

# **Beurteilung der Lebensmittelsicherheit des GVO-Erzeugnisses maltogene Amylase 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)

---

---

<sup>1</sup> Nach Gewährung des rechtlichen Gehörs der Gesuchstellerin überarbeitete Version vom 31. Oktober 2014.  
Auf Antrag der Gesuchstellerin werden Angaben, welche Geschäfts- oder Fabrikationsgeheimnisse betreffen,  
gemäss Art. 7 Abs. 1 Bst. g des Bundesgesetzes über das Öffentlichkeitsprinzip der Verwaltung  
(Öffentlichkeitsgesetz, BGO; SR 152.3) in diesem Dokument nicht aufgeführt.  
Die entsprechenden Textpassagen sind mit einem Asterisk (\*) versehen.

## Zusammenfassung der Beurteilung der Lebensmittelsicherheit des GVO-Erzeugnisses maltogene Amylase zur Verwendung in der Verarbeitung von Lebensmitteln

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 maltogene Amylase aus *Bacillus subtilis* Stamm BRG-1 als Verarbeitungshilfsstoff für Lebensmittel durch das Bundesamt für Gesundheit BAG bzw. das Bundesamt für Lebensmittelsicherheit und Veterinärwesen BLV.

Das Protein maltogene alpha-Amylase ist ein Enzym, das die Spaltung von Stärke in Maltose katalysiert. Die genetische Information für dieses Protein stammt aus dem thermophilen Bakterium *Geobacillus stearothermophilus* (ex *Bacillus stearothermophilus*) Stamm C599.

Das GVO-Erzeugnis wird aus dem gentechnisch veränderten Produktionsstamm *Bacillus subtilis* BRG-1 in einem geschlossenen System (Fermenter) nach den Leitlinien der aktuellen Guten Herstellungspraxis (current Good Manufacturing Practice; cGMP) fermentativ gewonnen. Das aufgereinigte flüssige Enzymkonzentrat wird durch Zugabe von Natriumchlorid stabilisiert, in die gewünschte Formulierung überführt und standardisiert.

Die maltogene Amylase soll in Form von zwei Enzympräparaten in Verkehr gebracht werden: Novamyl<sup>®</sup> (Granulat, in drei verschiedenen Formulierungen) und Maltogenase<sup>®</sup> (Flüssigkeit). Die beiden Enzympräparate entsprechen den für Lebensmittelenzyme durch das Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) und durch den Food Chemicals Codex (FCC) empfohlenen Reinheitsspezifikationen.

Das GVO-Erzeugnis maltogene Amylase wurde bereits in Dänemark im Jahre 1992 und in Frankreich 1993 von den zuständigen Behörden bewilligt. In den anderen Staaten der Europäischen Union ist das Erzeugnis ohne Bewilligung verkehrsfähig. In Australien wurde es 1994 und in Kanada 2004 zugelassen. In den USA ist das Enzym seit 1990 allgemein als sicher anerkannt (GRAS: generally recognized as safe). Das Enzympräparat Novamyl ist zudem auch in China, Japan, Mexiko, Neuseeland, Norwegen, den Philippinen, Russland, Saudi-Arabien, Südafrika und der Türkei rechtmässig im Verkehr.

Formulierungen des Enzyms werden in den Ländern, in denen es rechtmässig in Verkehr ist, seit Jahren von der Backwaren- und Stärkeindustrie als Verarbeitungshilfsstoff für Lebensmittel eingesetzt. Die Backwarenindustrie verwendet das Enzympräparat Novamyl, um die Retrogradation der Stärke in der Krume zu reduzieren; der Alterungsprozess von Backwaren wird dadurch verlangsamt. In der Stärkeindustrie kommt das Enzympräparat Maltogenase L alleine oder zusammen mit einem Amylopektin entzweigenden Enzym in der Herstellung von Maltosesirupen aus verflüssigter Stärke zum Einsatz.

Die DNA-Sequenz *amyM*, codierend für das GVO-Erzeugnis maltogene Amylase, wurde aus dem Spenderorganismus *G. stearothermophilus* Stamm C599 isoliert und durch homologe Rekombination an einen im Voraus bestimmten und bekannten Locus des Genoms des Empfängerorganismus *Bacillus subtilis* Stamm A164  $\Delta$ 5 integriert.

Der rekombinante DNA-Abschnitt, welcher durch homologe Rekombination ins Genom des Empfängerorganismus *B. subtilis* A164  $\Delta$ 5 integriert wurde, ist dem BLV im Einzelnen bekannt.\*

Der gentechnisch veränderte Produktionsstamm *B. subtilis* BRG-1 enthält keinen gentechnisch eingefügten Replikationsursprung, ist nicht sporulierend, Protease-defizient, Amylase- und Surfactin-

negativ sowie frei von Antibiotikaresistenz-Markergenen. Das GVO-Erzeugnis maltogene Amylase wird ins Fermentationsmedium sezerniert.

Das GVO-Erzeugnis maltogene Amylase weist im Vergleich zum nativen Protein eine Aminosäuresubstitution auf. Die Einzelheiten sind dem BLV bekannt.\*

Diese Aminosäuresubstitution hat jedoch keine Auswirkungen auf die biochemischen Eigenschaften des rekombinanten Enzyms. Sie entsprechen denjenigen des nativen Enzyms.

Um die toxikologische Unbedenklichkeit des GVO-Erzeugnisses maltogene Amylase zu überprüfen, wurden Studien (13-Wochen-Fütterungsstudie, Mutagenitäts- und Chromosomentest) mit einem aufgereinigten flüssigen Enzymkonzentrat durchgeführt. Die Resultate dieser Untersuchungen ergaben keinen Hinweis auf toxische oder genotoxische Effekte.

Zur Abklärung einer möglichen Allergenität wurden *in silico* Analysen zur Homologie des rekombinanten Proteins zu Sequenzen in Allergen-Datenbanken durchgeführt. Die Suche nach Homologien ergab keine Resultate, die auf eine mögliche Allergenität der maltogenen Amylase aus *B. subtilis* hinweisen würden. Studien *in vivo*, namentlich auch mit Personen, die eine berufsbedingte Inhalationsallergie gegen andere in der Lebensmittelindustrie verwendete Amylasen aufwiesen, ergaben keinen Hinweis auf ein allergenes Potential des GVO-Erzeugnisses maltogene Amylase in Lebensmitteln.

Die Enzympräparate Novamyl und Maltogenase L erzeugen in den damit verarbeiteten Lebensmitteln keine neuartigen Reaktionsprodukte. Es kann davon ausgegangen werden, dass die verwendeten Formulierungen für die Gesundheit der Konsumentinnen und Konsumenten kein Risiko darstellen.

Die Gesuchstellerin gibt zudem an, dass weltweit in den letzten 15 Jahren seit 1998 allein von dem Erzeugnis Novamyl eine Menge, welche für die Herstellung von über 70 Millionen Tonnen Brot und anderen Backwaren zureichend ist, vertrieben wurde, ohne dass sie nach aktuellem Stand Rückmeldungen über nachteilige Effekte dieser Produkte erhalten hätte.

Einer Bewilligung des GVO-Erzeugnisses maltogene Amylase in Form der Enzympräparate Novamyl bzw. Maltogenase L zur Verwendung als Verarbeitungshilfsstoff in der Verarbeitung von Lebensmitteln kann aufgrund der Bewertung der Lebensmittelsicherheit zugestimmt werden.

## **Ausgangslage**

Die Firma Novozymes France S.A., Nanterre, Frankreich, reichte mit Schreiben vom 26. November 2004 ein Gesuch um Bewilligung des GVO-Erzeugnisses maltogene Amylase als Verarbeitungshilfsstoff für Lebensmittel beim Bundesamt für Gesundheit BAG ein.

Das Enzym maltogene Amylase wurde ursprünglich in *Bacillus stearothermophilus* (heute *Geobacillus stearothermophilus*) Stamm C599 gefunden und wird im geschlossenen System (Fermenter) aus dem gentechnisch veränderten Mikroorganismus *Bacillus subtilis* Stamm BRG-1 gewonnen.

## **Rechtliche Grundlagen und Auftrag**

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. Der Bundesrat bestimmt die Anforderungen und das Verfahren.

Nach Artikel 22 der Lebensmittel- und Gebrauchsgegenständeverordnung (LGV, SR 817.02) bedürfen Lebensmittel, Zusatzstoffe und Verarbeitungshilfsstoffe, die GVO sind, solche enthalten oder daraus gewonnen wurden und die zur Abgabe an die Konsumentinnen und Konsumenten bestimmt sind, der Bewilligung durch das BLV. Die Verordnung des EDI über gentechnisch veränderte Lebensmittel (VGVL, SR 817.022.51) regelt die Anforderungen und das Verfahren zur Erteilung einer Bewilligung im Einzelnen.<sup>2</sup>

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 maltogene Amylase hergestellten Lebensmitteln ausgeschlossen werden kann. Zudem ist das Erzeugnis bezüglich des Täuschungsschutzes zu prüfen.

Das BLV ist die für diese Prüfung zuständige Behörde.<sup>3</sup> Es prüft dieses Gesuch und das beigelegte Dossier und erstellt einen Bericht. Das BLV legt den Bericht dem Bundesamt für Umwelt BAFU, dem Bundesamt für Gesundheit BAG, dem Bundesamt für Landwirtschaft BLW sowie der Eidg. Kommission für biologische Sicherheit EFBS und der Eidg. Ethikkommission für die Biotechnologie im Ausserhumanbereich EKAH vor und entscheidet über die Erteilung einer Bewilligung.

Entscheide ausländischer Behörden werden gemäss Artikel 3 VGVL im Rahmen eines Bewilligungsverfahrens zur Kenntnis genommen und berücksichtigt.

Die Bewilligung wird erteilt, wenn nach dem Stand der Wissenschaft eine Gesundheitsgefährdung ausgeschlossen werden kann und weitere gesetzliche Voraussetzungen erfüllt sind.

Die Bewilligung ist auf zehn Jahre zu befristen.

## **Beurteilungen und Bewilligungen ausländischer Behörden**

Das mit Hilfe des gentechnisch veränderten Produktionsstammes *B. subtilis* BRG-1 fermentativ hergestellte GVO-Erzeugnis maltogene Amylase wurde bereits von den zuständigen Gesundheitsbehörden folgender Staaten zugelassen: Dänemark im Jahre 1992, Frankreich im Jahre 1993, Australien im Jahre 1994 und Kanada im Jahre 2004. In den USA ist das Enzym seit 1990 allgemein als sicher anerkannt (GRAS: generally recognized as safe). In den anderen Staaten der Europäischen Union ist Novamyl ohne Bewilligung verkehrsfähig. Weiter ist das Enzympräparat Novamyl in folgenden Staaten rechtmässig im Verkehr: China, Japan, Mexiko, Neuseeland, Norwegen, Philippinen, Russland, Saudi-Arabien, Südafrika und Türkei.

Weltweit hat keine Behörde jemals einen Bewilligungsantrag für das Enzympräparat Novamyl abgelehnt.

