



## Überprüfung der Evaluierung des Produkts Xylanase aus gentechnisch veränderten Mikroorganismen

Freiburg/Köln, Februar 1997

Dr. Beatrix Tappeser, Öko-Institut  
Dipl. Biol. Arno Todt, nova-Institut  
Dr. Dirk Bunke, Öko-Institut

**Öko-Institut e.V.**  
Geschäftsstelle Freiburg  
Postfach 6226  
D-79038 Freiburg  
Tel.: 0761-4 52 95-0

**nova-Institut für politische und  
ökologische Innovation GmbH**  
Rosenstr. 53  
D-50678 Köln

**Überprüfung der Evaluierung des Produkts  
Xylanase aus gentechnisch  
veränderten Mikroorganismen**

Öko-Institut e.V., Institut für angewandte Ökologie,  
Freiburg

---

nova Institut für politische und ökologische Innovation  
GmbH, Köln

# INHALTSVERZEICHNIS

---

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1. Hintergrund und Zielsetzung .....</b>  | <b>3</b>  |
| <b>2. Produktionssicherheit - Kurzfristige oder langfristige ökologische Wirkungen des Produktionsstammes bei einer Freisetzung in die Umwelt.....</b> | <b>4</b>  |
| 2.1 Charakterisierung des Produktionsstammes.....  | 4         |
| 2.2 Taxonomie der Aspergillen.....   | 5         |
| 2.3 Vorkommen von Aspergillen.....   | 6         |
| 2.4 Einfluß physikalischer Faktoren auf die Lebensbedingungen der Aspergillen .....  | 6         |
| 2.5 Gesundheitsaspekte von Aspergillen.....  | 7         |
| 2.5.1 Mykotoxine .....   | 8         |
| 2.5.2 Einfluß auf andere Organismen .....  | 10        |
| 2.6 Xylanasen .....  | 12        |
| 2.6.1 Xylan.....   | 12        |
| 2.6.2 Charakterisierung der Xylan-abbauenden Enzyme .....  | 13        |
| 2.6.3 Ökologische Bedeutung und Vorkommen von Xylanasen.....   | 13        |
| 2.6.4 Aspergillen und Xylanasen.....   | 14        |
| Literatur.....   | 15        |
| <b>3. Immunotoxikologische Aspekte .....</b>   | <b>18</b> |
| 3.1 Abgrenzung der Fragekomplexe .....   | 19        |
| 3.2 Zusammenfassung.....   | 19        |
| 3.3 Fragekomplex: Produktionsorganismus <i>Aspergillus niger</i> .....   | 20        |
| 3.4 Fragekomplex: Identität und Eigenschaften von Xylanase II .....  | 22        |
| 3.5 Fragekomplex: „Xylanase II - Relative Antigenicity Study in Guinea Pigs“ .....   | 24        |
| Literatur .....  | 25        |
| <b>4. Allgemeine Toxikologie.....</b>  | <b>28</b> |
| 4.1 Zusammenfassung.....   | 28        |
| 4.2 Kurzcharakterisierung der Untersuchungen und Schlußfolgerungen.....  | 28        |
| 4.2.1 Untersuchung zur subchronischen Toxizität .....  | 28        |
| 4.2.2 Untersuchungen zur Mutagenität .....   | 29        |
| 4.3 Detailbeurteilung der subchronischen Toxizität der Xylanase II - Präparationen .....   | 29        |
| 4.3.1 Biologisch bedeutende, statistisch signifikante Veränderungen .....  | 29        |
| 4.3.2 Weitere Auffälligkeiten .....  | 30        |
| 4.4 Qualitatives Ergebnis dieser Untersuchungen.....   | 30        |
| 4.5 Aussagen zu Sicherheitsfaktoren.....   | 32        |
| <b>Anhang: Tabelle „Subchronische Fütterungsstudie an Ratten, Xylanase II, Organgewichtsveränderung“ ..</b>  | <b>32</b> |

---

## Projektteam

Dr. Beatrix Tappeser, Öko-Institut (Ökologische Wirkungen)

Dipl. Biol. Arno Todt, nova-Institut (Immunotoxikologische Aspekte)

Dr. Dirk Bunke, Öko-Institut (Allgemeine Toxikologie)

- nova-Institut für politische und ökologische Innovation GmbH  
Rosenstr. 53  
D-50678 Köln

- Öko-Institut e.V.,  
Institut für angewandte Ökologie  
Binzengrün 34a  
D-79114 Freiburg

---

## 1. HINTERGRUND UND ZIELSETZUNG

---

Gentechnische Verfahren in der Lebensmittelherstellung unterliegen einer kritischen Bewertung durch die deutschen Umwelt- und Verbraucherschutzverbände wie auch durch die Gewerkschaft NGG. In einem Gesprächskreis, an dem Unilever wie auch Teile dieser kritisch dazu eingestellten Organisationen beteiligt sind, werden damit verbundene Fragestellungen diskutiert. Im Rahmen dieses Dialogs sollen u.a. spezifische Sicherheitsaspekte, die Gesundheit und Umwelt betreffen, exemplarisch am Beispiel des Enzyms Xylanase erörtert werden, das mit Hilfe gentechnisch veränderter Mikroorganismen produziert werden soll.

Die hier vorliegenden Ausarbeitungen sollen die beteiligten Umwelt- und Verbraucherverbände wie auch die Gewerkschaft NGG in der Diskussion unterstützen, die von der Firma Quest zur Verfügung gestellten Unterlagen zum Produkt Xylanase und seinem Produktionsprozeß einer kritischen Durchsicht hinsichtlich gesundheitlicher und ökologischer Sicherheitsfragen zu unterziehen und fundierte Fragestellungen zu entwickeln. Im Rahmen dieses Projekts wurden daher Fragestellungen formuliert, die durch die kritisch eingestellten Gruppen bewertet und in der „Gentechnik-Dialogrunde“ besprochen werden. Aufgrund des geringen finanziellen Volumens des Projekts war dabei, nach einer sorgfältigen Prüfung der Unterlagen, eine Vertiefung von Fragestellungen nur in begrenztem Umfang möglich.

## 2. Produktionssicherheit - Kurzfristige oder langfristige ökologische Wirkungen des Produktionsstammes bei einer Freisetzung in die Umwelt

### 2.1 Charakterisierung des Produktionsstammes

Produktionsstamm: *Aspergillus niger* var. *awamori* transformiert mit einem Plasmid, das ein

- amdS-Gen kodiert für eine Acetamidase,
- ampR-Gen vermittelt Antibiotikaresistenz gegen Ampicillin und
- exlA-Gen kodiert für Xylanase II trägt.

Die genaue Kopienzahl und die Integrationsorte der Kopien sind nicht bekannt. Nur für das exlA-Gen wird die Herkunft von Promotor und Terminationssequenzen angegeben. Hier sind die ursprünglichen Regulationssequenzen aus *A. awamori* verwandt worden.

Es fehlen Angaben zu den Regulationssequenzen von amdS und ampR. Ebenso sind keine Angaben zu den Replikationsursprüngen gemacht. Es läßt sich allerdings vermuten, daß ein Replikationsursprung aus *E. coli* vorhanden ist und Regulationssignale, die die Ampicillinresistenz in Bakterien exprimierbar machen. Das amdS-Gen sollte mit Regulationssequenzen versehen sein, die eine Expression in *Aspergillen* ermöglichen. Inwieweit darüber hinaus eine Expression auch in Bakterien möglich ist, geht aus den zur Verfügung gestellten Unterlagen nicht hervor.

#### Daraus ergeben sich folgende Fragen:

- Welche Replikationsursprünge trägt das Plasmid?
- Welche Regulationssignale hat das amdS-Gen?
- Welche Regulationssequenzen weist das ampR-Gen auf?

#### Kommentar:

Es gibt Fälle, wo auch Gene ohne *Aspergillen*-typische Expressionssignale exprimiert werden. Punt et al. (1987) transformierten *A. niger* mit einem Plasmid ohne kompatible Promotoren. Daß das Resistenzgen dennoch exprimiert wurde, erklären sie sich mit der Integration in der Nähe eines Promotors.

- Wurde getestet, ob der modifizierte *A. awamori* das ampR-Gen exprimiert?
- Wurde die genaue Kopienzahl der integrierten Konstrukte bestimmt?
- Gibt es Daten zur genetischen Stabilität unter den Produktions- bzw. Umweltbedingungen?

#### Kommentar:

Verdoes et al. (1993) betonen, wie wenig Wissen über die Stabilität von genetisch veränderten *A. niger* Stämmen vorhanden ist.

- Wurden Rearrangements beobachtet?
- Wird ein Teil der gebildeten EXLA Menge intrazellulär akkumuliert?

**Kommentar:**

Bei einem transgenen *A. niger*, der etwa 200 Kopien eines Glykoamylase-Gens integriert hat, wurde ein Teil der normalerweise sekretierten Glykoamylasen intrazellulär akkumuliert (Verdoes et al. 1993)

## 2.2 Taxonomie der Aspergillen

Die Systematik der schwarzen *Aspergillen* (Untergattung *Circumdati* Sektion *Nigr*) galt lange Zeit als schwierig und problematisch, da man sich allein auf morphologische Daten verlassen mußte (Samson 1994a; Kusters-van Someren et al. 1991).

Mit molekularen Methoden untersuchten Kuster-van Someren et al. (1991) die schwarzen *Aspergillen*. Ihre Einteilung unterscheidet vier Arten und ein *A. niger* Aggregat. Dieses wird nun zusätzlich in zwei Gruppen aufgespalten, die *A. niger* und *A. tubingensis* genannt werden. Ausschlaggebend für diese Separation ist, neben den molekularen Daten, die Inkompatibilität zur Heterokaryonbildung dieser beiden Gruppen. Andere Arbeitsgruppen bestätigen mit leichten Änderungen diese Resultate (Croft & Varga 1994; Varga et al. 1994 und Megnegneau et al. 1993).

| <b>Aspergillus niger</b> | <b>Aspergillus tubingensis</b> |
|--------------------------|--------------------------------|
| A. pseudocitricus        | A. pseudoniger                 |
| A. awamori               | A. satoi-kagoshimamaenis       |
| A. foetidus              | A. satoi                       |
| A. usamii                | A. inuii                       |
| A. hennbergii            | A. cinnamomeus                 |
| A. kawachii              | A. schimannii                  |
| A. aureus                |                                |

***Einteilung der Arten des A. niger Aggregates***

(nach: Kuster-van Someren et al., 1991, aufgestellt von Someren 1994b)

Die *Aspergillen* werden auch der künstlichen Gruppe der Schimmelpilze zugerechnet. Der Begriff kommt aus der mikrobiologischen Praxis und bezeichnet keine wissenschaftlich systematische Einheit. Als gemeinsame Merkmale gelten (Deltsch 1943 zitiert von Reiss 1986):

- ihr Lebensraum ist der Boden oder allenfalls konzentrierte Nährlösungen (es sind also keine ausgesprochenen Wasserpilze),
- sie können saprophytisch leben,

- sie bilden ein typisches Mycel,
- sie vermehren sich überwiegend ungeschlechtlich durch Sporen (Sporangiosporen oder Konidien),
- wenn sie überhaupt sexuelle Fortpflanzungsorgane bilden, dann sind diese sehr klein.

*A. niger* und *A. awamori* werden einerseits klar unterschieden, andererseits wird *A. niger* aber auch als Überbegriff für eine Reihe von schwarzen *Aspergillen* verwendet. Aufgrund der nahen Verwandtschaft und der häufig nicht eindeutigen Differenzierung werden deshalb Angaben zu *A. niger* bei der Bewertung der ökologischen Rolle von *A. awamori* miteinbezogen.

