



Helserisikovurdering
av
PL73 (LM) bakteriebiomasse
(EFSA/GMO/FR/2008/61)
fra
Ajinomoto Eurolysine

1. innspillsrunde

Uttalelse fra
Faggruppe for genmodifiserte organismer
og
Faggruppe for fôr til terrestriske og akvatiske dyr
Vitenskapskomiteen for mattrygghet

27.9.2010

ISBN:978-82-8082-432-5

VKM Report 2010: 29

BIDRAGSYTERE

Den som utfører arbeid for VKM, enten som oppnevnte medlemmer eller på *ad hoc*-basis, gjør dette i kraft av sin egen vitenskapelige kompetanse og ikke som representanter for den institusjon han/hun arbeider ved. Forvaltningslovens habilitetsregler gjelder for alt arbeid i VKM-regi.

Takk til

Faggruppe for genmodifiserte organismer og faggruppe for fôr til akvatiske og terrestriske dyr ønsker spesielt å takke *ad hoc*-gruppen for deres verdifulle bidrag med denne risikovurderingen.

Medlemmer av *ad hoc*-gruppen er:

Knut Berdal (leder), Aksel Bernhoft (Faggruppe 6), Gro-Ingunn Hemre (Faggruppe 6), Askild Holck (Faggruppe 3), Ingolf Nes (Faggruppe 3), Kåre M. Nielsen (Faggruppe 3).

VURDERT AV

Arbeidet til *ad hoc*-gruppen er vurdert og godkjent av

Faggruppe for genmodifiserte organismer (Faggruppe 3):

Knut Berdal (leder), Thomas Bøhn, Jihong Liu Clarke, Askild Holck, Helge Klungland, Casper Linnestad, Richard Meadow, Anne I. Myhr, Audun Nerland, Ingolf Nes, Kåre M. Nielsen, Hilde-Gunn Opsahl Sorteberg, Odd E. Stabbetorp, Vibeke Thrane, Rose Vikse.

og

Faggruppen for fôr til terrestriske og akvatiske dyr (Faggruppe 6):

Marit Aursand (leder), Heidi Amlund, Aksel Bernhoft, Gro Ingunn Hemre, Bjørn M. Jensen, Trond Møretrø, Live Nesse, Birger Svihus, Ole Torrisen.

Koordinatorer fra sekretariatet:

Tron Ø. Gifstad og Arne Mikalsen

SAMMENDRAG

Helserisikovurderingen av bakteriebiomasse PL73 (LM) (EFSA/GMO/FR/2008/61) fra firmaet Ajinomoto Eurolysine er utført av Faggruppe for genmodifiserte organismer (Faggruppe 3) og Faggruppe for fôr til terrestriske og akvatiske dyr (Faggruppe 6) under Vitenskapskomiteen for mattrygghet (VKM). Vitenskapskomiteen for mattrygghet er bedt av Mattilsynet om å vurdere bakteriebiomasse PL73 (LM) (EFSA/GMO/FR/2008/61) til bruk i fôrvarer.

Bakteriebiomasse PL73 (LM) fra Ajinomoto Eurolysine er produsert fra den genmodifiserte bakterien *Escherichia coli* (*E. coli*) K-12 stamme N°19E, som er modifisert for økt produksjon av L-lysin. Faggruppe 3 og Faggruppe 6 har tidligere vurdert Ajinomoto Eurolysine sin søknad til EUs mattrygghetsorgan EFSA om godkjenning og markedsføring av bakteriebiomasse PL73 *E. coli* (LYS) (EFSA/GMO/FR/2007/40) fra den genmodifiserte bakterien *E. coli* K-12 stamme N°10S, som også produserer L-lysin. Ajinomoto Eurolysine sin søknad til EFSA om godkjenning og markedsføring av PL73 *E. coli* (LYS) biomasse er av Ajinomoto Eurolysine trukket tilbake. Ajinomoto Eurolysine har erstattet denne søknaden med ny søknad til EFSA om bruk av bakteriebiomasse fra bakterien *E. coli* N°19E. Tørket og granulert biomasse fra *E. coli* N°19E vil bli markedsført som PL73 (LM) under handelsnavnet PROT-AEL-L eller PROT-AEL, og vil kun bli brukt som tilsetning til fôrvarer.

Vurderingen av bakteriebiomasse PL73 (LM) er basert på dokumentasjon som er gjort tilgjengelig på EFSAAs nettside GMO EFSAnet. I tillegg er det benyttet informasjon fra uavhengige vitenskapelige publikasjoner i vurderingen. PL73 (LM) bakteriebiomasse er vurdert i henhold til tiltenkt bruk og i overensstemmelse med kravene i forordning 1829/2003/EF og Forskrift om fôrvarer (2002). Videre er EFSAAs retningslinjer for risikovurdering av genmodifiserte mikroorganismer (EFSA 2006) lagt til grunn for vurderingen. Den vitenskapelige vurderingen omfatter transformeringsprosessen, bruk av vektor og det transgene konstruktet, analyse av næringsstoffer, mineraler, kritiske toksiner, metabolitter, antinæringsstoffer, resultater fra fôringsforsøk, bruk av dose-respons design, *in vitro* og *in vivo* fordøyelighetsstudier. Mesteparten av søkers informasjon om transformeringsprosessen, bruk av vektor, det transgene konstruktet, toksisitetsstudier og fôringsforsøk er konfidensiell. Faggruppene har vurdert denne konfidensielle informasjonen, men informasjonen kan ikke gjengis i denne helserisikovurderingen.

Vedrørende genmodifiseringsprosessen opplyses det om at den genmodifiserte bakterien *Escherichia coli* (*E. coli*) K-12 stamme N°19E er fremkommet ved genmodifisering av *E. coli* K-12 stamme K-12S B-7 (også navngitt som stamme VKPM B-7). Stamme K-12S B-7 har følgende genotyper: F⁻, P1⁻, λ⁻, supE og relA. Denne stammen har ikke overførbare vektorer. N°19E er blitt genmodifisert ved hjelp av både konvensjonelle og rekombinante DNA teknikker. All genmodifisering ble utført på genomisk *E. coli* K-12S B-7 DNA. Det opplyses om at det er benyttet forskjellige vektorer i den initiale fasen av modifiseringen. Det opplyses også at disse vektorene er ikke tilstede i *E. coli* K-12 stamme N°19E. N°19E inneholder ikke antibiotikaresistensmarkørgener (ARMG). Hensikten med genmodifiseringen er å øke enzym-aktiviteten til L-lysin biosynteseveien, for kommersiell produksjon av L-lysin. Bakteriemassen som blir igjen etter produksjon av L-lysin blir videre prosessert til bakteriebiomasse PL73 (LM), se figur 1.

Faggruppe 3 og Faggruppe 6 finner informasjonen vedrørende molekylær karakterisering tilstrekkelig for vurdering av bakterien N°19E. Faggruppe 3 og Faggruppe 6 finner imidlertid at undersøkelsene av potensial for overføring av gener eller genelementer til bakterier i tarmen hos dyr, har begrenset verdi og er til dels mangelfulle. Innhold og størrelsesfordeling av DNA synes å være noe forskjellig fra søknaden PL73 *E. coli* (LYS), samt at den mengde DNA som er benyttet ved analyse av størrelsesfordeling av degradert DNA er forskjellig fra søknaden PL73 *E. coli* (LYS), noe som har betydning for påvisning av degradert DNA. Søker skal dokumentere bedre påvisningsgrensene for PCR-produktene, samt at kontrollene skal dokumenteres bedre.

Komparative analyser

Valg av komparator og forsøksdesign

Ajinomoto Eurolysine hevder at sammenligning med konvensjonelt motstykke ikke er aktuelt for PL73 (LM) bakteriebiomasse, fordi biomassen fra L-lysinproduserende *E. coli* ikke tidligere er blitt produsert og markedsført. Faggruppe 3 og Faggruppe 6 er uenige med Ajinomoto Eurolysine i at det ikke er mulig å foreta en komparativ risikovurdering med et konvensjonelt motstykke. Faggruppene mener at biomasse fra den umodifiserte *E. coli* K-12 stamme K-12S B-7 kan benyttes som konvensjonelt motstykke.

Ajinomoto Eurolysine har fremstilt to partier av biomasse PL73 (LM), parti B1-2006 og B2-2008. Parti B2-2008 er fra storskalaproduksjon som omfatter flere industrielle fermentorer, mens B1-2006 er småskalaproduksjon som omfatter en industriell fermentor. Disse to partiene er benyttet til analyser av hovedkomponenter, mens det er bare parti B1-2006 som er benyttet som fôr i forsøk på rotter. For sammenligning av hovedkomponenter i biomasse PL73 (LM) har søker brukt parti S1 (2001) fra biomasse PL73 *E. coli* (LYS) (EFSA/GMO/FR/2007/40).

Analyser av komponenter av ernæringsmessige betydning

Faggruppe 3 og Faggruppe 6 har vurdert analysene av komponenter av ernæringsmessige betydning og andre kjemiske komponenter. Faggruppene anser analyser av komponenter av ernæringsmessig betydning for å være utilstrekkelige fordi det mangler analyser av flere ernæringsmessige komponenter. Faggruppe 3 og Faggruppe 6 har også bemerkninger til analyser av partiene B1-2006 og B2-2008 fordi det mellom de forskjellige partiene er funnet store forskjeller i flere parametre, f.eks. uorganiske salter, enkelte fettsyrer, enkelte tungmetaller, ammoniumnitrogen og kadaverin. Når det gjelder analyser av andre kjemiske komponenter mener faggruppene at det mangler analyser av fosfolipider, liposakkarider og lipidløslige pigmenter, samt at det for parti B1-2006 mangler analyser av frie aminosyrer før syrehydrolyse av biomassen.

Faggruppene har bemerkninger til mengdene av tungmetallene arsen, bly, kadmium og kvikksølv i biomassen PL73 (LM). Sammenligninger mellom (LM) og PL73 *E. coli* (LYS) (EFSA/GMO/FR/2007/40) viser at metallmengdene i (LM) er ca. 1/1000 av mengdene i biomasse (LYS). Faggruppene har sjekket analysene som er utført av TNO, og analyserapportene fra TNO viser at mengdene av disse tungmetallene i de to biomassene er tilnærmet like. Faggruppene finner derfor at Ajinomoto Eurolysine må ha angitt feil mengder mht disse metallene for (LYS) S1-biomasse.

Faggruppe 3 og Faggruppe 6 påpeker at mange analyser, kjemisk og biologiske, ikke er utført i henhold til god laboratoriepraksis (GLP). Det råder derfor usikkerhet om at laboratoriene som har utført de forskjellige analysene, er sertifiserte laboratorier.

Toksisitetsstudier og ernæringsstudier

Søker har utført et 90 dagers fôringsforsøk på rotter med fôr som inneholder PL73 (LM)-biomasse. Søker konkluderer med at det ikke ble påvist vesentlige helseeffekter på forsøksdyrene.

Faggruppe 3 og Faggruppe 6 finner for fôringsforsøket på rotter en rekke endringer på hematologi, klinisk kjemi, organvekter med mer som anses som vesentlige. Faggruppene finner at disse effektene er avhengig av biomassemengdene som tilsettes fôret, og at en del påviste effekter på rottene ikke er skikkelig vurdert. Det mangler undersøkelser av lymfatisk vev – spesielt i tarm, immunglobuliner og immunresponser.

Faggruppene mener med bakgrunn i at standardfôret og forsøksfôret som inneholder biomasse har forskjellig ernæringsmessig sammensetning, kan det ikke konkluderes med at det er biomassen som har ført til de endringer som er funnet i dyreforsøket.

Faggruppe 3 og Faggruppe 6 konkluderer med at fôrdesignet for fôringsforsøket på rotter er utilstrekkelig for påvisning av testrelaterte helseeffekter, fordi forsøks- og standardfôret ikke er

balansere ernæringsmessig, dvs. forsøksfôret har en annen protein, lipid og mikronæringsstoff-sammensetning enn standardfôret.

