



Bern, 08.07.2019

---

# **Beurteilung der Lebensmittelsicherheit des GVO-Erzeugnisses Serinprotease (Chymotrypsin) Formea CTL aus *Bacillus licheniformis* Stamm NZYM-RH zur Verwendung in der Verarbeitung von Lebensmitteln**

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 Serinprotease (Chymotrypsin) aus *Bacillus licheniformis* Stamm NZYM-RH zur Verwendung in der Verarbeitung von Lebensmitteln

## Inhalt

Zusammenfassung

1. Einleitung .....	4
2. Charakterisierung des GVO-Erzeugnisses .....	4
3. Angaben über den gentechnisch veränderten Mikroorganismus .....	4
3.1 Eigenschaften des Empfängerorganismus .....	4
3.2 Herstellung des Produktionsorganismus .....	5
4. Herstellungsverfahren des GVO-Erzeugnisses .....	5
5. Reinheit des GVO-Erzeugnisses .....	5
6. Anwendungsbereich .....	7
7. Beurteilung möglicher gesundheitlicher Auswirkungen .....	7
7.1 Toxizität .....	7
7.2 Allergenität .....	8
8. Produktrisiken .....	9
9. Schlussfolgerungen .....	10
10. Referenzen .....	10

## Zusammenfassung

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 Serinprotease mit Chymotrypsinspezifität (kurz Serinprotease (Chymotrypsin)) aus *Bacillus licheniformis* Stamm NZYM-RH als Verarbeitungshilfsstoff für Lebensmittel durch das Bundesamt für Veterinärwesen und Lebensmittelsicherheit BLV.

Das Protein Serinprotease (Chymotrypsin) ist ein Enzym, das die Hydrolyse von Peptidbindungen katalysiert. Die genetische Information für dieses Protein stammt aus *Nocardioopsis prasina*.

Das GVO-Erzeugnis wird aus dem gentechnisch veränderten Produktionsstamm *B. licheniformis* NZYM-RH in einem geschlossenen System (Fermenter) nach den Leitlinien der Guten Herstellungspraxis (Good Manufacturing Practice, GMP) fermentativ gewonnen. Das resultierende flüssige Enzymkonzentrat wird aufgereinigt, stabilisiert und in die gewünschte standardisierte Formulierung überführt.

Die Serinprotease (Chymotrypsin) soll in Form von zwei Enzympräparaten mit folgenden Bezeichnungen in den Verkehr gebracht werden: Formea CTL 300 BG und Formea CTL 600 BG (beides Granulate). Die zwei Enzympräparate sind ausschliesslich für die gewerbliche Verwendung bestimmt.

Das GVO-Erzeugnis Serinprotease (Chymotrypsin) wurde bereits in folgenden Ländern von den zuständigen Behörden bewilligt; Dänemark und Frankreich im Jahre 2012, Brasilien 2014, Australien 2015 und Kanada 2016. In den USA ist das Enzym seit 2015 allgemein als sicher anerkannt (generally recognized as safe, GRAS). In der Europäischen Union (ausgenommen Dänemark und Frankreich) ist das GVO-Erzeugnis bis zur Veröffentlichung der Unionsliste der Lebensmittelenzyme ohne Bewilligung verkehrsfähig.

Das Enzym Serinprotease (Chymotrypsin) soll in der Verarbeitung von proteinhaltigen Lebensmitteln tierischen und pflanzlichen Ursprungs eingesetzt werden, insbesondere auch bei der Herstellung von Säuglingsanfangs- und Folgenahrung auf der Basis von Proteinhydrolysaten. Hydrolysierte Proteine (Peptide) unterscheiden sich u. a. in Geschmack, Löslichkeit, Viskosität, Verdaulichkeit und Allergenität vom intakten Protein. Proteinhydrolysate werden als Zutaten von Lebensmitteln genutzt.

Die Durchführung der drei toxikologischen Studien (13-Wochen-Fütterungsstudie, Tests auf Mutagenität und Chromosomenaberrationen) erfolgte mit einem aufgereinigten flüssigen Konzentrat des GVO-Erzeugnisses Serinprotease (Chymotrypsin). Die Resultate dieser Untersuchungen ergaben keinen Hinweis auf toxische oder genotoxische Effekte.

