



Erkrankungsrisiko gezielt senken

Forschungsprojekt zur Prävention von Bäckerasthma abgeschlossen

Ingrid Sander, Eva Zahradnik, Annette Lehrack, Heinz Kaiser, Bärbel Kniel, Monika Raulf-Heimsoth

Trotz rückläufiger Erkrankungszahlen durch Präventionserfolge der Berufsgenossenschaft Nahrungsmittel und Gaststätten (BGN) in den vergangenen zehn Jahren gehört das Backgewerbe bei beruflich bedingten obstruktiven allergischen Atemwegserkrankungen (BK 4301) zu den am häufigsten betroffenen Branchen. Auslöser sind neben den Mehlstäuben auch Enzymstäube. Auch aus diesem Grund startete das BGFA 2006 das Forschungsprojekt „Enzymhaltige Stäube“. Die Untersuchung zur Bestimmung und Reduzierung des allergenen Potenzials in enzymhaltigen Stäuben von pulverförmigen Schüttgütern für das Backgewerbe dauerte rund zwei Jahre und wurde im „Programm zur Förderung der Industriellen Gemeinschaftsforschung (IGF)“ des Bundesministeriums für Wirtschaft und Technologie über den Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. gefördert*. Werden die Ergebnisse von Herstellerseite umgesetzt, profitieren Unternehmen aus dem Backgewerbe von niedrigeren Allergenexpositionen.

Anlass für das Forschungsprojekt waren die immer noch hohen Zahlen von Berufserkrankungen bei Bäckern. Die Berufsgenossenschaften gaben im Jahr 2003 für Leistungsfälle im direkten Zusammenhang mit der Berufskrankheit 4301 im Backgewerbe 37,5 Millionen Euro aus. Diese Kosten und darüber hinaus der Arbeitsausfall von beruflich Erkrankten müssen Jahr für Jahr von den Unfallversicherungsträgern und dem Backgewerbe aufgefangen werden.

Prävention durch Staubvermeidung

Zu den effektivsten Maßnahmen bei der Prävention des Bäckerasthmas zählt neben einer Reduktion des entstehenden Gesamtstaubes auch die Vermeidung einer Inhalation des Allergens alpha-Amylase. Nicht nur Forschungsergebnisse des BGFA zeigten, dass auch andere Enzyme, die Xylanasen – die zur Verbesserung der Backeigenschaften zugesetzt werden – potente Inhalationsallergene sind [1-4]. In England ließ sich in den Jahren von 1998-2003 durch eine Präventionsstrategie, die insbesondere auf die Verringerung einer Exposition gegen Brotbackmittel setzte, eine Verringerung der Neu-Sensibilisierungen mit Beschwerden um 80 Prozent gegenüber dem Zeitraum von 1993-1998 erzielen [5].

Gefördertes Forschungsprojekt

Angeregt durch die Forschungsergebnisse zur Allergenität von Xylanasen initiierte der Verband der Backmittel- und Backgrundstoffhersteller ein Forschungsvorhaben, das die Untersuchung und Entwicklung von Verfahren zur Vermeidung der Inhalation von Enzymstaub, insbesondere von Xylanasestaub, beinhaltete. Die Fördermittel für das Projekt stammten aus dem Bundesministerium für Wirtschaft und Technologie (BMWi) – Arbeitsgemeinschaft industrieller Forschungsvereinigungen (AiF) und wurden über den Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI) vergeben. Die AiF bietet ein Netzwerk für die Realisierung innovativer Forschungsideen aus Wirtschaft und Wissenschaft. Projektpartner war das Institut für Lebensmittel- und Umweltforschung e.V. Nuthetal (ILU). Dort wurden in enger Kooperation mit der Backmittelindustrie neue Verfahren zur Produktentstaubung entwickelt und in Verstaubungsexperimenten überprüft. Außerdem wurden deren Auswirkung auf die Backfähigkeit der Produkte getestet. Die Aufgabe des BGFA im Projekt war es, das allergene Potenzial verschiedener mikrobieller Xylanasen zu überprüfen, sowie immunologische Messverfahren für diese Xylanasen zum sensitiven Nachweis in den Stäuben herkömmlicher beziehungsweise optimierter Backgrundstoffe zu entwickeln.