For andre toksisitetsstudier henviser søker til studier utført med PL73 *E. coli* (LYS) (EFSA/GMO/FR/2007/40).

Faggruppe 3 og Faggruppe 6 mener at toksisitets- og ernæringsstudiene utført med PL73 *E. coli* (LYS) biomasse kan være nyttige som bakgrunnsmateriale ved vurdering av PL73 (LM)-biomasse, men at egne toksisitets- og ernæringsstudier utført på PL73 (LM) skal følge med dokumentasjonen.

Miljørisiko

Søknaden gjelder godkjenning av varmeinaktivert PL73 (LM) bakteriebiomasse til bruk i fôrvarer under forordning (EF) 1829/2003. Faggruppe 3 og Faggruppe 6 har derfor ikke vurdert mulig miljærisiko knyttet til levende *E. coli* K-12 stamme N°19E bakterier.

SAMLET VURDERING

Fôringsforsøket viser effekter på forsøksdyr som anses som betydelige ved innblanding av biomassen i standardfôr. Endringer som ble påvist hos rotte var på levervekt, nyrevekt, klinisk kjemiske parametre som kolesterol og fosfolipider, samt trombocytantall. Det laveste innblandingsnivået det er funnet effekter var 3 % biomasse.

Fordi søker ikke har forsøkt å balansere forsøksfôret ernæringsmessig, dvs. forsøksfôret har en annen protein, lipid og mikronæringsstoffsammensetning enn standardfôret, er det vanskelig å konkludere om de endringer som er funnet i forsøk med rotter skyldes biomassen eller ubalanse i den ernæringsmessige sammensetningen. Faggruppene finner det derfor vanskelig å vurdere om bruk av PL73 (LM) bakteriebiomasse vil medføre endret risiko for dyrs helse i forhold til annet fôr.

Faggruppe 3 og Faggruppe 6 mener at fôrvarer som inneholder PL73 (LM) bakteriebiomasse ikke kan vurderes som fôr fordi det mangler ved analysene av biomassen, og med unntak for toksisitetsstudier på rotte er det ikke foretatt toksisitets- og ernæringsmessige studier på dyr.

Faggruppe 3 og Faggruppe 6 konkluderer derfor med at fôrvarer som inneholder PL73 (LM) bakteriebiomasse ikke kan vurderes helsemessig fordi det mangler viktige fôringsforsøk på pattedyr og fisk.

NØKKELORD

PL73 (LM) bakteriebiomasse, genmodifisert, fôr, helse, proteinkilde, EFSA/GMO/FR/2008/61

FORKORTELSER OG ORDFORKLARINGER

<i>Ad hoc</i>	betyr: til dette formålet. Med <i>ad hoc</i> -gruppe menes en gruppe som er nedsatt for å arbeide med en spesiell sak, og som deretter blir oppløst.
ARMG	Antibiotikaresistensmarkørgen
bp	Basepar
DNA	Deoxyribonukleinsyre (DNA)
EFSA	European Food Safety Authority
GLP	Good Laboratory Practices, retningslinjer for godt laboratoriarbeid.
GMO	Genmodifisert organisme
GMM	Genmodifisert mikroorganisme
Konjugasjon	se Plasmid
L-lysin	essensielle aminosyre som kroppen ikke selv kan fremstille. Aminosyrer som er byggesteiner for proteiner hos mennesker og dyr har alltid L-konfigurasjon.
MT	Mattilsynet
OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development
ORF	Open Reading Frame (åpen leseramme)
Plasmid	Plasmider er ikke-kromosomale genetiske elementer som finnes i bakterier m.m. Plasmider kan overføres til andre bakterier via horisontal nedarving, en prosess kalt konjugasjon
PCR	Polymerase chain reaction. Polymerasekjedereaksjon. Metode for å lage mange kopier av en DNA-sekvens vha primere.
PCR-primere	Korte DNA-sekvenser (18-30 bp) som er komplementære til spesifikke gensekvenser. Benyttes i PCR-reaksjonen
Rekombinant DNA	Kombinasjon av DNA sekvenser som normalt ikke opptrer sammen, dvs. DNA-fragmenter(gen, promoter, terminator etc.) fra flere forskjellige kilder (f.eks. bakterier, planter) som skjøtes sammen.
RNA	Ribonukleinsyre
Southern blot	Teknikk for overføring av DNA til en membran for videre studier av overførte DNA-sekvenser.
Unik kode	OECDs kodingssystem for identifisering av transgene planter. Koden består av 9 alfanumeriske karakterer. De to eller tre første karakterene identifiserer firmaet som har laget den genmodifiserte planten, de fem eller seks påfølgende karakterene identifiserer den genmodifiserte organismen, og det siste tallet er for verifikasjon av integriteten til den alfanumeriske koden. Eksempel: MON-ØØ81Ø-6 er Monsanto's genmodifiserte mais MON810.
Vektor	En molekylærbiologisk vektor (kloningsvektor) er et kunstig fremstilt DNA-molekyl som benyttes for å overføre genetisk materiale til en celle. De fire hovedtypene av vektorer er plasmider, bakteriofager og andre virus, kosmider og kunstige kromosomer.

INNHALDSFORTEGNELSE

BIDRAGSYTERE.....	2
VURDERT AV	2
SAMMENDRAG.....	3
Samlet vurdering	5
NØKKEWORD	5
FORKORTELSER OG ORDFORKLARINGER	6
INNHALDSFORTEGNELSE	7
BAKGRUNN.....	8
OPPDRAK FRA MATTILSYNET	8
RISIKOVURDERING.....	9
1. Innledning	9
1.1 Beskrivelse av egenskap(er) og virkningsmekanismer.....	9
2. Molekylær karakterisering	11
2.1 Genmodifisering, transformasjonssystem og vektorkonstruksjon.....	11
2.2 Karakterisering av geninnsettingen og genkonstruksjonen	11
2.3 Informasjon vedrørende uttrykk av innsatte gener og åpne leserammer (ORF).....	11
2.4 Nedarving og stabilitet av innsatt DNA	11
2.5 Potensial for genoverføring.....	11
2.6 Identifisering av en E. coli stamme som er konvensjonelt motstykke.....	12
2.7 Informasjon om den genmodifiserte mikroorganismen og sammenligning med konvensjonelt motstykke.....	13
2.8 Delkonklusjon	13
3. Komparative analyser	13
3.1 Valg av komparator og forsøksdesign.....	14
3.2 Analyser av ernæringsmessige - og andre kjemiske komponenter.....	14
3.3 Delkonklusjon	20
4. Dokumentasjon av næringsverdi, toksisitet og allergenisitet i dyreforsøk.....	21
4.1 Ernæringsmessig vurdering av biomassen for bruk som fôr i dyreforsøk.....	21
4.2 Toksisitet- og ernæringsstudier	21
4.2.1 Rotter.....	22
4.3 Tester for gentoksisitet og mutagenitet	22
4.4 Generelle kommentarer til undersøkelser av toksisitets- og ernæringsstudie.....	23
4.5 Allergenisitet	24
4.6 Delkonklusjon	24
5. Miljøriskovurdering, nivå 1	25
6. Vurdering av søkers dokumentasjon/kunnskapshull.....	25
7. Innspill til EFSA-nett	26
KONKLUSJON.....	28
REFERANSER.....	29

BAKGRUNN

Vitenskapskomiteen for mattrygghet er bedt av Mattilsynet om å foreta en vitenskapelig vurdering av helse- og miljørisiko for dyr ved en eventuell godkjenning og bruk av fôrvarer som inneholder PL73 (LM) bakteriebiomasse (EFSA/GMO/FR/2008/61) fra Ajinomoto Eurolysine. PL73 (LM) bakteriebiomasse er søkt omsatt i EU/EØS-området under forordning (EF) Nr. 1829/2003 om genmodifiserte fôrvarer (artiklene 15(1)(c) og 17).

Søknaden EFSA/GMO/FR/2008/61 omfatter bruksområdene fôrvarer, og ble fremmet og anbefalt av franske myndigheter juli 2008. Dokumentasjonen knyttet til søknaden ble lagt ut på EFSA-nett 1. oktober 2008, med frist 90 dager for innspill fra EU- og EØS/EFTA-landene. Norge har ikke tidligere uttalt seg om PL73 (LM) bakteriebiomasse.

OPPDRAK FRA MATTILSYNET

Mattilsynet har i brev datert 12.5.2006 (ref. 2006/17817) gitt Vitenskapskomiteen for mattrygghet i oppdrag å foreta løpende risikovurderinger av genmodifiserte næringsmidler og fôrvarer som faller inn under EUs forordning 1829/2003/EF. VKM er bedt om å vurdere helse- og miljøaspekter ved slike produkter, og på bakgrunn av vurderingene gi innspill til EFSA-nett.

Faggruppe for genmodifiserte organismer og Faggruppe for fôr til terrestriske og akvatiske dyr skal i tråd med oppdragsbrevet foreta en vurdering av dyrehelse ved en eventuell godkjenning av bakteriebiomasse PL73 (LM) (EFSA/GMO/FR/2008/61) som proteintilskudd til fôr. Vurderingen av bakteriebiomasse PL73 (LM) skal utføres i henhold til tiltenkt bruk og i overensstemmelse Forskrift om fôrvarer (2002), og med prinsippene som er nedfelt i EFSAAs retningslinjer for vurdering av genmodifiserte mikroorganismer ("Guidance document of the scientific panel on genetically modified organisms for the risk assessment of genetically modified microorganisms and their derived products intended for food and feed use" (EFSA 2006)).

Produktet som ønskes vurdert:

Bakteriebiomasse PL73 (LM) (EFSA/GMO/FR/2008/61) produsert fra den genmodifiserte bakterien *E. coli* K-12 stamme N°19E.

Unik kode: Ingen unik kode.

Status i EU: Søknad under forordning (EF) Nr. 1829/2003. EFSAAs frist for innspill er 3. januar 2009.

Ønsket svarfrist til Mattilsynet: 3. januar 2009.

RISIKOVURDERING

1. Innledning

Helserisikovurderingen av PL73 (LM) bakteriebiomasse for bruk i fôrvarer er i hovedsak basert på dokumentasjon som er gjort tilgjengelig på EFSAAs nettside GMO EFSAAnet. I tillegg er det benyttet uavhengige vitenskapelige publikasjoner med referee i vurderingen. Vurderingen er gjort i henhold til tiltenkt bruk og i overensstemmelse med kravene i Forskrift om fôrvarer og forordning 1829/2003/EF.

Faggruppe for genmodifiserte organismer har på faggruppemøtet 2. februar 2005 vedtatt å bruke EFSAAs retningslinjer som gruppens retningslinjer for vurdering av genmodifiserte mikroorganismer. Prinsippene som er lagt til grunn for vurderingen, er derfor hentet fra EFSAAs dokument "Guidance document of the scientific panel on genetically modified organisms for the risk assessment of genetically modified microorganisms and their derived products intended for food and feed use" (EFSA 2006). I henhold til Vitenskapskomiteen for mattrygghets uttalelse på møtet 23. april 2004 har Faggruppe for genmodifiserte organismer vedtatt at i de sakene hvor EFSA har kommet med sine uttalelser før Faggruppe for genmodifiserte organismer får sakene til behandling, skal søknadene behandles på samme måte som i EU-landene.

Medlemmene i Faggruppe for genmodifiserte organismer (Faggruppe 3) er ansvarlig for helserisikovurdering av genmodifiserte organismer, mens medlemmene i Faggruppe for fôr til terrestriske og akvatiske dyr (Faggruppe 6) er ansvarlig for helserisikovurdering av fôrvarer.

