

# **Beurteilung der Lebensmittelsicherheit des GVO-Erzeugnisses Asparaginase Acrylaway 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)

---

## Zusammenfassung der Beurteilung der Lebensmittelsicherheit des GVO-Erzeugnisses Asparaginase 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 Asparaginase aus *Aspergillus oryzae* Stamm NZYM-SP als Verarbeitungshilfsstoff für Lebensmittel durch das Bundesamt für Lebensmittelsicherheit und Veterinärwesen BLV.

Das Protein Asparaginase ist ein Enzym, das die Hydrolyse der freien Aminosäure Asparagin zu Asparaginsäure unter der Bildung von Ammonium katalysiert. Die genetische Information für dieses Protein stammt aus *Aspergillus oryzae* Stamm A1560.

Das GVO-Erzeugnis wird aus dem gentechnisch veränderten Produktionsstamm *Aspergillus oryzae* NZYM-SP in einem geschlossenen System (Fermenter) nach den Leitlinien der Guten Herstellungspraxis (Good Manufacturing Practice, GMP) fermentativ gewonnen. Das aufgereinigte flüssige Enzymkonzentrat wird durch Zugabe von Glycerin, Natriumbenzoat und Kaliumsorbat stabilisiert, in die gewünschte Formulierung überführt und standardisiert.

Das GVO-Erzeugnis soll in Form von drei Enzympräparaten mit folgenden Bezeichnungen in den Verkehr gebracht werden: Acrylaway® L (Flüssigkeit) sowie Acrylaway® 3500 BG und Acrylaway® 3500 BG Wheat free (Granulate).

Das GVO-Erzeugnis ist in Dänemark und Frankreich zugelassen. In den anderen Staaten der Europäischen Union ist das Erzeugnis ohne Zulassung verkehrsfähig. In Australien wurde es 2008 und in Kanada 2012 zugelassen. In den USA ist das Erzeugnis seit 2006 als sicher anerkannt (generally recognized as safe, GRAS). Zudem sind Enzympräparate in folgenden Staaten rechtmässig im Verkehr: Brasilien, China, Mexiko, Russland, Singapur, Südkorea, Thailand und Vietnam.

Das Enzym wird in der Verarbeitung von Getreide, Kartoffeln und Kaffee verwendet, um den Gehalt an Acrylamid in daraus hergestellten Erzeugnissen zu reduzieren.

Die DNA-Sequenz *asnAO*, codierend für das GVO-Erzeugnis Asparaginase, wurde aus dem Spenderorganismus *A. oryzae* Stamm A1560 isoliert und durch eine nicht homologe Rekombination an einer zufälligen Stelle in das Genom von *Aspergillus oryzae* Stamm BECh2 integriert. Mehrere Kopien wie auch DNA-Fragmente des für die Transformation benutzten Vektors pCAHj621 wurden dabei in das Genom integriert.

Die biochemischen Eigenschaften des GVO-Erzeugnisses Asparaginase entsprechen denjenigen des nativen Enzyms von *A. oryzae* A1560.

Mit einem aufgereinigten flüssigen Konzentrat des GVO-Erzeugnisses Asparaginase wurden toxikologische Studien (13-Wochen-Fütterungsstudie, Tests auf Mutagenität und Chromosomenaberrationen) 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 Proteins zu Sequenzen in Allergen-Datenbanken durchgeführt. Die Suche nach Homologien ergab keine Resultate, die auf eine mögliche Allergenität der Asparaginase aus *A. oryzae* hinweisen würden.

Das Enzympräparat Acrylaway® erzeugt 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.

## Ausgangslage

Die Firma Novozymes A/S, Bagsværd, Dänemark reichte mit Schreiben vom 2. Juli 2009 ein Gesuch um Bewilligung des GVO-Erzeugnisses Asparaginase als Verarbeitungshilfsstoff für Lebensmittel beim Bundesamt für Gesundheit BAG ein.

Das Enzym Asparaginase stammt von *Aspergillus oryzae* und wird im geschlossenen System (Fermenter) aus gentechnisch verändertem *Aspergillus oryzae* Stamm NZYM-SP (Stamm pCAHj621/BECh2#10) 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 31 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 Bundesamt für Lebensmittelsicherheit und Veterinärwesen BLV<sup>1</sup>. 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.

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

Das BLV ist die für diese Prüfung zuständige Behörde<sup>2</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 *A. oryzae* NZYM-SP fermentativ hergestellte GVO-Erzeugnis Asparaginase wurde bereits von den zuständigen Gesundheitsbehörden folgender Staaten zugelassen: Dänemark im Jahre 2007, Australien 2008, Frankreich 2009 und Kanada 2012. In den USA ist das Enzym seit 2006 als sicher anerkannt (generally recognized as safe, GRAS). In den anderen Staaten der Europäischen Union ist das Erzeugnis ohne Bewilligung verkehrsfähig. Weiter darf das Enzympräparat Acrylaway® in folgenden Staaten rechtmässig in Verkehr gebracht werden: Brasilien, China, Mexiko, Russland, Singapur, Südkorea, Thailand und Vietnam.

---

<sup>1</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>2</sup> Siehe Fussnote 1

Das Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) evaluierte im Jahre 2007 die Sicherheit des GVO-Erzeugnisses Asparaginase. Der Ausschuss konnte gesundheitliche Risiken ausschliessen und bestimmte keinen Wert für die erlaubte Tagesdosis des GVO-Erzeugnisses Asparaginase ('acceptable daily intake: not specified') (WHO, 2007).

Weltweit hat keine Behörde jemals einen Bewilligungsantrag für das GVO-Erzeugnis Asparaginase abgelehnt.

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

### **1. Allgemeine Angaben**

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

Novozymes A/S  
Krogshoejvej 36  
DK-2880 Bagsværd  
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 Bagsværd  
Dänemark

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

Novozymes A/S  
Krogshoejvej 36  
DK-2880 Bagsværd  
Dänemark

Novozymes A/S  
Hallas Alle 1  
DK-4400 Kalundborg  
Dänemark

Danish Technological Institute  
Gregersensvej 1  
DK-2630 Taastrup  
Dänemark

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

Das GVO-Erzeugnis Asparaginase (L-Asparagin-Amidohydrolase; EC 3.5.1.1; CAS 9015-68-2) soll als Verarbeitungshilfsstoff in der Lebensmittelherstellung eingesetzt werden. Das Enzym katalysiert die Hydrolyse der freien Aminosäure Asparagin zu Asparaginsäure unter der Bildung von Ammonium. Das Enzym besitzt keine Aktivität für Asparaginreste in Peptiden oder Proteinen.

Die fermentative Herstellung des GVO-Erzeugnisses Asparaginase erfolgt mit Hilfe des gentechnisch veränderten Produktionsorganismus *A. oryzae* Stamm NZYM-SP in einem geschlossenen System (Fermenter) nach den Leitlinien der Guten Herstellungspraxis (Good Manufacturing Practice, GMP). Nach beendeter Kultivierung wird das Enzym isoliert und aufgereinigt. Das daraus resultierende flüssige Enzymkonzentrat wird durch Zugabe von Glycerin, Natriumbenzoat und Kaliumsorbat stabilisiert, in die gewünschte Formulierung überführt und standardisiert.

In der Schweiz sind folgende drei Präparate des GVO-Erzeugnisses Asparaginase für den Handel vorgesehen: Acrylaway L, Acrylaway 3500 BG und Acrylaway 3500 BG Wheat free. Die Konzentration des Enzyms ist in allen drei Präparaten gleich hoch. Das Acrylaway L-Präparat ist flüssig, bei den Acrylaway 3500 BG-Präparaten handelt es sich um Granulate.

