



15.08.2019

Beurteilung der Lebensmittelsicherheit des GVO-Erzeugnisses Asparaginase Acrylaway HighT aus *Bacillus subtilis* Stamm NZYM-CK bei der Verwendung als Verarbeitungshilfsstoff

Bericht zu Handen der Behörden nach Artikel 4
der Verordnung des EDI über gentechnisch
veränderte Lebensmittel (VGVL, SR
817.022.51)

Beurteilung der Lebensmittelsicherheit des GVO-Erzeugnisses Asparaginase aus *Bacillus subtilis* Stamm NZYM-CK bei der Verwendung als Verarbeitungshilfsstoff

Bericht zu Handen der Behörden nach Artikel 4 der Verordnung des EDI über gentechnisch veränderte Lebensmittel (VGVL, SR 817.022.51)

Zusammenfassung

Die Firma Novozymes A/S, Bagsværd, Dänemark, reichte im Juli 2016 ein Gesuch um Bewilligung der Verwendung des GVO-Erzeugnisses Asparaginase aus *Bacillus subtilis* Stamm NZYM-CK als Verarbeitungshilfsstoff in der Lebensmittelverarbeitung ein.

Gegenstand des vorliegenden Berichtes gemäss Artikel 4 der Verordnung des EDI über gentechnisch veränderte Lebensmittel (VGVL, SR 817.022.51) ist die Bewertung der Lebensmittelsicherheit des GVO-Erzeugnisses Asparaginase aus dem gentechnisch veränderten *Bacillus subtilis* Stamm NZYM-CK bei der Verwendung als Verarbeitungshilfsstoff.

Das GVO-Erzeugnis Asparaginase ist ein Protein bzw. Enzym, das die Hydrolyse der freien Aminosäure Asparagin zu Asparaginsäure unter der Bildung von Ammonium katalysiert.

Das GVO-Erzeugnis wird aus dem gentechnisch veränderten Organismus *Bacillus subtilis* Stamm NZYM-CK gewonnen. Die genetische Information für das Protein stammt aus *Pyrococcus furiosus*. Die Produktion findet in einem geschlossenen System (Fermenter) nach den Leitlinien der Guten Herstellungspraxis (Good Manufacturing Practice, GMP) statt. Das GVO-Erzeugnis ist vom Produktionsorganismus abgetrennt.

Das GVO-Erzeugnis soll bei der Verarbeitung von Getreide, Kartoffeln sowie Kaffee und Kakao zu Lebensmittelerzeugnissen als Verarbeitungshilfsstoff eingesetzt werden. Zweck des Einsatzes der Asparaginase in der Verarbeitung ist die Verringerung der Belastung verarbeiteter Erzeugnisse mit Acrylamid durch Reduktion der Konzentration an freiem L-Asparagin im zu verarbeitenden Lebensmittel.

Das GVO-Erzeugnis soll in Form von eines Enzympräparates mit der Bezeichnung Acrylaway® HighT BG in Form eines formulierten Granulates in den Verkehr gebracht werden. Das Erzeugnis ist für die gewerbliche Verwendung bestimmt.

Die toxikologischen Studien *in vitro* und *in vivo* ergaben keine Befunde, die auf ein Gesundheitsrisiko beim Verzehr von mit dem GVO-Erzeugnis verarbeiteten Lebensmitteln hinweisen würden. Eine Fütterungsstudie an Ratten über 13 Wochen zeigte keine schädlichen Effekte; der ermittelte No Observed Adverse Effect Level (NOAEL) entspricht der höchsten verfütterten Dosis.

Die allergologischen Studien zeigten keine relevante Ähnlichkeit zu Proteinen, die als allergen bekannt sind.

Eine Schätzung der maximalen Exposition durch festen und flüssigen Lebensmitteln unter Verwendung der 'Budget Method' wurde durchgeführt. Zusammen mit dem NOAEL ergab dies einen Sicherheitsabstand von mindestens 3151.

Es besteht kein Grund zur Annahme einer Gesundheitsgefährdung bei oraler Aufnahme von Lebensmitteln, bei deren Verarbeitung das GVO-Erzeugnis Asparaginase aus *Bacillus subtilis* Stamm NZYM-CK als Verarbeitungshilfsstoff verwendet wurde.

Gegenstand

Gegenstand des vorliegenden Berichtes gemäss Artikel 4 der Verordnung des EDI über gentechnisch veränderte Lebensmittel (VGVL, SR 817.022.51) ist die Bewertung der Lebensmittelsicherheit des GVO-Erzeugnisses Asparaginase aus dem gentechnisch veränderten *Bacillus subtilis* Stamm NZYM-CK beim Verzehr von Lebensmitteln, die unter Verwendung des GVO-Erzeugnisses als Verarbeitungshilfsstoff hergestellt wurden.

