffer nach VIETHS et al. (1992) verwendet. Die Trennung entsprechend unterschiedlicher Molekülmasse wird durch eine Trennung in so genannten restriktiven Gelen herbeigeführt. Standardmäßig wird als Trägermatrix der SDS-PAGE Polyacrylamid verwendet. In Folge einer kleinen Porengröße eines restriktiven Polyacrylamidgels wird die Wanderung von großen Micellen im elektrischen Feld stärker behindert als die Wanderung von kleinen Micellen. Aus diesem Zusammenhang folgt die Proportionalität der Wanderungsgeschwindigkeit zu dem Molekulargewicht der Proteine. Proteine mit einer relativ kleinen Masse passieren die Trägermatrix mit einer vergleichsweise höheren Geschwindigkeit als Proteine mit einem größeren Molekulargewicht, die aufgrund der geringen Maschengröße durch größere Reibungskräfte stärker gebremst werden.

Als Trenngele dienen Polyacrylamidgele, die durch Copolymerisation von Acrylamidmonomeren mit N,N'-Methylenbisacrylamid als Vernetzer hergestellt werden. Aufgrund der vergleichsweise besseren Reproduzierbarkeit und einer höheren Trennschärfe der Proteintrennung gegenüber selbst hergestellten Gelen werden NuPAGE® NOVEX BIS-TRIS Fertiggele von Invitrogen™ verwendet. Dabei handelt es sich um Bis-(2-hydroxyethyl)-imino-tris-(hydroxymethyl)-methan-HCl (BIS-TRIS-HCl) gepufferte Polyacrylamidgele mit einer Totalamidkonzentration von 10 bzw. 12%. Die Auftrennung der Proteine erfolgt gemäß der Herstellerangaben mit Hilfe des NuPAGE® Elektrophorese Systems (Invitrogen™).

### 3.2.5. Western-Blotting mit immunochemischer Detektion

Die Bestätigung eines Gehaltes an Allergenen in den zu untersuchenden Proben soll nach elektrophoretischer Auftrennung in-vitro über menschliche Seren durchgeführt werden. Die im Allergikerblut enthaltenen, für das jeweilige Allergen spezifischen, Antikörper werden dazu im so genannten Western-Blotting Verfahren als Detektionsmittel verwendet. Mit Antikörpern aus dem Serum von Allergikern lassen sich definitionsgemäß Allergene (Antigene, die beim Allergiker Überempfindlichkeitsreaktionen auslösen) nachweisen, während die Verwendung von tierischen Antikörpern streng genommen nicht Allergene sondern lediglich Antigene (mit Antikörpern reagierende Strukturen) nachweist (SCHÄPPI, 2002). Dem Western-Blotting geht das in Abschnitt 4.2.3. beschriebene SDS-PAGE voraus. Dabei werden die Proteine durch den elektrischen Strom aus dem Gel auf eine stabile, dünne Membran (Nitrocellulose)

transferiert. Nach dem Transfer liegen die Proteine bzw. ihre Bindungsstellen für spezifische Reaktionen mit Antikörpern frei zugänglich vor. Eine Bindung an die Membran erfolgt über hydrophobe Wechselwirkungen, wobei eine Renaturierung der Proteine nach dem Verlust des SDS der Elektrophorese angenommen wird (AALBERSE, 2000). Die Übertragung der Proteine aus dem Gel heraus auf eine Membran ist notwendig, da die Proteine im Gel zum Einen für Antikörper schwer zugänglich sind, zum Anderen aber auch die Konzentration der Proteine aufgrund der Verteilung über die gesamte Dicke des Gels (~1 mm) für einen Nachweis evtl. zu niedrig ist. Die Allergene auf der Membran sind nach dem Western Blotting nicht sichtbar. Es folgt die Behandlung der Membran mit humanem Serum oder tierischem Antikörper. Sind Allergene in der Probe enthalten gewesen, binden die spezifischen Antikörper des Serums (primärer Antikörper) an diese Proteinbanden. Die Detektion erfolgt mit spezifischen Antikörpern, die so konzipiert sind, dass sie an Antikörper binden, an die ein Enzym (Horseradish-Mitteloxidase) gekoppelt ist (sekundärer Antikörper). Wenn die sekundären Antikörper primäre Antikörper auf der Membran erkennen, binden sie an diese. Ist kein Allergen in der zu untersuchenden Probe enthalten gewesen, konnte kein primärer Antikörper binden, so dass eine Bindung von sekundären Antikörpern nicht möglich ist. Abschließend wird die Membran mit einem Substrat, das von dem gekoppelten Enzym des sekundären Antikörpers in einen Farbstoff umgesetzt wird, inkubiert. Dort, wo primäre Antikörper gebunden wurden - Allergene auf der Membran vorhanden waren - werden die Proteine als farbige Banden sichtbar.

Als Humanserum wurden zur Untersuchung der Proben auf Milch-, Ei- und Haselnussproteine im Rahmen des Projektes jeweils hergestellte Poolseren verwendet. Zur Herstellung eines Poolserums wurden Blutseren von Allergikern zusammengestellt, die bezüglich einer Reaktion auf Milch-, Ei- bzw. Haselnussproteine hohe EAST-Klassen aufweisen. Die verwendeten Blutseren wurden von der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie der TU München bezüglich ihrer EAST-Klassen untersucht und der UHH zur Verfügung gestellt. Die EAST-Klasse eines Serums ist ein Maß für die Anzahl an spezifischen Antikörpern im Blut des Allergikers. Von insgesamt vier EAST-Klassen weisen hohe Klassen von 3 bzw. 4 eine große Anzahl spezifischer Antikörper auf. Die ausgewählten Einzelseren wurden qualitativ in Bezug auf die Reaktion auf die Allergene von Milch, Ei bzw. Haselnuss charakterisiert. Die Einzelseren wurden so zu einem Poolserum kombiniert, dass dieses auf alle relevanten Proteine reagiert, ohne dabei eine unerwünschte Verdünnung von Seren mit Antikörpern gegen seltener erkannte Proteine herbeizuführen. Zur Immunfärbung wurden die Poolseren in einer 1 / 15 Verdünnung eingesetzt, während die tierischen Antikörper (Wirt Kaninchen) in Verdünnungen von 1 / 10 000 bis 1 / 200 000 verwendet wurden. Die höhere Ergiebigkeit des tierischen Serums liegt darin begründet, dass bei den Versuchstieren durch Injektion des Allergens gemeinsam mit Adjuvanzen eine viel stärkere Antikörperproduktion erfolgt.

### 3.3. Herstellung und Charakterisierung der Reinigungslösungen

Entsprechend den Absprachen mit dem Projektbegleitenden Ausschuss wurden die Untersuchungen an wässrigen Lösungen unterschiedlicher Gelatinetypen durchgeführt. Dazu wurden seitens eines am Projekt beteiligten Unternehmens drei Gelatinemuster zur Verfügung gestellt, deren Produktspezifikation in Tabelle 3.3.1 dargestellt ist.

Tab. 3.3.1: Produktspezifikationen der für die Untersuchungen eingesetzten Gelatinemuster

Bezeichnung	Rinderhaut-gelatine	Schweineschwarten-gelatine	Rinderspalt-gelatine
Gelfestigkeit	249 Bloom	297 Bloom	261 Bloom
Viskosität (6,67%ige Lösung, gemessen bei 60 °C)	5,4 mPas	5,3 mPas	4,7 mPas

Zur Charakterisierung der Verarbeitungseigenschaften der Lösung wurden deren rheologische Eigenschaften sowie das Gelier- und Trocknungsverhalten bestimmt. Die Charakterisierung der Reinigungswirkung erfolgte über die Bestimmung der Grenzflächeneigenschaften sowie der Quantifizierung der Immobilisierung von Pulverpartikeln.

Entsprechend der Versuchsplanung des Forschungsvorhabens wurden zur Einstellung der Grenzflächeneigenschaften der Gelatinelösungen verschiedene Emulgatoren mit unterschiedlichen HLB-Werten zugesetzt. Die Beschreibung der verwendeten Emulgatoren ist in Tabelle 3.3.2 zusammengefasst.

Tab. 3.3.2: Beschreibung der für die Untersuchungen eingesetzten Emulgatoren

Handelsname	Chemischer Name	HLB-Wert
Tween 80	Polyoxyethylensorbitanmonooleat	15
Span 20	Sorbitanmonolaurat	8,6
Span 60	Sorbitanmonostearat	4,7

#### *Herstellung der Reinigungslösung*

##### Geräte, Hilfsmittel:

- Waage
- heizbare Magnetrührplatte
- Wärmeschrank
- Bechergläser
- Löffel
- Spatel
- entmineralisiertes Wasser

##### Probenvorbereitung:

Zur Herstellung der wässrigen Gelatinelösung wird die Gelatine in einem Becherglas vorgelegt. Anschließend wird die entsprechend notwendige Masse an wässriger Phase, in der gegebenenfalls zuvor die notwendige Menge an Emulgator gelöst wurde, zugegeben. Das Quellen der Gelatine erfolgt innerhalb von 10 min bei Raumtemperatur in unbeegtem Zustand (ohne Rühren). Anschließend wird die in der wässrigen Phase suspendierte, gequollene Gelatine mit Hilfe einer beheizbaren Magnetrührplatte unter Rühren ( $n = 500 \text{ min}^{-1}$ ) auf 60 °C erwärmt und für 10 min bei dieser Temperatur gehalten. So wird gewährleistet, dass die Gelatine im vollständig gelösten Zustand (Sol) vorliegt. Bis zur Durchführung der Untersuchungen wird die Lösung im Wärmeschrank auf 40 °C temperiert.

Versuchsplanung:

Zur Charakterisierung der physikalischen Eigenschaften der Reinigungslösungen und der Ermittlung des Einflusses verschiedener Variablen auf die Verarbeitungs- und Reinigungseigenschaften wurden folgende Parameter variiert:

- Gelatinetyp: Rinderhautgelatine, Schweineschwartengelatine, Rinderspaltgelatine
- Gelatinekonzentration: 10%, 20%, 30%
- Emulgatortyp: Tween 80, Span 20, Span 60
- Emulgatorkonzentration: ohne Emulgatorzusatz, 0,1%, 0,2%

Entsprechend dieser Versuchsplanung waren 63 unterschiedliche Gelatinelösungen zu untersuchen.

### 3.3.1. Bestimmung der Grenzflächeneigenschaften

Die Grenzflächeneigenschaften der Gelatinelösungen bestimmen die Benetzung der produktseitigen Anlagenoberflächen sowie die Einbindung der auf der Oberfläche befindlichen Pulverpartikel. Es muss gewährleistet sein, dass die Reinigungslösung auch verwinkelte, schwer zugängliche Bereiche in den Anlagen bedeckt und die dort anhaftenden Pulverpartikel einbindet.

Ein Parameter zur Charakterisierung der Grenzflächeneigenschaften ist der Kontaktwinkel. Er beschreibt den Winkel, den ein Flüssigkeitstropfen auf der Oberfläche eines Feststoffes zu dieser Oberfläche bildet (Abbildung 3.3.1). Die Größe des Kontaktwinkels zwischen Flüssigkeit und Feststoff hängt von den Wechselwirkungen zwischen den Stoffen an der Berührungsfäche ab. Je stärker diese Wechselwirkungen sind, desto kleiner ist der Kontaktwinkel und desto besser sind die Benetzungseigenschaften der Flüssigkeit für die betreffende Oberfläche.

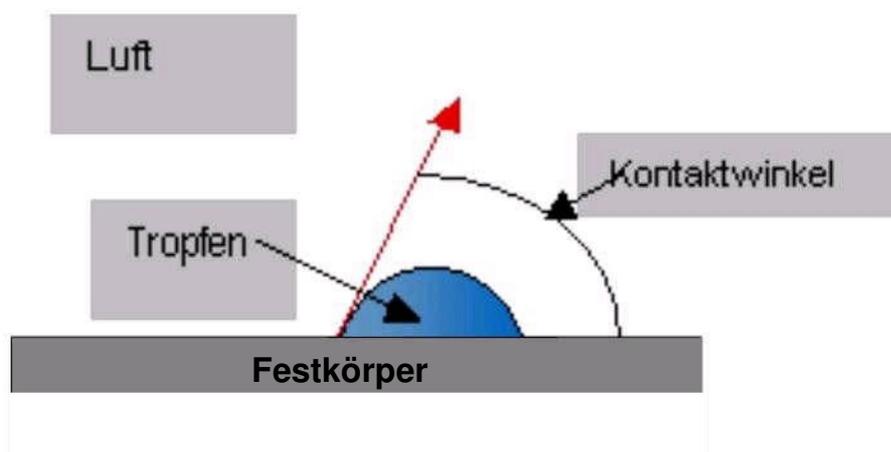


Abb. 3.3.1: Definition des Kontaktwinkels

Zur Messung des Kontaktwinkels werden 75  $\mu\text{l}$  der Reinigungslösung mittels Eppendorfpipette auf eine für Anlagen in der Lebensmittelverarbeitung typische Werkstoffoberfläche (V2A) gegeben und der ausgebildete Tropfen lichtmikroskopisch aufgenommen. Der sich einstellende Kontaktwinkel wird bildanalytisch mit einer speziell entwickelten Software bestimmt. Der Versuchstand zur Bestimmung des Kontaktwinkels wird in einem Wärmeschrank aufgebaut, um eine vollständige Temperierung der V2A-Oberfläche und der aufgetragenen Lösung zu realisieren. Dabei erfolgen die Untersuchungen zur Ermittlung des Kontaktwinkels bei einer Temperatur von 40 °C, um die Gelierung der Gelatine und damit verbunden eine Verfälschung der Ergebnisse durch eine Verfestigung des Tropfens zu verhindern.

### 3.3.2. Bestimmung der Fließeigenschaften

Das Fließverhalten der Gelatinelösungen bestimmt entscheidend ihre Verarbeitungseigenschaften. So muss gewährleistet werden, dass die im Reinigungsprozess eingesetzte Gelatinelösung gut fließfähig ist, damit sie leicht gepumpt und gleichmäßig durch Versprühen auf Anlagenoberflächen aufgebracht werden kann.

Die Fließkurven der Gelatinelösungen werden in einem spannungsgesteuerten Rotationsrheometer (AR 2000, Fa. TA-Instruments, Alzenau) bei folgenden Messbedingungen aufgenommen:

- Messsystem: Kegel/Platte-Spalt
- Kegelgeometrie:  $d = 4 \text{ cm}$ ;  $\alpha = 4^\circ$
- Schergeschwindigkeit:  $\dot{\gamma} = 0,1 - 500 \text{ s}^{-1}$
- Temperatur:  $T = 40^\circ\text{C}$

Die Auswertung der rheologischen Messungen erfolgt mit dem Programm Rheostar (FRANKE & TSCHUSCHNER, 1995). Als mathematisches Modell für die Berechnung der rheologischen Kennwerte der Gelatinelösungen wurde das Modell nach Ostwald-de-Waele angewendet.

### 3.3.3. Bestimmung des Gelierverhaltens

Die rheologischen Eigenschaften der Gelatinelösungen während des Gelierens bestimmen entscheidend ihre Eignung für den Einsatz als Reinigungslösung. So muss gewährleistet werden, dass die Gelatinelösung in möglichst kurzer Zeit feste Gele bildet, um gute Ablöseigenschaften zu realisieren. Insbesondere die Entfernung des Gelatinefilms kann erst erfolgen, wenn eine ausreichende Stabilität für eine großflächige Ablösung des Films vorhanden ist und die eingebundenen Pulverpartikel im Film immobilisiert bleiben.

Die rheologischen Eigenschaften während des Gelierprozesses der Reinigungslösung werden mit Hilfe eines deformationsgesteuerten Rheometers (AR 2000, Fa. TA Instruments, Alzenau) im Oszillationsversuch mit folgenden Messparametern ermittelt:

- Messsystem: Platte/Platte-Spalt
- Plattengeometrie:  $d = 5 \text{ cm}$
- Messspalt:  $h = 2 \text{ mm}$
- Auslenkung:  $\varphi = 0,025 \text{ rad}$
- Frequenz:  $f = 1 \text{ Hz}$
- Temperaturverlauf: Temperaturabsenkung von  $40^\circ\text{C}$  auf  $20^\circ\text{C}$  in 5 min  
anschließend konstante Temperatur von  $20^\circ\text{C}$  für 10 min

Die Bedingungen bei dem Oszillationstest werden dabei so gewählt, dass der viskoelastische Bereich der Deformation des Gels nicht verlassen wird. Auf diese Weise wird sichergestellt, dass die Struktur der Gele während der Messung nicht zerstört wird. Zur Bewertung der Ergebnisse des Oszillationstests wird das Speichermodul  $G'$  in Pa herangezogen, welches als Maß für die Festigkeit der gelierenden Gelatinematrix dient. Die Charakterisierung des Gelierverhaltens erfolgt über die Ermittlung der Parameter Gelbildungsbeginn, maximale Festigkeitszunahme und maximales Speichermodul. Die maximale Festigkeitszunahme ist gleich dem größten Anstieg von  $G'$  in der logarithmischen Darstellung und wird als Pa/s angegeben. Der Gelbildungsbeginn wird als Zeitpunkt der maximalen Festigkeitszunahme definiert und die maximale Festigkeit ist der Maximalwert von  $G'$ , der in der Regel am Ende der Messzeit auftritt. Die zur Charakterisierung des Gelierverhaltens herangezogenen Parameter werden in Abbildung 3.3.2 veranschaulicht.

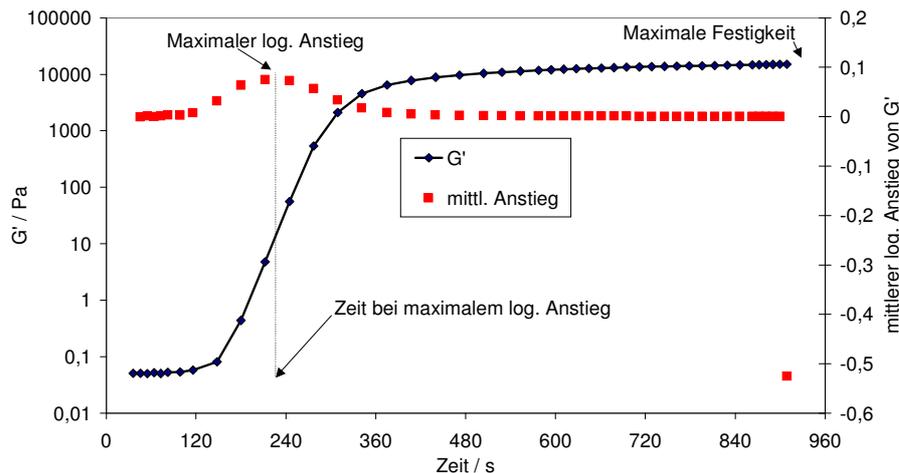


Abb. 3.3.2: Definition der Parameter zur Charakterisierung des Gelierverhaltens

### 3.3.4. Bestimmung des Trocknungsverhaltens

Die rheologischen Eigenschaften eines Gelatinefilms während des Trocknungsvorgangs sind entscheidend für die Ablöseigenschaften der auf eine Anlagenoberfläche aufgetragenen Gelatinelösung. Das Ablösen der getrockneten Gelatine kann erst erfolgen, wenn eine ausreichende Stabilität des Films vorhanden ist, so dass der Film großflächig entfernt werden kann und die eingebundenen Pulverpartikel im Film immobilisiert bleiben. Mit Hilfe dieser Untersuchungen wurden die für die Ablöseigenschaften entscheidenden, rheologischen Eigenschaften der Gelatinefilme während der Trocknung sowie der Masseverlust als Funktion der Trocknungszeit (Trocknungsverlust) bestimmt.

#### *Bestimmung des Trocknungsverlustes*

Runde Kunststoffformen ( $d = 64 \text{ mm}$ ) mit einem  $5 \text{ mm}$  hohen Rand werden mit etwa  $12 \text{ g}$  Gelatinelösung ( $\pm 0,01 \text{ g}$ ) befüllt, woraus eine Schichtdicke der Gelatinepads von etwa  $3,5 \text{ mm}$  resultiert. Die Masse der eingefüllten Gelatinelösung wird durch Wägung ermittelt. Die befüllten Kunststoffformen werden zur Trocknung der Gelatine in einen Klimaschrank ( $T = 20 \text{ }^\circ\text{C}$ , r.F. =  $50\%$  bzw. r.F. =  $60\%$ ) gelegt.

Nach Lagerzeiten von jeweils  $15$ ,  $30$ ,  $60$ ,  $120$  und  $240 \text{ min}$  werden Proben der ausgegossenen Gelatinelösungen entnommen und deren Masse durch Wägung bestimmt.

Der relative Trocknungsverlust (rTV) berechnet sich nach:

$$\text{rTV} = (m_{G0} - m_{Gt}) \cdot 100\% / m_{G0} \quad (3.3.1)$$

mit:

- $m_{G0}$ : Masse der in die Kunststoffform gefüllten Gelatinelösung, g
- $m_{Gt}$ : Masse der Gelatinelösung zum Zeitpunkt der Probenahme, g

Die entnommenen Proben werden auch für die Bestimmung der rheologischen Eigenschaften der getrockneten Gelatinepads eingesetzt.

#### *Bestimmung der rheologischen Eigenschaften der Gelatinepads*

Zur Durchführung der rheologischen Messungen werden die Gelatinepads mit einem Spatel vom inneren Rand der Formen gelöst und aus der Form entnommen. Die rheologischen Eigenschaften des Gelatinepads werden mit Hilfe eines deformationsgesteuerten Rheometers (AR 2000, Fa. TA-Instruments, Alzenau) im Oszillationsversuch ermittelt. Die Messparameter sind, bis auf die Frequenz und die Höhe des Messspalts, identisch mit den in Abschnitt 3.3.3 beschriebenen Parametern. In diesem Oszillationsversuch wird die Frequenz in einem Bereich von  $0,1$  bis  $10 \text{ Hz}$  variiert. Die Einstellung des Messspalts erfolgt über die Vorgabe des Normalkraft  $F = 10 \text{ N}$ .

### **3.4. Untersuchungen zur Optimierung des Reinigungsverfahrens**

#### **3.4.1. Randbedingungen für den Einsatz in der betrieblichen Praxis**

Zur Reinigung von Apparateoberflächen mittels aufgetragener Filme aus Kolloidmaterial konnten die in abgeschlossenen Projekten gewonnenen Erfahrungen genutzt werden. So wurden bereits Untersuchungen zur Erzeugung von Gelatinefilmen auf Oberflächen durchgeführt (AiF-FORSCHUNGSBERICHT 9768, 1996, AiF-FORSCHUNGSBERICHT 99 ZN/2, 2006). Schwerpunkte lagen in der Vergangenheit bei der Entwicklung von ca. 10 cm durchmessenden Gelpads zur Probenahme, der irreversiblen Einbindung einer Kontamination auf Filterelementen und der Bindung luftgetragener bzw. schwach gebundener Fasern durch Verdünnen von Gelatinelösung. Für die Fragestellung dieses Forschungsvorhabens waren die folgenden Arbeitsschritte im Zusammenhang mit der Gelatineauftragung zu untersuchen:

- Versprühen von Gelatinelösungen
- Haften und Erstarren des aufgetragenen Gelatinefilms
- Einbinden der zu entfernenden partikulären Verunreinigungen in die Filmmatrix
- Entfernen des aufgetragenen Gelatinefilms einschließlich der eingebundenen Partikel (haftkraftüberwindende Reinigung).

Die Anforderungen der verschiedenen Arbeitsschritte an jeweils optimale Prozessparameter und Einsatzmaterialien waren nicht immer vollständig deckungsgleich. Daher waren bei der Verfahrensentwicklung zur Gewährleistung des optimalen Reinigungsprozesses alle Prozessschritte gleichermaßen einzubeziehen. So war beispielsweise die möglichst feine Zerstäubung der Gelatinelösung durch niedrige Viskositäten z.B. bei hohen Temperaturen begünstigt, für die Gelierung der Lösung auf den Oberflächen und Erzeugung eines Films von ausreichender Schichtstärke jedoch eine möglichst niedrige Temperatur und niedrige Viskosität erforderlich.

Bei der praktischen Umsetzung des Verfahrens waren technische Randbedingungen der betrieblichen Praxis zu berücksichtigen, insbesondere:

- Temperaturbereich (Umgebungs- und Oberflächentemperatur, Temperatur des Sols),
- Druckniveau (zur Fluidförderung bzw. als Luftdruck),
- Oberflächenzugänglichkeit
- Akzeptanz des Gesamtverfahrens

Die Wärmeabfuhr beim Abkühlen und Erstarren des aufgetragenen Gelatinesols ist maßgeblich durch die Umgebungstemperatur beeinflusst (WEIGL, 2004). In den Produktionsstätten können unter bestimmten Bedingungen Temperaturen bis etwa 25°C, in Ausnahmefällen auch darüber, auftreten. Ist der Erstarrungsprozess der zerstäubten und auf den Oberflächen aufgetragenen Gelatinelösung nicht ausreichend weit fortgeschritten, kann die Lösung von senkrechten Oberflächen ablaufen bzw. von überhängenden Flächen abtropfen. Die Randbedingungen des Auftragprozesses sollten daher eine ausreichende Wärmeabfuhr ermöglichen. Dies konnte durch die Verwendung von entspannter Druckluft bei Zweistoffsystemen oder durch eine entsprechend niedrige Sol-Temperatur und große Wärmeaustauschflächen durch feine Zerstäubung bei Systemen ohne zusätzliche Druckluftunterstützung gewährleistet werden.

Da die Gelfestigkeit wesentlich durch Moleküle mit Molekulargewichten um 100.000 g/mol und die Viskosität durch Moleküle mit Molekulargewichten im Bereich von 200.000 g/mol bis 400.000 g/mol beeinflusst wird, können unterschiedlich viskose Fluide dieselbe Gelfestigkeit erreichen (SCHRIEBER & GARERIS, 2007). Somit sind Modifikationen der technischen Parameter in gewissem Rahmen durch die Materialauswahl beeinflussbar. In der Literatur werden bei rascher Temperaturabsenkung eine Abnahme der Gelfestigkeit von 10 bis 15% angegeben (SCHRIEBER & GARERIS, 2007). Es ist davon auszugehen, dass diese Bedingungen während der Auftragung mittels Zerstäubungsverfahren gegeben sind, da Sol-Lösungen mit Temperaturen oberhalb 35°C zerstäubt und auf Oberflächen mit Temperaturen von typischerweise ca. 20°C aufgetragen werden.

Entsprechend den Hinweisen der Mitglieder des Projektbegleitenden Ausschusses sollte die zum Versprühen benötigte Druckluft aus dem innerbetrieblichen Leitungsnetz bezogen werden, um keine Zusatzinvestitionen für Pumpen- bzw. Kompressorsysteme notwendig zu machen. Die innerbetrieblichen Druckluftnetzwerke werden typischerweise mit einem Überdruck von maximal 6 bar gespeist. Damit wurden bei höheren Drücken arbeitende Systeme im Weiteren nicht in die Untersuchungen einbezogen, der Schwerpunkt lag damit bei pneumatischen Druckapplikationen.

Die Auftragsgüte des Films ist wesentlich durch die Zugänglichkeit der Apparatenflächen beeinflusst. Ein weitgehend mobiles, handliches Spritzgerät und eine günstig positionierte Eingriffsöffnung, von der alle Oberflächenbereiche im Innern des Apparates erreicht werden können, erleichtern die Arbeit und die Akzeptanz des Verfahrens in der betrieblichen Praxis. Eine entsprechende konstruktive Ausgestaltung von ggf. mehreren Eingriffsöffnungen pro Apparat kann hier hilfreich sein.

Die zur Reinigung erforderliche Zeitdauer ist ein maßgebliches Kriterium, welches die Akzeptanz des Gesamtverfahrens in der Praxis beeinflusst. Wie in der Unternehmensbefragung (Abschnitt 4.1) dargestellt, beträgt die zur Anwendung des neuen Reinigungsverfahrens zwischen Produktwechseln zur Verfügung stehende Zeit ggf. weniger als eine Stunde. Daher wird angestrebt, den Film als elastische Matrix rasch in möglichst großen Einzelelementen zu entfernen. Aufgrund der bei Einbauten wie Wellen und Mischerschaukeln anzutreffenden Geometrien muss für diese Bauteile von einem erhöhten Zeitaufwand für die Reinigung ausgegangen werden. Bei der Immobilisierung von Pulverpartikeln in einem Gelatinefilm erfolgt daher die Reinigung der Apparate mehrstufig, um eine hohe Reinigungseffizienz zu erreichen. Nach dem Einsatz mechanischer Verfahren wie Ausfegen, Saugen oder Drucklufteinsatz erfolgt im zweiten Schritt die Gel-Applikation zur Intensivreinigung.

Nachfolgend sollen die Anforderungen der einzelnen Prozessschritte und die betrieblichen Randbedingungen der Verfahrensanwendung in der Praxis erläutert werden.

### **3.4.2. Zerstäuben von Flüssigkeiten**

#### **3.4.2.1. Düsenbauarten und Anwendungsbereiche**

Beim Zerstäuben von Flüssigkeiten werden viele kleine Tröpfchen aus einem Fluid-Kontinuum erzeugt. Der zur Zerstäubung erforderliche Energieeintrag soll zur Schaffung neuer Oberflächen dienen und resultiert aus der Entspannung des Fluids beim Versprühen aus der Düse. Die Tropfenbildung erfolgt durch Bildung dünner Flüssigkeitslamellen nach Verlassen der Düse. Allerdings wird mit etwa 3% nur ein kleiner Teil der zum Zerstäuben aufgebracht Energie zur Erzeugung neuer Oberflächen genutzt, der weitaus größere Teil wird für den Fluid- und Gastransport aufgebracht (SCHUBERT, 2003a). Zerstäubersysteme für industrielle Anwendungen sind meist als Einstoff- oder Zweistoff-Düsenysteme, mechanische Zerstäuber oder Ultraschall-Zerstäuber ausgeführt (LEFEBVRE, 1989, WOZNIAK, 2002, RICHTER, 2004). Darüber hinaus wurden für spezielle Anwendungen weitere Sonderbauformen entwickelt (RICHTER, 2004). Als Maß für die Vernebelung kann der Zerstäubungsgrad als Verhältnis der Oberfläche nach der Zerstäubung zur Strahloberfläche unmittelbar vor der Zerstäubung angesehen werden.

Bei pneumatischen Verfahren wird im Gegensatz zu Einstoffsystemen (Druckdüsen) zusätzlich zum Fluid ein Luftstrom entspannt. Dabei zerfällt der Strahl, da sich auf seiner Oberfläche in Strahlrichtung eine Wellenstruktur ausbildet, durch welchen Einschnürungen auftreten und somit der Strahlzerfall eingeleitet wird (RICHTER, 2004).

Bei mechanischen Zerstäubern wird die zur Tropfenbildung erforderliche Energie extern durch mechanische Bauteile eingebracht. Beispielsweise wird bei Rotationszerstäubern das Fluid auf eine rotierende Scheibe aufgebracht und in ihrem Fliehkraftfeld bis zum Strahlzerfall beschleunigt. Die Tropfen werden bei diesem Verfahren nahezu über den gesamten Scheibenumfang freigesetzt, die Strömungsrichtung ist somit räumlich weniger kontrolliert als beim Einsatz eines Düsenverfahrens (RICHTER, 2004). Die Ultraschallvernebelung erzeugt

durch die Schwingungsanregung ein feines Tropfenspektrum. Das Verfahren ist derzeit als technisch empfindlich und teuer einzustufen (LADISCH, 2007).

Die Ein- und Zweistoffsysteme sind aufgrund der relativ einfachen und robusten Bauform weit verbreitet und aufgrund ihrer Bauart für die geplante Applikation geeignet. Sie sollen daher nachfolgend beschrieben werden.

### *Einstoff-Düsen*

Einstoff-Druckdüsen beziehen die zur Vernebelung erforderliche Energie ausschließlich aus der Druckenergie des zu zerstäubenden Fluids bis zur Entspannung auf Umgebungsdruck. Nach erzeugtem Sprühbild werden die Bauformen Hohlkegel-, Vollkegel- und Flachstrahldüsen unterschieden (vgl. Abbildung 3.4.1).

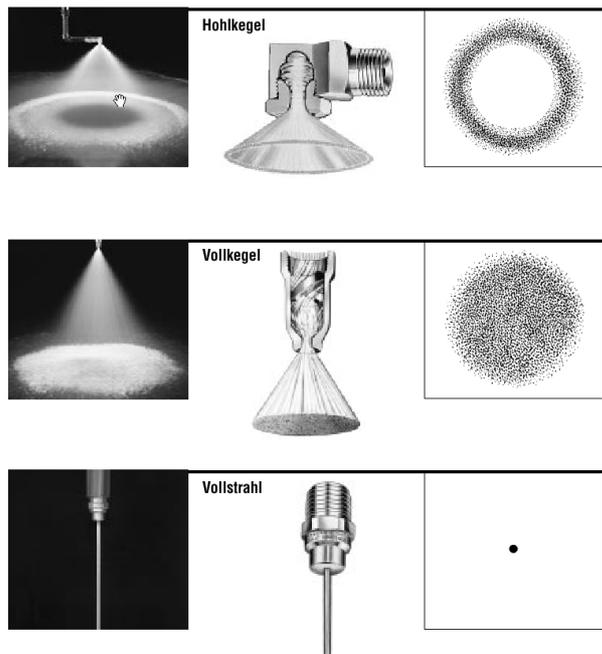


Abb. 3.4.1: Sprühbild, Einstoff-Düsen (SPRAYING SYSTEMS, 2008)

Bei der häufig anzutreffenden Bauform der Hohlkegeldüsen wird das Fluid tangential im äußeren Bereich des Düsenkopfes zugeführt und somit in Drall versetzt. Aufgrund der Erhaltung des Drehimpulses wird das Fluid zur Düsenmündung im Zentrum des Düsenkopfes beschleunigt. Dabei erreicht der statische Druck Werte unterhalb des Umgebungsdrucks, wodurch sich ein angesaugter (Umgebungs-)Luftkern ausbildet und das Fluid kreisringförmig als auseinander strebende, hohlkegelförmige Lamellen freigesetzt wird (vgl. Abbildung 3.4.1). Im Innern des Kegels fließt somit keine Flüssigkeit, sondern Luft. Die Lamellen zerfallen aufgrund von aufgeprägten oszillierenden Kräften in einiger Entfernung zu Tropfen. Durch tangentiale und radiale Fluidzuführung lässt sich eine Fluidströmung auch in Vollkegelgeometrie erzeugen (SCHUBERT, 2003a).

Einstoff-Düsen besitzen verhältnismäßig große Bohrungen bei recht kleinen Tropfendurchmessern. Sie neigen daher weniger schnell zur Verstopfung und sind somit insbesondere geeignet, höherviskose Lösungen bzw. Suspensionen zu verdüsen. Hohlkegeldüsen liefern bezogen auf den Düsendurchmesser die kleinsten Tröpfchendurchmesser aller Einstoff-Düsen. Die Berechnung der Tropfengrößenverteilung und des Volumenstroms ist für diese Düsenbauform sehr schwierig, da aufgrund des sich bildenden Luftkegels nicht die gesamte Düse mit Flüssigkeit ausgefüllt ist (IBR-ZERSTÄUBUNGSTECHNIK, 2008). Das für ein gegebenes Fluid zum Erzielen einer bestimmten Mindesttropfengröße erforderliche Druckniveau ist erheblich höher als bei pneumatischen Systemen (Zweistoff-Düsen).

### *Zweistoff-Düsen, pneumatische Zerstäubung*

Bei der pneumatischen Zerstäubung mittels Zweistoff-Düsen wird einer Düse sowohl das zu dispergierende Fluid als auch ein Gasstrom zugeführt. Der Gasstrom wird in der Düse mit

hoher Geschwindigkeit ringförmig um die Austrittsöffnung des Fluids herum freigesetzt (vgl. Abbildung 3.4.2). Aufgrund der höheren Geschwindigkeit des strömenden Gases wird das zugeführte Fluid angesaugt und zu lamellenartigen Gebilden und Tropfen zerteilt. Die Vorgänge sind bei RICHTER (2004) beschrieben. Die Energie zum Zerstäuben der Flüssigkeit stammt dabei primär aus der Entspannung des Gasstroms.

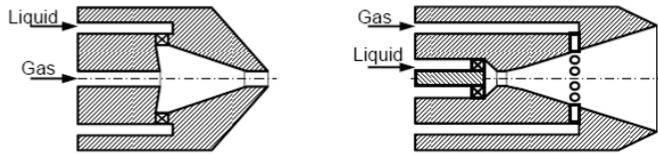


Abb. 2.1-8: Pneumatikzerstäuber mit innerer Mischung

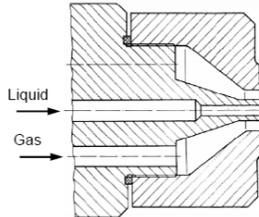
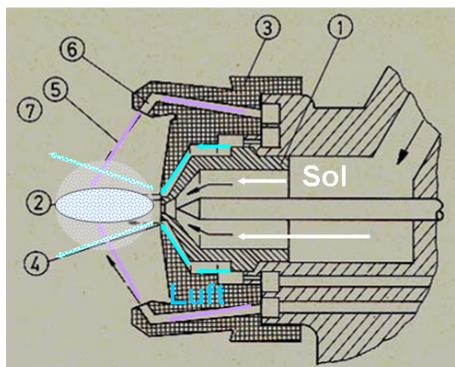


Abb. 2.1-9: Zweistoffdüse mit äußerer Mischung [6].

Abb. 3.4.2: Schematischer Aufbau einer Zweistoff-Düse mit innerer und äußerer Mischung – Schnitt durch den rotationssymmetrischen Zweistoffkörper (KOHLMANN, 2004)

Als Vorteile dieser Bauform sind die geringe Tropfengröße auch bei hochviskosen Medien (WOZNIAK, 2002) sowie die gute Regelbarkeit durch Variation des Gasmassstroms zu nennen (KOHLMANN, 2004). Nachteilig wirken sich die geringe Beeinflussung des Sprühbildes und der geringe energetische Wirkungsgrad aus. Wichtige Einflussgrößen sind das Volumenstromverhältnis von Gas- und Flüssigkeitsstrom (Beladung), Düsengeometrie und Stoffkenngrößen (WOZNIAK, 2002). Bei pneumatischen Zerstäubern mit innerer Mischung erfolgt die Zusammenführung von Gas- und Flüssigkeitsstrom innerhalb der Mischkammer vor Austritt aus der Düse (vgl. Abbildung 3.4.2). Das beim Mischen verteilte Fluid wird nach Austritt aus der Düse durch die hohe Gasgeschwindigkeit zu Tropfen zerrissen.

Bei der Bauform mit äußerer Mischung erfolgt die Vermischung außerhalb der Düse in einem vorgesetzten, sich kegelförmig aufweitenden Rohrstück oder direkt aus parallel sehr nah nebeneinander angeordneten Fluid- und Gasdüsen. Das Fluid kann mit Druck beaufschlagt und so durch die Düse gefördert, per Gewichtskraft ausgetragen oder vom Gasstrom mitgerissen werden.



- 1 Düse
- 2 Zerstäubungsraum, Sprühbild
- 3 Luftkappe
- 4 Gasströmung
- 5 Querluftströme
- 6 Hornbohrungen
- 7 Raum von Luftkappe

Abb. 3.4.3: Zweistoff-Düse mit Hornbohrungen zur pneumatischen Regulierung des Sprühbildes durch Querluftströme (WOZNIAK, 2002, verändert)

Die Bauform mit äußerer Mischung erzeugt ein weniger feines Tropfenspektrum bei sonst gleichen Betriebsbedingungen, vermeidet aber bestimmte bauartbedingte Materialflussprobleme der Düsen mit innerer Mischung. An pneumatischen Sprühpistolen kann meist zusätzlich die Luftzufuhr zu zwei Hornbohrungen, die in einigem radialen Abstand zum Luft- und Fluidaustritt am Düsenkopf angebracht sind, reguliert werden (vgl. Abbildung 3.4.3).

Diese so genannten Querluftströme üben einen seitlichen Impuls auf das Fluid-Luft-Gemisch aus und ermöglichen so, das eigentlich runde Spritzbild der gegebenen Düsengeometrie als ovales Sprühbild mit entsprechend höherem Deckungsgrad auf die Flächen aufzutragen.

Fluid- und Gasstrom lassen sich bei den Systemen separat regeln. Hinsichtlich der Bauformen werden im Wesentlichen HVLP- und RP-Systeme unterschieden (GOLDSCHMIDT & STREITBERGER, 2002). Die moderne Bauform der HVLP-Pistolen arbeiten bei hohen Gasvolumenströmen, aber niedrigeren Drücken. Die seit längerem am Markt angebotenen RP-Pistolen bei etwas höheren Drücken, aber reduzierten Gasdurchsätzen. Beide Bauformen erreichen heute einen Auftragswirkungsgrad von annähernd 70 %.

Tabelle 3.4.1 stellt die wesentlichen Vor- und Nachteile der Druckzerstäubung sowie pneumatischer Verfahren gegenüber. Im nachfolgenden Abschnitt werden die Vorgaben zur mathematisch-physikalischen Beschreibung von Sprühvorgängen dargestellt.

Tab. 3.4.1: Charakteristik von Zerstäuber-Bauarten (LADISCH, 2007, LEFEBVRE, 1989)

Bauart	Vorteil	Nachteil	Anwendungsbereich
Druckzerstäubung (Einstoffsysteme)	Einfacher Aufbau Kostengünstig Weiter Sprühwinkel Robust Geringer Energiebedarf zur Zerstäubung Niedrige Strömungsgeschwindigkeit möglich	Hoher Fluid-Vordruck Hoher apparativer Aufwand Sprühwinkel sinkt mit abnehmendem Fluidfluss Einsatz hochviskoser Fluide problematisch Verstopfungsempfindlich	Dieselmotoren Gasturbinen Wasserzerstäubung Lebensmittelverarbeitung
Pneumatische Zerstäubung (Zweistoffsysteme)	Hoher Zerstäubungsgrad Verstopfungsunempfindlich Größere Durchmesser innerhalb der Fluidführung Geeignet für höherviskose Fluide Einsatz bei niedrigem Druckniveau möglich (< 6 bar) Tropfengröße steuerbar	Fluidrücklauf in luftführende Leitungssysteme möglich Hohe Fluid-Strömungsgeschwindigkeit Fluidverluste (Farbnebel, Rückprall, Overspray)	Industrieöfen Gasturbinen Farbspritzsysteme Lebensmittelverarbeitung

### 3.4.2.2. Beschreibung des Strahlzerfalls bzw. der Tropfenbildung

Die Strömungsgeschwindigkeit am Austritt der Düse beeinflusst maßgeblich die Strömungszustände und damit die Tropfenbildung. Grundsätzlich werden nach zunehmender Strömungsgeschwindigkeit unterschieden

- 1) Auslaufen
- 2) Abtropfen
- 3) Zertropfen
- 4) Zerwellen
- 5) Zerstäuben.

