



**Helserisikovurdering**  
**av**  
**PT73 (TM) bakteriebiomasse**  
**(EFSA/GMO/FR/2008/59)**  
**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:978-82-8082-433-2**

**VKM Report 2010: 32**

## **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 (Faggruppe 3), 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:

Knut G. 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

### Faggruppe for fôr til terrestriske og akvatiske dyr:

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

### Koordinatorer fra sekretariatet:

Tron Gifstad og Arne Mikalsen

## SAMMENDRAG

Helserisikovurderingen av bakteriebiomasse PT73 (TM) (EFSA/GMO/FR/2008/59) 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 PT73 (TM) (EFSA/GMO/FR/2008/59) til bruk i fôrvarer.

Bakteriebiomasse PT73 (TM) fra Ajinomoto Eurolysine er produsert fra den genmodifiserte bakterien *Escherichia coli* (*E. coli*) K-12 stamme AG3139, som er modifisert for økt produksjon av L-treonin. Faggruppe 3 og Faggruppe 6 har tidligere vurdert Ajinomoto Eurolysine sin søknad til EUs mattrygghetsorgan EFSA om godkjenning og markedsføring av bakteriebiomasse PT73 *E. coli* (THR) (EFSA/GMO/FR/2007/44) fra den genmodifiserte bakteriestammen *E. coli* K-12 stamme TK7, som også produserer L-treonin. Ajinomoto Eurolysine sin søknad til EFSA om godkjenning og markedsføring av biomasse fra PT73 *E. coli* (THR) 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* AG3139. Tørket og granulert biomasse fra AG3139 vil bli markedsført som PT73 (TM) under handelsnavnet PROT-AEL-T, og vil kun bli brukt som tilsetning til fôrvarer.

Vurderingen av den PT73 (TM) bakteriebiomassen er basert på dokumentasjon som er gjort tilgjengelig på EFSAAs nettside GMO EFSAAnet. I tillegg er det benyttet informasjon fra uavhengige vitenskapelige publikasjoner i vurderingen. PT73 (TM) 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, toksiske metaller, kritiske toksiner, pesticider, 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 AG3139 er fremkommet ved genmodifisering av *E. coli* K-12 stamme MG1655. Stamme MG1655 har følgende genotyper: F-, P1-,  $\lambda$ -. Denne stammen har ikke overførbare vektorer. AG3139 er blitt genmodifisert ved hjelp av både konvensjonelle og rekombinante DNA teknikker. All genmodifisering er utført på genomisk *E. coli* MG1655 DNA. Det opplyses også om at det er benyttet forskjellige vektorer i den initiale fasen av modifisering. Det opplyses at disse vektorene er ikke tilstede i *E. coli* AG3139. *E. coli* AG3139 inneholder ikke antibiotikaresistensmarkørgener (ARMG). Hensikten med genmodifiseringen er å øke enzymaktiviteten til L-treonin biosynteseveien, for kommersiell produksjon av L-treonin. Bakteriebiomassen som blir igjen etter produksjon av L-treonin blir videre prosessert til bakteriebiomasse PT73 (TM), se figur 1.

Faggruppe 3 og Faggruppe 6 finner informasjonen vedrørende molekylær karakterisering tilstrekkelig for vurdering av AG3139. 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 PT73 *E. coli* (THR), samt at den mengde DNA som er benyttet ved analyse av størrelsesfordeling av degradert DNA er forskjellig fra søknaden PT73 *E. coli* (THR), 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 PT73 (TM) bakteriebiomasse, fordi biomassen fra L-treoninproduserende *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 MG1655 kan benyttes som konvensjonelt motstykke.

Ajinomoto Eurolysine har fremstilt tre partier av biomasse PT73 (TM), parti B1-2006, B2-2006 og B3-2006. Partiene er fra storskalaproduksjon som omfatter flere industrielle fermentorer. Partiene er benyttet til analyser av hovedkomponenter. For sammenligning av hovedkomponenter i biomasse PT73 (TM) har søker brukt parti S1 fra biomasse PT73 *E. coli* (THR) (EFSA/GMO/FR/2007/44).