* Das Forschungsvorhaben AiF 14785 BG wurde im „Programm zur Förderung der Industriellen Gemeinschaftsforschung (IGF)“ vom Bundesministerium für Wirtschaft und Technologie (via AiF) über den Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI) gefördert. (Bewilligungszeitraum: 01.06.2006-30.09.2008).

	Weizenmehl	Roggenmehl	A. oryzae α-Amylase	A. niger Xyl 1	A. niger Xyl 2	A. niger Xyl 3	T. reesei Xyl	B. subtilis Xyl 1
Weizenmehl	1							
Roggenmehl	0,670	1						
α-Amylase	0,110	0,058	1					
A.nig Xyl 1	0,031	0,002	0,276	1				
A.nig Xyl 2	0,057	0,027	0,568	0,558	1			
A.nig Xyl 3	0,018	0,000	0,274	0,981	0,590	1		
T.ree Xyl	0,057	0,017	0,435	0,685	0,761	0,691	1	
B.sub Xyl	0,114	0,047	0,115	0,288	0,185	0,230	0,407	1

Tabelle: Korrelationsanalyse der IgE-CAP-Klassen von 51 Bäckerseren (siehe Abb. 1). Ein Korrelationskoeffizient r^2 von 1 entspricht einer perfekten Korrelation, ein Koeffizient von 0 zeigt keinerlei Korrelation. Korrelationskoeffizienten $>0,6$ wurden hervorgehoben.

Allergische Sensibilisierungen bei Bäckern

In einem selektierten Kollektiv von 51 Bäckern mit beruflichen Beschwerden, deren Seren in den Jahren von 2003-2006 im BGFA eingingen, wurde die Häufigkeit von Sensibilisierungen gegen typische Bäckerallergene untersucht. Dafür wurden spezifische IgE-Antikörper, die im Falle einer Sensibilisierung gegen Allergene gebildet worden sind, im ImmunoCAP-System gemessen. Von den Industriepartnern des geförderten Projektes wurden außerdem Backmittel-Xylanasen aus verschiedenen Produktionsstämmen zur Verfügung gestellt, deren Allergenität nach Bindung an Streptavidin-ImmunoCAPs [6] untersucht werden konnte. Neben der Häufigkeit der Sensibilisierungen ist auch die Konzentration der spezifischen IgE-Antikörper anhand der Höhe der CAP-Klasse erkennbar (Abbildung 1). Die CAP-Klasse 6 entspricht dabei der höchsten IgE-Konzentration.

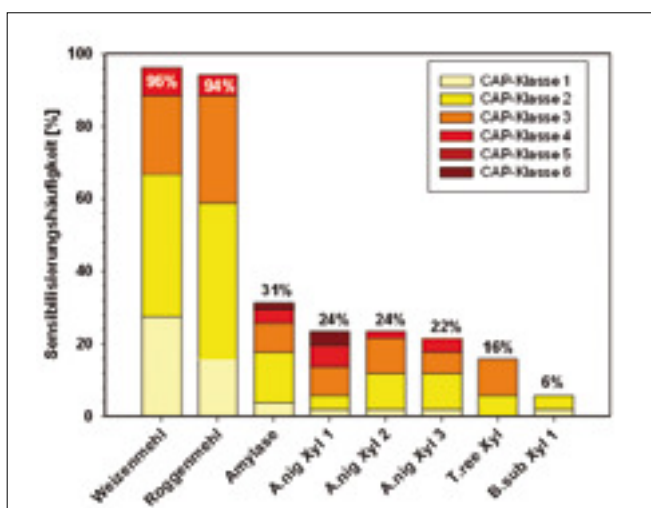


Abb. 1: Sensibilisierungsfrequenz und -stärke anhand spezifischer IgE-Antikörper in Seren von 51 Bäckerpatienten. Neben Weizen- und Roggenmehl sowie der α-Amylase aus *Aspergillus oryzae* wurden drei verschiedene Xylanasen aus dem Produktionsstamm *Aspergillus niger* (A.nig Xyl 1 - 3), eine Xylanase aus *Trichoderma reesei* (T.ree Xyl) und eine aus *Bacillus subtilis* (B.sub Xyl 1) getestet.