---

<sup>2</sup> Das BLV ist seit dem 1. Januar 2014 die für das Bewilligungsverfahren und die Prüfung der Lebensmittelsicherheit zuständige Behörde. Bis zum 31. Dezember 2013 war dies das Bundesamt für Gesundheit BAG.

<sup>3</sup> Siehe Fussnote 2.

## **Bericht zum Gesuch gemäss Anhang 1 VGVL**

### **1. Allgemeine Angaben**

#### **1.1. Name und Adresse der Gesuchstellerin**

Novozymes A/S  
Krogshoejvej 36  
DK-2880 Bagsvaerd  
Dänemark

Verantwortlicher: Peter Hvass, Senior Science Manager, Regulatory Affairs

#### **1.2. Name und Adresse der Herstellerin des GVO-Erzeugnisses**

Novozymes A/S  
Krogshoejvej 36  
DK-2880 Bagsvaerd  
Dänemark

#### **1.3. Name und Adressen der Laboratorien, die für die Durchführung der nach diesem Anhang erforderlichen Analysen verantwortlich sind**

Qualitätsüberprüfung der Enzympräparate durch:

Novozymes A/S  
Krogshoejvej 36  
DK2880 Bagsvaerd  
Dänemark

Qualitätskoordinator: Mette H. Engholt

#### **1.4. Beschreibung des GVO-Erzeugnisses**

Das GVO-Erzeugnis maltogene Amylase (Glucan-1,4-alpha-Maltohydrolase; EC 3.2.1.133; CAS 16011-47-2) soll als Verarbeitungshilfsstoff in der Lebensmittelherstellung eingesetzt werden. Als exogierendes Enzym katalysiert es die Hydrolyse von 1,4-alpha-glykosidischen Bindungen in Stärke (Amylose, Amylopektin) und ähnlichen Glukosepolymeren. Maltosemoleküle werden sukzessive vom nicht-reduzierenden Ende der Polymerkette abgespalten, bis die Zuckerkette vollständig abgebaut ist oder, im Fall von Amylopektin, bis eine Verzweigung in der Zuckerkette auftritt. Die maltogene Amylase weist aber auch eine Endoglucanase-Aktivität auf (Christophersen *et al.*, 1998).

Die fermentative Herstellung des GVO-Erzeugnisses maltogene Amylase erfolgt mit Hilfe des gentechnisch veränderten Produktionsorganismus *B. subtilis* BRG-1 in einem geschlossenen System (Fermenter) nach den Leitlinien der aktuellen Guten Herstellungspraxis. Nach beendeter Kultivierung wird das Enzym isoliert und aufgereinigt. Das daraus resultierende flüssige Enzymkonzentrat wird durch Zugabe von Natriumchlorid stabilisiert, in die gewünschte Formulierung überführt und standardisiert.

In der Schweiz sind folgende vier Präparate des GVO-Erzeugnisses maltogene Amylase für den Handel vorgesehen: Novamyl 10000 BG, Novamyl 1500 MG, Novamyl Conc BG und Maltogenase L. Die

Präparate unterscheiden sich in der Konzentration des Enzyms. Bei den Novamyl-Präparaten handelt es sich um Granulate, das Präparat Maltogenase L ist flüssig.

### **1.5. Zweckbestimmung allfälliger Folgeprodukte**

Das GVO-Erzeugnis maltogene Amylase soll in der Verarbeitung von Lebensmitteln eingesetzt werden.

In den Ländern, in denen das GVO-Erzeugnis maltogene Amylase bereits in Verkehr ist, werden die drei Formulierungen des Enzympräparates Novamyl (Granulat, hellbraune bis braune Farbe) in der Backwarenindustrie verwendet, um die Retrogradation der Stärke in der Krume zu reduzieren; der Alterungsprozess des Backerzeugnisses wird dadurch verlangsamt.

In der Stärkeindustrie kommt das Enzympräparat Maltogenase L (Flüssigkeit, hellbraune bis dunkelbraune Farbe) alleine oder zusammen mit einem Amylopektin entzweigenden Enzym für die Herstellung von Maltosesirupen aus verflüssigter Stärke zum Einsatz (Diderichsen und Christiansen, 1988). Maltosesirupe weisen eine milde Süskraft, geringe Viskosität in Lösung, geringe Hygroskopizität und eine gute Hitzestabilität auf (Andersen *et al.*, 1987). Sie können in vielen Formulierungen konventionellen Glukosesirup ersetzen (Diderichsen und Christiansen, 1988; Outtrup und Norman, 1984).

### **1.6. Angaben über Lagerung, Lagerungsbedingungen, Haltbarkeit sowie über spezielle Massnahmen im Umgang mit den GVO-Erzeugnissen**

Die Enzympräparate Novamyl 10000 BG, Novamyl 1500 MG, Novamyl Conc BG und Maltogenase L werden in geschlossenen Behältern gelagert und transportiert.

Die empfohlene Lagerungstemperatur beträgt bei Granulaten 0 bis 25°C, beim flüssigen Enzympräparat 0 bis 10°C. Das Produkt sollte je nach Formulierung innerhalb von drei bis zwölf Monaten ab Lieferdatum (je nach Formulierung) verwendet werden. Um die Enzym-Stabilität des Enzyms zu gewährleisten, sollten ungeöffnete Verpackungen trocken und vor Sonnenlicht geschützt gelagert werden.

Der unsachgemässe Umgang mit den Enzympräparaten kann generell die Bildung von Aerosolen oder Stäuben verursachen. Das Einatmen des Enzymstaubs oder eines Aerosols kann eine Sensibilisierung induzieren und bei sensibilisierten Personen allergische Reaktionen auslösen. Bei längerem Hautkontakt kann es zu geringfügigen Irritationen der Haut kommen.

Sowohl das Produktdatenblatt als auch das entsprechende Sicherheitsdatenblatt führen Vorschriften an, die beim Umgang mit den Erzeugnissen zu befolgen sind.

### **1.7. Vorgesehene Etikettierung**

Das GVO-Erzeugnis maltogene Amylase soll als Verarbeitungshilfsstoff eingesetzt werden.

Verarbeitungshilfsstoffe, die GVO-Erzeugnisse sind und als solche abgegeben werden, sind gemäss Artikel 7 Absätze 1 und 2 VGVL mit dem Hinweis „aus gentechnisch verändertem X hergestellt“ oder „aus genetisch verändertem X hergestellt“ zu kennzeichnen. Auf den Hinweis kann nach Artikel 7 Absatz 7bis VGVL verzichtet werden, wenn sie aus gentechnisch veränderten Mikroorganismen gewonnen wurden, von den Organismen abgetrennt, gereinigt und chemisch definierbar sind, und die Herstellung in einem geschlossenen System erfolgte.

Die Herstellung des GVO-Erzeugnisses maltogene Amylase erfolgt in einem geschlossenen System (Fermenter) durch den Mikroorganismus *B. subtilis*. Bei der Aufarbeitung wird das GVO-Erzeugnis maltogene Amylase vom gentechnisch veränderten Produktionsorganismus *B. subtilis* BRG-1 abgetrennt.

Bei den Enzympräparaten Novamyl und Maltogenase L kann deshalb auf eine Kennzeichnung mit dem Hinweis „aus gentechnisch veränderten Mikroorganismen hergestellt“ bzw. „aus genetisch veränderten Mikroorganismen hergestellt“ verzichtet werden.

Die Verwendung von Verarbeitungshilfsstoffen ist auf der Verpackung des Endproduktes nicht auszuweisen. Bezüglich einer Verwendung der maltogenen Amylase ist deshalb keine Angabe auf der Verpackung der damit verarbeiteten Lebensmittel erforderlich.

### 1.8. Angaben über Empfindlichkeit, Spezifität und Zuverlässigkeit der bei der Untersuchung der GVO-Erzeugnisse angewandten Analysemethoden sowie ein Hinweis auf standardisierte und internationale Methoden

Standardisierte Analysemethoden werden eingesetzt, um die Einhaltung der Empfehlungen des Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA, 2013) und des Food Chemicals Codex (FCC, 2004) über Reinheitsspezifikationen für Lebensmittelenzyme aufzuzeigen.

Reinheitsspezifikationen (Standards) für Lebensmittelenzyme beinhalten Grenzwerte für Schwermetalle und kontaminierende Mikroorganismen; auch verlangen sie die Abwesenheit von (Myko-) Toxinen, Antibiotika und Produktionsorganismen (Aberer *et al.*, 2002).

Die Herstellerin überprüft regelmässig folgende Parameter:

Parameter	Anforderung
Enzymaktivität	gemäss Deklaration
Schwermetalle	≤ 30 ppm
Blei	≤ 5 ppm (≤ 5 mg/kg)
Arsen	≤ 3 ppm
Gesamtkeimzahl	< 5000 kbE/g
Coliforme Keime	< 30 kbE/g
enteropathogene <i>E. coli</i>	nicht nachweisbar in 25 g
Salmonellen	nicht nachweisbar in 25 g
antibiotische Aktivität	nicht nachweisbar
Produktionsorganismus	nicht nachweisbar

Die Enzympräparate Novamyl und Maltogenase L entsprechen damit den von JECFA und FCC empfohlenen Reinheitsspezifikationen für Lebensmittelenzyme.

### 1.9. Gegebenenfalls die Bezeichnung des GVO mit dem Erkennungsmarker nach Artikel 8 Absatz 2

Der GVO ist ein Mikroorganismus. Für Mikroorganismen werden keine Erkennungsmarker festgelegt.

## 2. Angaben über die Eigenschaften der Spender- und Empfängerorganismen

### 2.1. Wissenschaftliche Bezeichnung

Spenderorganismen:

*Geobacillus stearothermophilus*

*Bacillus amyloliquefaciens*

*Bacillus thuringiensis*

*Staphylococcus aureus*

*Bacillus amyloliquefaciens* und *Bacillus thuringiensis* dienten lediglich als Spenderorganismen für Steuerungselemente der Expression der codierenden Sequenz für das Erzeugnis maltogene alpha-Amylase.

*Staphylococcus aureus* diente als Spenderorganismus für eine für die Selektion benötigte Sequenz, welche in einem späteren Schritt durch eine Deletion inaktiviert wurde.

Empfängerorganismus:

*Bacillus subtilis*

### 2.2. Taxonomische Daten

Stufe	Taxa		
Domäne	Bakterien	Bakterien	Bakterien
Abteilung	Firmicutes	Firmicutes	Firmicutes
Klasse	Bacilli	Bacilli	Bacilli
Ordnung	Bacillales	Bacillales	Bacillales
Familie	Bacillaceae	Staphylococcaceae	Bacillaceae
Gattung	<i>Bacillus</i>	<i>Staphylococcus</i>	<i>Geobacillus</i>
Art	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> <i>Bacillus thuringiensis</i> <i>Bacillus subtilis</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>

Die Art *Bacillus stearothermophilus* wurde im Jahr 2001 von Nazina *et al.* (2001) der neuen Gattung *Geobacillus* zugeordnet und als *Geobacillus stearothermophilus* reklassifiziert.

### 2.3. Sonstige Namen (Trivialname, Stamm, Cultivar usw.)

Spenderorganismus ist *Geobacillus stearothermophilus* Stamm C599.