Aufgrund der Vielzahl von Einflussfaktoren auf den Strahlzerfall und die Tropfenbildung werden dimensionslose Kennzahlen zur Beschreibung der Sprühvorgänge verwendet (LIN & REITZ, 1998, SCHUBERT, 2003a). Im Wesentlichen charakterisieren den Flüssigkeitszerfall die Kenngrößen Reynolds- ( $Re$ ), Weber- ( $We$ ), Ohnesorge- ( $Oh$ ) und Bondzahl ( $Bo$ )

$$Re_l = \frac{v_{0,l} d_d \rho_l}{\eta_l} \quad (3.4.1)$$

$$We_l = \frac{v_{0,l}^2 d_d \rho_l}{\sigma_l} \quad (3.4.2)$$

$$Oh_l = \frac{\sqrt{We_l}}{Re_l} = \frac{\eta_l}{\sqrt{d_0 \sigma \rho_l}} \quad (3.4.3)$$

$$Bo = \frac{d_d^2 \rho_l g}{\sigma_l} \quad (3.4.4)$$

mit:

- $d_d$ : Düsendurchmesser, m
- $v_{0,l}$ : mittlere Strömungsgeschwindigkeit der Flüssigkeit in der Düse, m/s
- $\eta_l$ : Viskosität der Flüssigkeit (dyn. Viskosität), kg/(m s)
- $\rho_l$ : Dichte der Flüssigkeit, kg/m<sup>3</sup>
- $\sigma_l$ : Oberflächenspannung der Flüssigkeit, kg/s<sup>2</sup>
- $g$ : Erdbeschleunigung, m/s<sup>2</sup>

Nachfolgend werden wesentliche Vorgänge beschrieben, die zum nicht kontrollierten Auftreten von Beschichtungsmaterial auf Oberflächen führen. Dieses sog. Overspray ist ein beim Beschichten eher unerwünschter Effekt. Unabhängig von der Zerstäubungsart (Druck- oder Pneumatikerstäubers) zeigt sich ein entsprechendes charakteristisches Sprühbild, welches durch zu den Rändern abnehmende Materialmenge pro Fläche charakterisiert ist. In den äußeren Bereichen zeigen sich immer einzelne Tropfen auf den Flächen, wohingegen in den mittleren Bereichen durch kontinuierlichen Auftrag eine gleichmäßig dichte Schicht vorhanden ist. Bei pneumatischen Zerstäubern ist dieser Effekt aufgrund der höheren Strömungsgeschwindigkeit der Fluidpartikel stärker ausgeprägt. Hierdurch wird der Effekt begünstigt, dass Fluidtropfen von den zu beschichtenden Flächen abprallen und anderenorts unkontrolliert auftreffen. Werden Randbereiche der Werkstücke beschichtet, tritt aufgrund der Breite des Sprühwinkels bei beiden Sprühverfahren die Situation auf, dass Fluid am Werkstück vorbei gesprüht wird. Bei der Erzeugung sehr kleiner Tropfen besteht darüber hinaus bei beiden Verfahrensprinzipien die Gefahr einer unkontrollierten Verteilung mit der Raumluftströmung bzw. durch diffusionskontrollierten Transport.

### *Einstoffsysteme*

Nach theoretischen Betrachtungen (RICHTER, 2004) läuft ein Fluid bei Bondzahlen größer 28 aus einer Kapillare aus, ein Abtropfen aus einer Kapillare geht bei Weberzahlen oberhalb von 8 bis 10 in die Strahlbildung über. Für Zerstäuberdüsen (Einstoff-Düsen) berechnet sich die zur Zerstäubung erforderliche Leistung  $P$  aus der Entspannungsarbeit des unter Druck stehenden, zu zerstäubenden Fluids gemäß

$$P = (p_{l,0} - p_{l,1}) * \dot{V}_l \quad (3.4.5)$$

mit:

- $p_{l,0}$ : Druck des Fluids vor der Entspannung, kg/(m s<sup>2</sup>)
- $p_{l,1}$ : Umgebungsdruck am Düsenaustritt, kg/(m s<sup>2</sup>)
- $\dot{V}_l$ : Fluid-Volumenstrom, m<sup>3</sup>/s

Die Berechnung des maximalen Volumenstroms kann mittels der Kontinuitätsgleichung erfolgen, wobei ein Geschwindigkeitsbeiwert die Hohlkegelform und den Luftkern berücksichtigt.

$$\dot{V}_l = \varphi \frac{\pi}{4} d_d^2 v_l \quad (3.4.6)$$

mit:

- $d_d$ : Düsendurchmesser, m
- $v_l$ : Fluidgeschwindigkeit in der Düse (Austrittsgeschwindigkeit), m/s
- $\varphi$ : Geschwindigkeitsbeiwert (dimensionslose Kenngröße für das Verhältnis von reibungsfreiem zu reibungsbehafteter Ausflussgeschwindigkeit) ( $f(Re, V_l/V_g)$ ); bei gut abgerundeten Düsen gilt  $\varphi = 1$ ; sonst:  $\varphi = 0,95$  bis  $0,98$ )

Unter Berücksichtigung der Flüssigkeitsreibung kann gemäß der Potentialtheorie die maximale Ausströmgeschwindigkeit aus dem Druckverlust über die Düse berechnet werden zu

$$v_{l,1} = \sqrt{\frac{2\Delta p_l}{\rho_l(1 + \zeta_D)}} \quad (3.4.7)$$

mit:

- $\Delta p_l$  Druckverlust über die Düse, kg/(m s<sup>2</sup>)  
 $\rho_l$  Dichte der Flüssigkeit, kg/m<sup>3</sup>  
 $\zeta_D$  Druckverlust-Beiwert der Düse (f(Re) (dimensionslose Größe; bei gut abgerundeten Düsen gilt  $\zeta_D = 0$ ; sonst  $\zeta_D = 0,2$  bis  $0,5$ )

Eingesetzt ergibt sich der Volumenstrom zu

$$\dot{V}_l = \varphi \frac{\pi}{4} d_d^2 \sqrt{\frac{2\Delta p_l}{\rho_l(1+\zeta_D)_l}} \quad (3.4.8)$$

Für die in der Düse vorherrschende Gas-Geschwindigkeit lässt sich die Reynoldszahl der Fluidströmung berechnen. In Abhängigkeit der Reynoldszahl können Druckverlust- und Geschwindigkeitsbeiwert mittels geeigneter Modelle nach WOZNAK (2002) und LEFEBVRE (1989) abgeschätzt werden.

Schätzt man die Kenngrößen einer 20%igen Gelatinelösung (Oberflächenspannung: 0,04 m/s<sup>2</sup>, Dichte ca. 1100 kg/m<sup>3</sup>) mit der kritischen Weberzahl (angenommen: 20) die Bedingungen des Strahlerfalls für eine 1 mm durchmessende Kapillare (Druckverlust-Beiwert 0,2) theoretisch ab, erhält man für die Mindestgeschwindigkeit, oberhalb der ein Zerstäubungsprozess einsetzt, einen Wert von 0,9 m/s. Für den sich dabei einstellenden Fluidvolumenstrom von 42 L/min ergibt sich rechnerisch ein Druckverlust innerhalb der Düse von ca. 6 bar. In der Praxis sind zur Überwindung der weiteren Druckverlustanteile innerhalb der Strömungsführung deutlich höhere Drücke erforderlich.

Tab. 3.4.2: Abschätzung des Düsen-Druckverlustes beim Zerstäuben

	We (Kritisch) = 20 =>	SOLL-Wert
$d_{Düse}$		0,001 m
Dichte, Fluid		1100 kg/m <sup>3</sup>
Oberflächenspannung		0,04 m/s <sup>2</sup>
Geschwindigkeit, oberhalb derer Zertropfen einsetzt		0,89 m/s
Druckverlust-Beiwert, Düse (angenommen)		0,2
theoretisch notwendiger Druckverlust $D_p$		5,76E+05 Pa
Fluid-Durchsatz		42,1 L/min

### Zweistoffsysteme

Zur mathematischen Beschreibung der Fluidentspannung mittels Pneumatikdüsen (Zweistoff-Düsen) wird die Interaktion von Fluidstrom und meist erheblich schnellerer Gasströmung berücksichtigt. In letzterer treten aufgrund der turbulenten Strömungsbedingungen nicht unerhebliche Dichteunterschiede auf, deren Ausgleich die Fluidströmung beeinflusst. Bei der Abschätzung der benötigten Energie wird die isentrope Entspannung des Luftstromes in die Bilanz einbezogen.

$$P = ((p_{l,0} - p_{l,1}) * \dot{V}_l + \frac{\kappa}{\kappa - 1} p_{g,1} \dot{V}_{g,1} \left[ \left( \frac{p_{g,0}}{p_{g,1}} \right)^{\kappa - 1/\kappa} - 1 \right]) \quad (3.4.9)$$

mit:

- $\kappa$ : Isentropenexponent ( $\kappa = c_p/c_v$ ;  $\kappa = 1,4$  für trockene Luft zwischen 0 und 100 °C)  
 $p_{g,0}$ : Absolutdruck des Gases am Düsenaustritt  
 $\dot{V}_{g,1}$ : Volumenstrom des Gases unter Umgebungsbedingungen

### *Tropfengrößen*

Das Spektrum von Tropfengrößen umfasst typischerweise zwei Größenordnungen und lässt sich nicht ausschließlich aus gegebenen Größen wie Düsengeometrie und Fluidkennwerten theoretisch ableiten. Experimentelle Untersuchungen sind in diesem Zusammenhang erforderlich. Die direkte Messung ist per Bildanalyseverfahren für Tropfendurchmesser ab etwa 50 µm oder per Laserbeugungsspektrometer möglich (RICHTER, 2004). Bei der Laserbeugungsspektroskopie wird die größen- und materialabhängige Wechselwirkung eines Partikel- oder Tropfenkollektivs mit einem Lichtstrahl ausgewertet. Eine simultane Bestimmung von Tropfendurchmesser und -geschwindigkeit ist mittels Phasen-Doppler-Anemometrie (PDA) möglich, bei der sich kreuzende Laserstrahlen das Messvolumen aufspannen und die Zielgrößen mittels Auswertung der Interferenzmuster sehr lokal bestimmt werden können (RICHTER, 2004).

Die entstehende Tropfengrößenverteilung einer Zweistoff-Düse kann nach SCHUBERT (2003a) orientierend aus einem empirisch abgeleiteten Ansatz abgeleitet werden, der u.a. Verhältnis der Massenströme von Gas und Fluid berücksichtigt. Der Sauter-Durchmesser  $d_{ST}$  kann demnach für eine gegebene Geometrie wie folgt berechnet werden:

$$d_{ST} = 51d_d \operatorname{Re}_{ur}^{-0,39} \operatorname{We}_{ur}^{-0,18} \left( \frac{\dot{m}_l}{\dot{m}_g} \right)^{0,29} \quad (3.4.10)$$

mit:

$$u_r = u_g - u_l$$

$$\operatorname{Re}_{ur} = \frac{v_{0,l} \rho_l d_d}{\eta_l}$$

$$\operatorname{We}_{ur} = \frac{u_r^2 \rho_l d_d}{\sigma_l}$$

$\dot{m}_l, \dot{m}_g$ : Massenstrom, Index l: Fluid, Index g: Gas, kg/s

$u_g, u_l$ : Geschwindigkeit, Index l: Fluid, Index g: Gas, m/s

Für einen Düsendurchmesser von 1,3 mm und bei den gemessenen Fluid- und Gasdurchsatzraten der eingesetzten Sprühhvorrichtung ergibt sich mit den rheologischen Parametern einer 20%igen Gelatinelösung sowie von Luft ein Tropfendurchmesser von ca. 21 µm. Gemäß einer bei RICHTER (2004) angegebenen Formel ergibt sich ein höherer Wert von 39 µm. Nach visuellem Eindruck und orientierender mikroskopischer Auswertung beim Sprühvorgang scheint dies eher dem unteren Durchmesser des aufgetragenen Tropfenspektrums zu entsprechen.

Die turbulenten, stochastischen Vorgänge im Innern der Sprüheinrichtungen sind aber trotz einer Vielzahl von Veröffentlichungen mathematisch-physikalisch nur sehr schwer zu beschreiben (LIN & REITZ, 1998).

#### **3.4.3. Haftkräfte zwischen Partikeln und Oberflächen**

Unterschiedliche Mechanismen sind für Phänomene der Anhaftung, wie z.B. Fluidfilme an Materialoberflächen und Haftung von Partikelmaterial an den Oberflächen und am Film, von Bedeutung. Eine Bilanzierung der haftwirksamen Wechselwirkungskräfte liefert die resultierende Haftkraft der jeweiligen Situation. Als Medium der haftkraftüberwindenden Reinigung muss die reversibel aufgetragene Gelmatrix eine größere Affinität zu den Partikeln besitzen als diese zur gereinigten Oberfläche. Die einzelnen Kräfte können hinsichtlich ihrer Reichweite oder gemäß des Charakters der Bindung unterschieden werden (vgl. Abbildung 3.4.4).

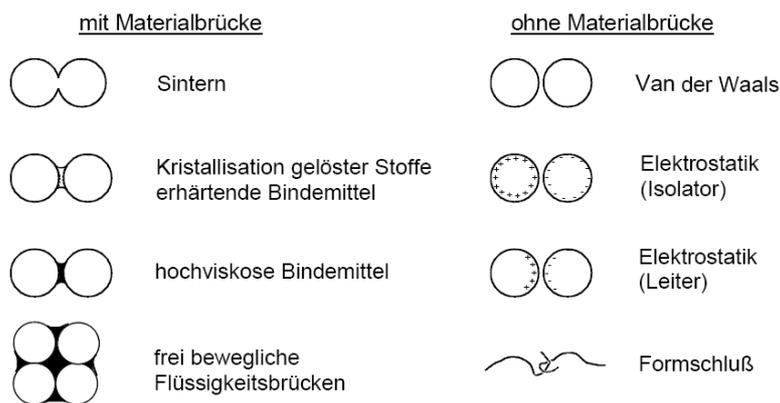


Abb. 3.4.4: Schematische Darstellung typischer Haftkräfte mit und ohne Materialbrücke (SCHUBERT, 1979)

Tabelle 3.4.3 zeigt eine Einteilung der Kräfte hinsichtlich ihrer Reichweite.

Tab. 3.4.3: Reichweite typischer Haftkräfte mit und ohne Materialbrücke

	Materialbrücke	Reichweite
Sintern	Ja	GF
Kristallisation, erhärtete Bindemittel	Ja	GF
Hochviskose Bindemittel	Ja	GF
Freie Flüssigkeitsbrücken	Ja	GF
Van-der-Waals	Nein	LR
Elektrostatik (Isolatoren)	Nein	LR
Elektrostatik (Leiter)	Nein	LR
Formschluss	Nein	GF

LR: Long Range (Wirkung über den eigentlichen Kontaktbereich hinaus)

GF: Grenzflächenreaktionen (Sinter- oder Kondensationsreaktion)

Short-Range-Kräfte können erst wirksam werden, wenn eine ausreichende Annäherung der Haftpartner aufgrund der Wirksamkeit von Kräften der Kategorie LR gegeben ist. Nach KRUPP (1967) erfolgt eine punktuelle Annäherung der Haftpartner im atomaren Bereich. Dann wirksame Short-Range-Kräfte können bei rauen Oberflächen die Zahl der Kontaktpunkte weiter erhöhen und die resultierende Haftkraft aufgrund intermolekularer Wechselwirkungen weiter verstärken. Dabei erfolgt eine weitere Annäherung bis sich die resultierende Haftkraft im Gleichgewicht mit den elastischen und plastischen Verformungskräften befindet. Die Haftung zwischen Partikelmaterialien und Oberflächen wird wesentlich durch die Geometrien der in Kontakt stehenden Oberflächen sowie durch die Qualität der betrachteten (Haft-)Partner und des umgebenden Mediums beeinflusst (VISSER, 1995). Grundsätzliche Mechanismen basieren auf den im Nahbereich herrschenden van-der-Waals-Kräften, elektrostatischen Kräften sowie Kräften aufgrund sich ausbildender Flüssigkeits- oder Bindemittelbrücken jeweils unter Berücksichtigung der Schwerkraft. Aufgrund der verschieden stark ausgeprägten Abhängigkeit der Kräfte vom Abstand der Partner ergibt sich die Anhaftung bei Unterschreiten eines bestimmten Abstandes (VISSER, 1995).

Sinterung sowie innerhalb einer Gelmatrix wirksame Formschlusskräfte, vergleichbar mit dem Verhaken von gebogenen Elementen, treten zwischen den hier betrachteten unterschiedlichen Materialien nicht auf und werden daher im Zusammenhang mit der Adhäsion im Weiteren nicht betrachtet.

Abgeleitete mathematische Ansätze beziehen sich in der Regel auf vereinfachte Modellfälle des Kontaktes zweier Kugeln, einer Kugel und einer unendlich ausgedehnten ebenen Platte oder zweier solcher Platten zueinander, jeweils mit einem Abstand  $a$  zwischen den betrachteten Haftpartnern. Die theoretischen Grundlagen der Anhaftung von sphärischen, ideal glatten und starren Partikeln an Oberflächen sind in der Literatur beschrieben (RUMPF, 1974, PODZECK et al., 1985, SCHUBERT, 2003a). Die Beschreibung der Kräfteverhältnisse basiert in den abgeleiteten Modellen meist auf schwer zugänglichen Größen wie der Hamaker-Kon-

stante, Interaktionskonstante, Lifshitz-Konstante oder der Dielektrizitätskonstante (PODZECK et al., 1985), wodurch sich ihre praktische Anwendung erschwert.

Eine wesentliche Einflussgröße stellt die Rauigkeit natürlicher Oberflächen dar, welche selbst in extrem glatten Zustand in der Größenordnung von Nanometern gegeben ist. Bei durch bestimmungsgemäße betriebliche Nutzung gealterten Stählen können Rauigkeiten bis zu einigen  $\mu\text{m}$  auftreten, durch Kratzer und mechanische Beanspruchung auch größere Unebenheiten. Diese Oberflächenstruktur ist für die Wirksamkeit der Haftkräfte bedeutsam, da sie lokal die minimalen Abstände der Haftpartner, damit die haftwirksamen Flächenanteile und lokalen Haftkräfte, definiert. Die Vergrößerung der mittleren Abstände von Partikel und Oberfläche und die daraus resultierende Abnahme der Haftkräfte wird durch Modellerweiterungen bzw. ergänzende Modellansätze berücksichtigt, indem z.B. kalottenförmige Halbkugel-Elemente mit kleineren Durchmessern auf der Oberfläche berücksichtigt werden (WEIGL, 2004). Ihre Anwendung in der industriellen Praxis ist aufgrund der zu erfassenden Einflussgrößen ebenfalls nicht trivial.

Liegt ein gasförmiges Medium vor, beruht die Haftung im Wesentlichen auf elektrostatischen Aufladungseffekten oder auf der Wirkung von kondensierten Wasserdampffilmen zwischen den Oberflächen (VISSER, 1995). Grundsätzlich bildet sich an nahezu allen Oberflächen aufgrund der atmosphärischen Luftfeuchte ein monomolekularer Wasserfilm aus. Dieser Film ist jedoch erst bei Luftfeuchten oberhalb 65% derart präsent, dass sich bei geeigneter Geometrie (Kapillare) Flüssigkeitsbrücken ausbilden können (PODZECK et al., 1985).

Bei von einer geschlossenen Fluidphase umgebenen Haftpartnern sind die Bedingungen für die genannten Kräfte nicht gegeben. Insbesondere treten bei einer vollständigen Benetzung mit einer inhärenten Phase, wie es bei der Filmreinigung auftritt, aufgrund der dann fehlenden Kapillareffekte keine Haftkräfte durch Flüssigkeitsbrücken auf. An ihre Stelle treten Kräfte aufgrund der sich ausbildenden elektrostatischen Doppelschicht gemäß der DLVO-Theorie sowie die van-der-Waals-Kraft (GOLDSCHMIDT & STREITBERGER, 2002). Die DLVO-Theorie stellt einen vereinfachenden, theoretischen Ansatz auf Grundlage der Kugel-Kugel-Geometrie unter Einbezug der räumlich ausgedehnten repulsiven elektrostatischen und der räumlich rasch abnehmenden, anziehenden van-der-Waals-Kräfte dar. Die Theorie bezieht allerdings beim Medium Wasser vorherrschende, spezielle Randbedingungen der Wasserstoffbrückenbindungen nicht mit ein. Den Oberflächen werden homogene Ladungsverteilungen mit dem entsprechenden elektrischen Feld zugeordnet, welche sich bei Annäherung überlappen.

Aufgrund der Produktionsbedingungen bei der Verarbeitung pulverförmiger Lebensmittel kann im Ursprung von eher trockenen Oberflächen ausgegangen werden, so dass van-der-Waals- und elektrostatische Kräfte die Haftmechanismen im Ausgangszustand, vor Anwendung der neuen Reinigungsmethode, dominieren. Nach Aufspritzen des Sols liegt jedoch ein polares Medium (Gel) zwischen den Haftpartnern vor. Nachfolgend sollen die relevanten Kräfte näher beschrieben werden.

Der Ansatz zur Beschreibung der Adhäsionskräfte durch van-der-Waals auf Grundlage der Wechselwirkung polarer Moleküle wurde durch London und Hamaker weiter entwickelt. Unter van-der-Waalschen Kräften werden mehrere unterschiedliche Arten von Wechselwirkungen polarer Moleküle zusammengefasst (GOLDSCHMIDT & STREITBERGER, 2002):

- Dipol-Dipol-Wechselwirkung (Orientierungskräfte)
- Wechselwirkung Dipol-Induzierter Dipol (Induktionskräfte)
- Dispersionskräfte (London-Kraft)

Die London-Kräfte beschreiben schwache Anziehungskräfte zwischen unpolarisierten Atomen und Molekülen. Sie sind mit 5 bis 10 kJ/mol schwächer als die anderen beiden genannten Wechselwirkungen und sind bei flüssigen Systemen von Bedeutung. Wasserstoffbrückenbindungen oder Dipol-Dipol-Wechselwirkungen weisen meist mit 40 bis 50 kJ/mol bzw. 15 bis 25 kJ/mol deutlich höhere Beträge auf (GOLDSCHMIDT & STREITBERGER, 2002).

Der molekülorientierte Ansatz wurde auf die Beschreibung makroskopischer Körper wie zweier paralleler Platten oder einer Platte und einer Kugel im Abstand  $a$  erweitert. Die resultierenden Kräfte werden aus molekularen Wechselwirkungsparametern berechnet. Dieser Ansatz berücksichtigt aber beispielsweise nicht, dass die Wechselwirkungen entfernter Part-

ner durch näher befindliche Moleküle abgeschirmt sein können. Weiterhin wird bei diesem theoretischen Ansatz nicht die Tatsache berücksichtigt, dass Oberflächen nur sehr selten aus reinen Substanzen, sondern beispielsweise für Edelstahl aus unterschiedlichen Oxiden sowie einem umgebenden Wasserfilm bestehen.

Die van-der-Waals-Wechselwirkung kann nach der Theorie von Hamaker berechnet werden. Einflussgrößen der Kugel-Platte-Geometrie sind die Hamaker-Konstante, der Adhäsionsabstand sowie der Kugeldurchmesser. Als Adhäsionsabstand kann nach KRUPP (1967) ein Wert von 0,4 nm verwendet werden. Die Hamaker-Konstante muss für die betrachtete Kombination zweier betrachteten Komponenten festgelegt werden. Meist werden diese für zwei gleiche ( $H_{11}$ ) oder zwei verschiedene Materialien ( $H_{12}$ ) im Vakuum als Funktion der material-spezifischen Kenngrößen, wie z.B. Anzahl der Moleküle pro Volumeneinheit  $q_i$  und frequenz-abhängigen Polarisierbarkeit der Partner, beschrieben durch die Interaktionskonstante  $C$ , angegeben.

$$H_{11} = \pi^2 C q_1 q_2 \quad (3.4.11)$$

$$H_{12} = \sqrt{H_{11} H_{22}} \quad (3.4.12)$$

Der Einfluss eines die Haftflächen umgebenden Fluids (Komponente 3) wird spezifisch berücksichtigt und die resultierende Hamaker-Konstante des Dreistoffsystems wie folgt berechnet:

$$H_{131} = H_{11} + H_{33} - 2H_{13} = \left( \sqrt{H_{11}} - \sqrt{H_{33}} \right)^2 \quad (3.4.13)$$

Aus den funktionellen Zusammenhängen ist ersichtlich, dass mit abnehmendem Partikeldurchmesser die Gewichtskraft mit der dritten Potenz des Partikeldurchmessers abnimmt und die Anziehungskräfte mit der ersten oder zweiten Potenz des Partikeldurchmessers zunehmen (vgl. Tabelle 3.4.3). Bei Partikeln mit einem Durchmesser oberhalb 100  $\mu\text{m}$  dominiert in der Regel die Gewichtskraft, wenn eine große Dichtedifferenz zwischen Partikel und umgebendem Fluid vorliegt (REED, 1988).

Werteangaben für die Hamaker-Konstante vergleichbarer Systeme schwanken z.T. um zwei Zehnerpotenzen (VISSER, 1972). Die exakte frequenzabhängige Polarisierbarkeit ist sehr schwer zu bestimmen. Es werden Wechselwirkungen der betrachteten Haftpartner additiv berücksichtigt, die ebenfalls wirksamen Effekte der Wechselwirkungen benachbarter Atome jedoch nicht. Bei WEIGL (2004) sind von VISSER (1972) berechnete Spannen der Hamaker-Konstanten für Partikelmaterialien in wässriger Lösung angegeben (Minimal- und Maximalwert), vgl. Tabelle 3.4.4.

Tab. 3.4.4: Hamaker-Konstanten  $H_{131}$  für Materialien in wässrigen Lösungen

Material	$H_{131,\text{min}}$ ( $10^{-20}$ J)	$H_{131,\text{max}}$ ( $10^{-20}$ J)
Polystyrol (PS)	0,1	11
Metalle	0,5	31
Kohlenstoff	1,0	60
Siliziumoxid	0,2	1,7

Bei BOBE (2008) werden Werte der Hamaker-Konstante für Reinstoffe nach LAGALY et al. (1997) wie folgt angegeben:

(20 - 45)  $10^{-20}$  J für Metalle und Kohlenstoffe

(5 - 20)  $10^{-20}$  J für Oxide und Silicate

(5 - 15)  $10^{-20}$  J für Salze

(3 - 8)  $10^{-20}$  J für Polymere

(4 - 7)  $10^{-20}$  J für Lösungsmittel

Für Wasser wird eine Hamaker-Konstante von  $4 \cdot 10^{-20}$  J angegeben.

Durch LIFSHITZ (1956) wurde der Hamaker-Ansatz dahingehend weiterentwickelt, dass die Konstante aus makroskopischen, messtechnisch zugänglichen Größen bestimmt werden kann. Dazu werden Real- und Imaginäranteil der komplexen Permittivität (Dielektrizi-

tätskonstante) genutzt. Für das Beispiel Kugel-Platte kann folgende Gleichung zur Bestimmung der Haftkraft herangezogen werden (WEIGL, 2004):

$$F_{Lifshitz} = \frac{h\omega d}{16\pi a^2} \tag{3.4.14}$$

mit:

- h $\omega$ : Lifshitz-Konstante, Nm
- a: Adhäsionsabstand, m
- d: Kugeldurchmesser, m

Die Lifshitz-Konstante h $\omega$  für ein System bestehend aus zwei Komponenten und einem umgebenden Fluid (Komponente 3) lässt sich aus den Permeabilitäten der beiden Partner und des Fluids durch Integration über die Frequenz (Imaginäranteil i $\xi$ ) bestimmen:

$$h\omega_{132} = h \int_0^\infty \left( \frac{\epsilon_1(i\xi) - \epsilon_3(i\xi)}{\epsilon_1(i\xi) + \epsilon_3(i\xi)} \frac{\epsilon_2(i\xi) - \epsilon_3(i\xi)}{\epsilon_2(i\xi) + \epsilon_3(i\xi)} \right) d(i\xi) \tag{3.4.15}$$

In den Tabellen 3.4.5a bis 3.4.5c sind bei VISSER (1995) tabellierte Werte der Lifshitz-van-der-Waals-Konstante wiedergegeben.

Tab. 3.4.5a: Lifshitz-van-der-Waals-Konstante h im Vakuum und in Wasser (VISSER, 1995)

Material	A <sub>11</sub> , Vakuum 10 <sup>-20</sup> J	A <sub>131</sub> , Medium (3): Wasser 10 <sup>-20</sup> J
Au	54,5	37,5
Cu	30,6	17,8
MgO	11,5	1,8
PS	7,3	0,42
Wasser	5,45	--

Tab. 3.4.5b: Lifshitz-van-der-Waals-Konstante h für ternäre Systeme (VISSER, 1995)

Material 1	Material 2	Material 3 (Medium)	A <sub>132</sub> (10 <sup>-20</sup> J)
CaF <sub>2</sub>	Helium	Wasserdampf	-0,58
Quartz	Octan	Luft	-0,82
Au	PS	Wasser	-2,59
Si	Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Wasser	-2,93
Ge	CdS	PS	-4,46

Tab. 3.4.5c: Lifshitz-van-der-Waals-Konstante h im Vakuum und in Wasser gemäß Kontaktwinkelmessungen mit einem apolaren Fluid (VISSER, 1995)

Material	A <sub>11</sub> , Vakuum 10 <sup>-20</sup> J	A <sub>131</sub> , Medium (3): Wasser 10 <sup>-20</sup> J
Protein	7,3	0,46
Polymer (PS)	7,8	0,61
Glass	7,4	0,49
Metall (Edelstahl)	6,6	0,30
Wasser	4,1	--
Lehm	7,4	0,49

Über die Indizes wird dargestellt, ob es sich um Werte im Vakuum für zwei gleiche (11) oder verschiedene (12) Haftpartner handelt oder die Partner durch ein drittes Medium, beispielsweise Wasser, umgeben sind (131 oder 132). Bei solchen ternären Systemen nimmt die van-der-Waals-Anziehungskraft ab, so dass die resultierende Konstante A<sub>132</sub> auch negative Werte annehmen kann. Liegt im Vakuum bereits eine schwache Wechselwirkung vor, fällt die Abnahme stärker aus als bei Komponenten mit großem Wert der Konstante für das Vakuum. Für Kombinationen verschiedener Materialien können die Konstanten gemäß nachfolgender Regeln aus den Werten für gleiche Paarungen (Index 11) abgeleitet werden (AiF-FORSCHUNGSBERICHT 99 ZN/2, 2006):

$$A_{12} = \sqrt{A_{11}A_{22}} \tag{3.4.16}$$

$$A_{132} = \left( \sqrt{A_{11}} - \sqrt{A_{33}} \right) \left( \sqrt{A_{22}} - \sqrt{A_{33}} \right) \tag{3.4.17}$$

Reinstoffkonstanten  $A_{11}$  können aus Kontaktwinkelmessungen an den jeweiligen Materialoberflächen mit einem apolaren Fluid bestimmt werden (VAN OSS et al., 1998).

$$A_{11} = \gamma_i^{LW} 24\pi d_0^2 \quad (3.4.18)$$

$$[1 + \cos \theta] \gamma_L = 2\sqrt{\gamma_i^{LW} \gamma_L^{LW}} \quad (3.4.19)$$

mit:

$$l_0 = 1,57 \text{ \AA}$$

$\gamma_L = \gamma_L^{LW} = 44,4 \text{ mJ/m}^2$  für  $\alpha$ -Bromnaphtalen (als von van Oss verwendetes unpolares Fluid)

Nach RUMPF (1974) schwanken die Werte der Lifshitz-van-der-Waals-Konstante allerdings über einen weiten Bereich, so dass Berechnungsergebnisse nur als grobe Näherung aufgefasst werden sollten.

In Tabelle 3.4.6 sind für typische Modellgeometrien die Formeln zur Berechnung der Haftkräfte zusammengestellt. Die Formelgrößen sind messtechnisch z.T. schwer zugänglich. In der Legende sind daher typische Zahlenwerte angegeben.

Tab. 3.4.6: Übersicht – Haftkraftberechnung für Modellgeometrien (SCHUBERT, 2003a)

Haftkraft \ Modell	Kugel/Platte	Kugel/Kugel	Platte/Platte
Van-der-Waals	$\frac{h\omega d}{16\pi a^2}$ (Lifshitz)	$\frac{h\omega d}{32\pi a^2}$	$\frac{h\omega A}{8\pi^2 a^3}$
Elektrostatik / Leit.	$\frac{\pi}{d} \epsilon_0 \epsilon U^2 \frac{d}{a}$	$\frac{\pi}{4} \epsilon_0 \epsilon U^2 \frac{d}{a}$	$\frac{1}{2} \epsilon_0 \epsilon U^2 \frac{A}{a^2}$
Elektrostatik / Isol.	$\frac{\pi}{2} \frac{\varphi_1 \varphi_2}{\epsilon_0 \epsilon} d^2$	$\frac{\pi}{4} \frac{\varphi_1 \varphi_2}{\epsilon_0 \epsilon} \frac{d^2}{1 + \frac{a}{d}}$	$\frac{1}{2} \frac{\varphi_1 \varphi_2}{\epsilon_0 \epsilon} A$
Kapillar-Kraft FK	$F_{Kap} = \pi \gamma d (\cos(\theta_1) + \cos(\theta_2))$		

$4 \text{ \AA} < A < 500 \text{ \AA}$

$h\omega$ : Van-der-Waals-Wechselwirkungsenergie (0,1 – 10 eV (5 eV =  $8 \cdot 10^{-19}$  Nm))

$a$ : geringstmöglicher Abstand zwischen den Haftpartnern, m

$d$ : Kugeldurchmesser, m

$A$ : ebene Kontaktfläche, Platte/Platte

$\epsilon_0$ : Elektrische Feldkonstante ( $\epsilon_0 = 8,854 \cdot 10^{-12}$  As/(Vm), Permittivität des Vakuums)

$\epsilon$ : rel. Permittivität ( $\epsilon = 1$  für Vakuum, 1,0006 f. Luft, 2,2 f. Paraffin, 80 f. Wasser (SCHUBERT, 2003a))

$U$ : Kontaktpotential bei elektrischen Leitern (0,1 – 0,7 V)

$\varphi_1, \varphi_2$ : Flächenladungsdichten der Haftpartner ( $\varphi_1, \varphi_2 \leq 100 \text{ As}/\mu\text{m}^2$ )

$\varphi_1$ : Benetzungswinkel, Fluid-Platte ( $20^\circ$ )

$\varphi_2$ : Benetzungswinkel, Fluid-Partikel ( $20^\circ$ )

$\gamma$ : Oberflächenspannung, Fluid,  $7,20 \cdot 10^{-02} \text{ J/m}^2$

In den Abbildungen 3.4.5 bis 3.4.7 werden die Ergebnisse einer rechnerischen Abschätzung der in Tabelle 3.4.6 angeführten Kräfte für das Modellsystem Kugel-Platte gezeigt. Trägt man die Kraftbeträge über dem Partikeldurchmesser auf, zeigt sich die Bedeutung vorhandener Kapillarkräfte im Vergleich zur van-der-Waals-Kraft und der elektrostatischen Kraft. Für Partikeldurchmesser bis maximal 100  $\mu\text{m}$  ist die Gewichtskraft von untergeordneter Bedeutung (vgl. Abbildung 3.4.4). In diesem Bereich ist die van-der-Waals-Kraft stärker als elektrostatische Kräfte.

Abbildung 3.4.5 stellt demgegenüber vergleichend die Kräfte bei einem vergrößerten Abstand der Haftpartner dar, wie er bei rauen Partikeln angetroffen werden kann. Im Vergleich ist der starke Rückgang der van-der-Waals-Kraft deutlich, ihr Betrag liegt bei entsprechender Oberflächenrauigkeit in der Größenordnung der elektrischen Kräfte. Wird der Einfluss der Rauigkeitslänge auf die Haftkräfte betrachtet, zeigt sich ebenfalls die große Bedeutung von Kapillarkräften auf die Anhaftung von Partikeln auf Oberflächen. Die van-der-Waals-Kraft durchläuft hier ein ausgeprägtes Minimum. Die Zunahme zu größeren Durchmessern ist auf die Wechselwirkung mit den Rauigkeitselementen zurückzuführen.

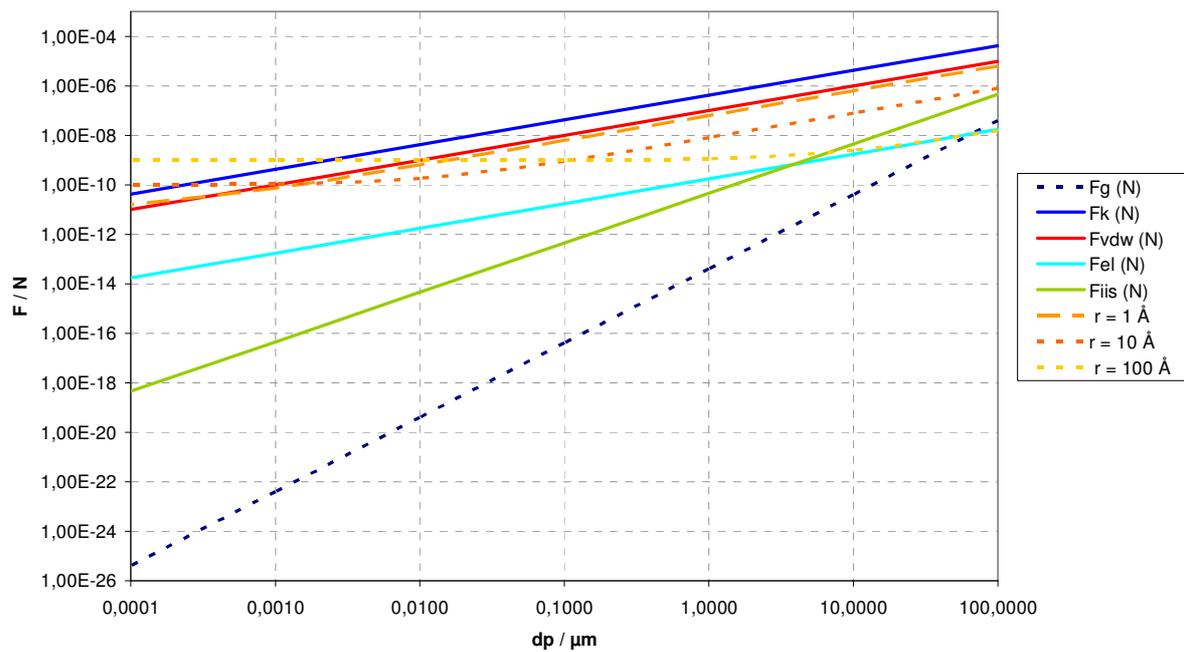


Abb. 3.4.5: Haftkraft  $F$  als Funktion des Partikeldurchmessers  $d_p$ , Modell Kugel-Platte,  $a_0 = 4 \text{ \AA}$

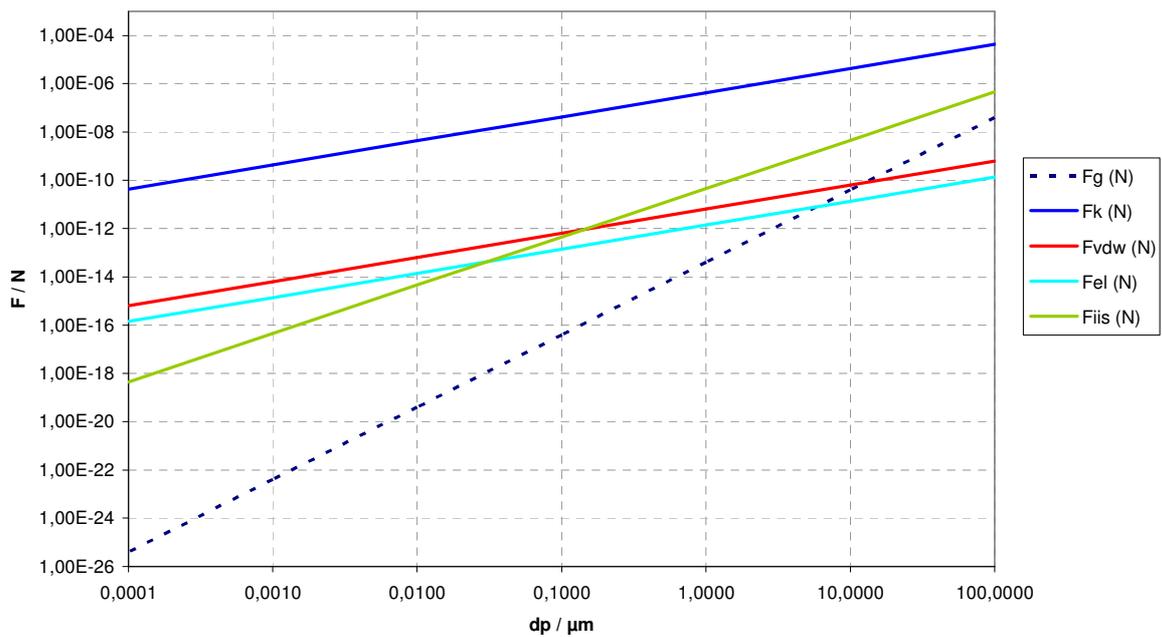


Abb. 3.4.6: Haftkraft  $F$  als Funktion des Partikeldurchmessers  $d_p$ , Modell Kugel-Platte,  $a_0 = 500 \text{ \AA}$

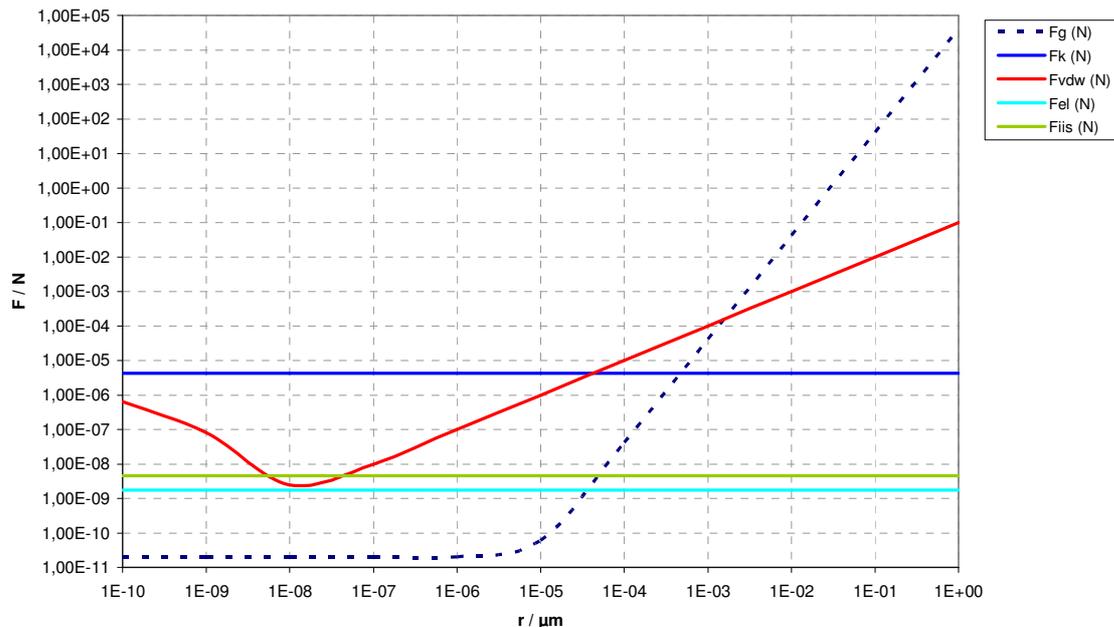


Abb. 3.4.7: Haftkraft  $F$  als Funktion der Rauheitslänge  $r$ , Modell Kugel-Platte,  $a_0 = 4 \text{ \AA}$

#### Partikelanhaftung im realen System

Um ein System weitestgehend abzureinigen, sollte durch die Reinigungsprozedur die maximal für ein System berechnete Haftkraft überwunden werden. In der Realität sind keine ideal-glatte Systeme anzutreffen. Reale Oberflächen weisen, auch wenn sie makroskopisch als glatt bezeichnet werden können, inhomogene Rauheitsverteilungen sowohl auf Seiten der Partikel als auch auf Seite der zu reinigenden Oberfläche auf. Daraus resultieren lokal unterschiedliche Anzahldichten für Kontaktpunkte sowie unterschiedliche räumliche Abstände zwischen Partikeln und Oberflächen. Eine exakte Beschreibung der Haftwirkung realer Partikel auf Oberflächen ist daher in der Praxis nicht möglich. Nach Beobachtungen ist ein reales System eher über eine breite Haftkraftverteilung als über eine singuläre, system-spezifische Kenngröße zu beschreiben (GÖTZINGER & PEUKERT, 2003). Die Haftkraftverteilung auf fein geschliffenem Edelstahl entspricht demnach eher einer logarithmischen Normalverteilung, welche u.a. die unterschiedlichen Orientierungen der Kristallite an den Oberflächen und daraus resultierende inhomogene Verteilung der Oberflächenenergie berücksichtigt (GÖTZINGER & PEUKERT, 2003).