### *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 analysene av komponenter av ernæringsmessig betydning for å være utilstrekkelige fordi det mangler analyser av flere ernæringskomponenter. Faggruppe 3 og Faggruppe 6 har også bemerkninger til analyser av partiene B1-2006, B2-2006 og B3-2006 fordi det mellom de forskjellige partiene er funnet relativt store forskjeller i flere parametre, f.eks. tørrstoff, vann, uorganiske salter, enkelte aminosyrer, enkelte mineraler, spermidin og kadaverin. Når det gjelder analyser av komponenter av ernæringsmessig betydning og andre kjemiske komponenter mener faggruppene at det mangler analyser av vitaminer, fosfolipider, liposakkarider og lipidløslige pigmenter. Faggruppene mener at PT73 *E. coli* (THR) biomasse i prinsippet ikke er lik PT73 (TM) biomasse fordi ved sammenligning av dataene for de to stammene er det påvist betydelige forskjeller mellom stammene mht til forskjellige komponenter.

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 PT73 (TM)-biomasse. Søker konkluderer med at det ikke er 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, immunoglobuliner 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 PT73 *E. coli* (THR) (EFSA/GMO/FR/2007/44).

Faggruppe 3 og Faggruppe 6 mener at toksisitets- og ernæringsstudiene utført med PT73 *E. coli* (THR) biomasse kan være nyttige som bakgrunnsmateriale ved vurdering av PT73 (TM) biomasse, men at egne toksisitets- og ernæringsstudier utført på PT73 (TM) biomasse skal følge med dokumentasjonen.

### **Miljørisiko**

Søknaden gjelder godkjenning av varmeinaktivert PT73 (TM) bakteriebiomasse til bruk i fôrvarer under forordning (EF) 1829/2003. Faggruppen har derfor ikke vurdert mulige miljørisiko knyttet til levende *E. coli* K-12 stamme AG3139 bakterier.

### **SAMLET VURDERING**

*Fôringforsøket 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 5 % 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 PT73 (TM) bakteriebiomasse vil medføre endret risiko for dyrs helse i forhold til annet fôr.*

*Faggruppe 3 og Faggruppe 6 mener at fôrvarer fra PT73 (TM) bakteriebiomasse ikke kan vurderes som fôr fordi det er mangler ved analysene av biomassen, og med unntak for toksisitetssstudier på rotte er det ikke foretatt toksisitets- og ernæringsmessige studier på dyr.*

*Faggruppe 3 og Faggruppe 6 konkluderer derfor med at fôrvarer som inneholder PT73 (TM) bakteriebiomasse ikke kan vurderes helsemessig fordi det mangler viktige fôringforsøk på pattedyr og fisk.*

### **NØKKELORD**

PT73 (TM) bakteriebiomasse, genmodifisert, fôr, helse, proteinkilde, EFSA/GMO/FR/2008/59