### 2.3 Vorkommen von Aspergillen

Die schwarzen Aspergillen sind weltweit verbreitet und wahrscheinlich die häufigsten Organismen aus ihrer Gattung. Am zahlreichsten werden sie in Böden tropischer und subtropischer Regionen gefunden (Raper & Fennel 1965). Die Häufigkeit von *A. niger* im Boden nimmt von Nord- nach Südeuropa hin zu (Reiss 1986). Der Grund liegt wahrscheinlich darin, daß Aspergillus-Arten allgemein wärmeliebend sind. Sie leben vor allem in den oberen Schichten von Böden, wobei Waldböden höhere Pilzkeimzahlen besitzen als Wiesenböden. Durch den Einsatz von Volldünger in der Landwirtschaft erhöht sich der Pilzgehalt. Die Daten über die geographische Verbreitung sind allgemein höchst unvollständig. Es gibt nur wenige Informationen, beschränkt auf einzelne Areale (Reiss 1986). Durch die große Menge an luftverbreiteten Sporen können die Aspergillen vom Boden aus die verschiedensten Lebensräume erreichen und diese mittels ihrer Fähigkeit zum Abbau zahlreicher Naturstoffe (Cellulose, Xylan, Pektin, Lignin, Stärke, Chitin, Lipide, Proteine, Fructane, Mannane, aromatische Kohlenwasserstoffe) auch besiedeln. Diese Fähigkeit macht die Aspergillen aber auch zu Lebensmittel- und Materialzerstörern (Biodeterioration). Aspergillen findet man an so unterschiedlichen Orten wie Wüstenböden, Lungen von Vögeln und Benzintanks von Flugzeugen.

### 2.4 Einfluß physikalischer Faktoren auf die Lebensbedingungen der Aspergillen

Die Faktoren Wasseraktivität, Temperatur, pH, Licht und Gaszusammensetzung haben neben dem Nahrungsangebot einen wichtigen Einfluß auf das Wachstum und die Mykotoxinproduktion der Aspergillen. Die Faktoren wirken dabei nicht isoliert, sondern verstärken oder schwächen sich (Kozakiewicz & Smith, 1994; Reiss, 1986). Nach Reiss (1986) vermehren sich Schimmelpilze nach einer bestimmten Gesetzmäßigkeit (Anlaufphase, Beschleunigung, Exponentielles Wachstum, Verzögerungsphase, Stationäre Phase und Absterbephase).

#### **Wasserverfügbarkeit**

*Aspergillen* können auch unter trockenen Bedingungen leben. Der Bedarf an Wasser wird durch den Wert  $a_w$  (Wasseraktivität) angegeben. Für *A. niger* werden folgende Zahlenwerte aufgelistet: optimales Wachstum wird bei einem  $a_w$  von 0.98 erreicht, minimales Wachstum wird noch bei

0.74-0.85 beobachtet. Zum Vergleich: Bakterien benötigen meist einen Wert von 0.95 (Kozakiewicz & Smith 1994; Reiss 1986). Konidien von *Aspergillus*-Arten können über Jahre hinweg in trockenem Zustand lebensfähig bleiben.

### **Temperatur**

*Aspergillen* gelten als mesophil. *A. niger* wächst zwischen 9 und 60° C, wobei das optimale Wachstum bei 17-42° C erreicht wird (Kozakiewicz & Smith 1994; Reiss 1986 gibt etwas andere Zahlen an). Die Sporenkeimung erfolgt ab 10° C, weitere Angaben zu Sporen, wie etwa Hitzeresistenz bei trockener Hitze wurden nicht gefunden. In den Unterlagen wird angegeben, daß Sporen bei feuchter Hitze sehr schnell abgetötet werden. Genauere Angaben werden aber leider nicht gemacht. *Aspergillen* scheinen sehr kältetolerant zu sein. Sie überleben Temperaturen von -20 bis -196° C. In flüssigem Stickstoff beträgt die längste bisher beobachtete Überlebenszeit für *A. awamori* 14 und für *A. niger* 21 Jahre (Kozakiewicz & Smith 1994).

### **pH**

*A. niger* kann zwischen den pH-Bereichen 1,5 und 9,8 wachsen. Für die Sporenkeimung wird ein pH von 3 als optimal angegeben. Der pH hat einen großen Einfluß auf die verschiedenen Stoffwechselfunktionen. Insbesondere die Produktion von Mykotoxinen scheint stark pH-abhängig zu sein (Reiss 1986).

### **Licht**

Das Wachstum der Schimmelpilze wird allgemein durch die Art oder Intensität des Lichtes nicht beeinflusst. Starke UV-Strahlung kann unpigmentierte Myzelien und Sporen schädigen. Das Fehlen von Helligkeit kann zur Bildung von Sklerotien führen (Reiss 1986). Sklerotien sind Dauerzustände in Form fester, knolliger und dickwandiger Hyphenverbände (Strasburger 1983; Raper & Fennell 1965).

### **Gaszusammensetzung**

*Aspergillen* stellen keine hohen Ansprüche an die Luftzusammensetzung. Sie können auch unter extrem sauerstoffarmen Bedingungen leben. Ein hoher Kohlendioxidgehalt hemmt das Wachstum der *Aspergillen*.

Die physikalischen Parameter sind hier isoliert betrachtet und sie betreffen vor allem das Myzel. Aussagen über das Verhalten des Myzels, der Sporen und Sklerotien unter natürlichen Bedingungen lassen sich daraus nur schwer ableiten.

## **2.5 Gesundheitsaspekte von Aspergillen**

Auf die Bedeutung der *Aspergillen* (Verursacher von Mykosen, Mykotoxikosen oder Myko-Allergien) für die Gesundheit des Menschen wird hier nicht näher eingegangen. Im Vordergrund stehen Auswirkungen auf Pflanzen, Tiere und Mikroorganismen.

### 2.5.1 Mykotoxine

Mykotoxine sind sekundäre Stoffwechselprodukte von Schimmelpilzen (genauer *fungi imperfecti*), die auf Menschen, Tiere, Pflanzen oder andere Mikroorganismen toxisch wirken und somit Mykotoxikosen hervorrufen können. Die meisten Mykotoxine sind säure- und hitzeresistent. Die Gifte können (je nach Art) hepatotoxische, carcinogene, nephrotoxische, teratogene oder immun-suppressive Effekte bewirken. Bis heute sind mehr als 300 Pilzarten bekannt, die etwa 200 Toxine bilden (Habermehl 1989). Die Produktion eines bestimmten Mykotoxins ist oft beschränkt auf einige Arten, und innerhalb einer Art kann sie stammspezifisch sein (Kozakiewicz & Smith 1994). Die Synthesewege sind meist komplex. Die Optimalbedingungen für Wachstum und Toxinbildung stimmen nicht notwendigerweise überein. Der Sekundärmetabolismus kann als biochemische Reaktion auf physiologische und ökologische Veränderungen oder Änderungen im Ernährungszustand gesehen werden (Moss 1994). Die Bildung von Mykotoxinen unterliegt somit ausgeprägten regionalen wie saisonalen Schwankungen und ist abhängig vom Nahrungsangebot, Wassergehalt, Temperatur und Interaktionen mit anderen Pilzen. Nach Thalmann (1989) werden für die Giftbildung Substrate bevorzugt, die reich an Kohlenhydraten komplexer Zusammensetzung sind. Die Temperatur spielt dabei nicht so eine große Rolle wie der pH, dessen Bereiche für die Toxinproduktion enger sind als für die Pilzentwicklung. Sehr wenig ist über die Faktoren bekannt, die zur Bildung der giftigen Metabolite unter Feldbedingungen führen (Thalmann 1989; Kozakiewicz 1994; Kozakiewicz & Smith 1994).

Einige der wichtigsten Mykotoxinproduzenten neben *Fusarium* und *Penicillium* stammen aus der Gattung der *Aspergillen*. In der Lebensmitteltechnologie werden *Aspergillen* verwendet, die zu den Giftbildnern gezählt werden. Dies macht diese Gattung zu einem Sorgenkind der biotechnischen Industrie (Lewis et al. 1994). Es werden jedoch solche Stämme für die Produktion ausgesucht, die schon lange bekannt sind und unter den Fermentationsbedingungen keine Toxine bilden. Es sei eine allgemeine Erfahrung, daß Pilze während der langen Anwendung in Industriekulturen ihre Fähigkeit zur Mykotoxinbildung verlieren (Moss 1994; Wicklow et al. 1994; Scudamore 1994). Doch es scheint, daß die Organismen dabei das Potential zur Toxinproduktion nicht verlieren. Ein nicht-toxischer *A. oryzae* Stamm wurde nach Behandlung mit einem Mutagen wieder toxisch (Benkhemmar et al. 1985 zitiert von Moss 1994).

*A. niger* wird allgemein nicht zu den Aflatoxinproduzenten gezählt und auch Schuster & Dunn-Coleman (1993) geben in ihrer Publikation „*Aspergillus niger* - a safe organism for biotechnology“ an, daß keine Fälle von Aflatoxin produzierenden *A. niger* Stämmen bekannt seien. Die Stammbeschreibungen der MUCL-Sammlung geben jedoch für zwei Vertreter von *A. niger* an, daß sie Produzenten von Aflatoxinen sind (Nr. 18911-18912). *A. niger* ist dazu fähig, die Aflatoxinproduktion von *A. flavus* zu inhibieren (Horn & Wicklow 1983) und kann Aflatoxin B1 in Aflatoxin AFL umwandeln. Auch die umgekehrte Reaktion ist möglich (Nakzato et al. 1990). Die schwarzen *Aspergillen* können aber einige andere giftige Sekundärmetabolite herstellen. Raper & Fernell (1965) zählen *Aspergillin* (Aspergin), eine antibiotisch wirksame Substanz, und das

phytotoxische Malformin zu den Mykotoxinen von *A. niger*. Neben diesen beiden Giften wird eine Reihe nicht identifizierter Substanzen erwähnt, die toxische Wirkungen auf andere Pilze, Pilzsporen, Protozoen, Bakterien und Viren (Inaktivierung des TMV) ausüben. Heute werden neben Malformin und Aspergillin zusätzlich Kojisäure, Oxalsäure, Nigragillin, Aurasperon, Nominin und Ochratoxin bei Spezien aus dem *A. niger* Aggregat gefunden (Lewis et al. 1994; Kozakiewicz 1994; Abarca et al. 1994; TePaske 1991; Roth et al. 1990; Schuster & Dunn-Coleman 1993).

### **Kojisäure**

Kojisäure wirkt als Mutagen und kann epilepsieartige Symptome hervorrufen. Nach Roth et al. (1990) gehört auch *A. awamori* zu den Produzenten von Kojisäure. *A. niger* hingegen scheint diese Säure nicht zu produziereen, zumindest nicht unter Produktionsbedingungen (Schuster & Dunn-Coleman 1993). Das Fehlen eines Toxins unter Produktionbedingungen ist jedoch noch kein Beweis dafür, daß der Organismus dieses Gift nicht produziern kann. Von *A. oryzae*, *A. sojae* und *A. tamarii* ist bekannt, daß sie im Fermenter keine Kojisäure bilden, unter spezifischen Umweltbedingungen aber dazu fähig sind (Aidoo et al. 1994).

### **Oxalsäure**

Die einzigen Angaben, die hierzu gefunden wurden, stammen von Schuster & Dunn-Coleman (1993) und Raper & Fennell (1965). Durch die Produktion von Oxalat kann *A. niger* bei der Erdnuß Kronenfäule (crown rot) verursachen. Und es gibt Hinweise, daß Tiere durch einen Oxalsäure produzierenden *A. niger* vergiftet wurden.

### **Nigragillin**

Dieses Toxin wird bei Isolaten von *A. niger* und *A. phoenicis* gefunden. Der LD50 beträgt 250 mg/kg Körpergewicht (gemessen an einem ein Tag alten Chockerspaniel) (Schuster & Dunn-Coleman 1993).

### **Aurasperon**

Aurasperone sind Naphtopyrone. Aus Myzelen von *A. niger* können verschiedene dimerische und monomerische Naphto- $\gamma$ -Pyrone isoliert werden (Aurasperone A,B,C,D und E sowie Rubrofusarin und Flavosperon). Aurasperone wirken auf Mäuse und Ratten akut toxisch. Sie sind auch aktiv gegen Insekten (Wicklow et al., 1994). Je nach Substrat produziert *A. niger* unterschiedlichen Mengen der verschiedene Aurasperone. Die verschiedenen Isolate von *A. niger* bilden nicht die gleiche Quantität an Aurasperon (Ehrlich et al. 1984). Auch die Konidien von *A. niger* können signifikante Mengen an Aurasperon aufweisen (Palmgreen & Lee 1986, zitiert von Lewis et al. 1994).