Zur Abklärung einer möglichen Allergenität wurden *in silico* Analysen zur Homologie des Proteins zu Sequenzen in Allergen-Datenbanken durchgeführt. Die Suche nach Homologien ergab keine Resultate, die auf eine mögliche Allergenität der Serinprotease (Chymotrypsin) aus *B. licheniformis* Stamm NZYM-RH hinweisen würden.

Die Enzympräparate Formea CTL 300 BG und Formea CTL 600 BG erzeugen in den damit verarbeiteten Lebensmitteln keine neuartigen Reaktionsprodukte.

Es kann davon ausgegangen werden, dass das GVO-Erzeugnis in den verwendeten Formulierungen für die Gesundheit der Konsumentinnen und Konsumenten keine Gefährdung darstellt.

## 1. Einleitung

Die Firma Novozymes A/S, Bagsværd, Dänemark reichte mit Schreiben vom 25. Juli 2016 ein Gesuch um Bewilligung des GVO-Erzeugnisses Serinprotease mit Chymotrypsinspezifität (kurz Serinprotease (Chymotrypsin)) als Verarbeitungshilfsstoff für Lebensmittel beim Bundesamt für Lebensmittelsicherheit und Veterinärwesen BLV ein.

Aufgrund des Gesuches der Firma Novozymes ist zu prüfen, ob nach dem Stand der Wissenschaft eine Gefährdung der Gesundheit von Konsumentinnen und Konsumenten beim Verzehr von mit dem GVO-Erzeugnis Serinprotease (Chymotrypsin) hergestellten Lebensmitteln ausgeschlossen werden kann. Zudem ist das Erzeugnis bezüglich des Täuschungsschutzes zu prüfen. Ein Bericht wird erstellt zu Händen der Behörden nach Artikel 4 der Verordnung des EDI über gentechnisch veränderte Lebensmittel (VGVL, SR 817.022.51).

Das GVO-Erzeugnis Serinprotease (Chymotrypsin) wurde bereits von den zuständigen Behörden folgender Staaten zugelassen: Dänemark und Frankreich im Jahre 2012, Brasilien 2014, Australien 2015 und Kanada 2016. In den USA ist Serinprotease (Chymotrypsin) seit 2015 als sicher anerkannt (generally recognized as safe, GRAS). In der Europäischen Union (ausgenommen Dänemark und Frankreich) ist das GVO-Erzeugnis bis zur Veröffentlichung der Unionsliste der Lebensmittelenzyme ohne Bewilligung verkehrsfähig.

Das Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) evaluierte im Jahre 2012 die Sicherheit des GVO-Erzeugnisses Serinprotease (Chymotrypsin). Der Ausschuss konnte gesundheitliche Risiken ausschliessen und legte keinen Wert für die erlaubte Tagesdosis des GVO-Erzeugnisses Serinprotease (Chymotrypsin) ('acceptable daily intake: not specified') fest (JECFA, 2012).

## 2. Charakterisierung des GVO-Erzeugnisses

Das GVO-Erzeugnis Serinprotease mit Chymotrypsinspezifität (Chymotrypsin; EC 3.4.21.1; CAS 9004-07-3) katalysiert die Hydrolyse von Peptidbindungen, vorzugsweise an der Carboxylgruppe von Tyrosin und Phenylalanin (aromatische Aminosäurereste) und Leucin und Methionin (hydrophobe Aminosäurereste).

Die DNA-Sequenz codierend für Serinprotease (Chymotrypsin) stammt aus dem Spenderorganismus *Nocardiopsis prasina* Stamm NRRL18262. Das GVO-Erzeugnis Serinprotease (Chymotrypsin) mit einer Länge von 188 Aminosäuren wird vom Produktionsorganismus *Bacillus licheniformis* Stamm NZYM-RH ins Fermentationsmedium sezerniert.

Serinprotease (Chymotrypsin) ist bis zu einer Temperatur von ca. 80°C stabil, die Enzymaktivität bleibt bei einem pH-Wert zwischen 4 und 11 erhalten. Bei einem pH-Wert von 7 liegt das Temperatur-Optimum der Serinprotease (Chymotrypsin) zwischen 50 und 75°C, bei einer Temperatur von 30°C liegt ihr pH-Optimum zwischen 8.5 und 11.

Das theoretische Molekulargewicht des reifen Enzyms beträgt 19.2 kDa. Die Polyacrylamid-Gelelektrophorese ergab für das Molekulargewicht des Proteins einen Wert von 20 bis 21 kDa.