1.1 Beskrivelse av egenskap(er) og virkningsmekanismer

Den genmodifiserte *E. coli* K-12 stamme N°19E produserer økt mengde L-lysin. *E. coli* K-12 stamme N°19E er fremkommet ved transformering av *E. coli* K-12 stamme K-12S B-7, ved direkte kloning med rekombinant DNA i bakteriens genom, Stamme K-12S B-7 er også navngitt som VKPM B-7. *E. coli* stamme K-12S B-7 har følgende genotyper: F⁺, P1⁺, λ⁺. K-12S B-7 inneholder ikke overførbare vektorer. Det DNA-materialet som er benyttet for konstruksjon av N°19E, kommer fra forskjellige *E. coli* K-12 stammer, med unntak for et gen som kommer fra stamme *E. coli* H155 og et annet fra en annen mikroorganisme. Bakterien N°19E inneholder ikke antibiotikaresistensgener.

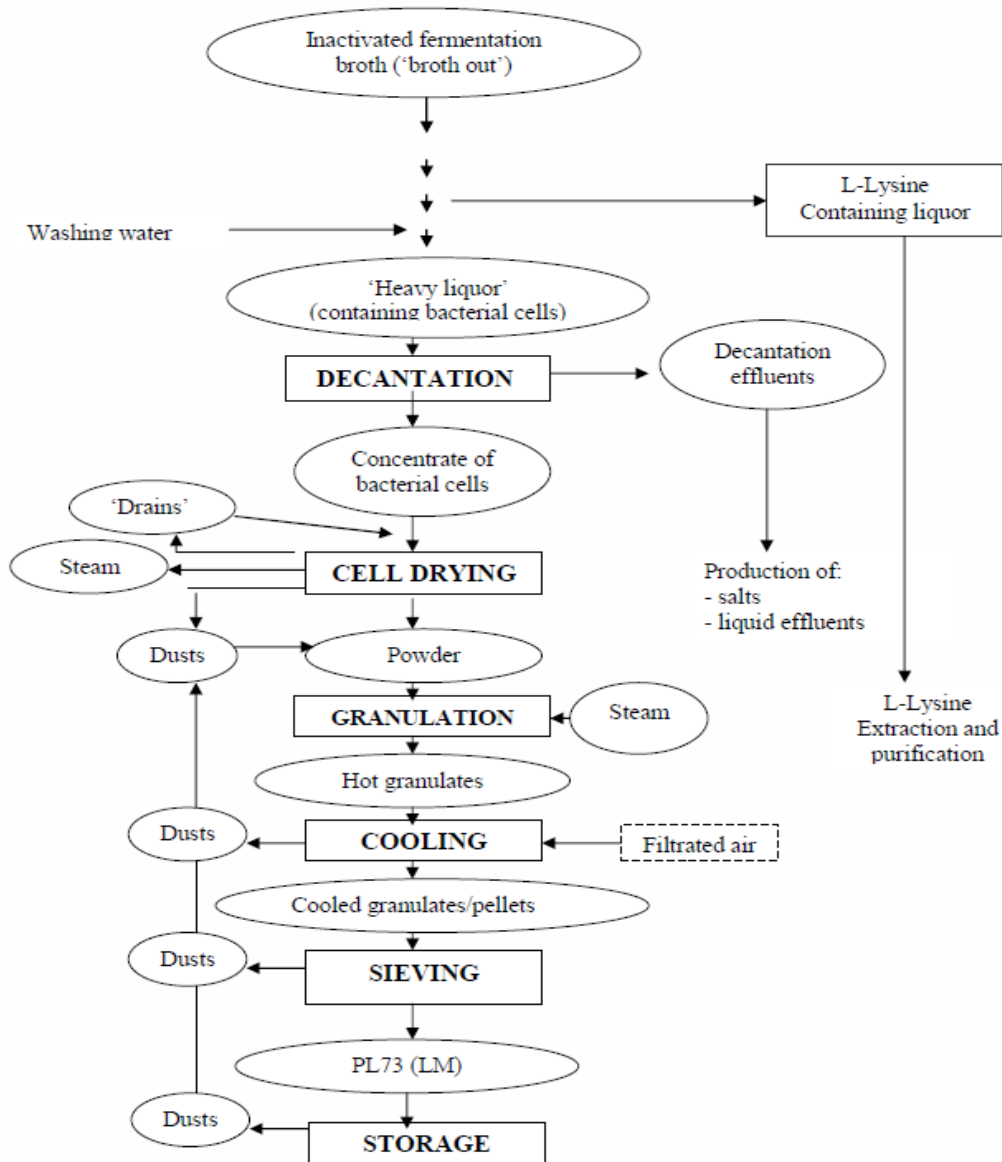
Den genmodifisert *E. coli* K-12 stamme N°10S som er utgangspunktet for biomasse PL73 *E. coli* (LYS), produserer også L-lysin. Stamme N°10S inneholder tilsvarende gener for lysinsyntese som K-12S B-7, men hos N°10S er disse innført ved at to rekombinante plasmider er transformert inn i *E. coli* K-12 stamme NVC578. Hensikten med innskutt rekombinant DNA er å øke enzymaktiviteten til L-lysin biosyntestveien, for kommersiell produksjon av L-lysin. Biomasse fra *E. coli* K-12 stamme N°10S blir brukt som komparator for biomasse PL73 (LM).

Genmodifiseringsprosessene frem til *E. coli* K-12 stamme N°19E og det DNA-materialet som er benyttet for konstruksjon av N°19E er konfidensiell informasjon. Faggruppene har vurdert denne konfidensielle informasjonen, men informasjonen kan ikke gjengis her.

Når produksjonen av L-lysin er ferdig blir bakteriekulturen varmeinaktivert ved 121 °C. Etter varmeinaktivering blir L-lysin separert fra bakteriemediet. Det gjenværende varmeinaktiverte bakteriemediet er undersøkt for levende og levedyktige *E. coli* bakterier. Metodene som ble benyttet for påvisning av levende og levedyktige celler, var undersøkelser med utsåing av 2 forsøk á 0,05 g x 20 utsæd (dvs. totalt 2 g utsædd) i vanlig dyrkingsmedium, samt i et selektivt og *E. coli* spesifikt dyrkingsmedium. Ingen levende eller levedyktige N°19E bakterier er påvist.

Det varmeinaktivert bakteriemediet er behandlet som vist i figur 1. Bakteriene ble skilt fra mediet, behandlet med svovelsyre. Bakteriebiomassen ble så konsentrert og tørket. Den tørkede massen ble malt, presset ved høyt trykk og granulert. Granulatet benyttes som tilsetning til fôrvarer. Biomassen vil bli markedsført under navnet PL73 (LM) med handelsnavn PROT-AEL-L eller PROT-AEL, og vil kun bli benyttet som tilsetning til fôrvarer.

Figure 1.2: Manufacturing process of PL73 (LM)



Decantation effluents (liquid): Supernatant coming from the decantation of bacterial creams.
'Drains' ('Egoutures'): settled and dried creams passing between the cylinders of the drier and falling at the bottom of these driers.
Dusts: fine particles of the product.

Figur 1: Fremstillingsprosess av PL73 (LM) biomasse

2. Molekylær karakterisering

Molekylærbiologiske analyser som er utført på den genmodifiserte bakterien *E. coli* K-12 stamme N°19E, er vurdert av faggruppene. Mesteparten av denne informasjonen er konfidensiell. Faggruppene har vurdert denne konfidensielle informasjonen, men informasjonen kan ikke gjengis her.

2.1 Genmodifisering, transformasjonssystem og vektorkonstruksjon

Den genmodifiserte bakterien N°19E er fremkommet ved hjelp av konvensjonelle - og rekombinante DNA teknikker. All genmodifisering ble utført på genomet til *E. coli* K12 stamme K-12S B-7. Genmodifiseringsprosessen er konfidensiell informasjon. Det opplyses at det er benyttet forskjellige vektorer i den initiale fasen av modifiseringen, og at disse vektorene er ikke tilstede i *E. coli* N°19E. Det er fortsatt undersøkelser om noen av de antibiotikaresistensgenene som er i vektorene, kan ha blitt overført til N°19E genomet. Undersøkelsen er utført med Southern blot og prober mot de aktuelle antibiotikaresistensgenene. Det opplyses at N°19E ikke inneholder disse genene.

2.2 Karakterisering av geninnsettingen og genkonstruksjonen

Karakteriseringen av ny gener, geninnsettingen og genkonstruktet anses av søker som konfidensiell informasjon. I den konfidensielle dokumentasjonen har søker laget et ganske detaljert sammendrag av genmodifiseringsprosessen. Søker beskriver "stamtavlen" til N°19E. Hele stamtavlen er konfidensiell. Det er også laget en detaljert oversikt av genmodifiseringsprosessen frem til N°19E. Det er opplyst at ekspressjonskassetten foreligger i flere kopier i N°19E-genomet. Oversikten omfatter også konstruksjon av vektorer, plasmider og genmodifikasjonen som fører til L-lysinproduksjon og strukturene til de integrerte genkassetene, m.m.

Faggruppene finner informasjonen tilstrekkelig for vurdering av N°19E.

2.3 Informasjon vedrørende uttrykk av innsatte gener og åpne leserammer (ORF)

Det er påvist flere åpne leserammer på mer enn 50 aminosyrer. Det er foretatt analyse og identifikasjon av disse åpne leserammene. Det hevdes at det ikke er påvist homologi til aminosyresekvenser som kan være helseskadelige. Denne informasjonen anser søker som konfidensiell informasjon.

Faggruppene finner informasjonen tilstrekkelig for vurdering av N°19E.

2.4 Nedarving og stabilitet av innsatt DNA

Undersøkelser over 15 til 20 generasjoner viser at det rekombinante DNAet er stabilt inkorporert i bakteriens genom. Undersøkelsen er utført ved restriksjonskutting av genomisk DNA, separasjon av fragmentene på agarosegel og Southern blot. Deteksjon av målsekvenser på ekspressjonskassetene ble utført med probe mot en bestemt sekvens på kassetene. Stabil produksjon av L-lysin over flere generasjoner viser også at fenotypen er stabil.

Faggruppene finner informasjonen tilstrekkelig for vurdering av N°19E.

2.5 Potensial for genoverføring

Vedrørende potensiale for genoverføring har Faggruppe 3 og Faggruppe 6 spillt inn kommentarer til EFSA-nett, se kapittel 7

3.3. *Assessment of the presence of recombinant DNA and of potential risk of gene transfer.*

Potensiale for overføring av rekombinant DNA fra biomassen til *E. coli* er undersøkt. En forutsetning for genspredning er tilgjengelige veier for overføring av genetisk materiale, enten via horisontal eller vertikal genoverføring av DNA. Overføring av rekombinant DNA kan skje ved at mikroorganismer i fordøyelseskanalen hos mennesker og dyr kan eksponeres for rekombinant DNA. *E. coli* er en naturlig del av tarmfloraer hos mennesker, dyr og fugl. DNA fra biomasse produsert av *E. coli* N°19E kan derfor overføres vertikalt til *E. coli* i tarmen, men også horisontalt til andre mikroorganismer som finnes i tarmen.

I henhold til søker vil den lave pHen (pH < 4,5) i svovelsyren som benyttes ved behandlingen av de varminaktiverte *E. coli* cellene, depurinere DNA. For å undersøke potensialet for overføring av DNA, ble DNA ekstrahert fra PL73 (LM) biomasse. For ekstrahering av DNA ble to forskjellige metoder benyttet, henholdsvis kloroform/fenol og alkalisk (NaOH). To milligram biomasse ble benyttet til opprensing av DNA. DNA er rensert for inhiberende komponenter. Renset DNA er analysert med gelelektroforese på agarosegel for å undersøke graden av degradering av DNA. Størrelsen på det degraderte DNAet var <<400 bp.