### **Malformin**

Es sind verschiedene Malformine (zyklische Pentapeptide) bekannt. A1 und A2 findet man bei *A. niger*, *A. phönicis*, *A. ficuum* und *A. awamori*, B1, B2 und C jedoch nur bei *A. niger* (Kobbe et

al. 1977). Malformine zeigen antibiotische Wirkung und können in Pflanzen Verkrümmungen verursachen (Bodanszky & Stahl 1974; John & Curtis 1974). Nach Schuster & Dunn-Coleman (1993) weist Malformin A1 bei Mäusen, intraperitoneal verabreicht, einen LD50 von 3.1 mg/kg und oral gegeben einen von 50 mg/kg auf. Bei Malformin C fand man einen LD50 von 0.9 mg/kg (intraperitoneal bei Ratten) (Schuster & Dunn-Coleman 1993; Anderegg et al. 1976).

### **Ochratoxin**

Bis vor kurzem war von keinem Organismus aus der Sektion der Nigri bekannt, daß er Ochratoxin produzieren kann. Abarca et al. (1994) isolierten zwei *A. niger var. niger* (oder *A. tubingensis* oder *A. ficuum* ?), die sich als schwache Ochratoxinproduzenten erwiesen. Die wichtigsten Produzenten gehören der Sektion Circumdati an. Auch in der *A. glaucus* Gruppe und bei Penicillium Arten findet man Ochratoxin (Abarca et al. 1994).

Ochratoxin wirkt nephrotoxisch, immuno-suppressiv, teratogen und carcinogen (Lewis et al. 1994). Es gibt Hinweise, daß Ochratoxin die Ursache für die Balkan Nephropathie ist. In England ist Ochratoxin nach Aflatoxin das häufigste Mykotoxin in Tiernahrung (Scudamore 1994).

### **Nominin**

Nominin ist ein Indolditerpenoid und biogenetisch verwandt mit den Aflavinen. Es besitzt anti-insektizide und antibakterielle Eigenschaften. Dieses Toxin wird vor allem von *A. nomius* gebildet, kann aber auch bei *A. tubingensis* gefunden werden (TePaske 1991, zitiert von Wicklow et al. 1994). *A. tubingensis* produziert zudem auch Carbazolalkaloide (Tubingensine; Wicklow et al. 1994). Es bleibt unklar, ob auch andere Organismen aus dem *A. niger* Aggregat Nominin und Tubingensin bilden können.

## **2.5.2 Einfluß auf andere Organismen**

### **Pflanzen**

*Aspergillen* leben normalerweise als Saprophyten auf totem Pflanzengewebe. Durch das Ausscheiden phytotoxischer Sekundärmetabolite, wie Malformin oder Oxalsäure können sie direkt schädliche Wirkungen auf Pflanzen ausüben. Unter gewissen Bedingungen können sie zudem zum Pflanzenpathogen werden. Raper & Fennel zitieren einige solche Fälle: *A. niger* kann Stammfäule (bole rot) bei Baumwolle und

Sisal, schwarzen Schimmel (black mold) bei Zwiebel, Knoblauch und Schalotten, Fäule bei Dracena, Chlorosen bei Mandelbäumen etc. verursachen. Auch *A. carbonarius* und *A. aculeatus* können Pflanzen infizieren (Domsch et al. 1980, zitiert von Wicklow et al., 1994). Die Mechanismen des Krankheitsbefalls sind nicht eindeutig geklärt. Es ist aber durchaus vorstellbar, daß die schwarzen *Aspergillen* durch den Besitz verschiedener hydrolytischer Enzyme, wie Cellulasen, Xylanasen, Pektinasen und Proteasen, unter bestimmten Bedingungen

Pflanzenzellwände schädigen und Pflanzen parasitieren können. Auch Saatgut können die *Aspergillen* mit Hilfe dieser Enzyme befallen und zur Ernährung nutzen. Dies ist vor allem in Ländern des Südens ein ökonomisches Problem. *A. niger* kann auch die Samenkeimung hemmen (Vijayan & Rehill 1990; Upadhyay et al. 1980; Manturovskaja & Sizova 1967).

### **Säugetiere**

*Aspergillen* können einerseits als Futtermittelkontaminanten durch die Produktion von Mykotoxinen Tiere schädigen, andererseits gibts es auch Arten, die Gewebe von lebenden Tieren infizieren können. *Aspergillen* sind jedoch keine eigentlichen Parasiten und die Besiedlung von Tiergewebe stellt für sie eine ökologische Sackgasse dar. Es ist anzunehmen, daß alle terrestrischen Tiere dauernd den durch Luft übertragenen Konidien von *Aspergillen*-Arten ausgesetzt sind. Bei Warmblütern wird die größte Anzahl an Infektionen von *A. fumigatus* verursacht. Daneben spielen aber auch *A. niger*, *A. terreus*, *A. flavus* und *A. nidulans* eine Rolle. Alle diese Organismen infizieren vor allem Gewebe des respiratorischen Traktes (Aspergillose), aber auch das Außenohr und Nägel werden befallen. Für eine erfolgreiche Infektion scheint eine hohe Sporenkonzentration notwendig zu sein.

Bei Säugern werden die gleichen Formen gefunden wie beim Menschen. Hunde und Pferde werden oft in der Nebenhöhle infiziert (Sinusitis). Die meisten Fälle von *Aspergillus*infektionen werden jedoch nicht primär durch den Pilz verursacht. Meistens weisen die befallenen Tiere ein geschwächtes Immunsystem auf; das heißt, *Aspergillen* wirken als Opportunisten. So läßt sich erklären, weshalb es bei jungen Schweinen und Schafen Ausbrüche akuter Lungenaspergillose gibt. Eine Pilzinfektion kann auch den Tod des Foetus zur Folge haben. Solche Fälle kennt man bei Schafen, Pferden, Rindern und Schweinen (Campbell 1994). Der Autor macht keine Angaben über von *Aspergillen* verursachte Krankheiten bei

**Wildsäugetiere:** Weiter bleibt abzuklären, welche Bedeutung *A. niger* und *A. awamori* als opportunistische Krankheitserreger spielen.

### **Vögel**

*Aspergillen* infizieren die Lungen und die Luftsacksysteme aller Vogelarten. Ökonomische Bedeutung erhalten vor allem Ausbrüche der tödlich verlaufenden, akuten Brutkasten-Pneumonia bei jungen Batteriehühnern. Auch ältere Vögel können an Aspergillose erkranken. Besonders anfällig scheinen in Gefangenschaft lebende Vögel zu sein.

### **Insekten**

Insekten und filamentöse Pilze interessieren sich oft für dieselben Nahrungssubstrate (Samen, Früchte etc.). Die *Aspergillen* versuchen die Konkurrenten durch Mykotoxine zu schwächen oder zu vertreiben. Die Insekten versuchen sich wiederum durch die Entwicklung detoxifizierender Mechanismen zuwehren. *Aspergillus*-Arten können auch direkt Insekten als Futter verwenden. Sie werden auf toten, kranken oder lebenden Insekten gefunden. Umgekehrt erweisen sich Pilzmyzele und vor allem Sklerotien als nährreiche Substrate, die von Insekten genutzt werden.

Viele der toxischen Sekundärmetaboliten von *Aspergillen* zeigen antiinsektizide Wirkungen: Wachstumshemmung, Reduzierung der Puppengrösse, verringerte Fruchtbarkeit, Sterilität, Wirkung als Repellens und als Mutagene. Eine besondere Quelle antiinsektizider Stoffe scheinen Sklerotien darzustellen. Hier dienen sie zusätzlich oder als Alternative zur Verdickung der Zellwand als Schutz vor Insektenfrass. Sklerotien enthalten oft Substanzen, die im Myzel nicht gefunden werden. *A. tubingensis* produziert in den Sklerotien Aurasperon A, Fonsecinon A (Naphthopyrone), Tubingensine (Carbazolalkaloid) und Aflavine. In den Sklerotien werden 10mal mehr Aurasperon und Fonsecinon gefunden. *A. niger* bilden in seinen Sklerotien dieselben antiinsektiziden Komponenten wie *A. tubingensis* (Wicklow et al. 1994)

**Aus den Kapiteln 2.2 - 2.5 ergeben sich folgende Fragen:**

- Wurde überprüft, ob nach der Hitzesterilisierung noch lebensfähige Zellen, Sporen, Konidien, Sklerotien im Fermenterschlämml vorhanden sind?
- Wurden Messungen im Feld durchgeführt, die auf veränderte Populationen oder erhöhte Populationsdichten von *A. niger* schließen lassen?
- Wurden die pH-Werte der landwirtschaftlichen Böden, auf die der Fermenterschlämml als Dünger ausgebracht wird, bestimmt?
- Findet unter den Bedingungen dieser Böden eine Mykotoxinbildung statt?
- Wurden bodenlebende Kleintiere auf Wirkungen hin untersucht, bzw. wurden Veränderungen in der Populationszusammensetzung untersucht?
- War das Pflanzenwachstum auf den behandelten Feldern unverändert?
- Hat es veränderte oder eine erhöhte Rate von Pflanzenkrankheiten gegeben?
- Fand überhaupt eine Überwachung der Felder statt, um gegebenenfalls Auffälligkeiten so frühzeitig wie möglich zu entdecken und die Ausbringung stoppen zu können?

**Kommentar:**

Auf Nachfrage von A. Todt an Dr. de Rijke wurden keinerlei Messungen zur Überprüfung der Überlebensfähigkeit durchgeführt.

## **2.6 Xylanasen**

### **2.6.1 Xylan**

Xylane bilden nach Cellulose das größte Reservoir an fixiertem Kohlenstoff in der Natur. Als Hauptbestandteil der Hemicellulosen werden sie in den Zellwänden aller Landpflanzen gefunden (Wong et al. 1988)

Neben der wichtigen Rolle als Zellwandbestandteil kann Xylan in Pflanzensamen auch die Funktion eines Speicherpolysaccharids übernehmen (Pang et al. 1971 zitiert nach Dekker & Richards 1976).

### 2.6.2 Charakterisierung der Xylan-abbauenden Enzyme

Um heteropolymeres, verzweigtes Xylan komplett zu degradieren, werden Enzyme mit verschiedenen Spezifitäten benötigt (Thomson 1993; Vietor et al 1994; Duarte & Costa-Ferreira 1994). Die meisten Endoxylanasen spalten die Xylane in Oligosaccharide. Diese werden dann von  $\beta$ -Xylosidasen (EC 3.2.1.37) zu Xylose hydrolysiert. Neben Endoxylanasen werden auch Exoxylanasen beschrieben. Im Ganzen gesehen, scheint die Hydrolyse von hochverzweigtem Xylan erst durch ein kooperatives Zusammenwirken verschiedenster Enzyme möglich zu sein (Wong et al. 1988; Duarte & Costa-Ferreira 1994).

### 2.6.3 Ökologische Bedeutung und Vorkommen von Xylanasen

Ein großer Teil des auf der Erde vorhandenen Kohlenstoffs liegt in Pflanzen vor (jährliche Produktion an Biomasse:  $10^{11}$  Tonnen). Damit dieser fixierte Kohlenstoff in den C-Kreislauf einfließen kann und das Gleichgewicht erhalten bleibt, müssen die organischen Substanzen mineralisiert werden. Diese für den Stoffkreislauf wichtige Aufgabe übernehmen verschiedene Bodenbakterien, Pilze, Protozoen und Würmer. Welcher quantitative Anteil dabei den Pilzen und im besonderen den *Aspergillen* zukommt, ist unbekannt (Weber 1993). Zum Abbau des fixierten Kohlenstoffs werden von diesen Organismen verschiedene Enzyme eingesetzt: Cellulasen, Hemicellulasen, Pektinasen, Lignasen etc. Diese Enzyme hydrolysieren die Polymere in Oligo- und Monomere, die dann zur Energiegewinnung zu  $\text{CO}_2$  katabolisiert werden. Die gegenwärtigen Kenntnisse über den Abbau von Naturstoffen stammen jedoch vorwiegend aus Laboruntersuchungen und lassen sich nur schwer auf die tatsächlich in der Natur ablaufenden Prozesse übertragen (Weber 1993).