#### 3.4.4. Haften und Erstarren des aufgetragenen Gelatinefilms

##### Oberflächenanhaftung des Sols

Aufgrund der geringen effektiven Reichweite der relevanten Haftkräfte (van-der-Waals-Kraft und der Wasserstoffbrückenbindungen) unterhalb eines Nanometers ist eine gute Benetzung der zu reinigenden Oberflächen mit den Beschichtungsstoffen für die Effektivität des Beschichtungsverfahrens essentiell (GOLDSCHMIDT & STREITBERGER, 2002). Dieses kann über die konzentrationsabhängige Viskosität und Oberflächenspannung des Fluids bzw. die Oberflächenenergie der Werkstoffe beschrieben werden. Gemäß der Young-Gleichung benetzt das aufgetragene Sol dann die Fläche, wenn die Oberflächenspannung des Oberflächenmaterials (Edelstahl, Partikelmaterial) größer ist als die des aufgetragenen Sols. Grundsätzlich ermöglicht der Sol-Gel-Übergang der Gelatine eine sehr schnelle Haftung an den Wänden ohne eigentlichen Trockenvorgang (HÄCKER 2008). Bis zum Einsetzen der Gelierung muss die Viskosität des Fluids allerdings ausreichend klein sein, um in vorhandene Poren und Kanten zu penetrieren sowie Partikel benetzend zu umfließen. Zusätze von Zucker reduzieren ebenfalls die Haftungseigenschaften auf Oberflächen (AiF-FORSCHUNGSBERICHT 99 ZN/2, 2006).

### *Elektrostatische Doppelschicht bei Wechselwirkungen im wässrigen System*

Aufgrund der Polarität von Fluidmolekülen oder der Dissoziation von Oberflächenmolekülen treten an festen Oberflächen mit Kontakt zu wässrigen Umgebungen Oberflächenladungseffekte auf. Van-der-Waals-Kräfte führen zur Bildung einer monomolekularen Schicht von, der Material-Oberflächenladung entgegengesetzt geladenen, fest gebundene Fluidionen (VISSER, 1995). Negative Ionen weisen in wässriger Lösung meist eine weniger stark ausgeprägte Hydrathülle auf als positive Ionen. Sie lassen sich daher leichter per van-der-Waals-Kraft an Oberflächen binden (RIPPBERGER, 2008). An diese sog. innere Helmholtzschicht schließt sich eine mit der Entfernung in Konzentration abnehmende Schicht an, die so genannte äußere Helmholtzschicht, die durch van-der-Waals- und elektrostatische Kräfte ebenfalls fest gebunden und deren Ladungsrichtung identisch zur Oberflächenladung ist. Die Ionendichte ist in dieser Schicht aufgrund des größeren Abstandes und der vorhandenen Hydrathüllen allerdings geringer. Damit zeigt sich nach Außen das resultierende Potential der inneren Schichten. Die an diese beiden Monolagen anschließende Schicht wird als diffuse Doppelschicht bezeichnet, welche der Brownschen Molekularbewegungen unterliegt und durch die sich bewegenden Ionen in die Fluidphase hineinragt. Der Potentialverlauf innerhalb der fest gebundenen Schichten ist linear nach außen abfallend, in der freien Schicht fällt das Potential mit dem Abstand exponentiell. Bei gut leitenden Fluiden zeigt sich entfernungsabhängig eine raschere Potentialabnahme als bei einem schlechter leitenden Fluid. Als Zetapotential wird das Potential zwischen der gebundenen und der diffusen, freien Fluidphase bezeichnet. Am so genannten isoelektrischen Punkt liegt ein Null-Potential vor. Partikel mit ungleich geladenen Schichten ziehen einander an und gleichgeladene stoßen sich ab. Zur mathematischen Beschreibung der Schichten werden unterschiedliche Modelle diskutiert (LECHTENFELD, 2001).

Mittels der DLVO-Theorie können die resultierenden Kräfte bei Annäherung zweier Doppelschichten berechnet werden. Einflussfaktoren sind

- 1) das Oberflächenpotential des Substrats
- 2) das Oberflächenpotential des Partikelmaterials
- 3) die Dielektrizitätskonstante des Mediums und die reziproke Dicke der Doppelschicht

Letztere wird aus der Ionenkonzentration und Valenzelektronenzahl der Lösung, der absoluten Temperatur und aus physikalischen Konstanten berechnet (VISSER, 1995).

Gelatine weist als hydrolisiertes Strukturkollagen wie andere Eiweiße Amino- und Carboxylgruppen auf. Letztere nehmen leicht ein Proton auf und erhalten dadurch eine positive Ladung, erstgenannte laden sich mit der Abspaltung eines Protons negativ auf. Daraus resultiert amphoterer Charakter des Moleküls als Elektrolyt, welches für die Gelatinearten nach Herstellungsprozess verschieden sein kann. In diesem Zusammenhang ist der isoelektrische Punkt (IEP) von Gelatine von Bedeutung, an dem eine neutrale Gesamtladung der Gelatine vorliegt. Bei Gelatine vom Typ A (z.B. Schweineschwartengelatine) liegt dieser zwischen pH 8,0 und 9,0 und bei alkalisch aufgeschlossener Gelatine vom Typ B etwa bei pH 5,0 (KOLBE, 2001). Die Gelatinemoleküle sind oberhalb ihres IEP negativ, unterhalb des IEP positiv geladen (SCHRIEBER & GARERIS, 2007). Nach VISSER (1995) stellen auf Grundlage der Lewis-Säure-Base-Theorie definierte Kräfte die treibende Kraft für hydrophobe Abstoßung oder hydrophile Annäherung von Proteinen in wässrigen Systemen dar. Die materialspezifischen Unterschiede sind damit rechnerisch gegeben, konnten allerdings im Verlaufe der Untersuchungen nicht eindeutig identifiziert werden.

### *Filmanhaftung im realen System*

Die Anwendung der neuen Reinigungsmethode ist innerhalb zylindrischer, aus Edelstahl gefertigter Apparate mit vorhandenen Einbauten vorgesehen. Entsprechend der anzutreffenden Oberflächen muss eine Reinigung von waagerechten Flächen sowie horizontalen und unterhalb überhängender Oberflächen auch bei vorhandenen Hinterschneidungen möglich sein. Während die Beschichtung waagerechter Flächen problemlos möglich ist (AiF-FORSCHUNGSBERICHT 99 ZN/2, 2006), ist das Auftragen der Gelschicht auf überhängenden und senkrechten Oberflächen und damit der dort mögliche Reinigungserfolg maßgeblich durch

Abtropfen bzw. Abfließen des Materials im Schwerfeld beeinflusst. In einem abgeschlossenen Vorhaben von IUTA und DIL (AiF-FORSCHUNGSBERICHT 99 ZN/2, 2006) wurden bereits verschiedenste Geometrien behandelt, insbesondere strukturierte, faserige Oberflächen, an denen das Penetrationsverhalten des Gels in die Materialstrukturen untersucht wurde. Im hier beschriebenen Vorhaben sind jedoch eher glatte Metalloberflächen zu behandeln, so dass die in dem genannten Zusammenhang gewonnenen Betriebserfahrungen nur eingeschränkt übertragen werden können. Das in der Gelatine enthaltene Einweiß Glutin ist maßgeblich für die Hafteigenschaften von Gelatine verantwortlich (HÄCKER, 2008). Die Konzentration im Produkt unterliegt jedoch produktionsbedingten Schwankungen.

Im Bereich von Kanten beeinflusst die Oberflächenspannung des Sols die Filmdicke maßgeblich aufgrund des schwerkraftbedingten Zusammenziehens und der Kohäsionskraft des Gels. Ideale Voraussetzung für eine per Sprühhvorrichtung aufgetragene Beschichtungsmasse wäre in diesem Zusammenhang thixotropes oder strukturviskoses Verhalten, da dann bei hohem Druck innerhalb der Düse eine Abnahme der Viskosität auftritt, gleichzeitig das aufgetragene Material beim demgegenüber geringeren Umgebungsdruck aber nur eine geringe Fließneigung besitzt. Wie in Abschnitt 4.3.2. (Fließverhalten der Gelatinelösungen) dargestellt, kann die Gelatine im untersuchten Bereich als eher Newtonsch charakterisiert werden, so dass die Filmbildung im Wesentlichen konzentrations- und temperaturabhängig erfolgt.

Beim Einsatz von Gelmateriale mit sehr hoher Oberflächenspannung kann die Einbindung des allergenen Partikelmaterials erschwert sein, da ggf. keine Benetzung kleiner Partikel stattfindet und somit keine für eine Ablösung ausreichende adhäsive Kraftwirkung erzielt werden kann. Die Haftkräfte zwischen Gelmateriale und zu entfernenden Partikeln müssen entsprechend größer sein als die Affinität der Partikel zur Apparateoberfläche.

#### *Erstarrung des Sols zum Gelfilm*

Die Verfestigung des aufgetragenen Films setzt ein durch

- a) Vernetzungsprozesse der Gelatine
- b) Viskositätsänderung aufgrund der Abkühlung
- c) Verdunsten des Lösemittels (Wasser).

Es werden verschiedene Modelle der Erstarrungskinetik diskutiert (KOLBE, 2001, LECHTENFELD, 2001). Vorrangig ist der Prozess der Vernetzung für die Filmbildung bedeutsam. Bei hohen Temperaturen sind die Polypeptidketten im Sol mehr oder weniger frei beweglich. Bei Absinken der Temperatur findet zum Einen eine Vernetzung der Ketten zu einer raumnetzartigen Struktur statt, zum Anderen werden Wassermoleküle in diese eingebunden (Hydratation). Da die Atmosphäre der Arbeitsumgebung nur in den seltensten Fällen Wasserdampf gesättigt ist, gehen Wasseranteile entsprechend des vorherrschenden Partialdrucks in die Atmosphäre über. Dieser Trocknungsverlust innerhalb der ersten Minuten nach Auftragen stellt aber nicht den wesentlichen Faktor der Gelbildung aus dem Sol dar, sondern die zunehmende Vernetzung der Molekülketten. Bei KOLBE (2001) werden mehrere Ansätze diskutiert, nach denen die strukturbildenden Prozesse der Gelierung beschrieben werden können. Nach ROOSEN (1991) erfolgt eine Stabilisierung der räumlichen Struktur durch hydrophobe Bindungen zwischen den unpolaren Seitenketten der Polypeptide, elektrostatische Anziehung oder van-der-Waals-Kräfte. Nach KEENAN (1994) bilden sich helixartige Strukturbereiche aus, ähnlich der Struktur im ursprünglichen Kollagen, und daran anschließend kristalline Bereiche. Diese Struktur wird durch Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den helikalen Bereichen stabilisiert.

Bei Gelatine zeigt sich eine starke Temperaturabhängigkeit des Verlaufverhaltens in Nähe des Gelpunktes. Findet der Auftrag in kalter Umgebung statt bzw. wird warmes Sol auf gut wärmeleitende Körper aufgetragen, setzt eine Gelierung in kürzester Zeit nach dem Auftragen ein. Von großem Vorteil ist daher ein Auftragen des Gels bei einer Temperatur möglichst nahe oberhalb des Gelierpunktes, da somit ein hochviskoses Sol vorliegt, und dadurch eine rasche Gelierung als auch geringe Neigung zum Verlaufen gewährleistet wird. Somit können die Vernetzung der Ketten und die Gelbildung unmittelbar nach dem Auftragen einsetzen.

In der Literatur finden sich für Beschichtungsverfahren Hinweise auf den großen Einfluss verfahrensspezifischer Kenngrößen wie Schichtdicke und Tropfendurchmesser auf die Struktur frischer Filme (GOLDSCHMIDT & STREITBERGER, 2002). Bei Zweistoffsystemen bildet sich eine eher poröse, weiße Struktur mit Lufteinschlüssen aus, wohingegen die Zerstäubung per Airless-Verfahren eher zu einer gelblich-klaaren, weniger Lufteinschlüsse enthaltenden Gelstruktur führt. Obwohl verschiedenste Ansätze zur Netzwerkbildung und seiner Einflüsse vorliegen (KOLBE, 2001, LECHTENFELD, 2001), konnte noch kein zuverlässiges Modell zur Beschreibung der Kinetik der Netzwerkbildung entwickelt werden.

### **3.4.5. Entfernen des aufgetragenen Gelatinefilms und der immobilisierten Partikel**

Im Verlaufe von Gelier- und Trocknungsprozess erstarrt das Gel zu einem festen, zuerst elastischen, dann glasartigen Film. Die Viskosität des Films ist temperatur- und zeitabhängig. Untersuchungen von TAKANA & UTSUMI (1963) mit 10 bis 40%igen Gelatinelösungen bestätigen die Ergebnisse der eigenen Untersuchungen, wonach eine hochkonzentrierte Gelatine (20% und 30%) in der Nähe des Gelpunktes einen steileren Anstieg der Viskosität und des dynamischen Moduls  $G$  aufweist. Zusätzlich beschreiben die Autoren einen überproportional starken Anstieg der Kenngrößen während der ersten 20 Minuten des Trocknungsvorganges, der sich nachfolgend abschwächt. Eigene experimentelle Erfahrungen zeigten, dass eine Grenzkonzentration für Gelatinelösungen existiert, unterhalb derer die Filme schnell zerreißen. Schon nach relativ kurzer Zeit (ca. 15 min) lag ein elastischer Film vor, welcher bei Schichtdicken oberhalb etwa 2 mm ohne zu zerbrechen oder zu zerreißen abzulösen war. Die Ablösung konnte manuell oder mit mechanischen Hilfsgeräten erfolgen. Grundsätzlich war der manuelle Abzug eines elastischen, zusammenhängenden Films, vergleichbar dem Abziehen eines Klebestreifens, dem Entfernen per mechanischem Gerät vorzuziehen, da eine sensible Reaktion auf die Filmqualität möglich war und damit höhere Arbeitsgeschwindigkeiten erzielt werden konnten, soweit keine Anbackungen auftraten. Ein vollständig getrockneter und erstarrter Film kann sich leicht oder sogar selbstständig ablösen. Da der Reinigungsaufwand mit zunehmender Größe der stückig abziehbaren Flächen sinkt, wurden bei der Methodenentwicklung möglichst große abzulösende Filmabschnitte angestrebt.

Festigkeit und Elastizität der sich ausbildenden Filmstruktur sind maßgebliche Parameter für die manuelle Abziehbarkeit des jeweiligen Gels. Die Gelstruktur muss in der Lage sein, entsprechend manuell aufgebrachte Kräfte als Längskräfte in den anhaftenden Film einzuleiten, ohne dabei lokale Spannungsspitzen hervorzurufen, die zur Rissbildung führen. Risse können während des Filmabziehens bevorzugt aufgrund von elastisch bedingter, lokaler Materialeinschnürung und Querschnittsabnahme, Strukturdefekten im homogenen Gelkörper und starken lokalen Adhäsionskräften der Fimmatrix zur Oberfläche hervorgerufen werden. Die Stabilität der sich ausbildenden Filme konnte aufgrund der Filmstärke, -elastizität und -struktur qualitativ beurteilt werden. Um negative Effekte zu vermeiden, wurde daher zum Einen eine weitgehend gleichmäßige Filmstärke und zum Anderen die Ausbildung einer homogenen Filmstruktur über die gesamte aufgetragene Gelmenge angestrebt. Ein umfangreiches Verlaufen des aufgetragenen Films sowie rasches Antrocknen kleinerer Tropfen war in diesem Zusammenhang eher von Nachteil für den erfolgreichen Einsatz des Reinigungsverfahrens.

Partikel können von Oberflächen entfernt werden, indem die vorherrschenden Haftkräfte reduziert oder eine weitere, Kraft mit ablösender Wirkung aufgeprägt wird. Letzteres geschieht beim Ablösen des Films durch die ausgeprägte Zugkraft über die kohäsive Kraft der Filmoleküle untereinander und Adhäsion der Partikel zu Gelfilm. Die Wirksamkeit der Zugabe eines Fluids zeigt sich für die van-der-Waals-Kraft in der Reduzierung der Lifshitz-van-der-Waals-Haftkonstanten des ternären gegenüber dem binären System (vgl. Tabellen 3.4.5a bis 3.4.5c). Daher leistet die gute Benetzung der Partikel-Oberfläche und die Gelbildung aus dem Fluid einen wesentlichen Beitrag zur Partikelablösung.

### 3.4.6. Auftragungs- und Zerstäubungsuntersuchungen mit Gelatinelösungen

#### 3.4.6.1. Ansetzen der Gelatinlösungen

Die Gelatinelösung wurde gemäß der in nachfolgender Tabelle 3.4.7 beispielhaft dargestellten Vorgehensweise angesetzt. Der Quellvorgang fand bei Raumtemperatur statt, der Lösungsprozess erfolgte im Wasserbad bei etwa 60 °C (max. 80 °C). Während des Quellens konnte ganz, während des Lösungsvorganges weitgehend auf Rührprozesse verzichtet werden. Austauschvorgänge fanden während des Lösens thermisch kontrolliert aufgrund von Diffusions- und Strömungsprozessen innerhalb des Behältnisses statt. Die Aufbewahrung von gelöstem Gelatinesol bis zur Verarbeitung erfolgte im Wärmeschrank. Durch den Verzicht auf die direkte elektrische Beheizung der Gelatine wurde die Gefahr der lokalen Überhitzung und strukturellen Veränderung der Gelatine vermieden. Es waren lediglich wenige, manuelle Rührvorgänge erforderlich. Die Gelatinelösung stellte sich bei dieser praxisbewährten Vorgehensweise nach wenigen Stunden als homogene, klare Phase dar.

Tab. 3.4.7: Rezeptur zum Ansatz von Gelatinelösung für Sprühuntersuchungen (z.B. Ansatz von 1 L 20%iger Gelatine)

Einwaage	- Einwiegen von 200 g Gelatine - Auffüllen mit Wasser auf 1 L
Quellen	Quellen lassen, bis eine weiße geleeartige Masse vorliegt, typischerweise 1 h (ohne zu heizen oder zu rühren)
Lösung	- Erwärmen im Wasserbad, max. 60 °C, nach Möglichkeit ohne zu rühren bzw. durch nur leichtes Rühren, um Schaumbildung zu vermeiden - Zugabe von Additiven (wenn für Rezeptur erforderlich) - Zugabe von 10 mL Konservierungsmittel (2-Phenoxy-Ethanol), nur wenn das Material wieder verwendet werden soll bzw. über mehrere Tage stehen bleibt - nach vollständiger Auflösung: Abschöpfen des Schaums, Umfüllen der Gelatine in das Sprühgerät
Dichte, Lösung	Lösung: ca. 1,08 g/mL (30 °C)

Laut Literaturangaben sinkt die Gelbildungstemperatur mit steigendem Wassergehalt, wohingegen die Bildungsgeschwindigkeit zunimmt. Dies liegt in der Tatsache begründet, dass die Gelatinemoleküle zur Gelierung ein durch Wassermoleküle stabilisiertes Netz ausbilden müssen. Dies ist eher gegeben, wenn die Gelatine beweglicher ist und nicht durch andere Gelatinemoleküle bei der Strukturausbildung behindert wird (SCHRIEBER & GARERIS, 2007). Wird ein Sol längere Zeit einer höheren Temperatur ausgesetzt, nimmt die Gelkraft ab (vgl. Tabelle 3.4.8). Sie beträgt beispielsweise noch 98% nach 2 h bei 60 °C (SCHRIEBER & GARERIS, 2007). Temperaturen oberhalb 100 °C, wie sie z.B. beim Autoklavieren auftreten, sollten vermieden werden, da die Gelkraft dadurch deutlich reduziert wird. SCHRIEBER & GARERIS geben Temperaturbedingungen an, die zu einem mehr als 10%igen Verlust der Gelkraft führen (vgl. Tabelle 3.4.8). Stark saure oder alkalische Bedingungen führen ebenfalls zu einer Reduzierung der maximalen Gelfestigkeit.

Tab. 3.4.8: Temperatur-Haltedauer (ca.-Angaben), oberhalb der eine mehr als 10%ige Abnahme der Gelfestigkeit zu erwarten ist (nach SCHRIEBER & GARERIS, 2007)

Temperatur (°C)	Zeit (min)
70	>2h
80	20 min
90	2 min
100	20 sec
110	12 sec
120	6 sec
130	5 sec

Durch die Verwendung von frisch angesetzten Produkten konnte der Einfluss von Alterungseffekten der Gelatine auf die Versuchsergebnisse weitgehend ausgeschlossen werden. Über

einige Stunden konnte das Sol ohne Einbußen der Gelfestigkeit bei Temperaturen oberhalb des Gelierpunktes aufbewahrt werden.

### **3.4.6.2. Randbedingungen der experimentellen Untersuchungen**

#### *Oberflächencharakteristik*

Grundsätzliche Anforderungen an Sprühuntersuchungen leiten sich aus den bei der Produktion typischerweise anzutreffenden Apparaten und Einsatzbedingungen ab:

- Einsatz in zylindrischen Körpern, Öffnungen entlang des Zylindermantels von Mischapparaten
- Arbeitsflächen senkrecht und waagrecht, hinterschnitten
- Abzureinigen sind ebenfalls Einbauten im Arbeitsraum
- Werkstoffoberfläche: Edelstahl, Bsp. Werkstoff-Nr. 1.4301, 240er Feinschliff, Mittelrauhwert  $R_a=1,6 \mu\text{m}$
- Arbeitsraum Umgebungstemperatur ca. 10 – 25 °C
- Untersuchung von Rinderspalt- und Schweineschwartengelatine
- Verwendung von Systemen mit temperierbaren Vorratsgefäßen und temperierbarem Sprühgerät bis max. einige 10 L
- Begrenzung des Druckniveaus für Druckluftversorgung des eingesetzten Gerätes auf betriebliche Druckluftnetze (< 6 bar)

Bei den in der Lebensmittelherstellung eingesetzten Apparaten kann zur Vermeidung von Kontaminationen und besserer Reinigungsmöglichkeit vorausgesetzt werden, dass vorhandene Einbauten bereits weitgehend ohne extreme 90°-Kanten gefertigt und Schweißnähte geglättet ausgeführt sind. Hinsichtlich der Oberflächenrauigkeit zeigt die Praxis jedoch, dass bei länger im Betrieb befindlichen Mischapparaten aufgrund der kontinuierlichen mechanischen Beanspruchung die tatsächlich vorhandene technische Oberflächenrauigkeit größer als im Einbautenzustand ist und insbesondere einzelne größere Unebenheiten bzw. Riefen anzutreffen sind. Aus diesem Grund wurden die verwendeten Edelstahlbleche im technisch rauhen Zustand untersucht.

#### *Versuchsstand*

Für die Untersuchungen standen Edelstahloberflächen in verschiedenen Geometrien zur Verfügung. Erste Untersuchungen wurden mit einem konisch zulaufenden Edelstahlgefäß mit flachem, ca. 12 cm durchmessenden Boden und einem Fassungsvermögen von 2 L durchgeführt.

Für die Parameterstudien wurde ein 1 m x 2 m großes Edelstahlblech mit einer Dicke von 1,0 mm genutzt (Werkstoff-Nr. 1.4301, 240er Feinschliff, Mittelrauhwert  $R_a=1,6 \mu\text{m}$ ). Dieses Blech konnte in Form eines, an den gegenüberliegenden Seiten mittels Gewindestangen ca. 1 m auseinander stehenden, gewölbten Zylindersegmentes gebogen werden, um so überhängende Flächen simulieren zu können (vgl. Abbildung 3.4.9). Im abgewickelten, ebenen Zustand wird die Fläche zur Durchführung von vergleichenden Parameterstudien bei variierten Auftragbedingungen verwendet. Hierzu waren Testfelder der Abmessung 40 cm x 80 cm abgeklebt, welche für einige Untersuchungen halbiert wurden (40 x 38 cm).

Weiterhin standen mehrere um 90° gewinkelte Edelstahlbleche zur Verfügung mit einer Breite von 33 cm und Längen von 50 bzw. 28 cm (vgl. Abbildung 3.4.8).

Auf jeweils einer der Flächen war zusätzlich ein 90°-Winkelblech zur Simulation von „Einbauten“ aufgeschweißt, Breite 3 cm, Kontaktflächen-Länge 4 cm, Länge der freistehenden Fläche: 7 cm (vgl. Abbildung 3.4.8).

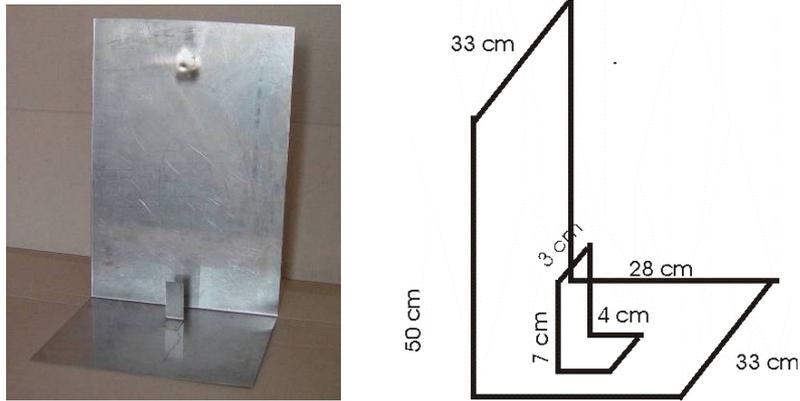


Abb. 3.4.8: Geometrie Testfläche, Edelstahl (Winkelblech)



Abb. 3.4.9: Geometrie Testfläche, Zylindermantel-Teilfläche (Breite: 1 m, Länge: 2 m)

#### *Versuchsparameter*

Mittels Parameterstudien erfolgte die Bewertung der erzeugten Gelfilme unter Variation der Auftragbedingungen. Die Druckluftversorgung erfolgte über das institutsinterne Hausnetz, der eingestellte Vordruck betrug 2,5 bar. Das jeweils am Versuchstag frisch angesetzte, zu untersuchende Hydrokolloid wurde per Wasserbad auf  $50\text{ °C} \pm 4\text{ °C}$  temperiert und unmittelbar vor Durchführung der Untersuchung in die Sprühvorrichtung umgefüllt. Weitere Angaben zum Sprühgerät finden sich im Abschnitt 4.4 (Optimierung der Aufbringung der Reinigungslösung).

Während eines Sprühvorganges auf Teilflächen eines Bleches wurden die jeweils anderen, aktuell nicht bearbeiteten Teilflächen abgedeckt, um die Entstehung von Overspray zu vermeiden. Gemäß der Ergebnisse aus Vorversuchen erfolgte die Materialablösung nach einer Wartezeit von 30 Minuten.

Die Sprühversuche wurden unter Variation der folgenden Parameter durchgeführt:

- Gelatinetyp (Rinderspalt- und Schweineschwartengelatine)
- Gelatinekonzentration (15 – 30%)
- Schichtdicke / aufgetragene Menge
- Umgebungstemperatur
- Luftdruck sowie Materialdruck zwischen 0,4 und 1 bar
- Optionaler Zusatz von Emulgatoren oder Weichmachern
- Untersuchung der Zeitdauer der Reinigung
- Partikeleinbindung

Als relevante Größen sind für eine Auswertung zu erfassen:

- Sprühverhalten (Laufeigenschaften, Filmdichte, Reißfestigkeit), Sprühbedingungen (Gas- und Fluiddruck; Fluidtemperatur im Vorratsgefäß, in Leitungen und in der Zerstäubungseinheit)
- Gel-Volumenstrom bei der Zerstäubung
- Dichte der Gelatinelösung (Sol)
- Dichte des aufgesprühten Gelfilms
- Maximale Schichtdicke
- Gleichmäßigkeit der Beschichtung
- Textur des Gelfilms
- Ablösbarkeit des Gelatinefilms (qualitative Beurteilung von Rückständen)
- Partikeleinbindevermögen (Nahrungsmittelkomponenten, Testpartikel)
- Umgebungstemperatur, Oberflächentemperatur

### 3.5. Beurteilung des Reinigungseffektes

#### *Charakterisierung der Partikelimmobilisierung*

Zur Bewertung des Reinigungseffektes wurde zunächst untersucht, mit welcher Methode die im Gelatinefilm immobilisierten Feststoffpartikel im relevanten Bereich  $<20$  mg am zuverlässigsten quantifiziert werden können. Zur Entwicklung dieser Methode wurde Weizenmehl als pulverförmige Feststoffkomponente eingesetzt. Für die quantitative Auswertung wurden sowohl eine Anfärbung des Weizenmehls mit anschließender photometrischer Detektion des im Gelatinefilm eingebundenen Farbstoffs als auch der direkte Nachweis derartiger Kleinmengen an Weizenmehl im Gelatinefilm mittels ELISA-Nachweismethode geprüft.

Es zeigte sich, dass das Anfärben des Weizenmehls durch Aufsprühen einer wässrigen Farbstofflösung nicht zu einer für die genaue Bestimmung des Weizenmehlanteils im relevanten Bereich erforderlichen homogenen Verteilung des Farbstoffs im Weizenmehl führte. Entsprechend ergaben sich sehr große Schwankungen der gemessenen Extinktion bei vergleichbaren Weizenmehlmengen im Bereich von 3 bis 15 mg. Aufgrund der sehr inhomogenen Farbstoffverteilung wurde die Optimierung der relativ einfachen photometrischen Methode zur Quantifizierung der im Gelatinefilm eingebundenen Pulverpartikel nicht weiter verfolgt.

Dementsprechend wurde untersucht, ob die Quantifizierung der im Gelatinefilm immobilisierten Partikel über die direkte Bestimmung des Weizenmehlgehalts im Gelatinefilm mittels ELISA-Test (Abschnitt 3.2.3) erfolgen kann. Die auf diese Weise ermittelten Anteile an immobilisiertem Weizenmehl schwankten bei vergleichbaren aufgetragenen Mengen sehr stark. Auffällig war, dass auch unrealistische Werte, bei denen die Masse an immobilisiertem Weizenmehl höher war, als die Masse des aufgetragenen Weizenmehls, gemessen wurden. Die Schwankungen und die teilweise unrealistischen Werte waren auf die für den ELISA-Test notwendige Zerkleinerung der Probenmatrix zurückzuführen. Die Zerkleinerung des getrockneten Gelatinefilms führte zu einer elektrostatischen Aufladung der Gelatinepartikel, so dass die Überführung der zerkleinerten Probe aus der Labormühle in einen Probenbehälter nicht reproduzierbar war.

Basierend auf diesen Erkenntnissen musste die Methode zur Beurteilung des Reinigungseffektes derart modifiziert werden, dass nicht der Anteil an eingebundenen Pulverpartikeln quantifiziert sondern mögliche Pulverrückstände auf den gereinigten Oberflächen mittels Wischtest bestimmt wurden. Diese Methode wird nachfolgend beschrieben.

#### *Ermittlung der Wiederfindung*

Zunächst wurde die Wiederfindungsrate für den Wischtest bei verschiedenen Pulvern ermittelt. Dazu wurden jeweils definierte Mengen (0,2 mg – 8,0 mg) von Weizenmehl, Sprühmagermilchpulver und Hühnervolleipulver auf glatten Edelstahloberflächen ( $l = 10$  cm,  $b = 5$  cm) mit Hilfe eines Wägebepapiers manuell verteilt. Mit Hilfe von Tupfern, die mit einem geeigneten Lösungsmittel (Ethanol,  $H_2O$ ) getränkt waren, wurden die Pulverpartikel von den Edelstahloberflächen abgewischt. Anschließend wurden die an den Tupfern anhaftenden Partikel in einer definierten Menge des entsprechenden Lösungsmittel gelöst. Mittels ELISA Nachweisverfahren wurde die Konzentration des jeweiligen allergieauslösenden Proteins im Lösungsmittel bestimmt. Aus den Werten der Proteinkonzentration im Lösungsmittel und der Masse an auf die Edelstahloberfläche aufgebrachtem Pulver wurde jeweils eine Kalibriergerade berechnet, mit deren Hilfe die Pulverrückstände auf den gereinigten Flächen quantifiziert werden konnten.

#### *Bewertung des Reinigungseffektes*

Zur Beurteilung des Reinigungseffektes wurden gewinkelte Edelstahlbleche ( $l = 5$  cm,  $b = 4$  cm) zunächst mit verschiedenen Pulvern (Weizenmehl, Sprühmagermilchpulver, Hühnervolleipulver) verunreinigt (Abbildung 3.5.1).

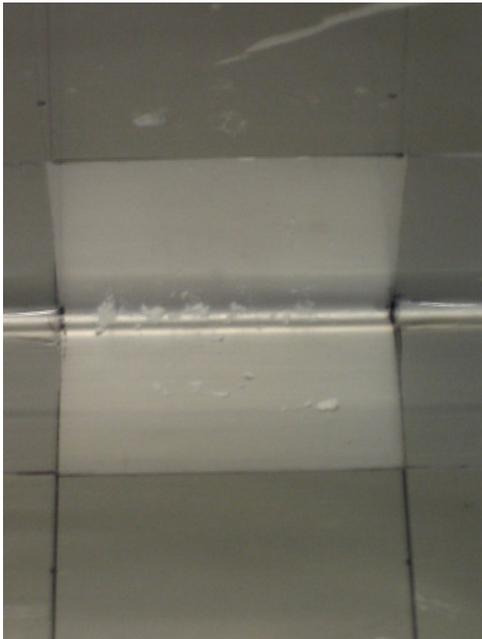


Abb. 3.5.1: Verunreinigtes, gewinkeltes Edelstahlblech für die Reinigungsversuche im Labormaßstab

Dazu wurden jeweils definierte Mengen der Pulver auf die Oberflächen der Bleche aufgebracht und manuell mit Hilfe des Wägebapieres verteilt. Anschließend wurden die Flächen gereinigt. Analog zur Ermittlung der Wiederfindung, wurden die gereinigten Flächen mit Tupfern beprobt und die Masse der an den Tupfern anhaftenden Partikel quantifiziert.

Die Bewertung des Reinigungseffektes erfolgte anhand der Anzahl an Edelstahloberflächen, auf denen noch Pulverrückstände nachgewiesen werden konnten.

Als weitere Kenngröße zur Bewertung des Reinigungseffektes diente die Reinigungseffizienz (RE). Zu ihrer Berechnung wurde die tatsächliche Masse des Pulverrückstands nach Extraktion der allergieauslösenden Pulverpartikel vom Tupper aus der ermittelten Proteinkonzentration im Lösungsmittel und der Kalibriergeraden errechnet. Die Reinigungseffizienz beschreibt den Anteil an abgereinigten Pulverpartikeln bezogen auf die Gesamtmenge an aufgetragenen Pulverpartikeln und berechnet sich nach:

$$RE = (m_P - m_{PR}) * 100\% / m_P \quad (3.5.1)$$

mit:

- $m_P$ : Masse des aufgetragenen Pulvers, g
- $m_{PR}$ : Masse des Pulverrückstands, g

#### *Vergleich verschiedener Reinigungsverfahren*

Zunächst wurden verschiedene Reinigungsverfahren hinsichtlich ihrer Reinigungswirkung verglichen. Dazu wurde Weizenmehl (Typ 405) als einfach zu handhabendes Pulver eingesetzt. Die Reinigungsversuche wurden entsprechend der oben beschriebenen Methode zur Bewertung des Reinigungseffektes durchgeführt.

Die Reinigung der gewinkelten Edelstahlbleche erfolgte dabei mit folgenden Verfahren:

- einfaches Abkippen der Verunreinigung durch Senkrechthalten des Edelstahlblechs
- Abblasen der Verunreinigung mit Druckluft (2 bar)
- Abfegen der Verunreinigung mit einem Handfeger
- Immobilisierung der Verunreinigung mit Gelatinelösung (Rinderhautgelatine 20%ig, ohne Emulgatorzusatz). Die Reinigung mit Gelatinelösung wird nachfolgend detailliert beschrieben.

Die Reinigungsversuche wurden jeweils als 4-fach Bestimmung durchgeführt und entsprechend den oben dargestellten Methoden bewertet.

### *Vergleich der Reinigungswirkung verschiedener Gelatinelösungen*

In weiterführenden Untersuchungen wurde für unterschiedliche Pulver (Weizenmehl, Sprühmagermilchpulver und Hühnervolleipulver) die Reinigungswirkung von verschiedenen Gelatinelösungen verglichen. Wie in der vorangegangenen Versuchsreihe wurden definierte Mengen an Pulver auf die gewinkelten Edelstahlbleche aufgebracht und mit Hilfe des Wägebepapiers gleichmäßig verteilt. Mittels Einwegspritze wurden etwa 3 g ( $\pm 0,01$  g) Reinigungslösung auf die verunreinigten Oberflächen aufgetragen. Nach einer Zeit von 30 min wurden die Gelatinefilme von den Edelstahlblechen abgelöst. Die gereinigten Flächen wurden mit Tupfern, die mit geeigneten Lösungsmitteln getränkt waren, abgewischt, um eventuell vorhandene Pulverrückstände aufzunehmen. Die an den Tupfern anhaftenden Pulverpartikel wurden in einer definierten Menge des Lösungsmittels, mit dem der jeweilige Tupfer getränkt war, gelöst. Anschließend wurde die Konzentration der allergieauslösenden Komponente in dem Lösungsmittel mit Hilfe von ELISA Nachweisverfahren bestimmt.

Jeder Reinigungsversuch wurde an 13 gewinkelten Edelstahlblechen durchgeführt. Zur Kontrolle einer möglichen Übertragung der allergieauslösenden Proteine durch die Raumluft wurden zwei Bleche, die nicht verunreinigt wurden, als Nullproben mit einem Tupfer beprobt. Die Bewertung des Reinigungseffekts erfolgte entsprechend der in oben beschriebenen Methoden über die Reinigungseffizienz sowie die Anzahl der Flächen, auf denen Pulverrückstände nachgewiesen werden konnten.

Als zusätzliches Kriterium zur Beurteilung der Eignung der verschiedenen Gelatinelösungen für den Einsatz als Reinigungsmittel diente die Zeit, die benötigt wurde, um einen stabilen Film, der vollständig von der Edelstahloberfläche abgelöst werden konnte, auszubilden.

### 3.6. Reinigungsversuche im Technikumsmaßstab

Die Reinigungsversuche im Technikumsmaßstab wurden an einem für die Herstellung von pulverförmigen Mischungen typischerweise eingesetzten Pflugscharmischer mit integriertem Agglomeratzerstörer (Typ FM 50, Fa. Gebr. Lödige Maschinenbau GmbH, Paderborn) durchgeführt (Abbildung 3.6.1).



Abb. 3.6.1: Pflugscharmischer mit integriertem Agglomeratzerstörer

Zur Beurteilung der Verschleppung allergener Komponenten nach verschiedenen Reinigungen wurde eine eihaltige Pulvermischung (Backmischung mit 25% (w/w) Hühnervolleipulver) eingesetzt, da für den Nachweis von Hühnereiklarprotein keine maskierenden Effekte anderer pulverförmiger Komponenten (z.B. Weizenmehl) bekannt waren. Im Anschluss an die unterschiedlichen Reinigungsverfahren wurde Weizenmehl (Typ 550) im Mischer verarbeitet und anschließend hinsichtlich eventuell vorhandener Eirückstände untersucht.

Die zur Durchführung der Reinigungsversuche benötigten Rohstoffe sowie der für eine vergleichende Reinigung benötigte Reinigungszucker wurden seitens einer am Projektbegleitenden Ausschuss beteiligten Firma zur Verfügung gestellt.

#### *Versuchsdurchführung*

Zunächst wurde der Mischer definiert mit 10 kg ( $\pm 1$  g) der eihaltigen Backmischung befüllt und zur Verarbeitung der Backmischung angeschaltet (Drehzahl Mischerwelle:  $100 \text{ min}^{-1}$ , eingeschalteter Agglomeratzerstörer, Mischzeit: 60 s). Zur Entleerung des Mixers wurde die untere Auslafluke geöffnet.

Nachdem der Mischer entleert war, wurde er mit Hilfe verschiedener Verfahren gereinigt. Dabei war eine Vorreinigung, die das Ausfegen des Mixers mit einem Handfeger beinhaltete, in jedem Fall notwendig, um die nach der Entleerung des Mixers zurückbleibenden Backmischungsreste zu entfernen. Die im Anschluss an das Ausfegen teilweise in Kombination eingesetzten Reinigungsverfahren waren:

- keine weitere Reinigung
- Spülen mit Reinigungszucker
- Reinigung durch Immobilisierung der Pulverrückstände mittels Gelatinelösung
- Aussaugen mit einem handelsüblichen Haushaltsstaubsauger

Für die Reinigung mit Reinigungszucker wurde der Mischer mit etwa 10 kg ( $\pm 0,001$  kg) Reinigungszucker befüllt. Anschließend wurde der Zucker für 5 min mit  $100 \text{ min}^{-1}$  und einge-

schaltetem Agglomeratzerstörer gemischt. Nach der Verarbeitung des Reinigungszuckers wurde der Mischbehälter entleert. Zuckerrückstände wurden mit Hilfe eines Handfegers beseitigt.

Die Reinigung mittels Gelatinelösung erfolgte durch Aufsprühen von etwa 2 kg Gelatinelösung mit der in Abschnitt 4.4.2 detailliert beschriebenen Hochleistungssprühpistole (SATA Jet K3 RP, Fa. SATA GmbH, Kornwestheim). Für alle Reinigungsversuche wurde der Materialdruck im Vorratsgefäß einheitlich auf 0,6 bar eingestellt. Der Druck am Düsenaustritt betrug in allen Versuchen  $0,6 \pm 0,1$  bar. Der Gelatinefilm mit den eingebundenen Pulverpartikeln wurde nach einer Gelierzeitzeit von 15 bis 20 min aus dem Mischer entfernt.

Das Aussaugen des Mixers mit einem Staubsauger war sowohl nach dem Spülen mit Reinigungszucker als auch nach der Reinigung mit Gelatinelösung notwendig, um Rückstände der eingesetzten Reinigungsmaterialien zu entfernen.

Nach der Reinigung wurde der Mischer mit 10 kg ( $\pm 1$  g) Weizenmehl befüllt und das Weizenmehl für 3 min bei einer Drehzahl der Mischerwelle von  $100 \text{ min}^{-1}$  und eingeschaltetem Agglomeratzerstörer gemischt. Durch Öffnen der unteren Auslaufluke wurde der Mischer entleert und der Mischerinhalt in einem Kuststoffsack abgefüllt.

#### *Bewertung der Reinigungswirkung*

An verschiedenen Stellen des Probebehälters wurden aus dem abgefüllten Weizenmehl Proben entnommen, um sie hinsichtlich eventuell vorhandener Eirückstände zu untersuchen. Dabei wurden die Untersuchungen des Weizenmehls zur Beurteilung des Reinigungseffekts als Dreifachbestimmung durchgeführt.

Die Analyse der entnommenen Proben erfolgte am DIL und an der UHH mit den in Abschnitt 3.2. beschriebenen Methoden ELISA-Test bzw. SDS-PAGE gefolgt vom Western-Blotting-Verfahren.

### 3.7. Erprobung alternativer Reinigungslösungen

Seitens des Projektbegleitenden Ausschusses wurde gefordert, dass anstelle der Gelatine auch die Anwendung von Reinigungslösungen auf pflanzlicher Basis mit vergleichbaren Eigenschaften untersucht werden soll.

Als mögliche Alternative zu Gelatine wurde die Anwendung von Agar Agar geprüft, da Agarlösungen ähnliche Eigenschaften wie Gelatinelösungen besitzen. Agar Agar wird aus den Zellwänden von Rotalgen gewonnen und ist als Polysaccharid in der Lage Gele zu bilden.

#### 3.7.1. Herstellung und rheologische Charakterisierung der alternativen Reinigungslösung

Für die Untersuchungen wurde Europäischer Agar (Fa. Becton Dickinson GmbH, Heidelberg) eingesetzt (Tabelle 3.7.1).