Ausgangslage und Auftrag

Die Firma Novozymes A/S, Bagsværd, Dänemark, reichte mit Schreiben vom April 2016 (Eingang 3. Mai 2016) beim Bundesamt für Lebensmittelsicherheit und Veterinärwesen BLV ein Gesuch um Bewilligung des Inverkehrbringens des GVO-Erzeugnisses Asparaginase aus *Bacillus subtilis* Stamm NZYM-CK als Verarbeitungshilfsstoff in der Lebensmittelverarbeitung ein.

Das Gesuch betrifft das Inverkehrbringen in Form eines Enzympräparates in Form eines Granulates mit der Bezeichnung 'Acrylaway® HighT BG' als Verarbeitungshilfsstoff für den gewerblichen Einsatz in der Lebensmittelverarbeitung.

Gemäss Artikel 12 des Gesetzes über die Gentechnologie im ausserhumanen Bereich (Gentechnikgesetz, GTG, SR 814.91) dürfen gentechnisch veränderte Organismen (GVO) nur mit einer Bewilligung des Bundes in Verkehr gebracht werden.

Nach Artikel 31 der Lebensmittel- und Gebrauchsgegenständeverordnung (LGV, SR 817.02) bedarf das Inverkehrbringen von Lebensmitteln, die GVO sind, solche enthalten oder daraus gewonnen wurden (GVO-Erzeugnisse) und die zur Abgabe an die Konsumentinnen und Konsumenten bestimmt sind, der Bewilligung durch das Bundesamt für Lebensmittelsicherheit und Veterinärwesen BLV.

Nach Artikel 3 der Verordnung des EDI über gentechnisch veränderte Lebensmittel (VGVL, SR 817.022.51) reicht der Gesuchsteller beim BLV ein Gesuch mit den notwendigen Angaben ein. Nach Artikel 4 VGVL prüft das BLV das Gesuch und erstellt dazu einen Bericht.

Administratives

Die Adresse des Gesuchstellers lautet

Novozymes A/S
Krogshøjvej 36
DK-2880 Bagsværd
Denmark

Der Gesuchsteller fügte dem Gesuch ein Dossier bei, welches einem Gesuch um Inverkehrbringen bei der zuständigen Behörde der Europäischen Union gemäss der Verordnung (EU) Nr. 1331/2008 eingereicht worden war. Das Dossier enthält die Angaben gemäss Anhang 1 VGVL.

Die für das Dossier verantwortliche Person ist

Frau Signe Munk, Novozymes A/S, Vice President, Toxicology and Regulatory Affairs.

Erzeugnis

Das GVO-Erzeugnis Asparaginase ist ein Protein und wird aus dem gentechnisch veränderten Mikroorganismus *Bacillus subtilis* Stamm NZYM-CK gewonnen. Die genetische Information für das Protein stammt aus dem Mikroorganismus *Pyrococcus furiosus*.

Das GVO-Erzeugnis ist ein Protein mit der enzymatischen Funktion einer Asparaginase (L-Asparaginamidohydrolase) mit der IUBMB¹ Nummer 3.5.1.1 und der CAS² Registry Number 9015-68-3. Das Enzym Asparaginase hat keine relevanten Nebenaktivitäten.

Asparaginase ist ein Enzym, das die Hydrolyse der freien Aminosäure L-Asparagin zu Asparaginsäure unter der Bildung von Ammonium katalysiert. Für diese Reaktion werden keine Kofaktoren benötigt.

Asparaginase kommt in allen Reichen (Mikroorganismen, Tier, Pflanzen) vor und dient in diesen Organismen dem Stoffwechsel und der Nutzung des Stickstoffreservoirs.

Das Protein weist eine Primärstruktur mit einer Länge von 326 Aminosäuren auf. Die Sequenz entspricht der Sequenz im Spenderorganismus *P. furiosus*. Das berechnete Molekulargewicht beträgt 35.8 kDa. Das Enzym tritt als Homodimer auf.

¹ International Union of Biochemistry and Molecular Biology

² Chemical Abstracts Service

Das Protein weist keine posttranslationalen Modifikationen auf.

Wichtigste Parameter für die Aktivität der Asparaginase aus *Bacillus subtilis* Stamm NZYM-CK sind Temperatur und pH-Wert. Die Aktivität in Abhängigkeit vom pH-Wert wurde bei einer Temperatur von 70°C in einem Intervall von pH 4 bis pH 9 bestimmt. Das Maximum der Aktivität lag bei pH 9 und fiel annähernd linear auf etwa 20% bei pH 4 ab. Die Aktivität in Abhängigkeit von der Temperatur wurde bei pH 7 in einem Intervall von 40 bis 90°C gemessen. Das Maximum der Aktivität lag bei 90°C und fiel auf null bei 40°C.

