



МИНИСТЕРСТВО НА ЗЕМЕДЕЛИЕТО, ХРАНИТЕ И ГОРИТЕ
ЦЕНТЪР ЗА ОЦЕНКА НА РИСКА ПО ХРАНИТЕЛНАТА
ВЕРИГА

Оценка на безопасността на хранителния ензим каталаза от генетично модифициран щам *Aspergillus niger* щам DP-Azw58, извършена от Европейския орган по безопасност на храните

Хранителният ензим каталаза (водороден-пероксид: водороден-пероксид оксидоредуктаза; ЕС 1.11.1.6) е произведен с генетично модифициран *Aspergillus niger* щам DP -Azw58 от Danisco US, Inc. Генетичната модификация не поражда опасения във връзка с безопасността. Този хранителен ензим се счита за свободен от жизнеспособни клетки на производствения организъм и неговата ДНК. Предназначен е за употреба при преработката на яйца. Въз основа на максималните нива на употреба, Европейския орган по безопасност на храните (ЕОБХ) изчислява експозицията на хранителния ензим – обща органична материя в състояние на суспензия (total organic solids, TOS) до 1 µg TOS/kg телесно тегло (т.т.) на ден при европейското население. Тестовите за генотоксичност не показват причини за заплаха за безопасността. Системната токсичност е оценена чрез 9 -дневно перорално изследване за токсичност при плъхове с многократна доза. Панелът СЕР¹ на ЕОБХ установи ниво без наблюдаван неблагоприятен ефект при най-високата тествана доза от 1 288 mg TOS/kg т.т. на ден. Тази доза, при сравнение с прогнозната хранителна експозиция, води до резултат за граница на експозиция от най-малко $1,3 \times 10^6$. При извършеното търсене за сходство между аминокиселинната последователност на хранителния ензим и такава при известни алергени е намерено едно съвпадение. Панелът СЕР счита, че при предвидените условия на употреба рискът от алергична сенсibiliзация и реакции чрез експозиция с храната не може да бъде изключен, но вероятността това да се случи се счита за ниска. Въз основа на предоставените данни, Панелът СЕР заключава, че този хранителен ензим не поражда опасения за безопасността при предвидените условия на употреба.

Въведение

Член 3 от Регламент (ЕО) № 1332/2008² дава определение за „хранителен ензим“ и „Ензимен препарат в храна“.

¹ Експертна група на ЕОБХ по материали, предназначени за контакт с храни, ензими, аромати и спомагателни средства за обработка (Panel on Food Contact Materials, Enzymes and Processing Aids, СЕР)

² Регламент (ЕО) № 1332/2008 на Европейския парламент и на Съвета от 16 декември 2008 година относно ензимите в храните и за изменение на Директива 83/417/ЕИО на Съвета, Регламент (ЕО) № 1493/1999 на Съвета, Директива 2000/13/ЕО, Директива 2001/112/ЕО на Съвета и Регламент (ЕО) № 258/97

гр. София, 1618, бул. "Цар Борис III" № 136

<http://corhv.government.bg>, corhv@mzh.government.bg

тел. 02/4273056



„Ензим в храна“ означава продукт, получен от растения, животни или микроорганизми, или продукти от тях, включително продукт, получен чрез ферментационен процес, използващ микроорганизми:

- i) съдържащ един или повече ензими, способни да катализират конкретна биохимична реакция; и
- ii) вложен в храна с технологична цел, на който и да е етап от производството, преработката, приготвянето, обработката, опаковането, транспортирането или съхранението на храни;

„Ензимен препарат в храна“ означава формула, състояща се от един или повече ензими в храните, в които са включени вещества като добавки в храните и/или други хранителни съставки за улесняване на тяхното съхранение, продажба, стандартизация, разреждане или разтваряне.