## 3. Angaben über den gentechnisch veränderten Mikroorganismus

### 3.1 Eigenschaften des Empfängerorganismus

Der Empfängerorganismus *Bacillus licheniformis* SJ6370 ist von *Bacillus licheniformis* Ca63 abgeleitet, nicht sporulierend, Protease-defizient, Amylase-negativ und enthält keine gentechnisch eingeführten Antibiotikaresistenzgene.

Nach den aktuellen Richtlinien des BAFU (2013) über die «Einstufung von Organismen. Modul 1. Bakterien» wird der Empfängerorganismus *B. licheniformis* der Risikogruppe 1 zugeordnet. Organismen der Risikogruppe 1 stellen nach dem Stand der Wissenschaft kein Risiko für die menschliche Gesundheit und Umwelt dar.

Für die Herstellung des GVO-Erzeugnisses Serinprotease (Chymotrypsin) wird der gentechnisch veränderte Produktionsstamm *B. licheniformis* NZYM-RH verwendet. Das Gremium für Biologische Gefahren (Panel on Biological Hazards, BIOHAZ) der Europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit (EFSA) bestätigt in seinem wissenschaftlichen Gutachten aus dem Jahre 2017 die Qualifizierte Sicherheitsannahme (Qualified Presumption of Safety, QPS) von *B. licheniformis* NZYM-RH mit der Qualifikation «keine toxische Aktivität» (EFSA, 2017).

### 3.2 Herstellung des Produktionsorganismus

Die Herstellung des gentechnisch veränderten Produktionsorganismus *B. licheniformis* NZYM-RH erforderte mehrere Transformationsschritte. Für die Transformation der *B. licheniformis*-Zellen wurden zwei verschiedene Vektoren verwendet. Beide Vektoren enthalten eine Expressionskassette des Gens kodierend für die Serinprotease (Chymotrypsin) von *Norcardiopsis prasina* NRRL18262.

Die Integration der entsprechenden Serinprotease (Chymotrypsin)-Expressionskassette erfolgte mittels doppelter homologer Rekombination in einem ersten Schritt in den *amyL*-Lokus des Empfängerorganismus *B. licheniformis* SJ6370 und dann in den *xylA*-Lokus von *B. licheniformis* SJ7430. Das *B. licheniformis*-Genom zählt somit vier Kopien der codierenden Sequenz von *pep10R*. Die transformierten Bakterienzellen wurden in Bezug auf Empfindlichkeit gegenüber Erythromycin überprüft. Schliesslich wurde durch klassische Mutagenese eine Leistungsverbesserung des Produktionsstammes erzielt.

Der gentechnisch veränderte Produktionsstamm *B. licheniformis* NZYM-RH ist aufgrund von Gendeletionen nicht sporulierend, Protease-defizient und Amylase-negativ. Aufgrund seiner Proteasedefizienz kann der Produktionsstamm NZYM-RH die sekretierten heterologen Proteine im Fermentationsmedium nicht abbauen. Auch enthält er keine gentechnisch eingeführten Antibiotikaresistenz-Markergene; ein Gentransfer solcher Sequenzen auf die menschliche Darmflora ist deshalb ausgeschlossen.

Die genetische Stabilität des Produktionsorganismus unter industriellen Herstellungsbedingungen wurde mittels Southern-Blot-Analyse überprüft. Die Resultate aus drei Produktionschargen zeigten übereinstimmend auf, dass am Ende des Fermentationsprozesses im Genom von *B. licheniformis* NZYM-RH sowohl im *amyL*- als auch im *xylL*-Lokus je zwei Transgenkopien enthalten sind.

## 4. Herstellungsverfahren des GVO-Erzeugnisses

Die Herstellung des GVO-Erzeugnisses Serinprotease (Chymotrypsin) erfolgt in Reinkultur mittels Submersfermentation im Zulaufverfahren in einem geschlossenen System (Fermenter) nach den Leitlinien der Guten Herstellungspraxis (Good Manufacturing Practice, GMP). Die für die Fermentation eingesetzten Rohmaterialien erfüllen die Anforderungen an Lebensmittel.

Der Produktionsorganismus *B. licheniformis* NZYM-RH sezerniert das GVO-Erzeugnis Serinprotease (Chymotrypsin) ins Fermentationsmedium.