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

Das GVO-Erzeugnis Asparaginase soll in der Verarbeitung von Lebensmitteln (Kaffee, Kartoffel- und Getreideprodukte) eingesetzt werden.

In den Ländern, in denen das GVO-Erzeugnis Asparaginase bereits im Verkehr ist, werden die drei Formulierungen des Enzympräparates Acrylaway von der Lebensmittelindustrie verwendet, um den Gehalt an Acrylamid in Lebensmitteln aus Getreide oder Kartoffeln zu reduzieren. Die Kaffee verarbeitende Industrie setzt zum gleichen Zweck das flüssige Enzympräparat ein.

Acrylamid entsteht beim Erhitzen (Backen, Frittieren, Rösten und Braten) von kohlenhydratreichen Lebensmitteln (Maillard-Reaktion). Bei Temperaturen von über 120 °C bildet sich aus der Aminosäure Asparagin unter Reaktion mit reduzierenden Zuckern die chemische Substanz Acrylamid, welche als wahrscheinlich krebserregend für den Menschen eingestuft wird. In Abhängigkeit des Herstellungsprozesses und des zu verarbeitenden Produktes (Getreide, Kartoffeln oder Kaffee) kann in Lebensmitteln durch den Einsatz des GVO-Erzeugnisses Asparaginase der Gehalt an Acrylamid um 40 bis 90 % reduziert werden.

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

Die Enzympräparate Acrylaway L, Acrylaway 3500 BG und Acrylaway 3500 BG Wheat free werden in geschlossenen Behältern gelagert und transportiert.

Die empfohlene Lagerungstemperatur beträgt bei flüssigen Enzympräparaten 0 bis 10 °C, bei Granulaten 0 bis 25 °C. Ungeöffnete Packungen sind trocken und vor Sonnenlicht geschützt zu lagern.

Der unsachgemässe Umgang mit Enzympräparaten kann die Bildung von Aerosolen oder Stäuben verursachen. Das Einatmen solcher Aerosole oder Stäube kann, gemäss Sicherheitsdatenblatt, eine Sensibilisierung induzieren und bei sensibilisierten Personen allergische Reaktionen auslösen. Bei längerem Hautkontakt kann es zu geringfügigen Irritationen der Haut kommen.

Die Gefahren und Vorschriften für den Umgang mit den Erzeugnissen sind sowohl im Produkte- als auch im entsprechenden Sicherheitsdatenblatt angeführt.

### **1.7. Vorgesehene Etikettierung**

Das GVO-Erzeugnis Asparaginase ist zur Verwendung als Verarbeitungshilfsstoff bestimmt.

Verarbeitungshilfsstoffe, die GVO-Erzeugnisse sind und als solche abgegeben werden, sind gemäss Artikel 37 Absatz 1 Buchstabe c LGV und Artikel 7 Absätze 1 und 2 VGV 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 VGV 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 Asparaginase erfolgt in einem geschlossenen System (Fermenter) durch den Mikroorganismus *A. oryzae*. Bei der Aufarbeitung wird das GVO-Erzeugnis Asparaginase vom gentechnisch veränderten Produktionsorganismus *A. oryzae* NZYM-SP abgetrennt.

Bei den Enzympräparaten Acrylaway L, Acrylaway 3500 BG und Acrylaway 3500 BG Wheat free kann deshalb auf eine Kennzeichnung nach Artikel 37 LGV verzichtet werden.

### **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**

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

Standardisierte Analysemethoden werden eingesetzt, um die Einhaltung der Empfehlungen des JECFA (JECFA, 2018) und des Food Chemicals Codex (FCC, 2004) über Reinheitsspezifikationen für Lebensmittelenzyme zu überwachen.

Die Herstellerin überprüft regelmässig folgende Parameter:

Parameter	Anforderung
Enzymaktivität	gemäss Deklaration
Schwermetalle	≤ 30 ppm
Blei	≤ 5 ppm
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
Mykotoxine	nicht nachweisbar
Produktionsorganismus	nicht nachweisbar

### **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:

*Aspergillus oryzae* diente als Spenderorganismus für die Genkassette *asnAO* kodierend für das GVO-Erzeugnis Asparaginase.

*Aspergillus niger* und *Aspergillus nidulans* dienten als Spenderorganismen für Steuerungselemente der Expression der codierenden DNA-Sequenz des GVO-Erzeugnisses Asparaginase.

*Aspergillus nidulans* diente zudem als Spenderorganismus für die Genkassette *amdS* kodierend für die Acetamidase.

*Escherichia coli* diente als Spenderorganismus für das Rückgrat des für die Transformation benutzten Vektors.

*Saccharomyces cerevisiae* diente als Spenderorganismus für die Genkassette *URA3* kodierend für die Orotidin-5'-Phosphat-Decarboxylase (ODCase).

Empfängerorganismus:

*Aspergillus oryzae*

### 2.2. Taxonomische Daten

Stufe	Taxa		
Domäne	Pilze	Bakterien	Pilze
Abteilung	Ascomycota	Proteobacteria	Ascomycota
Klasse	Eurotiomycetes	Gammaproteobacteria	Saccharomycetes
Ordnung	Eurotiales	Enterobacteriales	Saccharomycetales
Familie	Trichocomaceae	Enterobacteriaceae	Saccharomycetaceae
Gattung	<i>Aspergillus</i>	<i>Escherichia</i>	<i>Saccharomyces</i>
Art	<i>Aspergillus oryzae</i> <i>Aspergillus nidulans</i> <i>Aspergillus niger</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>

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

Spenderorganismus ist *A. oryzae* Stamm A1560 (Stamm IFO 4177, NBRC 4177, NITE Biological Resource Center, Japan, früher Institute for Fermentation, Osaka, Japan).

Empfängerorganismus ist *A. oryzae* Stamm BECh2, abgeleitet von *A. oryzae* A1560.

### 2.4. Phänotypische und genetische Marker

Der Spenderorganismus *A. oryzae* A1560 lebt aerob, ist thermophil und filamentös wachsend. Nebst dem rein vegetativen Myzelwachstum kann sich *A. oryzae* auch durch asexuelle Sporen (Konidien) vermehren. Eine sexuelle Vermehrung von *A. oryzae* ist nicht bekannt (Barbesgaard *et al.*, 1992, Jorgensen, 2007).

Der Empfängerorganismus *A. oryzae* BECh2 ist vom Spenderorganismus *A. oryzae* A1560 abgeleitet, Amylase- und Protease-defizient und produziert weder Cyclopiazonsäure, 3-Nitropropionsäure noch Aflatoxine. Die Produktion der Kojisäure erfolgt in *A. oryzae* BECh2 nur unter geeigneten Kultivationsbedingungen und ist stark reduziert.

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

Sowohl der Spenderorganismus *A. oryzae* A1560 für das Asparaginase-Gen als auch der Empfängerorganismus *A. oryzae* BECh2 gehören der Art *Aspergillus oryzae* an. Kleinere Elemente des transferierten Erbmateri­als stammen aus *A. nidulans*, *A. niger*, *S. cerevisiae* und *E. coli*. *A. nidulans* und *A. niger* gehören zur Gattung *Aspergillus*, *S. cerevisiae* gehört zur Abteilung Ascomycota, während zwischen *A. oryzae* und der prokaryontischen Art *E. coli* keine engere Verwandtschaft besteht.