Das Protein wird bei 120°C denaturiert.

Produktionsorganismus

Der Empfängerorganismus *Bacillus subtilis* ist ein grampositives Bakterium mit der Fähigkeit zur Sporenbildung. Er kommt natürlicherweise im Boden und auf Pflanzen als Saprophyt vor.

B. subtilis produziert keine *B. cereus*-ähnlichen Toxine oder sekundäre Metaboliten mit zelltoxischem Potential.

B. subtilis ssp. *natto* dient in Japan zur Herstellung von Natto, einem fermentierten Erzeugnis aus Sojabohnen. Natto enthält die lebenden Mikroorganismen, die während der Reifung des Erzeugnisses Sporen bilden.

Der Produktionsorganismus *B. subtilis* NZYM-CK ist gentechnisch verändert: sein Genom enthält Sequenzen von *Pyrococcus furiosus*, *Bacillus thuringiensis*, *B. licheniformis* und *B. amyloliquefaciens*.

Spenderorganismus für die codierende Sequenz für die Asparaginase war *P. furiosus*.

Spenderorganismen für kurze regulierende, stabilisierende bzw. nicht translatierte Sequenzen waren *B. thuringiensis*, *B. licheniformis* und *B. amyloliquefaciens*.

Nach der aktuellen Liste des Bundesamtes für Umwelt BAFU und des Bundesamtes für Gesundheit BAG über die „Einstufung von Organismen. Modul 1: Bakterien“ werden *B. subtilis* und *P. furiosus* der Risikogruppe 1 zugeordnet (Stand Januar 2013, abgerufen März 2019). Organismen der Risikogruppe 1 stellen nach dem Stand der Wissenschaft kein Risiko für die menschliche Gesundheit und die Umwelt dar. Darüber hinaus wird *B. subtilis* als in Einzelfällen pathogen³ beschrieben.

Das wissenschaftliche Gremium für biologische Gefahren (Panel on Biological Hazards, BIOHAZ) der Europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit (EFSA) bestätigt die Qualifizierte Sicherheitsannahme (Qualified Presumption of Safety, QPS), von *B. subtilis* mit der Qualifikation 'Abwesenheit toxischer Aktivität' (EFSA, 2017). Diese Qualifizierungsanforderung schliesst sowohl Toxine, die in Lebensmitteln gebildet werden, als auch Enterotoxine, die im Darmtrakt gebildet werden, ein.

Beim Gentransfer wurde im Wesentlichen eine für ein Protein mit der Funktion einer Asparaginase codierende Sequenz übertragen, wobei die Codonverwendung für *B. subtilis* optimiert wurde.

Die gentechnisch übertragene Erbinformation ist stabil ins Erbgut von *B. subtilis* NZYM-CK integriert.

Der Produktionsorganismus *B. subtilis* NZYM-CK hat keine Antibiotikaresistenzgene erworben und weist keine antimikrobielle Aktivität auf.

Der Produktionsorganismus ist weder pathogen noch toxisch und stellt nach dem aktuellen Stand der Wissenschaft kein Risiko für die menschliche Gesundheit dar.

³ pathogenic in individual cases (PIIC): shown or suspected to be pathogens in individual cases, predominantly in people with substantial immune deficiency; identification of species is often unreliable.

Herstellungsverfahren

Die Herstellung erfolgt in durch Fermentation in geschlossenen Systemen. Nach der Fermentation wird der Mikroorganismus abgetrennt und das GVO-Erzeugnis in einer Reihe von Schritten aufkonzentriert.

Die Herstellung erfolgt nach den Grundsätzen der Guten Herstellungspraxis, namentlich mit einer Qualitätssicherung.

Formulierung für das Inverkehrbringen

Das Enzymprodukt wird unter Beigabe von Maismehl und Kochsalz in Lebensmittelqualität zu einem Granulat formuliert, welches unter dem Handelsnamen Acrylaway® HighT BG in Verkehr gebracht werden soll.

Produkt- und Sicherheitsdatenblätter liegen vor.

Spezifikationen

Für das Enzymprodukt wurden Spezifikationen gemäss FAO/WHO (2006) formuliert:

- Blei: nicht über 5 mg/kg
- *Salmonella* sp.: nicht nachweisbar in 25 Gramm
- Coliforme: nicht über 30 pro Gramm
- *Escherichia coli*: nicht nachweisbar in 25 Gramm
- Antimikrobielle Aktivität: nicht nachweisbar.