Empfängerorganismus ist der *Bacillus subtilis* Stamm A164  $\Delta$ 5, ein Derivat von *B. subtilis* A164 (Stamm ATCC 6051a), dem Typstamm der Spezies *B. subtilis*.

## 2.4. Phänotypische und genetische Marker

Der Spenderorganismus *G. stearothermophilus* C599 ist grampositiv, stäbchenförmig und sporenbildend. Er wird zu den thermophilen Organismen gezählt (Diderichsen und Christiansen, 1988) und produziert eine thermostabile und relativ säurestabile maltogene Amylase, welche sezerniert wird (Outtrup und Norman, 1984).

Der Spenderorganismus wurde bei einem Screening nach Amylase-produzierenden Mikroorganismen aus Bodenproben einer heissen Quelle in Island isoliert (Outtrup und Norman, 1984).

Empfängerorganismus ist das grampositive Bakterium *B. subtilis*, ein aerob wachsender Endosporenbildner, der ubiquitär verbreitet ist. Es kann aus Boden, Wasser und Luft isoliert werden (De Boer und Diderichsen, 1991).

Der Empfängerorganismus *B. subtilis* A164  $\Delta$ 5 ist nicht sporulierend, Protease-defizient sowie Amylase- und Surfactin-negativ. Die Einzelheiten sind dem BLV bekannt.\*

## 2.5. Grad der Verwandtschaft zwischen Spender- und Empfängerorganismus

Sowohl der Spenderorganismus *G. stearothermophilus* C599 als auch der Empfängerorganismus *B. subtilis* A164  $\Delta$ 5 gehören der Familie Bacillaceae an.

## 2.6. Beschreibung der Identifizierungs- und Nachweisverfahren

Spender- und Empfängerorganismus können durch Kultivierung auf spezifischen Medien nachgewiesen werden.

## 2.7. Wahrscheinlichkeit eines Gentransfers in die Darmflora des Menschen

Spender- und Empfängerorganismus sind im GVO-Erzeugnis maltogene Amylase nicht enthalten.

Die Wahrscheinlichkeit eines Gentransfers in die Darmflora des Menschen kann als extrem gering eingestuft werden.

## 2.8. Prüfung der genetischen Stabilität der Organismen sowie der Faktoren, die diese beeinflussen können

### 2.8.1. Beschreibung der pathologischen und physiologischen Eigenschaften

Der Spenderorganismus *G. stearothermophilus* wird als nicht pathogen eingestuft (Ito, 1981; WHO, 1998). *G. stearothermophilus* kann natürlicherweise in Lebensmitteln auftreten (Ito, 1981).

Der Empfängerorganismus *B. subtilis* wird ebenfalls als nicht pathogen eingestuft (EPA, 1997). Der Wildtyp von *B. subtilis* besitzt die Fähigkeit, grössere Mengen an Proteinen zu sezernieren, insbesondere hydrolytische Enzyme wie Amylasen und Proteasen (De Boer und Diderichsen, 1991; Simonen und Palva, 1993). Der Empfängerorganismus *B. subtilis* A164  $\Delta$ 5 ist jedoch nicht sporulierend, synthetisiert keine endogene Amylase mehr und ist Protease- wie auch Surfactin-defizient.

## **2.8.2. Risikoeinstufung hinsichtlich des Schutzes der menschlichen Gesundheit**

Nach den aktuellen Richtlinien des BAFU (2011) über die „Einstufung von Organismen. Modul 1: Bakterien“ werden sowohl der Spenderorganismus *G. stearothermophilus* als auch der Empfängerorganismus *B. subtilis* der Risikogruppe 1 zugeordnet. Organismen der Risikogruppe 1 stellen nach dem Stand der Wissenschaft kein Risiko für die menschliche Gesundheit und die Umwelt dar.

Das wissenschaftliche Gutachten des Gremiums für biologische Gefahren (Panel on Biological Hazards, BIOHAZ) der Europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit (EFSA) aus dem Jahre 2012 bestätigt die Qualifizierte Sicherheitsannahme (Qualified Presumption of Safety, QPS), von *G. stearothermophilus* und *B. subtilis* mit der Qualifikation „keine toxigene Aktivität“ (EFSA, 2012). Diese Qualifizierungsanforderung schliesst sowohl Toxine, die sich in Lebensmitteln bilden könnten, als auch Enterotoxine, die im Darmtrakt gebildet werden, ein.

Sowohl *G. stearothermophilus* als auch *B. subtilis* stellen somit nach dem aktuellen Stand der Wissenschaft kein Risiko für die menschliche Gesundheit dar.

## **2.8.3. Angaben zur Pathogenität, Infektiosität und Toxizität sowie über bekannte Virulenzfaktoren (plasmid- oder genomkodiert), bekannte Allergene, Träger von Pathogenen sowie Plasmide und deren Wirtsspektrum**

Der Spenderorganismus *G. stearothermophilus* stellt nach dem Stand der Wissenschaft kein Risiko für die menschliche Gesundheit dar.

Die Virulenz von *B. subtilis* ist laut einer Risikobeurteilung der amerikanischen Umweltbehörde (U.S. Environmental Protection Agency EPA) gering, und die Art *B. subtilis* wird als nicht pathogen eingestuft. Eine Infektion durch *B. subtilis* erfolge beim Menschen nur, wenn die Anzahl der aufgenommenen Mikroorganismen sehr hoch oder das menschliche Immunsystem sehr geschwächt sei (EPA, 1997).

Pedersen *et al.* (2002) evaluierten in einer Studie das toxigene Potential verschiedener Stämme der Arten *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens* und *B. subtilis*, welche von Novozymes A/S für die Herstellung von industriellen Enzymen eingesetzt werden. Die Studie zeigte, dass die von Novozymes A/S für die Produktion von Enzymen verwendeten Stämme kein zytotoxisches Potential besaßen. Namentlich reagierten sie nicht mit Antikörpern gegen von *B. cereus* gebildete Enterotoxine.

## **2.8.4. Angaben über eingeführte Antibiotikaresistenzen und eine Abschätzung der potenziellen Nutzung der betreffenden Antibiotika zur Prophylaxe und zur Therapie von Krankheiten beim Menschen**

Der Empfängerorganismus *B. subtilis* A164  $\Delta$ 5 enthält keine eingeführten Antibiotikaresistenzgene.

## **2.9. Zusammenfassung der früheren genetischen Veränderungen oder Hinweis auf früher vorgelegte Dossiers**

Im Genom des Elternstammes *B. subtilis* A164 wurden fünf Gene durch Deletionen inaktiviert. Der resultierende Empfängerorganismus *B. subtilis* A164  $\Delta$ 5 ist nicht mehr sporulierend, Protease-defizient sowie Amylase- und Surfactin-negativ. Die Einzelheiten sind dem BLV bekannt.\*

## **2.10. Hinweis auf die Verarbeitungsart (gekocht oder roh) der Spender- und Empfängerorganismen, wenn diese vor der gentechnischen Veränderung schon als Lebensmittel verwendet werden, sowie Identifikation von möglichen toxischen Stoffen, die bei entsprechender Verarbeitung zerstört werden oder neu entstehen können**

*G. stearothermophilus* wird in Lebensmitteln nicht verwendet.

*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.

## **3. Angaben über die Eigenschaften und die Detektion der verwendeten Vektoren**

### **3.1. Art und Herkunft der Vektoren**

Der für die Transformation verwendete Vektor ist vom Plasmid pBR322 abgeleitet.

Die DNA-Sequenz codierend für die maltogene Amylase stammt aus *G. stearothermophilus* C599.

Die Steuerungselemente der Expression der codierenden Sequenz für das Erzeugnis maltogene Amylase stammen aus *Bacillus amyloliquefaciens* und *Bacillus thuringiensis*. Eine für die Selektion des Produktionsstammes benötigte Sequenz stammt aus *Staphylococcus aureus*. Diese Sequenz wurde in einem späteren Schritt durch eine Deletion inaktiviert. Die Einzelheiten sind dem BLV bekannt. \*

### **3.2. Wahrscheinlichkeit eines Gentransfers in die Darmflora des Menschen und Methoden zu dessen Bestimmung**

Die Enzympräparate sind vom Produktionsorganismus abgetrennt. Ein Gentransfer von Organismus zu Organismus ist deshalb ausgeschlossen.

Drei Chargen des aufgereinigten flüssigen Enzymkonzentrates, mit ABFR 282, ABKD 2345 und ABKD 2349 bezeichnet, wurden mittels PCR auf die Anwesenheit von genomischer DNA untersucht. Dabei konnte, bei einer Nachweisgrenze von 1 ng genomischer DNA bzw. umgerechnet 1 pg rekombinanter DNA pro Gramm Enzymkonzentrat, kein Erbmaterial nachgewiesen werden.

Zudem ist in einem Teig enthaltene DNA dem Abbau durch den Backvorgang sowie durch die menschliche Verdauung ausgesetzt. Das Risiko eines horizontalen Gentransfers rekombinanter DNA auf die menschliche Darmflora, sofern überhaupt vorhanden, kann somit als extrem gering angesehen werden (Rizzi *et al.*, 2012).

Der Produktionsstamm *B. subtilis* BRG-1 enthält keine gentechnisch übertragenen Antibiotikaresistenz-Markergene mehr. Ein Gentransfer solcher Sequenzen auf die menschliche Darmflora ist deshalb ausgeschlossen.

### **3.3. Informationen darüber, ob sich zusätzliche Sequenzen oder Gene auf dem Plasmid befinden, die exprimiert werden können**

Der für die Transformation eingesetzte Vektor enthält Gene, welche Resistenzen gegen drei Antibiotika vermitteln.

Zwei der Gene befinden sich nicht in der Expressionskassette und wurden somit auch nicht in das Empfänger genom von *B. subtilis* A164  $\Delta$ 5 integriert.

Das dritte Gen wurde integriert, jedoch in einem weiteren Schritt mit Hilfe von gentechnischen Methoden durch eine deletierte Genversion ersetzt. Die Einzelheiten sind dem BLV bekannt.\*

Der Produktionsstamm *B. subtilis* BRG-1 enthält somit keine gentechnisch eingefügten Antibiotikaresistenzgene mehr.

### **3.4. Abschätzung der Gesundheitsrisiken der exprimierten Proteine gegenüber dem Menschen**

Bei Backwaren liegt das Enzym nach dem Verarbeitungsprozess inaktiviert vor. Bei der Herstellung von Maltosesirup wird das Enzym während des Aufreinigungsprozesses des Sirups inaktiviert und entfernt.

Die Resultate der durchgeführten Sicherheitsstudien ergaben keinen Hinweis auf toxische oder allergene Eigenschaften des GVO-Erzeugnisses maltogene Amylase (siehe Abschnitt 4.4.1).

### **3.5. Beschreibung der Identifizierungs- und Nachweisverfahren**

Es steht kein validiertes Verfahren für den Nachweis der rekombinanten DNA zur Verfügung.