## 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 Asparaginase 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

*A. oryzae* wird als nicht pathogen eingestuft (Barbesgaard et al., 1992, WHO, 1987). In Ostasien, vor allem in Japan und China, wird *A. oryzae* schon seit mehreren Jahrhunderten für die Fermentation von Soja- und Reisprodukten eingesetzt (Barbesgaard et al., 1992, Jørgensen, 2007, Olempska-Beer et al., 2006). In den USA wird Amylase aus *A. oryzae* bereits seit 1918 in der industriellen Herstellung von Backwaren eingesetzt (Beckhorn et al., 1965).

Der Spenderorganismus *A. oryzae* A1560 produziert unter förderlichen Bedingungen Sekundärstoffwechselprodukte wie Cyclopiazonsäure, Kojisäure und Spuren von 3-Nitropropionsäure (Blumenthal, 2004, Olempska-Beer et al., 2006). Die Gensequenzen kodierend für Proteine, die an der Aflatoxinsynthese beteiligt sind, enthalten Mutationen. Trotz Wachstumsbedingungen, die eine Aflatoxinproduktion begünstigen, konnte bei *A. oryzae* keine Aflatoxinsynthese nachgewiesen werden (Barbesgaard et al., 1992, Blumenthal, 2004, Olempska-Beer et al., 2006, Tominaga et al., 2006).

Der Empfängerorganismus *A. oryzae* BECh2 ist von *A. oryzae* A1560 abgeleitet. In seinem Genom wurden die Gene *amyA*, *amyB* und *amyC* kodierend für die Taka-Amylase inaktiviert, die Gene *alpA* und *nprA* kodierend für die alkalische Protease (Alp) und die neutrale Metallo-Protease I (Npl) wurden deletiert. Ebenfalls deletiert wurden die Gensequenzen *cpa* und *afl*, welche für Proteine kodieren, die in die Biosynthese von Cyclopiazonsäure und Aflatoxin involviert sind. Die Gensequenzen kodierend für Proteine, die an der Biosynthese von Kojisäure beteiligt sind, wurden durch UV-Strahlen mutiert, jedoch nicht inaktiviert. Die Produktion der Kojisäure in *A. oryzae* BECh2 erfolgt nur unter geeigneten Kultivationsbedingungen und beträgt 15 % der vom Elternstamm *A. oryzae* A1560 produzierten Menge. Die 3-Nitropropionsäure wird in *A. oryzae* BECh2 auch unter förderlichen Bedingungen nicht produziert.



*A. oryzae* BECh2 ist somit Amylase- und Protease-defizient, synthetisiert keine 3-Nitropropionsäure und ist Aflatoxin- und Cyclopiazonsäure-negativ. Die Produktion der Kojisäure erfolgt in *A. oryzae* BECh2 nur unter geeigneten Kultivationsbedingungen und ist stark reduziert.

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

Die Richtlinien des BAFU über die „Einstufung von Organismen: Modul 4: Pilze“ (Stand, 2004) sind zurzeit in Revision. Eine Online-Publikation der aktualisierten Pilzliste erfolgt bald. In der überarbeiteten Liste wird *A. oryzae*, gemäss aktueller Nomenklatur als *A. flavus* var. *oryzae* bezeichnet, der Risikogruppe 1 zugeordnet (E-Mail BAFU vom 23.01.2018). Organismen der Risikogruppe 1 stellen nach dem Stand der Wissenschaft kein Risiko für die menschliche Gesundheit und Umwelt dar.

Im Jahre 2014 beurteilte die EFSA die Lebensmittelsicherheit von drei Enzymen, welche mit Hilfe von gentechnisch veränderten *A. oryzae*-Stämmen hergestellt werden, positiv (EFSA CEF Panel, 2014a, 2014b, 2014c). Alle drei Produktionsstämme sind vom Stamm *A. oryzae* A1560 abgeleitet. Wie beim Produktionsorganismus des GVO-Erzeugnisses Asparaginase kommt auch bei einem dieser drei Produktionsstämme der Empfängerorganismus *A. oryzae* BECh2 zum Einsatz.

Nach dem aktuellen Stand der Wissenschaft stellt *A. oryzae* 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**

*A. oryzae* wird als nicht pathogen eingestuft und stellt nach dem aktuellen Stand der Wissenschaft kein Risiko für die menschliche Gesundheit dar.

Eine pathogene Wirkung von *A. oryzae* auf gesunde Menschen ist nicht bekannt. In einzelnen Fällen wurde *A. oryzae* aus immunkompromitierten Patienten isoliert (Barbesgaard et al., 1992).

### **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 *A. oryzae* BECh2 enthält keine gentechnisch eingeführten Antibiotikaresistenzgene.

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

Im Genom des Empfängerorganismus *A. oryzae* BECh2 sind die Gene *amyA*, *amyB* und *amyC* kodierend für die Taka-Amylase sowie die Gene *alpA* und *nprA*, kodierend für eine alkalische Protease (Alp) und die neutrale Metallo-Protease I (Npl) deletiert. Ebenfalls deletiert sind die Gensequenzen *cpa* und *aff*, welche in die Biosynthese von Cyclopiazonsäure und Aflatoxin involviert sind. Die Gensequenzen der an der Biosynthese von Kojisäure beteiligten Proteine sind mutiert. Der resultierende Empfängerorganismus *A. oryzae* BECh2 ist somit Amylase- und Protease-defizient sowie Aflatoxin- und Cyclopiazonsäure-negativ. Während die Produktion von Kojisäure nur unter diesbezüglich geeigneten Kultivationsbedingungen erfolgt und stark reduziert ist, bleibt diejenige von 3-Nitropropionsäure auch unter förderlichen Bedingungen aus.

## **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**

*A. oryzae* wird seit Jahrhunderten in China und Japan zur Herstellung von fermentierten Nahrungsmitteln wie z. B. Sojasauce, Miso (Sojabohnenpaste) und Sake (Reiswein) eingesetzt.

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

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

Der für die Transformation benutzte Vektor pCAHj621 ist abgeleitet von Plasmid pUC19 und enthält keine Antibiotikaresistenzgene.

Der Vektor enthält den Replikationsursprung *ori* des Plasmids pUC19 (Vieira und Messing, 1987), das Markergen *URA3* für die Orotidin-5'-Phosphat-Decarboxylase aus *Saccharomyces cerevisiae* (Rose *et al.*, 1984) des Plasmids pYES2 (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA), das Markergen *amdS* für die Acetamidase aus *Aspergillus nidulans* (Corrick *et al.*, 1987) des Plasmids p3SR2 (Prof. M. Hynes, Melbourne University) und die Sequenz *asnAO* für die Asparaginase aus *A. oryzae* A1560.

Die Expression der Sequenz *asnAO* wird durch den Promotor Pna2/tpi und den Terminator Tamg kontrolliert.

Der Promotor Pna2/tpi stammt vom Gen für die neutrale Amylase II aus *Aspergillus niger*. Der nicht translatierte 5'-Bereich dieses Gens wurde durch den nicht translatierten 5'-Bereich des Gens für die Triosephosphat-Isomerase von *Aspergillus nidulans* ersetzt.

Der Terminator Tamg stammt vom Gen *amgA* für die Amyloglycosidase aus *Aspergillus niger*.

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

Der Produktionsorganismus ist von den Enzympräparaten abgetrennt. Ein Gentransfer vom Produktionsorganismus zu anderen Organismen ist deshalb ausgeschlossen.