Nach beendeter Kultivierung wird das extrazelluläre Enzym isoliert und aufgereinigt. Die Aufarbeitung umfasst mehrere Verfahrensschritte: Abtrennung von mikrobieller Biomasse (Produktionsorganismus) und unlöslichen Bestandteilen von der Kulturlösung mittels Filtration; Entkeimungsfiltration; Aufkonzentrierung der geklärten Kulturlösung durch Ultrafiltration. Das resultierende flüssige Enzymkonzentrat wird stabilisiert und in die gewünschte standardisierte Formulierung überführt.

Novozymes A/S unterhält für die Enzymproduktion ein nach ISO 9001:2008 zertifiziertes Qualitätsmanagementsystem.

## 5. Reinheit des GVO-Erzeugnisses

Das GVO-Erzeugnis Serinprotease (Chymotrypsin) entspricht den Empfehlungen des JECFA über Reinheitsspezifikationen für Lebensmittelenzyme (FAO/WHO, 2006). Spezifikationen für chemische

und biologische Reinheit von Lebensmittelenzymen legen Grenzwerte für Schwermetalle und kontaminierende Mikroorganismen fest; auch verlangen sie die Abwesenheit von (Myko-)Toxinen, Antibiotika und Produktionsorganismen (Aberer *et al.*, 2002)

Die Charakterisierung des Enzymbatches PPA 26797, eingesetzt für die toxikologischen Prüfungen des GVO-Erzeugnisses Serinprotease (Chymotrypsin), ergab folgende analytische Daten:

Parameter	PPA 26797	Anforderung JECFA
Enzymaktivität	54.6 KMCU <sup>1</sup> /g	gemäss Deklaration
Organische feste Bestandteile (Total Organic Solids, TOS)	9,5 % (w/w)	
Wasser	88.1 %	
Asche	2.4 %	
N <sub>tot</sub>	6.5 %	
Schwermetalle (Ag, Bi, Cd, Cu, Hg, Ni, Pb, Sn), Halbmetalle (As, Sb), gesamt	3.4 ppm	
Pb	< 0.5 ppm	≤ 5 ppm
As	< 0.1 ppm	
Cd	< 0.05 ppm	
Hg	< 0.03 ppm	
Gesamtkeimzahl	< 200 KBE/g	
coliforme Keime	< 10 KBE/g	< 30 KBE/g
enteropathogene <i>E. coli</i>	nicht nachweisbar in 25 g	nicht nachweisbar in 25 g
Salmonellen	nicht nachweisbar in 25 g	nicht nachweisbar in 25 g
antibiotische Aktivität	nicht nachweisbar	nicht nachweisbar
Mykotoxine		nicht nachweisbar
Produktionsorganismus		nicht nachweisbar

Zu den organischen Feststoffen (Total Organic Solids; TOS<sup>2</sup>) zählen neben dem GVO-Erzeugnis Serinprotease (Chymotrypsin) auch andere Proteine und Kohlenhydrate, die aus dem Fermentationsprozess stammen.

Der Enzymbatch PPA 26797 wurde zudem auch auf folgende Enzymaktivitäten getestet: Lipase, alpha-Amylase und Glucoamylase. Es konnten keine Aktivitäten nachgewiesen werden.

Die Enzympräparate Formea CTL 300 BG und Formea CTL 600 BG entsprechen den von JECFA empfohlenen Reinheitsspezifikationen für Lebensmittelenzyme (FAO/WHO, 2006).

<sup>1</sup> Die Serinprotease (Chymotrypsin)-Aktivität wird in Protease-Units (Kilo Microbial Chymotrypsin Unit, KMCU) gemessen. Eine KMCU ist die Enzymmenge, die erforderlich ist, um unter festgelegten Bedingungen aus Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA (Substrat) ein µmol *p*-Nitroanilin (pNA) pro Minute zu produzieren.

<sup>2</sup> Berechnung des TOS-Wertes in Prozent: TOS (%)= 100 – A – W – D; (A= % Asche; W= % Wasser; D= % Verdünnungsmittel und/oder andere Zusatz- oder Inhaltsstoffe).