## **4. Angaben über den gentechnisch veränderten Organismus**

### **4.1. Angaben über die genetische Veränderung**

#### **4.1.1. Beschreibung des eingeführten Genabschnittes und der Konstruktion des Vektors oder der Deletion im Erbmateriale**

Der rekombinante DNA-Abschnitt, welcher durch homologe Rekombination ins Genom des Empfängerorganismus *B. subtilis* A164  $\Delta$ 5 integriert wurde, ist dem BLV bekannt.\*

Der gentechnisch veränderte Produktionsorganismus *B. subtilis* BRG-1 enthält keinen gentechnisch übertragenen Replikationsursprung. Das Insert kann weder durch Konjugation auf einen anderen Mikroorganismus übertragen werden noch kann es autonom replizieren.

Weiter ist *B. subtilis* BRG-1 aufgrund von Gendeletionen nicht-sporulierend, Protease-defizient, Amylase- und Surfactin-negativ sowie frei von Antibiotikaresistenz-Markergenen. Aufgrund seiner Proteasedefizienz kann der Produktionsstamm BRG-1 die sekretierten heterologen Proteine im Fermentationsmedium nicht abbauen.

#### **4.1.2. Sequenzidentität mit ursprünglichem Konstrukt und Lokalisation des Einbaus oder der Deletionen der Nukleinsäuresequenzen**

Die Expressionskassette wurde durch eine homologe Rekombination in einen vorherbestimmten und definierten Locus von *B. subtilis* A164  $\Delta$ 5 transferiert.

Das GVO-Erzeugnis maltogene Amylase weist im Vergleich zum nativen Protein eine Aminosäuresubstitution auf. Die Einzelheiten sind dem BLV bekannt.\*

Diese Aminosäuresubstitution hat jedoch keine Auswirkungen auf die biochemischen Eigenschaften des rekombinanten Enzyms. Sie entsprechen denjenigen des nativen Enzyms.

## 4.2. Angaben über das endgültige GVO-Erzeugnis

### *Funktion und Eigenschaften des GVO-Erzeugnisses maltogene Amylase*

Das GVO-Erzeugnis maltogene Amylase (Glucan-1,4-alpha-Maltohydrolase; EC 3.2.1.133; CAS 16011-47-2) ist ein exo-agierendes Enzym, welches die Hydrolyse von 1,4-alpha-glykosidischen Bindungen in Stärke (Amylose, Amylopektin) und ähnlichen Glukosepolymeren katalysiert. Maltosemoleküle werden sukzessive vom nicht-reduzierenden Ende der Polymerkette abgespalten, bis die Zuckerkette vollständig abgebaut ist oder, im Fall von Amylopektin, bis eine Verzweigung in der Zuckerkette auftritt.

Das GVO-Erzeugnis maltogene Amylase soll in der Lebensmittelproduktion als Verarbeitungshilfsstoff eingesetzt werden. In den Ländern, in denen das Enzym in Verkehr ist, verwendet es die Backwarenindustrie, um die Retrogradation der Stärke in der Krume zu reduzieren; das Altbackenwerden des Brotes bzw. Gebäcks wird dadurch verlangsamt. In der Stärkeindustrie kommt das Enzym alleine oder zusammen mit einem Amylopektin entzweigenden Enzym für die Herstellung von Hoch-Maltose-sirupen aus verflüssigter Stärke zum Einsatz (Diderichsen und Christiansen, 1988).

Die DNA-Sequenz codierend für maltogene Amylase ist 2160 bp lang und wurde aus dem thermophilen *G. stearothermophilus* C599 isoliert (Outtrup und Norman, 1984).

Das unreife Genprodukt zählt 719 Aminosäuren und enthält am N-Terminus ein Signalpeptid mit einer Länge von 33 Aminosäuren, das für grampositive Bakterien typisch ist und abgespalten wird (Diderichsen und Christiansen, 1988).

Der Produktionsorganismus *B. subtilis* BRG-1 sezerniert das reife GVO-Erzeugnis maltogene Amylase mit einer Länge von 686 Aminosäuren ins Fermentationsmedium.

Die biochemischen Eigenschaften des GVO-Erzeugnisses maltogene Amylase entsprechen denjenigen des nativen Enzyms von *G. stearothermophilus* C599: die maltogene Amylase weist einen pI-Wert von 8.5 auf und ist bei einem pH-Wert zwischen 4.5 und 5.5 und einem Temperaturbereich von 60 bis 70°C stabil. Die Aminosäuresubstitution hat keine Auswirkungen auf die biochemischen Eigenschaften des rekombinanten Enzyms.

Das theoretische Molekulargewicht des reifen Enzyms beträgt 75.2 kDa. Ein Signal in Form einer dominanten Proteinbande, welche diesem Gewicht entspricht, konnte durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese gezeigt werden (Derde *et al.*, 2012).

### *Herstellungsprozess*

Die Herstellung des GVO-Erzeugnisses maltogene Amylase erfolgt durch Submersfermentation im Zulaufverfahren in einem geschlossenen System (Fermenter) nach den Leitlinien der aktuellen Guten Herstellungspraxis.

Das für die Fermentation verwendete Nährmedium enthält eine ausgewogene Menge an Kohlenstoff- und Stickstoffverbindungen sowie Mineralstoffe und Vitamine. Für die Nährlösung im Fermentationsprozess werden nur pflanzliche Proteine als Rohstoffe eingesetzt. Die Komponenten des Nährmediums (Rohmaterialien sowie Zusatzstoffe und Stabilisatoren) sind von Lebensmittelqualität.

Nach beendeter Kultivierung wird das extrazelluläre Enzym isoliert und aufgereinigt. Die Aufarbeitung umfasst mehrere Verfahrensschritte: Abtrennung von Zellmasse und unlöslichen Bestandteilen von

der Kulturlösung mittels Vakuumfiltration oder Zentrifugation; Aufkonzentrierung der geklärten Kulturlösung durch Ultrafiltration bzw. Eindampfen; Entfernung der Produktionsorganismen und anderen festen Bestandteilen aus der Kulturlösung mittels Entkeimungsfiltration. Das resultierende flüssige Enzymkonzentrat wird durch Zugabe von Natriumchlorid stabilisiert und in die gewünschte standardisierte Formulierung überführt.

In der Schweiz sollen folgende vier Enzymformulierungen des GVO-Erzeugnisses maltogene Amylase in den Verkauf gelangen: Novamyl 10000 BG, Novamyl 1500 MG, Novamyl Conc BG und Maltogenase L. Diese vier Enzympräparate werden ausschliesslich an Fachpersonen in der Lebensmittel verarbeitenden Industrie, namentlich der Stärke- und Backwarenindustrie sowie Bäckereien, abgegeben. Novozymes A/S unterhält für ihre Enzymproduktion ein ISO 9001:2000-zertifiziertes Qualitätsmanagementsystem.

#### *Reinheit des GVO-Erzeugnisses maltogene Amylase*

Eine Charge PPY 7087 des aufgereinigten flüssigen Enzymkonzentrates, bestehend aus drei „sub batches“, wurde chemisch analysiert. Die Charge wurde nicht weiter bearbeitet, d.h. weder stabilisiert noch standardisiert. Die Analyse ergab folgende Zusammensetzung:

Parameter	Wert
Enzymaktivität	8600 MANU <sup>4</sup> /g
Organische feste Bestandteile (Total Organic Solids, TOS)	9.1 %
Wasser	86.1 %
Asche	4.8 %
Kohlenhydrate (Anthon)	4.5 g/kg
Kohlenhydrate (Tryptophan)	6.5 g/kg
N <sub>tot</sub>	0.77 %
Schwermetalle (Ag, Bi, Cd, Cu, Hg, Ni, Pb, Sn einschliesslich die Halbmetalle As und Sb)	4.2 ppm
Pb	< 1 ppm
As	< 0.1 ppm
Cd	< 0.05 ppm
Hg	< 0.03 ppm

Der Gehalt an organischen Feststoffen (Total Organic Solids; TOS<sup>5</sup>) betrug 9.1 %. Zu den organischen Feststoffen zählen neben dem GVO-Erzeugnis maltogene Amylase auch die Nebenprodukte wie andere Proteine und Kohlenhydrate, die aus dem Fermentationsprozess stammen. Im analysierten Enzymbatch machte das GVO-Erzeugnis maltogene Amylase ungefähr 13 Gewichtsprozent der TOS aus.

Die Enzympräparate Novamyl und Maltogenase L entsprechen den von JECFA und FCC empfohlenen Reinheitsspezifikationen für Lebensmittelenzyme. Sowohl die Produktspezifikationen im Produktdatenblatt als auch die Resultate der entsprechenden Analysezertifikate bestätigen die Konformität

<sup>4</sup> Eine MANU (Maltogenic Amylase Novo Unit) ist die erforderliche Enzymmenge, um unter bestimmten Bedingungen die Hydrolyse von einem µmol Maltotriose pro Minute zu katalysieren.

<sup>5</sup> Berechnung des TOS-Wertes in Prozent: TOS (%) = 100 – A – W – D; (A = % Asche; W = % Wasser; D = % Verdünnungsmittel und/oder andere Zusatz- oder Inhaltsstoffe).

der verschiedenen Enzymformulierungen des GVO-Erzeugnisses maltogene Amylase mit diesen internationalen Standards.

#### **4.2.1. Beschreibung der neuen genetischen Merkmale und der phänotypischen Eigenschaften, insbesondere jeglicher neuen genetischen Merkmale und Eigenschaften, die exprimiert oder nicht mehr exprimiert werden können**

Die Beschreibung ist auf das GVO-Erzeugnis maltogene Amylase nicht anwendbar.

#### **4.2.2. Stabilität der veränderten genetischen Merkmale und des Organismus und zu deren Bestimmung verwendete Methoden**

Der rekombinante DNA-Abschnitt wurde ins Genom des Empfängerorganismus *B. subtilis* A164  $\Delta$ 5 integriert. Das Insert enthält keinen funktionell aktiven Replikationsursprung, auch kann es nicht über Konjugation in andere Organismen transferiert werden.

Der Produktionsstamm *B. subtilis* BRG-1 wurde unter industriellen Fermentationsbedingungen auf seine genetische Stabilität hin überprüft. Die rekombinanten Bakterienzellen blieben während ihrer Produktionsphase stabil. Am Ende des Fermentationsprozesses konnte die Aktivität der maltogenen Amylase mit dem Starch Azure-Assay (Bildung von Hydrolysehöfen auf Platten) nachgewiesen werden.

Weiter zeigten Southern-Blot-Analysen die Anwesenheit des Transgens in *B. subtilis* BRG-1 am Ende des Fermentationsprozesses.

Es ergaben sich damit keine Hinweise auf eine genetische Instabilität des Produktionsstammes.

#### **4.3. Anteil und Höhe der Expression des neuen genetischen Materials (auf Stufe Nukleinsäure, Protein oder anderer entstandener Moleküle)**

Das GVO-Erzeugnis maltogene Amylase machte im Enzymkonzentrat-Batch PPY 7087 ungefähr 13 Gewichtsprozent der organischen Feststoffe aus.