Renset DNA er undersøkt med konvensjonell PCR analyse med primerpar som oppformerer henholdsvis ≈ 1000 og 452 bp av spesifikke DNA-sekvenser til ekspresjonskassetten på det rekombinante DNAet. Det ble ikke påvist DNA som er ≈ 1000 bp, mens det ble påvist svært liten mengde av DNA-sekvensen på 454 bp. Mengden var nær deteksjonsgrensen på 10^{-4} ppm DNA. Ved bruk av Real Time PCR, et primerpar og en probe til 83 bp av ekspresjonskassetten, ble det påvist ca. 20 ppm av det rekombinante DNA-fragmentet. To kontroller ble benyttet. En kontroll med N°19E celler og en annen kontroll med N°19E DNA som ble tilsatt PL73 (LM) biomasse før opprensing. Analysen viser at det rekombinante DNA innskuddet er degradert, og at størrelsene på rekombinant DNA-sekvenser i biomassen er mellom 84 bp og 450 bp. Southern blot med probe mot rekombinante DNA sekvenser for å vise størrelsen av det degraderte rekombinante DNAet, er ikke utført.

Vurdering av transformeringsevnen til degradert rekombinant DNA i biomassen PL73 (LM) er ikke utført med en *E. coli* K-12 stamme. Søker henviser kun til forsøk utført med DNA fra PT73 *E. coli* (TM) (EFSA/GMO/FR/2008/59), dokumentasjonen er gjengitt i VKMs helserisikovurdering av PT73 (TM) (VKM 2008).

Kommentarer fra faggruppene til potensialet for genoverføring.

Dataene som er presentert i den konfidensielle analysen utført av Bailly & Labat (2008) har begrenset verdi, og er til dels mangelfull. Innhold og størrelsefordeling av DNA synes å være noe forskjellig fra søknaden PT73 (TM) (Bailly & Labat (2007)). Faggruppene påpeker at analyse av rensert DNA med agarosegel i søknaden PT73 (TM) er forskjellig med hensyn til tilsvarende analyse i PL73 (LM) søknaden. Mengde DNA som er påsatt gel er forskjellig, noe som har betydning for påvisning av degradert DNA. Faggruppene mener at søker må foreta egnet transformeringsforsøk med DNA fra PL73 (LM).

2.6 Identifisering av en *E. coli* stamme som er konvensjonelt motstykke

Søker hevder PL73 (LM) biomassen ikke kan sammenlignes med et konvensjonelt motstykke, fordi konvensjonelle *E. coli* K-12 stamme som produserer L-lysin ikke tidligere har blitt markedsført. Faggruppene er uenig med søker. Faggruppene mener at den umodifiserte stammen K-12S B-7 kan benyttes som konvensjonelt motstykke, og anfører at denne *E. coli* stammen uten tilførte gener, kan benyttes til å skille effekter som skyldes genmodifiseringen fra generelle effekter som skyldes eksponering til *E. coli* biomasse (justert for L-lysin innhold) i føringsforsøk.

2.7 Informasjon om den genmodifiserte mikroorganismen og sammenligning med konvensjonelt motstykke

Det foreligger beskrivelse av fenotypisk karakterer og eventuelle nye egenskaper som kan uttrykkes, eller som ikke blir uttrykt. Det er foretatt ribo- og serotyping av stammen. Disse undersøkelsene viser at N°19E og K-12S B-7 kommer fra samme *E. coli* K-12 stamme. Videre er det undersøkt for følsomhet overfor 32 antibiotika. N°19E var følsom for alle 32 antibiotikaene som det ble undersøkt for.

Vedrørende valg av komparator og forsøksdesign har faggruppene spilt inn kommentarer til EFSA-nett, se kapittel 7:

2. Characterisation of the genetically modified microorganism (GMM)

2.8 Delkonklusjon

Faggruppe 3 og Faggruppe 6 finner informasjonen tilstrekkelig for vurdering av den genmodifiserte stammen N°19E. Faggruppene har ikke identifisert noe risiko knyttet til den molekylærbiologiske karakteriseringen. Faggruppene mener at den umodifiserte *E. coli* stammen K-12S B-7 kan benyttes som konvensjonelt motstykke. Faggruppene påpeker at dataene mht. størrelse på degradert DNA er begrenset, samt at undersøkelse av transformeringsevnen til degraderte rekombinante DNA mangler.

Faggruppe 3 og Faggruppe 6 konkluderer med at det ikke er identifisert noen risiko knyttet til den molekylærbiologiske karakteriseringen.

3. Komparative analyser

Ajinomoto Eurolysine har fremstilt i fullskalaproduksjon to partier. Et navngitt som B1-2006 i dossier C. Dette partiet er også navngitt som "PL73 (LM) Nov. 2006" og "PL73 Dec. 2006" i andre dokumenter. Det andre partiet er navngitt B2-2008 i dossier C. Også dette partiet har andre navn i forskjellige dokumenter, som "PL 73 (LM) week 6 (of 2008)", "PL73 (LM) week 6/2008" og "PL73 W 6/2008". Ajinomoto Eurolysine har også fremstilt et parti benevnt B3-2006. Parti B2-2008 er i storskalaproduksjon som omfatter flere industrielle fermentorer, mens B1-2006 er småskalaproduksjon som omfatter en industriell fermentor. Søker opplyser at det har vært problemer med tørking av biomassen B1-2006, og dette har resultert i høyt tørrstoffinnhold (ca. 98,1 %). Søker opplyser også at tørrstoffinnholdet i parti B2-2008 er noe lavere (86,6 %) enn det som er typisk tørrstoffinnhold for slik biomasse. Typisk tørrstoffinnhold i biomasse oppgis til 88 %.

Disse partiene er benyttet til analyser og tester, samt til sammenligning med PL73 *E. coli* (LYS) parti S1 (2001), se helseisikovurdering av PL73 *E. coli* (LYS) biomasse (VKM, 2008) utført av Faggruppe 3 og Faggruppe 6.

Statistiske analyser

I Nordisk ministerråds rapport "Safety Assessment of Novel Food Plants: Chemical Analytical Approaches to the Determination of Substantial Equivalence" (TemaNord 1998), anbefales det at tilstrekkelig antall prøver må analyseres for å få adekvat sensitivitet for statistisk analyse. Spredning i enkeltparametre skal være sammenlignbare for genetisk modifisert plante og umodifisert plante. I rapporten er det anbefalt at spredningen i enkeltverdier bør ligge innenfor ± 20 %. Faggruppe for genmodifiserte organismer benytter denne anbefalingen som grunnlag for vurdering av forsøksresultatene.

3.1 Valg av komparator og forsøksdesign

Vedrørende analyse av forskjellige komponenter i biomassen av har Faggruppe 3 og Faggruppe 6 spill inn kommentarer til EFSA-net, se kapittel 7:

4. *Nutritional assessment of the product including safety for target animals.*

Ajinomoto Eurolysine hevder at sammenligning med konvensjonelt motstykke ikke er aktuelt for PL73 (LM) bakteriebiomasse, fordi biomassen fra L-lysinproduserende *E. coli* bakterien ikke tidligere er blitt produsert og markedsført. En komparativ risikovurdering med et ikke-konvensjonelt motstykke er derfor ikke mulig. Fordi det ikke finnes en slik komparator skal Ajinomoto Eurolysine utføre en full risikovurdering i henhold til EFSA's retningslinjer.

Ajinomoto Eurolysine hevder imidlertid at en fullstendig risikovurdering og fullstendig analyse av næringskomponenter ikke er nødvendig fordi dette ble utført på biomasse PL73 *E. coli* (LYS). Forskjellene mellom biomasse PL73 *E. coli* (LYS) og biomasse PL73 (LM) er endret bakteriestamme, fra *E. coli* K-12 stamme N°10S til *E. coli* K-12 stamme N°19E, endret genmodifikasjon samt det er benyttet forskjellige vektorer ved genmodifiseringene. Fremstillingsprosessen av L-lysin og biomassene er den samme for begge *E. coli* stammene.

Kommentarer fra Faggruppe 3 og Faggruppe 6:

Faggruppene er uenige med Ajinomoto Eurolysine i at det ikke er mulig å foreta en komparativ risikovurdering med et konvensjonelt motstykke. Faggruppene mener at den umodifiserte stammen K-12S B-7 kan benyttes som konvensjonelt motstykke, se kapittel 2.6 for faggruppens begrunnelse.

Faggruppene er også uenige med Ajinomoto Eurolysine i at biomasse fra PL73 *E. coli* (LYS) er tilstrekkelig for vurdering av helserisiko for biomasse PL73 (LM), fordi PL73 (LM) og PL73 *E. coli* (LYS) er produsert fra ulike *E. coli* stammer og fordi det er benyttet forskjellige vektorer ved genmodifiseringen. Det bemerkes også at det rekombinante DNAet i bakteriecellene til *E. coli* N°10S sitter på plasmider, mens i *E. coli* N°19E sitter rekombinant DNA i genomet. Faggruppene mener at *E. coli* N°10S prinsipielt ikke er lik *E. coli* N°19E, og det knyttes derfor usikkerhet til om biomasse PL73 *E. coli* (LYS) og PL73 (LM) er like pga forskjeller i genmodifisering.

Faggruppene påpeker også at dataene som er presentert i dokumentasjonen fra søker, viser forskjeller ved sammenligning mellom stammene.

Faggruppe 3 og Faggruppe 6 mener at en full risikovurdering av biomassen må utføres.

3.2 Analyser av ernæringsmessige - og andre kjemiske komponenter

Følgende analyser er ikke foretatt på PT73 (TM) biomasse:

Klororganiske forbindelser (dioxiner, PCBer m.m.), organofosfater og polyaromatiske hydrokarboner (PAH). Søker hevder at det er tilstrekkelig at disse komponentene er målt for PT73 *E. coli* (THR).

*De forskjellige analysene av ernæringsmessige - og andre kjemiske komponenter som er utført på PL73 *E. coli* (LYS) biomasse er dokumentert i Faggruppe 3s og Faggruppe 6s helserisikovurdering av PL73 *E. coli* (LYS) (VKM 2008).*

Da prosesseteknikk og tilsatzstoffer i fremstillingen av biomassene stort sett er den samme for PL73 *E. coli* (LYS) og PL73 (LM) samt at analysene av miljøgifter viser lave tall for PL73 *E. coli* (LYS), kan det aksepteres at det ikke foretas egne analyser av miljøgifter i biomasse PL73 (LM).

For beskrivelse av analysemetoder som er benyttet for å analysere de forskjellige komponentene i biomassene henvises det til analytiske metoder som brukes av TNO-Quality of Life, Nederland. Detaljert informasjon om metodene betraktes av TNO som konfidensielt. Kun generell informasjon om disse metodene er lagt ved søknaden. Imidlertid er analysene med referanse til Facquet et al.

(2008) og Jacot et al., (2006) utført av Laboratoire Veterinaire, Somme, og analysene med referanse til Mauclair (2007, 2008) er Ajinomoto Eurolysine egne analyser.

Det råder usikkerhet om noen av de kjemiske analysene utført av TNO og Ajinomoto ble utført under god laboratoriepraksis (GLP), fordi det i noen analyserapporter ikke er stadfestet at de kjemiske analysene er utført under GLP.

Faggruppe 3 og Faggruppe 6 finner at det knyttes usikkerhet til de analysene som er utført av Ajinomoto Eurolysine, fordi det ikke er spesifisert om metodene er sertifiserte analysemetoder.

Analysen av ernæringsmessige komponenter, metaller og kontaminanter i biomassen

Ved oppformering av bakteriekulturen benyttes det et skumdempende middel. På grunn av problemer med påvisning av midlet, hevder søker at eventuell risiko ved middelet er utført ved de generelle toksisitetsstudiene av biomassen.