## 6. Anwendungsbereich

Biotechnisch hergestellte Proteasen zählen zu den wichtigsten Enzymen in der Lebensmittelverarbeitung (Tavano *et al.*, 2018). Peptide hydrolysierter Proteine können sich in folgenden Eigenschaften vom intakten Protein unterscheiden: Geschmack, Löslichkeit, Viskosität, Allergenität, Verdaulichkeit, u. a. (Nielsen, 2010).

In der Schweiz sollen die Enzympräparate Formea CTL 300 BG und Formea CTL 600 BG, beides Granulate des GVO-Erzeugnisses Serinprotease (Chymotrypsin), in den Verkauf gelangen. Im Vergleich zu Formea CTL 600 BG sind bei Formea CTL 300 BG sowohl die Enzymaktivität als auch der TOS-Gehalt auf die Hälfte reduziert. Beide Granulate werden ausschliesslich an Fachpersonen in der lebensmittelverarbeitenden Industrie abgegeben.

Das GVO-Erzeugnis Serinprotease (Chymotrypsin) soll in der Lebensmittelproduktion als Verarbeitungshilfsstoff eingesetzt werden. Proteine tierischen und pflanzlichen Ursprungs werden je nach Bedarf partiell oder extensiv hydrolysiert (z. B. Casein, Molkenproteine, Gluten sowie Proteine enthalten in Soja, Mais, Erbsen, Linsen, Fleisch und Fisch). Sobald der gewünschte Hydrolysegrad erreicht ist, wird das Enzym durch Erhitzung inaktiviert. Die daraus resultierenden Proteinhydrolysate sollen als Zutaten von Lebensmitteln genutzt werden.

Das Enzym Serinprotease (Chymotrypsin) soll auch bei der Herstellung von Säuglingsanfangs- und Folgenahrung auf der Basis von Proteinhydrolysaten zum Einsatz kommen.

## 7. Beurteilung möglicher gesundheitlicher Auswirkungen

### 7.1 Toxizität

Das GVO-Erzeugnis Serinprotease (Chymotrypsin) wurde drei toxikologischen Prüfungen (13-Wochen-Fütterungsstudie, Mutagenitäts- und Chromosomenaberrationstest) unterzogen.

Für die Experimente wurde das aufgereinigte flüssige Enzymkonzentrat der Charge PPA 26797 verwendet. Das Material wurde weder stabilisiert noch standardisiert.

#### **13-Wochen-Fütterungsstudie:**

Die 13-Wochen-Fütterungsstudie mit Ratten wurde nach der OECD-Richtlinie 408 (1998) von der Firma Scantox (Lille Skensved, Dänemark) durchgeführt.

Das Enzymkonzentrat (Enzymbatch PPA 26797) wurde 80 Versuchstieren (40 männliche und 40 weibliche Ratten) in unterschiedlicher Konzentration (10, 33 und 100 % Enzymkonzentrat) oral verabreicht. Dies entspricht 50, 165.1 und 500.1 mg TOS pro Kilogramm Körpergewicht und Tag (bzw. 28.8, 90.1 und 54.6 KMCU). Als Kontrolle diente Wasser. Jede Dosis wurde an je zehn männlichen und weiblichen Ratten geprüft.

Folgende Parameter wurden untersucht:

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

Die orale Aufnahme von Serinprotease (Chymotrypsin) bis zu einer Dosis von 500.1 mg TOS pro Kilogramm Körpergewicht und Tag wurde gut vertragen. Toxische Auswirkungen auf die Versuchstiere wurden keine festgestellt. Im Einzelnen wurden folgende Befunde festgestellt:

Der Tod von vier Versuchstieren wurde nicht mit dem Versuch in Verbindung gebracht. Die Sektion dieser Tiere zeigte auf, dass ihr Tod auf Fehlmanipulationen bei der Verabreichung der Testsubstanz zurückzuführen war.

Zwischen den behandelten Tieren und den Kontrollgruppen wurden in Bezug auf klinische Symptome, Futter- und Wasseraufnahme, Hämatologie, Blutchemie und Organgewichte keine statistisch signifikanten Unterschiede beobachtet, die mit dem Versuch in Verbindung gebracht werden konnten.

In Bezug auf Körpergewicht ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Verfahren.

Die Ophthalmoskopie zeigte keine Veränderungen, die mit dem Versuch in Verbindung gebracht werden konnten.