Daten für drei repräsentative Produktionschargen des Enzymproduktes wurden vorgelegt; sie entsprechen den Spezifikationen.

Die drei Chargen des Enzymproduktes wurden mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) untersucht. Es zeigte sich in allen Chargen ein prominentes Band mit einer scheinbaren Grösse, welche dem erwarteten Signal für die Asparaginase entspricht.

Die drei Chargen wurden einer Grobanalyse unterzogen. Zudem wurde die Enzymaktivität gemessen. Eine validierte Methode zur Messung der Enzymaktivität (Masseinheit: Thermostable Asparaginase Units, TASU) ist vorhanden. Es wurden folgende Durchschnittswerte gefunden.

Rohprotein (Kjeldahl)	5.4	% w/w
Asche	2.8	% w/w
Wasser	87.2	% w/w
Organische Substanz (TOS ⁴)	10.1	% w/w
Aktivität	54267	TASU/g
spezifische Aktivität	539	TASU/mg TOS

Die Chargen des Enzymproduktes wurden auf weitere enzymatische Aktivitäten untersucht. Aktivitäten von Glucoamylase, alpha-Amylase, Lipase und Protease waren nicht nachweisbar.

Darüber hinaus wurden Schwermetalle und andere Elemente (Ag, Bi, Cd, Cu, Hg, Mo, Ni, Pb, Sn; As, Sb) analysiert. Insgesamt wurden Spuren von 5 ppm gemessen. Die Schwermetalle Pb, Cd und Hg waren nicht nachweisbar; As wurde in Spuren <0.2 ppm gemessen.

Anwendung in der Lebensmittelverarbeitung

Zweck der Anwendung der Asparaginase aus *B. subtilis* NZYM-CK in der Lebensmittelverarbeitung ist die Verringerung der Belastung verarbeiteter Erzeugnisse aus Getreide, Kartoffeln, Kaffee und Kakao mit Acrylamid. Acrylamid wird in den Verarbeitungsprozessen Backen, Rösten, Fritieren usw.

⁴ TOS: total organic solids

beim Erhitzen von kohlenhydratreichen Lebensmitteln gebildet. Acrylamid entsteht dabei aus der Aminosäure Asparagin unter Reaktion mit reduzierenden Zuckern (z.B. Glucose).

In Tierversuchen ist Acrylamid krebserzeugend, in höheren Dosen nervenschädigend und eventuell auch schädigend für die Fortpflanzung.

Die Europäische Kommission empfiehlt in der Verordnung (EU) Nr. 2017/2158 zur Festlegung von Minimierungsmassnahmen und Richtwerten für die Senkung des Acrylamidgehalts in Lebensmitteln unter anderem die Verwendung von Asparaginase in der Lebensmittelverarbeitung. Der Bund sieht vor, die Bestimmungen dieser Verordnung ins Schweizer Recht zu übernehmen.

Asparaginase ist ein Enzym, das die Hydrolyse der freien Aminosäure L-Asparagin zu Asparaginsäure unter der Bildung von Ammonium katalysiert. Für diese Reaktion werden keine Kofaktoren benötigt. Die Reaktionsprodukte kommen natürlicherweise in Lebensmitteln vor und sind am Stoffwechsel beteiligt. Das Enzym wirkt nicht auf in Proteinen oder Peptiden gebundenes Asparagin. Da das Enzym keine Nebenaktivität aufweist, entstehen keine unbeabsichtigten Reaktionsprodukte.

Asparaginase ist ein Protein; wesentliche Wechselwirkungen mit Bestandteilen von Lebensmitteln sind nicht zu erwarten.

Die Eigenschaften der Asparaginase aus *B. subtilis* NZYM-CK ermöglichen den Einsatz bei erhöhten Temperaturen während der Lebensmittelverarbeitung.

Das GVO-Erzeugnis soll in folgenden Prozessen verwendet werden:

- Verarbeitung von Getreide, namentlich Backen; Endprodukte sind Backwaren, Zerealien;
- Verarbeitung von Früchten und Gemüse, konkret Kartoffeln, namentlich Fritieren; Endprodukte sind Pommes Chips, Pommes frites usw.;
- Verarbeitung von Kaffee- und Kakaobohnen, d.h. Rösten.

Die Anwendung des Enzyms erfolgt abgestimmt auf das zu verarbeitende Material. Das Enzym wird den Ausgangs- oder Zwischenprodukten (z.B. Teig aus Getreidemehl, Kartoffeln) zugefügt und wirkt in der entsprechenden Phase der Verarbeitung.

Der Einsatz des Enzyms erfolgt *quantum satis* und mit der minimalen notwendigen Dosis nach der Guten Herstellungspraxis. Empfehlungen seitens des Herstellers zu den notwendigen Mengen liegen vor.