Преди януари 2009 г., хранителните ензими, различни от тези, използвани като хранителни добавки, не са били регулирани или са били регламентирани като помощни средства за обработка съгласно законодателството на държавите членки на Европейския съюз (ЕС). На 20 януари 2009 г., влиза в сила Регламент (ЕО) № 1332/2008 относно ензимите в храните. Този регламент се прилага за ензими, които се добавят към дадени храни за изпълнение на технологична функция при производството, преработката, приготвяне, третиране, опаковане, транспорт или съхранение на такива храни, включително ензими, използвани като помощни средства за обработка. Регламент (ЕО) № 1331/2008³ установява процедурите на Европейския съюз (ЕС) за оценка на безопасността и процедурата за разрешаване на добавки в храните, хранителни ензими и ароматизатори. Използването на хранителен ензим се разрешава само ако се докаже, че:

- не представлява опасност за здравето на потребителя при предложеното ниво на употреба;
- има разумна технологична необходимост;
- използването му не подвежда потребителя.

Всички хранителни ензими, които в момента са на пазара на Европейския съюз и са предназначени да останат на този пазар, както и всички нови хранителни ензими, ще бъдат подложени на оценка на безопасността от ЕОБХ и на одобрение чрез включване в Общият списък на ЕС. „Ръководство за представяне на досие за хранителни ензими

³ Регламент (ЕО) № 1331/2008 на Европейския парламент и на Съвета от 16 декември 2008 година за установяване на обща разрешителна процедура за добавките в храните, ензимите в храните и ароматизантите в храните

гр. София, 1618, бул. "Цар Борис III" № 136

<http://corhv.government.bg>, corhv@mzh.government.bg

тел. 02/4273056



за оценка на безопасността“ на ЕОБХ определя необходимите административни, технически и токсикологични данни.

Заявителят е предоставил досие в подкрепа на заявлението за разрешаване на хранителния ензим катализа от генетично модифициран *A. niger* (щам DP-Azw58).

Методологии

Оценката на предложения хранителен ензим е извършена в съответствие с принципите, описани в „Ръководство на ЕОБХ за прозрачност в научните аспекти на оценката на риска“ (2009 г.), както и в „Изявление относно характеризирането на микроорганизми, използвани за производството на хранителни ензими“ на ЕОБХ (2019 г.) и следвайки съответните съществуващи насоки на научните комитети на ЕОБХ. За оценка на заявлението е приложено настоящото „Ръководство за представяне на досие за хранителни ензими за оценка на безопасността“ (ЕОБХ, 2009 г.), с изключение на оценката на експозицията, която е извършена в съответствие с методологията, описана в „Изявление относно оценката на експозицията на хранителни ензими“ (ЕОБХ 2016 г.).

Производство на хранителния ензим

Ензимът катализа катализира разлагането на водороден пероксид, превръщайки го във вода и кислород. Хранителният ензим е предназначен да се използва при преработка на яйца.

Той е произведен съгласно Регламента (ЕО) № 852/2004⁴, с процедури за безопасност на храните въз основа на анализ на опасностите и критични контролни точки и в съответствие с настоящата добра производствена практика.

Производственият щам се отглежда като чиста култура, като се използва типична промишлена среда чрез система за потапяне на партидата или ферментационна система за захранване на партидата с конвенционален контрол на процеса. След завършване на ферментацията и освобождаването на вътреклетъчния ензим, твърдата биомаса се отстранява от ферментационния бульон чрез филтриране, оставяйки супернатант, съдържащ хранителния ензим.

След това, филтратът, съдържащ ензима, се пречиства и концентрира, включително чрез етап на ултрафилтрация, в който се задържа ензимният протеин, докато по-голямата част от материала с ниска молекулна маса преминава през филтрираща мембрана и се изхвърля. Заявителят е предоставил информация за идентичността на веществата, използвани за контрол на ферментацията и при последващата обработка на храната надолу по ензимната верига.