Biomasse PL73 *E. coli* (LYS) S1 (2001) (EFSA/GMO/FR/2007/40) er benyttet som komparator for B1-2006 og B2-2008, se tabell 1

Det er foretatt følgende analyser av komponenter i biomassene PL73 (LM) B1-2006 og B2-2008:

Nitrogenholdige komponenter (total og frie aminosyrer, ammonium N, amid N, urea N, biogene aminer, nukleinsyrer), karbohydrater, organiske syrer, tørrstoff, vann, aske, organisk stoff, protein, fiber, stivelse, mineraler, spormetaller, toksiske metaller og andre uorganiske komponenter. Analysene ble utført under god laboratoriepraksis (GLP).

Både PL73 (LM) og PL73 *E. coli* (LYS) har høyt innhold av protein, henholdsvis gjennomsnittlig ca. 800 g/kg tørrvekt og ca. 850 g/kg tørrvekt. Mengde protein i PL73 (LM) varierer med ca. 10 % fra parti til parti, fra 778 g/kg til 844 g/kg tørrstoff, se tabell 1.

Tabell 1: Kvantifisering av kjemiske komponenter av ernæringsmessig betydning i PL73 (LM) – og PL73 *E. coli* (LYS) biomasse.

Table 3.3.1: Crude (Macro-) components

Crude components	Unit	Ref.	'As is basis'			Dry matter basis		
			PL73 (LM)		PL73 <i>E. coli</i> (LYS)	PL73 (LM)		PL73 <i>E. coli</i> (LYS)
			B1-2006	B2-2008	S1 (2001)	B1-2006	B2-2008	S1 (2001)
Dry matter	g/100g	(a)	98.11	86.55	90.02			
		(b)	NM	88.1*	90.6*			
		(c)			91.1			
Moisture	g/100g	(a)	1.89*	13.45*	9.98*			
		(b)	NM	11.9	9.4			
		(c)			8.9*			
Crude protein (N total x 6.25)	g/100g	(a)	76.44	68.94	77.25	77.91*	79.65*	85.81*
		(b)	NM	74.38	NM		84.42*	
		(c)			76.25*			83.70
Crude fat	g/100g	(a)	NM	NM	6.05			6.72*
		(b)	12.1	10.3	5.40	12.3**	11.7*	5.96*
		(c)			5.70*			6.3
Crude fibre	g/100g	(c)			0.90*			1.00
Starch	g/100g	(c)			0.64*			0.70
Organic matter	g/100g	(c)			88.4*			97
Crude ash	g/100g	(a)	0.86	2.74	2.17	0.88*	3.17*	2.41*
		(b)	2.50	< 0.3	NM	2.55**	< 0.3*	
		(c)			2.73*			30
pH (suspension at 10%)		(a)	3.22	4.98	4.4			

N.M: not measured

*: By calculation either from the value expressed on the 'as is basis' or from the value expressed on the 'dry matter basis'.

** By calculation using the Dry Matter content obtained by '(Mauclair, 2007)'.

(a): (Mauclair, 2007) and (Mauclair, 2008) for samples B1-2006 and B2-2008 of PL73 (LM), respectively and (Mauclair, 2003) for sample S1 of PL73 *E. coli* (LYS)

(b): (de Haan, 2007) and (de Haan, 2008) for Samples B1-2006 and B2-2008 of PL73 (LM), respectively, and (Boerma, 2003) for Sample S1 of PL73 *E. coli* (LYS)

(c): (Jansman and van Diepen, 2005) for sample S1 of PL73 *E. coli* (LYS)

Analyser av fett, fosfolipider, lipidløslige pigmenter og fettsyresammensetning

Totalt fettinnhold i biomassene B1-2006 og B2-2008 er målt til henholdsvis 12,3 og 11,7 g/100g tørrstoff, mens i parti S1 (2001) er totalt fettinnhold 6 g/100g, se tabell 1.

Det er også foretatt analyse av flere fettsyrer i partiene B2-2008 og S1 (2001), mens det ikke er foretatt analyser av fettsyrer i parti B1-2006. I henhold til søker kan det ikke foretas direkte sammenligning mellom biomasse PL73 (LM) og biomasse PL73 *E. coli* (LYS) mht fettsyreinhold, fordi, fettsyresultatene som er presentert for (LM) og (LYS) ikke er direkte sammenlignbare. Søker hevder imidlertid at det er ingen grunn til å anta at fettsyreinholdet i *E. coli* stamme N°19E og *E. coli* stamme N°10S er forskjellige.

Det er ikke målt for fosfolipider, lipidløslige pigmenter og uforsåpbare rester.

Faggruppe 3 og Faggruppe 6 mener at det bør etterspørres hvorfor biomasse S1 (2001) inneholder ca. halvparten av fettinnhold av det som er påvist i parti B1-2006 og B2-2008.

Faggruppe 3 og Faggruppe 6 finner det ikke tilfredsstillende at fettsyremengdene for B2-2008 og S1 (2001) ikke kan sammenlignes. Faggruppe 3 og Faggruppe 6 mener at søker må utføre analyser av fosfolipider og lipopolysakkarider, og nye analyser av fettsyrer.

Kvantifisering av aminosyrer og nitrogenholdige komponenter.

Bakteriekulturen tilsettes ammoniumsulfat, ammoniakk og protein fra soya. Størsteparten av nitrogenet som er påvist i PL73 (LM)-biomassen kommer fra bakterieprotein og frie aminosyrer, mens cirka 7-10 % av nitrogenet er til stede som ammonium-N, dvs fritt NH₃ og NH₍₃₎-forbindelser. I biomasse S1 (2001) er det påvist ca. 3,5 ganger større mengde ammonium-N (33 %) enn i de to (LM) partiene (7-10 %). For nitrit, nitrat og betain er det funnet til dels store forskjeller mellom partiene B1-2006 og B2-2008.

Faggruppene mener at det bør etterspørres hvorfor biomasse S1 (2001) inneholder ca. 3,5 ganger større mengde fritt ammonium-N enn det som er påvist partiene B1-2006 og B2-2008.

Både essensielle og ikke-essensielle aminosyrer ble analysert, totalt 18 aminosyrer. Syrehydrolyse av biomassen fører til at proteiner og peptider spaltes til aminosyrer. Totalinnholdet, dvs. summen av frie aminosyrer ble kvantifisert både før og etter syrehydrolyse.

De frie aminosyrene som er påvist og kvantifisert før syrehydrolyse er asparaginsyre, treonin, serin, glutaminsyre, glycin, alanin, valin, metionin, leucin, tyrosin, histidin, lysin (base). Totalinnhold av frie aminosyrer for henholdsvis B2-2008 og S1 (2001) er 6,3 og 4,1 g/100g tørrvekt. Frie aminosyrer i B2-2008 består hovedsakelig av lysin. Prolin er ikke påvist i B2-2008. Med unntak av prolin er alle de andre aminosyrene påvist i B2-2008. Frie aminosyrer i parti S1 (2001) er hovedsakelig treonin og alanin.

Aminosyrer som er kvantifisert i (LM) B1-2006 og B2-2008 etter syrehydrolyse er aspergin/aparagin, treonin, serin, glutaminsyre/glutamin, glycin, alanin, valin, metionin, isoleucin, leucin, tyrosin, fenylalain, histidin, lysin (base), arginin, prolin, tryptofan. Totalmengden av aminosyrer i B1-2006 og B2-2008 er henholdsvis 73 og 76 g/100g tørrvekt og for biomasse S1 (2001) 60 g/100g tørrvekt. Lysinmengden i B1-2006 og B2-2008 ca. 2,5 ganger større enn i S1 (2001). For de andre aminosyrene er forskjellene mellom biomassene mindre enn 50 %.

Faggruppene mener at det bør etterspørres hvorfor biomasse S1 (2001) inneholder ca. ¼ av mengde lysin i forhold til partiene B1-2006 og B2-2008.

Kvantifisering av biogene aminer

Det er analysert for agmatin, fenyletylamin, histamin, kadaverin, putresin, spermidin, spermin, og tyramin.

Faggruppe 3 og Faggruppe 6 finner at det er relativt store forskjell i analysefølsomhet for flere av de biogene aminene som er målt. Søker har ikke gitt noen forklaring på hvorfor det er slike store forskjeller i analysefølsomhet for flere av de biogene aminene. Faggruppe 3 og Faggruppe 6 mener det er uakseptabelt å presentere slike resultater.

Kvantifisering av nukleinsyrer og nukleotider

Totalmengde nukleinsyre, RNA og DNA er målt i B2-2008 biomasse. Det er påvist svært lave mengder. Mengde RNA og DNA i (LM) og (LYS) er målt til mindre enn 1 g/100g "as is basis" Biomasse/bioprotein fra andre bakterier inneholder generelt relative store mengder nukleinsyrer, dvs. fra 5 til 15 g/100g (VKM 2006). Mengde nukleinsyrer i biomassen er svært mye lavere enn det som generelt påvises i biomasse som er fremstilt fra andre bakterier.

Det er også foretatt måling av purin- og pyrimidinbaser på basis av µmol/100 gram tørrvekt, gram/100 gram "as is" og gram/100 gram tørrvekt. For innholdet av tymin er det påvist forskjeller på opptil ca. 8 ganger. Summen av disse nukleotidene er mellom 0,7-0,95 g/100 g tørrvekt.

Faggruppene mener søker bør kommentere hvorfor denne biomassen har mye lavere mengde nukleinsyrer enn annen biomasse, og de store forskjellene i tyminmengde.

Kvantifisering av vitaminer

Søker har analysert for vitaminer i B2-2008- og S1 (2001)-biomasse. Vitaminer det er analysert for er vitamin A, B-vitaminene tiamin (vit. B1), riboflavin (vit. B2), niacin (vit. B3), pantotensyre (vit. B5) pyridoksin (vit. B6), biotin (vit. B7 dvs. vit. H), folinsyre (vit. B9) cyanokobalamin (vit. B12), og vitamin C, D, E (alfa-, beta-delta og gamma-tokoferol), K1 (fylloquinon) og karotener (total karoten, alfa- og beta karoten, lutein, lykopen, beta-kryptoxantin, zeaxantin).

For vitaminene A, D, E, C og karotener, med unntak av totalkaroten, er det ikke påvist mengder over påvisningsgrensene. Mengde vit. B1 er påvist i S1 (2001), men ikke i (LM), mengde vit. B2 er ca. 10 ganger større i S1 (2001) enn i (LM), mengde vit. B3 er ca. 8 ganger større i (LM) enn i S1 (2001), mengde pantotensyre er ca. 15 ganger større i S1 (2001) enn i (LM), vit K1 er ikke påvis i S1 (2001) men i (LM).

Kvantifisering av stivelse og oligosakkarider

Det fermenterte substratet inneholder ikke stivelse, men kan inneholde komplekse polysakkarider. Søker har ikke dokumentert totalt reduserende sukkerarter eller sukker. De sukkerartene som er det er analysert for er arabinose, fruktose, frukose, galaktose, glukose, laktose, maltose, isomaltose, maltotriose, mannose, sakkarose (sukrose), og xylose. For alle sukkerarter er mengdene <1 g/100g "as is basis". Det er målt for polysakkarider, og gjennomsnittlig mengde for de tre partiene er 23 g/100g tørrstoff.

Kvantifisering av organiske syrer

Følgende organiske syrer er analysert i (LM): melkesyre (fra LOQ til 0,37 g/100 g), maursyrer (LOQ til 0,019 g/100g), eddiksyre (0,28 til 1,7 g/100 g), propionsyre (LOQ til 0,2 g/100 g), smørsyre (0,03 til 0,19 g/100 g), valeriansyre (LOQ) og iso-valeriansyre (0,12 til 0,17 g/100 g). I (LYS)-biomasse er det kun analysert for eddiksyre (0,5 g/100 g) og maursyre (0,4 g/100 g).

Kvantifisering av mineraler, spormetaller, toksiske metaller og andre uorganiske komponenter

Det er analysert for mineralene kalium, kalsium, magnesium, og natrium, samt for fosfat, klorid og sulfat. Det er funnet til dels store forskjeller for enkelte metaller mellom B2-2008 og PL73 *E. coli* (LYS). Biomassene inneholder også en del sulfat ca. 35 g/kg tørrvekt i PL73 (LM) og 89 g/kg tørrvekt i PL73 *E. coli* (LYS), se tabell 2.