#### **4.4. Gesundheitliche Erwägungen:**

##### **4.4.1. Beurteilung der toxischen und allergenen Auswirkungen der GVO-Erzeugnisse und ihrer Stoffwechselprodukte**

Der Empfängerorganismus *B. subtilis* gilt als sicherer Produktionsorganismus für native Enzyme. (Beckhorn *et al.*, 1965; WHO, 1972; De Boer und Diderichsen, 1991; EPA, 1997; Olempska-Beer *et al.*, 2006). Die Sicherheit diverser rekombinanter Proteine aus *B. subtilis* ist ebenfalls dokumentiert. *B. subtilis* wird hauptsächlich für die industrielle Herstellung von alpha-Amylasen und Proteasen eingesetzt (Kroschwitz, 1994; Olempska-Beer *et al.*, 2006).

##### *Toxische Auswirkungen des GVO-Erzeugnisses maltogene Amylase (toxicity assessment)*

Das GVO-Erzeugnis maltogene Amylase wurde drei toxikologischen Prüfungen (13-Wochen-Fütterungsstudie, Mutagenitäts- und Chromosomentest) unterzogen.

Für die Experimente wurde jeweils der flüssige Enzymkonzentrat-Batch PPY 7087 verwendet.

### *13-Wochen-Fütterungsstudie*

Die 13-Wochen-Fütterungsstudie (13-week oral (gavage) study) an SPF-Sprague-Dawley-Ratten wurde nach der OECD-Richtlinie 408 (OECD, 1998) durchgeführt. Der Versuch wurde von der Firma Scantox (Lille Skensved, Dänemark) durchgeführt.

Der Enzymbatch PPY 7087 wurde den 80 Versuchstieren (40 männliche und 40 weibliche Ratten) in unterschiedlicher Verdünnung in Wasser zu einer Dosis von 10 ml pro kg Körpergewicht oral verabreicht. Die Dosierung des Enzymbatches PPY 7087 betrug 96.8, 319.5 und 968.2 mg TOS pro kg Körpergewicht und Tag (bzw. 10, 33 und 100 % Enzymbatch PPY 7087). Als Kontrolle diente Wasser. Jede Dosis wurde an je 10 männlichen und weiblichen Ratten geprüft.

Folgende Parameter wurden untersucht:

- klinische Symptome
- Motorik und Verhalten
- Morbidität/Mortalität
- Körpergewicht
- Futteraufnahme
- Ophthalmoskopie (Augenspiegelung)
- Klinische Pathologie: Blutprobe in Woche 14 (Ende des Versuches)
- Urinstatus
- Nekropsie
- Organgewichte
- Histopathologie

Die orale Aufnahme von maltogener Amylase wurde gut vertragen. Toxische Auswirkungen auf die Versuchstiere wurden nicht festgestellt.

Bei einem weiblichen Tier aus der Kontrollgruppe wurden an einem Auge Ausfluss und Blutspuren beobachtet. Weiter wiesen einige Tiere oberflächliche Hornhauttrübungen, leichte zentrale Linsentrübungen oder einen Hornhautriss am Auge auf. Solche Befunde an den Augen von Ratten sind normal. Bei einem weiblichen Tier aus der Dosisgruppe 96.8 mg TOS pro kg Körpergewicht und Tag wurde ab Tag 81 auf der linken Seite des Abdomens eine subkutaner Knoten beobachtet. Nach der Tötung des Tieres wurde eine weiterer subkutaner Knoten beobachtet. Die Knoten wurden als Adenokarzinome identifiziert. Solche Befunde sind bei Ratten dieses Stammes gelegentlich zu verzeichnen. Keiner der Befunde wurde mit dem Versuch in Verbindung gebracht.

Bei den weiblichen Tieren bei den Verfahren 96.8 und 319.5 mg TOS pro kg Körpergewicht und Tag war im Vergleich zur weiblichen Kontrollgruppe die durchschnittliche Gesamtmenge an aufgenommenem Futter erhöht. Auch das durchschnittliche Körpergewicht der weiblichen Tiere bei den Verfahren 96.8, 319.5 und 968.2 mg TOS pro kg Körpergewicht und Tag war im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöht. Der Gewichtsunterschied der Gruppen stand jedoch nicht im Verhältnis zur verabreichten Dosis. Am Ende des Versuches war das durchschnittliche Körpergewicht der verschiedenen Gruppen nicht signifikant verschieden. Bei den männlichen Tieren ergab sich bezüglich der durchschnittlichen Gesamtmenge an aufgenommenem Futter und des Körpergewichts zu keinem Zeitpunkt des Versuches ein signifikanter Unterschied zwischen den Verfahren.

Die Blutuntersuchungen ergaben, dass der durchschnittliche Gehalt an Fibrinogen bei den behandelten weiblichen Gruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöht war, aber nicht im Verhältnis zur verabreichten Dosis. Die relative Neutrophilenzahl war bei den männlichen und weiblichen Tieren beim Verfahren 968.2 mg TOS pro kg Körpergewicht und Tag im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöht. Ebenso war die absolute Neutrophilenzahl der männlichen Tiere beim Verfahren 968.2 mg TOS pro kg Körpergewicht und Tag und der weiblichen Tiere beim Verfahren 319.5 mg TOS pro kg Körpergewicht

und Tag im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöht. Die absolute Neutrophilenzahl zwischen den Verfahren stand jedoch nicht im Verhältnis zur verabreichten Dosis. Auch war keine Zunahme der Gesamtzahl an Leukozyten zu verzeichnen. Die Befunde der hämatologischen Untersuchungen wurden nicht mit den Verfahren in Verbindung gebracht.

Bezüglich der Morphologie der Epithelzellen und der Anzahl der Leukozyten im Urin wurden zwischen den einzelnen Verfahren statistisch signifikante Unterschiede beobachtet. Diese Unterschiede standen jedoch in keiner Verbindung zur verabreichten Dosis.

Das durchschnittliche relative Nierengewicht (bezogen auf das Körpergewicht) der männlichen Tiere und das durchschnittliche absolute Nierengewicht der weiblichen Tiere waren beim Verfahren 968.2 mg TOS pro kg Körpergewicht und Tag im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe erhöht. Diese erhöhten Nierengewichte lagen aber im Bereich der Erfahrungswerte früherer toxikologischer Studien. Die Nieren wiesen auch keine pathologischen oder histopathologischen Befunde auf.

Die Resultate der Verfahren zeigten somit keine biologisch relevanten Unterschiede auf. Zwischen den behandelten Tieren und den Kontrollgruppen wurden in Bezug auf klinische Symptome, Körpergewicht, hämatologische Parameter und Blutwerte, Urinanalyse sowie Organgewichte und histologische Untersuchungen keine Unterschiede beobachtet, die mit dem Versuch in Verbindung gebracht werden konnten.

Damit entspricht die höchste in der 13-Wochen-Fütterungsstudie an Ratten getestete Dosis von 968.2 mg TOS pro kg Körpergewicht und Tag der Dosis ohne beobachtete schädigende Wirkung (No Observed Adverse Effect Level, NOAEL).

#### *Ames-Test (Rückmutationstest)*

Der Ames-Test wurde gemäss der OECD-Richtlinie 471 (OECD, 1997) durchgeführt.

Für die Untersuchung wurden Teststämme von *Salmonella typhimurium* (TA1535, TA100, TA1537, TA98) und *Escherichia coli* (WP2uvrA) eingesetzt, um eine mutagene Aktivität des Enzymbatches PPY 7087 (mit und ohne metabolische Aktivierung durch den S9-Mix aus Rattenleber) zu prüfen.

Der Rückmutationstest ergab keinen Hinweis auf mutagene Komponenten im Enzymbatch PPY 7087.

#### *In vitro „chromosome aberration assay“ (In vitro Chromosomenaberrationstest)*

Der Versuch wurde nach der OECD-Richtlinie 473 (OECD, 1997) und einer Richtlinie der International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH, 1995) durchgeführt.

Ein genotoxischer Effekt von Enzymbatch PPY 7087 (mit und ohne metabolischer Aktivierung durch den S9-Mix aus Rattenleber) auf menschliche periphere Blutlymphozyten wurde geprüft. Die Analyse der menschlichen peripheren Blutlymphozyten zeigten auch bei der höchsten Dosierung von 5000 µg PPY 7087 pro ml Testmaterial keine Veränderungen (Aberrationen) in den Chromosomen.

Die Resultate der toxikologischen Untersuchungen mit dem Enzymbatch PPY 7087 ergaben somit keinen Hinweis auf toxische oder genotoxische Effekte.

#### *Untersuchung möglicher Sequenzhomologien zwischen dem GVO-Erzeugnis maltogene Amylase und bekannten Toxinen*

Untersuchungen bezüglich Homologien der Aminosäuresequenz der maltogenen alpha-Amylase aus *G. stearothermophilus* und den Sequenzen in den Proteindatenbanken Swiss-prot und Swiss-new,

welche in ihrem Beschrieb das Wort „toxin“ enthalten, ergaben keinen Hinweis auf relevante Homologien zu bekannten Toxinen. Auf eine Prüfung der Aminosäuresequenz des GVO-Erzeugnisses maltogene Amylase aus *B. subtilis* wurde angesichts des minimalen Unterschiedes (Substitution einer einzigen Aminosäure) verzichtet.

#### *Allergenes Potential des GVO-Erzeugnisses maltogene Amylase*

##### *In silico Analyse bezüglich Homologie in einem Abschnitt von 6 bis 8 Aminosäuren:*

Untersuchungen der Homologie der Aminosäuresequenz der maltogenen alpha-Amylase aus *G. stearothermophilus* und den Proteinsequenzen aus den Proteindatenbanken Swiss-prot und Swiss-new, welche in ihrem Beschrieb das Wort „allergen“ enthalten, ergaben keinen Hinweis auf relevante Sequenzhomologien zu bekannten Allergenen. Die Datenbanken Swiss-prot und Swiss-new wurden auf homologe Aminosäuresequenzen mit einer Länge von vier bis acht Aminosäureresten abgesucht. Homologien mit einer Länge von 7 oder 8 Aminosäuren wurden dabei nicht gefunden, bei 6 Aminosäuren ergaben sich lediglich 3 Treffer.

Mit Hilfe der Allergendatenbank Allermatch wurde eine weitere Suche nach homologen Abschnitten der Primärsequenz der maltogenen Amylase aus *G. stearothermophilus* von 6-8 Aminosäuren mit Proteinen, die bekanntermassen allergische Reaktionen verursachen können, durchgeführt.

Die Suchen nach homologen Sequenzen mit Längen von 8 bzw. 7 Aminosäuren ergaben keine Treffer. Bei der Suche nach Homologien mit einer Länge von 6 Aminosäuren ergaben sich fünf Übereinstimmungen. Zwei davon betreffen die alpha-Amylase Asp o 21 aus *Aspergillus oryzae*. Weitere Homologien betreffen das Allergen Asp f 7 aus *Aspergillus fumigatus* sowie Proteine aus Jujube (*Ziziphus mauritiana*, Fam. Rhamnaceae), der Biene und der Weinbergschnecke.