Tab. 3.7.1: Produktspezifikationen des Herstellers für den eingesetzten Agar Agar

Aschegehalt	3,6%
pH-Wert	6,5
Gelfestigkeit einer 1,5%igen Lösung	600 g/cm <sup>2</sup>
Gelertemperatur einer 1,5%igen Lösung	35 °C
Schmelzpunkt	88 °C

Zur Charakterisierung der Verarbeitungseigenschaften der Agarlösungen wurden deren Fließigenschaften sowie das Gelierverhalten analog zu den in Abschnitt 3.3 für Gelatine beschriebenen Methoden bestimmt.

#### *Herstellung der alternativen Reinigungslösung*

##### Geräte, Hilfsmittel:

- Waage
- heizbare Magnetührplatte
- Wärmeschrank
- Bechergläser
- Löffel
- entmineralisiertes Wasser

##### Probenvorbereitung:

Zur Herstellung einer wässrigen Agarlösung wird Agar Agar in einem Becherglas vorgelegt. Die entsprechend notwendige Masse an entmineralisiertem Wasser wird zugegeben und die Agarsuspension mit Hilfe einer beheizbaren Magnetührplatte unter Rühren ( $n = 500 \text{ min}^{-1}$ ) auf etwa 100 °C erwärmt. So wird gewährleistet, dass der Agar Agar in der Wasserphase vollständig gelöst ist. Bis zur Durchführung der Untersuchungen wird die Lösung im Wärmeschrank auf 45 °C temperiert.

#### *Rheologische Charakterisierung der alternativen Reinigungslösung*

Die Bestimmung der Fließigenschaften sowie des Gelierverhaltens erfolgte entsprechend den in den Abschnitten 3.3.2 und 3.3.3. für Gelatine beschriebenen Methoden.

#### 3.7.2. Sprühversuche mit der alternativen Reinigungslösung

Zur Beurteilung der Auftragungs-, Haftungs- und Ablöseeigenschaften der Filme aus den alternativen Reinigungslösungen, wurden zunächst im Labormaßstab Versuche zur Aufbringung der Agarlösung und Ablösung des Agarfilms an gewinkelten Edelstahlblechen (5 cm x 4 cm), welche vergleichbar zu den mit Gelatinelösung gemachten Versuchen waren, durchgeführt. Das Verhalten der Agarlösung beim Auftragen sowie beim Ablösen wurde fotografisch dokumentiert.

Ein Sprühversuch wurde im Technikumsmaßstab an dem in Abschnitt 3.6 beschriebenen Pflugscharmischer mit integriertem Agglomeraterstörer durchgeführt. In diesem Versuch

wurden Auftragungseigenschaften, Sprühbild (Haftung des Films an der Behälterwand sowie am Rührorgan) und Ablöseigenschaften einer ausgewählten Agarlösung beurteilt und fotografisch dokumentiert.

## 4. Ergebnisse und Diskussion

### 4.1. Auswertung der Istzustandsanalyse

#### 4.1.1. Auswertung der Unternehmensbefragung

Der an die beteiligten Unternehmen versendete Fragebogen zur Erfassung des Istzustands bezüglich Reinigung und Verschleppung bei der Herstellung von Backmitteln und Backmischungen wurde von vier Projektteilnehmern ausgefüllt und an das DIL zurückgesendet. Beschreibungen der in den Unternehmen *verarbeiteten Rohstoffe und hergestellten Endprodukte* bezüglich vorhandener allergener Komponenten sind in Tabelle 4.1.1 dargestellt.

Tab. 4.1.1: Zusammenstellung der Rohstoffe und Endprodukte der Unternehmen, die den Fragebogen ausgefüllt haben

Unternehmen 1	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 98% aller Rohstoffe enthalten mindestens ein Allergen</li> <li>• nicht auftretende Allergene: Krebstiere, Fisch, Erdnuss, Senf</li> <li>• 840 verschiedene Endprodukte</li> </ul>
Unternehmen 2	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 420 verschiedene Rohstoffe</li> <li>• 272 Rohstoffe ohne Allergen (65%)</li> <li>• 600 verschiedene Endprodukte</li> </ul>
Unternehmen 3	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 600 verschiedene Endprodukte</li> </ul>
Unternehmen 4	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 173 verschiedene Rohstoffe</li> <li>• 3 Rohstoffe ohne Allergen (1,7%)</li> <li>• 1078 verschiedene Endprodukte</li> </ul>

Eine Übersicht über die Situation im Bereich *Produktion* in den befragten Unternehmen ist nachfolgend zusammengefasst:

- Gesamtanzahl verschiedener Anlagen: 19
- Anlagen zur Herstellung von Produkten mit und ohne Allergene: 100%
- Produktwechsel:
 

1 Produktwechsel / Tag:	5 Anlagen (26%)
2 - 3 Produktwechsel / Tag:	4 Anlagen (21%)
5 - 10 Produktwechsel / Tag:	4 Anlagen (21%)
> 10 Produktwechsel / Tag:	3 Anlagen (15%)
- Personaleinsatz:
 

keine Trennung Personal bezüglich der Produkte:	75%
bestimmtes Personal für bestimmte Produkte:	25%

Die Beschreibung der in den betreffenden Unternehmen eingesetzten *Anlagen* ist in Tabelle 4.1.2 zusammengefasst.

Tab. 4.1.2: Zusammenstellung der in der Herstellung von trockenen Pulvermischungen eingesetzten Anlagen

Prozessschritt	Beschreibung der Anlageneinheit
Vorratsbehälter	Außensilo Edelstahl-Trichterwagen (Problemzonen: Verschluss)
Ventile/Weichen	Quetschventile Magnetventile Schiebeweichen Klappweichen pneumatische Weichen Zellradschleusen
Fördern	Saugpneumatik Druckpneumatik Rohrleitungen (Problemzonen: Bögen) Andockstationen (Problemzonen: Flansche)
Mischen	Nautamischer Engelsmann Schubmischer Gericke Mischer (Problemzonen: Mischerteller) Hosokawa Mischer (Problemzonen: Mischerteller) Lödige Vertikalmischer Lödige Pflugscharmischer (Problemzonen: Dichtung, Klappe)
Zwischenlagerung	Schalensilo Silo Edelstahl-Trichterwagen (Problemzonen: Verschluss)
Sieben	Wirbelstromsiebmaschinen Kunststoffsiebe (Problemzonen: Aufbau verschachtelt) Edelstahlsiebe (Problemzonen: Aufbau verschachtelt) Freewitt Granulier-Siebanlage (Problemzonen: Dichtungen) Allgaier Taumelsiebanlage (Problemzonen: feste Rohrförderleitungen)
Agglomerieren	Wirbelschichtgranulator
Abfüllen	Verpackungsanlage Dostromat mit vorgeschalteter Nettowaage Ventilpacker mit vorgeschalteter Nettowaage Big Bag Abfüllstation Kleinverpackungsanlage Ventilsackabfüllanlage Schlauchbeutelabfüllanlage Deltapack 550 (Problemzonen: Anbindung Metalldetektor) Rowema 500 (Problemzonen: Verbindungsmanschetten) Optima 120 (Problemzonen: Anbindung Metalldetektor) Optima 750 (Problemzonen: Anbindung Metalldetektor)

Bezüglich der *Reinigung* wurde von allen Unternehmen angegeben, dass alle Anlagen nach jedem Produktwechsel trocken mit Hilfe von Bürste, Staubsauger oder Reinigungszucker gereinigt werden. Es erfolgt eine optische Kontrolle des Reinigungserfolgs. Zusätzliche Reinigungsmaßnahmen der verschiedenen Unternehmen und eine detaillierte Beschreibung der Vorgehensweise bei der Trockenreinigung sind in Tabelle 4.1.3 dargestellt.

Tab. 4.1.3: Beschreibung der Reinigungsmaßnahmen in den befragten Unternehmen

Unternehmen 1	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Reinigungsdauer: 1 - 2 h, sofortige Wiederaufnahme der Produktion</li> <li>• Verwendung aller Reinigungsutensilien für alle Anlagen</li> <li>• Kontrolle: zusätzlich sensorische Prüfung des Nachfolgeprodukts</li> </ul>
Unternehmen 2	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Reinigungsdauer: 15 min - 3 h, Wiederaufnahme der Produktion nach max. 30 min</li> <li>• Verwendung aller Reinigungsutensilien für alle Anlagen</li> <li>• Kontrolle: zusätzlich sensorische und analytische Kontrolle des Nachfolgeprodukts, SWAB-Test einmal monatlich</li> </ul>
Unternehmen 3	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Reinigungsdauer: 30 min</li> <li>• jede Prozesslinie wird nur mit bestimmten Reinigungsutensilien gereinigt</li> </ul>
Unternehmen 4	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Reinigungsdauer: 15 min, sofortige Wiederaufnahme der Produktion</li> <li>• zusätzlich Nassreinigung zum Wochenende</li> <li>• Reinigungsdauer Nassreinigung: 2 - 8 h, mehrere Stunden bis Wiederaufnahme der Produktion</li> <li>• Kontrolle: zusätzlich analytische Kontrolle des Nachfolgeprodukts, ATP-Messung nach Nassreinigung und bei bestimmten Produkten</li> </ul>

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die am Projekt beteiligten Firmen eine Vielzahl von Produkten mit unterschiedlicher Zusammensetzung herstellen. In fast allen Produkten sind allergene Lebensmittelbestandteile enthalten. Alle Anlagen werden für die Herstellung verschiedener Endprodukte eingesetzt. In der Regel werden die Anlagen bei einem Produktwechsel trocken gereinigt. Der Reinigungserfolg wird optisch und nur teilweise durch analytische oder sensorische Untersuchung des Nachfolgeproduktes kontrolliert. Zusätzliche Reinigungsmaßnahmen erfolgen nur bei einigen Unternehmen nach der Produktion kritischer Produkte oder zu festgelegten Zeitpunkten.

Basierend auf den Ergebnissen der Unternehmensbefragung wurden nach Diskussion in einer Sitzung des Projektbegleitenden Ausschuss folgende Festlegungen für die Konkretisierung der Aufgabenstellung vereinbart:

- Bezüglich der *Inhaltstoffe der Reinigungslösung* sollte zunächst Gelatine als Basis dienen. Nach deren erfolgreicher Anwendung sollte ein Einsatz pflanzlicher Produkte mit vergleichbaren Eigenschaften untersucht werden (ggf. wichtig bei der Produktion von koscheren bzw. Halal-Produkten sowie vor dem Hintergrund der BSE-Problematik).
- Hinsichtlich der *Apparate* zum Test der neuen Reinigungstechnologie sollte zunächst ein Pflugscharmischer, der typischerweise in der Herstellung von pulverförmigen Mischungen eingesetzt wird, gereinigt werden.
- Als zu reinigende *Oberflächen* waren Edelstahloberflächen zu untersuchen. Neben glatten und gewinkelten Oberflächen sollen insbesondere auch Einbauten berücksichtigt werden.
- Zu entfernende *Pulverpartikel* können aufgrund ihrer chemisch-physikalischen Eigenschaften unterschiedliche Oberflächenaffinitäten aufweisen, welche sich auch in ihrem Reinigungsverhalten widerspiegeln. Dementsprechend sollten die ersten Untersuchungen (z.B. Methodenentwicklungen) an eher unkritischen Pulvern wie Weizenmehl durchgeführt werden. Der Hauptteil der Arbeiten zur Adaption der neuen Reinigungstechnologie sollte mit Pulvern durchgeführt werden, die eine stärkere Haftung an den Edelstahloberflächen aufweisen. Dies sind z.B. Milchpulver und Eipulver.

#### 4.1.2. Ergebnisse der Untersuchungen zur Beurteilung der Verschleppung allergener Komponenten bei Produktwechseln

Für die Untersuchungen auf vorhandene allergene Komponenten stellten zwei Unternehmen des Projektbegleitenden Ausschusses fünf verschiedene Muster an Backmischungen zur Verfügung.

Die Beschreibung der Proben sowie der zuvor auf der entsprechenden Anlage produzierten Produkte ist in Tabelle 4.1.4 zusammengefasst.

Tab. 4.1.4: Beschreibung der Muster zur Erfassung des Istzustands bezüglich Verschleppung von Allergenen bei der Herstellung von Backmischungen

Produktbezeichnung	Zutaten	Beschreibung Vorgängerprodukt
Backmischung Classic Muffins	Weizenmehl, Zucker, Weizenstärke, Süßmolkepulver, mod. Stärke, Backpulver (Säuerungsmittel Diphosphate, Backtriebmittel: Na-Carbonat), Aroma, Speisesalz Spuren: Nüsse, Ei	Produktbezeichnung: Nusskuchen Zutaten: Nuss, Gluten Spuren: Milch, Ei, Soja
Schokoladenstücke aus Classic Muffins Backmischung	Zucker, Kakaomasse, Kakaobutter, Emulgator: Lecithine (enthält Soja), Aroma Spuren: Nüsse, Ei	
Backmischung Obstkuchenteig	Weizenmehl, Zucker, Weizenstärke, Säuerungsmittel Diphosphate, Backtriebmittel Natriumhydrogencarbonat, Salz, Aroma Spuren: Nuss, Milch, Ei, Soja	Produktbezeichnung: Eierpfannkuchen Zutaten: Gluten, Ei Spuren: Nuss, Milch, Soja
Backmittel zur Herstellung von Weizenmischbrötchen	Weizenmehl, Roggenmehl, getrockneter Sauerteig, Weizenkleber, Salz, Molkenpulver, Dextrose, Malzmehl (z.T. geröstet), Emulgatoren (E472e, E 322), Quellmehl, Guarkernmehl, Zucker, Enzyme, Ascorbinsäure	Kuchenmischung mit Milchbestandteilen und Volleipulver
Backmischung zur Herstellung von Bio-Weizenkleingebäck	Bio-Weizenkleber, Bio-Zucker, Bio-Weizenmehl, Raps-Lecithin, Bio-Gerstenmalzextrakt, Bio-Weizenstärke, Enzyme, Ascorbinsäure	Brötchenbackmittel mit Milchbestandteilen
Backmischung zur Herstellung von Brot	Weizenkeime, Maisflocken, jodiertes Salz, Roggenmehl, Weizenkleber, Gerstenmalzmehl, Weizenmehl, Stabilisator Guarkernmehl, Emulgator Lecithin, Lactose, Trennmittel Calciumcarbonat, Mehlbehandlungsmittel Ascorbinsäure	Haselnuss Füllmasse 43%ig

Die zur Verfügung gestellten Muster wurden vergleichend am DIL und an der UHH untersucht, um die Gehalte der allergenen Komponenten Ei, Milch (Casein,  $\beta$ -Lactoglobulin) und Haselnuss zu ermitteln.

Die am DIL mit Hilfe von ELISA-Nachweisverfahren ermittelten Ergebnisse sind in den Tabellen 4.1.5 bis 4.1.8 zusammengefasst.

Tab. 4.1.5: Ergebnisse der Untersuchungen an der Backmischung Classic Muffins mittels ELISA

Allergen	Konzentration, ppm				
	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Mittelwert	Standardabw.
Eiklarprotein	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5	
$\beta$ -Lactoglobulin	> 0,2	> 0,2	> 0,2	> 0,2	
Casein	388	352	389	376	21,1
Haselnussprotein	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	

Tab. 4.1.6: Ergebnisse der Untersuchungen an Schokoladestücken aus der Classic Muffins Backmischung mittels ELISA

Allergen	Konzentration, ppm				
	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Mittelwert	Standardabw.
Eiklarprotein	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5	
Casein	12120	11535	11735	11797	297,3
Haselnussprotein	5,0	5,1	4,4	4,8	0,38

Tab. 4.1.7: Ergebnisse der Untersuchungen an der Backmischung Obstkuchenteig mittels ELISA

Allergen	Konzentration, ppm			
	Probe 1	Probe 2	Mittelwert	Standardabw.
Eiklarprotein	623	650	637	19,1
$\beta$ -Lactoglobulin	< 0,2	< 0,2	< 0,2	
Casein	1,75	2,17	1,96	0,297
Haselnussprotein	< 2,5	< 2,5	< 2,5	

Tab. 4.1.8: Ergebnisse der Untersuchungen an Backmischungen mittels ELISA

Allergen	Allergenkonzentration in der Backmischung, ppm					
	Weizenmischbrötchen		Weizenkleingebäck		Brot	
	Mittelw.	Stabw.	Mittelw.	Stabw.	Mittelw.	Stabw.
Eiklarprotein	2288	769	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.
$\beta$ -Lactoglobulin	n.u.	n.u.	96,9	n.b.	n.u.	n.u.
Casein	n.u.	n.u.	4505	380	n.u.	n.u.
Haselnussprotein	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	8297	703

n.u.: nicht untersucht; n.b.: nicht berechnet

In der Backmischung Classic Muffins konnte Casein in einer Konzentration von etwa 380 ppm nachgewiesen werden. Dagegen war  $\beta$ -Lactoglobulin nicht nachweisbar, obwohl Süßmolkepulver eine Zutat der Backmischung darstellt. Eine Verunreinigung durch Bestandteile des Vorgängerprodukts (Haselnuss, Ei) wurde nicht festgestellt. Die Konzentrationen dieser Komponenten lagen unterhalb der Nachweisgrenze.

In den Schokoladestücken wurde Haselnussprotein in der Größenordnung von 5 ppm nachgewiesen. Die Anwesenheit von Nussbestandteilen in Schokolade ist aufgrund der Verarbeitung von Rework nicht unüblich. Weiterhin liegt Casein in den Schokoladestücken in hoher Konzentration vor. Dies war nicht zu erwarten, da es sich bei den Schokoladestücken um dunkle Schokolade handelt. Eine Erklärung für den hohen Gehalt an Casein könnte ebenfalls die Verarbeitung von Rework sein.

Für die Backmischung Obstkuchenteig ist eine Verunreinigung durch Komponenten des Vorgängerprodukts Eierpfannkuchen festzustellen. Eiklarprotein, das keine Zutat der Backmischung darstellt, wurde in einer Konzentration von etwa 640 ppm nachgewiesen. Weiterhin sind auch Spuren von Casein (2 ppm) vorhanden.

Für die Backmischungen „Weizenmischbrötchen“, „Bio-Weizenkleingebäck“ und „Brot“ wurden jeweils sehr hohe Konzentrationen der allergenen Komponenten aus den jeweiligen Vorgängerprodukten nachgewiesen. Das macht deutlich, dass hier die Verschleppung allergener Substanzen bei Produktwechseln nicht vernachlässigt werden kann.

Weiterhin erfolgte der Nachweis von Milch-, Ei- bzw. Haselnussproteinen in Produkten der am Projekt beteiligten Unternehmen vergleichend an der UHH anhand der Methode der SDS-PAGE gefolgt vom Western-Blotting-Verfahren mit anschließender spezifischer Immunfärbung über entsprechende tierische Antikörper bzw. Humanserum. Prinzipiell wurde ein Extraktionsansatz von 2 g bzw. 4 g Probeneinwaage in 20 ml Extraktionsmittel gewählt und das erhaltene Extrakt wurde unverdünnt in die elektrophoretische Trennung eingesetzt. Um die Nachweisgrenze der Immunfärbung herabzusetzen, wurden die Extrakte z.T. ultrazentrifugiert. Bei diesem Verfahren wurde zum Einen eine Konzentrierung des Proteingehaltes bewirkt, zum Anderen wurden Stoffe kleiner Massen abgetrennt.

Eine Zusammenstellung der auf Milchproteine untersuchten Proben, Informationen zu deren Aufarbeitung sowie den entsprechenden Untersuchungsbefund für den Obstkuchenteig und das Weizenkleingebäck zeigt Tabelle 4.1.9. Allen diesen Produkten gingen Vorgängerprodukte in der Produktionsstraße voraus, die Milchbestandteile enthielten (Tabelle 4.1.4). Abbildung 4.1.1 zeigt die entsprechende Immunfärbung der elektrophoretisch aufgetrennten Probenextrakte.

Tab. 4.1.9: Zusammenstellung der Aufarbeitung und des Untersuchungsbefundes der auf Milchproteine untersuchten Proben; Immunfärbung erfolgte mittels tierischem Antimilch-Antikörper (Wirt Kaninchen) bzw. mit dem Antimilch-Poolserum

Nr.	Bezeichnung	Aufarbeitung	Befund
1	Obstkuchenteig Probe 1	2 g Probe mit 20 ml „Extraction Buffer“ über Nacht bei RT extrahiert	Milchproteine nicht nachweisbar
2	Obstkuchenteig Probe 2		Milchproteine nicht nachweisbar
3	Backmischung „Bio Weizenkleingebäck“	2 g Probe mit 20 ml SDS-Lösung über Nacht bei RT extrahiert; Ultrazentrifugation	Milchproteine nicht eindeutig nachweisbar
4	Backmischung „Bio Weizenkleingebäck“	4 g Probe mit 20 ml SDS-Lösung über Nacht bei RT extrahiert; Ultrazentrifugation	Milchproteine nicht eindeutig nachweisbar

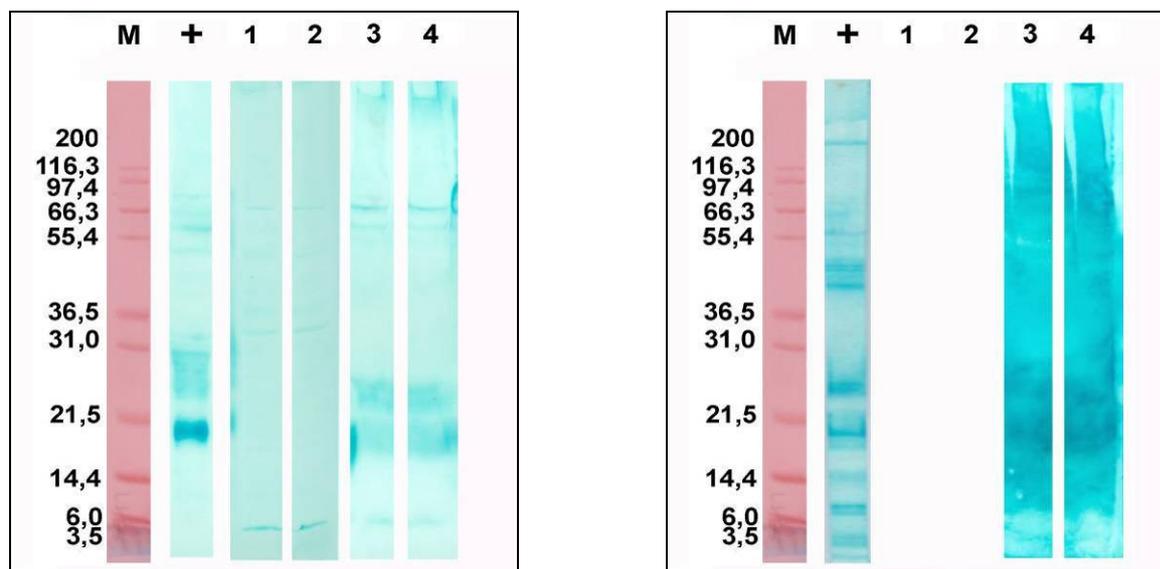


Abb. 4.1.1: Spezifische Immunfärbung der elektrophoretische aufgetrennten Probenextrakte. Links: Immunfärbung der Probenextrakte mittels tierischer Antimilch-Antikörper; Rechts: Immunfärbung der Probenextrakte mittels Antimilch-Poolserum; M (Molekulargewichtsmarker); + = Positiv-Kontrolle (Magermilch-Extrakt; SDS-Lösung); Die Nummerierung stimmt mit der Probennummerierung der Tabelle 4.1.9 überein.

Während alle Extrakte spezifisch mit tierischem Antikörper gefärbt worden sind, wurde allein das „Bio Weizenkleingebäck“ einer Immunfärbung mit dem humanen Poolserum unterzogen. Bei allen untersuchten Proben konnten die Milchproteine im Extrakt entweder nicht oder nicht eindeutig nachgewiesen werden.

Während beim „Obstkuchenteig“ der Befund eindeutig negativ war, konnten Milchproteine in der Backmischung für „Bio Weizenkleingebäck“ aufgrund sehr diffuser Banden im Immunoblot nicht eindeutig nachgewiesen werden. Werden Proteinbanden in der Immunfärbung diffus detektiert, kann dies mehrere Ursachen haben. Weist das elektrophoretisch zu trennende Extrakt einen sehr hohen Proteingehalt auf, wird die Trennschärfe herabgesetzt. Bei den untersuchten Proben war ein großer Anteil Weizenmehl enthalten. Die bei der Extraktion ebenfalls isolierten Weizenmehlproteine bewirkten eine geringere Qualität der elektrophoretischen Trennung. Eine Verdünnung der Proben zur Verbesserung der Trennschärfe bedeutete gleichermaßen eine Verdünnung der Milchproteine, was eine Erhöhung der Nachweis-

grenze mit sich brachte. Der Nachweis von Proteinen im Immunoblot wird ebenfalls erschwert, wenn der Gehalt des betreffenden Antigens in der Probe nur wenig über der Nachweisgrenze liegt. Sehr schwach gefärbte Banden lassen sich nicht immer von Unregelmäßigkeiten in der Färbung unterscheiden. Ein Nachweis des Proteins anhand einer sehr schwachen Bande ist nicht eindeutig.

Beim Vergleich der in Abbildung 4.1.1 dargestellten Immunfärbungen mittels tierischer Antikörper bzw. mittels humanen Poolserums wird die deutlich geringere Spezifität des Poolserums veranschaulicht. Wird das Poolserum bei einem Magermilchpulver-Extrakt angewendet, sind noch definierte Banden zu erkennen. Erfolgt die Anwendung der Patientenserum jedoch auf Extrakte komplexer Proben, werden keine einzelnen Banden mehr detektiert. Reagiert der tierische Antikörper spezifisch auf die in den Proben enthaltenen Milchproteine, sind die Bahnen der elektrophoretisch getrennten Extrakte, die mit Poolserum detektiert worden sind, nahezu komplett gefärbt. Da keine Reaktion mit den tierischen Antikörpern stattgefunden hat, wurde kein Immunoblot mit Humanserum angefertigt.

Hier reagierte das Poolserum nicht allein auf die Milchproteine in der Probe, sondern auch auf die darüber hinaus in der Probe enthaltenen Proteine. Den größten Anteil des Gesamtproteins stellten die Weizenproteine dar. Im verwendeten Poolserum der Milchallergiker waren nicht ausschließlich Antikörper mit einer Affinität gegen Milchproteine enthalten, sondern oft zeigten die Seren der sensibilisierten Patienten auch Reaktion auf weitere Proteine. Eine Erklärung können entsprechende Antikörper gegen z.B. Weizenproteine sein, wobei diese Personen nicht zwingend klinische Symptome als Reaktion auf Weizenproteine zeigen müssen. Milch- und Eiallergiker sind hochgradig sensibilisierte Patienten, deren Seren, wenn auch klinische Symptome lediglich gegen Milch und/oder Ei auftreten, in vitro auf viele Proteine ansprechen.

Eine Zusammenstellung der auf Eiproteine untersuchten Proben, Informationen zu deren Aufarbeitung und deren Untersuchungsbefunde zeigt Tabelle 4.1.10.

Tab. 4.1.10: Zusammenstellung der Aufarbeitung und des Untersuchungsbefundes der auf Eiproteine untersuchten Proben

Nr.	Bezeichnung	Aufarbeitung	Befund
1	„Classic Muffins“ Backmischung Probe 1	2 g Probe mit 20 ml „Extraction Buffer“ über Nacht bei RT extrahiert	Eiproteine nicht eindeutig nachweisbar
2	„Classic Muffins“ Backmischung Probe 2		Eiproteine nicht eindeutig nachweisbar
3	„Classic Muffins“ Backmischung Probe 3		Eiproteine nicht eindeutig nachweisbar
4	„Classic Muffins“ Schokostücke Probe 1	2 g Probe mit 20 ml „Extraction Buffer“ 5 min bei 40 °C im Wasserbad temperieren / mischen (5 Wdh.); anschließend über Nacht bei RT extrahiert	Eiproteine nicht nachweisbar
5	„Classic Muffins“ Schokostücke Probe 2		Eiproteine nicht nachweisbar
6	„Classic Muffins“ Schokostücke Probe 3		Eiproteine nicht nachweisbar
7	Obstkuchenteig Probe 1	2 g Probe mit 20 ml „Extraction Buffer“ über Nacht bei RT extrahiert	Eiproteine nachweisbar
8	Obstkuchenteig Probe 2		Eiproteine nachweisbar
9	Backmittel „Weizenmischbrötchen“	2 g Probe mit 20 ml SDS-Lösung über Nacht bei RT extrahiert; Ultrazentrifugation	Eiproteine nicht eindeutig nachweisbar
10	Backmittel „Weizenmischbrötchen“	4 g Probe mit 20 ml SDS-Lösung über Nacht bei RT extrahiert; Ultrazentrifugation	Eiproteine nicht eindeutig nachweisbar

Untersucht wurden mit „Classic Muffins“, „Obstkuchenteig“ und dem „Backmittel für Weizenmischbrötchen“ reale Produkte, deren Vorgängerprodukte im Herstellungsprozess eihaltig gewesen sind. Des Weiteren wurden Schokostückchen, die als Bestandteil der Backmischung Classic Muffins separat verpackt waren, auf das Vorhandensein von Eiproteinen untersucht.

Die Immunfärbung einer stellvertretenden Auswahl der Proben, die auf das Vorhandensein von Eiproteinen untersucht worden sind, wird in der Abbildungen 4.1.2 gezeigt. Im linken Teil der Abbildung wird die Immunfärbung der Probenextrakte, die mittels tierischer Antie-Antikörper detektiert worden sind, gezeigt, während die elektrophoretisch getrennten Extrakte, die mittels Patientenseren angefärbt wurden, im rechten Teil der Abbildung 4.1.2 dargestellt sind.

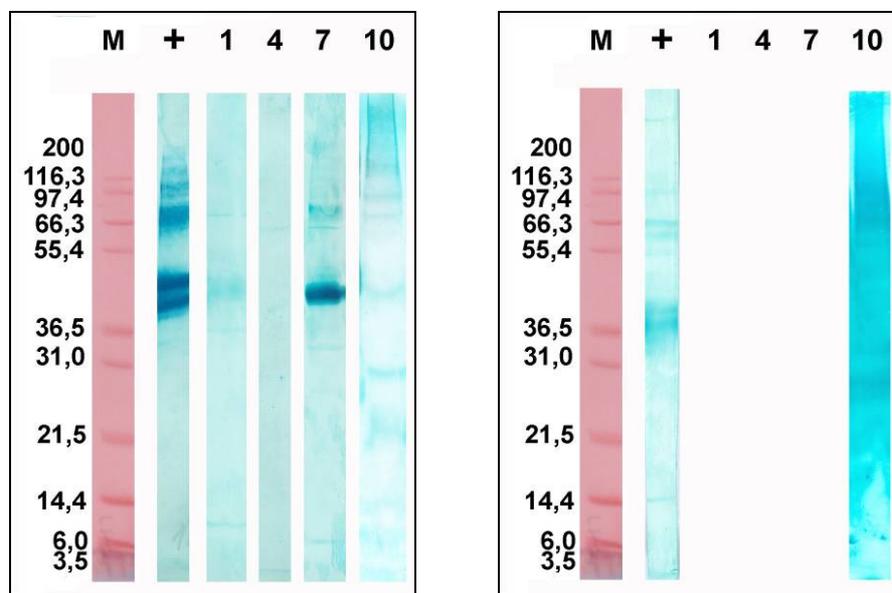


Abb. 4.1.2: links: Immunfärbung der Probenextrakte mittels tierischer Antie-Antikörper; rechts: Immunfärbung der Probenextrakte mittels Antie-Poolserum;  
M (Molekulargewichtsmarker); + = Positiv-Kontrolle (Ovalbumin-Extrakt; SDS-Lösung);  
Die Nummerierung stimmt mit der Proben-Nummerierung der Tabelle 4.1.10 überein

Tabelle 4.1.10 zeigt in Kombination mit Abbildung 4.1.2, dass bei der Probe Obstkuchenteig (Nr. 7 und 8) Eiproteine nachweisbar waren. Bei den Proben Classic Muffins und der Probe Weizenmischbrötchen war ein eindeutiger Nachweis von Eiproteinen nicht möglich. Beim Vergleich der beiden Detektionsmethoden wird erneut deutlich, dass sich Patientenseren zum Nachweis von geringen Mengen Protein im Kontext einer proteinreichen Matrix weniger eignen als tierische Antikörper.

Eine Zusammenstellung der auf Haselnussproteine untersuchten Proben, Informationen zu deren Aufarbeitung und deren Untersuchungsbefund, zeigt Tabelle 4.1.11. Untersucht wurden die Backmischungen Classic Muffins, Obstkuchenteig und eine Brotbackmischung. Des Weiteren wurden Schokostückchen, die als Bestandteil der Backmischung Classic Muffins separat verpackt waren, auf Haselnussproteine untersucht. Die Immunfärbung einer Auswahl der Proben, die auf das Vorhandensein von Haselnussproteinen untersucht worden sind, wird in der Abbildungen 4.1.3 gezeigt. Im linken Teil der Abbildung wird die Immunfärbung der Probenextrakte, die mittels tierischer Antihaseluss-Antikörper detektiert worden sind, gezeigt, während die elektrophoretisch getrennten Extrakte, die mittels Patientenseren angefärbt wurden, im rechten Teil dargestellt sind.

Tab. 4.1.11: Zusammenstellung der Aufarbeitung und des Untersuchungsbefundes der auf Haselnussproteine untersuchten Proben

Nr.	Bezeichnung	Aufarbeitung	Befund
1	„Classic Muffins“ Backmischung Probe 1	2 g Probe mit 20 ml Ammoniumcarbonat-Lsg. über Nacht bei RT extrahiert	Haselnussproteine nachweisbar
2	„Classic Muffins“ Backmischung Probe 2		Haselnussproteine nachweisbar
3	„Classic Muffins“ Backmischung Probe 3		Haselnussproteine nachweisbar
4	„Classic Muffins“ Schokostücke Probe 1	2 g Probe mit 20 ml Ammoniumcarbonat-Lsg. 5 min bei 40°C im Wasserbad temperieren / mischen (5 Wiederholungen); anschl. über Nacht bei RT extrahiert	Haselnussproteine nicht nachweisbar
5	„Classic Muffins“ Schokostücke Probe 2		Haselnussproteine nicht nachweisbar
6	„Classic Muffins“ Schokostücke Probe 3		Haselnussproteine nicht nachweisbar
7	Obstkuchenteig Probe 1	2 g Probe mit 20 ml „Extraction Buffer“ über Nacht bei RT extrahiert	Haselnussproteine nachweisbar
8	Obstkuchenteig Probe 2		Haselnussproteine nachweisbar
11	Backmischung Brot	2 g Probe mit 20 ml SDS-Lösung über Nacht bei RT extrahiert; Ultrazentrifugation	Haselnussproteine nicht eindeutig nachweisbar
14	Backmischung Brot	4 g Probe mit 20 ml SDS-Lösung über Nacht bei RT extrahiert; Ultrazentrifugation	Haselnussproteine nicht eindeutig nachweisbar

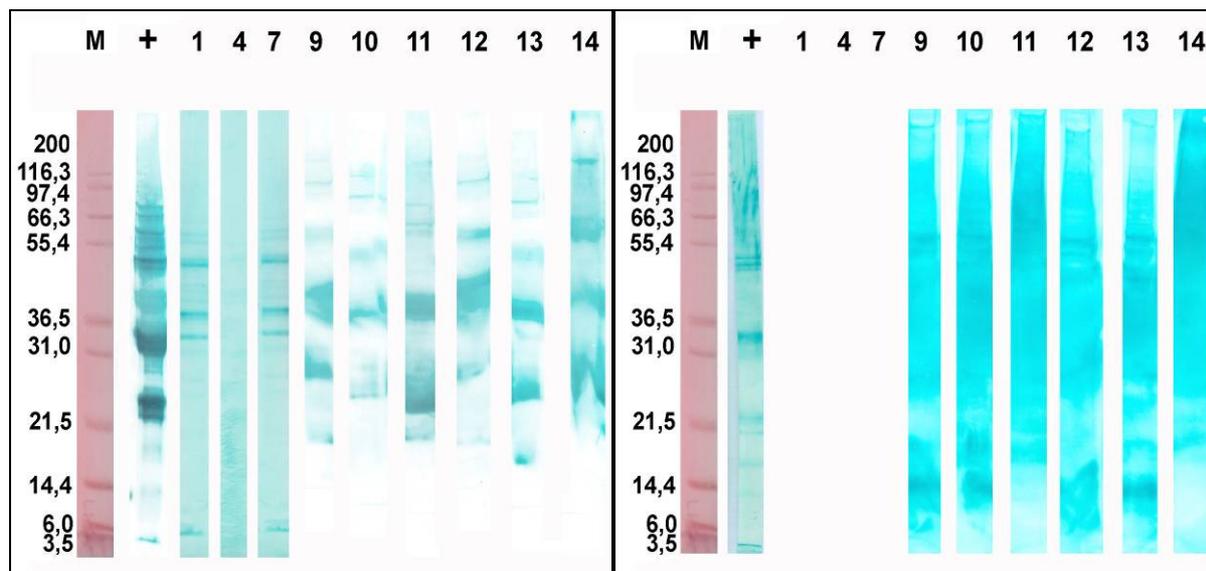


Abb. 4.1.3: Spezifische Immunfärbung der elektrophoretisch aufgetrennten Probenextrakte. links: Immunfärbung der Probenextrakte mittels tierischer Anti-Haselnuss-Antikörper; rechts: Immunfärbung der Probenextrakte mittels Anti-Haselnuss-Poolserum; M (Molekulargewichtsmarker); + = Positiv-Kontrolle (Haselnuss-Extrakt; SDS-Lösung); (Nummerierung siehe Tabelle 4.1.11)

Bei den Backmischungen „Classic Muffins“ und „Obstkuchenteig“ konnten Haselnussproteine nachgewiesen werden. Die bei den elektrophoretisch aufgetrennten Probenextrakten mit dem tierischen Antikörper detektierten Banden (Banden 1, 4, 7) stimmen mit dem Bandenmuster der Positiv-Kontrolle überein.

Die Banden 9, 10, 12 und 13 zeigen jeweils die spezifische Immunfärbung von Weizenmehl, welches mit definierten Mengen an Haselnuss dotiert war und zur Überprüfung der Wiederfindung des Nachweissystems eingesetzt wurde. Hier konnten entsprechende Haselnuss-

proteine nicht eindeutig nachgewiesen werden. Bei diesen Proben weicht aufgrund einer mangelhaften Trennschärfe das Bandenmuster von dem charakteristischen Bandenmuster der Haselnussproteine der Positiv-Kontrolle ab. Dennoch werden Proteine vom verwendeten tierischen Antikörper detektiert, was im Gegensatz dazu für ein Vorhandensein von Haselnussproteinen spricht. Wie auch bei den auf Milch- bzw. Eianteile untersuchten Proben zeigt sich bei der Untersuchung des Probenmaterials auf Haselnussproteine, dass ein Nachweis dieser Proteine aus einer proteinreichen Matrix mit den hier verwendeten Methoden nicht möglich ist.

Es fällt auf, dass die mit unterschiedlichen Analysemethoden erzielten Ergebnisse zum Nachweis von allergenen Substanzen nicht vollständig übereinstimmten. Insbesondere die Ergebnisse der Nachweise von Haselnussprotein wichen stark voneinander ab. So wurden genau in den Mustern, in denen mit dem ELISA-Nachweisverfahren keine Haselnussbestandteile detektiert werden konnten, mit dem SDS-PAGE und Western-Blotting-Verfahren positive Nachweisergebnisse erzielt. Für die Ei- und Milchproteine waren die Analyseergebnisse übereinstimmend, wobei beim Nachweis mittels SDS-PAGE und Western-Blotting-Verfahren nicht zwischen Casein und Molkenprotein unterschieden wurde.

## 4.2. Ergebnisse der Optimierung der Proteinextraktion

### 4.2.1. Untersuchungsmaterialien Kuhmilch, Hühnerei und Haselnuss

Einen nicht zu vernachlässigenden Aspekt bezüglich der Extrahierbarkeit von Proteinen bzw. Allergenen stellt die Veränderung der physikochemischen Eigenschaften der Lebensmittelallergene durch technologische Verarbeitung der Lebensmittel während des Herstellungsprozesses dar. Bei der Herstellung von z.B. Backmischungen werden nicht die unverarbeiteten Lebensmittel wie Milch, rohes Ei oder Nüsse verwendet, sondern es werden Trockenmilch- bzw. Trockenmolkeerzeugnisse, Trockeneiprodukte (Volleipulver, Eigelbpulver und/oder Trockeneiweiß) sowie geröstete, gemahlene Nüsse bzw. Haselnussgrieß eingesetzt. Zur Herstellung dieser Zutaten werden die nativen Lebensmittel technologischen Prozessen wie Zerkleinern, Pasteurisieren oder anderen Hitzebehandlungen wie Sprühtrocknen oder Rösten unterworfen. Solche Prozesse können die Struktur der allergenen Proteine verändern und somit auch Einfluss auf ihre Extrahierbarkeit haben. Ein Beispiel für die Veränderung von Proteinen ist die thermische Koagulation. Aufgrund des Temperatureinflusses ändert sich die native Konformation (Sekundär-, Tertiär-, Quartärstruktur) des Proteins, indem Wasserstoffbrücken und Ionenbindungen irreversibel gelöst werden (BELITZ et al., 2001). Diese Strukturveränderung muss jedoch nicht zwingend eine Verringerung der Antigenität oder Extrahierbarkeit bewirken. Die Denaturierung kann entweder keine Veränderung des allergenen Potentials hervorrufen oder sogar eine Erhöhung der Allergenität zur Folge haben (MALEKI, 2004, POMS & ANKLAM, 2004). Um zu ermitteln, inwieweit unterschiedliche Extraktionsbedingungen erforderlich sind, um Allergene in Produkten nachzuweisen, die aus unterschiedlichen technologischen Prozessen hervorgegangen sind, wurden je Allergen (Allergene der Kuhmilch, des Hühnereies sowie der Haselnuss) unterschiedliche Produkte untersucht, um die Veränderung von Allergenen durch technische Prozesse zu berücksichtigen. Als Nussmaterial wurde Haselnussgrieß ausgewählt, der üblicherweise in Handelsprodukten verwendet wird. Haselnussgrieß ist nicht nur besonders fetthaltig, sondern weist zudem eine sehr inhomogene Korngrößenverteilung auf. Der Fettgehalt und die relativ große und unregelmäßige Korngröße stellen eine besondere Herausforderung in Bezug auf die Reproduzierbarkeit der durchzuführenden Analytik dar. Um zu beurteilen, ob eine etwaige Entfettung des Probenmaterials einen Einfluss auf die Untersuchungsergebnisse hat, wurde durch Entfettung mit n-Hexan aus dem Haselnussgrieß entsprechend entfettetes Material hergestellt und in den Extraktionsversuchen eingesetzt.

Die Extrahierbarkeit und die Extraktionsausbeute sind ebenfalls entscheidend von der Matrix des jeweiligen Lebensmittels abhängig. Die Wahl der Extraktionsbedingungen muss sicherstellen, dass die quantitative Extraktion des technologisch veränderten Allergens auch aus einer komplexen Matrix gewährleistet ist, um falsch negative Ergebnisse vorzubeugen. Um einen Einfluss von Matrixbestandteilen auf die Extraktion der Allergene zu beurteilen, wurden nicht nur Extrakte von allergenem Material untersucht, sondern ebenfalls Extrakte, die neben den allergenen Komponenten auch Matrixkomponenten enthielten. In Anlehnung an die Produktgruppe der pulverförmigen Backmischungen sollte zunächst der Einfluss von Weizenstärke und Weizenmehl auf die Extraktionen untersucht werden. Im Hinblick auf die innerhalb dieses Projektes verwendeten analytischen Methoden wurde in entsprechenden Extraktionsversuchen auch ein proteinfreies Fettpulver als Matrix verwendet. Darüber hinaus wurde aus Zucker, Fettpulver, Weizenstärke, Natriumhydrogencarbonat und Kochsalz eine Backmischung nachgestellt, die möglichst realitätsnah die Matrix eines entsprechenden Handelsproduktes simulieren sollte. Die Zusammensetzung dieser nachgestellten Backmischung zeigt Tabelle 4.2.1. Bei dieser Backmischung wurde Weizenmehl als Zutat durch Weizenstärke ersetzt, um eine proteinfreie, komplexe Matrix nachzustellen, die es ermöglicht, Extraktionsausbeuten der Allergene im Kontext dieser Matrix zu ermitteln. Bei der Proteinquantifizierung nach Lowry, die den Proteingehalt als Summenparameter bestimmt, ist eine Differenzierung in „allergenes Protein“ und „Matrixprotein“ nicht möglich. Ein Eintrag an Fremdprotein in das Extrakt durch die Matrix macht eine Interpretation der resultierenden Wiederfindungsraten nicht möglich.