Metaller som er analysert i (LM) og (LYS) S1 (2001) er arsen, bly, jern, kadmium, kobber, krom, kvikksølv, nikkel og sink. Mengdene av tungmetallene arsen, bly, kadmium og kvikksølv i biomassen PL73 (LM) er ca. 1/1000 av mengdene i biomasse (LYS) S1 (2001), se tabell 2. Analysene er utført av TNO Nutrition and Food Research. Analyserapportene fra TNO (de Haan, 2007, de Haan, 2008, Rooseboom-Reimers, 2002, se fotnoter i tabell 2) viser at mengdene av arsen, bly, kadmium og kvikksølv i de to biomassene er ganske like, eksempelvis er arsenmengden i (LM) angitt til <20 mikrogram/kg og for (LYS) til 0,035 mg/kg (dvs. 35 mikrogram/kg). For (LYS)-biomasse må Ajinomoto Eurolysine ha oppgitt feil mengder i tabell 2.

Tabell 2: *Analyse av metaller.*

Table 3.3.8.2.a Concentrations of heavy metals (in mg/kg or µg/kg)

(Heavy) metals	Max. Limit ⁽¹⁾	Unit	Ref.	'As is basis'			Dry matter basis		
				PL73 (LM)		PL73 <i>E. coli</i> (LYS)	PL73 (LM)		PL73 <i>E. coli</i> (LYS)
				B1-2006	B2-2006	S1 (2001)	B1-2006	B2-2006	S1 (2001)
As	2 mg/kg	mg/kg	(a) (b)	<0.020	<0.010	35			
Pb	10 ⁽²⁾ mg/kg	mg/kg	(a) (b)	0.090	<0.050	169			
Hg	0.1 mg/kg	mg/kg	(a) (b)	0.006	0.008	33			
Cd	1 ⁽³⁾ mg/kg	mg/kg	(a) (b)	<0.010	0.032	42			
Cr	-	mg/kg	(a) (b)	NM	0.39	0.48			
Cu	-	mg/kg	(a) (b)	<5	2.3	1.5 2.7*		2.6*	
Ni	-	mg/kg	(a) (b)	NM	0.57	0.58			3
Fe	-	mg/kg	(a) (b)	51	95	83*	52*	108*	91
Zn	-	mg/kg	(a) (b)	4.7	NM	13.8 11.8*	4.8*		13

(a) (de Haan, 2007) and (de Haan, 2008) for samples B1-2006 and B2-2008 of PL73 (LM), respectively, and (Rooseboom-Reimers, 2002) for Sample S1 of PL73 *E. coli* (LYS).

Kvantifisering av pesticider, klororganiske miljøgifter(dioksiner, DDT etc) og polyaromatiske hydrokarboner (PAH)

For analyser av pesticider etc. henvises det til PL73 *E. coli* (LYS) dokumentasjonen. Dokumentasjonen i PL73 *E. coli* (LYS) inneholder målinger av klororganisk forbindelser, pesticider, organofosfater, polyaromatiske hydrokarboner (PAH) med mer. Denne dokumentasjonen er gjengitt i VKMs helserisikovurdering av PL73 *E. coli* (LYS) (VKM 2008).

Kvantitativ og kvalitativ analyse mikroorganismer i biomasse

Dyrkbare mikroorganismer

Søker har undersøkt for dyrkbare mikroorganismer i PL73 (LM) biomasse. Det er ikke påvist *Salmonella* bakterier per 50 gram biomasse. Det er påvist færre enn 10 per gram biomasse av henholdsvis koagulase positive *Stafyllococcus*, *Clostridium perfringens*, sulfit-reduserende bakterier dyrket ved 46 °C, termotolerante coliforme, coliforme dyrket ved 30 °C og enterobakteriaser dyrket ved 30 °C. Per gram biomasse er det påvist færre enn 20 fekal streptokokker dyrket ved 37 °C. Søker har estimert totalantall aerobe bakterier dyrket ved 30 °C til 600 per gram biomasse, gjærsopper til færre enn 10 per gram og muggsopper til 90 per gram.

Den mikrobielle status for PL73 (LM) biomasse er som for PL73 *E. coli* (LYS). Analysemetodene for påvisning av mikroorganismer er utført i henhold til AFNOR-normer (Association française de normalisation).

Vekst av mikroorganismer ved lagring.

Vekst av mikroorganismer ved lagring av PL73 (LM) biomasse er ikke målt. Søker henviser til PL73 *E. coli* (LYS)-dokumentasjonen. Denne dokumentasjonen er gjengitt i VKMs helserisikovurdering av PL3 *E. coli* (LYS) (VKM 2008).

Lagringsstabilitet av fôr som inneholder biomasse PL73 (LM).

Søker har ikke utført undersøkelser av lagringsstabilitet av fôr som inneholder biomasse PL73 (LM). Søker henviser til lagringsforsøk av grise fôr og fôr til kyr som inneholder biomasse PL73 *E. coli* (LYS).

Andre studier som ikke er utført på PL73 (LM), men som er utført på PL73 *E. coli* (LYS) er opptak av oksygen i biomassen og frigivelse av flyktig komponenter fra biomassen.

Denne dokumentasjonen er gjengitt i VKMs helserisikovurdering av PL73 *E. coli* (LYS) (VKM 2008).

3.3 Delkonklusjon

Ettersom fosfolipider og lipopolysakkarider er forventet å utgjøre en viktig bestanddel i slike biomasser, mener Faggruppe 3 og Faggruppe 6 at søker bør kvantifisere fosfolipider og lipopolysakkarider i PL73 (LM) biomasse. Faggruppe 3 og Faggruppe 6 påpeker at mange analyser, kjemisk og biologiske, ikke er utført i henhold til god laboratoriepraksis (GLP). Faggruppene stiller også spørsmål ved noen av analysemetodene som er benyttet, fordi faggruppene ikke finner at metodene er sertifiserte. Faggruppene finner måleresultatene av nukleinsyrer overraskende lave. Biomasse/bioprotein fra andre bakterier inneholder generelt relative store mengder nukleinsyrer, dvs. fra 50 til 150 g/kg (VKM 2006).

Fordi prosessteknikk etter modifisering stort sett er den samme for PL73 *E. coli* (LYS) og PL73 (LM), og analysene av miljøgifter (fremmedstoffer) viser så lave tall for PL73 *E. coli* (LYS), aksepterer Faggruppe 3 og Faggruppe 6 at det ikke foretas egne analyser av miljøgiftinnhold i PL73 (LM) biomasse.

Faggruppe 3 og Faggruppe 6 mener at PL73 (LM) bakteriebiomasse prinsipielt ikke er lik PL73 *E. coli* (LYS) fordi biomassene er produsert fra ulike *E. coli*-stammer. Faggruppene mener også at modifiseringen av *E. coli* stammene som produserer PL73 *E. coli* (LYS) og PL73 (LM) er forskjellige, fordi det er plasmider i bakteriene som produserer PL73 *E. coli* (LYS) biomasse. Det knyttes derfor usikkerhet til om biomasse fra PL73 *E. coli* (LYS) og PL73 (LM) er like pga forskjeller i genmodifisering. Ut fra analysedataene stiller faggruppene også spørsmål ved påstanden om at de to bakteriestammene er like, fordi bredden av studiene for PL73 (LM) er smalere enn for PL73 *E. coli* (LYS).

Faggruppe 3 og Faggruppe 6 påpeker at dataene mht. størrelse på degradert DNA og transformeringsevnen til degraderte rekombinante DNA er begrenset og til dels mangelfulle, både med hensyn til innhold og størrelsesfordeling av DNA.

Faggruppe 3 og Faggruppe 6 er uenige med søker i at sammenligning med konvensjonelt motstykke ikke er aktuelt for PT73 (TM) bakteriebiomasse, samt at fullstendig risikovurdering og fullstendig analyse av næringskomponenter ikke er nødvendig fordi dette ble utført på PL73 *E. coli* (LYS). Faggruppene viser til at bredden av studiene for PL73 (LM) er smalere enn for PL73 (LYS), og det er påvist store endringer i innhold av enkelte analyserte komponenter i PT73 (LM) sammenlignet med biomasse PL73 *E. coli* (LYS). Faggruppene mener derfor det er uakseptabelt at søker henviser til PL73 *E. coli* (LYS)-dokumentasjonen mht de komponentene som ikke er målt for i biomasse PL73 (LM).

Ettersom fosfolipider og lipopolysakkarider er forventet å utgjøre en viktig bestanddel i slike biomasser, mener Faggruppene at det bør foretas analyser av mengde fosfolipider og lipopolysakkarider i PL73 (LM) biomasse.

Faggruppene konkluderer med at PL73 *E. coli* (LYS) biomasse i prinsippet ikke er lik PL73 (LM) biomasse, fordi ved sammenligning av forskjellige komponenter er det funnet til dels store forskjeller mellom PL73 *E. coli* (LYS) og PL73 (LM).

Faggruppe 3 og Faggruppe 6 konkluderer med at biomasse fra PL73 *E. coli* (LYS) ikke er tilstrekkelig for vurdering av ernæringsrelaterte komponenter, kritiske toksiner, toksiske metaller og kjemiske kontaminanter for biomasse PL73 (LM), men biomasse PL73 *E. coli* (LYS) kan benyttes som støtte i vurderingen av slike komponenter. Faggruppene mener at en full analyse av ernæringsrelaterte komponenter, kritiske toksiner, toksiske metaller og kjemiske kontaminanter i biomassen må utføres.

Faggruppe 3 og Faggruppe 6 konkluderer også med at det er mulig å foreta en komparativ risikovurdering med et konvensjonelt motstykke.

4. Dokumentasjon av næringsverdi, toksisitet og allergenisitet i dyreforsøk

4.1 Ernæringsmessig vurdering av biomassen for bruk som fôr i dyreforsøk

Det er ikke utført ernæringsstudier på dyr fordi søker mener at undersøkelser av sammensetning av PL73 (LM) biomasse, viser at PL73 (LM) biomasse ikke er vesentlig endret i forhold til PL73 *E. coli* (LYS)-biomasse.

In vitro fordøyelighetstest

Det er ikke utført fordøyelighetsstudier på PL73 (LM) biomasse. Søker henviser til studier utført på PL73 *E. coli* (LYS) biomasse, se VKMs risikovurdering av PL73 *E. coli* (LYS)-biomasse (VKM 2008)..

Faggruppe 3 og Faggruppe 6 er uenig i søkers argumentasjon fordi bakterien som er utgangspunktet for PL73 (LM) biomasse er genotypisk og fenotypisk forskjellig fra bakterien som er utgangspunktet for PL73 *E. coli* (LYS) biomasse, og det er også påvist store forskjeller i innholdet av enkelte analyserte komponenter, se 3.3 Delkonklusjon.

Faggruppe 3 og Faggruppe 6 mener at studiene som er utført på PL73 *E. coli* (LYS)-biomasse kan være nyttige som bakgrunnsmateriale ved vurdering av PL73 (LM) biomasse, men egne studier av PL73 (LM) biomasse skal følge med dokumentasjonen.

4.2 Toksisitet- og ernæringsstudier

Vedrørende dokumentasjon av næringsverdi, toksisitet og allergenisitet i dyreforsøk og valg av komparator og forsøksdesign har Faggruppe 3 og Faggruppe 6 spillt inn kommentarer til EFSA-nett, se kapittel 7:

4. Nutritional assessment of the product including safety for target animals,

4.4 Studies on target animals

og

5. Considerations for human health of the product,

5.1 Toxicology

Søker har utført et 13 ukers fôringsforsøk på rotter med PL73 (LM) biomasse. Det er ikke utført andre toksisitet og ernæringsstudier på PL73 (LM) biomasse. Søker henviser til studier utført på PL73 *E. coli* (LYS) biomasse.