Die homologen Hexamere wurden in einer Suche in der Datenbank Immune Epitope Database nach Homologien zu Epitopen, die bekanntermassen Reaktionen des Immunsystems bewirken können, verwendet. Es wurden Sequenzen von 12 Aminosäuren Länge aus der maltogenen Amylase mit dem betreffenden Hexamer im Zentrum verwendet. Die Suche ergab keine Übereinstimmungen.

Zudem ist die Wahrscheinlichkeit von falsch positiven Resultaten bei der Suche nach Homologien von 6 Aminosäuren Länge gegenüber der Suche nach Homologien von 8 Aminosäuren Länge erhöht, während schon eine Homologie von 8 Aminosäuren Länge als konservatives Kriterium bewertet wird (Hileman *et al.*, 2002; Verma *et al.*, 2011).

Die Suche nach homologen Abschnitten ergab somit keine Hinweise auf eine mögliche Allergenität der maltogenen Amylase aus *G. stearothermophilus*.

Die Möglichkeit, dass durch die Aminosäuresubstitution in der maltogenen Amylase aus *B. subtilis* neue Homologien zu bekannten Allergenen entstehen könnten, wurde mit Hilfe der Allergendatenbank Allermatch untersucht. Es wurde der betreffende Abschnitt des Proteins untersucht. In diesem Abschnitt hatte die Suche nach Homologien von 6-8 Aminosäuren keine Treffer ergeben. Es ergaben sich durch die Substitution lediglich neue Treffer von 4 Aminosäuren.

Die Substitution führt also nicht zur Bildung neuer Aminosäuresequenzen, denen ein allergenes Potential zugeschrieben werden könnte.

Die Suche nach Homologien in kurzen Abschnitten der maltogenen Amylase aus *B. subtilis* ergab somit keine Resultate, die auf eine mögliche Allergenität hinweisen würden.

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

In einem weiteren Schritt wurde Abschnitte von 80 Aminosäuren der Sequenz der maltogenen Amylase nach Übereinstimmungen von mindestens 35 % mit bekannten Allergenen untersucht. Der Ver-

gleich erfolgte entsprechend der Empfehlung der EFSA zur Beurteilung der Allergenität von gentechnisch veränderten Pflanzen und Mikroorganismen sowie daraus hergestellten Lebens- und Futtermitteln (EFSA, 2010).

Die Aminosäuresequenz des GVO-Erzeugnisses maltogene Amylase wurde auf homologe Sequenzen zu Einträgen der Allergen-Datenbanken allergenonline.org und allergen.org durchsucht.

Dafür wurde die Aminosäuresequenz des GVO-Erzeugnisses in 80 Aminosäuren lange überlappende Abschnitte unterteilt (80 amino acid window search). Die Sequenzabschnitte wurden mit den Einträgen der Datenbank allergenonline.org verglichen und auf eine Übereinstimmung von mindestens 35 % überprüft. Die Sequenzanalyse ergab Homologien zu einem einzigen Allergen, der alpha-Amylase Asp o 21 aus *Aspergillus oryzae*. Asp o 21 wird zu den sogenannten Berufsallergenen gezählt.

In der zweiten Sequenzanalyse erfolgte die Suche in der Datenbank allergenonline.org mit einem sogenannten „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 einen Treffer für Asp o 21.

Die Suche in der Datenbank allergen.org, mit und ohne Scaling, ergab einen Treffer für Asp o 21 und einen weiteren Treffer für die Protease Asp f 13 aus *Aspergillus fumigatus*.

*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 maltogene Amylase und den Einträgen der Allergen-Datenbanken „allergenonline.org“ und „allergen.org“ überprüft, die sogenannte „overall identity“. Die Überprüfung ergab eine Sequenzübereinstimmung von 21.3 % zwischen der gesamten Aminosäuresequenz des GVO-Erzeugnisses maltogene Amylase und Asp o 21. Die Sequenzübereinstimmung zwischen der *Aspergillus fumigatus* Protease Asp f 13 und dem GVO-Erzeugnis maltogene Amylase beträgt nur 12.7 %. Diese Homologien können als unbedenklich bewertet werden.

*Befunde in vivo:*

Da relevante Sequenzhomologien zur allergenen alpha-Amylase Asp o 21 aus *Aspergillus oryzae* bestehen, wurden auch Erkenntnisse bezüglich Lebensmittelallergien mit alpha-Amylasen aus *Aspergillus oryzae* in die Bewertung einbezogen.

Medizinische Studien weisen darauf hin, dass Personen, die von Berufs wegen bereits gegen Enzyme sensibilisiert sind, auf alpha-Amylase aus *Aspergillus oryzae* allergisch reagieren können (Baur und Czuppon, 1995; Kanny und Moneret-Vautrin, 1995; Losada *et al.*, 1992). Ein Beschäftigter aus der Pharmaindustrie, der aufgrund seiner Arbeit Stäuben der alpha-Amylase von *Aspergillus oryzae* ausgesetzt war, zeigte nach der Einnahme dieser alpha-Amylase in Kapselform allergische Reaktionen (Losada *et al.*, 1992). Weiter sind drei Fälle beschrieben, bei denen der Verzehr von Brot, das alpha-Amylase aus *Aspergillus oryzae* enthielt, allergische Reaktionen auslöste (Baur und Czuppon, 1995; Kanny und Moneret-Vautrin, 1995; Moreno-Ancillo *et al.*, 2004). Zwei der drei Personen waren in Bäckereien tätig (Baur und Czuppon, 1995; Kanny und Moneret-Vautrin, 1995). Bei der dritten Person handelte es sich um einen Landwirt, der zuvor nie in einer Bäckerei oder in der Pharmaindustrie gearbeitet hatte (Moreno-Ancillo *et al.*, 2004).

Poulsen (2004) erwähnt in einer Übersichtsarbeit Ergebnisse einer Studie, in der das konventionelle Enzympräparat Fungamyl, das eine alpha-Amylase von *Aspergillus oryzae* (Markenname Fungamyl®) enthält und seit den 1960er Jahren auf dem Markt ist, untersucht wurde. Hierfür wurden 18 Patienten mit einer Inhalationsallergie auf alpha-Amylase aus *Aspergillus oryzae* einer doppelblinden, placebo-kontrollierten Provokationsstudie unterzogen. Testmaterial war Brot, das mit einer überhöhten Dosis des Enzyms zubereitet worden war. Positive Reaktionen der Probanden konnten in Einzelfällen beobachtet werden.

bachtet werden, waren aber nicht reproduzierbar. Zudem zeigten etliche Probanden Reaktionen auf Brot, welches ohne Fungamyl zubereitet worden war. Damit liess sich auch bei Patienten mit einer Inhalationsallergie gegenüber diesem Enzym eine entsprechende Lebensmittelallergie nicht zeigen. Weiter wurden die Seren von 1000 zufällig ausgewählten Personen auf ihre IgE-Sensibilisierung gegen Fungamyl überprüft (Poulsen, 2004). Eine IgE-spezifische Reaktion blieb aus. Daraus schlossen die Autoren, dass in der Bevölkerung eine Lebensmittelallergie, ausgelöst durch die Einnahme des Enzympräparates Fungamyl, nur in seltenen Fällen zu erwarten ist.

Bindslev-Jensen *et al.* (2006) untersuchten die mögliche orale Allergenität von 19 aus Mikroorganismen gewonnenen Enzymen, die von der dänischen Gesundheitsbehörde für die Verwendung in Lebensmitteln zugelassen worden waren. Dabei wurden auch der Gegenstand des vorliegenden Berichtes, das GVO-Erzeugnis maltogene Amylase aus *B. subtilis*, sowie die alpha-Amylase aus *Aspergillus oryzae* untersucht. 400 erwachsene Patienten mit einer diagnostizierten Allergie auf Inhalations- und Lebensmittelallergene, allergene Stoffe aus Bienen und Wespen oder Arzneimittel wurden untersucht. Bei zwei Personen wurde dabei im Skin-Prick-Test eine positive Reaktion auf die maltogene Amylase festgestellt. Diesen Personen wurde maltogene Amylase in einer Flüssigkeit oral verabreicht. Die Menge Enzym entsprach der Menge, welche in 250 g eines damit zubereiteten Lebensmittels maximal enthalten ist. Die Probanden zeigten dabei keine Reaktion. Auch die anderen eingenommenen Enzympräparate, darunter die alpha-Amylase aus *A. oryzae*, lösten keine positive Reaktion bei den Probanden aus.

Gemäss Poulsen (2004) und Bindslev-Jensen *et al.* (2006) konnte eine durch kommerzielle Lebensmittelenzyme verursachte Lebensmittelallergie somit nicht nachgewiesen werden.

Nach dem aktuellen Stand des Wissens bestehen demnach keine Hinweise auf ein allergenes Potential des GVO-Erzeugnisses maltogene Amylase in Lebensmitteln.

#### **4.4.2. Produktrisiken**

Die als Verarbeitungshilfsstoffe eingesetzten Enzympräparate Novamyl (bei Backwaren) und Maltogenase L (bei Maltose-Sirupen) erzeugen in den Lebensmitteln keine Reaktionsprodukte, die nicht als konventionelle Lebensmittelbestandteile angesehen werden können. Im Endprodukt (Backware bzw. Maltose-Sirup) liegt die maltogene Amylase in inaktivierter Form vor bzw. ist nicht mehr vorhanden. Während des Backvorganges bewirken die hohen Temperaturen eine Inaktivierung des Enzyms im Teig. Beim Aufreinigungsprozess von Sirup wird das Enzym inaktiviert und entfernt.

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 maltogene Amylase in den Lebensmitteln verbleibt, berechnet.

Der anhand der subchronischen oralen Toxizitätsstudie mit Ratten ermittelte NOAEL des GVO-Erzeugnisses maltogene alpha-Amylase beträgt 968.2 mg TOS pro kg Körpergewicht pro Tag.

Das in der Sicherheitsstudie verwendete GVO-Erzeugnis, als Produkt der Fermentation von *B. subtilis* BRG-1 (im Folgenden Fermentationsprodukt genannt), enthielt 9.1 % TOS und wies eine Enzymaktivität von 8600 MANU auf, also etwa 100,000 MANU/g TOS des Fermentationsproduktes. Diese Werte werden zur Schätzung der täglichen Gesamtaufnahme verwendet. Zudem wird davon ausgegangen, dass das Enzympräparat in der empfohlenen Höchstdosierung verwendet wird und im Lebensmittel verbleibt.

Für die Schweiz betrug laut Brotkonsumstatistik des Bundesamtes für Landwirtschaft der durchschnittliche Konsum von Brot und brotähnlichen Gebäcken im Jahr 2009 pro Person und Tag rund 135 g (BLW, 2010).

Das Enzympräparat Novamyl 10000 BG enthält 4 % TOS und weist eine Enzymaktivität von 10000 MANU pro Gramm Enzympräparat auf. Die höchste empfohlene Dosierung für den Einsatz des Enzympräparats Novamyl 10000 BG in Bäckereien beträgt 4000 MANU pro kg Mehl. Dies entspricht einer Menge von ca. 0.4 g Enzympräparat pro kg Mehl bzw. 0.3 g pro kg Brot und damit einer Menge von 12 mg TOS (Fermentationsprodukt) pro kg Brot.