Die Reaktionsprodukte der Hydrolyse haben keine negativen Auswirkungen auf den Nährwert der verarbeiteten Lebensmittel.

Das Enzym wird im Verlauf des Verarbeitungsprozesses des Lebensmittels denaturiert und liegt im Endprodukt (Lebensmittel) als inertes Protein vor. Abbauprodukte sind nicht von anderen Produkten des Proteinabbaus verschieden und sind mengenmässig zu vernachlässigen.

Eine Inaktivierung aus Sicherheitsgründen ist nicht erforderlich. Die Fütterungsstudie wurde mit einem Enzymprodukt, das nicht inaktiviert worden war, durchgeführt und ergab eine Verträglichkeit auch bei der höchsten eingesetzten Dosis.

Der Verarbeitungshilfsstoff ist für die gewerbliche Anwendung bestimmt. Ein Inverkehrbringen als Publikumsprodukt ist nicht vorgesehen.

Toxizität

Das GVO-Erzeugnis Asparaginase wurde drei toxikologischen Prüfungen (Rückmutationstest, *in-vitro*-Test auf Chromosomenaberrationen, Fütterungsstudie) unterzogen.

Für die Experimente wurde ein Konzentrat der Charge PPV 33595, gewonnen aus einer Kultur von *B. subtilis* NZYM-CK verwendet.

Die Charge wurde charakterisiert und ist repräsentativ für das Enzymprodukt.

Rückmutationstest mit Bakterien (Ames-Test)

Eine mögliche mutagene Aktivität von Material der Charge 33595 wurde mittels Rückmutationstest mit Bakterien (Ames-Test) geprüft. Der Test wurde gemäss der OECD-Richtlinie 471 (1997)

durchgeführt. Da die Charge PPV 33595 Histidin und Tryptophan in erheblicher Menge enthielt, wurde die 'treat-and-plate'-Methode verwendet.

Für die Untersuchung wurden Teststämme von *Salmonella typhimurium* (TA98, TA100, TA1535, TA1537) und *Escherichia coli* (WP2uvrApKM101) eingesetzt, um die mutagene Aktivität der Charge PPV 33595 mit und ohne metabolischer Aktivierung durch den S9-Mix aus Rattenleber zu überprüfen.

Es wurden sechs verschiedene Dosisstufen geprüft; die höchste Stufe betrug umgerechnet 4.35 mg TOS/mL.

Der Rückmutationstest ergab keinen Hinweis auf mutagene Komponenten in der Charge PPV 33595.

In-vitro-Test auf Chromosomenaberrationen

Ein möglicher genotoxischer Effekt von Material der Charge PPV 33595 mit und ohne metabolischer Aktivierung durch den S9-Mix aus Rattenleber auf eine Kultur menschlicher peripherer Blutlymphozyten wurde geprüft. Der *in-vitro*-Test auf Chromosomenaberrationen wurde nach der OECD-Richtlinie 487 (2010) durchgeführt. Es wurden fünf verschiedenen Dosen geprüft; die höchste Dosis betrug 2.85 mg TOS/mL.

Der *in-vitro*-Test auf Chromosomenaberrationen mit Material der Charge PPV 33595 ergab keinen Hinweis auf toxische oder genotoxische Effekte.

Fütterungsstudie

Eine mögliche schädliche Wirkung bei oraler Aufnahme von Material der Charge PPV 33595 wurde untersucht. Die Fütterungsstudie mit Ratten über 13 Wochen (90 Tage) wurde nach der OECD-Richtlinie 408 (1998) durchgeführt.

Material der Charge PPV 33595 wurde Ratten (Sprague Dawley) in drei unterschiedlichen Dosisstufen oral verabreicht. Die Dosen betragen 1.0, 3.3 und 10.0 mL pro kg Körpergewicht und Tag. Dies entspricht 0.121, 0.398 und 1.207 g TOS/kg KG/d bzw. 58'457, 192'907 und 584'568 TASU pro kg Körpergewicht und Tag. Als Kontrolle diente Wasser. Jede Dosis wurde an je zehn männlichen und weiblichen Tieren geprüft (total 80 Tiere). Folgende Parameter wurden untersucht:

- klinische Symptome
- Motorik und Verhalten
- Morbidität/Mortalität
- Körpergewicht
- Futter- und Wasseraufnahme
- Ophthalmoskopie (Augenspiegelung)
- Hämatologie und Blutchemie: Blutprobe in Woche 13 (Ende des Versuches)
- Organgewichte
- Nekroskopie
- Histopathologie.

In Bezug auf klinische Symptome, Verhalten, Körpergewicht, Wasseraufnahme, Futtermittelverwertung sowie den Resultaten der Ophthalmoskopie ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Verfahren.