Die Anwesenheit genomischer DNA im aufgereinigten Enzymkonzentrat wurde in drei Chargen mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) untersucht. Dabei konnte, bei einer Nachweisgrenze von 100 ng genomischer DNA bzw. umgerechnet 380 pg rekombinanter DNA pro Gramm Enzymkonzentrat, kein Erbmateriale nachgewiesen werden. Zudem ist die in einem Teig enthaltene DNA oder die DNA auf der Oberfläche von Kaffeebohnen oder Kartoffelerzeugnissen dem Abbau durch Verarbeitungsprozesse wie dem Backvorgang, dem Frittieren, Rösten bzw. Braten 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 *A. oryzae* NZYM-SP enthält keine gentechnisch übertragenen Antibiotikaresistenz-Markergene. Ein Gentransfer solchen Erbmateriale 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 das Selektionsmarkergen *URA3* aus *Saccharomyces cerevisiae* und das Markergen *amdS* aus *Aspergillus nidulans*.

Die Selektion transformierter *Escherichia coli* basiert auf *URA3*, welches die Mutation *pyrF* im entsprechenden *E. coli*-Stamm komplementieren kann.

Die Selektion transformierter *A. oryzae* beruht auf dem Markergen *amdS*. Eine erfolgreiche Transformation des Empfängerorganismus *A. oryzae* BECh2 resultiert in der Produktion von Acetamidase. Positive Transformanten sind befähigt, sich auf Substraten zu vermehren, die Acetamid als alleinige Stickstoffquelle enthalten.

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

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

Das Enzym wird während des Verarbeitungsprozesses (Rösten, Backen, Frittieren oder Braten) hohen Temperaturen ausgesetzt und liegt im Endprodukt in inaktivierter Form vor.

### **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 Erbmaterial**

Der für die Transformation benutzte Vektor pCAHj621 enthält eine DNA-Sequenz codierend für die Asparaginase von *A. oryzae* A1560. Weiter umfasst der Vektor den Replikationsursprung *ori* des Plasmids pUC19 (Vieira und Messing, 1987), das Orotidin-5'-Phosphat-Decarboxylase-Markergen *URA3* aus *Saccharomyces cerevisiae* (Rose et al., 1984) des Plasmids pYES2 (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA) sowie das Acetamidase-Markergen *amdS* aus *Aspergillus nidulans* (Corrick et al., 1987) des Plasmids p3SR2 (Prof. M. Hynes, Melbourne University). Der Vektor enthält keine Antibiotikaresistenzgene.

Der Promotor Pna2/tpi stammt vom Gen für die neutrale Amylase II (NA2) aus *Aspergillus niger*. Der nicht translatierte 5'-Bereich dieses Gens wurde durch den nicht translatierten 5'-Bereich des Gens für die Triosephosphat-Isomerase (TPI) von *Aspergillus nidulans* ersetzt. Er ersetzt den nativen Promotor des *asnAO*-Gens des Spenderorganismus *A. oryzae* A1560 und reguliert die *asnAO*-Expression im Empfängerorganismus *A. oryzae* BECh2.

Die für das GVO-Erzeugnis Asparaginase codierende Sequenz *asnAO* mit einer Länge von 1137 bp stammt aus *A. oryzae* A1560.

Der Terminator Tamg stammt aus dem Amyloglucosidase-Gen *amgA* aus *Aspergillus niger*.

Die Herstellung des gentechnisch veränderten Produktionsstammes *A. oryzae* NZYM-SP erforderte einen Transformationsschritt und zwei Selektionsschritte.

Protoplasten des Empfängerorganismus *A. oryzae* BECh2 wurden durch Zugabe von Calciumchlorid und Polyethylenglykol mit dem Vektor pCAHj621 transformiert. Die Integration des Vektors erfolgte durch eine nicht homologe Rekombination an einer zufälligen Stelle im Genom von *A. oryzae* BECh2; dabei wurden mehrere Kopien, aber auch kürzere Fragmente des Vektors ins Genom integriert.

Die positiven Transformanten wurden auf selektiven Agarplatten mit Acetamid als alleiniger Stickstoffquelle identifiziert. In einem weiteren Screening wurden Stämme identifiziert, die eine erhöhte Produktion von Asparaginase aufwiesen.

Der rekombinante DNA-Abschnitt ist 7473 bp lang und enthält folgende Elemente:

Position (bp)	Grösse (bp)	Element	Ursprung
1 - 616	616	<i>Pna2/tpi</i>	<i>A. niger</i> / <i>A. nidulans</i>
617 - 627	11	Linker	synthetische DNA
628 - 1764	1137	<i>asnAO</i> , codierende Sequenz	<i>A. oryzae</i>
1765 - 1778	14	Linker	synthetische DNA
1779 - 2477	699	<i>Tamg</i>	<i>A. niger</i>
2478 - 5202	2725	<i>amdS</i>	<i>A. nidulans</i>
5203 - 6365	1163	pUC19	<i>E. coli</i>
6366 - 7473	1108	<i>URA3</i>	<i>S. cerevisiae</i>

Das Genom des gentechnisch veränderten Produktionsorganismus *A. oryzae* NZYM-SP zählt etwa 20 Kopien der codierenden Sequenz von *asnAO*. Eine Genkopie war bereits im Genom des Empfängerorganismus *A. oryzae* BECh2 enthalten; die weiteren Kopien wurden durch den Transformationsprozess ins Empfängergenom integriert. Im Vergleich zu *A. oryzae* BECh2 ist in *A. oryzae* NZYM-SP die Produktion von Asparaginase stark erhöht.

Weiter ist *A. oryzae* NZYM-SP frei von Antibiotikaresistenz-Markergenen und aufgrund von Gendelektionen Protease- und Amylase-defizient sowie Aflatoxin- und Cyclopiazonsäure-negativ. Aufgrund seiner Proteasedefizienz kann der Produktionsstamm NZYM-SP die sekretierten Proteine im Fermentationsmedium nicht abbauen. Die Amylasedefizienz des Produktionsorganismus bewirkt, dass die Aktivität des GVO-Erzeugnisses Asparaginase nicht beeinträchtigt wird. Die Produktion von Kojisäure erfolgt nur unter diesbezüglich geeigneten Kultivationsbedingungen und ist stark reduziert. Die Bildung von 3-Nitropropionsäure bleibt auch unter förderlichen Bedingungen aus. In vier unter industriellen Bedingungen produzierten Chargen waren weder Kojisäure noch 3-Nitropropionsäure nachweisbar.

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

Mehrere Kopien des Vektors pCAHj621 wurden durch eine nicht homologe Rekombination an einer zufälligen Stelle ins Genom von Empfängerorganismus *A. oryzae* BECh2 integriert. Der Produktionsstamm *A. oryzae* NZYM-SP enthält insgesamt 20 Kopien des offenen Leserasters des Gens *asnAO*.

#### 4.2. Angaben über das endgültige GVO-Erzeugnis

##### *Funktion und Eigenschaften des GVO-Erzeugnisses Asparaginase*

Das GVO-Erzeugnis Asparaginase (L-Asparagin-Amidohydrolase; EC 3.5.1.1; CAS 9015-68-3) katalysiert als Tetramer die Spaltung der freien Aminosäure L-Asparagin in L-Asparaginsäure und Ammoniak. Für die Reaktion werden keine Cofaktoren benötigt. Weiter weist das Enzym keine Aktivität auf Asparaginreste in Peptiden oder Proteinen auf.

Das aufgereinigte flüssige Enzymkonzentrat von GVO-Erzeugnis Asparaginase wurde auf folgende Enzymaktivitäten getestet: Protease, alpha-Amylase, Lipase, Cellulase, Peroxidase und

Glucoamylase. Die nachgewiesenen Aktivitäten sind nur geringfügig und für die Anwendung in der Lebensmittelverarbeitung nicht relevant. Auch haben sie keinen Einfluss auf die Stabilität des Enzyms.