Tab. 4.2.1: Zusammensetzung der nachgestellten Backmischung

Komponente	Gehalt [%]
Saccharose	70,5
Fettpulver	17,7
Weizenstärke	9,8
Natriumhydrogencarbonat	1,6
Natriumchlorid	0,4

In Tabelle 4.2.2 sind alle verwendeten Materialien sowie ihre mittels Kjeldahl ermittelten Proteingehalte, bzw. der Proteingehalt laut Spezifikation des Produktes zusammengestellt. Der mittels Kjeldahl ermittelte Proteingehalt des jeweiligen allergenen Materials wird gemeinsam mit der in den Extraktionsversuchen eingesetzten Einwaage des entsprechenden Materials zur Berechnung der maximalen Ausbeute herangezogen.

Tab. 4.2.2: Zusammenstellung der verwendeten Materialien sowie der entsprechenden Proteingehalte ermittelt mittels Kjeldahl (n. n. = nicht nachweisbar); die mit \* gekennzeichneten Werte sind entsprechende Spezifikationsangaben des Herstellers

Material	Proteingehalt nach Kjeldahl
Magermilchpulver	33,8% ( $\pm 1,5\%$ )
Süßmolkenpulver	11,5% ( $\pm 2,3\%$ )
Sauermolkenpulver	12,0% ( $\pm 0,9\%$ )
Volleipulver	46,5% ( $\pm 0,2\%$ )
Eigelbpuver	30,7% ( $\pm 1,2\%$ )
Eiweißpulver	76,2% ( $\pm 0,8\%$ )
Haselnussgrieß, fetthaltig	13,7% ( $\pm 1,1\%$ )
Haselnussgrieß, entfettet (eigene Herstellung)	29,5% ( $\pm 0,5\%$ )
Weizenmehl T 405	9,7% ( $\pm 1,8\%$ )
Weizenstärke	n. n.*
Saccharose	n. n.*
Backmischung (eigene Herstellung)	n. n.
Fettpulver (Palmfett, trägerfrei)	n. n.*
Natriumchlorid	n. n.*
Natriumhydrogencarbonat	n. n.*

## 4.2.2. Quantitative und qualitative Beurteilung unterschiedlicher Extraktionsmittel

### 4.2.2.1. Kriterien zur Beurteilung von Extraktionsmitteln

Damit ein Extraktionsmittel als zur Isolierung von Allergenen geeignet beurteilt werden kann, sollte es verschiedene Eigenschaften aufweisen. Eine Übersicht der Beurteilungskriterien bezüglich der Extraktionsmittel und der herangezogenen analytischen Methoden zeigt Tabelle 4.2.3.

Tab. 4.2.3: Zusammenstellung der als Beurteilungskriterien festgelegten Größen und der dazugehörigen analytischen Methoden

Beurteilungskriterium Extraktionsmittel	Analytische Messgröße bzw. Methode
Hohe Proteinausbeute	Proteinquantifizierung nach Lowry bzw. Bradford
Umfassendes Proteinspektrum	SDS-PAGE mit anschließender Coomassie- und Silberfärbung
Umfassendes Allergenspektrum mit intakter Antigenität	Semidry-Blot mit anschließender Immunfärbung

Zum einen sollte die Isolierung der Proteine aus einer Matrix möglichst quantitativ erfolgen, um Verluste in der Ausbeute und daraus resultierende falsch negative Ergebnisse zu vermeiden. Ein Maß für die Menge an extrahiertem Allergen stellt die Proteinausbeute dar, die anhand einer Proteinquantifizierung im Extrakt nach Lowry bzw. Bradford berechnet werden kann. Anhand der mittels Kjeldahl ermittelten Proteingehalte der eingesetzten allergenen Untersuchungsmaterialien wurde zunächst der Proteingehalt im Extrakt berechnet, der bei

einer Extraktionsausbeute von 100%, erreicht werden konnte. Die im Extrakt mittels Lowry bzw. Bradford gemessenen Proteingehalte wurden entsprechend den unterschiedlichen Einwaagen korrigiert. Anhand der „theoretischen“ Proteingehalte (100% Ausbeute) und der tatsächlich gemessenen Proteingehalte im Extrakt wurden unter Berücksichtigung unterschiedlicher Einwaagen für alle untersuchten Extraktionsmittel die prozentualen Extraktionsausbeuten berechnet und miteinander verglichen.

Weiterhin soll die Isolierung von Proteinen durch das Extraktionsmittel nicht selektiv erfolgen, da in der Regel nicht nur ein einziges Protein für entsprechende allergische Reaktionen verantwortlich gemacht wird, sondern mehrere Proteine solche Reaktionen auslösen können. Inwieweit sich unterschiedliche Extraktionsmittel in dem extrahierten Proteinmuster unterscheiden, lässt sich qualitativ anhand einer elektrophoretischen Trennung entsprechender Extrakte vergleichen. Nach unspezifischer Färbung mittels Coomassie- und Silberfärbung wird sowohl die Bandenzahl als auch die Bandenintensität der unterschiedlichen Extrakte verglichen und beurteilt.

Soll im Anschluss an eine Extraktion ein Allergennachweis mit immunochemischen Methoden erfolgen, ist es notwendig, dass das verwendete Extraktionsmittel die Antigenität des Allergens nicht negativ beeinflusst. Vor allem bei der Verwendung von detergenzienhaltigen Extraktionsmitteln ist es denkbar, dass Konformationsepitope durch Denaturierung verloren gehen können, was den Nachweis erschweren kann. Wenn der zum Nachweis des Allergens in der immunochemischen Methode verwendete Detektionsantikörper auf eben dieses zerstörte Epitop reagiert, ist eine geringere Empfindlichkeit bzw. ein falsch negatives Ergebnis im Nachweis die Folge. Eine Möglichkeit, die Beeinflussung der Antigenität des Allergens durch das verwendete Extraktionsmittel zu beurteilen, ist eine immunochemische Detektion nach erfolgter elektrophoretischer Trennung.

#### 4.2.2.2. Extraktionsmittel-Screening Milchmaterialien

Die bei den Extrakten der Milchmaterialien Magermilchpulver, Süßmolkenpulver und Sauermolkenpulver ermittelten Extraktionsausbeuten werden in Abbildung 4.2.1 veranschaulicht.

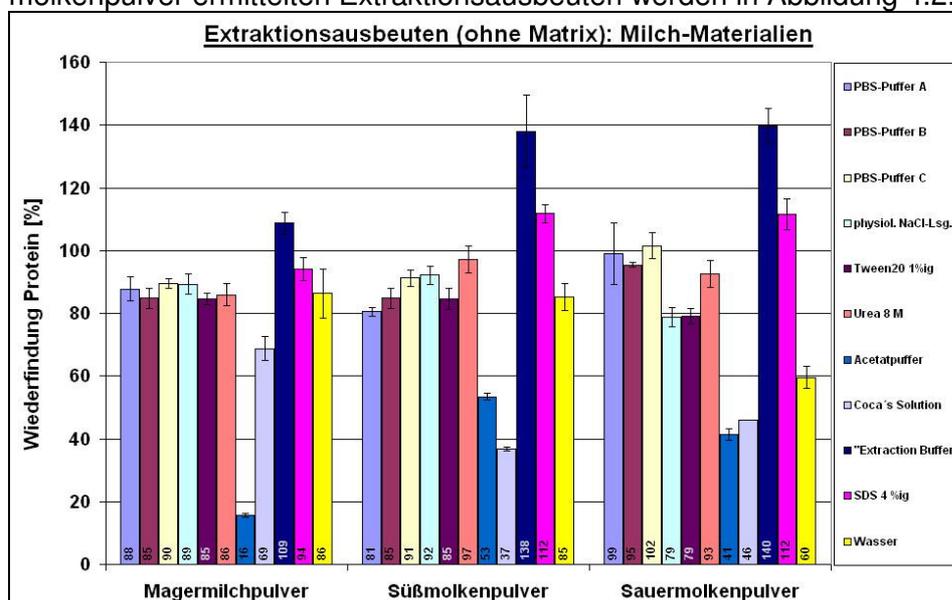


Abb. 4.2.1: Prozentuale Proteinausbeuten der Extraktionen der Kuhmilchmaterialien ermittelt mittels Lowry bzw. mittels Bradford (Coca's Solution)

Die durchschnittlichen Extraktionsausbeuten der hergestellten Extrakte eines Materials variierten bei den untersuchten Milchmaterialien über einen relativ weiten Bereich. Während beispielsweise der Acetatpuffer bei der Extraktion von Magermilchpulver nur 16% Proteinausbeute erreichte, konnte bei der Extraktion mit dem „Extraction Buffer“ eine berechnete Ausbeute von 109% erreicht werden.

Wiederfindungsraten größer als 100% begründen sich dadurch, dass das Bezugsprotein BSA eine andere Aminosäurezusammensetzung als das Gesamtprotein der verschiedenen Milchprodukte aufweist. Besitzt das Proteingemisch in der zu messenden Probe einen größeren Anteil an phenolischen Aminosäuren als das Bezugsprotein, können bei entsprechenden Proteingehalten Wiederfindungsraten von mehr als 100% ermittelt werden.

Diese sehr großen Unterschiede in den Extraktionsausbeuten demonstrieren, welche entscheidende Bedeutung der Wahl eines geeigneten Extraktionsmittels im Vorfeld eines Allergennachweises zukommt. Eine Probenextraktion mit beispielsweise Acetatpuffer in Bezug auf Allergene der Kuhmilch kann zu falsch negativen Ergebnissen führen, da dieses Extraktionsmittel aufgrund der geringen Proteinausbeute die Nachweisgrenze für sich anschließende Untersuchungen erheblich heraufsetzt. Ein Vergleich der Extraktionsausbeuten der untersuchten Milchmaterialien untereinander ist nur bedingt möglich, da sich ihre Proteinzusammensetzung unterscheidet. Es ist aber offensichtlich, dass, obwohl es sich bei Magermilchpulver, Süßmolkenpulver und Sauermolkenpulver um Produkte unterschiedlicher technologischer Verarbeitung handelt, die Eignung der Extraktionsmittel bei allen drei Produkten ähnlich war. Die höchsten Ausbeuten zeigten bei allen untersuchten Milchmaterialien mit Abstand der „Extraction Buffer“ (109 – 140%) und die 4%ige SDS-Lösung (94 – 112%). Die geringsten Ausbeuten an Protein erreichten bei allen der extrahierten Materialien der Acetatpuffer (16 – 53%) und „Coca´s Solution“ (37 – 69%), wobei berücksichtigt werden muss, dass der Proteingehalt der Extrakte der „Coca´s Solution“ nicht mittels Lowry sondern mittels Bradford ermittelt worden ist. Die ebenfalls untersuchten Extraktionsmittel, wie die unterschiedlichen PBS-Varianten, NaCl-Lösung, Tween 20<sup>®</sup>, Urea und Wasser, zeigten bei allen Materialien relativ hohe Proteinausbeuten. Lediglich bei den Extrakten des Sauermolkenpulvers zeigte sich abweichend, dass mit den PBS-Puffern A, B und C sowie 8 M Urea eine größere Ausbeute an Proteinen erzielt werden konnte als mit der physiologischen NaCl-Lösung und dem Tween 20<sup>®</sup>-haltigen Extraktionsmittel. Dieser Unterschied in der Extraktionsfähigkeit zeigte sich bei den untersuchten Extrakten von Magermilchpulver und Süßmolkenpulver nicht in dem Maße. Die Herstellung dieser Produkte schien aber, insgesamt beurteilt, keinen merklichen Einfluss auf die Extrahierbarkeit der Proteine zu haben.

Inwieweit sich das extrahierte Protein- bzw. Allergenspektrum der Magermilchpulverextrakte unterschied, wurde anhand der Ergebnisse der SDS-PAGE Methode mit anschließender unspezifischer Proteindetektion im Gel beurteilt. Abbildung 4.2.2 zeigt die unspezifische Silberfärbung des Elektropherogrammes der Extrakte des Magermilchpulvers. Die Nummerierung der Bahnen entspricht dabei der Nummerierung der Extraktionsmittel. Um das Bandenmuster der Extraktionsmittel direkt miteinander vergleichen zu können, wurde prinzipiell angestrebt, gleiche Volumina in entsprechender Weise verdünnter Extrakte aufzutrennen. Aufgrund der z.T. sehr großen Abweichungen der Extrakte bezüglich des Proteingehaltes war es vereinzelt notwendig, unterschiedliche Verdünnungen der Extrakte eines Produktes auf die Gelmatrix aufzutragen. Sowohl bei der in Abbildung 4.2.2 dargestellten Silberfärbung als auch im dort ebenfalls dargestellten Immunoblot der Magermilchpulverextrakte wurden alle Extrakte 1 / 1,5 verdünnt aufgetragen. Lediglich das Acetatpufferextrakt (Nr. 7) wurde aufgrund des geringen Proteingehaltes unverdünnt verwendet.

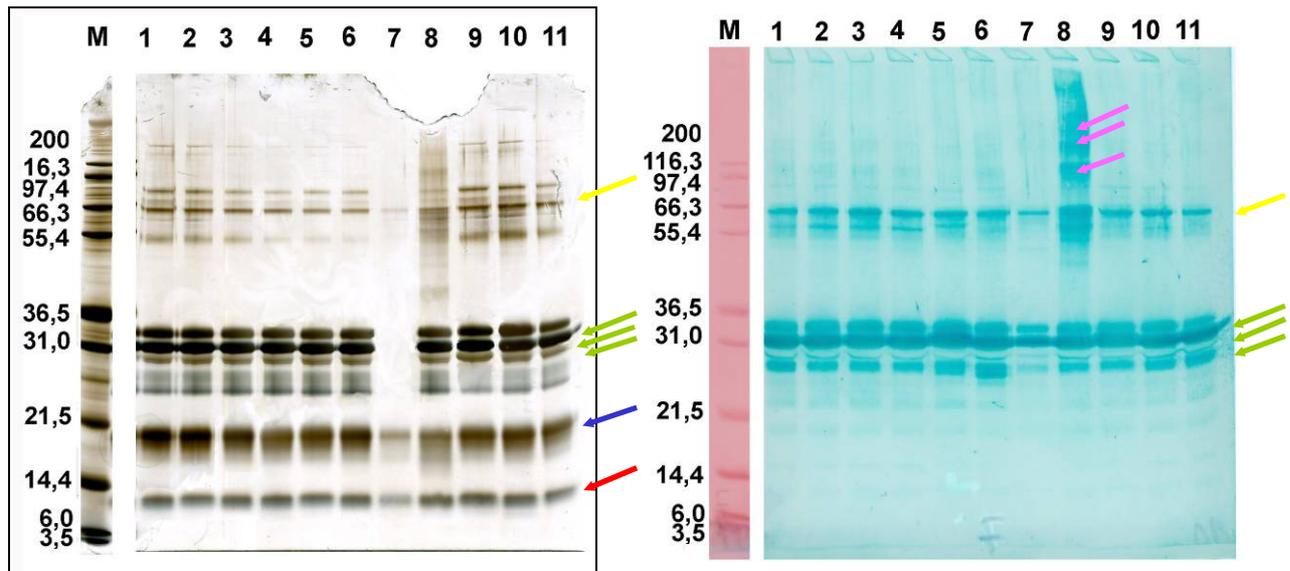


Abb. 4.2.2: links: unspezifische Silberfärbung des Elektropherogrammes der Magermilchpulverextrakte ohne Matrixzusatz; rechts: spezifische Immunfärbung eines Westernblots der Magermilchpulverextrakte; die Nummerierung entspricht der Bezeichnung der verwendeten Extraktionsmittel. Farbschlüssel:  $\alpha$ -Lactalbumin (14,2 kDa; roter Pfeil);  $\beta$ -Lactoglobulin (18,3 kDa; blauer Pfeil); Caseingruppe (ca. 20 - 25 kDa; grüne Pfeile); BSA (66,3 kDa; gelber Pfeil), nicht eindeutig identifizierbare Banden (höhermolekularer Bereich; magentafarbene Pfeile); M (Molekulargewichtsmarker)

Das unspezifisch mittels Silberfärbung detektierte Elektropherogramm der Magermilchpulverextrakte zeigt alle charakteristischen Milchproteine:  $\alpha$ -Lactalbumin (14,2 kDa; roter Pfeil),  $\beta$ -Lactoglobulin (18,3 kDa; blauer Pfeil), die Gruppe der Caseine (ca. 20 - 25 kDa; grüne Pfeile) und Serumalbumin (BSA; 66,3 kDa; gelber Pfeil). Im Gegensatz zu Ergebnissen der Proteinquantifizierung zeigen die Extraktionsmittel prinzipiell geringe Unterschiede in Bandenintensität und Bandenanzahl. Lediglich das Extrakt des Acetatpuffers (Nr. 7) zeigt trotz des unverdünnten Auftrags keine Caseinbanden und nur schwache Banden für die Molkenproteine, was der ermittelten geringen Extraktionsausbeute entspricht. Bei der Proteinquantifizierung zeigen „Extraction Buffer“ (Nr. 9) und die SDS-Lösung (Nr. 10) die höchsten Ausbeuten. Im silbergefärbten Gel jedoch zeigen diese Extraktionsmittel keine merklich stärkeren Banden als die restlichen Extraktionslösungen. Unterschiede in den Bandenintensitäten zeigen sich bei den hier untersuchten Extrakten ausschließlich in der Intensität der BSA-Bande. BSA ist jedoch aufgrund seines sehr geringen Massenanteils und allergenen Potentials im Vergleich zu den restlichen Milchproteinen weniger von Bedeutung. Die Beurteilung, inwieweit die untersuchten Extraktionsmittel die Extraktion eines umfassenden Spektrums intakter Allergene gewährleisteten, erfolgte durch spezifische Immunfärbung im Immunoblot nach elektrophoretischer Auftrennung der Proteine. Sollen in Produkten Spuren von Magermilchpulver nachgewiesen werden, stellt die Caseingruppe als mengenmäßig größte Proteinfraction die Leitsubstanz in der sich anschließenden Analytik dar. Für die spezifische Färbung der Extrakte im Immunoblot wurde daher ein Anticasein-Antikörper verwendet, der spezifisch die Banden der Caseingruppe anfärbt (Abbildung 4.2.2; grüne Pfeile) aber auch BSA zu detektieren vermag (Abbildung 4.2.2; gelber Pfeil). Alle Extraktionsmittel zeigen im Immunoblot die charakteristischen Casein-Banden. Die Antigenität der Caseinfraktionen wurde durch die Extraktionsmittel nicht merklich verringert. Während der Acetatpuffer (Nr. 7) aufgrund des im Vergleich zu den anderen Extrakten geringeren Proteingehaltes im Immunoblot relativ schwache Banden aufweist, sind bei „Coca’s Solution“ (Nr. 8) zusätzliche Banden im höhermolekularen Bereich zu erkennen (Abbildung 4.2.2; magentafarbene Pfeile), die nicht eindeutig zugeordnet werden können.

### Süßmolkenpulverextrakte

Abbildung 4.2.3 zeigt das silbergefärbte Elektropherogramm der Süßmolkenpulverextrakte ohne einen Zusatz von Matrix. Ebenfalls abgebildet ist der entsprechende Immunoblot derselben Extrakte. In diesem Fall wurde lediglich das Extrakt aus 8 M Urea verdünnt (1 / 1,5); alle weiteren Extrakte wurden unverdünnt eingesetzt. Die Immunfärbung der Süßmolkenpulverextrakte wurde im Gegensatz zu der Immunfärbung der Magermilchpulverextrakte nicht mit einem Anticasein-Antikörper sondern mit einem Antimolke-Antikörper detektiert. Tests im Vorfeld der Untersuchungen der Extrakte haben ergeben, dass dieser Antikörper nicht nur auf die Molkenproteine der Kuhmilch sondern auch auf die Caseine und BSA reagiert. Entsprechend werden die Banden dieser Proteine ebenfalls im Immunoblot sichtbar.

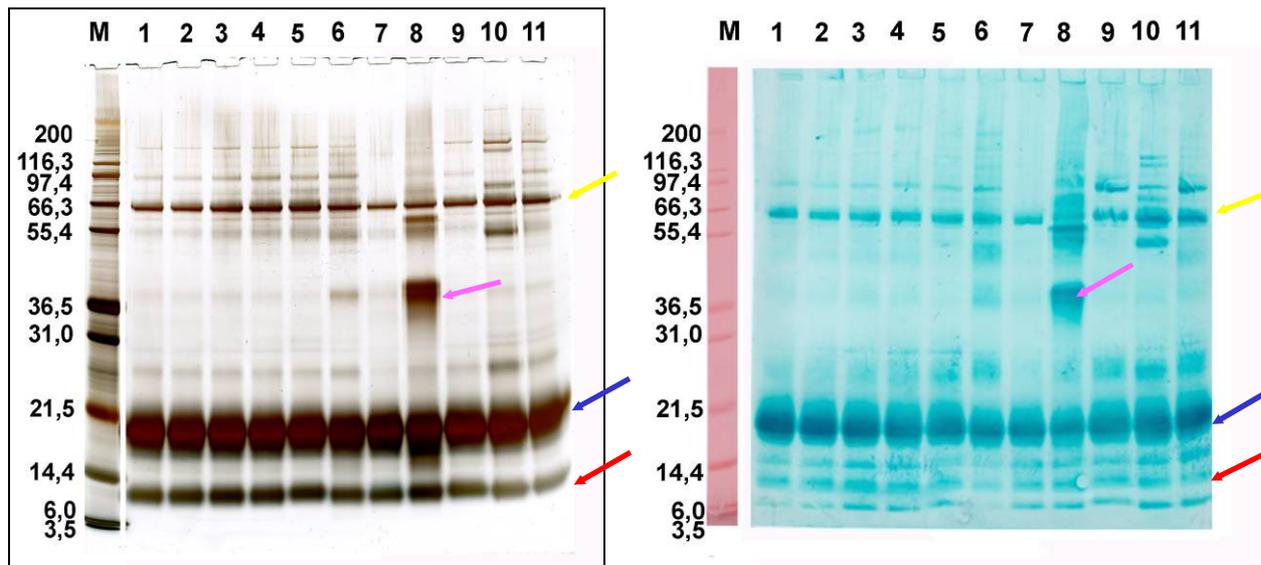


Abb. 4.2.3: links: unspezifische Silberfärbung eines Elektropherogrammes der Süßmolkepulverextrakte ohne Matrixzusatz; rechts: spezifische Immunfärbung eines Westernblots der Süßmolkepulverextrakte; die Nummerierung entspricht der Bezeichnung der verwendeten Extraktionsmittel. Farbschlüssel:  $\alpha$ -Lactalbumin (14,2 kDa; roter Pfeil);  $\beta$ -Lactoglobulin (18,3 kDa; blauer Pfeil); BSA (66,3 kDa; gelber Pfeil), nicht eindeutig identifizierbare Bande (mittleres Molekulargewicht; magentafarbener Pfeil); M (Molekulargewichtsmarker)

Im silbergefärbten Gel lassen sich kaum Unterschiede in den Bandenstärken der  $\alpha$ -Lactalbumin- und  $\beta$ -Lactoglobulin-Banden erkennen, da diese sehr stark ausgeprägt sind. Alle Extraktionsmittel sind also prinzipiell dazu geeignet, Molkenproteine aus dem Süßmolkenpulver zu isolieren. Casein-Banden sind bei diesem Produkt wie erwartet nicht zu erkennen, da die Caseingruppe bei der Herstellung von Molkepulver allgemein entfernt wird. Der Immunoblot bestätigt die Ergebnisse der Silberfärbung. Die Bandenstärke der  $\beta$ -Lactoglobulin-Bande lässt zwar keine Differenzierung zu, welches Extraktionsmittel eine größere Ausbeute zeigt, jedoch zeigen sich hier die untersuchten Extraktionsmittel andererseits als gleichermaßen gut geeignet,  $\beta$ -Lactoglobulin aus dem Süßmolkenpulver zu isolieren.

Vergleicht man die Banden des  $\alpha$ -Lactalbumins in der Silberfärbung mit denen im Immunoblot fällt auf, dass sich im Bereich dieser Massen ein anderes Bandenmuster ergibt. Anstelle einer Bande ergeben sich etwa drei gleichstarke Banden. Ansonsten sind die Unterschiede der Extraktionsmittel im Bereich der höhermolekularen Proteine zu erkennen. Bei diesen Proteinen handelt es sich u.a. um BSA, das mengenmäßig im Vergleich zu den Molkenproteinen nur in geringen Mengen in Molkenprodukten enthalten ist. Vergleicht man das silbergefärbte Elektropherogramm und den Immunoblot miteinander, ist vor allem eine markante zusätzliche Bande der „Coca's Solution“ (Nr. 8) auffällig. Diese Bande ist zwar bei allen anderen Extraktionsmitteln ebenfalls vorhanden, jedoch ist sie dort viel weniger stark ausgeprägt. Sie scheint ein Abkömmling des  $\beta$ -Lactoglobulin zu sein. SDS-PAGE-

Experimente mit reinem  $\beta$ -Lactoglobulin zeigten ein vergleichbares Phänomen. Da die zusätzliche Bande bei größeren Massen auftritt, scheint sich hier durch die Phenolkomponente im Extraktionsmittel „Coca´s Solution“ (Nr. 8) eine Art  $\beta$ -Lactoglobulin-Komplex zu bilden. Dennoch kann dieses Phänomen in diesem Zusammenhang nicht abschließend geklärt werden.

#### *Sauermolkenpulverextrakte*

Abbildung 4.2.4 zeigt die Bandenmuster für die Sauermolkenpulverextrakte ohne den Zusatz von Matrix. Das Extrakt mit 8 M Urea wurde 1 / 1,5 verdünnt, während alle übrigen Extrakte unverdünnt eingesetzt worden sind.

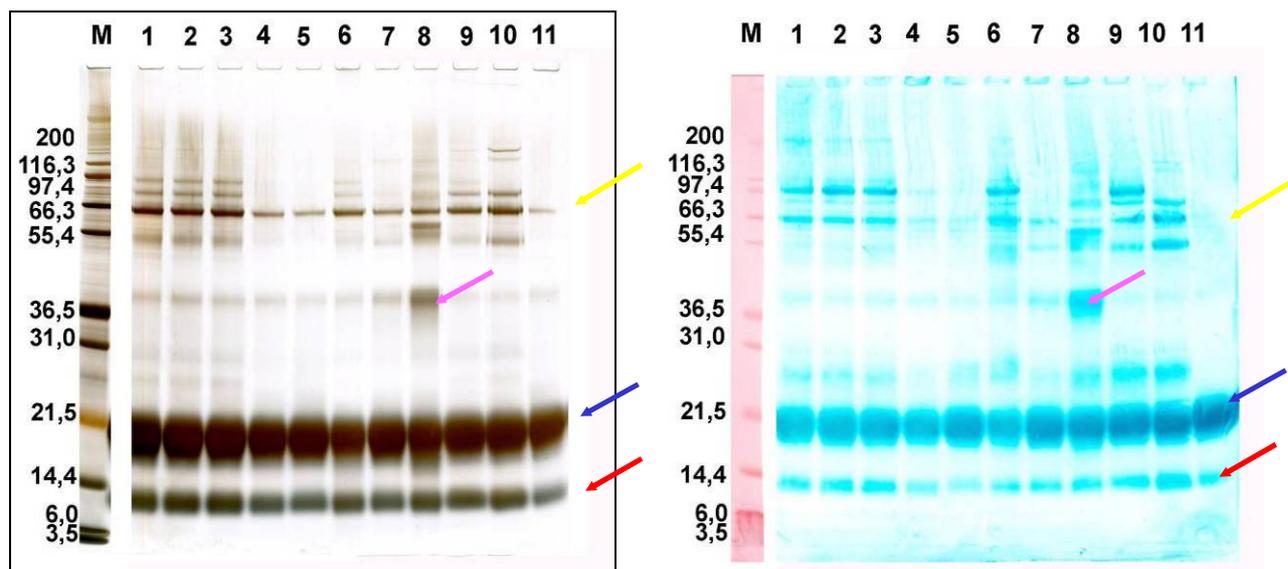


Abb. 4.2.4: links: unspezifische Silberfärbung eines Elektropherogrammes der Sauermolkepulverextrakte; rechts: spezifische Immunfärbung eines Westernblots der Sauermolkepulverextrakte; die Nummerierung entspricht der Bezeichnung der verwendeten Extraktionsmittel. Farbschlüssel:  $\alpha$ -Lactalbumin (14,2 kDa; roter Pfeil);  $\beta$ -Lactoglobulin (18,3 kDa; blauer Pfeil); BSA (66,3 kDa; gelber Pfeil), nicht eindeutig identifizierbare Bande (mittleres Molekulargewicht; magentafarbener Pfeil); M (Molekulargewichtsmarker)

Wie auch bei den Extrakten von Magermilchpulver und Süßmolkenpulver lassen die Extraktionsmittel wenige Unterschiede in der Extraktionsfähigkeit der Molkenproteine  $\alpha$ -Lactalbumin und  $\beta$ -Lactoglobulin erkennen. Die entsprechenden Banden sind bei allen Extraktionsmitteln stark ausgeprägt und demonstrieren eine gute Eignung aller untersuchten Extraktionsmittel in Bezug auf die Molkenproteine. Unterschiede der Extraktionsmittel sind bei den aufgetrennten Sauermolkenextrakten im Bereich der höhermolekularen Proteine zu erkennen, die in Molkenprodukten im Vergleich zu den klassischen Molkenproteinen jedoch eine eher untergeordnete Rolle spielen. Wie auch bei den „Coca´s Solution“-Extrakten (Nr. 8) des Süßmolkenpulvers ist auch hier eine zusätzliche Bande mittleren Gewichtes zu erkennen.

Diese Ergebnisse bestätigen sich in dem entsprechenden Immunoblot. Die Immunfärbung wurde bei den Extrakten der Sauermolke ebenfalls mit einem Antimolke-Antikörper durchgeführt. Sowohl  $\alpha$ -Lactalbumin als auch  $\beta$ -Lactoglobulin werden als intensive Banden detektiert. Es ist davon auszugehen, dass die verwendeten Extraktionsmittel keinen Einfluss auf die Antigenität dieser Proteine haben, wie es sich auch schon bei der Untersuchung der Extrakte von Magermilchpulver und Süßmolkenpulver gezeigt hatte.

#### **4.2.2.3. Extraktionsmittel-Screening Eimaterialien**

Die für die Extrakte der Hühnereimaterialien ermittelten Ausbeuten zeigt Abbildung 4.2.5.

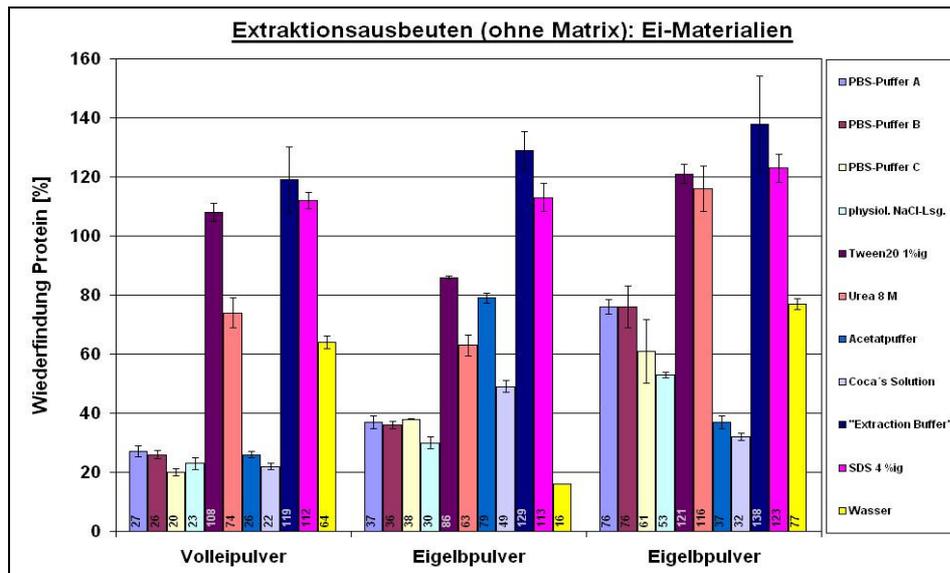


Abb. 4.2.5: Proteinausbeuten der Extraktionen der Eimaterialien ermittelt mittels Lowry bzw. mittels Bradford (Coca's Solution)

Die durchschnittlichen Ausbeuten der Extrakte eines Materials variierten bei den untersuchten Eimaterialien, ähnlich wie bei den Milchmaterialien, relativ stark. Während beispielsweise der Acetatpuffer bei der Extraktion von Eigelbpulver nur 16% Proteinausbeute erreichte, konnte bei der Extraktion mit dem „Extraction Buffer“ eine Ausbeute von 142% erreicht werden. Wie auch bei der Untersuchung der Milchprodukte wurden ebenfalls mit dem „Extraction Buffer“, der 4%igen SDS-Lösung (112 – 123%) und Tween 20<sup>®</sup>-Lösung (86 - 121%) die höchsten Ausbeuten erzielt. Anders als bei den Milchprodukten zeigte sich jedoch in den Extraktionsausbeuten der Eimaterialien, dass die meisten der verwendeten Extraktionsmittel weniger gut zur Extraktion von Eiweißen geeignet sind. Die unterschiedlichen PBS-Varianten, NaCl-Lösung, Acetatpuffer, „Coca's Solution“ und Wasser zeigen im Vergleich zu den Extraktionsmitteln „Extraction Buffer“, SDS 4%ig und 8 M Urea erheblich geringere Proteinausbeuten. Eiweißpulver, Eigelbpulver und Volleipulver unterscheiden sich weniger in Bezug auf das Herstellungsverfahren sondern vielmehr in ihrer Zusammensetzung. Während Eiweißpulver kaum Fett enthält (0,12%), aber sehr proteinreich (80%), ist Eigelbpulver sehr fetthaltig (ca. 57%) und proteinärmer (30%) als Eiweißpulver. Ein hoher Fettanteil kann bewirken, dass ein Extraktionsmittel ohne Tensidanteil das zu extrahierende Material bei der Extraktion nicht vollständig benetzt, so dass insgesamt geringere Extraktionsausbeuten erreicht werden. Die wässrigen, salzhaltigen PBS-Puffer und die physiologische NaCl-Lösung zeigten mit 60 bis 75% entsprechend höhere Ausbeuten bei den Extrakten des fettarmen Eiweißpulvers, während dieselben Extraktionsmittel bei den Extrakten von Volleipulver (ca. 20% Ausbeute) und Eigelbpulver (ca. 40% Ausbeute) nur geringe Ausbeuten zeigten. Zwar weist Volleipulver (ca. 40% Fett) einen geringeren Fettanteil als Eigelbpulver (57%) auf, jedoch wurden mit den wässrigen, salzhaltigen PBS-Puffer und der NaCl-Lösung höhere Proteinausbeuten bei den Eigelbpulverextrakten erhalten. Evtl. wirkten die vor allem im Eigelb enthaltenen Phospholipide (Lecithin) als Lösungsvermittler, so dass hier bei der Extraktion von Eigelbpulver höhere Ausbeuten erhalten wurden. Die Unterschiede der Ausbeuten innerhalb eines Extraktionsmittels beim Vergleich der unterschiedlichen Eimaterialien kann auch auf die unterschiedliche Anfärbbarkeit der enthaltenen Proteine bei der Proteinquantifizierung zurückzuführen sein. Da dieser Unterschied nicht abschließend geklärt werden konnte, ist ein Vergleich von Extraktionsausbeuten unterschiedlicher Eimaterialien nur bedingt möglich.

#### Volleipulverextrakte

Da Eigelb im Vergleich zum Eiweiß weniger Protein enthält, wird die Proteingesamtheit des Volleipulvers im wesentlichen durch die Proteine des Eiweißes repräsentiert. Abbildung 4.2.6 zeigt das silbergefärbte Elektropherogramm und den entsprechenden Immunoblot der Voll-

eipulverextrakte ohne Matrixzusatz. Die Extrakte von Tween 20<sup>®</sup> (Nr. 5), 8 M Urea (Nr. 6), „Extraction Buffer“ (Nr. 9) und der SDS-Lösung (Nr. 10) wurden 1 / 1 verdünnt eingesetzt, während die übrigen Extrakte unverdünnt analysiert wurden.

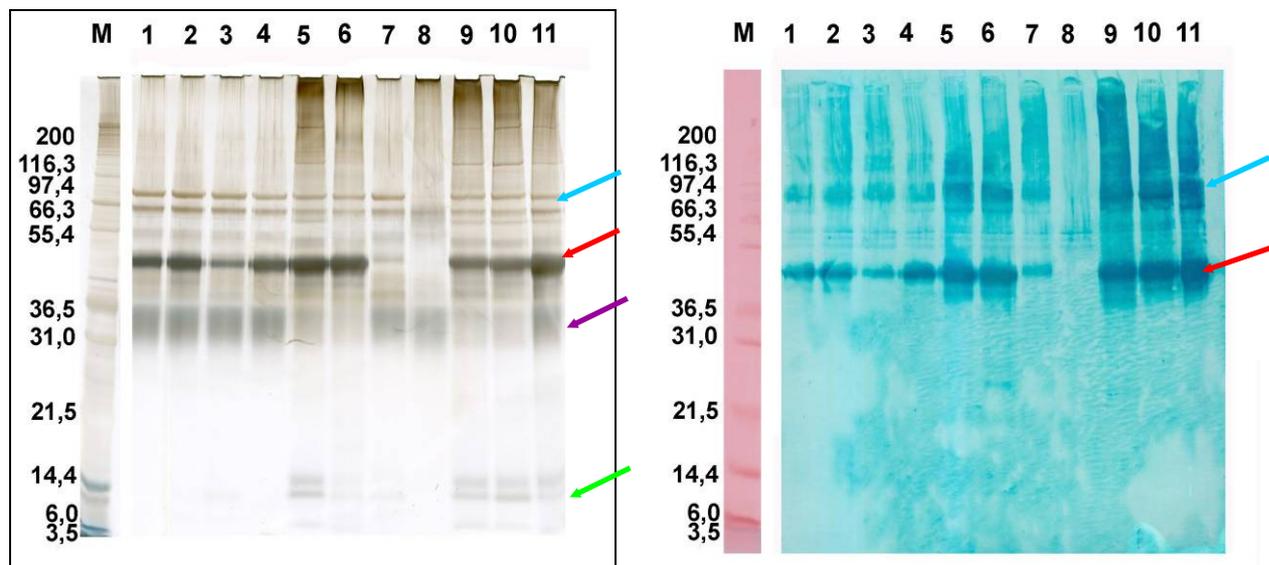


Abb. 4.2.6: links: unspezifische Silberfärbung eines Elektropherogrammes der Volleipulverextrakte; rechts: spezifische Immunfärbung eines Westernblots der Volleipulverextrakte; die Nummerierung entspricht der Bezeichnung der verwendeten Extraktionsmittel. Farbschlüssel: Conalbumin (76 kDa; blauer Pfeil); Ovalbumin (44,5 kDa; roter Pfeil); Ovomuroid (28 kDa, violetter Pfeil); Lysozym (14,3 kDa; grüner Pfeil); M (Molekulargewichtsmarker)

Im silbergefärbten Elektropherogramm sind die charakteristischen Hühnereiproteine Ovalbumin (44,5 kDa; roter Pfeil), Ovomuroid (diffuse Bande bei 28 kDa, violetter Pfeil), Conalbumin (76 kDa; blauer Pfeil) und bei den Extrakten der Extraktionsmittel Tween 20<sup>®</sup> (Nr. 5), „Extraction Buffer“ (Nr. 9) und SDS-Lösung (Nr. 10) zusätzlich auch Lysozym (14,3 kDa; grüner Pfeil) zu erkennen. Vergleicht man die Bandenmuster der Extrakte des Volleipulvers der unterschiedlichen Extraktionsmittel untereinander, sind im silbergefärbten Elektropherogramm durchaus Unterschiede erkennbar.

Wie auch schon die Ermittlung der Extraktionsausbeuten vermuten ließ, zeigen die Extrakte von Tween 20<sup>®</sup> (Nr. 5), 8 M Urea (Nr. 6), „Extraction Buffer“ (Nr. 9), SDS-Lösung (Nr. 10) und Wasser (Nr. 11) gegenüber den übrigen Extrakten sehr starke Ovalbumin-Banden. Ebenfalls entsprechend den ermittelten Extraktionsausbeuten zeigen die Extrakte aus PBS-Puffer C (Nr. 3), Acetatpuffer (Nr. 7) und „Coca's Solution“ (Nr. 8) im silbergefärbten Elektropherogramm keine bzw. nur eine sehr schwache Ovalbumin-Bande. Diese Extraktionsmittel sind somit nicht zur Extraktion von allergenen Komponenten aus Hühnereimaterialien geeignet.

Die Ergebnisse der unspezifischen Färbung spiegeln sich in der Auswertung des entsprechenden Immunoblots wieder. Auch bei der spezifischen Immunfärbung, in diesem Fall mit einem Antiovalbumin-Antikörper, zeigen die Extrakte von Tween 20<sup>®</sup> (Nr. 5), 8 M Urea (Nr. 6), „Extraction Buffer“ (Nr. 9) und SDS-Lösung (Nr. 10) trotz Verdünnung sehr starke Ovalbumin-Banden. Diese Extraktionsmittel extrahieren Ovalbumin unverändert, d.h. ohne die Antigenität bezüglich des verwendeten Antikörpers zu beeinflussen, mit großer Ausbeute. Im höhermolekularen Bereich ist sowohl im silbergefärbten Gel als auch in Immunoblot eine Bande zu erkennen, die dem Conalbumin zuzuordnen ist. In diesem Bereich zeigen sich aber auch bei allen Extraktionsmitteln unspezifische Bindungen, die sich als blaue Spur unterhalb des Probenlots darstellen. Diese zahlreichen Banden zu differenzieren und gezielt einem bestimmten Protein zuzuordnen, war im Rahmen dieses Projektes nicht möglich.

*Eigelbpulverextrakte*

Das hier verwendete Eigelbpulver wurde gewonnen, indem man nach dem Öffnen roher Hühnereier Eidotter und Eiklar mechanisch voneinander getrennt hat und das Eigelb lyophilisiert wurde. Abbildung 4.2.7 zeigt das silbergefärbte Elektropherogramm und den Immunoblot der Eigelbpulverextrakte ohne Matrixzusatz.