Fast alle selektierten Bäcker waren gegen Weizen- und Roggenmehle sensibilisiert. Die höchste Frequenz bei den Enzymen erreichte die α-Amylase aus *Aspergillus oryzae* (31%) gefolgt

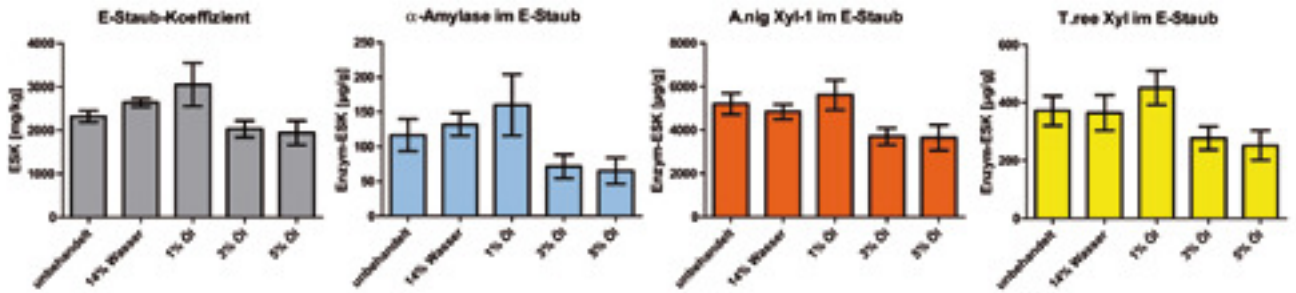
von den Xylanasen, deren Produktionsstamm der Schimmelpilz *Aspergillus niger* war. Sensibilisierungen gegen Enzyme ohne eine gleichzeitige Sensibilisierung gegen Mehle traten nur in zwei Fällen auf. Auffällig war aber, dass es für die Enzyme *A. niger* Xylanase 1 und die α-Amylase einige Seren mit besonders hoher IgE-Konzentration gab. Oft waren Patienten nicht nur gegen ein Enzym sensibilisiert, sondern gegen mehrere. Die Korrelationsanalyse der IgE-CAP-Klassen in dem Patientenkollektiv (Tabelle) zeigte hohe Übereinstimmungen zwischen den verschiedenen *A. niger* Xylanasen (Korrelationskoeffizient zwischen *A. niger* Xylanase 1 und Xylanase 3 von $r^2=0,981$), und auch zwischen den Xylanasen aus *A. niger* und der *T. reesei* Xylanase (Korrelationskoeffizient zwischen *A.niger* Xylanase 2 und *T. reesei* Xylanase $r^2=0,761$). Für die Weizen- und Roggenmehle ist bekannt, dass die hohe Korrelation der IgE-Werte durch homologe Strukturen bedingt ist, mit denen die IgE-Antikörper kreuzreagieren. Die Vermutung liegt nahe, dass es auch bei den verschiedenen Xylanasen übereinstimmende kreuzreaktive Strukturen gibt.

Neuentwicklung von immunologischen Messverfahren

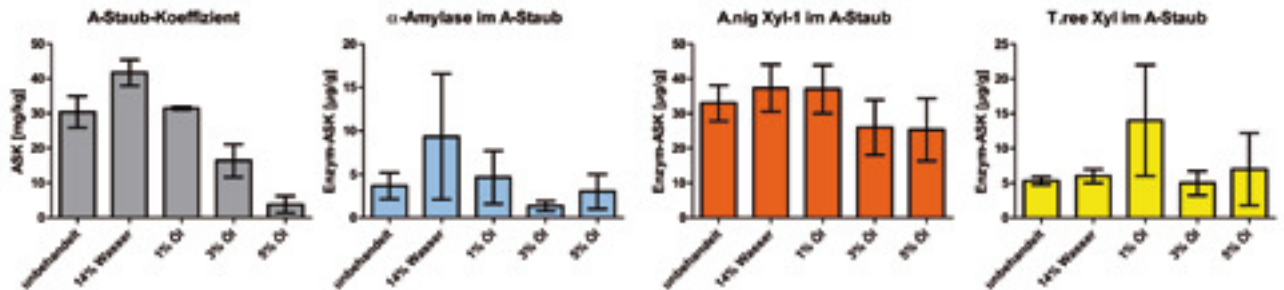
Obwohl ein Enzym anhand der spezifischen von ihm katalysierten biochemischen Reaktion nachgewiesen werden kann, und dies in älteren Studien auch zur Quantifizierung in einatembaren Stäuben genutzt worden ist, wurden aus folgenden Gründen für die Quantifizierung von Backmittel-Xylanasen immunologische Testverfahren auf Basis polyklonaler Antikörper vorgezogen:

- Immunologische Verfahren können in der Regel zwischen Enzymen gleicher Funktion aus verschiedenen Spezies unterscheiden, enzymatische Testverfahren nicht. Eine Unterscheidung zwischen mehleigenen und mikrobiellen Xylanasen gelingt daher besser mit immunologischen Verfahren.
- Immunologische Verfahren erfassen im Gegensatz zum enzymatischen Test auch inaktivierte Enzyme, soweit die Antikörperbindungsstellen (Epitope) unverändert sind. Während die enzymatische Aktivität bei Denaturierung oder Proteolyse fast immer verloren geht, bleibt die immunologische Aktivität dabei häufig erhalten.
- Testverfahren auf Basis polyklonaler Antikörper simulieren die Erkennung des menschlichen Immunsystems. Anders

A: E-Staubfraktion



B: A-Staubfraktion



formuliert bedeutet das, wenn ein Enzym so stark verändert ist, dass es im immunologischen Test nicht mehr erkannt wird, liegt der Schluss nahe, dass es auch vom menschlichen Immunsystem nicht mehr erkannt werden kann.

- Immunologische Tests sind empfindlicher als enzymatische Testverfahren.

Diese Vorteile immunologischer Testverfahren sind so erheblich, dass der Aufwand, spezifische Antikörper gegen die nachzuweisenden Enzyme herzustellen, in Kauf genommen wurde. Für zwei *Aspergillus niger* Xylanasen (A.nig Xyl1 und A.nig Xyl2), die getestete *T. reesei* Xylanase und die *Bacillus subtilis* Xylanase wurden zweiseitige immunologische Messverfahren (sogenannte Sandwich-ELISA) auf Basis von Kaninchenantikörpern entwickelt. Die Messverfahren waren sehr sensitiv und spezifisch und wurden anhand von 30 Backmitteltestmischungen erfolgreich validiert, denen Enzyme in verschiedenen dem BGFA unbekanntem Konzentrationen zugesetzt worden waren.

Entstaubungsmaßnahmen für Backmischungen und Backmittel

Vielfach werden marktübliche Backmittel- und Backmischungen durch verschiedene Maßnahmen entstaubt. Den Projektpartnern stand an der IGV – Institut für Getreideverarbeitung GmbH Nuthetal eine neue Benetzungstechnologie zur Verfügung, die erst kürzlich mit dem Präventionspreis 2008 der BGN ausgezeichnet worden ist. Diese unter dem Namen „MoisTec“ vermarktete Technologie (Abb. 2) ermöglicht die gleichmäßige Benetzung der Mehl- und Backmittelpartikel mit Flüssigkeit, wodurch die Partikel miteinander verkleben. Die so „aggregierten“ Mehle und



Abbildung 2: „MoisTec“ Benetzungsapparatur

Backmischungen zeigen eine geringere Staubeentwicklung und können dazu beitragen, die Einatmung von Staub und damit das Risiko für Allergien und Bäckerasthma zu verringern.

Das „MoisTec“ Verfahren wurde im Rahmen dieses Projektes eingesetzt, um Backmischungen und Backmittel mit Enzymen durch Benetzung mit Wasser oder Öl zu entstauben. Dabei wurden den Backgrundstoffen unterschiedliche Flüssigkeitsanteile zugesetzt und nachträglich überprüft, ob die Verarbeitungseigenschaften und die Backfähigkeit sowie die Qualität der fertigen Backwaren sich von unbehandelten Proben unterschieden. Insgesamt konnten keine Einbußen der entstaubten Produkte in diesen Eigenschaften festgestellt werden.

Erfolg der neuen Entstaubungsmaßnahmen

Nicht-entstaubte Backmischungen und eine Modellbackmischung, welche die nachweisbaren Enzyme *A. oryzae* α-Amylase, *A. niger* Xylanase 1, *T. reesei* Xylanase und *B. subtilis* Xylanase enthielt, wurden im MoisTec Verfahren mit Wasser oder steigenden Zugaben von Pflanzenöl entstaubt. Dabei war die maximale Zugabe von Öl oder Wasser von der Zusammensetzung der Produkte abhängig, damit technische Eigenschaften wie zum Beispiel die Rieselfähigkeit nicht verschlechtert wurden.