Das GVO-Erzeugnis Asparaginase soll in der Lebensmittelproduktion als Verarbeitungshilfsstoff eingesetzt werden, um den Gehalt an Acrylamid in Lebensmitteln zu reduzieren. In Ländern, in denen das Enzym im Verkehr ist, verwendet es die Lebensmittelindustrie bei der Kaffeeverarbeitung, der Herstellung von Kartoffelerzeugnissen und Backwaren sowie anderen Lebensmittelprodukten aus Getreide.

Die DNA-Sequenz codierend für die extrazelluläre Asparaginase ist 1137 bp lang und stammt aus dem Spenderorganismus *A. oryzae* A1560.

Das unreife Genprodukt zählt 378 Aminosäuren und enthält am N-Terminus ein Signalpeptid mit einer Länge von 19 Aminosäuren, das abgespalten wird.

Der Produktionsorganismus *A. oryzae* NZYM-SP sezerniert das reife GVO-Erzeugnis Asparaginase mit einer Länge von 359 Aminosäuren ins Fermentationsmedium. Es handelt sich hierbei um ein Glykoprotein. *Aspergillus* sp. können Proteine posttranslational glykosylieren (Deshpande *et al.*, 2008, Maras *et al.*, 1999, Ward *et al.*, 2005).

Die biochemischen Eigenschaften des GVO-Erzeugnisses Asparaginase entsprechen denjenigen des nativen Enzyms von *A. oryzae* A1560: das Protein ist bis zu einer Temperatur von 60°C stabil, die Enzymaktivität bleibt bei einem pH-Wert zwischen 2 und 11 erhalten. Bei einem pH-Wert von 7 liegt das Temperatur-Optimum der Asparaginase bei 50°C, bei einer Temperatur von 37°C liegt ihr pH-Optimum zwischen 6 und 7.

Das theoretische Molekulargewicht des reifen Enzyms (Monomer) beträgt 37.7 kDa. Die Polyacrylamid-Gelelektrophorese ergab für das Molekulargewicht des deglykosylierten Proteins einen Wert von ungefähr 40 kDa.

#### *Herstellungsprozess*

Die Herstellung des GVO-Erzeugnisses Asparaginase erfolgt durch Submersfermentation im Zulaufverfahren in einem geschlossenen System (Fermenter) nach den Leitlinien der Guten Herstellungspraxis (Good Manufacturing Practice, GMP).

Das für die Fermentation verwendete Nährmedium enthält Kohlenstoff- und Stickstoffverbindungen sowie Mineralstoffe. Die Komponenten des Nährmediums (Rohmaterialien sowie Zusatzstoffe und Stabilisatoren) erfüllen die Anforderungen an Lebensmittel.

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 durch Zugabe von Glycerol, Natriumbenzoat und Kaliumsorbat stabilisiert und haltbar gemacht. Nach einer letzten Entkeimungsfiltration wird das aufgereinigte flüssige Enzymkonzentrat in die gewünschte standardisierte Formulierung (Granulat bzw. Flüssigkeit) übergeführt.

In der Schweiz sollen folgende drei Enzymformulierungen des GVO-Erzeugnisses Asparaginase in den Verkauf gelangen: Acrylaway L, Acrylaway 3500 BG und Acrylaway 3500 BG Wheat free. Diese drei Enzympräparate werden ausschliesslich an Fachpersonen in der Lebensmittel verarbeitenden Industrie, namentlich der Kaffee- und Kartoffelverarbeitungsindustrie sowie der Backwarenindustrie und der Getreide verarbeitenden Industrie, abgegeben.

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

### Reinheit des GVO-Erzeugnisses Asparaginase

Eine Charge eines aufgereinigten Enzymkonzentrates, aus drei Fermenterchargen hergestellt und als PPV 24743 bezeichnet, wurde chemisch analysiert. Das Material wurde nicht weiter bearbeitet, d. h. weder stabilisiert noch standardisiert. Die Analyse ergab folgende Zusammensetzung:

Parameter	Wert
Enzymaktivität des Präparates	4440 ASNU <sup>3</sup> /g
Organische feste Bestandteile (Total Organic Solids, TOS)	8.4 % (w/w)
Wasser	89.5 %
Asche	2.1 %
N <sub>tot</sub>	5.9 %
Schwermetalle (Ag, Bi, Cd, Cu, Hg, Mo, Ni, Pb, Sn), Halbmetalle (As, Sb), gesamt	3.9 ppm
Pb	< 1 ppm
As	< 0.1 ppm
Cd	< 0.05 ppm
Hg	< 0.03 ppm

Zu den organischen Feststoffen (Total Organic Solids, TOS<sup>4</sup>) zählen neben dem GVO-Erzeugnis Asparaginase auch andere Proteine und Kohlenhydrate, die aus dem Fermentationsprozess stammen. Das GVO-Erzeugnis Asparaginase machte ungefähr 31 Gewichtsprozent der TOS aus.

Die Enzympräparate Acrylaway L, Acrylaway 3500 BG und Acrylaway 3500 BG Wheat free entsprechen den von JECFA (JECFA, 2018) und FCC (FCC, 2004) empfohlenen Reinheitsspezifikationen für Lebensmittelenzyme.

#### 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 Asparaginase nicht anwendbar.

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

Der Produktionsorganismus *A. oryzae* NZYM-SP wurde mittels Southern-Blot-Analyse auf seine genetische Stabilität unter industriellen Herstellungsbedingungen überprüft. Die Resultate aus drei Produktionschargen zeigten übereinstimmend die Anwesenheit von mehreren Kopien des Transgens in den Zellen von *A. oryzae* NZYM-SP am Ende des Fermentationsprozesses auf.

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

<sup>3</sup> Die Aktivität des Enzympräparates wird in Asparaginase-Units (ASNU) gemessen. Eine ASNU ist die Enzymmenge, die erforderlich ist, um unter festgelegten Bedingungen aus L-Asparagin als Edukt ein µmol Ammoniak pro Minute zu produzieren.

<sup>4</sup> Berechnung des TOS-Wertes in Prozent: TOS (%) = 100 – A – W – D; (A = % Asche; W = % Wasser; D = % Verdünnungsmittel und andere Trägersubstanzen)

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

Das GVO-Erzeugnis Asparaginase machte in der Charge PPV 24743 ungefähr 31 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 *A. oryzae* wird in Asien seit mehreren Jahrhunderten bei der Herstellung von fermentierten Lebensmitteln, z. B. Sojasauce, Sake und Miso, verwendet. In den USA kommen seit 1918 Enzyme von *A. oryzae* bei der industriellen Lebensmittelverarbeitung zum Einsatz (Beckhorn et al., 1965). Das JECFA evaluierte im Jahre 1987 die Lebensmittelsicherheit von *A. oryzae*. Das Komitee kam zum Schluss, dass sowohl der Mikroorganismus als auch seine exprimierten Enzyme als Bestandteile von Lebensmitteln betrachtet werden können (WHO, 1987).

Seit über 15 Jahren setzt Novozymes den gentechnisch veränderten Empfängerorganismus *A. oryzae* BECh2 zur Herstellung von rekombinanten Lebensmittelenzymen ein. Inzwischen sind vier verschiedene Enzymprodukte im Handel erhältlich.

#### *Toxische Auswirkungen des GVO-Erzeugnisses Asparaginase*

Das GVO-Erzeugnis Asparaginase wurde drei toxikologischen Prüfungen (13-Wochen-Fütterungsstudie, Mutagenitäts- und Chromosomenaberrationstest) unterzogen. Für die Experimente wurde Enzymkonzentrat der Charge PPV 24743 verwendet.