Zu einzelnen Endpunkten ergaben sich statistisch signifikante Befunde.

Die Futteraufnahme von männlichen Tieren der hohen Dosisgruppe war in Woche 6 signifikant geringer, von weiblichen Tieren der mittleren Dosisgruppe in Woche 8 signifikant höher. Diese Befunde waren isoliert und wurden als nicht behandlungsbedingt bewertet.

Der Hämatokrit in männlichen Tieren der mittleren Dosisgruppe war signifikant geringer, dies wegen eines einzelnen Tieres. Der Befund wurde deshalb als nicht behandlungsbedingt bewertet.

Die Thromboplastinzeit bei männlichen Tieren der hohen Dosisgruppe war signifikant höher. Es wurde kein Zusammenhang mit der Dosis festgestellt. Bei weiblichen Tieren wurde kein solcher Effekt beobachtet. Der Befund wurde deshalb als nicht behandlungsbedingt bewertet.

Die relativen Werte für Basophile in weiblichen Tieren der hohen Dosisgruppe waren signifikant geringer. Sie lagen aber in der historischen Bandbreite. Bei andere Leukozyten waren die Werte nicht verändert. Der Befund wurde als nicht behandlungsbedingt bewertet.

Das Verhältnis Albumin/Globulin in männlichen Tieren der mittleren und hohen Dosisgruppe signifikant erhöht. Die Werte für Albumin und Globulin waren aber nicht signifikant verändert, und in weiblichen Tieren wurde kein Effekt festgestellt. Der Befund wurde deshalb als nicht behandlungsbedingt bewertet.

Der Cholesterolspiegel in weiblichen Tieren der hohen Dosisgruppe war signifikant verringert. In den weiblichen Tieren der tiefen und mittleren Dosisgruppen war der Wert ebenfalls verringert, aber nicht signifikant. In männlichen Tieren wurde ebenfalls eine nicht signifikante Verringerung beobachtet. Die Befunde schienen dosisabhängig zu sein, und ein Zusammenhang mit der Behandlung wurde nicht ausgeschlossen. Die Veränderungen waren aber geringfügig und innerhalb der historischen Bandbreite. Sie wurden deshalb als toxikologisch unbedeutend bewertet.

Das relative Lebergewicht in männlichen Tieren der mittleren Dosisgruppe war signifikant erhöht. In männlichen Tieren der hohen Dosisgruppe und in den weiblichen Tieren wurde dies nicht festgestellt. Der Befund wurde deshalb als nicht behandlungsbedingt bewertet.

Das absolute und relative Gewicht der Prostata in männlichen Tieren der tiefen Dosisgruppe war signifikant tiefer. Es wurde aber kein Zusammenhang mit der Dosis festgestellt. Der Befund wurde deshalb als nicht behandlungsbedingt bewertet.

In der makroskopischen Untersuchung ergaben sich nur vereinzelte Befunde. Bei einem männlichen Tier wurde ein Zwerchfellbruch festgestellt, wobei ein Leberlappen betroffen war. Dieses und ein Tier aus der Kontrollgruppe wiesen kleinere Samenbläschen auf. Eierstockzysten wurden bei zwei weiblichen Tieren, eines davon aus der Kontrollgruppe, gefunden. Die Befunde betreffend Samenbläschen und Eierstockzysten konnten aber in der mikroskopischen Untersuchung nicht bestätigt werden. Drei Tiere aus drei unterschiedlichen Gruppen (mittlere Dosis, männlich; mittlere Dosis, weiblich; hohe Dosis, weiblich) wiesen Verfärbungen des Thymus auf.

In der mikroskopischen Untersuchung wurde im Fall des Zwerchfellbruchs eine kleine Stelle mit erhöhtem Bindegewebeanteil im betroffenen Leberlappen gefunden. In weiteren Tieren wurden Veränderungen im Zungenmuskel gefunden, die aber auf die Blutentnahmen zurückgeführt wurden. Die Befunde lagen im Bereich des Üblichen und wurden als toxikologisch unbedeutend bewertet.

Die Fütterung von Ratten mit Material der Charge 33595 ergab insgesamt keine behandlungsbedingten Befunde. Damit entspricht die höchste in der Fütterungsstudie während 13 Wochen getestete Dosis von 1.207 g TOS pro Kilogramm Körpergewicht und Tag der Dosis ohne beobachtete schädigende Wirkung (No Observed Adverse Effect Level, NOAEL) für männliche und weibliche Ratten.