Eine wichtige Rolle im Abbauprozess kommt auch den Xylanasen (eine Hemicellulase) zu, die Xylan zu Di- und Trimeren degradieren. Diese Oligosaccharide werden durch Xylosidasen zu Xylose umgesetzt, die in den Pentosephosphatzyklus einfließt (Weber 1993). Die Fähigkeit zum Xylanabbau ist weit verbreitet und kommt häufiger vor als die zum Celluloseabbau (Weber 1993; Schlegel 1976). Eine Übersicht geben Dekker & Richards (1976):  $\beta$ -1,4-Xylanasen findet man in marinen und terrestrischen Bakterien, in Pilzen (Saprophyten, Phytopathogenen und Mycorrhiza-Pilzen), Hefen, Protozoen, xylophagen Insekten, Schnecken, marinen Algen, Krebsen und in keimenden Samen von Landpflanzen, wie Weizen, Roggen, Mais, Hafer und Gerste. Vertebraten hingegen bilden keine Xylanasen. Diese Tiere benötigen zur Verwertung xylanhaltiger Nahrung die xylanolytischen Enzyme ihrer mikrobiellen Flora und Fauna im Magendarmtrakt.

Bei den meisten Pilzen, Bakterien und Hefen findet man die Xylanasen extrazellulär, es existieren aber auch intrazelluläre Xylanasen (Dekker 1985).

Xylanasen ermöglichen nicht nur die Verwendung von Xylan als Nahrungssubstrat, sondern können auch zur Erschließung anderer Nahrungsquellen dienen. So besitzt *Clostridium thermocellum* mehrere verschiedene Xylanasen und sogar eine Xylosidase, ohne aber die Fähigkeit zu besitzen, Xylan zu nutzen. Möglicherweise erleichtern diese xylanolytischen Enzyme *C. thermocellum* den Zugang zur verwertbaren Cellulose (Morag et al. 1990, zitiert von Thomson 1993). Weitere Beispiele hierfür sind Mycorrhiza- und phytopathogene Pilze. In diesen parasitischen und mutualistischen Pflanzen-Mikroorganismus-Interaktionen spielt die Kontrolle der hydrolytischen Enzyme eine wichtige Rolle. Wong et al. (1988) meinen, daß die Überlebensfähigkeit von Mikroorganismen in einem gegebenen Ökosystem von der Produktion [Menge?] und Funktion gewisser Enzyme abhängen kann (Raper & Fennel 1965) und andererseits die Abwehrmechanismen der Pflanzenzellen gegen Pilze von den jeweils gebildeten Enzymmengen (z.B. Proteasen gegen Zellwand-abbauende Enzyme) abhängen können.

#### 2.6.4 Aspergillen und Xylanasen

*Aspergillen* produzieren große Mengen an Hemicellulasen und Cellulasen. Dies macht sie zu essentiellen Mitgliedern im komplexen mikrobiellen System der Destruenten (Duarte & Costa-Ferreira 1994).

Daraus ist abzuleiten, daß *Aspergillen* eine gewichtige Rolle im Kohlenstoffkreislauf im Boden einnehmen. In den zur Verfügung gestellten Papieren sind keine spezifischen Genehmigungsunterlagen zum zu beurteilenden Produktionsorganismus beigelegt. Stellvertretend sind die entsprechenden Genehmigungsunterlagen für einen transgenen *Aspergillus niger var awamori* oder *var aculeatus* mit einem Rhamnogalacturonasegen beigelegt.

Die Fragen in den Antragsunterlagen:

- Anticipated interaction of the organism with those in the Environment?
- Known or predicted effect on Plants and Animals?
- Known or predicted involvement in Biogeochemical Processes?

werden alle mit „None“ beantwortet

Da *Aspergillen* z.B. antiinsektizide Effekte ausüben können, in bestimmten Situationen Pflanzenpathogene sind und auf jeden Fall wichtige Glieder im Kohlenstoffkreislauf, verwundern diese Angaben sehr.

Im Zusammenhang mit transgenen *A. awamori*, die deutlich erhöhte Mengen an Xylanasen produzieren, sind diese Angaben aber mit Sicherheit nicht mehr zutreffend.

Hier läßt sich annehmen, daß durch die erhöhte Xylanase-Menge und Aktivität die pathogenen Eigenschaften des Organismus verändert sind, da z.B. eine verbesserte Zugänglichkeit der Pflanzenzellen durch Abbau der Zellwände erwartet werden kann. Auch sollten die Umsätze im Boden durch die erhöhten Enzymmengen verändert sein.

Insgesamt ergeben sich daraus folgende Fragen:

#### **Fragenkomplex zu Stabilität und Aktivität des Enzyms:**

- Kann das Enzym und/oder Enzymaktivität in Fermenterschlämme nachgewiesen werden?
- In welchen Mengen?
- Wie sieht die Stabilität des Enzyms im Boden aus?

#### **Kommentar:**

Bei extrazellulär vorliegenden Enzymen muß eine gewisse Umweltstabilität erwartet werden.

- Wurden Wirkungen auf den Kohlenstoffkreislauf im Boden überprüft?

#### **Fragenkomplex zum Verbleib des Genkonstrukts:**

- In welcher Menge werden im Fermenterschlämme die Genkonstrukte nachgewiesen?
- Wurden im Labor Gentransferexperimente vorgenommen?
- Wurden Messungen im Feld zur Stabilität und Persistenz der DNA (Genkonstrukte) durchgeführt?

#### **Kommentar:**

Mittlerweile gibt es viele experimentelle Daten, die auf eine hohe Stabilität der Genkonstrukte/DNA im Boden hinweisen. Smalla konnte z.B. spezifisch das transgene *uptII*-Gen (Kanamycinresistenz) über ein Jahr im Boden nachweisen.

Andere Ergebnisse, die ähnlich lange Zeiten betreffen, werden von ihr zitiert (Smalla 1995).

Da das Xylanase-Genkonstrukt ein Ampicillinresistenzgen enthält, ergibt sich daraus ein besonderes Besorgnispotential.

- (Unter Mitarbeit von Diplombiologe Benno Vogel) -

## **Literatur**

- Abarca ML, Bragulat MR, Castella G, Cabanes FJ (1994) Ochratoxin A production by strains of *Aspergillus niger* var. *niger*; *Applied and Environmental Microbiology*, Vol 60, S 2650-2652
- Aidoo KE, Smith JE, Wood BJB (1994) Industrial aspects of soy sauce fermentation using *Aspergillus*; *The Genus Aspergillus*, edited by KA Powell, A Renwick, JF Peberby, Plenum Press New York

- Benkhemmar O, Gaudemer F, Bouvier-Fourcade I (1985) Heterokaryosis between *Aspergillus oryzae* Cyclopiazonic acid-defective strains: method for estimating the risk of inducing toxin production among cyclopiazonic acid-defective industrial strains; *Applied and Environmental Microbiology*, Vol 50, S 1087-1093
- Bodanszky M, Stahl GL (1974) The structure and synthesis of malformin A; *Proc. nat. Sci USA*, Vol 71, S 2791-2794
- Campbell CK (1994) *Forms of Aspergillosis; The Genus Aspergillus*, edited by KA Powell, A Renwick, JF Peberby; Plenum Press new York
- Croft JH, Varga J (1994) Application of RLFPS in systematics and population genetics of Aspergilli, *The Genus Aspergilli*, edited by KA Powell, A Renwick, JF Peberby; Plenum Press New York
- Dekker RFH, Richards GN (1976) Hemicellulases: Their occurrence, purification, properties and mode of action; *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, Vol 32, S 277-352
- Dekker RFH (1985) *Biodegradation of the hemicelluloses; Biosynthesis and Biodegradation of Wood Components*, Academic Press, Inc
- Duarte JC, Costa-Ferreira M (1994) Aspergilli and lignocellulosis; *FEMS Microbiology Reviews*, Vol 13, S 377-386
- Ehrlich KC, DeLucca AJ, Ciegler A (1984) Naphto-gamma-pyrone production by *Aspergillus niger* isolated from Cottonseed; *Applied and Environmental Microbiology*, Vol 48, S 1-4
- Habermehl G (1989) Die Bedeutung von Mykotoxikosen für Mensch und Tier, *Dtsch. tierärztl. Wschr.* 1989, S 335-338
- Horn BW, Wicklow DT (1983) Factors influencing the inhibition of aflatoxin production in corn by *Aspergillus niger*; *Can J. Microbiol.*, Vol 29, S 1087-1091
- John WW, Curtis RW (1974) Stimulation of plant growth by malformin A; *Experientia*, Vol 30, S 1392-1393
- Kobbe B, Cushman M, Wogan GN, Demian AL (1977) Production and antibacterial activity of malforminC, a toxic metabolite of *Aspergillus niger*; *Applied and Environmental Microbiology*, Vol 33, S 996-997
- Kozakiewicz Z (1994) *Aspergillus toxins and taxonomy; The genus Aspergillus*, edited by KA Powell, A Renwick, JF Peberby; Plenum Press New York
- Kozakiewicz Z, Smith D (1994) *Physiology of Asperigillus; Asperigillus*, edited by JE Smith; Plenum Press New York
- Kuster-van Someren MA, Samson RA, Visser J (1991) The use of RLFP analysis in classification of the black Aspergilli: reinterpretation of the *Aspergillus niger* aggregate; *Curr. Genet.*, Vol 19, S 21-26
- Lewis CW, Anderson JG, Smith JE (1994) Health-related aspects of the genus *Aspergillus*; *Aspergillus*, edited by JE Smith, Plenum Press New York
- Manturovskaja NV, Sizova TP (1967) Interactions between germinating Spruce seedlings and soil fungi. I.; *Mikol. i Fitopat.*, Leningrad 1967 1 (6)
- Megnégneau B, Cebets F, Hoekstra RF (1993) Genetic variability and relatedness in the complex group of black Aspergilli based on random amplification of polymorphic DNA; *Curr. Genet.*, Vol 23, S 323-329
- Moss MO (1994) *Biosynthesis of Aspergillus toxins-non-aflatoxins; The Genus Aspergillus*, edited by KA Powell, A Renwick, JF Peberby; Plenum Press New York
- Nakzato M, Morozumi S, Saito K, Fujinuma K, Nishima T, Kasai N (1990) Interconversion of Aflatoxin B1 and Aflatoxicil by several fungi; *Applied and Environmental Microbiology*, Vol 56, S 1465-1470