#### *13-Wochen-Fütterungsstudie*

Die 13-Wochen-Fütterungsstudie mit Ratten wurde nach der OECD-Richtlinie 408 (1998) von der Firma Huntingdon Life Sciences Ltd. (Huntingdon, UK) durchgeführt.

Enzymkonzentrat der Charge PPV 24743 wurde 80 Versuchstieren (40 männliche und 40 weibliche Ratten) in unterschiedlicher Konzentration (10, 33 bzw. 100 % Enzymkonzentrat) oral verabreicht. Dies entspricht 0.088, 0.29 bzw. 0.88 g TOS pro Kilogramm Körpergewicht und Tag (bzw. 4658, 15370 und 46576 ASNU). Als Kontrolle diente Wasser. Jede Dosis wurde an je zehn männlichen und weiblichen Ratten geprüft.

Folgende Parameter wurden untersucht:

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

Die orale Aufnahme von Asparaginase bis zu einer Dosis von 0.88 g TOS pro Kilogramm Körpergewicht und Tag wurde gut vertragen. Toxische Auswirkungen auf die Versuchstiere wurden keine festgestellt. Im Einzelnen wurden folgende Befunde festgestellt:

Die Griffstärke des Vorderbeins von männlichen Ratten aus der hohen Dosisgruppe war im Vergleich zur Kontrollgruppe statistisch signifikant erhöht. Die durchschnittliche Griffstärke des Vorderbeins dieser Dosisgruppe lag jedoch im Bereich der Erfahrungswerte früherer toxikologischer Studien. Die männlichen Tiere zeigten keine Verhaltensstörungen. Bei den weiblichen Tieren wurden zwischen den Verfahren keine signifikanten Unterschiede bezüglich Griffstärke verzeichnet. Dieser Befund wurde deshalb nicht mit dem Versuch in Verbindung gebracht.

In Bezug auf klinische Symptome, Körpergewicht, Futter- und Wasseraufnahme, Futterverwertung sowie den Resultaten der Ophthalmoskopie ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Verfahren.

Die hämatologischen Untersuchungen ergaben, dass die durchschnittlichen Gehalte an Erythrozyten und Hämoglobin in männlichen Tieren der mittleren und hohen Dosisgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe statistisch signifikant vermindert waren, aber nicht in Beziehung zur verabreichten Dosis standen. Solche Befunde waren bei den weiblichen Versuchstieren nicht zu verzeichnen. Weiter zeigten die Blutuntersuchungen, dass die durchschnittliche Gesamtzahl an Leukozyten bei den behandelten weiblichen Gruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe statistisch signifikant geringer war. Der Unterschied stand aber nicht in Beziehung zur verabreichten Dosis. Bei den männlichen Versuchstieren war kein solcher Befund zu verzeichnen.

Die behandelten weiblichen Gruppen wiesen zudem im Vergleich zur Kontrollgruppe eine geringere Anzahl Basophile auf. Die partielle Thromboplastinzeit war ebenfalls reduziert. Die Werte dieser Parameter befanden sich bei der Kontrollgruppe nahe dem oberen Grenzbereich von Erfahrungswerten. Die statistisch signifikanten Unterschiede standen nicht in Beziehung zur verabreichten Dosis. Keiner dieser Befunde wurde bei den männlichen Versuchstieren festgestellt.

Die Kaliumkonzentration im Plasma von männlichen Tieren der mittleren und hohen Dosisgruppe sowie von weiblichen Tieren der hohen Dosisgruppe war statistisch signifikant erhöht. Dies wurde mit dem Versuch in Verbindung gebracht. Es wurden jedoch keine weiteren Veränderungen der Elektrolytkonzentration im Plasma festgestellt, und die Nieren wiesen weder pathologische noch histopathologische Befunde auf. Die statistisch signifikante Zunahme an Kalium im Plasma ist somit nicht von toxikologischer Bedeutung.

Zwischen den behandelten Tieren und den Kontrollgruppen wurden in Bezug auf Organgewichte und histologische Untersuchungen keine statistisch signifikanten Unterschiede beobachtet, die mit dem Versuch in Verbindung gebracht werden konnten.

Die Resultate der Verfahren zeigen somit keine relevanten biologischen Unterschiede auf. Damit entspricht die höchste in der 13-Wochen-Fütterungsstudie an Ratten getestete Dosis von 0.88 g 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 die Charge PPV 24743 Histidin und Tryptophan in freier Form enthielt, wurde die „treat-and-plate“-Methode verwendet.

Für die Untersuchung wurden Teststämme von *Salmonella typhimurium* (TA98, TA100, TA1535, TA1537) und *Escherichia coli* (WP2uvrApKM101) eingesetzt, um die mutagene Aktivität der Charge PPV 24743 (mit und ohne metabolischer Aktivierung durch S9-Mix) zu überprüfen.

Der Rückmutationstest ergab keinen Hinweis auf mutagene Komponenten in der Charge PPV 24743.

#### *In vitro Test auf Chromosomenaberrationen*

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

Ein möglicher genotoxischer Effekt von Material der Charge PPV 24743 (mit und ohne metabolischer Aktivierung durch den S9-Mix aus Rattenleber) auf menschliche periphere Blutlymphozyten wurde geprüft.

Die Resultate der toxikologischen Untersuchungen mit dem Enzybatch PPV 24743 ergaben keinen Hinweis auf toxische oder genotoxische Effekte.



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

Untersuchungen bezüglich der Aminosäuresequenz der Asparaginase aus *A. oryzae* und den Sequenzen der Proteindatenbanken SWISS-PROT und TrEMBL bzw. den translatierten Nukleotidsequenzen der DNA-Sequenzdatenbank GenBank, welche in ihrem Beschrieb das Wort „toxin“ enthalten, ergaben keinen Hinweis auf relevante Homologien zu bekannten Toxinen.

#### *Allergenes Potential des GVO-Erzeugnisses Asparaginase*

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

Untersuchungen der Homologie der Aminosäuresequenz der Asparaginase aus *A. oryzae* und den Proteinsequenzen der Datenbanken SWISS-PROT, TrEMBL und GenBank, welche in ihrem Beschrieb das Wort „allergen“ enthalten, ergaben keinen Hinweis auf relevante Sequenzhomologien zu bekannten Allergenen. Die Datenbanken SWISS-PROT, TrEMBL und GenBank wurden auf homologe Aminosäuresequenzen mit einer Länge von vier bis acht Aminosäureresten untersucht. Die Suche nach Homologien mit einer Länge von mehr als sechs Aminosäuren ergab keine Treffer.

Die Suche nach Homologien in kurzen Abschnitten der Aminosäuresequenz der Asparaginase aus *A. oryzae* ergab somit keine Resultate, die auf eine mögliche Allergenität hinweisen würden.

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

Abschnitte von 80 Aminosäuren der Sequenz der Asparaginase 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 GMO Panel, 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 Asparaginase 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 Asparaginase in Lebensmitteln.

#### **4.4.2. Produktrisiken**

Die als Verarbeitungshilfsstoffe eingesetzten Enzympräparate Acrylaway L (Flüssigkeit) sowie Acrylaway 3500 BG und Acrylaway 3500 BG Wheat free (Granulate) können bei der Kaffeeverarbeitung, der Herstellung von Kartoffelerzeugnissen, Backwaren und anderen Nahrungsmitteln aus Getreide eingesetzt werden. In Abhängigkeit vom Herstellungsprozess kommt die flüssige Enzymformulierung oder das Granulat zum Einsatz. In den Lebensmitteln entstehen

dadurch keine Reaktionsprodukte, die nicht als konventionelle Lebensmittelbestandteile angesehen werden können. Die Asparaginase wird während des Verarbeitungsprozesses (Rösten, Backen, Frittieren oder Braten) hohen Temperaturen ausgesetzt. Im Endprodukt liegt das Enzym in inaktivierter Form vor.

