



**Научно становище на Европейския орган по безопасност на храните
относно оценката на безопасността на хранителния ензим глюкан
1,4а-глюкозидаза от генетично модифициран щам *Aspergillusniger*
NZYM-BR**

Хранителният ензим глюкан 1,4-а-глюкозидаза (4-а-D-глюкан глюкохидролаза, ЕС 3.2.1.3) е произведен с генетично модифицирания щам Aspergillusniger NZYM-BR от фирма Novozymes A/S. Генетичните модификации не пораждат опасения във връзка с безопасността. Хранителният ензим е свободен от жизнеспособни клетки и ДНК на организма, който го произвежда. Предназначен е за употреба при обработка на нишесте за производство на глюкозни сиропи и дестилиран алкохол. Тъй като, остатъчните органични твърди вещества (TOS)¹ се отстраняват чрез етапите на пречистване, прилагани по време на производството на глюкозни сиропи и чрез дестилация, не се счита за необходима оценка на хранителната експозиция. Тестовите за генотоксичност не показват причини за заплахата на безопасността. Системната токсичност е оценена чрез 90-дневно изследване на перорална токсичност с многократна доза при плъхове. Панелът СЕР² на Европейския орган по безопасност на храните (ЕОБХ) идентифицира ниво без наблюдаван неблагоприятен ефект от 1135 mg TOS/kg телесно тегло на ден, най-високата тествана доза. При извършеното търсене на сходство между аминокиселинната последователност на хранителния ензим и такава при известни алергени, са намерени две съвпадения. Панелът СЕР смята, че при предвидените условия на употреба (различни от производството на дестилиран алкохол) рискът от алергична сенсибилизация 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) № 1332/2008³ дава определение за „хранителен ензим“ и „Ензимен препарат в храна“. „Ензим в храна“ означава продукт, получен от растения, животни или микроорганизми, или продукти от тях, включително продукт, получен чрез ферментационен процес, използващ микроорганизми:

¹ Нивата на употреба на хранителните ензими се изразяват като остатъчни органични твърди вещества (TOS)/kg суровина.

² 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)

³ 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

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) № 1331/2008⁴ установява обща разрешителна процедура на ЕС за добавките в храните, ензимите в храните и ароматизантите в храните. 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 Общностния списък на ЕС. „Ръководство за представяне на досие за хранителни ензими за оценка на безопасността“ на ЕОБХ определя необходимите административни, технически и токсикологични данни.

Производство на хранителния ензим

Хранителният ензим се произвежда съгласно Регламент (ЕО) № 852/2004⁵, съгласно процедури за безопасност на храните, базирани на принципите на системата за анализ на опасностите и критичните контролни точки (НАССР) и в съответствие с настоящата добра производствена практика. Производственият щам се отглежда като

⁴ 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

⁵ Регламент (ЕО) № 852/2004 на Европейския парламент и на Съвета от 29 април 2004 година относно хигиената на храните (ОВ L 139, 30.4.2004 г., стр. 1)

чиста култура, използваща типична индустриална среда в потопена, ферментационна система с конвенционален контрол на процеса. След завършване на ферментацията, твърдата биомаса се отстранява от ферментационния бульон чрез филтриране, оставяйки супернатант, съдържащ хранителния ензим. След това филтратът, съдържащ ензима, се пречиства допълнително и се концентрира, включително чрез етап на ултрафилтрация, при който ензимният протеин се задържа, докато по-голямата част от нискомолекуления материал преминава през филтрационната мембрана и се изхвърля.

Заявителят е предоставил информация за идентичността на веществата, използвани за контрол на ферментацията и при последващата обработка надолу по веригата на хранителния ензим. 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.

Характеристики на хранителния ензим

Свойства на хранителния ензим

Глюкан 1,4-а-глюкозидазата е единична полипептидна верига от 556 аминокиселини. Молекулната маса на крайния протеин, получена от аминокиселинната последователност, е изчислена на 59,1 kDa. Хранителният ензим е анализиран чрез електрофореза на натриев додецил сулфат-полиакриламиден гел (SDS-PAGE). Наблюдаван е последователен протеинов модел във всички изследвани партии. Геловите показват основна протеинова лента, съответстваща на молекулна маса от около 54 kDa, и няколко ленти с по-нисък интензитет на оцветяване. Хранителният ензим е тестван за активности на амилаза, липаза, пулуланаза и протеаза и е открита само активност на амилаза. Определянето на активността на глюкан 1,4-а-глюкозидазата се основава на хидролиза на малтоза (условия на реакцията: рН 4,3, температура 37°C, време на реакция 6 минути). Ензимната активност се определя количествено, като се измерва образуването на глюкоза с помощта на ензимен анализ. Активността на глюкан 1,4-а-глюкозидаза се определя количествено спрямо вътрешен ензимен стандарт и се изразява в амилоглюкозидазни единици/g (AGU/g). Хранителният ензим има температурен оптимум около 65°C (рН 5,0) и оптимално рН около рН 4.0 (37°C). Термостабилността му се тества след предварително инкубиране на хранителния ензим за 30 минути при различни температури (рН 5,0). Активността намалява над 55°C, като не показва остатъчна активност над 80°C.