Ein täglicher Konsum von 135 g Brot und Backwaren ergibt bei einer Person mit einem Standardgewicht von 60 kg somit eine Aufnahme von 27 µg TOS (Fermentationsprodukt) pro kg Körpergewicht und Tag.

In der Schweiz lag gemäss den Angaben der Agrarstatistik des Bauernverbandes im Jahr 2010 der durchschnittliche Zucker- und Sirupkonsum bei ca. 114 g pro Person und Tag (SBV, 2011). Eine 1997 in Neuseeland bei Erwachsenen durchgeführte Ernährungserhebung ergab für Männer einen durchschnittlichen Tageskonsum von 139 g Zucker, davon 5.1 g Maltose., Für Frauen betrug der Konsum 105 g Zucker bzw. 3.1 g Maltose (Ministry of Health New Zealand, 1999). Gemäss einer Ernährungserhebung bei Kindern in Neuseeland im Jahr 2002 lagen die Werte bei männlichen Jugendlichen (11-14 Jahre) bei 124 g bzw. 4.1 g und bei weiblichen Jugendlichen bei 113 g bzw. 3.2 g (Ministry of Health New Zealand, 2003). Ein täglicher Konsum von 5 g Maltose kann deshalb als Grundlage zur Schätzung der Einnahme von Maltogenase L dienen.

Das Enzympräparat Maltogenase L enthält 1.5 % TOS und weist eine Enzymaktivität von 3200 MANU pro Gramm Enzympräparat auf. Für die Verwendung des Enzympräparates Maltogenase L zur Herstellung von Maltose aus Stärke beträgt die höchste empfohlene Dosierung 40,000 MANU pro kg Stärke, entsprechend 12.5 g flüssigem Enzympräparat. Dies entspricht einer eingesetzten Menge von 187.5 mg TOS (Fermentationsprodukt) pro kg Maltose, unabhängig von der Effizienz der Umsetzung von Stärke zu Maltose, aber unter der Voraussetzung einer gleichmässigen Verteilung des Enzympräparates in den Reaktionsprodukten.

Unter der konservativen Annahme, dass das Enzympräparat im Maltosesirup verbleibt, würde ein täglicher Konsum von 5 g Maltose in Form von Maltosesirup bei einer 60 kg schweren Person somit einer Aufnahme von 16 µg TOS (Fermentationsprodukt) pro kg Körpergewicht und Tag entsprechen.

Unter der Annahme, dass die Person Brot, Backwaren und Maltosesirup, die mit maltogener Amylase aus *B. subtilis* BRG-1 hergestellt wurden, in den genannten Mengen verzehrt, ergibt sich eine durchschnittliche tägliche Gesamtaufnahme von ca. 43 µg TOS (Fermentationsprodukt) pro kg Körpergewicht und Tag.

Basierend auf diesen Annahmen und dem NOAEL von 968.2 mg TOS (Fermentationsprodukt) pro kg Körpergewicht und Tag im Tierversuch ergibt sich bei einem durchschnittlichen Verzehr der genannten Erzeugnisse eine Sicherheitsspanne von über 22,000. Dieser Wert übertrifft den Wert von 100 klar. Für den Endverbraucher dieser Erzeugnisse bestehen somit keine gesundheitlichen Bedenken.

Die Berechnung wurde anhand der Angaben zum Brotverzehr in der Umfassenden Europäischen Datenbank der EFSA über den Lebensmittelverzehr überprüft. Als Extremfall wurde die 99. Perzentile bei Kleinkindern in den Niederlanden ermittelt. Dieser Verzehr beträgt 170 g Brot pro Tag. Unter der Annahme eines täglichen Verzehrs von 5 g Maltose und eines Körpergewichtes von 15 kg ergibt sich hier eine Sicherheitsspanne von über 4600. Es kann also auch unter diesen Umständen von der Unbedenklichkeit der Verwendung der maltogenen alpha-Amylase als Verarbeitungshilfsstoff ausgegangen werden.

Die Gesuchstellerin gibt zudem an, dass weltweit seit 1998 allein das Erzeugnis Novamyl in einer Menge, welche für die Herstellung von über 70 Millionen Tonnen Brot und anderen Backwaren zureichend ist, vertrieben wurde, ohne dass sie Rückmeldungen über nachteilige Effekte dieser Produkte erhalten hätte.

#### **4.4.3. Beurteilung des veränderten Organismus im Vergleich mit dem Spender- und dem Empfängerorganismus in Bezug auf die Pathogenität und Toxizität gegenüber Menschen**

Der Spenderorganismus *G. stearothermophilus* wie auch der Empfängerorganismus *B. subtilis* werden der Risikogruppe 1 (Organismen, bei denen es unwahrscheinlich ist, dass sie beim Menschen eine Krankheit verursachen) zugeteilt. Sie gelten beide als nicht pathogen und nicht toxisch (OECD, 1993; Pedersen *et al.*, 2002; WHO, 1998).

Aufgrund der erfolgten Toxizitätsstudien besteht kein Grund zur Annahme, dass der gentechnisch veränderte Produktionsorganismus *B. subtilis* BRG-1 durch die Integration der DNA-Sequenz codierend für maltogene alpha-Amylase aus *G. stearothermophilus* C599 ein pathogener oder ein toxinbildender Organismus geworden ist.

Das aufgereinigte Enzymkonzentrat von GVO-Erzeugnis maltogene Amylase ist frei von lebenden bzw. intakten Zellen des Produktionsorganismus *B. subtilis* BRG-1.

#### **4.5. Zusammenfassung über die substantielle Äquivalenz der GVO-Erzeugnisse**

Die klonierte DNA-Sequenz codierend für das GVO-Erzeugnis maltogene Amylase unterscheidet sich von der ursprünglich isolierten DNA-Sequenz des thermophilen Spenderorganismus *G. stearothermophilus* C599 durch eine Transition.

Die abgeleitete Aminosäuresequenz des Genproduktes maltogene Amylase unterscheidet sich von der nativen Sequenz durch die Substitution einer Aminosäure.

Die biochemischen und physikalischen Eigenschaften des GVO-Erzeugnisses maltogene Amylase stimmen jedoch mit dem nativen Enzym überein (siehe 4.2). Das GVO-Erzeugnis maltogene Amylase wurde als substantiell äquivalent bewertet (OECD, 1993).

### **5. Angaben über die Gewährleistung der Sicherheit**

#### **5.1. Angaben für den Nachweis des GVO-Erzeugnisses:**

##### **5.1.1. Methoden zum Aufspüren der GVO-Erzeugnisse**

Es stehen keine validierten Verfahren für den Nachweis der rekombinanten DNA bzw. des Proteins zur Verfügung.

##### **5.1.2. Ort, an dem Referenzmaterial für den Nachweis der GVO-Erzeugnisse erhältlich ist**

Es ist kein zertifiziertes Referenzmaterial verfügbar. Die Produkte Novamyl 10000 BG, Novamyl 1500 MG, Novamyl Conc BG und Maltogenase L können beim Hersteller Novozymes Schweiz bezogen werden.

## **5.2. Qualitätssicherungssystem bezüglich:**

### **5.2.1. Allergenität**

Biotechnisch hergestellte Amylasen zählen zu den wichtigsten industriellen Enzymen (Nielsen und Borchert, 2000; Pandey *et al.*, 2000; Sivaramakrishnan *et al.*, 2006). Im Lebensmittelbereich finden alpha-Amylasen unter anderem Verwendung in der Stärke- und Backindustrie (Sivaramakrishnan *et al.*, 2006; Tegge, 2004).

Die zur Verfügung stehenden wissenschaftlichen Informationen ergeben keinen Hinweis auf ein allergenes Potential des GVO-Erzeugnisses maltogene Amylase in Lebensmitteln.

Die Sicherheitsdatenblätter der Enzympräparate Novamyl und Maltogenase L entsprechen den Vorschriften der EG-Richtlinie 2001/58/EG der Kommission zur zweiten Änderung der Richtlinie 91/155/EWG zur Festlegung der Einzelheiten eines besonderen Informationssystems für gefährliche Zubereitungen und sind in erster Linie für die beruflichen Verwender bestimmt.

Der Hersteller Novozymes unterhält für Mitarbeiter zudem einen betriebsinternen arbeitsmedizinischen Dienst (Occupational Health Service), der Skin-Prick-Tests zur Ermittlung möglicher berufsbedingter Allergien gegen Enzympräparate verwendet (Bindslev-Jensen *et al.*, 2006).

### **5.2.2. Veränderung der substanziellen Äquivalenz, insbesondere bezüglich bekannter Toxine**

Die biochemischen und physikalischen Eigenschaften des GVO-Erzeugnisses maltogene Amylase entsprechen denjenigen des nativen Enzyms. Weiter ergaben toxikologische Studien keinen Hinweis auf ein toxisches Potential.

Der gentechnisch veränderte Produktionsstamm *B. subtilis* BRG-1 entspricht den Anforderungen gemäss der „Good Industrial Large Scale Practice (GILSP)“ (OECD, 1992). Er wird von der OECD als „low-risk organism“ eingestuft und erfüllt die gleichen Sicherheitsanforderungen wie sein Elterstamm *Bacillus subtilis* A164.

Die Aktivität der Enzympräparate Novamyl und Maltogenase L wird routinemässig überprüft. Die entsprechenden Analysezertifikate bestätigen die Konformität der Enzymformulierungen mit den von JECFA und FCC empfohlenen Reinheitsspezifikationen für Lebensmittelenzyme.

### **5.2.3. Muster der Antibiotikaresistenz**

Der Produktionsstamm *B. subtilis* BRG-1 ist frei von gentechnisch übertragenen Antibiotikaresistenzgenen. Die Abwesenheit einer antibiotischen Aktivität des Enzympräparates wird regelmässig überprüft.

### **5.2.4. Biologische Stabilität**

Der Produktionsorganismus *B. subtilis* BRG-1 ist biologisch stabil.

Zur Aufbewahrung des Produktionsstammes *B. subtilis* BRG-1 werden Glycerolkulturen bei -80°C eingefroren. Vor der Inokulation wird die Stammkultur des Produktionsorganismus einer Qualitätsprüfung unterzogen. Folgende Parameter werden jeweils überprüft:

- Stammidentität (vial identity)
- Abwesenheit von kontaminierenden Organismen
- Lebendzellzahl (viable count)
- Fähigkeit, Enzym zu bilden (enzyme-generating ability).

### **5.2.5. Wirtsbereich, Detektion von Änderungen**

Der Produktionsstamm *B. subtilis* BRG-1 ist kein Pathogen. Ein Qualitätssicherungssystem ist deshalb nicht erforderlich.

### **5.2.6. Gentransfer in die Darmflora des Menschen**

Das Risiko eines horizontalen Gentransfers auf die menschlichen Darmbakterien kann, sofern überhaupt vorhanden, als extrem gering angesehen werden.