Die Expositionsabschätzung des GVO-Erzeugnisses Asparaginase erfolgte unter den konservativen Annahmen zum Lebensmittelkonsum gemäss der „budget method“ (FAO/WHO, 2009). Diese Methode wurde verwendet, um die theoretische maximale tägliche Aufnahme (Theoretical Maximum Daily Intake, TMDI) von Asparaginase über Lebensmittel abzuschätzen. Die Angaben zu den maximalen täglichen Verzehrmenen von festen und flüssigen Lebensmitteln basieren auf Annahmen über den maximalen physiologischen Bedarf an Flüssigkeit und Energie eines zweijährigen Kindes, entsprechend 100 ml flüssige und 50 g feste Lebensmittel pro kg Körpergewicht (Hansen, 1979). Diese Annahmen wurden auf eine Person mit einem Standardgewicht von 60 kg übertragen, was einem täglichen Konsum von 3 kg festen und 6 L flüssigen Lebensmittel entspricht

Die Sicherheitsmarge der Exposition (Margin of Exposure, MoE) als Verhältnis des NOAEL zur TMDI wurde berechnet. Lebensmittelenzyme mit einer Sicherheitsmarge von mindestens 300 werden aus toxikologischer Sicht als unbedenklich für die menschliche Gesundheit bewertet (EFSA CEF Panel, 2016).

Der anhand der subchronischen oralen Toxizitätsstudie mit Ratten ermittelte NOAEL des GVO-Erzeugnisses Asparaginase beträgt 880 mg TOS pro kg Körpergewicht und Tag. Das in der Sicherheitsstudie verwendete Material, als Produkt der Fermentation aus *A. oryzae* NZYM-SP (im Folgenden Fermentationsprodukt genannt), enthielt 8.4 % (w/w) TOS und wies eine Enzymaktivität von 4440 ASNU/g auf, also etwa 53,000 ASNU/g TOS (Fermentationsprodukt). Diese Werte werden zur Schätzung der täglichen Gesamtaufnahme verwendet.

Die Berechnung des TMDI-Wertes erfolgte unter folgenden Annahmen:

#### *Feste Lebensmittel*

Eine Person mit einem Standardgewicht von 60 kg konsumiert 50 g feste Lebensmittel pro kg Körpergewicht und Tag. 50 % der festen Lebensmittel sind verarbeitet. Der tägliche Konsum von festen verarbeiteten Lebensmitteln pro kg Körpergewicht beträgt somit 25 g.

Die höchste empfohlene Enzymdosierung in Backwaren und Kartoffelerzeugnissen beträgt 4000 ASNU pro kg. Dies entspricht einer Menge von 0.9 g Fermentationsprodukt pro kg Backwaren oder Kartoffelerzeugnisse und damit einer Menge von 75.7 mg TOS (Fermentationsprodukt).

Unter der Annahme, dass eine Person mit einem Standardgewicht von 60 kg täglich 1500 g feste verarbeitete Lebensmittel konsumiert, ergibt sich eine Aufnahme von 1.893 mg TOS (Fermentationsprodukt) pro kg Körpergewicht und Tag.

#### *Flüssige Lebensmittel*

Die tägliche Einnahme von flüssigen Lebensmitteln beträgt 100 mL pro kg Körpergewicht. 25 % der flüssigen Lebensmittel sind verarbeitet. Der tägliche Konsum von flüssigen verarbeiteten Lebensmitteln beträgt somit 25 mL pro kg Körpergewicht.

Die Berechnung des TMDI basiert auf der Annahme, dass die gesamte Menge an eingenommenen verarbeiteten flüssigen Lebensmitteln in Form von Kaffee eingenommen wird. Für 1 L Kaffee werden 75 g grüne Kaffeebohnen benötigt. Die höchste empfohlene Enzymdosierung für die Behandlung von grünen Kaffeebohnen beträgt 3500 ASNU pro Kilogramm.

Unter der Annahme, dass eine Person mit einem Standardgewicht von 60 kg täglich 1.5 L Kaffee konsumiert, ergibt sich eine Aufnahme von 0.124 mg TOS (Fermentationsprodukt) pro kg Körpergewicht und Tag.

Unter dieser konservativen Annahme, dass bei 50 % der festen und 25 % der flüssigen Lebensmittel während des Herstellungsprozesses das GVO-Erzeugnis Asparaginase als Verarbeitungshilfsstoff in der höchsten empfohlenen Enzymdosierung zum Einsatz kommt und auch im Lebensmittel verbleibt bzw. ins Lebensmittel gelangt, beträgt der TMDI-Wert für eine 60 kg schwere Person insgesamt 2.017 mg TOS (Fermentationsprodukt) pro kg Körpergewicht und Tag.

Basierend auf diesen Annahmen und dem NOAEL von 880 mg TOS (Fermentationsprodukt) pro kg Körpergewicht und Tag im Tierversuch ergibt sich für eine 60 kg schwere Person bei genanntem Lebensmittelkonsum eine MoE von 436. Dieser Wert übertrifft den Wert von 300. Für den Endverbraucher dieser Erzeugnisse bestehen somit keine gesundheitlichen Bedenken.

Die Sicherheitsmarge der Exposition wurde ebenfalls für Kleinkinder berechnet. Unter der Annahme, dass ein Kleinkind mit einem Körpergewicht von 15 kg 50 g feste Lebensmittel pro kg Körpergewicht und Tag konsumiert (Hansen, 1979) und 50 % der festen Lebensmittel verarbeitet sind, beträgt der tägliche Konsum von festen verarbeiteten Lebensmitteln 25 g pro kg Körpergewicht bzw. 375 g.

Somit ergibt sich eine Aufnahme von 1.893 mg TOS (Fermentationsprodukt) pro kg Körpergewicht und Tag. Ein Konsum von Kaffee wird bei Kleinkindern nicht angenommen.

Basierend auf diesen Annahmen und dem NOAEL von 880 mg TOS (Fermentationsprodukt) pro kg Körpergewicht und Tag im Tierversuch ergibt sich für ein Kleinkind beim Verzehr von festen verarbeiteten Lebensmitteln ein MoE von 465. Es kann somit auch hier von der Unbedenklichkeit der Verwendung der Asparaginase als Verarbeitungshilfsstoff ausgegangen werden.

#### **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 Spender- bzw. Empfängerorganismus *Aspergillus oryzae* wird der Risikogruppe 2 (Organismen, die ein geringes Risiko für die menschliche Gesundheit und Umwelt darstellen) zugeteilt und gilt als nicht pathogen (Barbesgaard et al., 1992, WHO, 1987).

Der gentechnisch veränderte Produktionsorganismus *A. oryzae* NZYM-SP produziert unter industriellen Herstellungsbedingungen keine toxischen Sekundärmetaboliten.

Das aufgereinigte Enzymkonzentrat von GVO-Erzeugnis Asparaginase ist frei von lebenden bzw. intakten Zellen des Produktionsorganismus *A. oryzae* NZYM-SP.

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

Die biochemischen Eigenschaften des GVO-Erzeugnisses Asparaginase entsprechen denjenigen des nativen Enzyms von *A. oryzae* A1560.

## **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 Acrylaway L, Acrylaway 3500 BG und Acrylaway 3500 BG Wheat free können beim Hersteller Novozymes Schweiz bezogen werden.