Die Befunde der histologischen Untersuchungen zeigten zwischen den behandelten Tieren und den Kontrollgruppen keine Effekte auf, die mit dem Versuch in Verbindung gebracht werden konnten oder von toxikologischer Bedeutung waren.

Die Resultate der Verfahren zeigen somit keine relevanten biologischen Effekte auf. Damit entspricht die höchste in der 13-Wochen-Fütterungsstudie an Ratten getestete Dosis von 500.1 mg TOS pro Kilogramm Körpergewicht und Tag der Dosis ohne beobachtete schädigende Wirkung (No Observed Adverse Effect Level, NOAEL).

#### **Rückmutationstest mit Bakterien (Ames-Test):**

Der Versuch wurde gemäss der OECD-Richtlinie 471 (1997) durchgeführt. Da der Enzyymbatch PPA 26797 Histidin und Tryptophan in freier Form enthält, 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 26797 (mit und ohne metabolischer Aktivierung durch S9-Mix) zu überprüfen.

Der Rückmutationstest ergab keinen Hinweis auf mutagene Komponenten im Enzyymbatch PPA 26797.

#### **In vitro Test auf Chromosomenaberrationen:**

Der Versuch wurde nach der OECD-Richtlinie 473 (1997) durchgeführt.

Ein möglicher genotoxischer Effekt von Enzyymbatch PPA 26797 (mit und ohne metabolischer Aktivierung durch den S9-Mix aus Rattenleber) auf menschliche periphere Blutlymphozyten wurde geprüft.

Die Resultate der toxikologischen Untersuchungen mit dem Enzyymbatch PPA 26797 ergaben keinen Hinweis auf toxische oder genotoxische Effekte.

## **7.2 Allergenität**

Das allergene Potential des GVO-Erzeugnisses Serinprotease (Chymotrypsin) wurde mittels *in silico* Analysen zur Homologie des Proteins zu Sequenzen in Allergen-Datenbanken ermittelt.

#### **In silico Analyse bezüglich Übereinstimmung von mindestens 35 % in einem Abschnitt von 80 Aminosäuren:**

Abschnitte von 80 Aminosäuren der Sequenz der Serinprotease (Chymotrypsin) wurden nach Übereinstimmungen von mindestens 35 % mit bekannten Allergenen untersucht. Der Vergleich erfolgte entsprechend der Empfehlung der EFSA zur Beurteilung der Allergenität von gentechnisch veränderten Pflanzen und Mikroorganismen sowie daraus hergestellten Lebens- und Futtermitteln (EFSA, 2010).

Dafür wurde die Aminosäuresequenz des GVO-Erzeugnisses in 80 Aminosäuren lange, einander überlappende Abschnitte unterteilt (80 amino acid window search). Die Sequenzabschnitte wurden auf eine Übereinstimmung mit den Einträgen der Datenbank „allergenonline.org“ von mindestens 35 % überprüft. Die Sequenzanalyse ergab keine Fälle mit entsprechender Übereinstimmung.

In einem zweiten Schritt erfolgte eine modifizierte Suche in der Datenbank „allergenonline.org“ („**80 amino acid window search with scaling**“) nach Proteinen, die in einem 80 Aminosäuren langen Proteinabschnitt eine Sequenzhomologie von über 35 % zeigen, darüber hinaus aber in einem kürzeren



Teilabschnitt eine noch höhere Übereinstimmung von Aminosäureresten aufweisen. Diese Sequenzanalyse ergab ebenfalls keine Fälle mit entsprechender Übereinstimmung.

Die Suche in der Datenbank „allergen.org“, mit und ohne Scaling, ergab keine Treffer.

**In silico Analyse bezüglich Übereinstimmung von mind. 35 % über die gesamte Sequenz:**

In einer dritten Überprüfung wurde eine Übereinstimmung von über 35 % zwischen der gesamten Aminosäuresequenz des GVO-Erzeugnisses Serinprotease (Chymotrypsin) und den Einträgen der Allergen-Datenbanken „allergenonline.org“ und „allergen.org“ überprüft, die sogenannte „overall identity“. Die Überprüfung ergab keine Fälle mit entsprechender Übereinstimmung.

Es bestehen damit keine Hinweise auf ein allergenes Potential des GVO-Erzeugnisses Serinprotease (Chymotrypsin) in Lebensmitteln.