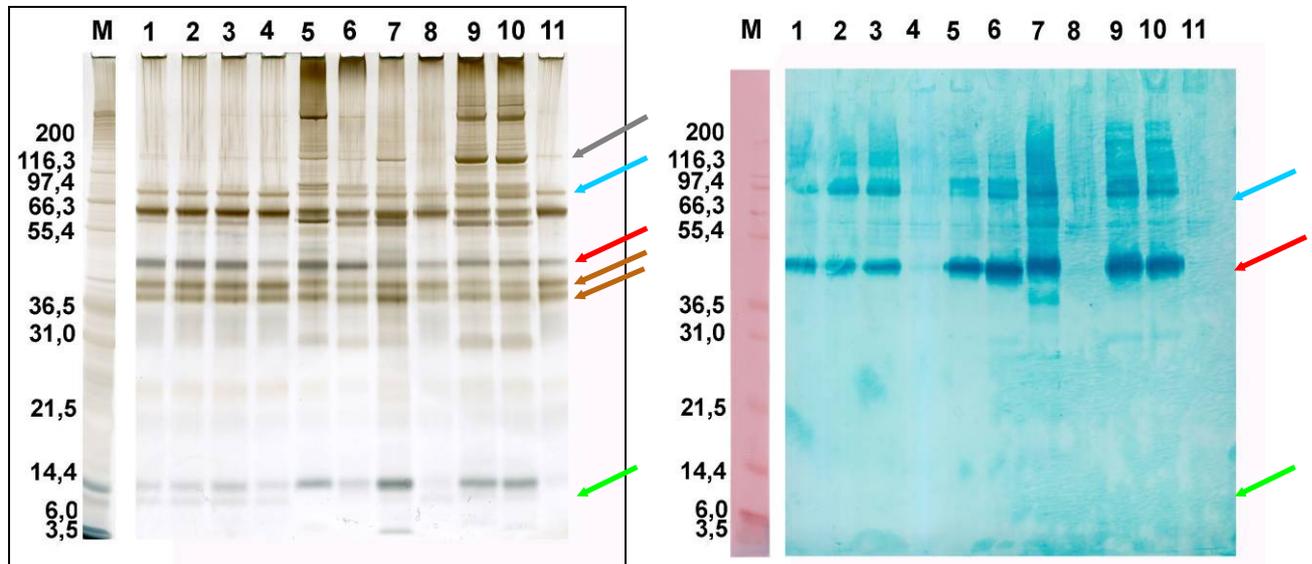


Abb. 4.2.7: links: unspezifische Silberfärbung eines Elektropherogrammes der Eigelbpulverextrakte; rechts: spezifische Immunfärbung eines Westernblots der Eigelbpulverextrakte; die Nummerierung entspricht der Bezeichnung der verwendeten Extraktionsmittel. Farbschlüssel: Lipovitellin (85, 110 bzw. 111 kDa ; grauer Pfeil); Conalbumin (76 kDa; blauer Pfeil); Ovalbumin (44,5 kDa; roter Pfeil); Phosvitin (37,5, 42,5, bzw. 45 kDa ; braune Pfeile); Lysozym (14,3 kDa; grüner Pfeil); M (Molekulargewichtsmarker)

Bei der Herstellung ließ es sich nicht vermeiden, dass in dem Eigelbmaterial ebenfalls Eiweißmaterial enthalten war. Daher sind bei den hier behandelten Eigelbpulverextrakten ebenfalls die für das Eiweiß charakteristische Ovalbumin-Bande (roter Pfeil) und die Lysozym-Bande (hellgrüner Pfeil) erkennbar.

Im Gegensatz zum Eiklar sind die charakteristischen Proteine des Eidotters das Lipovitellin (graue Pfeile) und das Phosvitin (braune Pfeile), das im Elektropherogramm durch die Denaturierung mit SDS in seinen Untereinheiten (37,5, 42,5 bzw. 45 kDa) vorliegt. Diese überlagern z.T. wegen gleicher Masse die Ovalbumin-Bande. Eine Bande auf Höhe der Ovalbumin-Bande im silbergefärbten Elektropherogramm beweist somit nicht das Vorhandensein von Ovalbumin im Extrakt. Sowohl bei der Silberfärbung als auch im Immunoblot wurden lediglich die Extrakte von Tween 20® (Nr. 5), 8 M Urea (Nr. 6), „Extraction Buffer“ (Nr. 9) und SDS-Lösung (Nr. 10) entsprechend des Proteingehaltes 1 / 1 verdünnt verwendet, alle weiteren Extrakte wurden unverdünnt aufgetragen. Im silbergefärbten Gel sind durchaus Unterschiede im Proteinmuster und in der Intensität der Banden der unterschiedlichen Extrakte zu erkennen. Im silbergefärbten Elektropherogramm der Eigelbpulverextrakte sind bei allen Extraktionsmitteln Banden auf Höhe des Ovalbumins zu erkennen. Es kann bei dieser unspezifischen Färbemethode nicht beurteilt werden, ob es sich bei diesen tatsächlich um Ovalbumin handelt oder um Untereinheiten des  $\alpha$ - bzw.  $\beta$ -Phosvitins, die eine entsprechende Molekülmasse besitzen. Das unspezifisch gefärbte Elektropherogramm zeigt ansonsten jedoch, dass die verwendeten Extraktionsmittel Unterschiede in der Eignung zur Extraktion von Eiproteinen aufweisen. Im Gegensatz zu den übrigen Extraktionsmitteln zeigen Tween 20® (Nr. 5), „Extraction Buffer“ (Nr. 9) und SDS-Lösung (Nr. 10) intensive Banden, die dem Lipovitellin zugeordnet werden können. Diese Extraktionsmittel zeigen neben der Acetatpuffer-Extraktion (Nr. 7) ebenfalls eine Bande, die dem Lysozym zugeordnet werden kann.

Bei der spezifischen Färbung wurde wie auch bei der Untersuchung des Volleipulvers ein Antiovalbumin-Antikörper verwendet, da Antikörper gegen Lipovitelline bzw. Phosvitin nicht zur Verfügung standen. Im Immunoblot der Eigelbpulverextrakte ist trotz der geringen Gehalte an Ovalbumin des Eidotters die zugehörige, charakteristische Bande zu erkennen, was mit Eiklaranteilen im Eigelbpulver erklärt werden kann. Zwar wird auch Conalbumin (blauer Pfeil) detektiert, jedoch reagiert der Antikörper nicht auf die charakteristischen Eigelbproteine Lipovitellin und Phosvitin. Die Extraktionsmittel Tween 20<sup>®</sup> (Nr. 5), 8 M Urea (Nr. 6), „Extraction Buffer“ (Nr. 9) und SDS-Lösung (Nr. 10) zeigen im Immunoblot trotz Verdünnung die am stärksten ausgeprägten Ovalbumin-Banden. Diese Extraktionsmittel eignen sich somit zur Extraktion des Allergens Ovalbumin aus dem Eigelbpulvermaterial. Dieses Ergebnis entspricht der vorangegangenen Interpretation der Extraktionsausbeuten. „Coca´s Solution“ (Nr. 8) zeigt sich zudem sowohl bei den Volleipulverextrakten als auch bei den Eigelbpulverextrakten nicht für die Extraktion von Ovalbumin geeignet. Obwohl die Extraktionsmittel NaCl-Lösung (Nr. 4) und Wasser (Nr. 11) im silbergefärbten Elektropherogramm Banden auf Höhe des Ovalbumins zeigen, sind bei diesen Extraktionsmitteln keine charakteristischen Ovalbumin-Banden im Immunoblot zu erkennen. Die Beurteilung der Volleipulverextrakte im Immunoblot hat gezeigt, dass die Extraktionsmittel NaCl-Lösung (Nr. 4) und Wasser (Nr. 11) prinzipiell keinen negativen Einfluss auf die Antigenität des Ovalbumins haben. Somit weist das Fehlen der Banden im Immunoblot der Eigelbpulverextrakte darauf hin, dass diese Extrakte kein Ovalbumin enthalten. Dieses Ergebnis stimmt nicht mit den Ergebnissen der Beurteilung der Volleipulverextrakte überein. Bei der Extraktion von Volleipulver war es im Gegensatz zur Extraktion von Eigelbpulver durchaus möglich, mit den Extraktionsmitteln NaCl-Lösung (Nr. 4) und Wasser (Nr. 11) Ovalbumin zu isolieren. Hier wird deutlich, dass auch die Matrix auf die Extrahierbarkeit von Proteinen bzw. Allergenen Einfluss haben kann, insbesondere dann, wenn die Gehalte der zu untersuchenden Allergene sehr gering sind. Die Extraktionsmittel NaCl-Lösung (Nr. 4), „Coca´s Solution“ (Nr. 8) und Wasser (Nr. 11) sind somit nicht für die Extraktion von Ovalbumin aus Eigelbpulver heraus geeignet, obwohl sie durchaus geeignet sind, Ovalbumin aus Volleipulver zu extrahieren.

#### *Eiweißpulverextrakte*

Abbildung 4.2.8 zeigt das silbergefärbte Elektropherogramm der hergestellten Eiweißpulverextrakte ohne Matrixzusatz. Ebenfalls abgebildet ist der entsprechende Immunoblot derselben Extrakte.

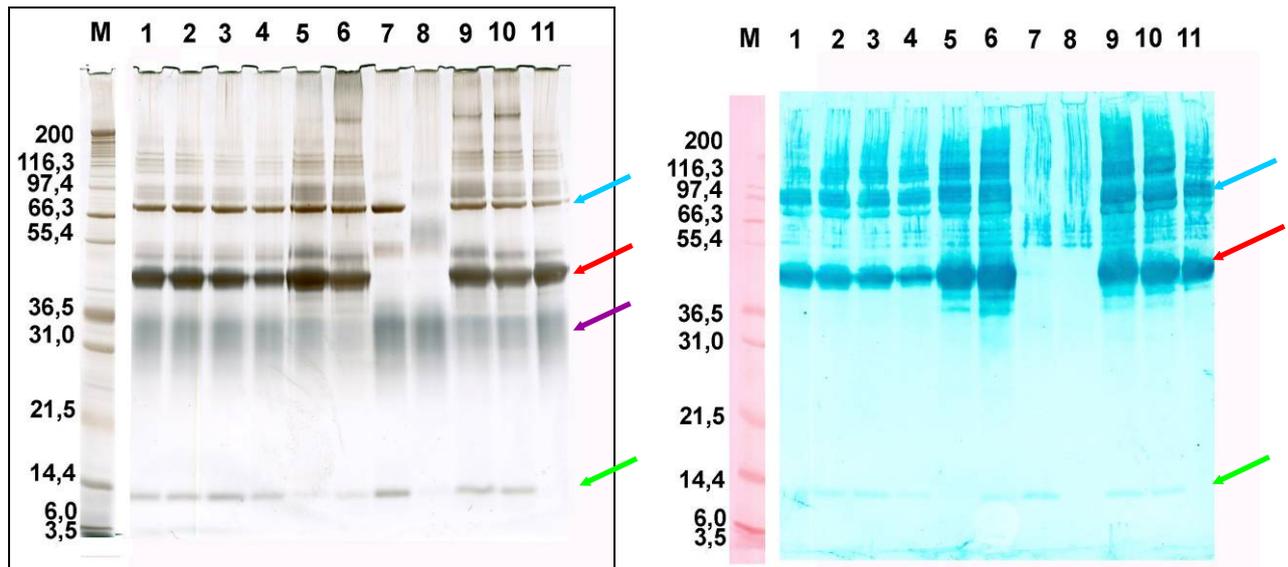


Abb. 4.2.8: links: unspezifische Silberfärbung eines Elektropherogrammes der Eiweißpulverextrakte; rechts: spezifische Immunfärbung eines Westernblots der Eiweißpulverextrakte; die Nummerierung entspricht der Bezeichnung der verwendeten Extraktionsmittel. Farbschlüssel: Conalbumin (76 kDa; blauer Pfeil); Ovalbumin (44,5 kDa; roter Pfeil); Ovomuroid (28 kDa; violetter Pfeil); Lysozym (14,3 kDa; grüner Pfeil); M (Molekulargewichtsmarker)

Die „Coca´s Solution“-Extrakte und die Extrakte des Acetatpuffers wurden unverdünnt eingesetzt, während die übrigen Extrakte in einer 1 / 1 Verdünnung analysiert wurden. Vergleicht man die Bandenmuster des Volleipulvers im silbergefärbten Elektropherogramm, sind Unterschiede erkennbar. Wie auch schon die Extraktionsausbeuten vermuten ließen, zeigen die Extrakte von Tween 20<sup>®</sup> (Nr. 5), 8 M Urea (Nr. 6), „Extraction Buffer“ (Nr. 9), SDS-Lösung (Nr. 10) und Wasser (Nr. 11) gegenüber den übrigen Extrakten sehr starke Ovalbumin-Banden, welches die guten Extraktionseigenschaften dieser Extraktionsmittel demonstriert. Die Extrakte aus Acetatpuffer (Nr. 7) und „Coca´s Solution“ (Nr. 8) zeigen sowohl im silbergefärbten Elektropherogramm als auch im Immunoblot keine bzw. nur eine sehr schwache Ovalbumin-Bande. Diese Extraktionsmittel sind somit nicht zur Extraktion von allergenen Komponenten aus Hühnereimaterialien geeignet.

Diese Ergebnisse der unspezifischen Färbung spiegeln sich in der Auswertung des entsprechenden Immunoblots wieder. Wie auch bei den Untersuchungen von Volleipulver und Eigelbpulver wurde bei der Immunfärbung ein Antiovalbumin-Antikörper verwendet, da es sich bei Ovalbumin um das mengenmäßig am stärksten vertretene Protein im Hühnereiweiß handelt. Auch bei der spezifischen Immunfärbung, zeigen die Extrakte Tween 20<sup>®</sup> (Nr. 5), 8 M Urea (Nr. 6), „Extraction Buffer“ (Nr. 9), SDS-Lösung (Nr. 10) und Wasser (Nr. 11) sehr starke Ovalbumin-Banden. Diese Extraktionsmittel extrahieren Ovalbumin unverändert, d.h. ohne die Antigenität bezüglich des verwendeten Antikörpers zu beeinflussen, mit großer Ausbeute. Im höhermolekularen Bereich ist sowohl im silbergefärbten Gel als auch im Immunoblot eine Bande zu erkennen, die dem Conalbumin zuzuordnen ist (blauer Pfeil). Im höhermolekularen Bereich zeigen sich aber auch bei allen Extraktionsmitteln unspezifische Bindungen, die sich als blaue Spur unterhalb des Probenlots zeigen. Diese zahlreichen Banden zu differenzieren und gezielt einem bestimmten Protein zuzuordnen war im Rahmen des Projektes nicht möglich.

#### 4.2.2.4. Extraktionsmittel-Screening Haselnussmaterialien

Die Abbildung 4.2.9 zeigt die relativen Wiederfindungen an Gesamtprotein der Extraktionsversuche des fetthaltigen und des entfetteten Haselnussmaterials ohne Matrixzusatz.

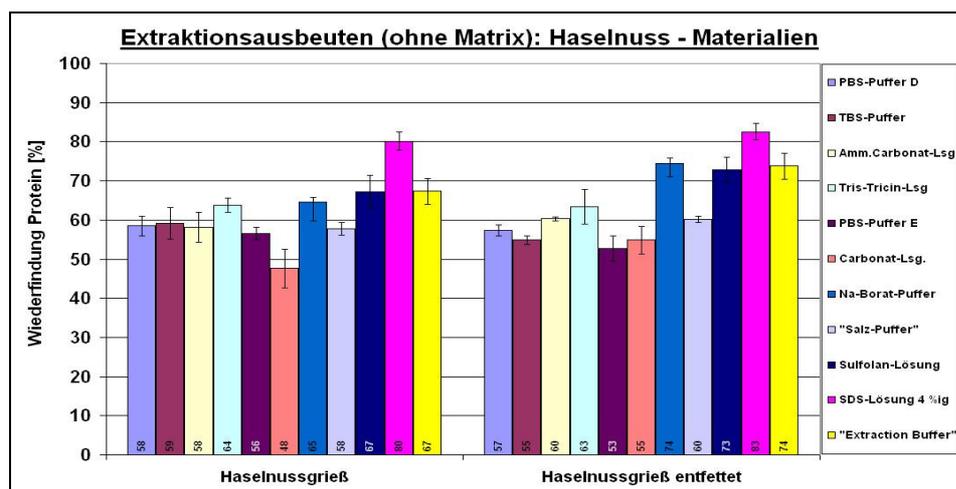


Abb. 4.2.9: Proteinausbeuten der Extraktionen der Haselnussmaterialien ermittelt mittels Lowry bzw. mittels Bradford

Dass die Extraktionsausbeuten der Extraktionsversuche der Haselnussmaterialien Wiederfindungen von etwa 70% nicht überschreiten, bedeutet nicht zwingend, dass die verwendeten Extraktionsmittel nur eine bedingte Eignung zur Isolierung der Proteine aufweisen. Wie schon bei der Methodenbeschreibung der Proteinquantifizierung nach Lowry bzw. Bradford beschrieben, ist die Auswahl des Proteins zur Kalibrierung ein kritischer Punkt. Durch eine etwaige geringere Farbentwicklung der Haselnussproteine im Vergleich zu der des BSA können hier geringe Wiederfindungen vorgetäuscht werden. Es ist aber dennoch möglich, die Eignung der verwendeten Extraktionsmittel innerhalb eines Produktes untereinander zu vergleichen. Bei der Extraktion des fetthaltigen Haselnussmaterials zeigen die Ammoniumcarbonat-Lösung (65%), die Tris-Tricin-Lösung (64%) und die Natriumborat-Lösung (64%) die höchsten Proteinausbeuten. Bei der Extraktion des entfetteten Haselnussmaterials zeigen PBS-Puffer D (69%) und die Ammoniumcarbonat-Lösung (68%) die höchsten Extraktionsausbeuten.

Vergleicht man die Ausbeuten eines Extraktionsmittels von fetthaltigem mit denen des entfetteten Materials, zeigt sich, dass bei Verwendung des PBS-Puffers D (Nr. 1) und des TBS-Puffers (Nr. 2) höhere Proteinausbeuten bei Verwendung des entfetteten Haselnussmaterials erreicht werden können. Im Gegensatz extrahieren der PBS-Puffer E und die Carbonatlösung weniger Protein aus dem entfetteten Material als aus dem fetthaltigen Material. Da die Unterschiede in den Extraktionsausbeuten der Extraktionen von fetthaltigem und entfettetem Haselnussmaterial sehr gering sind, ist es offensichtlich, dass bezüglich der Proteinausbeute eine Entfettung des Materials bei Extraktionen ohne einen Zusatz an Matrix nicht notwendig ist.

#### *Extrakte des fetthaltigen Haselnussmaterials*

Die Proteinmuster der fetthaltigen Haselnussgrießextrakte, die ohne Matrixzusatz angefertigt worden sind, werden sowohl in einem silbergefärbten Elektropherogramm als auch in einem Immunoblot in Abbildung 4.2.10 gezeigt. Hierzu wurden alle Extrakte in einer 1 / 1 Verdünnung verwendet.

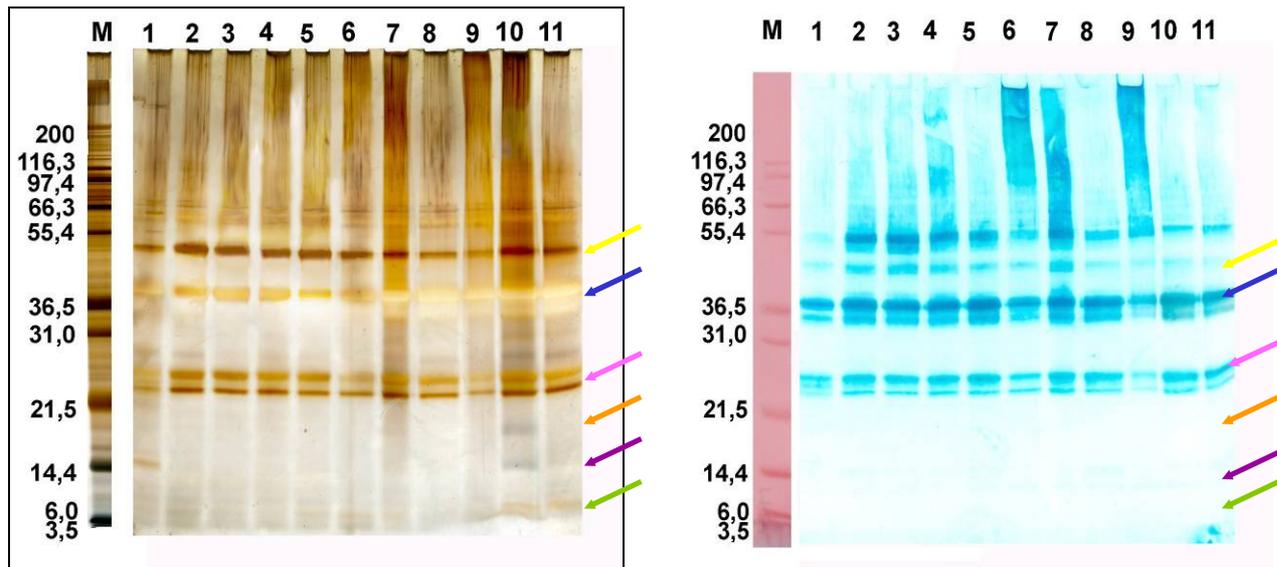


Abb. 4.2.10: links: unspezifisch Silberfärbung eines Elektropherogrammes der Extrakte des fetthaltigen Haselnussmaterials; rechts: Spezifische Immunfärbung eines Westernblots der Extrakte des fetthaltigen Haselnussmaterials; die Nummerierung entspricht der Bezeichnung der verwendeten Extraktionsmittel. Farbschlüssel: Cor a 8 (9 kDa; grüner Pfeil); Cor a 2 (14 kDa; violetter Pfeil); Cor a 1 (18 kDa; oranger Pfeil); Cor a 9 (40 kDa; blauer Pfeil); Cor a 11 (48 kDa; gelber Pfeil); M (Molekulargewichtsmarker)

Je nach Extrakt können z.T. alle bzw. nur einige der in der Literatur beschriebenen Haselnussallergene zugeordnet werden. Über den Vergleich mit dem Molekulargewichtsmarker konnten das Hauptallergen der Haselnuss Cor a 1 (oranger Pfeil) und die Minorallergene Cor a 8 (grüner Pfeil) Cor a 2 (violetter Pfeil), Cor a 9 (blauer Pfeil) sowie Cor a 11 (gelber Pfeil) zugeordnet werden. Bezüglich der Mengenverhältnisse der verschiedenen Haselnussproteine in der Haselnuss bzw. in der gerösteten Haselnuss sind keine Angaben bekannt. Hauptallergene sind im Vergleich zu Minorallergenen nicht zwingend in größeren Mengen in dem entsprechenden Ausgangsmaterial vorhanden, da die Einteilung in Haupt- bzw. Nebenallergene allein in der Reaktion der Gesamtheit der Allergiker begründet ist. Ebenso ist zu berücksichtigen, dass der verwendete tierische Antikörper nicht zwingend am stärksten die Proteine detektiert, die als Hauptallergene eingestuft sind.

Die Beurteilung der Ausbeuten der Extraktionen des Haselnussmaterials ohne Matrixzusatz hat ergeben, dass sich diese bei allen verwendeten Extraktionsmitteln nur sehr wenig unterscheiden, während 4%ige SDS-Lösung mit Abstand die höchste Wiederfindungsrate an Protein ermitteln ließ. Die Auswertung des silbergefärbten Elektropherogramms ergibt, dass die Unterschiede in Bandenintensität und Bandenzahl der unterschiedlichen Extraktionsmittel prinzipiell sehr gering sind. Entsprechend der hohen Extraktionsausbeute der SDS-Lösung (Nr. 10) weist dieses Extraktionsmittel im Vergleich zu den übrigen Extrakten zwei zusätzliche Banden, die des Cor a 1 und des Cor a 2, auf. Neben SDS-Lösung zeigen Ammoniumcarbonat-Lösung (Nr. 3) und die NaCl-Lösung (Nr. 8) ebenfalls sehr intensiv gefärbte Banden im silbergefärbten Gel. Die schwächste Bandenintensität und damit auch die geringste Eignung zur Extraktion zeigen der PBS-Puffer D (Nr. 1) und die Carbonat-Lösung (Nr. 6).

Für alle Extrakte, die mit Haselnussmaterial hergestellt worden sind, wurde bei der Immunfärbung ein Antihaselnuss-Corylin-Antikörper verwendet. Laut Hersteller reagiert dieser Antikörper spezifisch auf die Gesamtheit der Haselnussproteine. Da reine Haselnussproteine nicht verfügbar waren, konnte jedoch nicht überprüft werden, inwieweit der Antikörper die einzelnen Haselnussproteine detektiert. Der Antihaselnuss-Corylin-Antikörper, der entsprechend Abbildung 4.2.10 offensichtlich auf Cor a 9 (blauer Pfeil) und Cor a 11 (gelber Pfeil) reagiert, detektiert mit sehr schwacher Intensität ebenfalls das Cor a 2 (violetter Pfeil). Die sehr intensive Doppelbande bei etwa 22 kDa (magentafarbener Pfeil) in Silberfärbung und

Immunoblot kann nicht zugeordnet werden, wenn auch der verwendete Antikörper auf dieses Protein offensichtlich reagiert.

In der Immunfärbung zeigt sich nun, dass die Extraktionsmittel zwar ähnliche Ausbeuten in der Proteinextraktion zeigten, aber Unterschiede in der detektierbaren Extraktzusammensetzung aufweisen. Zwar zeigen die SDS-Lösung (Nr. 10), die Ammoniumcarbonat-Lösung (Nr. 3) und die NaCl-Lösung (Nr. 8) die stärksten Banden aller Extraktionsmittel, jedoch wird deutlich, dass die SDS-Lösung und die NaCl-Lösung mehr Cor a 9 zu extrahieren vermögen, während die Ammoniumcarbonat-Lösung eine besonders starke Bande des Cor a 11 zeigt. Hier zeigt sich besonders deutlich, dass nicht nur unterschiedliche Matrices angepasste Extraktionsbedingungen erfordern, sondern dass ein Extraktionsmittel nicht gleichermaßen gut für alle Allergene eines Lebensmittels geeignet sein muss. Wie auch in der unspezifischen Silberfärbung zeigen die Carbonat-Lösung (Nr. 6) und der PBS-Puffer D die geringste Bandenfärbung.

#### Extrakte des entfetteten Haselnussmaterials

Abbildung 4.2.11 zeigt neben dem silbergefärbten Elektropherogramm der Extrakte des entfetteten Haselnussmaterials ebenfalls den entsprechenden Immunoblot. Die aufgetrennten Extrakte wurden sowohl im silbergefärbten Gel als auch im Immunoblot unverdünnt aufgetragen. Die Detektion im Immunoblot erfolgte mit einem Antihaselnuss-Corylin-Antikörper.

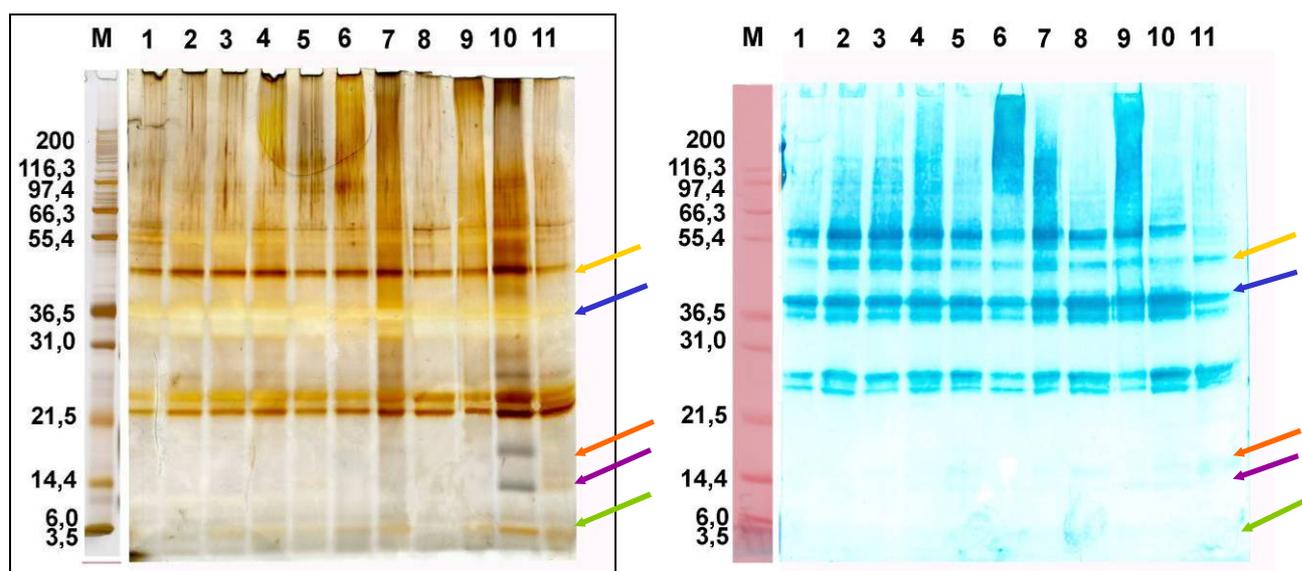


Abb. 4.2.11: links: unspezifische Silberfärbung eines Elektropherogrammes der Extrakte des entfetteten Haselnussmaterials; rechts: spezifische Immunfärbung eines Westernblots der Extrakte des entfetteten Haselnussmaterials; die Nummerierung entspricht der Bezeichnung der verwendeten Extraktionsmittel. Farbschlüssel: Cor a 8 (9 kDa; grüner Pfeil); Cor a 2 (14 kDa; violetter Pfeil); Cor a 1 (18 kDa; oranger Pfeil); Cor a 9 (40 kDa; blauer Pfeil); Cor a 11 (48 kDa; gelber Pfeil); M (Molekulargewichtsmarker)

Im silbergefärbten Elektropherogramm und auch im Immunoblot bestätigen sich die Banden der Extrakte des fetthaltigen Haselnussmaterials. Prinzipiell zeigen auch hier die untersuchten Extrakte des entfetteten Haselnussmaterials nur geringfügige Unterschiede in der Intensität der entsprechenden Banden. Wie auch bei der Extraktion des fetthaltigen Haselnussmaterials weist die SDS-Lösung (Nr. 10) im silbergefärbten Elektropherogramm im Vergleich zu den übrigen Extrakten zwei zusätzliche Banden, die des Cor a 1 und des Cor a 2, auf. Die SDS-Lösung (Nr. 10) vermag es ebenfalls im Vergleich zu den anderen Extraktionsmitteln, am meisten Cor a 8 (grüner Pfeil) zu extrahieren. Neben SDS-Lösung zeigen Ammoniumcarbonat-Lösung (Nr. 3) und die NaCl-Lösung (Nr. 8) auch insgesamt sehr intensiv ge-

färbte Banden im silbergefärbten Gel, wenn die Extrakte auch nicht die charakteristischen Banden der Allergene Cor a 1, Cor a 2 und nur schwach die Bande des Cor a 8 aufweisen. Die schwächste Bandenintensität und damit auch die geringste Eignung zur Extraktion zeigen der PBS-Puffer D (Nr. 1) und die Carbonat-Lösung (Nr. 6). Im Immunoblot sind ebenfalls für die SDS-Lösung (Nr. 10), die Ammoniumcarbonat-Lösung (Nr. 3) und die NaCl-Lösung (Nr. 8) die stärksten Banden sichtbar, während die Carbonat-Lösung (Nr. 6) und der PBS-Puffer D die geringste Bandenfärbung zeigt. Da sich die Ergebnisse aus den qualitativen Untersuchungen von sowohl fetthaltigem als auch entfettetem Haselnussmaterial ähneln, ist davon auszugehen, dass eine Entfettung des Haselnussmaterials weder einen positiven noch einen negativen Einfluss auf die Extraktionsergebnisse zu haben scheint. Die Extraktionsausbeuten können durch den geringeren Fettgehalt des entfetteten Materials weder erhöht werden noch wirkt sich die Behandlung mit n-Hexan negativ auf die Nachweisbarkeit im Immunoblot aus.

#### 4.2.2.5. Zusammenfassende Darstellung der Beurteilung der Extraktionsmittel

Tabelle 4.2.4 fasst die Ergebnisse der Beurteilung der Extraktionsmittel bezüglich der Extraktion von Milchproteinen bzw. -allergenen zusammen.

Tab. 4.2.4: Zusammenfassende Beurteilung der Extraktion von Milchproteinen bzw. -allergenen (Beurteilung: - = nicht geeignet; + = geeignet; ++ = gut geeignet; +++ = sehr gut geeignet)

Extraktion Milchmaterialien	Proteinausbeute (Lowry / Bradford)	Silberfärbung Elektropherogramm	Immunfärbung Westernblot
1. PBS-Puffer A	++	++	++
2. PBS-Puffer B	++	++	++
3. PBS-Puffer C	++	++	++
4. physiol. NaCl-Lösung	+	+	+
5. Tween 20 <sup>®</sup> 1%ig	+	++	+
6. Urea 8 M	++	+++	+++
7. Acetatpuffer	-	-	-
8. „Coca´s Solution“	-	+++	+++
9. „Extraction Buffer“	+++	+++	+++
10. SDS 4%ig	+++	+++	+++
11. Wasser	+	++	+

Bis auf den Acetatpuffer zeigten sich alle untersuchten Extraktionsmittel zumindest als geeignet, Proteine bzw. Allergene aus den Produkten Magermilchpulver, Süßmolkenpulver und Sauermolkenpulver zu extrahieren. Im Allgemeinen gute Eignung zeigten die verwendeten PBS-Puffer A, B und C sowie die phenolhaltige „Coca´s Solution“. Die besten Extraktionseigenschaften bei sowohl Proteinquantifizierung als auch dem Protein- bzw. Allergenmuster wurden mit 4%iger SDS-Lösung, „Extraction Buffer“ und 8 M Urea erhalten. Diese Extraktionsmittel lieferten hohe Proteinausbeuten, extrahierten ein breites Proteinspektrum und beeinflussten offensichtlich nicht die Antigenität der allergenen Proteine. An dieser Stelle soll darauf hingewiesen werden, dass sich 8 M Urea zur Extraktion von Proben mit Weizenstärkezusatz als nicht geeignet gezeigt hat. Urea bewirkte ein Aufquellen der Weizenstärke, so dass diese Extrakte aufgrund der hohen Viskosität nicht weiter analysiert werden konnten. Aufgrund der oben erläuterten Vorteile wurden die Extraktionsmittel 4%ige SDS-Lösung und „Extraction Buffer“ zur Optimierung des pH-Wertes des Extraktionsmittels und der Extraktionstemperatur herangezogen.

Die Beurteilung der zur Extraktion der Eiprodukte Vollei-, Eigelb- und Eiweißpulver verwendeten Extraktionsmittel wird in Tabelle 4.2.5 zusammengefasst.

Tab. 4.2.5: Zusammenfassende Beurteilung der Extraktion von Eiproteinen bzw. –allergenen (Beurteilung: - = nicht geeignet; + = geeignet; ++ = gut geeignet; +++ = sehr gut geeignet)

Extraktion Eimaterialien	Proteinausbeute (Lowry / Bradford)	Silberfärbung Elektropherogramm	Immunfärbung Westernblot
1. PBS-Puffer A	-	+	+
2. PBS-Puffer B	-	+	+
3. PBS-Puffer C	-	-	-
4. physiol. NaCl-Lösung	-	+	+
5. Tween 20 <sup>®</sup> 1%ig	++	+++	+++
6. Urea 8 M	++	+++	+++
7. Acetatpuffer	-	+	+
8. „Coca´s Solution“	-	-	-
9. „Extraction Buffer“	+++	+++	+++
10. SDS 4%ig	+++	+++	+++
11. Wasser	+	+	++

Auch bei der Extraktion der Eimaterialien zeigten sich 4%ige SDS-Lösung und „Extraction Buffer“ als die Extraktionsmittel mit den besten Extraktionseigenschaften zur Isolierung von Eiproteinen bzw. -allergenen.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen der Extraktion der Milchprodukte zeigten sich bei der Extraktion der Eimaterialien die meisten Extraktionsmittel als nicht zur Isolierung von Eiproteinen bzw. -allergenen geeignet. Die PBS-Puffer A, B und C, die physiologische NaCl-Lösung, der Acetatpuffer und die phenolhaltige „Coca´s Solution“ wiesen nicht nur geringe Proteinausbeuten bei der Extraktion von Eimaterial auf, sondern zeigten auch verglichen mit 4%iger SDS-Lösung und „Extraction Buffer“ schwächere Banden sowohl in unspezifischer Detektion im Elektropherogramm als auch im Immunoblot. Eine dennoch gute Eignung zur Extraktion zeigten 8 M Urea und Tween 20<sup>®</sup>. Aufgrund der oben erläuterten Vorteile wurden die Extraktionsmittel 4%ige SDS-Lösung und „Extraction Buffer“ zur Optimierung des pH-Wertes des Extraktionsmittels und der Extraktionstemperatur herangezogen.

Die zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse der Extraktion des fetthaltigen und der entfetteten Haselnussgrießes zeigt Tabelle 4.2.6.

Tab. 4.2.6: Zusammenfassende Beurteilung der Extraktion von Haselnussproteinen bzw. –allergenen (Beurteilung: - = nicht geeignet; + = geeignet; ++ = gut geeignet; +++ = sehr gut geeignet)

Extraktion Haselnussmaterialien	Proteinausbeute (Lowry / Bradford)	Silberfärbung Elektropherogramm	Immunfärbung Westernblot
1. PBS-Puffer D	+	-	-
2. TBS-Puffer	+	+	+
3. Ammon .carb.-Lösung	+	++	++
4. Tris-Tricin-Lösung	+	+	+
5. PBS-Puffer E	+	+	+
6. Carbonat-Lösung	-	-	-
7. Na-Borat-Lösung	++	+	+
8. NaCl-Lösung	+	++	++
9. Sulfolan-Puffer	++	+	+
10. SDS 4%ig	+++	+++	+++
11. „Extraction Buffer“	++	+	+

Insgesamt zeigten hier die Extraktionsmittel PBS-Puffer D, TBS-Puffer, die Tris-Tricin-Lösung und die Carbonat-Lösung keine gute Eignung zur Extraktion der Haselnussproteine bzw. -allergene. Ammoniumcarbonat-Lösung, Natriumborat-Lösung, NaCl-Lösung, Sulfolan-Lösung und „Extraction Buffer“ zeigten hingegen relativ gute Extraktionseigenschaften. Mit Abstand die besten Eigenschaften bezüglich der Extraktion von Haselnussmaterial zeigte wie auch bei den Milch- und Eiprodukten die 4%ige SDS-Lösung. Daher wurde diese zur Optimierung des pH-Wertes des Extraktionsmittels und

der Extraktionstemperatur herangezogen. Als zweites Extraktionsmittel wurde Ammoniumcarbonat-Lösung ausgewählt, da es in der Gruppe der gut geeigneten Extraktionsmittel gemeinsam mit der NaCl-Lösung die stärksten Bandenfärbungen bei der unspezifischen und spezifischen Detektion der Proteine zeigte. Da bei der Optimierung von pH-Wert und Extraktionstemperatur nur jeweils zwei Extraktionsmittel weitergeführt werden sollten, wurde die NaCl-Lösung nicht weiter berücksichtigt.

#### **4.2.3. Optimierung von Extraktionstemperatur und pH-Wert des Extraktionsmittels**

Zur Untersuchung, inwieweit die Extrahierbarkeit (Proteinausbeute) bzw. die Antigenität der Proteine von Milch-, Ei- und Haselnussmaterialien durch den pH-Wert des Extraktionsmittels und der Extraktionstemperatur beeinflusst wird, wurden unter Variation dieser beiden Extraktionsparameter Extrakte hergestellt und sowohl eine Proteinquantifizierung als auch eine qualitative Untersuchung der Extrakte durchgeführt. Zur Herstellung der Extrakte aus Milch- und Eimaterialien wurden wie in Abschnitt 4.2.2.5 dargestellt die 4%ige SDS-Lösung und der „Extraction Buffer“ ausgewählt, für das fetthaltige sowie das entfettete Haselnussmaterial wurde neben 4%iger SDS-Lösung auch Ammoniumcarbonat-Lösung verwendet. Die Löslichkeit von Proteinen ist stark abhängig vom pH-Wert des verwendeten Extraktionsmittels, denn am isoelektrischen Punkt, dem pH-Wert, an dem die Summenladung des entsprechenden Proteins gleich Null ist, durchläuft es ein Minimum seiner Löslichkeit. Werden die Komponenten der 4%igen SDS-Lösung bzw. des „Extraction Buffer“ entsprechend der Literaturstellen (KATO et al., 2001, YEUNG et al., 2000) hergestellt, weist die SDS-Lösung einen pH-Wert von 8,5 und der „Extraction Buffer“ einen pH-Wert von 7,4 auf. Mit wenigen Ausnahmen liegen die isoelektrischen Punkte der zu untersuchenden Proteine im Sauren. Da eine Senkung der neutral bis leicht basischen pH-Werte der Extraktionsmittel eine Annäherung an die isoelektrischen Punkte bedeuten würde, wurden die pH-Werte für die Extraktionsversuche im stärker Basischen gewählt. Um einen relativ großen pH-Bereich abzudecken, wurden je Lösung zwei weitere pH-Werte gewählt, die sich um zwei bzw. vier Skalenteile vom eigentlichen pH-Wert unterschieden. Somit wurden zusätzlich zur SDS-Lösung pH 8,5 Extrakte mit SDS-Lösungen von pH 10,5 bzw. pH 12,5 angefertigt. Entsprechend wurde bei den Extraktionsversuchen zusätzlich zu einem „Extraction Buffer“ pH 7,4 Lösungen mit pH-Werten von 9,4 bzw. 11,4 angewendet.

Auch die Extraktionstemperatur kann einen entscheidenden Einfluss auf die Güte der Extraktion haben. So kann es bei einer Hitzebeanspruchung der Proteine zu deren Denaturierung kommen, was unter Umständen eine Zerstörung von Epitopen bewirken kann. Eine Veränderung der Epitopstruktur bedeutet in der Regel auch einen Verlust an Antigenität, der im Verlauf einer immunochemischen Analytik falsch negative Ergebnisse bewirken kann. Dennoch kann die Löslichkeit von Proteinen bei Temperaturen bis 40°C im Vergleich zu niedrigeren Temperaturen erhöht sein. Darüber hinaus können sehr fetthaltige Matrices während der Homogenisation die Erwärmung des Probenmaterials erfordern. Um zu untersuchen, inwiefern eine Variation der Extraktionstemperatur Einfluss auf die Extraktionsausbeute bzw. auf die Extraktionsqualität hat, wurden die Extraktionsversuche bei 4°C, bei Raumtemperatur (RT) und bei 40°C durchgeführt. Um zu ermitteln, ob die Extraktion allergenen Materials aus einer komplexen Matrix heraus z.B. eine längere Extraktionsdauer oder evtl. eine Erwärmung erfordert, sollten entsprechende Extraktionsversuche mit einem Zusatz an Matrix erfolgen. An dieser Stelle wurde die nachgestellte Backmischung, die neben Weizenstärke noch weitere Komponenten wie Zucker und Fettpulver enthielt, eingesetzt (Zusammensetzung Backmischung siehe Tabelle 4.2.1). Bei den Extraktionsversuchen mit Haselnussmaterial wurde in Anlehnung an Schokoladen bzw. schokoladenhaltige Produkte und andere fetthaltige Matrices Fettpulver als komplexe Matrix gewählt. Im Folgenden werden die erhaltenen Ergebnisse dargestellt und diskutiert.

##### **4.2.3.1. Temperatur- und pH-Wert Einfluss auf die Extraktion von Milchproteinen**

Die mittels Lowry ermittelten Proteinausbeuten der Extraktion sowohl bei unterschiedlichen pH-Werten als auch bei variiertem Extraktionstemperatur zeigt Abbildung 4.2.12.