Um den Erfolg dieser Entstaubungsvarianten zu testen, wurde folgendermaßen vorgegangen:

- Verstaubung der Proben im Staubkanal bei den Projektpartnern
- Sammlung der Staubfraktionen auf Filtern (E-Staub und A-Staub entsprechend der einatembaren bzw. alveolengängigen Fraktion nach DIN EN 481)
- Wiegen der Stäube und Bestimmung der E-Staub und A-Staubkoeffizienten (mg Staub/kg verstaubtes Produkt)
- Extraktion der Filter [7] sowie Messung der Enzyme mit den immunologischen Assays am BGFA mit Bestimmung der Enzym-Staubkoeffizienten (µg Enzym im Staub/verstaubtes Produkt mit 1g Enzym).

Die Ergebnisse der Verstaubungsexperimente sind exemplarisch für die Modellbackmischung mit den vier zugesetzten messbaren Enzymen gezeigt (Abbildung 3).

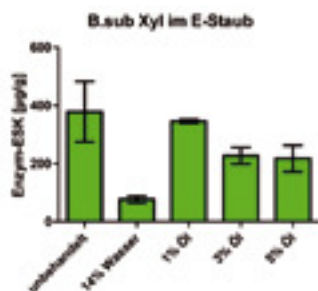


Abb. 3: Entstaubung einer Modellbackmischung mit vier zugesetzten Enzymen. Oben (A) ist der Einfluss verschiedener Benetzungsvarianten auf den einatembaren Staub (E-Staub) und die Enzyme im E-Staub dargestellt, unten (B) sind diese Effekte für den alveolengängigen Staub (A-Staub) gezeigt. Die *B.subtilis* Xylanase lag in den A-Stäuben unter der Nachweisgrenze.

Die Ergebnisse lassen sich folgendermaßen zusammenfassen:

- Die Modellbackmischung zeigte bei Benetzung mit Pflanzenöl (3% und 5%) eine deutliche verringerte Menge an A-Staub. Der E-Staub änderte sich nur geringfügig. Auch die Experimente mit zwei Backmischungen zeigten die besten Effekte bei Benetzung mit höheren Ölzugaben (maximale Staubreduktion des A-Staubes um 95%), während beim E-Staub eine maximale Reduktion um 51% erzielt wurde.
- Die Benetzung mit 3% und 5% Pflanzenöl zeigte auch für die Enzyme im E-Staub in der Regel die besten Ergebnisse. Die α -Amylase-Menge konnte um 50% gesenkt werden, gefolgt von der *B.subtilis* Xylanase (um 42%) und der *A.niger* Xylanase 1 bzw. der *T.reesei* Xylanase (um ca. 30%). Nur bei der *B.subtilis* Xylanase war die Wasserbenetzung sehr effektiv.
- In der A-Staubfraktion wurde trotz der erzielten Staubdezymierung oft keine Reduktion der Enzymmenge erreicht. Mit einigen Entstaubungsvarianten (14% Wasser und 1% Öl) kam es sogar zu einer Zunahme der Enzym-A-Staubkoeffizienten, z.B. bei α -Amylase und *A.niger* Xylanase 1. Das Staubungsverhalten der *T.reesei* Xylanase konnte mit keiner Variante verbessert werden.
- Die Enzymstaubkoeffizienten ermöglichen einen Vergleich des Staubungsverhaltens der verschiedenen Enzyme. Während die eingesetzte *A.niger* Xylanase 1 Enzym-E-Staubkoeffizienten von 3700-5600 $\mu\text{g/g}$ aufwies, lagen diese bei der *T.reesei* Xylanase zwischen 250-450 $\mu\text{g/g}$, bei der *B.subtilis* Xylanase zwischen 80 und 380 $\mu\text{g/g}$ und bei der eingesetzten α -Amylase zwischen 65-160 $\mu\text{g/g}$. Die Enzym-A-Staubkoeffizienten der *A.niger* Xylanase 1 lagen zwischen 25-37 $\mu\text{g/g}$, bei der *T.reesei* Xylanase zwischen 5-14 $\mu\text{g/g}$, und bei der α -Amylase zwischen 1-9 $\mu\text{g/g}$. Die *B.subtilis* Xylanase war im A-Staub nicht messbar. Es gibt also starke Unterschiede in der Staubigkeit dieser Enzympräparate; die *A.niger* Xylanase 1 staubte wesentlich stärker als die anderen Enzyme.