For andre toksisitets- og ernæringsstudier utført på PL73 *E. coli* (LYS) biomasse, se VKMs helse- og risikovurdering av PL73 *E. coli* (LYS) biomasse (VKM 2008).

4.2.1 Rotter

Subkronisk toksisitetsstudie

TNO Nutrition and Animal Research, Zeist, Nederland (Jonker 2008, rapport nr: V7399) har utført for Ajinomoto Eurolysine et 13 ukers fôringsforsøk med hann- og hunnrotter. Tre grupper à 10 rotter/kjønn ble fôret med fôr som inneholder PL73 (LM) og en kontrollgruppe med 10 rotter/kjønn ble fôret med standard rottefôr. Studien er utført i henhold til retningslinjene fra OECD, retningslinje 408, og EU, EC direktiv 2001/59/EC, B.26 (87/302/EEC). Forsøket er utført i henhold til GLP. I fôret var det innblandet henholdsvis 0, 3, 8 og 15 % (vekt/vekt) PL73 (LM)-biomasse Nov-06 (B1-2006). Gjennomsnittlig inntak av biomasse i hver fôrgruppe var for hannedyr 1,4-: 4,0-; 7,8- og for hunndyr 1,5-; 4,2-; 8,1 g/kg kroppsvekt/dag. Kroppsvekt og fôrinntak ble målt på alle dyrene en gang i uken. Det er utført detaljert kliniske undersøkelser, registrering av fôr- og vanninntak, makroskopiske og mikroskopiske undersøkelser av utvalgte organer (blod, nyre, lever, livmor, binyrer) samt klinisk-patologisk undersøkelser av urin og blod fra 10 dyr i hver gruppe. Det er funnet statistiske forskjeller i enkelte parametere, bl.a. for midt- og høyinntaksgruppen. Forskjellene relaterer seg til fôrinntak, vekt, vanninntak, trombocytall, alkalisk fosfatase, relative organvekter til nyre, lever, livmor, binyrer, nedsatt plasma kolesterol- og fosfolipidnivå. Disse forskjellene forklares med at standardfôret har større mengde kasein, soyaolje og stivelse, og at slike endringer er funnet i fôr som er basert lavt nivå av cerealier. Den økende mengde av biomasse i fôret forklarer også noe av forskjellene. Søker konkluderte med at det ikke er påvist vesentlige endringer i de andre undersøkte parametrene og at inntak av det fôret som har størst mengden PL73 (LM) biomasse ikke fører til toksisk påvirkning.

Kommentarer fra faggruppene:

Fôringsstudien viser forskjellige testrelaterte effekter på hematologi, klinisk kjemi og organvekter. Økt eller minsket organvekter kan tyde på skadelige effekter, og antall signifikant påviste variable - og mulige helserelaterte effekter var generelt doserelatert. Statistiske effekter på blodverdier og klinisk kjemi ble påvist ved den laveste fôrdosen (3 %) som ble testet. Undersøkelser av lymfatisk vev, særlig vev i tarm, og immunrespons var ikke inkludert i studien, men skulle ha vært med. Faggruppene finner at en del effekter på rottene ikke er skikkelig vurdert. Faggruppene mener at søker må undersøke nøyere om de påviste effektene på rottene skyldes ernæringsmessige forskjeller mellom standardfôret og forsøksfôret. Faggruppene mener at søker også bør undersøke lymfatisk vev, tarm, tarmvegg, immunglobuliner og immunrespons.

Faggruppe 3 og Faggruppe 6 påpeker at fôrdesignet er ikke tilstrekkelig, at søker ikke har undersøkt nøye nok påviste effekter på rottene, og at søker må lage fôringsforsøk med et standardfôr som er ekvivalent til forsøksfôret. Fôrdesignet skulle ha vært utført slik at dosegruppene og innholdet av ernæringskomponenter i fôrene er sammenlignbare.

Faggruppe 3 og Faggruppe 6 konkluder med at de mulige effekter på helse som er påvist, ikke er tilstrekkelig utredet.

4.3 Tester for gentoksisitet og mutagenitet

Ames test:

TNO Nutrition and Animal Research, Zeist, Nederland (van den Wijngaard 2007, rapport nr: V7405/02) har utført Ames-tester for Ajinomoto Eurolysine. Ames-testene er utført på *Salmonella typhimurium* stammene TA 98, TA 100, TA 1535, TA 1537 og *Escherichia coli* WP2 uvrA. Testene er utført på PL73 (LM) biomasse fra parti B1-2006, og i henhold til GLP og retningslinjene fra OECD, retningslinje 471. For metabolsk aktivering ble det benyttet Aroclor 1254-induserte rottelever-homogenater blandet med S9-miks. Siden testsubstansen (LM) er relativt uløselig ble den ekstrahert med saltvann i ca. 24 timer, etterfulgt av sentrifugering, sterilfiltrering og fortynning i saltvann. Konsentrasjon i skålene er \pm S9-miks 62 – 5000 μ g (LM) biomasse. For positiv kontroll ble det

benyttet Na-azid (TA 1535 og TA 100), 9-aminakridin (TA 1537), 2-nitrofluoren (TA 98) og N-etyl-N-nitrosourea (WP 2 *uvrA*) uten S9-miks, og 2-aminantracen (TA 1535, TA 98, TA 100 og WP 2 *uvrA*) og benzo(a)pyren (TA 1537) med S9-miks.

Det ble ikke påvist cytotoxisitet (\pm S9-miks) ved mengder opptil 5000 μg (LM) biomasse/ml. Det ble heller ikke påvist frame shift mutasjon eller baseparsubstitusjon. Søker konkluderte med at PL73 (LM) biomasse ikke er mutagent i Amestest.

Søker har lagt ved Amestest på saltvannsekstrakter fra PL73 *E. coli* (LYS)-biomasse. Resultatene fra denne testen er som for (LM) biomasse.

Test for kromosomale abberasjoner (avvik) i mammalske celler:

TNO Nutrition and Animal Research, Zeist, Nederland (Usta & Vogel 2007, rapport nr: V7402/03) har utført for Ajinomoto Eurolysine test på kromosomabberasjon på cellelinje CHO K-1 (Chinese hamster ovary cells). Testen er utført på PL73 (LM) biomasse fra parti B1-2006, og i henhold til retningslinjene fra OECD, retningslinje 473, og EU, EC direktiv 67/548/EC, B.10. For metabolsk aktivering ble det benyttet Aroclor 1254-induserte rotteleverhomogenat blandet med S9-miks. Siden testsubstansen er relativt uløselig ble den ekstrahert med saltvann i ca. 24 timer, etterfulgt av sentrifugering, sterilfiltrering og fortynning i saltvann. Konsentrasjon i skålene er (\pm S9-miks) 10 – 5000 μg (LM) biomasse/ml i første forsøk, og 500 – 5000 μg (LM) biomasse/ml i andre forsøk. For positiv kontroll ble det benyttet mitomycin C uten S9-miks, og cyklofosfamid med S9-miks. Det ble ikke påvist induksjon av kromosomal abberasjon.

Søker har lagt ved test for kromosomal abberasjon på saltvannsekstrakter fra PL73 *E. coli* (LYS)-biomasse. Resultatene fra denne testen er som for (LM).

Test for genmutasjon i mammalske celler:

TNO Nutrition and Animal Research, Zeist, Nederland (Van Meeuwen & Steenwinkel 2007, rapport nr: V7403/02) har utført for Ajinomoto Eurolysine test for mutasjoner i cellelinjen muslymfom L5178Y tk+/-3.7.2C. Testen er utført på PL73 (LM) biomasse fra parti B1-2006, og i henhold til retningslinjene fra OECD, retningslinje 476. For metabolsk aktivering ble det benyttet Aroclor 1254-induserte rotteleverhomogenat blandet med S9-miks. Siden testsubstansen er relativt uløselig ble den ekstrahert med saltvann i ca. 24 timer, etterfulgt av sentrifugering, sterilfiltrering og fortynning i saltvann. Konsentrasjon i skålene er \pm S9-miks 312 – 5000 μg (LM) biomasse/ml. For positiv kontroll ble det benyttet metylmetansulfonat uten S9-miks, og 3-metylcholantren med S9-miks. Det ble ikke påvist testrelaterte mutasjoner i cellelinjen muslymfom L5178Y.

Søker har lagt ved test for genmutasjon i mammalske celler på saltvannsekstrakter fra PL73 *E. coli* (LYS)-biomasse. Resultatene fra denne testen er som for (LM).

Kommentarer fra faggruppene:

Til testene er det benyttet saltvann eller kulturmedium uten serum. Faggruppene mener at dette uttrekksmediet trekker hovedsakelig ut polare komponenter. Tester med S9-miks aktiviserer også upolare komponenter, og gjør de bl.a. mer polar. Faggruppene mener at det bør utføres tester på uttrekk fra testsubstanser der det er benyttet upolart uttrekksmedium. Faggruppene finner at fordi det kun er benyttet polart uttrekksmedium, er det begrensninger i metodeoppsettet. Det er ikke noe som tilsier at testsubstansen skal bli mutagent pga opprensingsmetodene som er benyttet i mutasjonstestene. Det råder imidlertid usikkerhet om det ved overproduksjon av L-lysin kan dannes komponenter som kan være upolare mutagener. Behandling av *E. coli* K12 N^o19E bakterier med svovelsyre (pH < 4,5) kan gi nedbrytningsprodukter som er vanskelig å karakterisere.

4.4 Generelle kommentarer til undersøkelser av toksisitets- og ernæringsstudie

Faggruppe 3 og Faggruppe 6 mener at PL73 *E. coli* (LYS) studiene kan være nyttige som bakgrunnsmateriale ved vurdering av PL73 (LM)-biomasse, men at egne toksisitets- og ernæringsstudier utført på PL73 (LM) skal følge med dokumentasjonen.

Faggruppe 3 og Faggruppe 6 påpeker at fôrdesignet er ikke tilstrekkelig, at søker ikke har undersøkt nøye nok påviste effekter på rottene, og at søker må lage fôringsforsøk med et standardfôr som er ekvivalent til forsøksfôret. Fôrdesignet skulle ha vært utført slik at dosegruppene og innholdet av ernæringskomponenter i fôrene er sammenlignbare.

4.5 Allergenitet

I henhold til EFSAAs retningslinjer kapittel C.6.8 er vurdering av allergenitet mht dyrehelse, et tema som det ikke er behov for å rette spesiell oppmerksomhet til.

Søker har imidlertid foretatt en vurdering av allergenitet/risiko for sensibilisering av arbeidere ved arbeid med PL73 (LM). Mat og fôr, inkludert PL73 (LM), som inneholder proteiner kan medføre risiko for hud og/eller respiratorisk sensibilisering for arbeidere. PL73 (LM) ansees derfor å være en potensiell kilde til sensibilisering av hud og ved inhalering av biomassepartikler.

4.6 Delkonklusjon

Faggruppe 3 og Faggruppe 6 mener at når det testes for gentoksisitet og mutagenitet bør det utføres tester på uttrekk fra testsubstanser der det er benyttet upolart uttrekksmedium. Faggruppe 3 og Faggruppe 6 finner derfor at det er begrensninger i metodeoppsettet. Det er ikke noe som tilsier at testsubstansen skal bli mutagent pga opprensningsmetodene som er benyttet i mutasjonstestene. Det råder imidlertid usikkerhet om det ved overproduksjon av L-lysin kan dannes komponenter som kan være upolare mutagener.

Faggruppe 3 og Faggruppe 6 mener at fordi søker ikke har forsøkt å balansere forsøksfôrene ernæringsmessig, dvs. forsøksfôret har en annen protein, lipid og mikronæringsstoffsammensetning enn standardfôret, kan det ikke konkluderes på om de endringer som er funnet i forsøk med rotter skyldes biomassen eller ubalanse i den ernæringsmessige sammensetningen.