- Punt PJ, Oliver RP, Dingemans MA, Pouwels PH, van den Hondel CAMJJ (1987) Transformation of *Aspergillus* based on the hygromycin B resistance from *Escherichia coli*; *Gene*, Vol 56, S 117-124
- Raper KB, Fennel DI (1965) The Genus *Aspergillus*; *The Genus Aspergillus*, edited by KB Raper and DI Fennel, S 13-35, S 315-319, S 331-343
- Reiss J (1986) Schimmelpilze als Lebensmittelverderber; *Schimmelpilze*, J Reiss, Springer, S 71-97
- Reiss J (1986) Morphologische Kennzeichen der Schimmelpilze/Verbreitung der Schimmelpilze/Lebensbedingungen der Schimmelpilze; *Schimmelpilze*, J Reiss, Springer, S 1-43
- Roth, Frank and Kormann (1990) *Schimmelpilze und Mykotoxine*; In: Roth, Frank; Kormann. 1990. *Giftpilze-Pilzgifte*; exo-med-verlag
- Schuster E, Dunn-Coleman N (1993) *Aspergillus niger* - A safe organism for biotechnology. A review; entnommen Quest-Unterlagen, keine weiteren bibliographischen Angaben
- Scudamore KA (1994) *Aspergillus* toxins in food and animal feedingstuffs; *The Genus Aspergillus*, edited by KA Powell, A Renwick, JF Peberby; Plenum Press New York
- Samson RA (1994a) Taxonomy - Current Concepts of *Aspergillus*; *Aspergillus*, edited by JE Smith, Plenum Press New York
- Smalla K (1995) Horizontal gene transfer from transgenic plants into plant-associated bacteria and soil bacteria; In: *Safety of Transgenic Corps. Environmental and Agricultural Considerations*, Proceedings, Basel Forum in Biosafety; Agency BATS, Basel, Schweiz
- Strasburger (1983) *Lehrbuch der Botanik*, Gustav Fischer Verlag Stuttgart
- Thalmann A (1989) Bedingungen für die Bildung von Mykotoxinen in Futtermitteln. In: *Dtsch. tierärztl. Wschr*, Vol 96, S 341-343
- Thomson JA (1993) Molecular biology of xylan degradation; *FEMS Microbiology Reviews*, Vol 104, S 65-82
- Upadhyay RK, Arora DK, Dwivedi RS (1980) Staling growth products of phyllosphere fungi; *Experientia*, Vol 36, S 66-67
- Varga J, Kevei F, Vagvölgy C (1994) Double-stranded RNA mycoviruses infection *Nigri* of the *Aspergillus* genus; *Can J Microbiol.*, Vol 40, S 325-329
- Verdoes JC, Punt PJ, Schrickx JM, van Verseveld HW, Stouthamet AH, van den Hondel CAMJJ (1993) Glucoamylase overexpression in *Aspergillus niger*: molecular genetic analysis of strains containing multiple copies of the *gla* gene; *Transgenic Research*, Vol 2, S 84-92
- Vietor RJ, Hoffmann RA, Angelino SAGF, Voragen AGJ, Kamerling JP, Vliegenthart JFG (1994) Structure of small oligomers liberated from barely arabinoxylans by endoxylanase from *Aspergillus awamori*; *Carbohydr. Res.*; Vol 254, S 245-255
- Vijayan AK, Rehill PS (1990) Effect of culture filtrates of some seed born fungi of *Dalbergia sossou* on seed germination and seedling growth; *Indian Forester*, Vol 116/7, S 559-563
- Weber H (1993) *Allgemeine Mykologie* von Herbert Weber; Gustav Fischer Verlag Jena / Stuttgart
- Wicklow DT, Dowd PF, Gloer JB (1994) Antinsectan effects of *Aspergillus* metabolites; *The Genus Aspergillus*, Edited by KA Powell et al., Plenum Press New York
- Wong KKY, Tan LUL, Saddler JN (1988) Multiplicity of beta-1,4-xylanase in microorganisms: function and application; *Microbiological Reviews*, Vol 52, S 305-317

### 3. Immunotoxikologische Aspekte

Ein besonderes Augenmerk bei der gesundheitlichen Bewertung von Enzympräparaten ist ihrem immunotoxikologische Potential zu schenken, da im Bereich der industriellen Produktion von Enzymen und in ihrer Verarbeitung insbesondere im Bäckerhandwerk bereits vielfältige Erfahrungen mit allergenen Effekten gesammelt werden konnten. Nutritive Sensibilisierungen gegen Lebensmittelenzyme bei Konsumenten konnten bislang allerdings noch nicht schlüssig nachgewiesen werden. Dies kann eventuell darauf zurückzuführen sein, daß zu diesem Problemfeld bislang wenig experimentelle Arbeiten durchgeführt wurden und daher keine gesicherte Datenbasis besteht (1). Allerdings konnte nachgewiesen werden, daß bei bereits bestehender Sensibilisierung durch Aufnahme des entsprechenden Enzyms über den Magen-Darmtrakt allergische Reaktionen hervorgerufen werden können (2, 3).

Bei der immunotoxikologischen Bewertung von Enzymen muß in Betracht gezogen werden, daß kommerzielle Enzympräparate unreine Produkte sind, die Rückstände des Wachstumssubstrats und der Mikroorganismen mit ihren Stoffwechselprodukten, andere Enzyme sowie Konservierungszusätze enthalten können, die neben dem Enzym selbst als mögliche Allergene in Frage kommen (1, 4). Da für immunologische Reaktionen keine klaren Dosis-Wirkungs-Relationen bestehen, können auch geringe Konzentrationen von Verunreinigungen ein Gefährdungspotential darstellen. Daneben können Substanzen aus Mikroorganismen, als Adjuvant wirken (5). Adjuvantien können das Immunsystem in einer Weise aktivieren, daß die immunologische Antwort des Organismus gegen ein Allergen stärker ausfällt (6). Es ist daher denkbar, daß Enzymprodukte oder Verunreinigungen als Adjuvantien dazu führen, daß Personen allergisch auf Substanzen reagieren, gegen die sie unter „normalen“ Umständen keine Symptome zeigen.

Bei den Sicherheitsüberlegungen zur Produktion und Anwendung von Enzymen ist auch das Phänomen allergischer Kreuzreaktionen mit in Betracht zu ziehen, das zur Erweiterung des Personenkreises führen kann, der gegen eine spezifische Substanz allergische Reaktionen zeigt. Aufgrund ähnlicher oder übereinstimmender Epitope (Allergie verursachende Bereiche) von Allergenen, können bei Personen allergische Reaktionen gegen Substanzen auftreten, ohne daß vorher eine Sensibilisierung stattgefunden hat<sup>1</sup>.

Deutlich wird, daß in der Bewertung des allergenen Potentials gentechnisch erzeugter Xylanase grundsätzlich drei Bereiche betrachtet werden sollten, in denen Personen mit dem Präparat in Kontakt kommen können:

1. Produktion des Produkts;
2. Verarbeitung des Produkts im Bäckerhandwerk sowie,

### 3. Verzehr des Produkts durch den Endverbraucher.

Dabei sollte das Augenmerk gerichtet werden auf:

- Xylanase selbst,
- Verunreinigungen aus dem Produktionsprozeß mit *Aspergillus niger* sowie
- Veränderungen der biochemischen Struktur von Xylanase, die immunotoxikologische Effekte beeinflussen können<sup>2</sup>.

## 3.1 Abgrenzung der Fragekomplexe

Der Schwerpunkt in den Entwicklung von Fragestellungen hinsichtlich des immunotoxikologischen Potentials von Xylanase - produziert mit gentechnisch veränderten Mikroorganismen - liegt im Bereich der Veränderungen, die sich aus der Anwendung der Gentechnik ergeben. Daneben finden aber auch einzelne Aspekte Berücksichtigung, die das Produkt als Ganzes berücksichtigen. Denn die Anwendung der Gentechnik in der Produktion von Enzymen kann, durch die technische Verbesserung der Präparate und wirtschaftlichere Produktion, einen Einsatz von Enzympräparaten in Lebensmitteln und damit das Problem von Proteinzusätzen als versteckte Allergene weiter befördern (vgl. 9). Xylanase stellt dabei neben anderen bekannteren Lebensmittelenzymen immerhin ein neues potentes Allergen dar, für das gefordert wird, daß über dessen Gefährdungspotential und Maßnahmen zur Risikovermeidung informiert wird (4). Es wurde zudem nachgewiesen, daß Xylanase wie auch Cellulase sowohl Haut- als auch Atemwegsallergien verursachen kann und zudem zwischen diesen Enzymen immunologische Kreuzreaktionen bestehen (4, 10).

## 3.2 Zusammenfassung

Bei der Durchsicht der Unterlagen, die von der Firma Quest bzw. Unilever zur Verfügung gestellt wurden, ergaben sich unter immunotoxikologischen Gesichtspunkten eine Reihe von Fragestellungen hinsichtlich der Begleitsubstanzen bzw. Verunreinigungen, die das Präparat Xylanase II enthält, nach der Identität und den Eigenschaften des Enzyms selbst sowie den immunotoxikologischen Potentialen der Substanzen. Die Studie zum relativen allergenen Potential von Xylanase II liefert nur in sehr beschränktem Maße Antworten auf Fragen nach dem allergischen Potential des Präparats. Zudem wirkt die Interpretation der Ergebnisse der Untersuchung Fragen auf.

---

<sup>1</sup> Beispiele: Personen, die unter beruflich bedingtem Astma durch Cellulase Staub litten, zeigten allergische Reaktionen bei Hauttests mit *Aspergillus niger* Extrakt (7). Bei den Allergenen des Backmehls bestehen teilweise Antigenverwandschaften und Kreuzreaktionen mit Gräserpollen (8). Kreuzallergische Reaktionen treten z. B. auch bei Birkenpollen und Apfel auf.

<sup>2</sup> Eine Veränderung des allergenen Potentials von Proteinen ist z.B. prinzipiell durch mechanische Energien (z.B. intensive Scherkräfte) und das Erhitzen möglich, wobei sich das allergene Potential erhöhen oder reduzieren kann. Maillardprodukte, die sich unter anderem auch im Backprozeß aus Zuckern und Aminosäureresten bilden, können chemisch zu einer Zerstörung oder einer Neubildung allergene Epitope führen (1).

Umfassendere qualitative und quantitative Analysen, welche Substanzen neben Xylanase im Präparat enthalten sind, in welcher Form Xylanase selbst vorliegt und wie die immunotoxikologischen Potentiale der enthaltenen Substanzen zu bewerten sind, wären zu einer Einschätzung des Gefahrenpotentials notwendig.

### 3.3 Fragekomplex: Produktionsorganismus *Aspergillus niger*

Aus *Aspergillus niger var. awamori* wurde das 1,4- $\beta$ -Xylanase-Gen (exl A) isoliert und als Multicopies wieder einkloniert (40fache Überproduktion). Der zur Übertragung verwendete Lambda-Vector war mit einem Ampicillin-Resistenzgen ausgestattet (50). Als Selektionsmarker wurde das Acetamidase-Gen *amdS* aus *Aspergillus nidulans* verwendet. Das überproduzierte Enzym hat die selben biochemischen und enzymologischen Eigenschaften wie das Enzyme des Wildtyps (51).

#### 3a) Fragen

- Wurde das Ampicillin-Resistenzgen auch in den Produktionsstamm übertragen? Konnte das Genprodukt im Präparat nachgewiesen werden? Wie ist das allergische Potential des Genprodukts zu bewerten?
- Ist Acetamidase im Präparat nachzuweisen und wie ist sein allergisches Potential zu bewerten?

Die Expression des Acetamidase Gens *amdS* wird in *Aspergillus nidulans* von einer Anzahl unabhängig agierender regulatorischer Gene kontrolliert. Diese Gene modulieren die Expression von *amdS* in Abhängigkeit von der Anwesenheit externer Metabolite (11). Das Produkt des *amdR*-Gens aktiviert die *amdS*-Expression in Anwesenheit von  $\alpha$ -AS wie  $\delta$ -alanin. Außer der Regulation von *amdS* kontrolliert das *amdR*-Regulatorgen die Expression von Genen, die beteiligt sind am Lactam- und  $\alpha$ -AS-Metabolismus (11). Es wird gegenwärtig untersucht, ob weitere Gemeinsamkeiten mit anderen eukaryontischen Regelungselementen bestehen.

#### 3b) Frage

- Wurde zur Regulation des Acetamidase-Gens *amdS* im Produktionsorganismus *Aspergillus niger var. awamori* das *amdR*-Gen aus *Aspergillus nidulans* oder andere regulatorische Gene in den Produktionsorganismus transferiert (siehe auch Kapitel 2.1) ?

Welche Gene wurden transferiert und welche immunotoxikologischen Eigenschaften haben ihre Produkte? Welche Effekte haben ihre Produkte auf andere Stoffwechseleigenschaften des Organismus?

*Aspergillus niger* ist als sporenbildender Pilz bekannt. Seine Sporen sind als Hauptquelle allergischer Reaktionen aus diesen Organismus erkannt worden (52). Außerdem kann eine im-

munologische Sensibilisierung speziell gegen *Aspergillus* zu allergischen Pneumonitis-Erkrankungen führen (12).