## 8. Produktrisiken

Die als Verarbeitungshilfsstoffe eingesetzten Enzympräparate Formea CTL 300 BG und Formea CTL 600 BG erzeugen in Lebensmitteln keine Reaktionsprodukte, die nicht als konventionelle Lebensmittelbestandteile angesehen werden können. Am Ende der Proteinhydrolyse wird die Serinprotease (Chymotrypsin) durch Erhitzung denaturiert und liegt im Endprodukt (Proteinhydrolysat tierischen oder pflanzlichen Ursprungs) in inaktivierter Form vor.

Die Sicherheitsspanne als Verhältnis des NOAEL zur geschätzten täglichen Aufnahme wurde berechnet. Ist sie bei einem Lebensmittelzusatzstoff grösser als 100, kann davon ausgegangen werden, dass der Stoff aus toxikologischer Sicht für die menschliche Gesundheit kein Risiko darstellt (Aberer et al., 2002). Die Sicherheitsspanne für das GVO-Erzeugnis wurde in der Annahme, dass der Verarbeitungshilfsstoff Serinprotease (Chymotrypsin) in der empfohlenen Höchstdosierung verwendet wird und im Proteinhydrolysat verbleibt, berechnet.

Der anhand der subchronischen oralen Toxizitätsstudie mit Ratten ermittelte NOAEL des GVO-Erzeugnisses Serinprotease (Chymotrypsin) beträgt 500.1 mg TOS pro kg Körpergewicht und Tag. Das in der Sicherheitsstudie verwendete GVO-Erzeugnis (Produkt der Fermentation von *B. licheniformis* wird im Folgenden Fermentationsprodukt genannt) enthielt 9.5 % TOS und wies eine Enzymaktivität von 54.6 KMCU/g auf.

Das Enzympräparat Formea CTL 600 BG enthält 85 % TOS und weist eine Enzymaktivität von 600 KMCU pro Gramm Enzympräparat auf. Die höchste empfohlene Dosierung für den Einsatz dieses Enzympräparates beträgt 600 KMCU pro Kilogramm Protein. Dies entspricht einer Menge von 1 g Enzympräparat bzw. 850 mg TOS (Fermentationsprodukt) pro Kilogramm Protein.

Die publizierten Daten von menuCH<sup>3</sup> (erste national repräsentative Ernährungserhebung für die Schweiz) zeigen, dass im Durchschnitt die 18- bis 75-Jährigen täglich 2232 kcal Energie pro Person zu sich nehmen. Der Beitrag der Proteine zur täglichen Energiezufuhr beträgt durchschnittlich 340 kcal Energie bzw. 85 g Protein. Eine Person mit einem Standardgewicht von 60 kg nimmt somit 1.4 g Protein pro kg Körpergewicht und Tag auf. (Das BLV empfiehlt einer gesunden erwachsenen Person eine Proteinaufnahme von 0.8 g pro Kilogramm Körpergewicht und Tag, unabhängig von Alter und Geschlecht<sup>4</sup>.)

Unter der konservativen Annahme, dass das Enzympräparat im Proteinhydrolysat (Endprodukt) verbleibt, würde bei einer 60 kg schweren Person die Aufnahme von 1.4 g Protein pro kg Körpergewicht und Tag somit einer Aufnahme von 1.2 mg TOS (Fermentationsprodukt) pro kg Körpergewicht und Tag entsprechen.

Basierend auf diesen Annahmen und dem NOAEL von 500.1 mg TOS (Fermentationsprodukt) pro kg Körpergewicht und Tag im Tierversuch ergibt sich bei einem durchschnittlichen täglichen Konsum an

<sup>3</sup> <https://www.blv.admin.ch/blv/de/home/lebensmittel-und-ernaehrung/ernaehrung/menuch.html>

<sup>4</sup> <https://www.blv.admin.ch/blv/de/home/lebensmittel-und-ernaehrung/ernaehrung/empfehlungen-informativen/naehrstoffe/hauptnaehrstoffe.html>

Proteinen gemäss den erhobenen menuCH-Daten eine Sicherheitsspanne von 417. Dieser Wert übertrifft den Wert von 100. Für den erwachsenen Endverbraucher dieser Erzeugnisse bestehen somit keine gesundheitlichen Bedenken.