Allergenität

Zur Abklärung einer möglichen Allergenität des Proteins Asparaginase aus *P. furiosus* bzw. *B. subtilis* Stamm NZYM-CK wurde ein Vergleich mit den Sequenzen, die in der Datenbank allergenonline.org des Food Allergy Research and Resource Program bzw. der Datenbank allergen.org der der WHO International Union of Immunological Societies (WHO/IUIS) enthalten sind, angestellt, mit folgenden Vorgehensweisen.

- Suche nach Homologien von mindestens 35% über ein gleitendes Fenster mit einer Länge von 80 Aminosäuren.
- Gleiche Untersuchung wie oben, aber mit besonderer Gewichtung einer erhöhten Übereinstimmung innerhalb von Teilabschnitten des Fensters von 80 Aminosäuren.
- Vergleich über die gesamte Länge der Asparaginase und der bekannten Allergene gemäss des Verfahrens von Needleman und Wunsch (1970).

Asparaginase wurde mit 1603 Sequenzen von Allergenen aus der Datenbank allergenonline verglichen. Es wurden keine Homologien über 35% gefunden. Die höchste Übereinstimmung gemäss Needleman-Wunsch-Algorithmus ergab sich mit einem Protein aus der Birne (*Pyrus communis*) und betrug 20.5%.

Asparaginase wurde mit 986 Sequenzen von Allergenen aus der Datenbank allergen.org verglichen. Es wurden keine Homologien über 35% gefunden. Die höchste Übereinstimmung gemäss Needleman-Wunsch-Algorithmus ergab sich mit einem Protein aus der Birke (*Betula pendula*) und betrug 20.7%,

Die Resultate weisen darauf hin, dass die gefundenen Übereinstimmungen zufällig sind. Es bestehen damit keine Hinweise auf ein allergenes Potential des GVO-Erzeugnisses Asparaginase aus *B. subtilis* Stamm NZYM-CK in Lebensmitteln.

Exposition

Die Abschätzung der Exposition von Konsumenten gegenüber des GVO-Erzeugnisses Asparaginase betrifft feste und flüssige Lebensmittel, bei deren Herstellung Asparaginase verwendet wurde. Für Kleinkinder wurde eine besondere Abschätzung vorgenommen, wobei Biscuits aus Getreide berücksichtigt wurden.

Die Expositionsabschätzung erfolgte unter den konservativen Annahmen zum Lebensmittelkonsum gemäss der „Budget Method“ (ILSI, 1997). Diese Methode wurde verwendet, um die theoretische maximale tägliche Aufnahme (Theoretical Maximum Daily Intake, TMDI) von Asparaginase über Lebensmittel abzuschätzen. Es wurden feste und flüssige Lebensmittel berücksichtigt.

Es wurde angenommen, dass alle verarbeiteten Lebensmittel mit der maximalen Menge Asparaginase verarbeitet worden waren und dass die gesamte Menge des verwendeten Erzeugnisses im Endprodukt verblieb und aufgenommen wurde.

Es wird, auf der Basis von drei analysierten Chargen des Erzeugnisses Asparaginase aus *B. subtilis* Stamm NZYM-CK, angenommen, dass das Erzeugnis eine spezifische Aktivität von 539 TASU/mg TOS aufweist.

Feste Lebensmittel

Es wurde angenommen, dass die Energieaufnahme 50 kcal (ca. 200 kJ) pro kg Körpergewicht und Tag beträgt. Dies entspricht einem Verzehr von 25 g festen Lebensmitteln pro kg Körpergewicht und Tag. Es wurde angenommen, dass 50% dieser Ration verarbeitete Lebensmittel sind. Dies entspricht einem Verzehr von 12.5 g festen verarbeiteten Lebensmitteln pro kg Körpergewicht und Tag.

Die höchste Dosierung von Asparaginase bei der Herstellung fester verarbeiteter Lebensmittel beträgt 15,000 TASU/kg Erzeugnis. Dies entspricht 27.8 mg TOS/kg Erzeugnis.

Der Verzehr von 12.5 g festen verarbeiteten Lebensmitteln pro kg Körpergewicht und Tag entspricht demnach einer Aufnahme von 0.348 mg TOS pro kg Körpergewicht und Tag.

Flüssige Lebensmittel

Es wurde angenommen, dass 100 mL flüssige Lebensmittel (Milch und milchbasierte Erzeugnisse ausgeklammert) pro kg Körpergewicht und Tag verzehrt werden und dass 25% dieser Ration verarbeitete Lebensmittel sind. Dies entspricht einem Verzehr von 25 mL flüssigen verarbeiteten Lebensmitteln (Kaffee oder Kakao als Getränk) pro kg Körpergewicht und Tag. Es wurde angenommen, dass 1000 mL Kaffee oder Kakao als Getränk aus 60 g Bohnen hergestellt werden.