⁴ Регламент (ЕО) № 852/2004 на Европейския парламент и на Съвета от 29 април 2004 година относно хигиената на храните, специално българско издание: глава 13 том 044 стр. 173 – 191.

гр. София, 1618, бул. "Цар Борис III" № 136

<http://corhv.government.bg>, corhv@mzh.government.bg

тел. 02/4273056



Панелът СЕР счита, че е предоставена достатъчно информация за производствения процес и системата за осигуряване на качеството, приложена от заявителя, за да се изключат проблеми, предизвикващи безпокойство за безопасността на ензима.

Характеристика на хранителния ензим

Свойства на хранителния ензим

Каталазата е единична полипептидна верига от аминокиселини. Хранителният ензим е анализиран чрез електрофореза на натриев додецил сулфат-полиакриламиден гел (SDS -PAGE). Във всички партии се наблюдава последователен протеинов модел. Геловите показват основна протеинова ивица, съответстваща до видима молекулна маса, в съответствие с очакваната молекулна маса на ензима. Протеиновият профил включва също ивици с по-ниска интензивност на оцветяване. Не са отчетени други ензимни дейности. Вътрешното определяне на каталазната активност се основава на разлагането на субстрата водороден пероксид (реакционни условия: рН 7,0; 25°C; 60 минути). Ензимната активност е определена чрез йодометрично определяне на остатъчния водороден прекис. Ензимната активност се изразява в единици на каталазна активност (CAU)/g. Един CAU се определя като това количество каталаза, което ще разложи 264 mg водороден пероксид при условията на анализа. Хранителният ензим има температурен оптимум между 5°C и 15°C (рН 7,0) и оптимален рН между рН 5,5 и 6,5 (25°C). Термостабилността е тествана след предварително инкубиране на хранителния ензим при 95°C за различна продължителност (рН 7,0). Каталазната активност значително намалява след 50s, а след 2 мин. липсва активност.

Химични параметри

Предоставени са данни за химичните параметри на хранителния ензим за три партии, използвани за комерсиализация и за партидата, произведена за токсикологичните тестове. Средната (аритметична) стойност за органичната материя в състояние на суспензия (TOS) от трите партии хранителни ензими за комерсиализация е 13,1%, а средната стойност на съотношението ензимна активност/TOS е 109,1 CAU/mg TOS.

Чистота

Съдържанието на олово в трите търговски партии и в партидата, използвана за токсикологични изследвания, е под 5 mg/kg, което отговаря на спецификацията за олово, установена в общите спецификации за ензими, използвани при преработката на храни (FAO/WHO, 2006 г.). Освен това, нивата на арсен, кадмий и живак в партидата,

гр. София, 1618, бул. "Цар Борис III" № 136

<http://corhv.government.bg>, corhv@mzh.government.bg

тел. 02/4273056



използвана за токсикологични изследвания, са под границите на откриване на използваните методологии.

Хранителният ензим отговаря на микробиологичните критерии (за колиформи (общ брой), *Escherichia coli* и *Salmonella*), както е предвидено в общите спецификации за ензимите, използвани при преработката на храни (FAO/WHO, 2006 г.). Не е открита антимикуробна активност в нито една от тестваните партии (FAO/WHO, 2006 г.). Щамовете на *Aspergillus*, както и повечето нишковидни гъби, имат способността да произвеждат диапазон на вторични метаболити. Наличието на афлатоксини, охратоксин А, стеригматоцистин, Т-2 токсин, зеараленон и фумонизин са изследвани във всичките четири партии на хранителния ензим и са били под границата на откриване (LOD) на приложените аналитични методи. Неблагоприятните ефекти, причинени от потенциалното присъствие на други вторични метаболити, получени от производствения щам, са разгледани в токсикологичния анализ на хранителния ензим-TOS.