Химични параметри

Данните за химичните параметри на хранителния ензим са предоставени за три партии, използвани за комерсиализация и една партида, произведена за токсикологичните тестове. Средната стойност за TOS от трите партии хранителни ензими за комерсиализация е 10,9% и съотношението на средната ензимна активност/TOS е 3,6 AGU/mg TOS.

Чистота

Съдържанието на олово в трите търговски партии и в партидата, използвана за токсикологични изследвания, е под 0,5 mg/kg, което отговаря на спецификацията за олово (≤ 5 mg/kg), както е посочено в общите спецификации за ензими, използвани в хранително-вкусовата промишленост⁶. В допълнение, нивата на кадмий и живак са под границите на откриване (LODs) на използваните методологии. За арсен средната концентрация, определена в търговските партии, е 0,19 mg/kg. Панелът СЕР счита, че тази концентрация не предизвиква безпокойство.

Хранителният ензим отговаря на микробиологичните критерии (за общи колиформи, *Escherichia coli* и *Salmonella*), както е предвидено в общите спецификации за ензимите, използвани при преработка на храни. Не е открита антимикробна активност в нито една от тестваните партии. Щамовете на *Aspergillus*, както и повечето филаментозни гъби, имат способността да произвеждат редица вторични метаболити⁷. Наличието на микотоксини фумонизин В2 и охратоксин А е изследвано в трите търговски партии хранителни ензими и двете са под LOD на използвания метод. Потенциалното присъствие на други вторични метаболити е разгледано при токсикологичното изследване на TOS на хранителния ензим. Панелът СЕР счита, че предоставената информация относно чистотата на хранителния ензим е достатъчна.

Токсикологични данни

Предоставени са серия от 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 СЕР заключава, че хранителният ензим не предизвиква:

- генни мутации при условията на теста за бактериална обратна мутация (Еймс 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 СЕР е определил ниво без наблюдаван неблагоприятен ефект (при най-високата тествана доза) от 1,135 mg TOS/kg т.т. на ден.

⁶ FAO/WHO (Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization), 2006. General specifications and considerations for enzyme preparations used in food processing in Compendium of food additive specifications. 67th meeting. FAO JECFA Monographs, 3, 63–67. Available online:

⁷ Frisvad JC, Møller LLH, Larsen TO, Kumar R and Arnau J, 2018. Safety of the fungal workhorses of industrial biotechnology: update on the mycotoxin and secondary metabolite potential of *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, and *Trichoderma reesei*. Applied Microbiology and Biotechnology, 102, 9481–9515

Алергенност

Оценката за алергенност 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 хранителния ензим глюкан 1,4-а-глюкозидазата, произведен с генетично модифицирана *A.niger* strain NZYM-BR, е оценена чрез сравняване на неговата аминокиселинна последователност с тези на известни алергени според Научното становище за оценка на алергенността на ГМ растения и микроорганизми и производни храни и фуражи на Научния комитет по генетично модифицирани организми⁸. Използвайки като критерии подхода на плъзгащ се прозорец за 80 аминокиселини с 35% по висока идентичност, са установени две съвпадения.

Няма налична информация за орални и респираторни реакции или предизвикване на алергична сенсибилизация и алергични реакции.

Съгласно предоставената информация, вещества или продукти, които могат да причиняват алергии или непоносимост (Регламент (ЕС) № 1169/2011⁹) 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 обработка, Панелът СЕР счита, че не се очаква потенциално алергенни остатъци от тези храни, използвани като източници на протеин, да присъстват. Панелът СЕР преценява, че при предвидените условия на употреба, рискът от алергична сенсибилизация и реакция при експозиция при консумация на този хранителен ензим може да бъде изключен за производство на дестилиран алкохол. Рискът не може да бъде изключен при обработката на нишесте за производство на глюкозен сироп, но вероятността от възникване на такива реакции се счита за ниска.

Оценка на хранителната експозиция

Панелът СЕР приема предоставените доказателства за достатъчни, за да заключи, че остатъчните количества хранителен ензим–TOS в крайните дестилиран алкохол и глюкозни сиропи са незначителни.

Поради това, не е изчислявана експозиция на TOS с храната.

⁸ EFSA GMO Panel (EFSA Panel on Genetically Modified Organisms), 2010. Scientific Opinion on the assessment of allergenicity of GM plants and microorganisms and derived food and feed. EFSA Journal 2010;8(7):1700, 168pp.

⁹ 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 *OJ L 304, 22.11.2011, стр. 18–63*

Заклучения

Въз основа на предоставените данни и отстраняването на TOS по време на планираните процеси на производство на храните, Панелът СЕР заключава, че хранителният ензим глюкан 1,4-а-глюкозидаза, произведен с генетично модифициран *A. nigerstrain* NZYM-BR, не предизвиква опасения за безопасността при предвидените условия на употреба.

Панелът СЕР счита хранителният ензим свободен от жизнеспособни клетки и рекомбинантна ДНК на организма, който го произвежда.

Източник: Safety evaluation of the food enzyme glucan 1,4a-glucosidase from the genetically modified *Aspergillus niger* strain NZYM-BR

<https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/j.efsa.2022.7191>

за



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

Изготвил:

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

01.04.2022 г.