### **3c) Frage**

- Ist sichergestellt, daß im Produktionsprozeß eine Kontamination der Beschäftigten mit Pilzsporen vermieden wird und wie erfolgt dieses?

Personen, die aufgrund von Respirationsallergien gegen ein spezifisches Allergen sensibilisiert sind, können auch bei Aufnahme des Allergens über den Magen-Darmtrakt allergische Reaktionen erleiden (2, 3, 13).

### **3d) Frage**

- Wird gewährleistet und kontrolliert, daß keine Pilzsporen in das Enzympräparat gelangen - wie?

Obwohl Pilzsporen allgemein als die wichtigsten Allergie verursachenden Agenzien angesehen werden, tragen auch andere Partikel wie Mycel-Fragmente, wenn sie über die Luft verbreitet werden, allergisches Potential. Bedauerlicherweise sind die *Aspergillus*-Allergene noch nicht so gut charakterisiert und isoliert wie die anderer Pilze (12). Die Gattung *Aspergillus* kann mehrere allergische Atemwegserkrankungen verursachen (14). Dabei wird angenommen, daß neben *Aspergillus fumigatus*, der Art mit den potentesten Allergenen dieser Gattung, *Aspergillus niger* wie auch andere *Aspergillus*-Arten in den pathologischen Prozeß von Atemwegserkrankungen (bronchopulmonarische Aspergillosis) involviert sein können (15).

### **3e) Fragen**

- Welche dem Gefährdungspotential entsprechenden Aufklärungs-, Informations- und Schutzmaßnahmen sind für die Arbeiter getroffen worden und werden sie unter Berücksichtigung möglicher *Aspergillus*-Allergien regelmäßig allergologisch untersucht?
- Ist bekannt, ob und welche Verunreinigungen des Produktionsorganismus im Enzympräparat verbleiben und wie sie immunotoxikologisch zu bewerten sind ?

Neben Proteinen können auch Glykoproteine als Allergene auf das Immunsystem wirken (1). Im Zusammenhang mit der Produktion von Xylanase mit einem gentechnisch veränderten *Aspergillus niger* Stamm kann dieses Tatsache insofern immunologische Bedeutung gewinnen, daß die meisten Proteine filamentöser Pilze wie *Aspergillus niger* vor der Sekretion eine Glykosylierung erfahren (16). Aufgrund der Komplexität der biologischen Stoffwechselwege, die an der Glykosylierung beteiligt sind, fehlen bei filamentösen Pilzen detaillierte Informationen über Stoffwechselwege und über die Struktur der Glukane von Glykoproteinen (16).

Alle rekombinanten eukaryotischen Expressionssysteme, die bis heute untersucht wurden, produzieren Glykoproteine nicht in einer einheitlicher Struktur, sondern als eine Mischung unterschiedlich glykosilierter Varianten eines gemeinsamen Polypeptides (17). Dieses „Set“ von

Glykosilierungsvarianten werden als „Glykoformen“ eine Polypeptides bezeichnet und stellen die letztendlich exprimierten Formen eines Glykoproteins dar. Während dieses Set von Glykoformen, das durch eine Zellpopulation exprimiert wird, bei ausgeglichenen Bedingungen völlig invariant erscheint, kann es schon, wenn sich die Umgebungsbedingungen der Zellpopulationen ändert, zu erheblichen Varianzen kommen (17).

### **3f) Fragen**

- Liegt Xylanase im Präparat als Protein oder als Glykoprotein vor?
- Führen der genetische Eingriff bei *Aspergillus niger* oder veränderte Produktionsbedingungen zu Veränderungen der Glykoformen von Xylanase oder anderer Proteine, die im Präparat enthalten sind? Welches allergische Potential besitzen diese evtl. veränderten Glykoformen?

## **3.4 Fragekomplex: Identität und Eigenschaften von Xylanase II**

Das klonierte 1,4- $\beta$ -Endoxylanase Gen codiert ein Präprotein von 211 AS, das „reife“ Protein hat 184 AS, einen IP bei 3,7 und unter nicht reduzierenden Bedingungen ein Molekulargewicht von 20kDa. Unter reduzierenden Bedingungen beträgt das Gewicht 30 kDa, was sich auch theoretisch aus den AS errechnet (51).

### **4a) Fragen**

- Was ist die Ursache dieser Differenz ?
- Kann es durch die Veränderung der redox-Bedingungen zu Veränderungen der Proteinstruktur kommen? Und hat das Einfluß auf das immunotoxikologische Potential der Xylanase?
- Wurde das relative allergische Potential der „richtigen“ Xylanase getestet?

Die Seitenaktivität ( $\alpha$ -amylase,  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase, Protease,  $\alpha$ -galactosidase) des vorliegenden Xylanase-Enzympräparats ist geringer als bei Enzympräparaten, die mit Organismen produziert wurden, die nicht diese gentechnische Veränderung erfahren haben. Die hohe Xylanase-Aktivität des Enzymkonzentrats (53) dürfte hingegen erheblich über der Aktivität liegen, die bisher produziert wurde.

### **4b) Fragen**

- Treten im Vergleich zum bisherigen Enzympräparat im Xylanase II-Präparat aus gentechnisch veränderten Organismen neue Seitenaktivitäten von Enzymen auf? Die Aktivitäten welche Enzyme wurden beim alten und welche beim neuen Präparat berücksichtigt?

- Die Steigerung der Xylanase-Aktivität dürfte auch mit einer Erhöhung der immunologischen Wirksamkeit einhergehen. Das immunotoxikologische Risiko durch Xylanase-Aktivität für Arbeiter in der Produktion dürfte sich erhöhen. Welche dem erhöhten Gefährdungspotential entsprechenden zusätzlichen Aufklärungs- und Informations- und Schutzmaßnahmen sind für die Arbeiter getroffen worden und werden sie unter Berücksichtigung von Xylanase regelmäßig allergologisch untersucht?
- Werden auch reine Xylanase II-Präparate kommerziell gehandelt und angewendet, oder ausschließlich Mischungen, die den bisherigen Aktivitäten entsprechen? Wird bei neuen Präparaten mit höheren Aktivitäten auf das erhöhte allergene Potential durch Xylanase hingewiesen?

In den Unterlagen zur Bewertung von Xylanase II (53) wird unter „1.5 Use“ bei der Anwendung davon ausgegangen, daß sämtlich Enzyme, die im Mehl enthalten sind, durch den Backprozeß desaktiviert werden. Dies muß nicht in jedem Fall richtig sein. So kann  $\alpha$ -amylase, die in gebackenem Brot enthalten ist, bei sensibilisierten Personen allergische Reaktionen hervorrufen (2). Zudem ist insgesamt nicht auszuschließen, daß Erhitzungsprozesse bzw. Backprozesse das allergische Potential von Enzymen sowohl erhöhen wie auch reduzieren können (1, 2, 3, 18).

#### **4c) Frage**

- Bestehen Untersuchungen zur Veränderung allergener Epitope von Xylanase II durch den Backprozeß?

In der chemischen Charakterisierung von Xylanase II (54) ergibt die Analyse des Präparats einen Proteingehalt von 95%. Diese Proteine enthalten Xylanase I und Xylanase II. Darüber hinaus wird festgestellt, daß nach siebenmonatiger Lagerung bei Zimmertemperatur die Aktivität des Präparats abgenommen hat. Dies weist laut Unterlagen darauf hin, daß die Enzyme, werden sie bei Zimmertemperatur gelagert, nicht stabil sind.

#### **4d) Fragen**

- Enthält die Präparation, die kommerziell gehandelt wird, sowohl Xylanase I und Xylanase II? Weiß man etwas über die Unterschiede in der biochemischen Struktur der beiden Proteine und über evtl. unterschiedliche immunotoxikologische Effekte?
- Welche Proteine oder Glykoproteine außer Xylanase liegen in der Proteinfraction (95%) vor (z.B. evtl. Acetamidase)? Wie sind sie immunotoxikologisch zu bewerten (Atemwege, Haut, Magen-Darmtrakt)?
- Welche Substanzen beinhalten die restlichen 5% des Präparats und wie sind sie immunotoxikologisch zu bewerten?

- Verursachen Xylanase oder Verunreinigungen des Präparats Adjuvants-Effekte?
- Ist die Instabilität von Xylanase nach siebenmonatiger Lagerung auf Veränderungen der Proteinstruktur zurückzuführen? Sind Änderungen der allergisch relevanten Epitope damit verbunden?
- Gehen immunotoxikologische Effekte von Abbauprodukten der Xylanase oder Begleitsubstanzen im Magen-Darmtrakt aus?

Die Frage von Verunreinigungen des Xylanase II-Präparats ist zum einen vor dem Hintergrund interessant, ob eventuell weitere potente Allergene enthalten sind. Zum anderen spielt sie aber auch deshalb eine Rolle, weil für das Auftreten von immunotoxikologischen Reaktionen bei der Aufnahme von Antigenen über den Magen-Darmtrakt, neben der individuellen genetischen Ausstattung der Personen, auch die Aufnahme von Begleitsubstanzen von Bedeutung ist (19).

### **3.5 Fragekomplex: „Xylanase II - Relative Antigenicity Study in Guinea Pigs“**

Um Aussagen über das allergische Potentials von Xylanase II zu gewinnen, wird in der vorliegenden Untersuchung ein Vergleichstests mit dem Waschmittelenzym Alcalase an „Guinea-Pigs“ angestellt (55).

Zwei Gruppen von Schweine erhalten intradermale Injektionen jeweils mit einer der beiden Enzymlösungen. Die Injektionen werden am Tag 22 und 43 wiederholt. Jeweils 14 Tage nach der Injektion werden Blutproben zur Antikörperanalyse (ELISA) entnommen. Mit den Serumproben wird zu jedem Termin ein PCA (Passive Cutaneous Anaphylaxis) Test durchgeführt.

#### **5a) Fragen**

- Welcher Enzymaktivität entspricht die Proteinkonzentration bzw. welche Aktivitäten haben die Lösungen und in welchem Verhältnis stehen sie zur Exposition von Arbeitern, Bäckern und Konsumenten?
- Wie ist der Tod zweier Versuchstiere zu erklären (1 Individ. Alcalase-Gruppe nach Blutabnahme Termin eins und 1 Individ. Xylanase-Gruppe nach Blutabnahme Termin zwei)?

Nach Behandlung mit Xylanase zeigten nach dem ersten Termin 30% der Tiere eine positive Reaktion nach dem zweiten Termin 40% und nach dem dritten Termin 100%. Nach Behandlung mit Alcalase zeigten nach dem ersten Termin 20% der Tiere eine positive Reaktion nach dem zweiten Termin 10% und nach dem dritten Termin 60%. Dieses Ergebnis wird interpretiert als „das allergische Potential von Xylanase II ist dem von Alcalase gleich“.

#### **5b) Frage**

- Wieso werden die deutlichen Unterschiede in dieser Weise interpretiert?

#### **Kommentar**

- Die Aussage der Untersuchung besteht im Prinzip darin, zu zeigen, wie sich allergische Effekte, hervorgerufen durch Xylanase, in Relation zu Effekten durch Alcalase verhalten. Ohne eine Einordnung des allergischen Potentials von Alcalase erscheint eine weitere Einschätzung des allergischen Potentials von Xylanase schwerlich möglich. In anderen Untersuchungen hat sich Alcalase zum Beispiel in Hauttests (skin prick testing) als stärkeres Allergen (Reaktionen bei geringeren Konzentrationen) als die  $\alpha$ -Amylase „Rapidase“ erwiesen (20). Erste allergische Reaktionen können in Hauttests bei Alcalase schon im Bereich von  $10^{-3}$   $\mu$ g Protein / ml auftreten (20, 21).
- Da bei Lebensmittelallergien Antigene auf anderem Weg ins Blut gelangen und zudem nicht immer auf dem selben immunologischen Reaktionsmechanismus beruhen müssen wie bei Atemwegs- oder Hautexposition und die allergischen Reaktionen sich unterscheiden können, kann ein Vergleich von Xylanase mit dem Waschmittelenzym Alcalase nur begrenzten Wert haben.