Жизнеспособни клетки и ДНК на производствения щам

Отсъствието на производствения щам в хранителния ензим е доказано в три независими партии, анализирани трикратно. Не е наблюдаван растеж. Липсата на рекомбинантна ДНК в хранителния ензим е демонстрирана чрез анализ на полимеразна верижна реакция (PCR) на три партии трикратно.

Токсикологични данни

Предоставени са серия от приемливи токсикологични тестове, включително анализ на бактериална генна мутация (тест на Еймс), *in vitro* тест за хромозомни аберации при бозайници, 90-дневно проучване за орална токсичност при плъхове.

Генотоксичност

Панелът CEP заключи, че хранителният ензим не предизвиква:

- генни мутации при условията на теста за бактериална обратна мутация (Ames анализ);
- хромозомни аберации при условията на *in vitro* тест за хромозомни аберации при бозайници;
- Въз основа на данните от 90-дневно изследване на токсичността с повтаряща се доза перорално върху гризачи, Панелът CEP определи ниво без наблюдаван неблагоприятен ефект при най-високата тествана доза от 1 288 mg TOS/kg т.т. на ден.

гр. София, 1618, бул. "Цар Борис III" № 136

<http://corhv.government.bg>, corhv@mzh.government.bg

тел. 02/4273056



Алергенност

Оценката на алергенността взема предвид само хранителния ензим, а не носител или друго помощно вещество, които могат да бъдат използвани в рецептурата на крайния хранителен продукт.

Потенциалната алергенност на каталазата, произведена с генетично модифицирания щам *A. niger DPAzw58*, е оценена чрез сравняване на нейната аминокиселинна последователност с тази на известните алергени според „Научното становище за оценка на алергенността на ГМ растения и микроорганизми и производни храни и фуражи на Научния комитет по генетично модифицирани организми“ (Панел по ГМО на ЕОБХ, 2010 г.). Използвайки като критерии подхода на плъзгащ се прозорец за 80 аминокиселини с 35% по-висока идентичност, е установено едно съвпадение.

По отношение на оценяваната каталаза липсва информация за предизвикване на алергична сенсибилизация и алергични реакции. Анафилаксия, характеризираща се със симптоматична хипотония със свързана диспнея, уртикария и евентуално стомашно - чревни симптоми се наблюдава след експозиция като лекарство, което най - често е след парентерално лекарствено приложение и е рядко при орална или кожна експозиция.

Според предоставената информация, вещества или продукти, които могат да причинят алергии или непоносимост (Регламент (ЕС) № 1169/2011⁵), се използват като суровини в хранителната среда, използвана за запазване на микроорганизмите. Обаче, по време на процеса на ферментация, тези продукти ще бъдат разградени и използвани от микроорганизмите за клетъчен растеж, клетъчна поддръжка и производство на ензимен протеин. В допълнение, гъбичната биомаса и твърдите вещества от ферментацията се отстраняват. Като се има предвид процеса на ферментация и последващата преработка, Панелът СЕР счита, че не се очаква потенциално алергенни остатъци от тези храни, използвани като източници на протеини да присъстват. Количествено определяне на риска от алергичност не е възможно с оглед на индивидуалната податливост към хранителни алергени. Алергенността може да бъде изключена само, ако протеините са напълно отстранени. Хранителният ензим остава да присъства в яйчните продукти.

Панелът счита, че при предвидените условия на употреба, рискът от алергична сенсибилизация и реакция при експозиция при консумация на този хранителен ензим, не може да бъде изключен, но вероятността от възникване на такива реакции се счита за ниска.