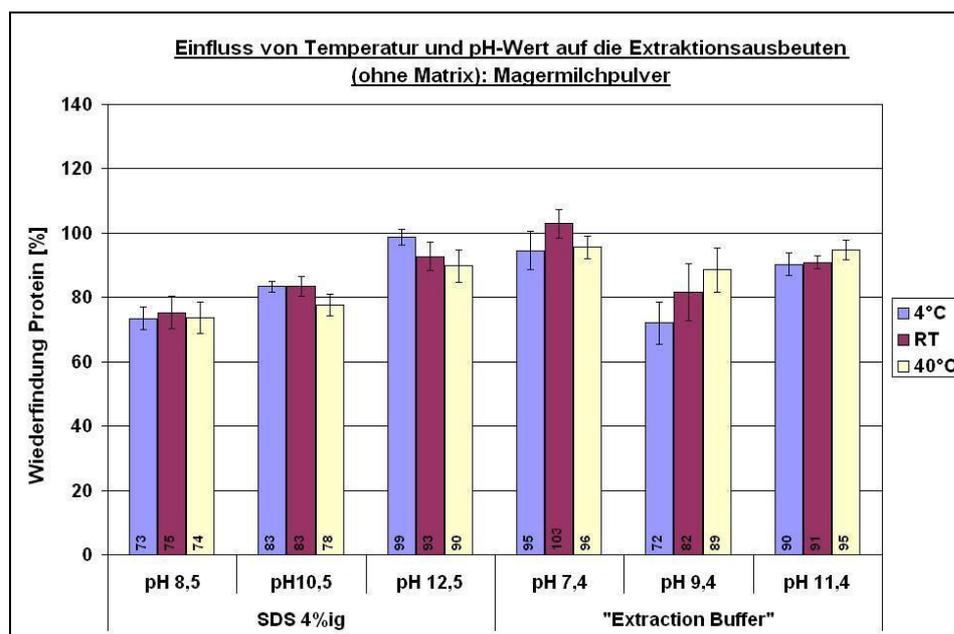


Abb. 4.2.12: Prozentuale Proteinausbeuten der Extraktion von Magermilchpulver mit 4%iger SDS-Lösung (pH 8,5, pH 10,5 und pH 12,5) und „Extraction Buffer“ (pH 7,4, pH 9,4 und pH 11,4) bei Extraktionstemperaturen von 4 °C, RT und 40 °C

Die erzielten Ausbeuten bewegen sich insgesamt in einem eher engen Bereich von 75% (SDS-Lösung pH 8,5) bis 102% („Extraction Buffer“ pH 7,4). Die vergleichbare Größenordnung der beiden untersuchten Extraktionsmittel zeigt, dass SDS-Lösung und „Extraction Buffer“ in vergleichbarer Weise geeignet sind, Milchproteine zu extrahieren.

Bei den Extraktionen mit 4%iger SDS-Lösung hingegen wurden bei einem pH-Wert von 8,5 Ausbeuten von etwa 70% erzielt, bei einem pH-Wert von 10,5 wurden Werte von ca. 80% ermittelt und bei einem pH-Wert von 12,5 lagen die Wiederfindungsraten bei ungefähr 90%. Diese Erhöhung der Wiederfindungsrate von etwa 10% je Erhöhung des pH-Niveaus war gegenüber der berechneten Standardabweichung nicht zu vernachlässigen.

Die Ermittlung der Wiederfindungsraten der Extraktionen von Süß- und Sauermolkenpulver ohne Matrixzusatz zeigt bei den Extraktionen mit SDS-Lösung ein ähnliches Ergebnis (vergl. Anhang Abbildung A 1 bzw. A 2). Wie auch bei den SDS-Extrakten des Magermilchpulvers ist bei den Süß- und Sauermolkenextrakten ebenfalls eine Steigerung der Proteinausbeute mit steigendem pH-Wert erkennbar. Bei den Extraktionen mit 4%iger SDS-Lösung und einem pH-Wert von 8,5 liegen die ermittelten Extraktionsausbeuten bei etwa 70%, bei einem pH-Wert von 10,5 sind sie mit etwa 90% ermittelt worden und bei einem pH-Wert von 12,5 wurden Proteinausbeuten von etwa 115% festgestellt. Die Zunahme der Ausbeuten bei steigendem pH-Wert von etwa 20 – 25% sind größer als die Schwankungsbreite der Standardabweichung der Dreifachbestimmung, so dass die Veränderung der Proteinausbeute durchaus mit der Veränderung des pH-Wertes begründet werden kann.

Beim Vergleich der Ausbeuten bei steigendem pH-Wert, so kann zwar bei den SDS-Extrakten mit zunehmendem pH-Wert auch eine Tendenz zu höheren Ausbeuten erkannt werden, jedoch zeigt das Extraktionsmittel „Extraction Buffer“ diese eindeutige Tendenz nicht. Bei den Extraktionen mit „Extraction Buffer“ ergaben sich bei den Extrakten aus Magermilchpulver die höchsten Wiederfindungen bei pH 7,4 mit einer Proteinausbeute von etwa 95%. Die geringsten Wiederfindungen zeigen sich bei diesem Extraktionsmittel bei pH 9,4 mit etwa 80%. Eine eindeutige Tendenz bezüglich der pH-Abhängigkeit der Proteinausbeuten ist bei der Extraktion von Milchprodukten mit „Extraction Buffer“ nicht erkennbar.

Werden die Proteinausbeuten innerhalb eines pH-Wertes bei Veränderung der Extraktionstemperatur verglichen, zeigen sich nur geringe Unterschiede in den Wiederfindungen. Die Größenordnung der Unterschiede in den Proteinausbeuten ist vergleichbar mit der der be-

rechneten Standardabweichung der Dreifachbestimmung, so dass kein Einfluss der Extraktionstemperatur auf die Proteinausbeute nachgewiesen werden kann.

Zur Untersuchung der erhaltenen Milchempakte wurde eine SDS-PAGE mit anschließender unspezifischer Silberfärbung und spezifischer Immunfärbung durchgeführt. Über die unspezifischen Detektionsmethoden der Proteine im Elektropherogramm wird die Zusammensetzung der Extrakte qualitativ beurteilt. In Abbildung 4.2.13 ist exemplarisch die Silber- und Immunfärbung der elektrophoretisch aufgetrennten Milchproteine dargestellt, die mit 4%iger SDS-Lösung aus Magermilchpulver extrahiert wurden.

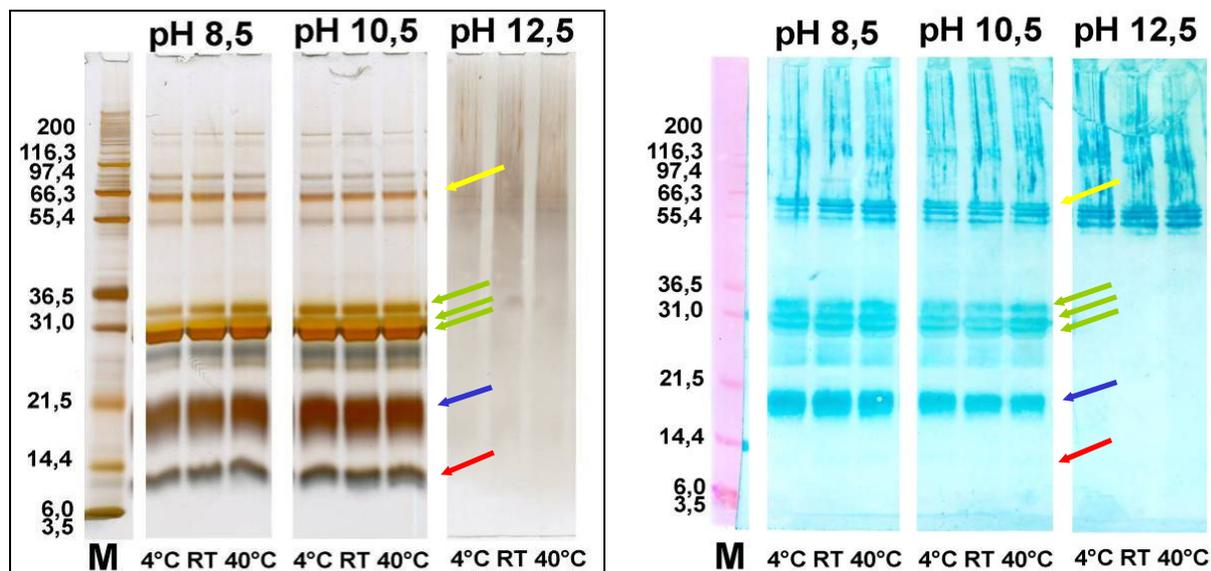


Abb. 4.2.13: links: Unspezifische Silberfärbung des Elektropherogrammes der SDS -Extrakte von Magermilchpulver (pH 8,5, pH 10,5 und pH 12,5) hergestellt bei 4°C, RT und 40°C (ohne Matrixzusatz); rechts: Spezifischer Immunoblot der SDS-Extrakte von Magermilchpulver (pH 8,5, pH 10,5 und pH 12,5) hergestellt bei 4°C, RT und 40°C (ohne Matrixzusatz); Farbschlüssel:  $\alpha$ -Lactalbumin (14,2 kDa; roter Pfeil);  $\beta$ -Lactoglobulin (18,3 kDa; blauer Pfeil); Casein-Gruppe (ca. 20 - 25 kDa; grüne Pfeile); BSA (66,3 kDa; gelber Pfeil); M (Molekulargewichtsmarker)

Das unspezifisch mittels Silberfärbung detektierte Elektropherogramm der Magermilchpulverextrakte zeigt alle charakteristischen Milchproteine:  $\alpha$ -Lactalbumin (roter Pfeil),  $\beta$ -Lactoglobulin (blauer Pfeil), die Gruppe der Caseine (grüne Pfeile) und Serumalbumin (gelber Pfeil). Bemerkenswert ist, dass bei allen Milchpulverextrakten, die mit der SDS-Lösung pH 12,5 hergestellt worden sind, mittels Silberfärbung keine Proteinbanden detektiert werden können. Offensichtlich wurden die Allergene bei diesem pH-Wert abgebaut, was allerdings im Widerspruch zu den bei der Proteinquantifizierung ermittelten hohen Wiederfindungsraten eben dieser Extrakte steht. Nach FREIMUTH & KRAUSE (1981) findet bei pH-Werten von etwa 12 eine alkalische Hydrolyse statt, bei der die Proteinketten zu Peptiden abgebaut werden. Da im Elektropherogramm keine Banden erkennbar sind, liegt die Vermutung nahe, dass die Proteine zu sehr kurzen Peptiden abgebaut worden sind, deren Wanderungsgeschwindigkeit größer als die des Lauffront anzeigenden Farbstoffs CBB-G gewesen ist. Peptide, die die molekulare Masse des CBB-G von 854 g/mol unterschreiten, wandern theoretisch während der Elektrophorese so schnell, dass sie bei Beendigung der Trennung das Gel bereits verlassen haben, und somit nicht mehr detektierbar sind. Wird ein Molekulargewicht von 30 bis 100 g/mol für Aminosäuren angenommen, unterschreiten Peptide mit etwa 10 - 30 Aminosäuren die Masse des CBB-G-Farbstoffs. Solche Peptide bzw. einzelne Aminosäuren sind aber dennoch mit der Farbreaktion während der Proteinquantifizierung nach Lowry detektierbar, was die hohen Ausbeuten der vermessenen Magermilchextrakte erklärt. Darüber hinaus sind bei den Extrakten, die mit SDS-Lösung pH 8,0 bzw. 10,0 aus Magermilchpulver hergestellt worden sind, keine Unterschiede in der Bandeninten-

sität erkennbar. Hier zeigt sich, dass bei der Extraktion von Magermilchpulver eine Erhöhung des pH-Wertes keine verbesserte Extraktion bedeutet.

Zur Immunfärbung des Westernblots wurde ein Antikörper verwendet, der sowohl die Molkenproteine  $\alpha$ -Lactalbumin und  $\beta$ -Lactoglobulin als auch die Caseine detektiert (vergl. Abbildung 4.2.13). Entsprechend der unspezifischen Silberfärbung sind auch bei der spezifischen Färbung keine Proteine bei den aufgetrennten Extrakten von pH 12,5 detektierbar. Bei den elektrophoretisch aufgetrennten SDS-Extrakten der pH-Werte 8,5 und 10,5 lassen sich jedoch charakteristische Milchproteine anfärben. Sowohl die charakteristischen Banden der Casein-Gruppe (grüne Pfeile) als auch des  $\beta$ -Lactoglobulin (blauer Pfeil) sind deutlich zu sehen, wobei der Unterschied der Bandenintensität beim Vergleich der Extrakte bei pH 8,5 und pH 10,5 erkennbar ist und sich umgekehrt zu den Proteinausbeuten verhält. Die bei der Proteinquantifizierung festgestellte steigende Ausbeute mit steigendem pH-Wert können weder in der unspezifischen noch in der spezifischen Färbung bestätigt werden, da hier die intensivsten Banden der Molkenproteine bei pH 8,5 detektiert werden können. Die Immunfärbung lässt also erkennen, dass sich hier ein steigender pH-Wert negativ auf die Antigenität auswirkt.

Bei den parallel zu den Magermilchpulverextrakten untersuchten Extrakten aus Süßmolken- und Sauermolkenpulver zeigt sich insgesamt ein vergleichbares Ergebnis. Trotz relativ hoher Wiederfindungsraten konnten bei den Extrakten mit einem pH-Wert von 12,5 keine Proteinbanden detektiert werden, während die Extrakte mit niedrigeren pH-Werten die charakteristischen Molkenproteine zeigten (vergl. Anhang Abbildung A 3 bzw. A 4). Ein Unterschied in den Wiederfindungsraten der SDS-Extrakte mit pH-Werten 8,5 bzw. 10,5 konnte auch hier sowohl in der unspezifischen als auch der spezifischen Färbung nicht bestätigt werden, was einen Widerspruch zu den Ergebnissen der Proteinquantifizierung darstellt. Bei der Proteinquantifizierung konnte ein mehr oder weniger starker Zuwachs in der Wiederfindungsrate mit steigendem pH-Wert ermittelt werden. Bei den Molkenprodukten war dieser Effekt insgesamt stärker ausgeprägt als bei der Extraktion von Magermilchpulver. Bei der Proteinquantifizierung nach Lowry handelt es sich um einen Summenparameter, der nicht zwischen Proteinen, Peptiden bzw. Aminosäuren differenziert. Findet ein gewisser Proteinabbau durch alkalische Hydrolyse statt, werden die Abbauprodukte durch die Farbreaktion der photometrischen Bestimmung miterfasst. Kurze Peptide bzw. Aminosäuren scheinen einen größeren Responsefaktor aufzuweisen als Proteine mit höheren Molekulargewichten. Mit dieser These lassen sich hohe Wiederfindungsraten bei 4%iger SDS-Lösung erklären, in der nachweislich keine intakten Proteine mehr vorhanden sind. Vermutlich werden durch einen beginnenden Proteinabbau, der durch die hier verwendeten Extraktionszeiten von mehr als 14 Stunden begünstigt wurde, höhere Ausbeuten vorgetäuscht.

Die Extrakte, die anstelle von 4%iger SDS-Lösung mit dem so genannten „Extraction Buffer“ angefertigt worden sind, zeigten im Allgemeinen keine bessere Eignung für die Isolierung von Milchallergenen als die Extraktion mit SDS-Lösung. Auch bei diesem Extraktionsmittel führte ein pH-Wert von 11,4 zu einer alkalischen Hydrolyse, so dass auch bei diesem Extraktionsmittel dieser pH-Wert als nicht geeignet beurteilt werden muss (vergl. Anhang Abbildung A 5 bis A 7). Auch hier konnten weder durch Silberfärbung noch durch Immunfärbung Proteinbanden detektiert werden. Vergleicht man die Leistungsfähigkeit der beiden verwendeten Extraktionsmittel 4%ige SDS-Lösung und „Extraction Buffer“ auf Grundlage von Proteinquantifizierung und Bandenmuster bzw. -intensität der unspezifischen und spezifischen Färbung, sind die Unterschiede nur gering. Beide Extraktionsmittel sind als durchaus geeignet zur Extraktion von Milchallergenen zu beurteilen, soweit das Milieu einen pH-Wert von 11 bzw. 12 nicht übersteigt.

Um den Einfluss von pH-Wert und Extraktionstemperatur auf die Extraktzusammensetzung auch unter möglichst produktnahen Bedingungen zu beurteilen, wurden ebenfalls Extrakte angefertigt, die neben Magermilchpulver, Süßmolkenpulver und Sauermolkenpulver einen Zusatz an Backmischungsmatrix enthielten (Zusammensetzung Backmischung siehe Tabelle 4.2.1). Nach Anfertigung der Extrakte wurde hier ebenfalls eine Proteinquantifizierung durchgeführt, um die entsprechenden Ausbeuten zu beurteilen. Da, wie bereits oben beschrieben,

SDS-Extrakte mit pH-Werten von über 12,5 und „Extraction Buffer“ Extrakte mit einem pH-Wert über 11,4 keine Eignung zur Isolierung der Milchallergene zeigten, wurden die Extraktionsmittel mit diesen pH-Werten nicht weiter verwendet. Die berechneten Proteinausbeuten der Extrakte von 4%iger SDS-Lösung (pH 8,5 und 10,5) und „Extraction Buffer“ (pH 7,4 und 9,4) zeigt Abbildung 4.2.14.

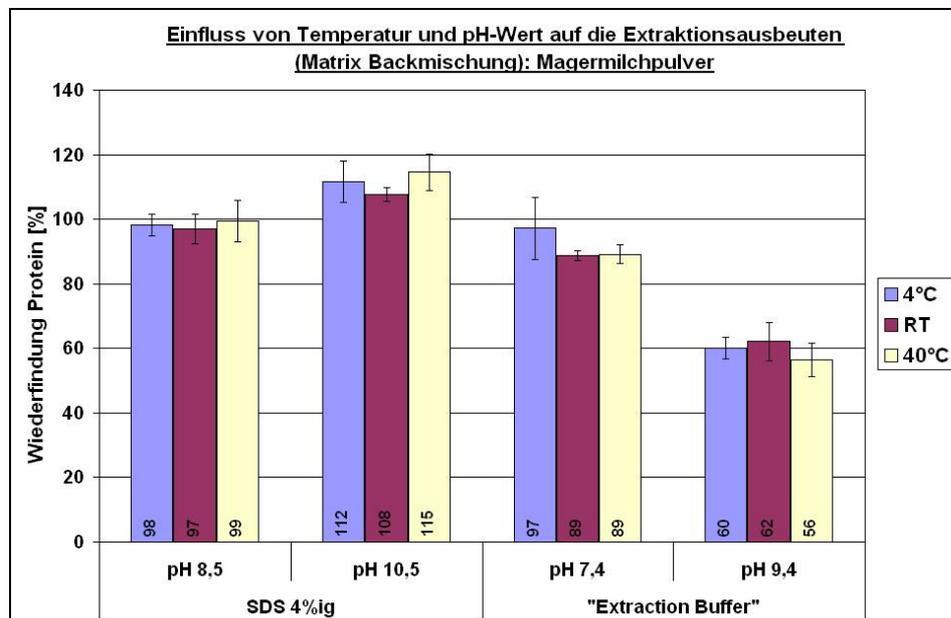


Abb. 4.2.14: Prozentuale Proteinausbeuten der Extraktion von Magermilchpulver mit 4%iger SDS-Lösung (pH 8,5, pH 10,5 und pH 12,5) und „Extraction Buffer“ (pH 7,4, pH 9,4 und pH 11,4) unter Zusatz von Backmischung bei Extraktionstemperaturen von 4°C, RT und 40°C

Vergleicht man die Proteinausbeuten der Extrakte mit und ohne Matrix (vergl. Abbildung 4.2.12 und 4.2.14), zeigt sich, dass die Wiederfindungen der SDS-Extrakte mit Matrixzusatz (ca. 95 - 110%) höher liegen als die der Extrakte ohne Matrixzusatz (ca. 70 bzw. 80%), während die Extraktionsausbeuten mit „Extraction Buffer“ bei einem Zusatz an Backmischung geringere Ausbeuten (ca. 60 - 90%) als die Extrakte ohne Matrixzusatz (ca. 80 - 90%) aufweisen. Die hier dargestellten Werte lassen vermuten, dass sich ein Zusatz an Backmischung positiv auf die Extraktionsausbeute bei einer Extraktion mit 4%iger SDS-Lösung auswirkt, während ein solcher Matrixzusatz die Ausbeuten bei einer Extraktion mit „Extraction Buffer“ erniedrigt. Da die Ergebnisse der Proteinquantifizierung auf einer Dreifachbestimmung basieren, handelt es sich bei dieser Interpretation lediglich um eine Tendenz, die nicht hinreichend statistisch gesichert ist.

Des Weiteren bestätigen sich die Ergebnisse der Proteinquantifizierung der Magermilchpulverextrakte ohne Matrixzusatz, da auch hier die Unterschiede der Ausbeuten beim Vergleich unterschiedlicher Extraktionstemperaturen lediglich Unterschiede in der Größenordnung der Standardabweichung zeigen. Beim Vergleich der ermittelten Proteinausbeuten lässt sich kein Einfluss der Extraktionstemperatur auf die Wiederfindungsraten erkennen. Des Weiteren wird hier ebenfalls durch Erhöhung des pH-Wertes der SDS-Lösung auch unter Verwendung der Matrix Backmischung eine höhere Proteinausbeute erzielt. Die Proteinquantifizierung der Extrakte von Süß- und Sauermilchpulver mit Matrixzusatz lassen entsprechend der Ergebnisse der Extraktion des Magermilchpulvers unter Zusatz von Backmischung ebenfalls keinen Einfluss von Extraktionstemperatur und pH-Wert des Extraktionsmittels erkennen (vergl. Anhang Abbildung A 8 und A 9).

Die Extrakte, die unter Verwendung der Matrix Backmischung aus den zu untersuchenden Milchprodukten hergestellt worden sind, wurden zur qualitativen Beurteilung elektrophoretisch getrennt und sowohl unspezifisch als auch spezifisch gefärbt. Da, wie oben diskutiert, kein Hinweis auf einen Temperatureinfluss auf die Extraktionsgüte erkennbar war, wurde auf

eine elektrophoretische Trennung der Extrakte, die (unter Backmischungszusatz) bei 4 °C angefertigt worden sind, zunächst verzichtet. Die silbergefärbten Elektropherogramme bzw. Immunoblots zeigt Abbildung 4.2.15.

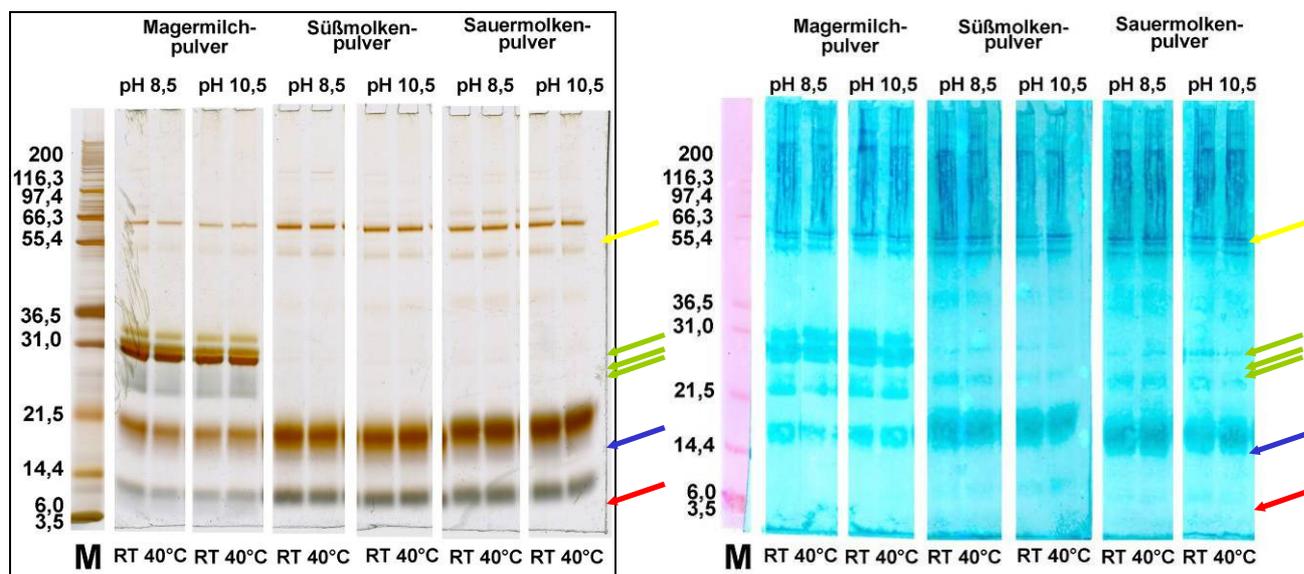


Abb. 4.2.15: links: Unspezifische Silberfärbung des Elektropherogrammes der SDS-Extrakte (pH 8,5 und pH 10,5) der Milchprodukte hergestellt bei RT bzw. 40 °C mit Backmischungszusatz; rechts: Spezifischer Immunoblot der SDS-Extrakte (pH 8,5 und pH 10,5) der Milchprodukte hergestellt bei RT bzw. 40 °C mit Backmischungszusatz; Farbschlüssel:  $\alpha$ -Lactalbumin (14,2 kDa; roter Pfeil);  $\beta$ -Lactoglobulin (18,3 kDa; blauer Pfeil); Ca-sein-Gruppe (ca. 20 - 25 kDa; grüne Pfeile); BSA (66,3 kDa; gelber Pfeil); M (Molekulargewichtsmarker)

Bei den elektrophoretisch aufgetrennten Extrakten der untersuchten Milchprodukte die bei unterschiedlichen pH-Werten bzw. bei unterschiedlichen Extraktionstemperaturen angefertigt worden sind, zeigt sich kein Unterschied in der Bandenintensität. Unter Verwendung der komplexen Matrix einer nachgestellten Backmischung zeigte sich, dass eine Veränderung der Temperatur bzw. eine Variation des pH-Wertes des Extraktionsmittels keine Verbesserung der Extraktionsqualität lieferte. Wenn auch die Veränderung von pH-Wert und Temperatur keinen positiven Einfluss weder auf die Proteinausbeute noch auf die Qualität der Extrakte lieferte, konnte jedoch gezeigt werden, dass die Milchallergene eine gewisse Stabilität gegenüber der Veränderung dieser Parameter aufwiesen. Wird ein milder pH-Wert von 8,5 der SDS-Lösung auf 10,5 erhöht, hat dieses basische Milieu keinen negativen Einfluss auf die Extrahierbarkeit oder die Antigenität der Milchallergene. Auch eine Erhitzung der Milchallergene auf bis zu 40 °C über einen Zeitraum von ca. 14 Stunden beeinträchtigt die Antigenität dieser Allergene nicht nachweisbar. Diese Stabilität der Milchallergene zeigt sich ebenfalls in den Ergebnissen der Extraktionsversuche mit „Extraction Buffer“ als Extraktionsmittel. Wurde der pH-Wert dieses Extraktionsmittels bis auf 11,4 erhöht, bzw. die Extraktionstemperatur von 4 °C bis 40 °C erhöht, konnte bezüglich der Antigenität auch unter Verwendung einer komplexen Matrix keine Veränderung der Proteine festgestellt werden (vergl. Anhang Abbildung A 10).

Dass ein Zusatz an Backmischung bei der Extraktion von Milchprodukten eine Erhöhung der Proteinausbeuten zur Folge hat, kann bei vergleichender Beurteilung der Abbildungen 4.2.13 und 4.2.15 nicht bestätigt werden. Die Proteinbanden der Extrakte mit Backmischungszusatz sind im Silbergel und auch im Immunoblot schwächer ausgeprägt als die Banden der Extrakte ohne Matrixzusatz, was für eine geringere Proteinkonzentration spricht. Ob ein Einfluss der Matrix Backmischung auf die Ausbeute an Protein bzw. Allergen während der Extraktion vorliegt, konnte auf Basis einer Dreifachbestimmung nicht abschließend geklärt werden.

#### 4.2.3.2 Temperatur- und pH-Wert Einfluss auf die Extraktion von Eiproteinen

Die mittels Lowry ermittelten Proteinausbeuten der Extraktion von Volleipulver sowohl bei unterschiedlichen pH-Werten als auch Extraktionstemperaturen zeigt Abbildung 4.2.16.

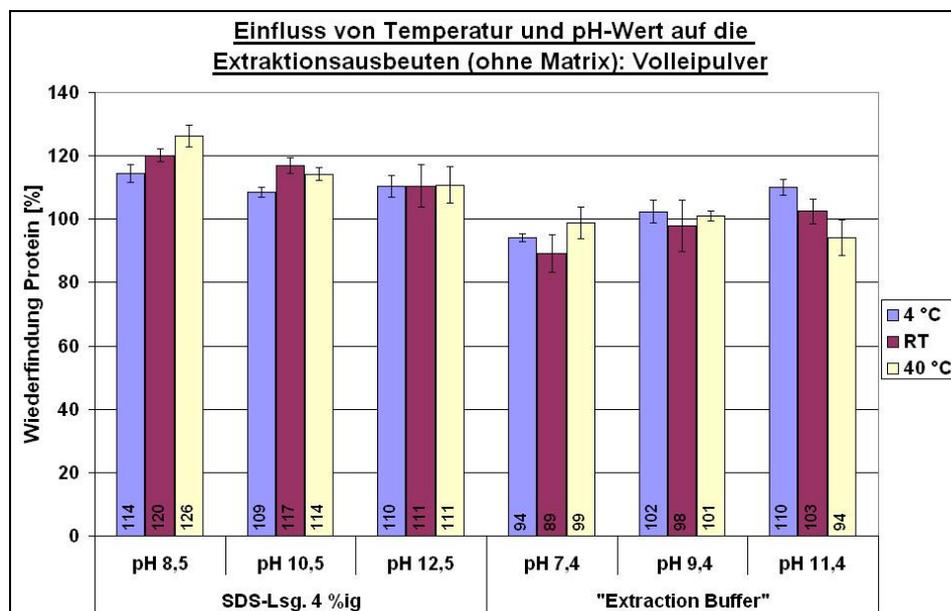


Abb. 4.2.16: Prozentuale Proteinausbeuten der Extraktion von Volleipulver mit 4%iger SDS-Lösung (pH 8,5, pH 10,5 und pH 12,5) und „Extraction Buffer“ (pH 7,4, pH 9,4 und pH 11,4) bei Extraktionstemperaturen von 4 °C, RT und 40 °C

Die erzielten Ausbeuten bewegen sich in einem Bereich von 89 bis 126%. Da die Unterschiede der Ausbeuten von SDS-Lösung und „Extraction Buffer“ relativ gering sind, zeigen sich beide Extraktionsmittel als geeignet, Eiproteine zu extrahieren.

Werden die Proteinausbeuten der Extrakte verglichen, die bei derselben Extraktionstemperatur aber unterschiedlichen pH-Werten angefertigt worden sind, zeigt sich bei der Extraktion mit 4%iger SDS-Lösung mit zunehmendem pH-Wert eine Abnahme der entsprechenden Proteinausbeuten. Während z.B. bei der Extraktion bei RT mit 4%iger SDS-Lösung pH 8,5 ein Wert von 120% ermittelt wurde und bei einem pH-Wert von 10,5 eine Ausbeute von 117%, konnte bei pH 12,5 ein entsprechender Wert von 111% bestimmt werden. Gegensätzlich zu der Tendenz der Ergebnisse, die mit der Extraktion mit 4%iger SDS-Lösung ermittelt worden sind, zeigen sich die Ergebnisse der Extraktionen mit „Extraction Buffer“. Hier fand scheinbar eine Zunahme der Extraktionsausbeuten mit zunehmendem pH-Wert statt. So wurde bei der Extraktion von Volleipulver bei RT bei pH 7,4 eine Proteinausbeute von 89%, bei einem pH-Wert von 9,4 eine Ausbeute von 98% bestimmt und bei pH 11,4 eine Wiederfindungsrate von 103% berechnet. Die Interpretation der Proteinausbeuten lässt vermuten, dass sich bei einer Extraktion mit „Extraction Buffer“ ein steigender pH-Wert, bei der Extraktion mit SDS ein geringerer pH-Wert positiv auf die Extraktionsqualität auswirkt.

Beim Vergleich der Größenordnung von Standardabweichung der Dreifachbestimmung und den Differenzen in den prozentualen Proteinausbeuten wird deutlich, dass es sich nur um sehr geringe Unterschiede handelt. Der pH-Einfluss auf die Extraktionsausbeuten scheint zwar tendenziell vorhanden zu sein, ist jedoch als äußerst schwach zu beurteilen. Während die Interpretation der Wiederfindungsraten der Extraktionen von Volleipulver noch eine gewisse Tendenz erkennen lässt, ist eine pH-Wert-Abhängigkeit der Ausbeuten der Extraktion von Eigelbpulver und Eiweißpulver nicht erkennbar (vergl. Anhang Abbildungen A 12 bzw. A 13). Zum Einen sind die Unterschiede in den Extraktionsausbeuten bei diesen Materialien ebenfalls gering, zum Anderen wurden die niedrigsten Ausbeuten prinzipiell entgegen der Tendenz bei einem mittleren pH-Wert ermittelt.

Werden die Ergebnisse innerhalb eines pH-Wertes bezüglich des Temperatureinflusses interpretiert, zeigt sich, wie bei den Ausbeuten der Extraktion von Magermilchpulver, dass die Unterschiede in den Ausbeuten bei unterschiedlichen Extraktionstemperaturen ebenfalls in der Größenordnung der Standardabweichung anzusiedeln sind. Diese sehr schwachen Unterschiede in den Wiederfindungsraten zeigen, dass kein Temperatureinfluss auf die Extraktionsausbeute bei der Extraktion von Eiallergenen vorliegt. Dieses Ergebnis gilt sowohl für die Proteinausbeuten von Volleipulver als auch für die Ergebnisse der Extraktionen von Eigelb- und Eiweißpulver.

Für den qualitativen Vergleich der hergestellten Extrakte der Eimaterialien wurde eine SDS-PAGE mit anschließender unspezifischer Proteinfärbung mittels Silber- und CBB-Lösung durchgeführt. In Abbildung 4.2.17 ist sowohl die Silberfärbung der elektrophoretisch aufgetrennten Eiweiße dargestellt, die mit 4%iger SDS-Lösung unterschiedlicher pH-Werte bei verschiedenen Extraktionstemperaturen aus Volleipulver extrahiert wurden, als auch der entsprechende Immunoblot zur Beurteilung der Antigenität.

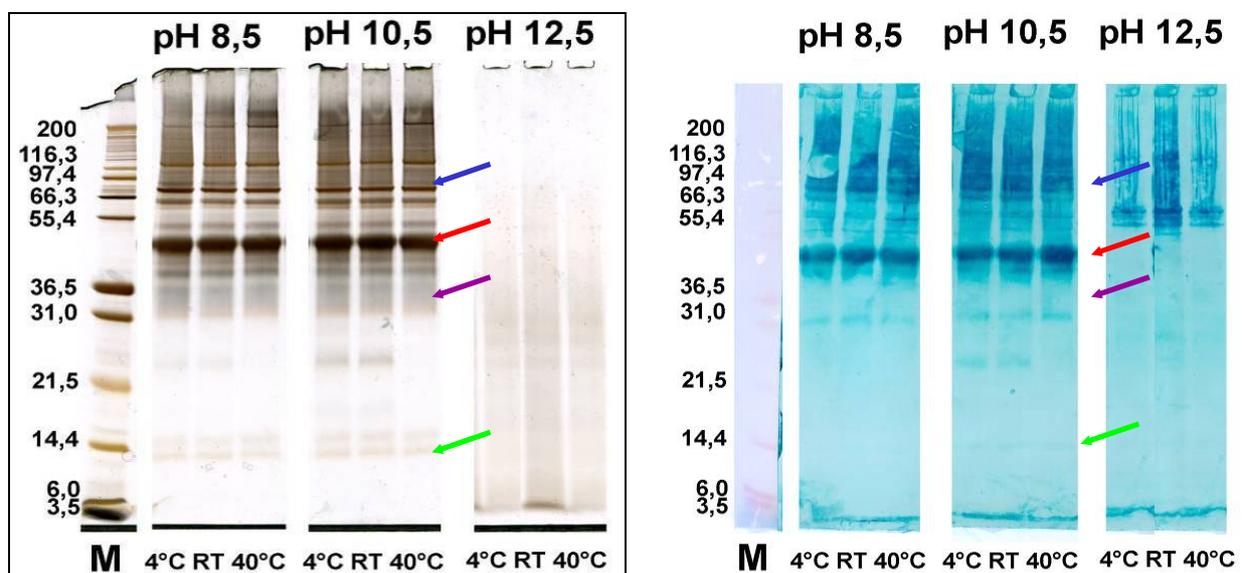


Abb. 4.2.17: links: Unspezifische Silberfärbung des Elektropherogrammes der SDS-Extrakte von Volleipulver (pH 8,5, pH 10,5 und pH 12,5) hergestellt bei 4°C, RT und 40°C (ohne Matrixzusatz); rechts: Spezifischer Immunoblot der SDS-Extrakte von Volleipulver (pH 8,5, pH 10,5 und pH 12,5) hergestellt bei 4°C, RT und 40°C (ohne Matrixzusatz); Farbschlüssel: Conalbumin (76 kDa; blauer Pfeil); Ovalbumin (44,5 kDa; roter Pfeil); Ovomuroid (28 kDa; violetter Pfeil); Lysozym (14,3 kDa; grüner Pfeil); M (Molekulargewichtsmarker)

Das unspezifisch mittels Silberfärbung detektierte Elektropherogramm der Volleipulverextrakte zeigt alle charakteristischen Eiweiße; am intensivsten zeichnen sich die Banden der mengenmäßig am stärksten vertretenen Eiweiße Ovalbumin (44,5 kDa; roter Pfeil), Conalbumin (76 kDa; blauer Pfeil) und Ovomuroid (28 kDa; violetter Pfeil) ab, wobei die Bande des Ovomucoids eher diffus detektiert wird. Diese Banden werden jedoch nur bei den Extrakten detektiert, die bei den pH-Werten 8,5 und 10,5 angefertigt worden sind. Die Extrakte, die mit einer 4%igen SDS-Lösung mit einem pH-Wert von 12,5 hergestellt worden sind, zeigen, wie auch schon entsprechende Extrakte des Magermilchpulvers, in der elektrophoretischen Trennung nach Silberfärbung und im Immunoblot keine Banden. Wie bei der Diskussion der Ergebnisse der Magermilchextraktionen erläutert, ist auch in diesem Fall eine wahrscheinliche Erklärung, dass die Eiweiße durch eine alkalische Hydrolyse abgebaut worden sind, was eine Detektion basierend auf proteinogenen als auch den antigenen Eigenschaften unmöglich macht.

Auch die Extrakte bei pH 12,5, die aus Eigelbpulver und Eiweißpulver hergestellt worden sind, zeigen weder im unspezifisch gefärbten Elektropherogramm noch im spezifisch ge-

färbten Immunoblot charakteristische Banden der Eiproteine (vergl. Anhang Abbildung A 13 bzw. A 14). Auch hier hat offensichtlich eine alkalische Hydrolyse die Proteine abgebaut.

Während der Vergleich der Proteinausbeuten der Extrakte unterschiedlicher Extraktionstemperaturen keinen offensichtlichen Temperatureinfluss erkennen ließ, zeigten sich in der qualitativen Beurteilung der Extrakte Unterschiede im Bandenmuster. In Extrakten, die bei einer Extraktionstemperatur von 4°C bzw. RT sowie pH 8,5 und 10,5 angefertigt worden sind, erscheinen im Gegensatz zu den Extrakten, die in entsprechender Weise mit SDS-Lösung bei 40°C hergestellt worden sind, zwei zusätzliche schwache Banden bei etwa 17 und 25 kDa sowohl im silbergefärbten Elektropherogramm als auch im Immunoblot. Diese Banden erscheinen nicht bei den elektrophoretisch aufgetrennten Extrakten, die mit „Extraction Buffer“ hergestellt worden sind (vergl. Anhang Abbildung A 15 bis A 17). Bei pH 10,5 erscheinen die Banden stärker als bei dem mildereren pH-Wert von 8,5. Sie können zunächst keinen charakteristischen Eiproteinen zugeordnet werden. Der im Immunoblot verwendete Antikörper zeigte in Vorversuchen nicht nur eine Reaktion auf Ovalbumin, sondern aufgrund einer geringeren Spezifität auch eine Reaktion auf Lysozym und eine sehr schwache Reaktion auf Ovomuroid und Conalbumin. Da die Bande von dem verwendeten Antikörper detektiert werden kann, ist es wahrscheinlich, dass es sich bei diesem Protein um ein Artefakt des Ovalbumins oder des Lysozyms handelt. Dass sich das Phänomen mit steigendem pH verstärkt, spricht für einen Proteinabbau, jedoch kann keine Abnahme in der Bandenintensität des Ovalbumins erkannt werden. Des Weiteren ist eine Dimerbildung des Lysozyms denkbar, was die Masse von 14,3 kDa auf etwa 28 kDa erhöhen würde. Da diese Banden jedoch bei Extraktionstemperaturen von 4°C und RT erscheinen, aber nicht bei den Extrakten, die bei 40°C hergestellt worden sind, kann nicht abschließend geklärt werden, um welches Protein oder Artefakt es sich bei diesen Banden handelt. Prinzipiell ist sowohl ein Proteinabbau als auch eine Dimerbildung während der Extraktion unerwünscht, da sich eine solche chemische Veränderung des Analyten negativ auf die Nachweisgrenze auswirkt. Die hier beurteilten Extrakte wurden mit Extraktionszeiten von etwa 14 Stunden hergestellt, was sich begünstigend auf diese unerwünschte Proteinveränderung ausgewirkt hat.

Die Beurteilung der Proteinausbeuten der Extrakte, die mit unterschiedlichen pH-Werten angefertigt worden sind, zeigt, dass keine merkliche Steigerung der Ausbeuten durch Variation des pH-Wertes erreicht werden konnte. Dieses Ergebnis bestätigt sich in der qualitativen Beurteilung der unspezifisch gefärbten Elektropherogramme und im Immunoblot. Die relevanten Banden zeigen eine vergleichbare Intensität und auch das Bandenmuster weist keine Unterschiede auf. Das gleiche Ergebnis wird beim Vergleich der beiden verwendeten Extraktionsmittel erhalten. Wie auch bei den Extraktionen der Eimaterialien mit 4%iger SDS-Lösung zeigen die Extrakte, die mit „Extraction Buffer“ aus den Eimaterialien hergestellt worden sind, keinen Einfluss von Temperatur oder pH-Wert auf Proteinausbeute oder Extraktionsqualität, mit Ausnahme eines Proteinabbaus bei einem pH-Wert von 12,5. Somit konnte auch hier gezeigt werden, dass eine Extraktion mit einem stark basischen Extraktionsmittel zur Isolierung der Eiproteine bzw. Eiallergene nicht geeignet ist.

Wie bei den Extraktionsversuchen bezüglich der Milchproteine wurden auch hier Extrakte von Vollei-, Eigelb- und Eiweißpulver mit einem Zusatz der Matrix „Backmischung“ hergestellt. Nach Anfertigung der Extrakte wurde ebenfalls eine Proteinquantifizierung durchgeführt, um die entsprechenden Ausbeuten zu beurteilen. Da wie bereits oben beschrieben, SDS-Extrakte mit pH-Werten von über 12,5 und „Extraction Buffer“ Extrakte mit einem pH-Wert von über 11,4 keine Eignung zur Isolierung der Milchallergene zeigten, wurden die Extraktionsmittel mit diesem pH-Werten nicht weiter verwendet.

Die berechneten Proteinausbeuten der Extrakte von 4%iger SDS-Lösung (pH 8,5 und 10,5) und „Extraction Buffer“ (pH 7,4 und 9,4) zeigt Abbildung 4.2.18.