Das GVO-Erzeugnis Serinprotease (Chymotrypsin) soll auch bei der Herstellung von Säuglingsanfangs- und Folgenahrung auf der Basis von Proteinhydrolysaten zum Einsatz kommen. Entsprechende Anforderungen sind in der Verordnung des EDI über Lebensmittel für Personen mit besonderem Ernährungsbedarf (VLBE, SR 817.022.104) festgelegt und entsprechen dem geltenden EU-Recht (Verordnung (EU) 2016/127). Bei Säuglingsanfangs- und Folgenahrung auf der Basis von Proteinhydrolysaten beträgt der maximale Gehalt an Proteinhydrolysaten für beide Altersgruppen 2.8 Gramm pro 100 kcal.

Die EFSA empfiehlt in ihrem Gutachten für die Grundzusammensetzung von Säuglingsanfangsnahrung und Folgenahrung für neugeborene Jungen bzw. Mädchen eine durchschnittliche tägliche Energieaufnahme von 109 bzw. 103 kcal pro kg Körpergewicht (EFSA, 2014). Ein neugeborener Junge nimmt somit im Extremfall 3.1 g Protein pro kg Körpergewicht und Tag auf.

Unter der konservativen Annahme, dass das Enzympräparat in der empfohlenen Höchstdosierung verwendet wurde und in der Säuglingsanfangsnahrung verbleibt, würde bei einem neugeborenen Jungen die Aufnahme von 3.1 g Protein pro kg Körpergewicht und Tag somit einer Aufnahme von 2.6 mg TOS (Fermentationsprodukt) pro kg Körpergewicht und Tag entsprechen.

Basierend auf diesen Annahmen und dem NOAEL von 500.1 mg TOS (Fermentationsprodukt) pro kg Körpergewicht und Tag im Tierversuch ergibt sich für neugeborene Jungen beim Konsum von Säuglingsanfangsnahrung auf der Basis von Proteinhydrolysaten eine Sicherheitsspanne von 192; bei neugeborenen Mädchen beträgt diese 200. Es kann somit auch hier von der Unbedenklichkeit der Verwendung der Serinprotease (Chymotrypsin) als Verarbeitungshilfsstoff ausgegangen werden.

## 9. Schlussfolgerungen

Die Prüfung durch das BLV nach Artikel 31 Absatz 2 Buchstabe a der Lebensmittel- und Gebrauchsgegenständeverordnung (LGV, SR 817.02) ergibt, dass eine Gesundheitsgefährdung des Menschen, verursacht durch den Verzehr von Lebensmitteln, die mit Hilfe des vom Organismus abgetrennten und gereinigten GVO-Erzeugnisses Serinprotease (Chymotrypsin) aus *B. licheniformis* NZYM-RH hergestellt wurde, nach dem Stand der Wissenschaft ausgeschlossen werden kann.

Einer Bewilligung für die Verwendung des Verarbeitungshilfsstoffes Serinprotease (Chymotrypsin) in der Herstellung von Lebensmitteln (Proteinhydrolysate tierischen und pflanzlichen Ursprungs) steht aus Sicht des Gesundheitsschutzes nichts entgegen.

## 10. Referenzen

Aberer, W, Hahn, M, Lkade, M, Seebacher, U, Spök, A, Wallner, K and Witzani, H. 2002. Collection of information of enzymes. Final report. European Community.

EFSA, 2010. Scientific Opinion on the on the assessment of allergenicity of GM plants and microorganisms and derived food and fee. Panel on Genetically Modified Organisms (GMO panel). EFSA Journal **8**(7):700.

EFSA, 2014. Scientific Opinion on the essential composition of infant and follow-on formulae. Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA panel). EFSA Journal **12**(7): 13.

EFSA, 2017. Scientific Opinion on the update of the list of QPS-recommended biological agents intentionally added to food or feed as notified to EFSA. Panel on Biological Hazards (BIOHAZ panel). EFSA Journal **15**(3):102.

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

JECFA, 2012. Safety evaluation of certain food additives. WHO Food Additives Series No. 67: 39-49.

Nielsen, PM, 2010. Enzymes in protein modification. Enzymes in Food Technology (Second edition. Edited by Whitehurst, M and van Oort M), Verlag Wiley-Blackwell, UK. 292-319.

Tavano, OL, Berenguer-Murcia, A, Secundo, F and Fernandez-Lafuente, R, 2018. Biotechnological Applications of Proteases in Food Technology. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety **17**(2): 412-436.