Der Produktionsstamm *B. subtilis* BRG-1 enthält keine gentechnisch übertragenen Antibiotikaresistenz-Markergene mehr. Ein Gentransfer solcher Sequenzen auf die menschlichen Darmbakterien ist damit ausgeschlossen. Ein Qualitätssicherungssystem ist deshalb nicht erforderlich.

### **5.2.7. Auswirkungen auf die Umwelt**

Die Verwendung des Produktionsorganismus *B. subtilis* BRG-1 erfolgt ausschliesslich in einem geschlossenen System.

Die Enzympräparate enthalten keine Organismen. Sie werden in geschlossenen Behältnissen transportiert. Durch die Formulierung der Präparate wird die Staub- bzw. Aerosolbildung minimiert.

## **5.3. Dauer und Häufigkeit der Überwachung**

Der Herstellungsprozess des GVO-Erzeugnisses maltogene Amylase erfolgt nach den Regeln der aktuellen Guten Herstellungspraxis (current Good Manufacturing Practice; cGMP). Ausserdem unterhält das Unternehmen Novozymes A/S für ihre Enzymproduktion ein nach ISO 9001:2000 zertifiziertes Qualitätsmanagementsystem.

## **5.4. Pläne zum Schutz der menschlichen Gesundheit im Fall des Auftretens unerwünschter Wirkungen.**

Die Vorschriften für den Umgang mit dem Enzympräparat sind im entsprechenden Sicherheitsdatenblatt erläutert.

## Schlussfolgerung

Die Prüfung durch das BLV nach Artikel 22 Absatz 2 Buchstabe a LGV ergibt, dass eine Gesundheitsgefährdung des Menschen, verursacht durch Verzehr von Lebensmitteln, die mit Hilfe des vom Organismus abgetrennten und gereinigten GVO-Erzeugnisses maltogene Amylase aus *B. subtilis* BRG-1 hergestellt wurden, nach dem Stand der Wissenschaft ausgeschlossen werden kann.

Einer Bewilligung für die Verwendung des Verarbeitungshilfsstoffes maltogene Amylase in der Herstellung von Lebensmitteln (Backwaren und Sirupen) kann aus Sicht des Gesundheitsschutzes zugestimmt werden.

## Referenzen

Aberer,W, Hahn,M, Klade,M, Seebacher,U, Spök,A, Wallner,K, und Witzani,H 2002. Collection of information on enzymes. Final report. European Communities, ISBN 92-894-4218-2.

Andersen,JR, Diderichsen,B, Hjortkaer,RK, De Boer,AS, Bootman,J, West,H, und Ashby,R 1987. Determining the safety of maltogenic amylase produced by rDNA technology. J Food Prot , **50**(6): 521-526.

BAFU. Bundesamt für Umwelt 2011. Einstufung von Organismen. Modul 1: Bakterien.

Baur,X und Czuppon,AB 1995. Allergic reaction after eating alpha-amylase (Asp o 2)-containing bread. A case report. Allergy, **50**(1): 85-87.

Beckhorn,EJ, Labee,MD, und Underkofler,LA 1965. Production and Use of Microbial Enzymes for Food Processing. J Agr Food Chem, **13**: 30-34.

Bindslev-Jensen,C, Skov,PS, Roggen,EL, Hvass,P, und Brinch,DS 2006. Investigation on possible allergenicity of 19 different commercial enzymes used in the food industry. Food Chem Toxicol, **44**(11): 1909-1915.

BLW. Bundesamt für Landwirtschaft 2010. Marktbericht Getreide. Brotkonsumstatistik.

Christophersen,C, Otzen,DE, Norman,BE, Christensen,S, und Schafer, T 1998. Enzymatic Characterisation of Novamyl<sup>®</sup>, a Thermostable  $\alpha$ -Amylase. Starch **50**(1):40–45.

De Boer,AS und Diderichsen,B 1991. On the safety of *Bacillus subtilis* and *B. amyloliquefaciens*: a review. Appl Microbiol Biotechnol , **36**(1): 1-4.

Derde,LJ, Gormand,SV, Courtin,CM, und Delcour,JA 2012. Characterisation of three starch degrading enzymes: Thermostable  $\beta$ -amylase, maltotetraogenic and maltogenic  $\alpha$ -amylases. Food Chem, **135**(2): 713-721.

Diderichsen,B und Christiansen,L 1988. Cloning of a maltogenic alpha-amylase from *Bacillus stearothermophilus*. FEMS Microbiol Lett, **56**(1): 53-59.

EFSA. European Food Safety Authority 2012. Scientific Opinion on the maintenance of the list of QPS biological agents intentionally added to food and feed (2012 update). Panel on Biological Hazards BIOHAZ. EFSA Journal, **10**(12): 3020.

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

- EPA. United States Environmental Protection Agency 1997. *Bacillus subtilis* Final Risk Assessment. Biotechnology Program Under Toxic Substances Control Act (TSCA).
- FCC. Food Chemicals Codex 2004. Food Chemicals Codex, Enzyme Preparations, General Requirements. 146-152. National Academy Press, Washington.
- Hileman,RE, Silvanovich,A, Goodman,RE, Rice,EA, Holleschak,G, Astwood,JD, und Hefle,SL 2002. Bioinformatic methods for allergenicity assessment using a comprehensive allergen database Int Arch Allergy Immunol, **128**(4): 280-291.
- ICH. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use 1995. Tripartite Harmonised Guideline on Genotoxicity, ICH S2A.
- Ito,KA 1981. Thermophilic organism in food spoilage: Flat-sour aerobes. J Food Prot, **44**(2): 157-163.
- JECFA. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. General Specification and Considerations for Enzyme Preparations Used in Food Processing (in Online Edition of "Combined Compendium of Food Additive Specifications") (2013).
- Kanny,G und Moneret-Vautrin,DA 1995. alpha-Amylase contained in bread can induce food allergy. J Allergy Clin Immunol, **95**(1 Pt 1): 132-133.
- Kroschwitz, JI 1994. Enzyme Applications. Encyclopedia of Chemical Technology: 567-620.
- Losada,E, Hinojosa,M, Quirce,S, Sanchez-Cano,M, und Moneo,I 1992. Occupational asthma caused by alpha-amylase inhalation: clinical and immunologic findings and bronchial response patterns J Allergy Clin Immunol, **89**(1 Pt 1): 118-125.
- Ministry of Health New Zealand. 1999. NZ Food: NZ People. Key results of the 1997 National Nutrition Survey. Wellington: Ministry of Health.
- Ministry of Health New Zealand. 2003. Key Results of the 2002 National Children's Nutrition Survey. Wellington: Ministry of Health.
- Moreno-Ancillo,A, Dominguez-Noche,C, Gil-Adrados,AC, und Cosmes,PM 2004. Bread eating induced oral angioedema due to alpha-amylase allergy. J Investig Allergol Clin Immunol, **14**(4): 346-347.
- Nazina,TN, Tourova,TP, Poltarau,AB, Novikova,EV, Grigoryan,AA, Ivanova,AE, Lysenko,AM, Petrunyaka,VV, Osipov,GA, Belyaev,SS, und Ivanov,MV 2001. Taxonomic study of aerobic thermophilic bacilli: descriptions of *Geobacillus subterraneus* gen. nov., sp. nov. and *Geobacillus uzenensis* sp. nov. from petroleum reservoirs and transfer of *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus thermocatenulatus*, *Bacillus thermoleovorans*, *Bacillus kaustophilus*, *Bacillus thermodenitrificans* to *Geobacillus* as the new combinations *G. stearothermophilus*, *G. thermocatenulatus*, *G. thermoleovorans*, *G. kaustophilus*, *G. thermoglucosidasius* and *G. thermodenitrificans*. Int.J Syst Evol Microbiol, **51**(Pt 2): 433-446.
- Nielsen,JE und Borchert,TV 2000. Protein engineering of bacterial alpha-amylases. Biochim Biophys Acta, **1543**(2): 253-274.
- OECD. Organisation for Economic Cooperation and Development 1992. Safety Consideration for Biotechnology. Report.
- OECD. Organisation for Economic Cooperation and Development 1993. Safety Evaluation of Foods Derived by Modern Biotechnology.
- OECD. Organisation for Economic Cooperation and Development 1997. OECD Guideline for the Testing of Chemicals 471. Bacterial Reverse Mutation Test.

- OECD. Organisation for Economic Cooperation and Development 1997. OECD Guideline for the Testing of Chemicals 473. *In Vitro* Mammalian Chromosome Aberration Test
- OECD. Organisation for Economic Cooperation and Development 1998. OECD Guideline for the Testing of Chemicals 408. Repeated Dose 90-day Oral Toxicity Study in Rodents.
- Olempska-Beer,ZS, Merker,RI, Ditto,MD, und DiNovi,MJ 2006. Food-processing enzymes from recombinant microorganisms - a review. *Regul Toxicol Pharmacol*, **45**(2): 144-158.
- Outtrup,H und Norman,BE 1984. Properties and Application of a Thermostable Maltogenic Amylase Produced by a Strain of *Bacillus* Modified by Recombinant-DNA Techniques. *Starch*, **36**: 405-411.
- Pandey,A, Nigam,P, Soccol,CR, Soccol,VT, Singh,D, und Mohan,R 2000. Advances in microbial amylases. *Biotechnol Appl Biochem.*, **31 ( Pt 2)**: 135-152.
- Pedersen,PB, Bjornvad,ME, Rasmussen,MD, und Petersen,JN 2002. Cytotoxic potential of industrial strains of *Bacillus* sp. *Regul Toxicol Pharmacol*, **36**(2): 155-161.
- Poulsen,LK 2004. Allergy assessment of foods or ingredients derived from biotechnology, gene-modified organisms, or novel foods. *Mol Nutr Food Res*, **48**(6): 413-423.
- Rizzi,A, Raddadi,N, Sorlini,C, Nordgård,L, Nielsen,KM, und Daffonchio,D 2012. The stability and degradation of dietary DNA in the gastrointestinal tract of mammals: implications for horizontal gene transfer and the biosafety of GMOs. *Crit Rev Food Sci Nutr*, **52**(2): 142-161.
- SBV. Schweizerischer Bauernverband 2011. Statistische Erhebungen und Schätzungen über Landwirtschaft und Ernährung.
- Simonen,M und Palva,I 1993. Protein secretion in *Bacillus* species. *Microbiol Rev*, **57**(1): 109-137.
- Sivaramakrishnan,S, Gangadharan,D, Nampoothiri,KM, Soccol,CR, und Pandey,A 2006. alpha-amylases from microbial sources - An overview on recent developments. *Food Technol Biotechnol*, **44**(2): 173-184.
- Tegge, G. 2004. Stärke und Stärkederivate. B. Behr's Verlag, Hamburg.
- Verma,AK, Misra,A, Subash,S, Das,M, und Dwivedi,PD 2011. Computational allergenicity prediction of transgenic proteins expressed in genetically modified crops. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, **33**(3): 410-422.
- WHO. World Health Organization 1972. Toxicological evaluation of some enzymes, modified starches and certain other substances. WHO FAS, **1** (nos 223 on INCHEM).
- WHO. World Health Organization 1998. Safety evaluation of certain food additives and contaminants. WHO FAS, **40** (nos 902 on INCHEM).