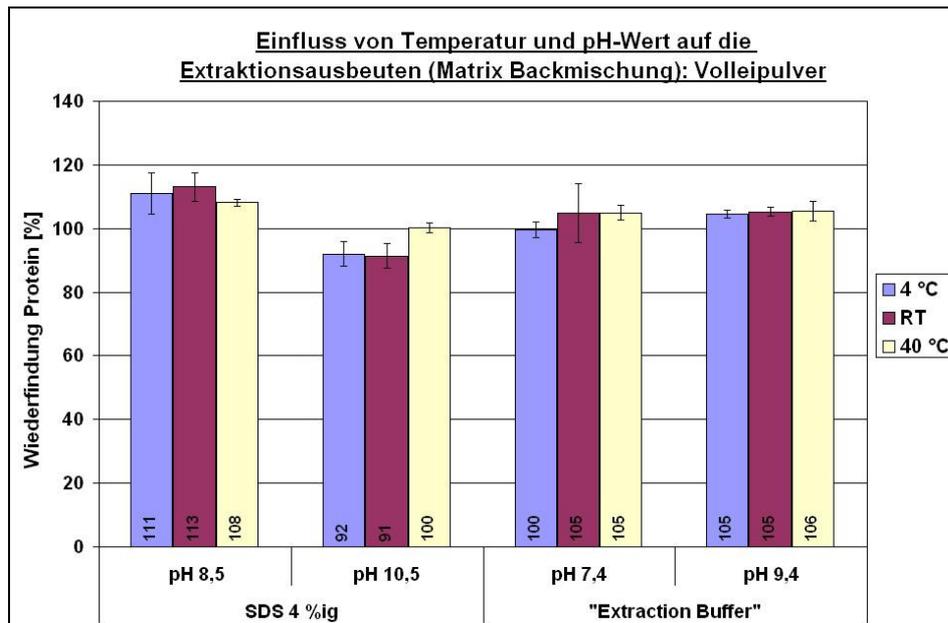


Abb. 4.2.18: Prozentuale Proteinausbeuten der Extraktion von Volleipulver mit 4%iger SDS-Lösung (pH 8,5, pH 10,5 und pH 12,5) und „Extraction Buffer“ (pH 7,4, pH 9,4 und pH 11,4) unter Zusatz von Backmischung bei Extraktionstemperaturen von 4 °C, RT und 40 °C

Vergleicht man die Proteinausbeuten der Extrakte mit und ohne Matrix (vergl. Abbildung 4.2.16 und 4.2.18), zeigt sich, dass die Wiederfindungen der SDS-Extrakte mit Matrixzusatz (ca. 91 - 113%) ähnliche Wiederfindungsraten zeigen wie die Extrakte ohne Matrixzusatz (ca. 109 - 126%). Die Extraktionsausbeuten mit „Extraction Buffer“ als Extraktionsmittel zeigen mit einem Zusatz an Backmischung ebenfalls vergleichbare Ausbeuten (ca. 100 - 106%) wie die Extrakte ohne Matrixzusatz (ca. 89 - 102%).

Die hier dargestellten Werte lassen die Vermutung zu, dass sich ein Zusatz an Backmischung nicht auf die Proteinausbeuten der Extrakte auswirkt. Statistische Untersuchungen zum Matrixeinfluss werden im Kapitel 4.2.3.4 diskutiert.

Des Weiteren bestätigen sich hier die Ergebnisse der Proteinquantifizierung der Extrakte aus den Eimaterialien ohne Matrixzusatz, da bei der Extraktion von Vollei-, Eigelb- und Eiweißpulver die Unterschiede der Ausbeuten bei unterschiedlichen Extraktionstemperaturen lediglich in der Größenordnung der Standardabweichung liegen (vergl. Anhang Abbildung A 18 bzw. A 19). Beim Vergleich der ermittelten Proteinausbeuten lässt sich kein Einfluss der Extraktionstemperatur auf die Wiederfindungsraten erkennen. Des Weiteren wird durch Erhöhung des pH-Wertes der SDS-Lösung auch unter Verwendung der Matrix Backmischung keine höhere Proteinausbeute erzielt.

Die Extrakte, die unter Verwendung der Matrix Backmischung aus den zu untersuchenden Eiprodukten hergestellt worden sind, wurden zur qualitativen Beurteilung elektrophoretisch getrennt und sowohl unspezifisch als auch spezifisch gefärbt. Da bei den oben diskutierten Ergebnissen kein Hinweis auf einen Temperatureinfluss auf die Extraktionsgüte erkennbar war, wurde auf eine elektrophoretische Trennung der Extrakte, die unter Backmischungszusatz bei 4 °C angefertigt worden sind, zunächst verzichtet. Die silbergefärbten Elektrophorerogramme bzw. die Immunoblots zeigt Abbildung 4.2.19.

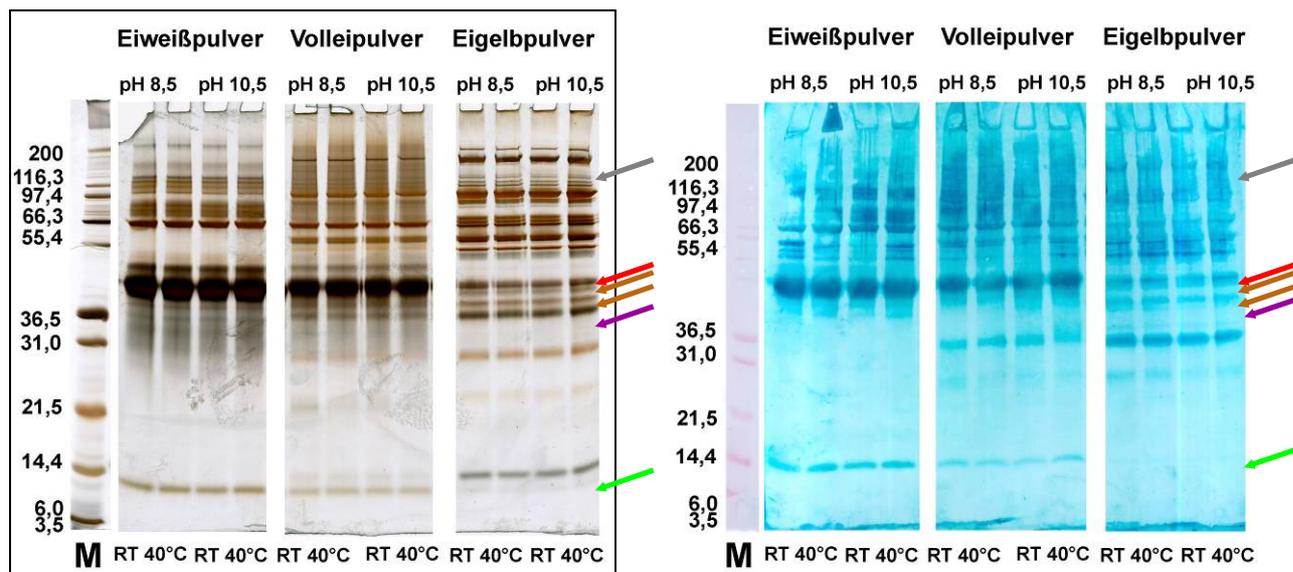


Abb. 4.2.19: links: Unspezifische Silberfärbung des Elektropherogrammes der SDS-Extrakte (pH 8,5 und pH 10,5) der Eiprodukte hergestellt bei RT bzw. 40°C mit Backmischungszusatz; rechts: Spezifischer Immunoblot der SDS-Extrakte (pH 8,5 und pH 10,5) der Eiprodukte hergestellt bei RT bzw. 40°C mit Backmischungszusatz; Farbschlüssel: Lipovitellin (85, 110 bzw. 111 kDa; graue Pfeile); Conalbumin (76 kDa; blauer Pfeil); Ovalbumin (44,5 kDa; roter Pfeil); Phosvitin (37,5, 42,5, bzw. 45 kDa; braune Pfeile); Ovomucoïd (28 kDa; violetter Pfeil); Lysozym (14,3 kDa; grüner Pfeil); M (Molekulargewichtsmarker)

Bei den elektrophoretisch aufgetrennten Extrakten der untersuchten Eiprodukte zeigt sich kein Unterschied in der Bandenintensität beim Vergleich der Extrakte, die bei unterschiedlichen pH-Werten bzw. Extraktionstemperaturen angefertigt worden sind. Hier wird auch unter Verwendung der komplexen Matrix gezeigt, dass eine Veränderung der Temperatur bzw. eine Variation des pH-Wertes des Extraktionsmittels keine Verbesserung der Extraktionsqualität liefert. Wie bereits bei der Extraktion der Milchproteine festgestellt wurde, kann zwar die Veränderung von pH-Wert und Temperatur keine positive Beeinflussung weder der Proteinausbeute noch der Qualität der Extrakte bewirken, zeigt aber, dass die Eiallergene eine gewisse Stabilität gegenüber der Veränderung dieser Parameter aufweisen. Wird ein milder pH-Wert von 8,5 der SDS-Lösung auf 10,5 erhöht, hat dieses basische Milieu keinen negativen Einfluss auf die Extrahierbarkeit oder die Antigenität der Eiproteine. Auch eine Erhitzung der Eiallergene auf bis zu 40°C über einen Zeitraum von ca. 14 Stunden beeinträchtigt die Antigenität dieser Allergene nicht nachweisbar. Diese Stabilität der Eiproteine zeigte sich ebenfalls in den Ergebnissen der Extraktionsversuche mit „Extraction Buffer“ als Extraktionsmittel. Wurde der pH-Wert dieses Extraktionsmittels bis auf 11,4 erhöht, bzw. wurde die Extraktionstemperatur von 4 bis 40°C erhöht, konnte bezüglich der Antigenität auch unter Verwendung einer komplexen Matrix keine Veränderung der Proteine festgestellt werden (vergl. Anhang Abbildung A 19).

#### 4.2.3.3. Temperatur- und pH-Wert Einfluss auf die Extraktion von Haselnussproteinen

Die mittels Lowry ermittelten Proteinausbeuten der Extraktion bei unterschiedlichen pH-Werten und Extraktionstemperaturen von fetthaltigem und entfettetem Haselnussgrieß ohne einen Zusatz an Matrix zeigt Abbildung 4.2.20.

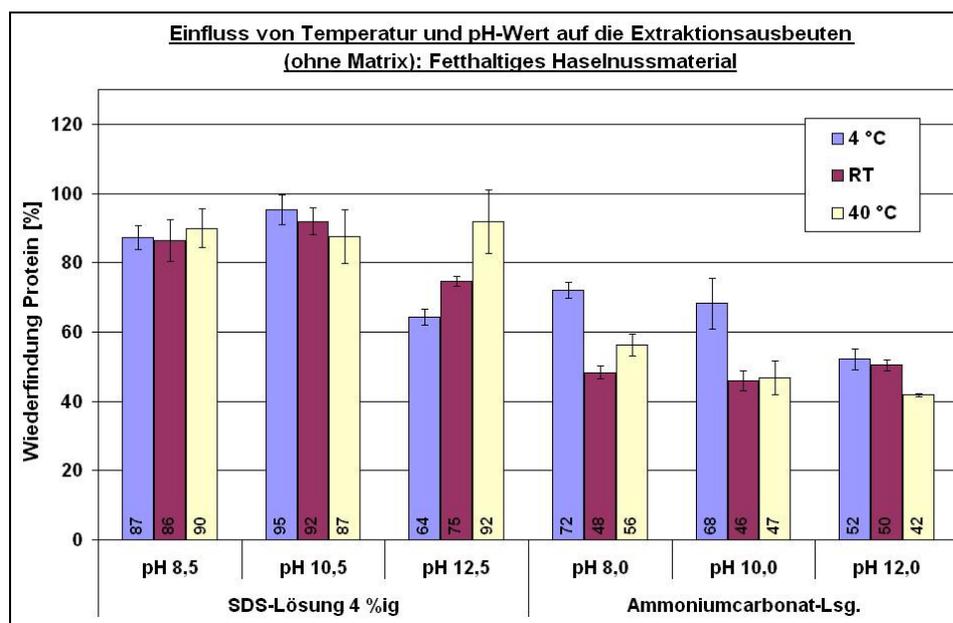


Abb. 4.2.20: Prozentuale Proteinausbeuten der Extraktion von fetthaltigem Haselnussmaterial mit 4%iger SDS-Lösung (pH 8,5, pH 10,5 und pH 12,5) und Ammoniumcarbonat-Lösung (pH 8,0, pH 10,0 und pH 12,0) bei Extraktionstemperaturen von 4°C, RT und 40°C

Die erzielten Ausbeuten bewegen sich insgesamt in einem relativ großen Bereich von 42% (Ammoniumcarbonat-Lösung pH 12,0) bis 95% (SDS-Lösung pH 10,5). Der größte Unterschied ist dabei zwischen den beiden verwendeten Extraktionsmitteln zu erkennen. Die SDS-Lösung liefert mit 64 bis 95% Wiederfindung prinzipiell höhere Ausbeuten als die Ammoniumcarbonat-Lsg (42 bis 68%). Weder bei den Extraktionsausbeuten, die mit 4%iger SDS-Lösung erzielt wurden, noch bei den Wiederfindungsraten, die mit Ammoniumcarbonat-Lösung ermittelt werden konnten, zeigt sich eine eindeutige Tendenz in Bezug auf eine pH-Wert-Abhängigkeit. Die maximalen Ausbeuten wurden mit der SDS-Lösung bei pH 10,5 bzw. mit der Ammoniumcarbonat-Lösung bei pH 8,0 erzielt. Die geringste Ausbeute wiederum wurde bei der 4%igen SDS-Lösung mit dem höchsten pH von 12,5 erzielt, während die niedrigste Extraktionsausbeute der Ammoniumcarbonat-Lösung bei einem pH von 10,0 ermittelt werden konnte. Bezüglich der Extraktionstemperatur lässt sich bei den Wiederfindungsraten der Extraktion von fetthaltigem und entfettetem Haselnussgrieß zunächst kein Zusammenhang erkennen. Werden die Proteinausbeuten innerhalb eines pH-Wertes bei Veränderung der Extraktionstemperatur verglichen, zeigen sich nur geringe Unterschiede in den Wiederfindungen. Die Größenordnung der Unterschiede in den Proteinausbeuten ist vergleichbar mit der berechneten Standardabweichung der Dreifachbestimmung, so dass kein Einfluss der Extraktionstemperatur auf die Proteinausbeute nachgewiesen werden kann. Die einzige Ausnahme stellen hier die Extraktionen mit der Ammoniumcarbonat-Lösung bei den pH-Werten 8,0 und 10,0 dar. Hier werden bei einer Extraktion von 4°C vergleichsweise weit aus höhere Ausbeuten erzielt als bei den Extraktionen, die zwar denselben pH-Wert aufweisen, aber bei RT bzw. 40°C hergestellt worden sind.

Zur qualitativen Untersuchung der erhaltenen Haselnussgrießextrakte wurde eine SDS-PAGE mit anschließender unspezifischer Proteinfärbung durchgeführt. In Abbildung 4.2.21 werden die unspezifisch gefärbten Elektropherogramme der Extrakte, die mit SDS-Lösung bzw. Ammoniumcarbonat-Lösung aus fetthaltigem Haselnussgrieß hergestellt worden sind, präsentiert. Aufgrund des sehr unterschiedlichen Proteingehaltes wurden die Extrakte, die mit 4%iger SDS-Lösung angefertigt wurden, 1/2 verdünnt, während die Extrakte der Ammoniumcarbonat-Lösung unverdünnt in die elektrophoretische Trennung eingesetzt worden sind.

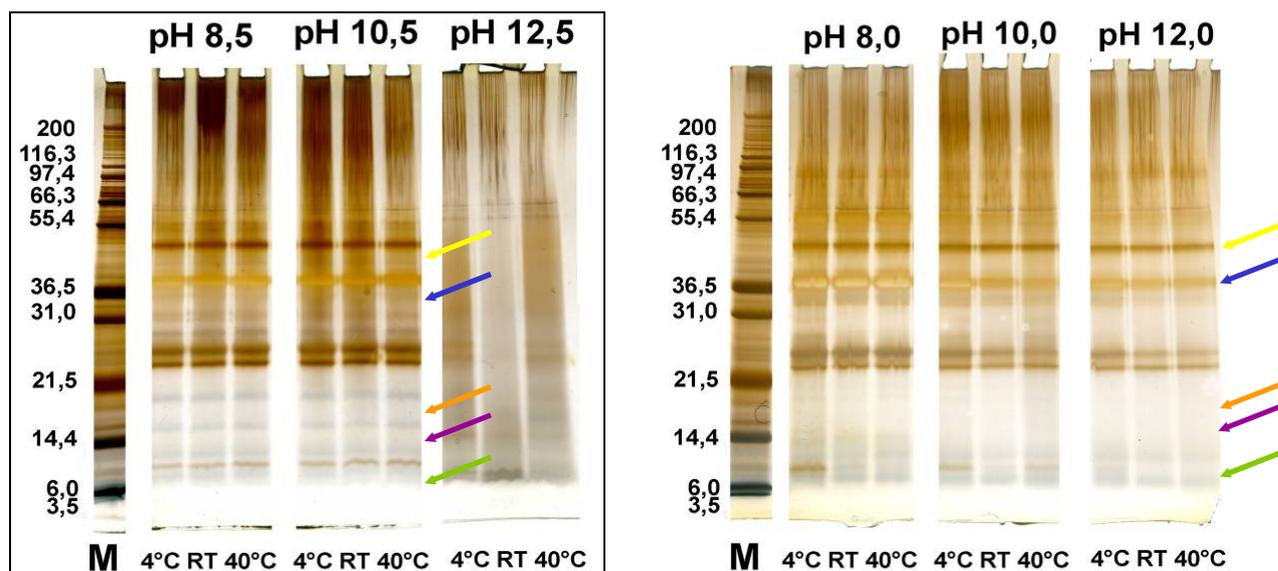


Abb. 4.2.21: links: Unspezifische Silberfärbung des Elektropherogrammes der SDS-Extrakte von fetthaltigem Haselnussgrieß (pH 8,5, pH 10,5 und pH 12,5) hergestellt bei 4°C, RT und 40°C (ohne Matrixzusatz); rechts: Unspezifische Silberfärbung der Ammoniumcarbonat-Lösung-Extrakte von fetthaltigem Haselnussgrieß (pH 8,0, pH 10,0 und pH 12,0) hergestellt bei 4°C, RT und 40°C (ohne Matrixzusatz); Farbschlüssel: Cor a 8 (9 kDa; grüner Pfeil); Cor a 2 (14 kDa; violetter Pfeil); Cor a 1 (18 kDa; oranger Pfeil); Cor a 9 (40 kDa; blauer Pfeil); Cor a 11 (48 kDa; gelber Pfeil); M (Molekulargewichtsmarker)

Die bei der Proteinquantifizierung festgestellten großen Unterschiede in der Proteinausbeute der beiden zu vergleichenden Extraktionsmittel werden bei der unspezifischen Färbung der elektrophoretisch aufgetrennten Haselnussproteine bestätigt. Die Bandenintensität der Extrakte beider Extraktionslösungen sind von vergleichbarer Stärke, wobei jedoch berücksichtigt werden muss, dass die SDS-Extrakte im Gegensatz zu den Extrakten, die mit Ammoniumcarbonat-Lösung angefertigt worden sind, einer 1 / 2 verdünnt wurden. Das unspezifisch detektierte Elektropherogramm der Haselnussgrießextrakte aus SDS-Lösung zeigt alle charakteristischen Haselnussproteine. Am intensivsten zeichnen sich die Banden der mengenmäßig am stärksten vertretenen Haselnussproteine Cor a 9 und Cor a 11 ab.

Das Hauptallergen der Haselnuss Cor a 1 ist gemeinsam mit den Minorallergenen Cor a 2 und Cor a 8 ebenfalls in der Silberfärbung detektierbar. Die Beurteilung der Proteinausbeuten der SDS-Extrakte, die mit unterschiedlichen pH-Werten angefertigt worden sind, zeigt, dass keine merkliche Steigerung der Ausbeuten durch Variation des pH-Wertes erreicht werden kann. Dieses Ergebnis bestätigt sich in der qualitativen Beurteilung der unspezifisch gefärbten Elektropherogramme. Wie bei den Milch- und Eiprodukten bereits erläutert, zeigt sich bei der Extraktion des fetthaltigen und entfetteten Haselnussgrießes, dass eine SDS-Lösung mit einem pH-Wert von 12,5 nicht zur Extraktion der relevanten Proteine bzw. Allergene geeignet ist. Auch scheint ein Proteinabbau stattzufinden, der die Detektion der Haselnussproteine unmöglich macht. Die relevanten Banden hingegen zeigen bei den Extrakten mit niedrigerem pH-Wert eine vergleichbare Intensität und auch das Bandenmuster weist keine Unterschiede auf. Ein entsprechendes Ergebnis wird beim Vergleich der Extrakte erhalten, die bei unterschiedlichen Extraktionstemperaturen hergestellt worden sind. Da sich auch hier weder Bandenmuster noch Bandenintensität unterscheiden, ist davon auszugehen, dass zwischen 4°C und 40°C kein Einfluss der Temperatur auf die Extraktionsgüte besteht. Dieses Ergebnis bestätigt die vorangegangene Interpretation der Proteinquantifizierung, bei der lediglich sehr geringe Unterschiede in den Wiederfindungsraten der Extrakte ermittelt wurden.

Im Vergleich zu dem Proteinmuster der SDS-Extrakte zeigen die Extrakte, die mit Ammoniumcarbonat-Lösung aus dem fetthaltigen Haselnussgrieß gewonnen worden sind, im silber-

gefärbten Elektropherogramm weder Cor a 1 noch Cor a 2 und nur vereinzelt die Bande des Cor a 8. Das Allergen Cor a 8 wird bei den Extrakten der pH-Werte 8,0 und 10,0 bei einer Extraktionstemperatur 4°C in detektierbaren Mengen extrahiert, so dass sich eindeutig ein Einfluss der Extraktionstemperatur auf die Extraktzusammensetzung zeigt. Hier kann das Ergebnis der Proteinquantifizierung bestätigt werden, da die Extrakte, die bei 4°C mit Ammoniumcarbonat-Lösung angefertigt worden sind, auch vergleichsweise höhere Ausbeuten zeigen. Hinzu kommt, dass die Intensität der Bande des Cor a 8 mit steigendem pH-Wert abnimmt. Bei dem Allergen Cor a 9 zeigt sich zusätzlich zum Temperatureinfluss ein Einfluss des pH-Wertes des Extraktionsmittels. Mit steigendem pH-Wert der Ammoniumcarbonat-Lösung und steigender Extraktionstemperatur wird die Bande des Cor a 9 mit schwächer werdender Intensität detektiert, was für einen geringer werdenden Gehalt an Cor a 9 im Extrakt spricht.

Da die Ammoniumcarbonat-Lösung prinzipiell weniger Protein und die Hauptallergene Cor a 1 und Cor a 2 nicht oder nur in geringsten Mengen aus dem Haselnussmaterial zu extrahieren vermag, zeigt sich dieses Extraktionsmittel im Vergleich zur 4%igen SDS-Lösung als kaum geeignet zur Extraktion von Haselnussallergenen. Als positiv ist jedoch zu bewerten, dass bei den Extrakten der Ammoniumcarbonat-Lösung mit einem pH-Wert von 12,0 im Gegensatz zu den Extrakten der SDS-Lösung mit einem pH-Wert von 12,5 noch Haselnussproteine mit relativ starker Intensität detektierbar sind.

Die spezifische Immunfärbung der SDS-Extrakte und der Ammoniumcarbonat-Lösungs-Extrakte zeigt Abbildung 4.2.22. Wie bei der unspezifischen Silberfärbung wurden die Extrakte der Ammoniumcarbonat-Lösung unverdünnt eingesetzt, während die SDS-Extrakte in einer 1 / 2 Verdünnung der elektrophoretischen Trennung zugeführt worden sind.

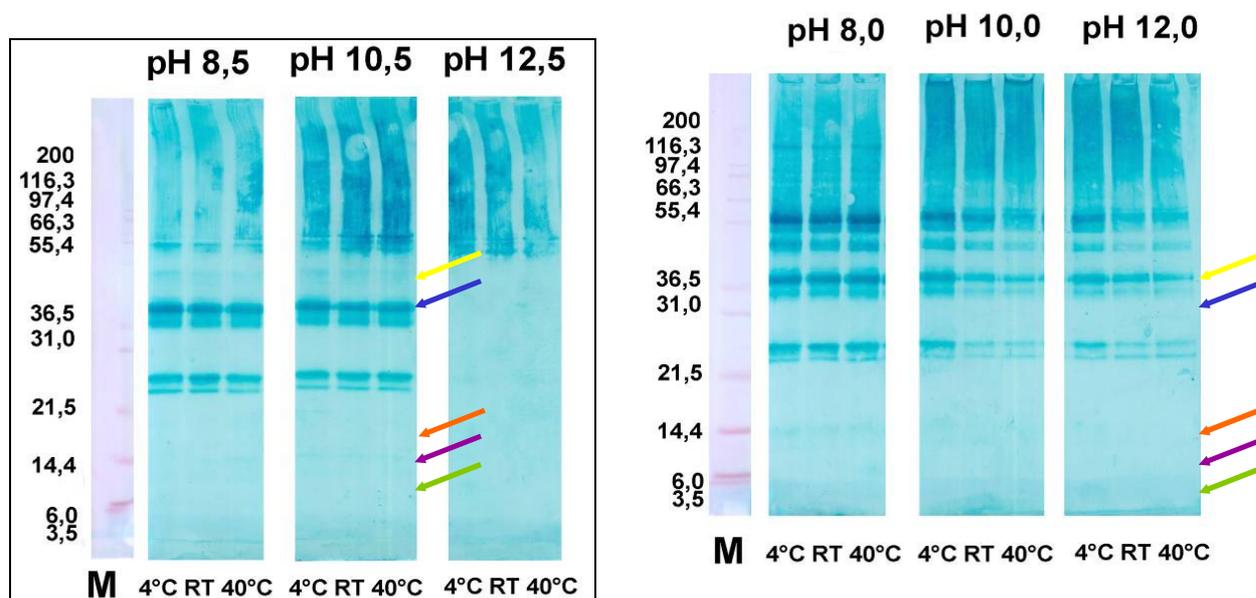


Abb. 4.2.22: links: Spezifische Immunfärbung des Elektropherogrammes der SDS-Extrakte von fettreichem Haselnussgrieß (pH 8,5, pH 10,5 und pH 12,5) hergestellt bei 4°C, RT und 40°C (ohne Matrixzusatz); rechts: Spezifische Immunfärbung der Ammoniumcarbonat-Lösungs-Extrakte von fettreichem Haselnussgrieß (pH 8,0, pH 10,0 und pH 12,0) hergestellt bei 4°C, RT und 40°C (ohne Matrixzusatz); Farbschlüssel: Cor a 8 (9 kDa; grüner Pfeil); Cor a 2 (14 kDa; violetter Pfeil); Cor a 1 (18 kDa; oranger Pfeil); Cor a 9 (40 kDa; blauer Pfeil); Cor a 11 (48 kDa; gelber Pfeil); M (Molekulargewichtsmarker)

Da der zur Immunfärbung verwendete Antihaseluss-Antikörper nicht auf die Allergene Cor a 1, Cor a 2 und Cor a 8 reagiert, werden die Banden dieser Proteine im Immunoblot der SDS-Extrakte nicht detektiert, obwohl die unspezifische Färbung gezeigt hat, dass diese Allergene durchaus in den entsprechenden Extrakten enthalten sind. Die Extrakte der SDS-Lösung zeigen prinzipiell eine schwächere Bande des Allergens Cor a 11 (gelber Pfeil) als die Extrakte der Ammoniumcarbonat-Lösung. Dieser Unterschied in der Färbung ist auf

den höheren Verdünnungsgrad der SDS-Extrakte zurückzuführen. Des Weiteren werden die Ergebnisse der Proteinquantifizierung und der unspezifischen Detektion im Elektropherogramm bezüglich der Extrahierbarkeit an Cor a 9 (blauer Pfeil) bestätigt. Mit steigendem pH-Wert und steigender Temperatur wird weniger Cor a 9 extrahiert, was sich in einer geringeren Bandenintensität nach der Immunfärbung widerspiegelt.

Wie bei den Extraktionsversuchen bezüglich der Milchproteine wurden Extrakte sowohl von fetthaltigem als auch von entfettetem Haselnussmaterial mit einem Zusatz an Fettpulver hergestellt. Nach Anfertigung der Extrakte wurde eine Proteinquantifizierung durchgeführt, um die entsprechenden Ausbeuten zu beurteilen. Da, wie bereits oben beschrieben, SDS-Extrakte mit pH-Werten von über 12,5 und die Extrakte der Ammoniumcarbonat-Lösung mit pH-Wert 12,0 eine geringere Eignung zur Isolierung der Haselnussallergene zeigten, wurden die Extraktionsmittel mit diesen pH-Werten nicht weiter untersucht. Die berechneten Proteinausbeuten der Extrakte von 4%iger SDS-Lösung (pH 8,5 und 10,5) und Ammoniumcarbonat-Lösung (pH 8,0 und 10,0) zeigt Abbildung 4.2.23.

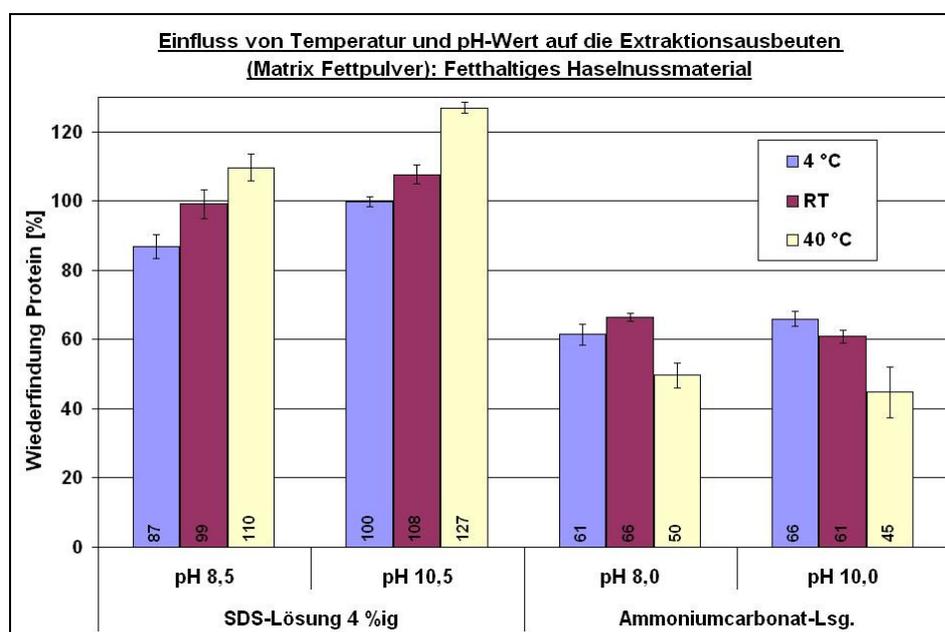


Abb. 4.2.23: Prozentuale Proteinausbeuten der Extraktion von fetthaltigem Haselnussmaterial mit 4%iger SDS-Lösung (pH 8,5, pH 10,5 und pH 12,5) und Ammoniumcarbonat-Lösung (pH 8,0, pH 10,0 und pH 12,0) unter Zusatz von Fettpulver bei Extraktionstemperaturen von 4°C, RT und 40°C

Vergleicht man die Proteinausbeuten der Extrakte mit und ohne Matrix (vergleiche Abbildung 4.2.21 und 4.2.23), zeigt sich, dass die SDS-Extrakte mit Matrixzusatz ähnliche Wiederfindungsraten zeigen wie die Extrakte ohne Matrixzusatz. Allein die Proteinausbeute der SDS-Lösung mit pH 10,5 in Kombination mit der Extraktionstemperatur 40°C und einem Zusatz an Fettpulver liegt mit 127% im Durchschnitt weitaus höher als 87% Wiederfindung an Protein im entsprechenden Extrakt ohne Matrixzusatz. Dennoch zeichnet sich im Gegensatz zu den Ausbeuten der Extrakte ohne Fettpulverzusatz bei den hier dargestellten Wiederfindungen eine gewisse Tendenz eines Temperatureinflusses auf die Ausbeuten ab. Sowohl bei pH 8,5 als auch bei pH 10,5 werden mit steigender Extraktionstemperatur auch höhere Ausbeuten erhalten. Bei SDS-Lösung pH 8,5 steigt die Wiederfindung an Protein von 87% bei 4°C über 99% bei RT bis auf 110% bei einer Extraktionstemperatur von 40°C an. Bei 4%igem SDS pH 10,5 ergibt sich ein ähnliches Bild. Hier wächst die Extraktionsausbeute von 100% über 108% auf sogar 127% an. Die Extraktionsausbeuten der Ammoniumcarbonat-Lösung zeigen bei Matrixzusatz im Allgemeinen Ausbeuten in vergleichbarer Größenordnung wie bei der Extraktion ohne Matrixzusatz. Lediglich bei den Extrakten mit pH 8,0 und 10,0, die bei RT hergestellt worden sind, wurden bei Matrixzusatz mit 66% bzw. 61% höhere Ausbeuten erzielt als bei entsprechenden Extrakten ohne Zusatz an Fettpulver. Ein Zu-

satz an Fettpulver scheint somit keinen Einfluss auf die Ausbeute der Haselnussproteine zu haben.

Die Extrakte, die unter Verwendung von Matrix aus dem fetthaltigen bzw. entfetteten Haselnussgrieß hergestellt worden sind, wurden zur qualitativen Beurteilung elektrophoretisch getrennt und ebenfalls sowohl unspezifisch als auch spezifisch gefärbt. Im Gegensatz zu den qualitativen Untersuchungen der Extrakte ohne Fettpulverzusatz wurden sowohl die SDS-Extrakte als auch die Extrakte der Ammoniumcarbonat-Lösung unverdünnt eingesetzt. Die Darstellung der silbergefärbten Elektropherogramme zeigt Abbildung 4.2.24.

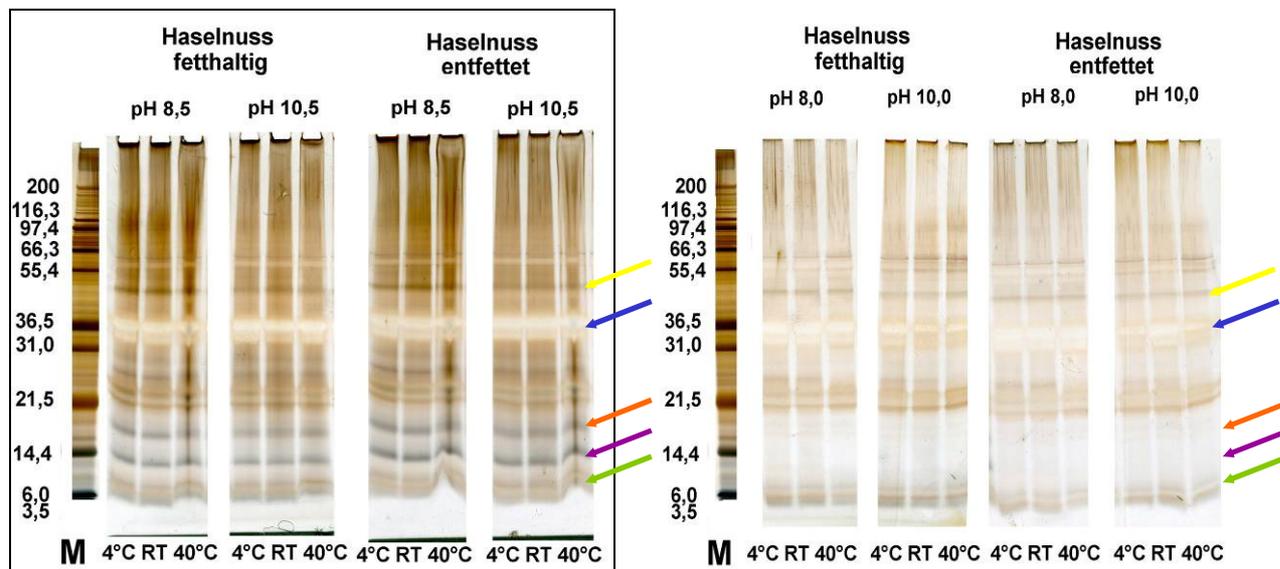


Abb. 4.2.24: links: Unspezifische Silberfärbung des Elektropherogrammes der SDS-Extrakte der Haselnussmaterialien (pH 8,5, pH und 10,5) hergestellt bei 4°C, RT und 40°C unter Zusatz von Fettpulver; rechts: Unspezifische Silberfärbung der Ammoniumcarbonat-Lösung-Extrakte der Haselnussmaterialien (pH 8,0 und pH 10,0) hergestellt bei 4°C, RT und 40°C unter Zusatz von Fettpulver; Farbschlüssel: Cor a 8 (9 kDa; grüner Pfeil); Cor a 2 (14 kDa; violetter Pfeil); Cor a 1 (18 kDa; oranger Pfeil); Cor a 9 (40 kDa; blauer Pfeil); Cor a 11 (48 kDa; gelber Pfeil); M (Molekulargewichtsmarker)

Das Ergebnis der Proteinquantifizierung der Extrakte, die mit SDS-Lösung bei unterschiedlichen Temperaturen hergestellt worden sind, wird bei der unspezifischen Silberfärbung insofern nicht bestätigt, als dass die elektrophoretisch aufgetrennten Extrakte hier keinen Unterschied in der Bandenintensität und damit auch keinen Unterschied im Proteingehalt aufweisen. Hier wird auch unter Verwendung der komplexen Matrix gezeigt, dass eine Veränderung der Temperatur bzw. eine Variation des pH-Wertes des Extraktionsmittels keine Verbesserung der Extraktionsqualität liefert. Auch bei den Extrakten, die unter Verwendung von Ammoniumcarbonat-Lösung hergestellt worden sind, bestätigen sich die Ergebnisse der Extraktionsversuche ohne Matrixzusatz.

Darüber hinaus zeigt sich in der elektrophoretischen Trennung deutlich die Problematik der Untersuchung von fettreichen Proben. Um eine vollständige Homogenisierung zu gewährleisten, ist es in der Regel notwendig, das fetthaltige Probenmaterial (z.B. Schokolade) zu erhitzen bzw. zu schmelzen. Bei höheren Temperaturen, wie auch hier bei der Extraktion der fettpulverhaltigen Proben bei 40°C, wird bei Verwendung von tensidhaltigen Extraktionsmitteln mehr Fett emulgiert als z.B. während einer Extraktion bei RT. Das emulgierte Fett setzt die Trennschärfe der Elektrophorese herab, so dass die Banden z.T. ineinander verlaufen. Ein solches Verschmieren der Banden zeigen in Abbildung 4.2.24 die SDS-Extrakte, die von Haselnussmaterial bei 40°C hergestellt worden sind. Die Extrakte der tensidfreien Ammoniumcarbonat-Lösung zeigen dieses Phänomen nicht, wobei Ammoniumcarbonat-Lösung als Extraktionsmittel jedoch nur etwa die Hälfte des Proteins im Vergleich zur 4%igen SDS-Lösung zu extrahieren vermag.

Abbildung 4.2.25 zeigt die Immunfärbung der Extrakte, die unter Variation des pH-Wertes und der Temperatur mit den Extraktionsmitteln SDS-Lösung und Ammoniumcarbonat-Lösung aus fetthaltigem Haselnussgrieß mit einer Fettpulvermatrix erhalten worden sind. Wie auch bei der unspezifischen Silberfärbung wurden hier alle Extrakte unverdünnt eingesetzt.

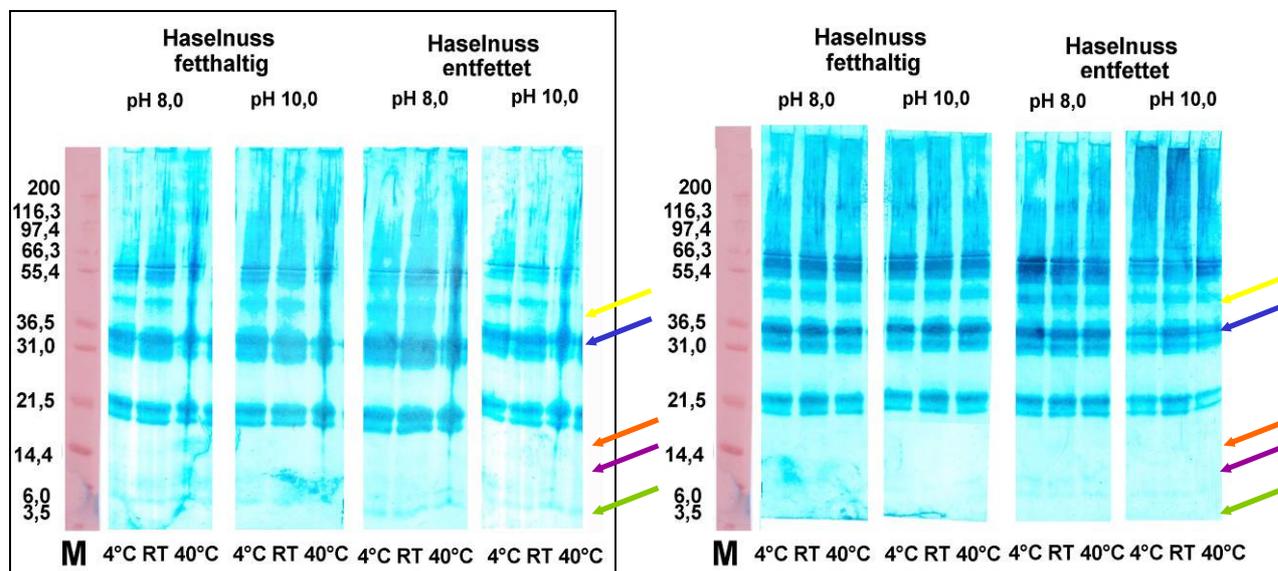


Abb. 4.2.25: links: Spezifische Immunfärbung des Elektropherogrammes der SDS-Extrakte der Haselnussmaterialien (pH 8,5, pH und 10,5) hergestellt bei 4°C, RT und 40°C unter Zusatz von Fettpulver; rechts: Spezifische Immunfärbung der Ammoniumcarbonat-Lösungs-Extrakte der Haselnussmaterialien (pH 8,0 und pH 10,0) hergestellt bei 4°C, RT und 40°C unter Zusatz von Fettpulver; Farbschlüssel: Cor a 8 (9 kDa; grüner Pfeil); Cor a 2 (14 kDa; violetter Pfeil); Cor a 1 (18 kDa; oranger Pfeil); Cor a 9 (40 kDa; blauer Pfeil); Cor a 11 (48 kDa; gelber Pfeil); M (Molekulargewichtsmarker)

In der spezifischen Färbung zeigen sich bei den Extrakten beider Extraktionsmittel vergleichbare Ausbeuten des Allergens Cor a 11 (gelber Pfeil), da hier kein Unterschied in der Verdünnung vorliegt. Wie auch bei den entsprechenden Extrakten, die ohne Fettpulver hergestellt worden sind, zeigen sich auch hier die unterschiedlichen Ausbeuten an Cor a 9 beim Vergleich der unterschiedlichen pH-Werte der Ammoniumcarbonat-Lösung. Entsprechend den vorangegangenen Ergebnissen zeigt sich auch in der elektrophoretischen Trennung der matrixhaltigen Extrakte weder eine Temperaturabhängigkeit noch ein Einfluss der Extraktionstemperatur auf die Ausbeuten an Protein bei der Extraktion von Haselnussmaterial mit 4%iger SDS-Lösung.

#### 4.2.3.4. Zusammenfassende Beurteilung der Optimierung von Extraktionstemperatur und pH-Wert des Extraktionsmittels

Sowohl bei der Extraktion von Milch- als auch von Eimaterialien mit SDS-Lösung mit pH 12,5 bzw. „Extraction Buffer“ pH 11,4 trat eine alkalische Hydrolyse ein. Diese Extraktionsmittel wurden als nicht geeignet zur Extraktion von Ei- bzw. Milchprodukten beurteilt, da sowohl die proteinogene als auch die antigene Struktur während der Extraktion zerstört wurden. Die Extraktion mit 4%iger SDS-Lösung pH 12,5 zeigte dabei einen stärkeren Abbau der Proteine als die Extraktion mit „Extraction Buffer“ pH 11,4, wohingegen die verwendete SDS-Lösung im Vergleich zum „Extraction Buffer“ jedoch prinzipiell gering höhere Ausbeuten bei der Proteinquantifizierung gezeigt hatte. Einen zusammenfassenden Überblick der Ergebnisse der Untersuchung des Einflusses des pH-Wertes auf die Extraktionsqualität der Milch- und Eimaterialien zeigen die Tabellen 4.2.7 und 4.2.8.