Die höchste Dosierung von Asparaginase bei der Herstellung flüssiger verarbeiteter Lebensmittel der Anwendung beträgt 12,500 TASU/kg Erzeugnis (Kaffee- und Kakaobohnen). 60 g Bohnen werden mit 750 TASU behandelt. Dies entspricht 1.39 mg TOS/1000 mL Getränk.

Die Aufnahme von 25 mL Kaffee pro kg Körpergewicht und Tag entspricht also einer Aufnahme von 0.035 mg TOS pro kg Körpergewicht und Tag.

Die theoretische maximale tägliche Aufnahme via feste und flüssige Lebensmittel beträgt demnach 0.383 mg TOS pro kg Körpergewicht und Tag.

Kleinkinder

Für Kleinkinder wurde eine besondere Abschätzung vorgenommen. Die Abschätzung betrifft hier die Aufnahme via Biscuits. Es wurde angenommen, dass die Energieaufnahme 400 kJ pro kg Körpergewicht und Tag beträgt. Es wurde angenommen, dass 25% dieser Energieaufnahme durch Biscuits erfolgen. Die Energiedichte von Biscuits wurde mit 500 kcal/100 g (umgerechnet 2093 kJ/100 g) angenommen.

Dies entspricht einer Aufnahme von 4.8 g Biscuit pro kg Körpergewicht und Tag.

Die höchste Dosierung von Asparaginase bei der Herstellung von Biscuits beträgt 15,000 TASU/kg Erzeugnis. Dies entspricht 27.8 mg TOS/kg.

Der Verzehr von 4.8 g Biscuits pro kg Körpergewicht und Tag entspricht demnach einer Aufnahme von 0.133 mg TOS pro kg Körpergewicht und Tag.

Die theoretische maximale tägliche Aufnahme bei Kleinkindern via Biscuits liegt also unter dem allgemeinen Wert für feste und flüssige Lebensmittel.

Sicherheitsabstand

Der anhand der subchronischen oralen Toxizitätsstudie mit dem Enzymprodukt an Ratten ermittelte NOAEL des GVO-Erzeugnisses Asparaginase beträgt 1.207 g TOS pro kg Körpergewicht und Tag.

Die maximale Aufnahme an Enzymprodukt beträgt 0.383 mg TOS pro kg Körpergewicht und Tag.

Der berechnete Sicherheitsabstand (margin of exposure) beträgt somit 3151.

Schlussfolgerung

Die Prüfung des Gesuchs bezüglich der Gesundheit des Konsumenten ergibt keinen Grund zur Annahme einer Gesundheitsgefährdung durch Asparaginase aus *Bacillus subtilis* Stamm NZYM-CK, die bei der Verwendung als Verarbeitungshilfsstoff in der Lebensmittelverarbeitung verwendet wird. Nach aktuellem Stand liegen deshalb keine wissenschaftlichen Einwände gegen eine Verwendung bzw. ein Inverkehrbringen von Asparaginase aus *Bacillus subtilis* Stamm NZYM-CK als Verarbeitungshilfsstoff vor.

Referenzen

BAFU/BAG (Hrsg.) 2013: Einstufung von Organismen: Bakterien, Viren, Parasiten und Pilze. Bundesamt für Umwelt, Bern. Umwelt-Vollzug Nr. 1114. Modul 1: Bakterien.

EFSA BIOHAZ Panel, 2017. Update of the list of QPS-recommended biological agents intentionally added to food or feed as notified to EFSA 5: suitability of taxonomic units notified to EFSA until September 2016. EFSA J 15(3):4664.

FAO/WHO, 2006. General Specifications and Considerations for Enzyme Preparations Used in Food Processing. Compendium of Food Additives Specifications. 67th meeting. FAO JECFA Monographs 3: 63-67.

ILSI, 1997. An evaluation of the budget method for screening food additive intake. Summary report prepared under the responsibility of ILSI Europe Food Chemical Intake Task Force, 1-12.

Needleman&Wunsch, 1970. A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins. Journal of Molecular Biology, Volume 48, Issue 3, 28 March 1970, Pages 443-453.

OECD, 1997. OECD Guideline for the Testing of Chemicals, Test No. 471: Bacterial Reverse Mutation Test. [gemäß Annex 7.01 3. aktuell 1997]

OECD, 2010. OECD Guideline for the Testing of Chemicals, Test No. 487: In Vitro Mammalian Cell Micronucleus Test. [gemäß Annex 7.02 1.2. aktuell 2016]

OECD, 1998. OECD Guideline for the Testing of Chemicals, Test No. 408: Repeated dose 90-day oral toxicity study in rodents [gemäß Annex 7.03 2.4. aktuell 2018]