⁵ Регламент (ЕС) № 1169/2011 на Европейския парламент и на Съвета от 25 октомври 2011 година за предоставянето на информация за храните на потребителите, за изменение на регламенти (ЕО) № 1924/2006 и (ЕО) № 1925/2006 на Европейския парламент и на Съвета и за отмяна на Директива 87/250/ЕИО на Комисията, Директива 90/496/ЕИО на Съвета, Директива 1999/10/ЕО на Комисията, Директива 2000/13/ЕО на Европейския парламент и на Съвета, директиви 2002/67/ЕО и 2008/5/ЕО на Комисията и на Регламент (ЕО) № 608/2004 на Комисията, *ОВ L 304, 22.11.2011г., стр. 18–63.*

гр. София, 1618, бул. "Цар Борис III" № 136

<http://corhv.government.bg>, corhv@mzh.government.bg

тел. 02/4273056



Хранителна експозиция

Хранителният ензим е предназначен да се използва при преработка на яйца при препоръчително ниво на употреба от 0,09 до 0,46 mg TOS/kg яйца. Яйца включва прясно цяло яйце, белтък и жълтък. Предоставена е –схема на производствения процес, изобразяваща използването на каталаза в преработката на яйца. Цяло яйце, яйчен жълтък или яйчен белтък се третира с водороден перексид. След етапа на пастъоризация, се добавя каталаза, за да се отстрани излишъка от водороден пероксид и да се получат пастъоризирани яйчни продукти. Хранителният ензим остава в крайните пастъоризирани яйчни продукти. Яйчните продукти се използват по-нататък за производство на различни храни, включително хлебни изделия и майонеза.

Въз основа на предоставените данни за оптималната температура на действие на каталазата, е докладвана 20 % остатъчна ензимна активност след 60 минути при около 43°C. Тестът за термостабилност на каталазата е проведен при 95°C, поради което, той не може да се използва за оценка на степента на ензимна инактивация по време на студена пастъоризация на яйца (52°C).

Оценка на хранителната експозиция

Хроничната експозиция се изчислява чрез комбиниране на максималното препоръчително ниво на употреба на хранителния ензим, предоставено от заявителя, с индивидуалните данни за потребление на съответните категории храни в базата данни FoodEx на ЕОБХ. Впоследствие, експозицията от всички категории храни се сумира и нормализира на база телесното тегло. Това е направено за всеки участник във всички проучвания на храненето, с които ЕОБХ разполага. Това дава разпределението на индивидуалната средна експозиция. Въз основа на тези разпределения, за всяко проучване са изчислени стойностите за средната и високата (95-ти перцентил) експозиция на общото население и по възрастови групи. Проучванията за храненета, обхващащи само 1 ден, са изключени. Високото ниво на експозиция/прием е изчислено само за онези групи от населението, в които размерът на извадката е бил достатъчно голям, за да позволи изчисляване на 95-ия перцентил.

Граница на експозиция

Сравнението на NOAEL (1 288 mg TOS/kg телесно тегло на ден) от 90-дневното проучване на токсичността с най-високата оценка за експозиция (0,001 mg TOS/kg телесно тегло на ден при 95-ия процентил), дават граница на експозицията (margin of exposure, MoE) от най-малко $1,3 \times 10^6$.

гр. София, 1618, бул. "Цар Борис III" № 136

<http://corhv.government.bg>, corhv@mzh.government.bg

тел. 02/4273056



Изводи

Въз основа на предоставените данни и полученото МоЕ, Панелът СЕР заключава, че хранителният ензим каталаза, произведен с генетично модифицирания щам *A. niger DP-Azw58*, не предизвиква опасения за безопасността при предвидените условия на употреба.

Панелът СЕР счита хранителния ензим свободен от жизнеспособни клетки на производствения/изходния организъм и от рекомбинантна ДНК.



Други информации в областта на новите храни, както и оценка на риска по цялата хранителна верига може да намерите на сайта на Центъра за оценка на риска по хранителната верига:
<http://corhv.government.bg/>

Изготвил:

инж. Светлана Савова, младши експерт, дирекция „Оценка на риска по хранителната верига“ при ЦОРХВ

21.10.2021 г.

гр. София, 1618, бул. "Цар Борис III" № 136

<http://corhv.government.bg>, corhv@mzh.government.bg

тел. 02/4273056