Fazit: Die Ergebnisse zeigen, dass die Entstaubung mit einem höheren Zusatz an Öl den alveolengängigen Staub deutlich reduziert, während sich der Entstaubungserfolg bei den Enzymen dagegen vorrangig auf die einatembare Staubfraktion bezieht. Insgesamt kann aber Enzymstaub besonders effektiv vermieden werden, wenn von vorn herein keine stark staubenden Enzyme in den Backmitteln und Backmischungen eingesetzt werden.

Bedeutung für die Praxis

Mit den entwickelten Verfahren wird Backmittel- und Enzymherstellern die Möglichkeit gegeben, die Staubigkeit pulverförmiger Produkte und den Erfolg von Entstaubungsmaßnahmen zu objektivieren. Damit kann die Staubigkeit von allergenen Enzymen bestimmt werden und Enzym- und Backmittelhersteller haben bereits vor erstmaliger Anwendung dieser Rohstoffe ein Instrumentarium zur Optimierung beziehungsweise Selektion ihrer Produkte zur Verfügung. Werden die Forschungsergebnisse auf der Herstellerseite konsequent umgesetzt, profitieren vor allem Unternehmen des Backgewerbes. Geringere Allergenexpositionen führen zu einem verringerten Risiko, eine allergisch obstruktive Atemwegserkrankung (Berufskrankheit 4301) zu entwickeln, und können so helfen, die mit dieser Berufskrankheit verbundenen Kosten für die Unfallversicherungsträger und somit für die Unternehmen zu senken. Insbesondere Kleinunternehmen, für die Investitionen in andere staubreduzierende Maßnahmen aus wirtschaftlichen Gründen oft nicht möglich sind, würden von der Umsetzung der Forschungsergebnisse profitieren und in ihrer Wettbewerbsfähigkeit gestärkt.

Die Autoren:

PD Monika Raulf-Heimsoth, Dr. Ingrid Sander,
Eva Zahradnik
BGFA

Dr. Heinz Kaiser, Annette Lehrack

Institut für Lebensmittel- und Umweltforschung e.V. Nuthetal

Prof. Bärbel Kniel

Biotask AG, Esslingen

Literatur

1. Merget R, Sander I, Raulf-Heimsoth M, Baur X. Baker's asthma due to xylanase and cellulase without sensitization to alpha-amylase and only weak sensitization to flours. A case study. *Int Arch Allergy Immunol* 2001; 124:502-4.
2. van Kampen V, Merget R, Brüning T. Berufliche Allergien gegen Xylanasen. *Pneumologie* 2004; 58:103-6.
3. Zahradnik E, Sander I, Fleischer C, Brüning T, Raulf-Heimsoth M. Enzymsensibilisierungen bei Patienten mit Verdacht auf Bäckerasthma. *Atemwegs- und Lungenkrankheiten* 2003; 29:361-2.
4. Elms J, Fishwick D, Walker J, Rawbone R, Jeffrey P, Griffin P, Gibson M, Curran AD. Prevalence of sensitisation to cellulase and xylanase in bakery workers. *Occup Environ Med* 2003; 60:802-4.
5. Smith TA. Preventing baker's asthma: an alternative strategy. *Occup Med (Lond)* 2004; 54:21-7.
6. Sander I, Kespohl S, Merget R, Goldscheid N, Degens PO, Brüning T, Raulf-Heimsoth M. A new method to bind allergens for the measurement of specific IgE antibodies. *Int Arch Allergy Immunol* 2005; 136:39-44.
7. Sander I, Zahradnik E, Bogdanovic J, Raulf-Heimsoth M, Wouters IM, Renström A, Harris-Roberts J, Robinson E, Goldscheid N, Brüning T, Doekes G. Optimized methods for fungal alpha-amylase airborne exposure assessment in bakeries and mills. *Clin Exp Allergy* 2007; 37:1229-38.