Es ist bekannt, daß bis heute keine etablierten „Tiermodelle“ zur Untersuchung potentiell allergisch wirkender Lebensmittelproteine zur Verfügung stehen (22).

### **5c) Frage**

- Zur Untersuchung welcher Formen von Allergenen (Atemwegs-, Haut- oder Lebensmittelallergene) gilt das „Guinea-Pig“ als etabliertes „Testsystem“?

### **Kommentar**

- Antworten auf detailliertere Fragen zum allergenen Potential des Enzympräparats Xylanase II, wie sie in den Fragekomplexen 1 und 2 gestellt wurden, liefert diese Untersuchung nicht. Umfassendere qualitative und quantitative Analysen, welche Substanzen neben Xylanase enthalten sind, in welcher Form Xylanase enthalten ist und wie die immunotoxikologischen Potentiale zu bewerten sind, wären u.a. auch hinsichtlich Verzehr und Hautexposition notwendig, um bestehende Fragen zu beantworten. Weitergehende Tests zur Bewertung immunotoxikologischer Gefahrenpotentiale werden u.a. in der Literatur diskutiert (23, 24, 25).

## **Literatur**

- (1) Vieths, S. et al., 1994: Allergenes Potential von verarbeiteten Lebensmitteln - Teil 1: Beeinflussung durch lebensmitteltechnologische Verfahren und Zubereitungstechniken. Ernährungs-Umschau 41, Heft 4, 140-143
- (2) Kanny, G. & Moneret-Vautrin, D.-A., 1995: Alpha-Amylase contained in bread can induce food allergy. J. Allergy Clin Immunol. 1995, 95, 132-133
- (3) Losada, E., 1992: Occupational asthma caused by alpha-amylase inhalation: Clinical and immunologic findings and bronchial response patterns. J Allergy Clin Immunol. 1992, 89, 118-125
- (4) Tarvainen, K. et al., 1991: Allergy from cellulase and xylanase enzymes. Clinical and Exper. Allergy, 1991, Vol 21, 609-615

- (5) Fuchs, E. & Schulz, K.-H., 1990: Manuale Allergologicum - Ein Nachschlagewerk (Bd 2). S. 11, Dustri-Verlag, Deisenhofen
- (6) Patterson, R., 1993: Allergic Diseases - Diagnosis and Management. S. 3, 4th Edit, Lippincott Company Philadelphia
- (7) Losada, E. et al., 1986: Occupational asthma caused by cellulase. *J. Allergy Clin Immunol* 1986; 77, 635-639
- (8) Fruhmann, G., 1989: Beruflich bedingtes Asthma bronchiale. *Dtsch. med. Wschr.* 1989, 114, 306-311
- (9) Vieth, S. et al., 1994: Versteckte Allergene in Lebensmitteln. *Bundesgesundhbl.* 2/94, 51-60
- (10) Kanerva, L. & Tarvainen, K., 1990: Allergic Contact Dermatitis and Contact urticaria from cellulolytic Enzymes. *Am. J. Contact Derm.* 1990, Vol 1, No 4, 244-245
- (11) Littlejohn T. G. & Hynes, M. J., 1992: Analysis of the site of action of the amdR product for regulation of the amdS gene of *Aspergillus nidulans*. *Mol Gen Genet* 1992, 235, 81-88
- (12) Gutman, A. & Bush, R., 1993: Allergens and other factors important in atopic disease. In: *Allergic Diseases - Diagnosis and Management*. Edit. Patterson, R., 4th Edit, Lippincott Company Philadelphia, 93-138
- (13) Leonhardt, I. & Moltor, S. J., 1993: Nahrungsmittelallergien bei Bäckern. *Allergologie*, 1993, 16, Nr. 3, 91-92
- (14) Jaque, D. et al., 1995: Serological evidence of *Aspergillus* type I hypersensitivity in a subgroup of pulmonary aspergilloma patients. *Int. Arch. Allergy Immunol* 95; 106; 263-270
- (15) Vernon, D.R.H. & Allan, F., 1980: Environmental factors in allergic bronchopulmonary aspergilliosis. *Clinical Allergy*, 1980, Vol 10, 217-227
- (16) Peberdy, J. F., 1994: Protein secretion in filamentous fungi - trying to understand a highly productive black box. *TibTech* 1994, Vol 12, 50-57
- (17) Parekh, R. B. & Patel, T. P., 1992: Comparing the glycosylation patterns of recombinant glycoproteins.
- (18) Sander, I. et al., 1993: *Aspergillus*-Amylase (Asp ol) als Bäckerallergen. *Allergologie*, 1993, 16, Nr. 3, 87-90
- (19) Levinsky, R., 1985: Factors influencing intestinal uptake of food antigens. *Proceed Nutri Soc*, 1985, 44, 81-86
- (20) Bernstein, D. I. et al., 1994: Characterisation of skin prick testing responses for detecting sensitization to detergent enzymes at extreme dilutions: Inability of the RAST to detect lightly sensitized individuals. *J Allergy Clin Immunol.* 1994, 94, 498-507
- (21) Sarlo, K. et al., 1990: ELISA for human IgE antibody to Subtilisin A (Alcalase): Correlation with RAST and skin test results with occupationally exposed individuals. *J Allergy Clin Immunol.* 1990, 86, 393-399
- (22) Atkinson, H. C. & Miller, K., 1994: Assessment of the Brown Norway rat as a suitable model for the investigation of food allergy. *Toxicology* 91 (1994), 281-288
- (23) Luster M. I. et al., 1992: Risk assesment in immunotoxicology - sensivity and predictability of immune tests. *Fundam Appl Toxicol* 1992, 18, 200-210
- (24) Trizio, D., et al. 1988: Identification of immuntoxic effects of chemicals and assessment of their relevance to man. *Fd Chem Toxic* 1988, Vol 26, No 6, 527-539
- (25) Houben, G. F., 1993: Proposed two-tier approach for screening of immunotoxicological effects of foodstuffs. Unpublished communication: TNO Nutrition and Food Research
- (50) de Rijke, D., 1995: Memo zum Xylanase-dossier. In: *Quest Xylanase Dossier zur Bewertung*
- (51) Hessian, J. G. M., 1994: Isolation and chrakterization of a 1,4- $\beta$ -endoxylanase gene of *A. awamori*. *Curr. Genet* (1994, 26, 228-232

- (52) Schuster, E., 1993: *Aspergillus niger* - a safe organism for biotechnology; a review. Script der Firma Röhm GmbH als Mitteilung von Quest an Umwelt- und Verbraucherverbände.
- (53) de Rijke, D., 1995: Data for the evaluation of Xylanase II. In: Quest Xylanase Dossier zur Bewertung
- (54) Colson, N., 1993: Xylanase II: Chemical Characterisation Study AC920181. In: Quest Xylanase Dossier zur Bewertung
- (55) Blaike, L. & Selbe, L., 1994: Xylanase II: Relative antigenicity Study in Guinea pigs - Study II910178. In: Quest Xylanase Unterlagen zur Bewertung

## 4. Allgemeine Toxikologie

### 4.1 Zusammenfassung

Die von Unilever bzw. Quest zur Verfügung gestellten Unterlagen, die Fragen der Toxikologie betreffen, wurden hinsichtlich der Fragestellung ausgewertet, wie Xylanase II-Präparationen in Bezug auf toxikologische Risiken einzuschätzen sind.

Aus den vorgelegten Unterlagen ergeben sich keine Anzeichen für ein mutagenes Potential der untersuchten Xylanase II-Präparationen.

In der vorliegenden Studie zur subchronischen Toxizität hat es sich gezeigt, daß bei den mit Xylanase II behandelten Tieren eine Vielzahl von statistisch signifikanten Veränderungen bei physiologisch wichtigen Größen eingetreten sind. Diese Veränderungen waren in der Kontrollgruppe nicht zu finden. Die vorliegenden Ergebnisse werden nicht erklärt. Ein Teil dieser Veränderungen trat erst in der Schlußphase des Versuches auf. Sie können als erste Anzeichen von chronischen Veränderungen durch Xylanase II-haltiges Futter gewertet werden.

**Die vorliegenden Ergebnisse belegen biologische Effekte durch Xylanase II-Zusätze, die zum Versuch der Herleitung eines Risikofaktors in der Studie geführt haben. Aufgrund der Befunde besteht begründeter Klärungsbedarf hinsichtlich möglicher chronischer Effekte. Auf der Grundlage der vorliegenden Studie können keine Risikofaktoren angemessen angegeben werden.**

### 4.2 Kurzcharakterisierung der Untersuchungen und Schlußfolgerungen

Die ausgewerteten Untersuchungen und die Schlußfolgerungen sind hier in Kurzform wiedergegeben.

#### 4.2.1 Untersuchung zur subchronischen Toxizität

##### A) Subchronische Fütterungsstudie an Ratten

- 90 Tage-Studie (13 Wochen)
- Fütterungsstudie mit 3 Konzentrationen: 0,285%, 0,0285% und 0,00285%.
- Drei Gruppen und eine Kontrollgruppe von je 40 Tieren (20 Männchen, 20 Weibchen).

Ergebnis auf Nachfrage: Es gab keine Vorversuche mit höheren Konzentrationen. Solche Vorversuche hätten Hinweise auf akute bzw. chronische Effekte geben können.

**Ergebnis: statistisch signifikante biologische Veränderungen.**

**Risikobewertung:** Eine Risikobewertung wurde für notwendig erachtet und durchgeführt.

**Bewertung der Ergebnisse:** Die vorgelegte Bewertung durch Quest ist nicht übereinstimmend mit unserer Einschätzung.

**Einschätzung Quest:** Ein ausreichender Sicherheitsabstand liegt vor.

**Einschätzung der Auswertung:** Hinweise auf Gefahrenpotential liegen vor. Ein Sicherheitsabstand ist aus den vorliegenden Untersuchungen nicht bestimmbar. Die Datenlage nicht ausreichend zur Beurteilung.

#### 4.2.2 Untersuchungen zur Mutagenität

##### A) Bakterien-Mutationstest nach Ames

- 3 Bakterienstämme, Durchführung mit und ohne metabolische Aktivierung.

**Es gibt keinen Hinweis auf mutagene Aktivität.**

##### B) Metaphasen-Chromosomen Analyse

- Verfahren: Test auf Chromosomenaberrationen bei kultivierten menschlichen Lymphozyten, mit und ohne metabolische Aktivierung

Es gibt keinen Hinweis auf erhöhte Chromosomen-Veränderungen!

**Schlußfolgerung:** Es gibt keine Hinweise auf ein mutagenes Potential der getesteten Xylanase II - Präparationen.

**Diese Schlußfolgerung ist nachvollziehbar.**

#### 4.3 Detailbeurteilung der subchronischen Toxizität der Xylanase II - Präparationen

##### 4.3.1 Biologisch bedeutende, statistisch signifikante Veränderungen

In der subchronischen Fütterungsstudie an Ratten konnten folgende statistisch signifikanten Veränderungen bei den mit Xylanase II-haltigem Futter behandelten Tieren festgestellt werden:

##### A) Blutgerinnungsfaktoren : Prothrombinzeit

- 3%ige Abnahme in der 0,285% Gruppe, höchste Dosierung
- 2%ige Abnahme in den unteren Dosis-Gruppen  
gefunden bei weibliche Ratten, geschlechtsspezifisch (3.9.3)

##### B) Verringerung der Plasma-Pseudocholinesterase-Aktivität

- 10% ige Abnahme bei den Männchen, höchste Dosierung
- 12%ige Abnahme bei den Weibchen, höchste Dosierung  
gefunden bei männlichen und weiblichen Ratten, höchste Dosierung.(3.10.2)

##### C) Verringerung der 5'-Nucleotidase-Aktivität

- 13%ige Abnahme bei Männchen, niedrigste Dosierung (3.10.3).  
Dieser Befund ist in der Zusammenfassung nicht aufgenommen worden.