### **5.2. Qualitätssicherungssystem bezüglich:**

#### **5.2.1. Allergenität**

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

Die Sicherheitsdatenblätter der Enzympräparate Acrylaway L, Acrylaway 3500 BG und Acrylaway 3500 BG Wheat free entsprechen den Vorschriften der EU-Verordnung Nr. 453/2010 der Kommission zur Änderung der EG-Verordnung Nr. 1907/2008 zur Registrierung, Bewertung, Zulassung und Beschränkung chemischer Stoffe (REACH) und sind in erster Linie für den beruflichen Verwender bestimmt.

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

Die biochemischen Eigenschaften des GVO-Erzeugnisses Asparaginase entsprechen denjenigen des nativen Enzyms. Weiter ergaben die toxikologischen Studien keinen Hinweis auf ein toxisches Potential.

Die Aktivität der Enzympräparate Acrylaway L, Acrylaway 3500 BG und Acrylaway 3500 BG Wheat free wird routinemässig überprüft. Die entsprechenden Analysen bezwecken die Bestätigung der Konformität der Enzymformulierungen mit den von JECFA und FCC empfohlenen Reinheitsspezifikationen für Lebensmittelenzyme.

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

Der Produktionsstamm *A. oryzae* NZYM-SP enthält keine gentechnisch eingebrachten Antibiotikaresistenzgene. Die Abwesenheit einer antibiotischen Aktivität des Enzympräparates wird regelmässig überprüft.

#### **5.2.4. Biologische Stabilität**

Der Produktionsorganismus *A. oryzae* NZYM-SP ist biologisch stabil.

Die Aufbewahrung von *A. oryzae* NZYM-SP zur Kultivierung erfolgt entweder als Glycerolkultur bei -80 °C oder als Lyophilisat. 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 *A. oryzae* NZYM-SP 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 *A. oryzae* NZYM-SP enthält keine gentechnisch übertragenen Antibiotikaresistenz-Markergene. 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 *A. oryzae* NZYM-SP erfolgt ausschliesslich im Ausland im 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 Asparaginase erfolgt nach den Regeln der Guten Herstellungspraxis. Ausserdem unterhält das Unternehmen Novozymes A/S für ihre Enzymproduktion ein ISO 9001:2008-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 Asparaginase aus *A. oryzae* NZYM-SP hergestellt wurden, nach dem Stand der Wissenschaft ausgeschlossen werden kann.

Einer Bewilligung für die Verwendung des Verarbeitungshilfsstoffes Asparaginase in der Herstellung von Lebensmitteln (Kaffee, Kartoffelerzeugnissen, Backwaren sowie anderen Nahrungsmitteln aus Getreide) steht aus Sicht des Gesundheitsschutzes nichts entgegen.

## Referenzen

- Aberer, W, Hahn, M, Lkade, M, Seebacher, U, Spök, A, Wallner, K und Witzani, H (2002). "Collection of information of enzymes. Final report." European Community.
- Barbesgaard, P, Heldt-Hansen, HP und Diderichsen, B (1992). "On the safety of *Aspergillus oryzae*: a review." *Appl. Microbiol. Biotechnol* **36**(5): 569-572.
- Beckhorn, EJ, Labee, MD und Underkofler, LA (1965). "Production and Use of Microbial Enzymes for Food Processing." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **13**: 30-34.
- Blumenthal, CZ (2004). "Production of toxic metabolites in *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, and *Trichoderma reesei*: justification of mycotoxin testing in food grade enzyme preparations derived from the three fungi." *Regul. Toxicol. Pharmacol* **39**(2): 214-228.
- Corrick, CM, Twomey, AP und Hynes, MJ (1987). "The nucleotide sequence of the *amdS* gene of *Aspergillus nidulans* und the molecular characterization of 5' mutations." *Gene* **53**(1): 63-71.
- Deshpande, N, Wilkins, MR, Packer, N und Nevalainen, H (2008). "Protein glycosylation pathways in filamentous fungi." *Glycobiology* **18**(8): 626-637.
- EFSA Panel on Food Contact Material, Enzymes, Flavourings and Processing Aids CEF (2014a). "Scientific Opinion on Lipase from a Genetically Modified Strain of *Aspergillus oryzae* (strain NZYM-FL)." *EFSA Journal* **12**(7):3762.
- EFSA Panel on Food Contact Material, Enzymes, Flavourings and Processing Aids CEF (2014b). "Scientific Opinion on Lipase from a Genetically Modified Strain of *Aspergillus oryzae* (strain NZYM-LH)." *EFSA Journal* **12**(7):763.
- EFSA Panel on Food Contact Material, Enzymes, Flavourings and Processing Aids CEF (2014c). "Scientific Opinion on lipase from a genetically modified strain of *Aspergillus oryzae* (strain NZYM-AL)." *EFSA Journal* **12**(7):3778.
- EFSA Panel on Food Contact Material, Enzymes, Flavourings and Processing Aids CEF (2016). "Draft Statement on Exposure Assessment of Food Enzymes." *EFSA Journal*.
- EFSA Panel on Genetically Modified Organisms GMO (2010). "Scientific Opinion on the assessment of allergenicity of GM plants and microorganisms and derived food and feed." *EFSA Journal* **8**(7): 1700.
- FAO/WHO (2009). "Principles and methods for the risk assessment of chemicals in food, Chapter 6: Dietary exposure assessment of chemicals in food." *Environmental Health Criteria* 240.
- FCC. Food Chemicals Codex. (2004). *Food Chemicals Codex, Enzyme Preparations, General Requirements*. Washington, National Academy Press
- Hansen, SC (1979). "Conditions for Use of Food Additives Based on a Budget for an Acceptable Daily Intake 1." *Journal of Food Protection* **42**(5): 429-434.
- JECFA. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. "General Specifications and Considerations for Enzyme Preparations Used in Food Processing." (in Online Edition of "Combined Compendium of Food Additive Specification") (2018).
- Jørgensen, TR (2007). "Identification and toxigenic potential of the industrially important fungi, *Aspergillus oryzae* and *Aspergillus sojae*." *J. Food Prot* **70**(12): 2916-2934.
- Maras, M, van Die, I, Contreras, R und van den Hondel, CA (1999). "Filamentous fungi as production organisms for glycoproteins of bio-medical interest." *Glycoconj J* **16**(2): 99-107.

Olempska-Beer, ZS (2007). "Asparaginase from *Aspergillus oryzae* encoded by the asparaginase gene from *A. oryzae*." 68th JECFA - Chemical and Technical Assessment (CTA).

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.

Rizzi, A, Raddadi, N, Sorlini, C, Nordgrd, 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.

Rose, M, Grisafi, P und Botstein, D (1984). "Structure and function of the yeast URA3 gene: expression in Escherichia coli." Gene **29**(1-2): 113-124.

Tominaga, M, Lee, YH, Hayashi, R, Suzuki, Y, Yamada, O, Sakamoto, K, Gotoh, K und Akita, O (2006). "Molecular analysis of an inactive aflatoxin biosynthesis gene cluster in *Aspergillus oryzae* RIB strains." Appl Environ Microbiol **72**(1): 484-490.

Vieira, J und Messing, J (1987). "Production of single-stranded plasmid DNA." Methods Enzymol **153**: 3-11.

Ward, OP, Qin, WM, Dhanjoon, J, Ye, J und Singh, A (2005). "Physiology and Biotechnology of *Aspergillus*." Adv. Appl. Microbiol **58C:1-75**.: 1-75.

WHO (1987). "Evaluation of certain food additives and contaminants." WHO Technical Report Series No. 759: 16-17.

WHO (2007). "Evaluation of certain food additives and contaminants." WHO Technical Report Series No. 947.