Faggruppe 3 og Faggruppe 6 er uenig med søker om at det ikke er nødvendig å foreta fôringsstudier på dyr, ernæringsstudier og allergenitetsstudier, fordi disse studiene er utført på PL73 *E. coli* (LYS) biomasse. Faggruppene presiserer at studiene som er utført på PL73 *E. coli* (LYS) biomasse kan eventuelt brukes som referanser for tilsvarende publiserte data i en risikovurdering, og er av denne grunn verdifulle, dog utilstrekkelige, ved helserisikovurdering av PL73 (LM)-bakteriebiomasse.

Faggruppe 3 og Faggruppe 6 konkluder med at de mulige effekter på helse som er påvist, ikke er tilstrekkelig utredet, og at det er begrensninger i metodeoppsettet for påvisninger av mutagener.

5. Miljørisikovurdering, nivå 1

Søker har ikke utført miljørisikovurdering da det ikke er levende mikroorganismer tilstede i biomassen.

5.1 Spredning av genmodifisert mikroorganisme fra biomassen til miljø

Ikke aktuelt for vurdering da biomassen ikke består av levende mikroorganismer.

5.2 Mulighet for den genmodifiserte mikroorganismen til å overleve og etablere seg i miljøet

Ikke aktuelt for vurdering da biomassen ikke består av levende mikroorganismer.

5.3 Overføring av rekombinant DNA

Søker har foretatt vurdering av potensiale for overføring av antibiotikaresistensgen til mikroorganismer i miljøet, se kapittel 2.5.

6. Vurdering av søkers dokumentasjon/kunnskapshull

Faggruppe 3 og Faggruppe 6 mener at det foreligger utilstrekkelig dokumentasjon, både kjemisk og biologisk (med manglende fôringsstudier), til å kunne konkludere om PL73 (LM) biomasse er trygt å tilsette som fôringrediens. Med bakgrunn i at noen av de analyser som er foretatt, kjemisk og biologiske, ikke er utført i henhold til GLP råder det også usikkerhet i om laboratoriene som har utført de forskjellige analysene er sertifiserte laboratorier. Fordi det ikke er foretatt fôringsstudier på dyr anses denne delen å være mangelfull.

Faggruppene mener at søker ikke har lagt ved tilstrekkelig dokumentasjon, både kjemisk og biologisk (med manglende fôringsstudier), til å kunne konkludere om LM-biomasse er trygt å tilsette som fôringrediens.

7. Innspill til EFSA-net

1. General comments:

2. Characterisation of the genetically modified microorganism(GMM)

The Norwegian experts disagree with Ajinomoto Eurolysine concerning comparison of the GM product with its conventional counterpart. The host strain *E. coli* K12 K-12S B-7 could be used as a counterpart.

3. Characterisation of the product

3.1. *Information relating to the production process.*

As submitted earlier by other countries for the *E. coli* LYS application of the same applicant, the analysis of 2 g of biomass may be insufficient to establish lack of viability. As outlined in the prior submission, the starting material may be 25 g, with no initial selection to allow stressed cells to recover, and then applying selective antibiotics as necessary.

3.2. *Description of the product.*

The experts do not agree that PL 73 (LYS) can substitute LM in analysing key components. The modification process of LM is not the same as for PL 73 (LYS). The strain used for modification are not comparable with PL 73 (LYS), e.g. different composition of several amino acids, content of ash, crude protein, crude fat and sulphate.. There is a consistent lack of measures of data variability and sample numbers analysed for almost all reported numeric values. This is an unacceptable practice. Statistical analyses and sample size must be provided in all sections where numeric data are described. An accurate understanding of the natural variation in measured parameters (and sample numbers taken/measured) are also necessary as a part of the summarized presentation of the data as it is otherwise impossible to effectively assess the likelihood of detecting significant differences (power analysis).

3.3. *Assessment of the presence of recombinant DNA and of potential risk of gene transfer*

The documentation of DNA degradation and transforming capability of the recombinant DNA are of limited value, and insufficient. DNA is reported to be present at 0.5 g/kg biomass. The experimental data providing the evidence for the reduced size of remaining DNA in the biomass needs to be more clearly communicated with high resolution photographs of agarose gel electrophoresis of separated DNA, and suitable PCR based agarose gels. In cases, relevant controls and sensitivity measures needs to be clearly shown and described. These additional data clarifications are essential as the lack of functional DNA and below unit size DNA defines the risk assessment category adopted for the biomass product.

Thus, the DNA inactivating effect of the different steps of the biomass treatment should be shown/proven by actual publication-quality data, not by claims.

4. Nutritional assessment of the product including safety for target animals.

As phospholipids and lipopolysaccharides are expected to constitute important ingredients in such biomass their concentrations should have been determined. Elevated intake of bacterial phospholipids, may be of clinical importance via biotransformation to homocysteine which might be involved in mechanisms leading to vascular diseases. Lipopolysaccharides in gram-negative bacteria have been linked to an adversely strong stimulation of the immune system of the gastrointestinal tract.

4.4. *Studies in target animals*

An important general comment is that studies on target animals have to be conducted. Such studies must be toxicologically comprehensive, including examination of histopathology, immunopathology as well as reproductional effects. In particular, examinations of lymphoid tissues with focus those related to the intestine, and immune responses should be included. For other single cell products used as feed, increased size or histopathological effects of mesenteric lymph nodes as well as other immune responses have been regarded as critical effects.

The experts do not agree that PL 73 (LYS) can substitute PL 73 (LM) in toxicity studies and nutritional assessment on target animals. The experts found when evaluating toxicity studies using PL73 *E. coli* (LYS) numbers of test feed related effects, e.g. in the performance studies on pigs it was found low faecal consistency at all dosage levels from 5-20 %, increased liver weight at 20% biomass, and at 15 and 20 % dosages reduced body weight gain, increased serum bilirubin and so on. The performance study on rainbow trout revealed delayed rigor mortis at three dosage levels. Fish fed the two highest levels showed, however, reduced growth, and at highest level were also found fluid in the peritoneal cavity. Fish fed 11.7 % and above showed reduced protein and energy retention, and so on. Examinations of lymphoid tissues and immune responses were neither included in these studies on PL73 (LYS). The applicant often considered the effects shown in those studies due to differences in the dietary composition. If that is correct it should to be proven. The design should have made the dose groups and the feed receipts comparable.

5. Considerations for human health of the product

5.1 *Toxicology*

The rat feeding toxicity study using PL73 (LM) revealed various test feed related effects, on haematology, clinical chemistry and organ weights. The number of variables significantly affected and the severities were in general dose related. Statistically significant effects on haematology and clinical chemistry were found even at the lowest dosage level tested (3%). Examinations of lymphoid tissues, particularly those related to the intestine, and immune response were not included but should have been so. The applicant considers the effects shown in the presented study due to differences in the dietary composition. If that is correct it has to be proven. The design should have made the dose groups and the feed receipts comparable.

KONKLUSJON

Faggruppe 3 og Faggruppe 6 påpeker at dataene mht. størrelse på degradert DNA og transformeringsevnen til degraderte rekombinante DNA er begrenset og til dels mangelfulle, både med hensyn til innhold og størrelsesfordeling av DNA. Ut fra analysedataene stiller Faggruppe 3 og Faggruppe 6 også spørsmål ved påstanden om at de to bakteriestammene er like, fordi bredden av studiene for PL73 (LM) er smalere enn for PL73 *E. coli* (LYS). Faggruppe 3 og Faggruppe 6 er uenige med søker at sammenligning med konvensjonelt motstykke ikke er aktuelt for PL73 (LM) bakteriebiomasse, samt at fullstendig risikovurdering og fullstendig analyse av næringskomponenter ikke er nødvendig fordi dette ble utført på PL73 *E. coli* (LYS).

Faggruppene mener det er for mange indikasjoner på helseeffekter ved bruk av PL73 *E. coli* (LYS) og PT73 *E. coli* (THR), og det er stilt mange spørsmål til de enkelte dyreforsøkene. Faggruppene mener at PL73 (LM) prinsipielt ikke er lik PL73 *E. coli* (LYS), og det knyttes derfor usikkerhet til om biomasse fra PL73 *E. coli* (LYS) og PL73 (LM) er like pga forskjeller i genmodifisering. Faggruppene påpeker også at dataene som er presentert i dokumentasjonen fra søker viser forskjeller ved sammenligning mellom stammene.

Faggruppe 3 og Faggruppe 6 konkluderer med at PL73 (LM) bakteriebiomasse prinsipielt ikke er lik PL73 *E. coli* (LYS) fordi det er ulike *E. coli*-bakteriestammer og ulike genmodifiseringsmetoder.

Faggruppe 3 og Faggruppe 6 kan ikke konkludere på om biomasse PL73 (LM) er egnet for tilsetning til fôr fordi søker ikke har utført egne fôringsstudier på dyr med biomasse PL73 (LM).

Samlet vurdering

Faggruppe 3 og Faggruppe 6 konkluderer med det er påvist endringer i innhold av analyserte komponenter sammenlignet med biomasse PL73 *E. coli* (LYS). Faggruppene mener derfor det er uakseptabelt at søker henviser til PL73 *E. coli* (LYS)-dokumentasjonen mht de komponentene som ikke er målt for i biomasse PL73 (LM).

Faggruppe 3 og Faggruppe 6 finner på grunn av at det foreligger utilstrekkelig dokumentasjon, både kjemisk og biologisk (med manglende fôringsstudier), det er påviste endringer hos forsøksdyrene ved bruk av PL73 *E. coli* (LYS) og PT73 *E. coli* (THR) biomasse i forsøksfôr, kan faggruppene ikke konkludere på om PL73 (LM) biomassen er egnet for tilsetning til fôr.

REFERANSER

- Bailly, R-A & Labat N (2007) G.M.O Evaluation on the Bacterial Biomass PT73 (TM) by-product of L-Threonine Production by Fermentation using a GM Strain of *E. coli* K-12 (Strain AG3139). Ajinomoto analysis. Confidential information.
- Bailly, R-A & Labat N (2008) G.M.O Evaluation on the Bacterial Biomass PL73 (LM) by-product of L-Lysine Production by Fermentation using a GM Strain of *E. coli* K-12 (Strain N°19E). Ajinomoto analysis. Confidential information.
- EFSA (2006) Guidance document of the scientific panel on genetically modified organisms for the risk assessment of genetically modified microorganisms and their derived products intended for food and feed use. EFSA 374, 1-115. ISBN 92-9199-029-9.
http://www.efsa.europa.eu/EFSA/Scientific_Document/comm_Guidance%20doc_GMM_en_0.pdf
- Forskrift om fôrvarer (2002) FOR 2002-11-07 nr 1290: Forskrift om fôrvarer.
<http://www.lovdata.no/cgi-wift/lcles?doc=/sf/sf/sf-20021107-1290.html>
- Raetz, C. R. H. & Whitefield, C. (2002) Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu. Rev. Biochem.* **71**; 635-700.
- TemaNord (1998). Safety Assessment of Novel Food Plants: Chemical Analytical Approaches to the Determination of Substantial Equivalence. *TemaNord* 1998:**591**. ISBN 92-893-0263-1.
- VKM (2006) Opinion on the safety of BioProtein® by the Scientific Panel on Animal Feed of the Norwegian Scientific Committee for Food Safety. Revised version. Adopted on the 5th of October 2006
- VKM (2008) Helserisikovurdering av PL73 *E. coli* (LYS) bakteriebiomasse (EFSA/GMO/FR/2007/40) fra Ajinomoto Eurolysine. Uttalelse fra Faggruppe for genmodifiserte organismer og Faggruppe for fôr til terrestriske og akvatiske dyr. 16.04.08. 08/309-endelig. Vitenskapskomiteen for mattrygghet, Oslo, Norge, ISBN: 978-82-8082-430-1.