##### D) Veränderungen im 4-Stunden-Urin, 12. Woche

- Urin-Volumen: 49% Reduktion bei Männchen, 59% Reduktion bei Weibchen, höchste Dosierung;
- Erythrozyten-Test, Leukozyten- Test und

- Protein-Test waren positiv bei vielen Männchen, höchste Dosisgruppe.

#### **E) Zunahme des Nebennieren-Gewichtes**

- 17% Zunahme Absolutgewicht, 20% Zunahme relatives Gewicht, Männchen, höchste Dosierung;
- 15% Zunahme absolutes und Gesamtgewicht, Weibchen, höchste Dosierung.

#### **4.3.2 Weitere Auffälligkeiten**

Es ergaben sich eine Reihe von Befunden, die statistisch signifikant sind, bei denen aber entweder die gefundenen Abweichungen von der Kontrollgruppe keine Dosisabhängigkeit zeigen, oder ein Zusammenhang mit der Behandlung schwerer vorstellbar ist als bei den oben genannten Veränderungen. Zu diesen Auffälligkeiten zählen:

- Der Tod von zwei männlichen Tieren, höchste Dosierung, 7. bzw. 9. Woche, 2. Versuchshälfte
- 38%ige Reduktion im Urinvolumen, weibliche Ratten, niedrigste Dosisgruppe (3.8.1), Veränderungen gab es schon in den Vortests, daher hier nicht weiter beachtet.
- Veränderungen im 20-Stunden-Urin in der 12. Woche, einige Auffälligkeiten, z.T. in der niedrigsten Dosierungsgruppe (3.8.2)
- Geringe Erniedrigung des Plasma-Kalium-Spiegels bei allen weiblichen Ratten. (3.10.1)
- Zunahme des absoluten bzw. relativen Nierengewichtes, unterschiedliche Tiergruppen (3.11)
- 2 %ige Abnahme des Zellvolumens der roten Blutkörperchen, niedrigste Dosierung, Weibchen (3.9.1)
- Veränderungen bei den Leukozyten, Differentialzählung (3.9.2)
- Veränderungen bei der Nahrungsaufnahme, verteilt, nicht dosierungsabhängig (3.5)
- Verminderte Wasseraufnahme, 8.-13. Woche, Männchen, höchste und niedrigste Dosierung, Weibchen erhöhte Aufnahme bei mittlerer Dosierung

#### **4.4 Qualitatives Ergebnis dieser Untersuchungen**

Aus der Gesamtbetrachtung der Untersuchungsergebnisse lassen sich fünf Aussagen ableiten:

1. Bei mit Xylanase II-haltigen Futter behandelten Tieren kommt es nicht zu direkten Vergiftungserscheinungen und auch nicht zu histologisch nachweisbaren Gewebeveränderungen. Es kommt aber zu einer Vielzahl von Veränderungen bei physiologisch wichtigen Untersuchungsparametern, die in den Kontrollgruppen nicht auftreten. Es wird in der Studie auch nicht ansatzweise der Versuch unternommen, die hier gefundenen Ergebnisse hinsichtlich möglicher Wirkungsmechanismen zu erklären. So ist z.B. nicht untersucht worden, welche Proteine vermehrt im Urin in der 12. Woche auftreten.
2. Bei den Tiergruppen, die die höchste Dosierung erhalten haben, sind besonders viele Auffälligkeiten festzustellen, z.B. die Veränderung des Nebennierengewichtes und andere.

Dies ist ein deutlicher Beleg für einen ursächlichen Zusammenhang mit dem Xylanase II-Gehalt des Futters (siehe hierzu auch Unterpunkt 4.) In den Versuchs- und Kontrollgruppen sind Tiere mit unterschiedlichen individuellen Empfindlichkeiten. Bei einigen Versuchsparametern werden für die Bewertung die Mittelwerte herangezogen. Diese Vorgehensweise ist verständlich, um über die individuellen Schwankungen hinaus statistisch signifikante Veränderungen nachweisen zu können. Andererseits sind mit den so erhaltenen Mittelwerte keine bewertungsrelevanten Aussagen zu natürlich vorkommenden empfindlicheren Individuen möglich.

Für die beiden Parameter: Veränderungen des absoluten und des relativen Nebennierengewichtes zeigen sich schon bei alleiniger Auswertung der Mittelwerte statistisch signifikante Zunahmen, allerdings nur in den höchsten Dosisgruppen.

Hier wurden im Rahmen unserer Arbeiten zusätzlich die Befunde der Einzelindividuen ausgewertet. In der Tabelle 1 werden für männliche und weibliche Ratten, für die Kontrollgruppe und für die drei Dosierungen folgende Versuchsergebnisse wiedergegeben: die Minimalwerte, die Maximalwerte und die Mittelwerte des absoluten und des relativen Nebennieren-Gewichtes. Auf die Mittelwerte wurde bereits im Versuchs-Protokoll von *Quest* eingegangen. Die Maximalwerte wurden im Versuchsprotokoll nicht näher betrachtet.

**Hier zeigt die Zusammenstellung der Tabelle, daß Erhöhungen der Maximalwerte der Nebennierengewichte (absolut und relativ) schon bei der niedrigsten Dosierung von Xylanase II im Futter beobachtbar sind.** Eine Dosisabhängigkeit der Zunahme ist bei Männchen und bei Weibchen zu erkennen. Die Annahme ist vertretbar, daß diese Maximalwerte die Reaktion von besonders empfindlichen Individuen auf Xylanase II-Zusatz besser wiedergeben als die in der Studie zur Bewertung eingesetzten Mittelwerte.

3. Einige der Befunde treten in dem letzten Drittel des Versuches auf, insbesondere die Veränderungen der Urin-Analyse-Werte. Hier werden in der 12. Woche, nicht aber in der 3. Woche Auffälligkeiten gefunden. Dieser zeitliche Verlauf kann als Hinweis auf mögliche chronische Schädigungen z.B. der Nierenfunktionen gewertet werden. Wie sähen die Ergebnisse aus, wenn in der 19. Woche erneut gemessen worden wäre? In der Studie wird dieser Aspekt nicht erwähnt.
4. Die Einzelanalyse der experimentellen Daten hat für den Parameter "Veränderung des Nebennierengewichtes" gezeigt, daß mit dem Auftreten von individuell empfindlicheren Subpopulationen bei den Versuchstieren zu rechnen ist. Diese Möglichkeit ist bei der Bewertung nicht berücksichtigt worden.
5. Der gewählte Versuchsansatz - eine subchronische Fütterungsstudie - ist nicht dafür konzipiert, chronische Effekte aufzuzeigen. Die Frage, ob in den verwendeten Präparationen von Xylanase II Inhaltsstoffe mit chronisch toxischen Eigenschaften enthalten sind, kann daher in diesem Ansatz nicht geklärt werden.

Die subchronische Fütterungsstudie hat gezeigt: Xylanase II hat nachweisbare Auswirkungen auf die Physiologie der Versuchstiere. Xylanase II ist kein Zusatzstoff, der von den Versuchstieren aufgenommen und dann abgebaut wird, ohne in ihnen Veränderungen hervorzurufen. Xylanase II ist biologisch aktiv. Die in der subchronischen Fütterungsstudie gefundenen Effekte sind derzeit nicht erklärbar.

Die vorliegenden Untersuchungsergebnisse lassen vermuten, daß bei Xylanase II-Präparationen auch chronische Toxizitätseffekte auftreten können (siehe z.B. Veränderungen der Urinwerte in der 12., aber nicht in der 3. Woche). Eine ausreichende Datenbasis zur Bewertung der Toxizität liegt derzeit nicht vor.

**Die vorliegenden Ergebnisse lassen es dringend notwendig erscheinen, in weiteren Versuchen die offenen Fragen zu Wirkungsmechanismen und chronischen Wirkungen zu untersuchen. Auf der Grundlage der vorgelegten Untersuchungsergebnisse kann angesichts der gefundenen Effekte und der bestehenden Wissenslücken von einem Einsatz von Xylanase II - Präparationen in der Nahrungsmittelherstellung nur abgeraten werden.**

#### **4.5 Aussagen zu Sicherheitsfaktoren**

In der Untersuchung wird aufgrund der vorliegenden Befunde eine Risikobewertung durchgeführt. Als non-effect-Konzentration wird 0.0285% im Futter angenommen, unter Bezugnahme auf die gefundene Nebennieren-Gewichtsreduktion bei 0,285% Xylanase II. Bei dieser Konzentration und auch bei der niedrigsten Konzentration im Test (0,00285%) sind aber ebenfalls statistisch signifikante Veränderungen festgestellt worden, z.B.

- 2%ige Abnahme der Prothrombinzeit bei weiblichen Ratten;
- generelle Erniedrigung der Kalium-Konzentration im Blutplasma bei weiblichen Tieren;
- 13%ige Abnahme der 5'-Nucleotidase-Aktivität bei männlichen Ratten (3.10.3).

Unter Berücksichtigung dieser Effekte konnte in der Fütterungsstudie keine non-effect-Konzentration bestimmt werden. Die Studie begründet die Notwendigkeit, die subchronische Toxizität genauer zu erfassen und die chronische Toxizität gezielt zu untersuchen. Auf der Grundlage einer erweiterten Datenbasis kann dann erneut eine Bestimmung der Risikofaktoren versucht werden.

Der in der Studie berechnete Risikofaktor von 1.100 reduziert sich bei Berücksichtigung oben genannter Effekte auf 11, die Datenlage ist allerdings unzureichend, um solche Berechnungen durchzuführen.

## Anhang: Tabelle „Subchronische Fütterungsstudie an Ratten, Xylanase II, Organgewichtsveränderung“

Zusammenstellung von experimentellen Versuchsergebnissen. Wiedergegeben sind für die Kontrollgruppen und die drei Versuchsgruppen (Dosierung Xylanase 0,00285%, 0,0285% und 0,285%) die gefundenen Minimal-, Maximal- und Mittelwerte der absoluten und relativen Nebennieren-Gewichte der Tiere.

Die Ergebnisse für männliche Ratten sind im oberen Teil, die für weibliche Ratten im unteren Teil wieder gegeben.

Die Daten sind dem Appendix 2 zur Studie entnommen worden. Im Volume 1 werden für die Bewertung lediglich die Mittelwerte eingesetzt (Tabelle 25 in Volume 2).

(Die absoluten Gewichte sind in Milligramm angegeben, die relativen Gewichte in Milligramm / 100g Körpergewicht.)

| Männliche Ratten | Kontrolle      |            | 0,00285 % Xylanase II |            | 0,0285 % Xylanase II |            | 0,285 % Xylanase II |            |
|------------------|----------------|------------|-----------------------|------------|----------------------|------------|---------------------|------------|
|                  | absolut (mg)   | relativ    | absolut (mg)          | %          | absolut (mg)         | %          | absolut (mg)        | %          |
| Minimum          | 52,2 mg        | 83         | 46,3 mg               | 77         | 44,4 mg              | 59         | 53,6 mg             | 188        |
| <b>Maximum</b>   | <b>81,8 mg</b> | <b>132</b> | <b>86,7 mg</b>        | <b>135</b> | <b>89,7 mg</b>       | <b>146</b> | <b>91,3 mg</b>      | <b>170</b> |
| Mittelwert       | 64,2 mg        | 103        | 64,9 mg               | 104        | 68,3 mg              | 105        | 75,1 mg             | 124        |
| Weibliche Ratten | Kontrolle      |            | 0,00285 % Xylanase II |            | 0,0285 % Xylanase II |            | 0,285 % Xylanase II |            |
|                  | absolut (mg)   | %          | absolut (mg)          | %          | absolut (mg)         | %          | absolut (mg)        | %          |
| Minimum          | 37,3 mg        | 87         | 56,1 mg               | 172        | 52,3 mg              | 139        | 59,6 mg             | 174        |
| <b>Maximum</b>   | <b>85,6 mg</b> | <b>249</b> | <b>93,1 mg</b>        | <b>261</b> | <b>96,8 mg</b>       | <b>296</b> | <b>99,8 mg</b>      | <b>319</b> |
| Mittelwert       | 66,6 mg        | 194        | 73,1 mg               | 211        | 71,5 mg              | 206        | 76,7 mg             | 224        |