## FORKORTELSER OG ORDFORKLARINGER

|                   |   |
|-------------------|---|
| <i>Ad hoc</i>     | betyl: til dette formålet. Med <i>ad hoc</i> -gruppe menes en gruppe som er nedsatt for å arbeide med en spesiell sak. Etter saken er ferdig utredet blir <i>ad hoc</i> -gruppen oppløst.   |
| ARMG              | Antibiotikaresistensmarkørgen   |
| Auxotrof mutasjon | en eller flere mutasjoner som medfører at en organisme ikke har evne til å syntetisere et spesielt molekyl og må derfor få tilført dette stoffet for å opprettholde normal vekst.   |
| bp                | Basepar   |
| DNA               | Deoxyribonukleinsyre (DNA)  |
| EFSA              | European Food Safety Authority  |
| GLP               | Good Laboratory Practices, retningslinjer for godt laboratoriearbeid.   |
| GMO               | Genmodifisert organisme   |
| GMM               | Genmodifisert mikroorganisme  |
| Konjugasjon       | se Plasmid  |
| L-treonin         | 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 celler via horisontal nedarving, en prosess kalt konjugasjon  |
| PCR               | Polymerase chain reaction. Polymerase kjedereaksjon. 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, 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.....  | 11 |
| 2.2 Karakterisering av geninnsettingen og genkonstruksjonen .....                                       | 11 |
| 2.3 Informasjon vedrørende uttrykk av innsatte gener og åpne leserammer (ORF).....                      | 12 |
| 2.4 Nedarving og stabilitet av innsatt DNA .....  | 12 |
| 2.5 Potensial for genoverføring.....  | 12 |
| 2.6 Identifisering av en <i>E. coli</i> stamme som er konvensjonelt motstykke.....                      | 13 |
| 2.7 Informasjon om den genmodifiserte mikroorganismen og sammenligning med konvensjonelt motstykke..... | 13 |
| 2.8 Delkonklusjon .....   | 14 |
| 3. Komparative analyser .....   | 14 |
| 3.1 Valg av komparator og forsøksdesign.....  | 14 |
| 3.2 Analyser av ernæringsmessige - og andre kjemiske komponenter.....                                   | 15 |
| 3.3 Delkonklusjon .....   | 19 |
| 4. Dokumentasjon av næringsverdi, toksisitet og allergenisitet .....                                    | 20 |
| 4.1 Ernæringsmessig vurdering av biomassen for bruk som fôr i dyreforsøk.....                           | 20 |
| 4.2 Toksisitet og ernæringsstudier.....   | 21 |
| 4.2.1 Rotter.....   | 21 |
| 4.3 Tester for gentoksisitet og mutagenitet .....   | 22 |
| 4.4 Generelle kommentarer til undersøkelser av toksisitets- og ernæringsstudie.....                     | 23 |
| 4.5 Allergenisitet .....  | 23 |
| 4.6 Delkonklusjon .....   | 23 |
| 5. Miljørisikovurdering, nivå 1 .....   | 24 |
| 6. Vurdering av søkers dokumentasjon/kunnskapshull .....  | 24 |
| 7. Innspill til EFSA-nett .....   | 25 |
| KONKLUSJON.....   | 27 |
| REFERANSER.....   | 28 |

## BAKGRUNN

Vitenskapskomiteen for mattrygghet er bedt av Mattilsynet om å foreta en vitenskapelig vurdering av helseisiko for dyr ved en eventuell godkjenning og bruk av fôrvarer som inneholder PT73 (TM) bakteriebiomasse (EFSA/GMO/FR/2008/59) fra Ajinomoto Eurolysine. PT73 (TM) 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/2008/59 omfatter bruksområdene fôrvarer, og ble fremmet og anbefalt av franske myndigheter i mai 2008. Dokumentasjonen knyttet til søknaden ble lagt ut på EFSAnet 24. juli 2008, med frist på 90 dager for innspill fra EU- og EØS/EFTA-landene. Norge har ikke tidligere uttalt seg om PT73 (TM) bakteriebiomasse.

## OPPDRA 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 helseaspekter ved slike produkter, og på bakgrunn av vurderingene gi innspill til EFSAnet.

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 PT73 (TM) (EFSA/GMO/FR/2008/59) som proteintilskudd til fôr. Vurderingen av PT73 (TM) bakteriebiomasse skal utføres i henhold til tiltenkt bruk og i overensstemmelse Forskrift om fôrvarer (2002), og med prinsippene som er nedfelt i EFSAs 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, PT73 (TM) (EFSA/GMO/FR/2008/59) produsert fra den genmodifiserte bakterien *E. coli* K-12 stamme AG3139.

Unik kode: Ingen unik kode.

Status i EU: Søknad under forordning (EF) Nr. 1829/2003. EFSAs frist for innspill er 10. november 2008.

Ønsket svarfrist til Mattilsynet: 10. november 2008.



## RISIKOVURDERING

### 1. Innledning

Helserisikovurderingen av PT73 (TM) 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 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 AG3139 produserer økt mengde L-treonin. *E. coli* K-12 stamme AG3139 er fremkommet ved transformering av *E. coli* K-12 stamme MG1655, ved direkte kloning med rekombinant DNA i bakteriens genom. *E. coli* K-12 stamme MG1655 har følgende genotyper: F<sup>-</sup>, P1<sup>-</sup>, λ. MG1655 inneholder ikke overførbare vektorer. Det materialet som er benyttet for konstruksjon av bakteriestammen AG3139, kommer fra forskjellige *E. coli* K-12 stammer, med ett unntak der noen gener kommer fra *E. coli* H155. Bakterien AG3139 inneholder ikke antibiotikaresistensgener.

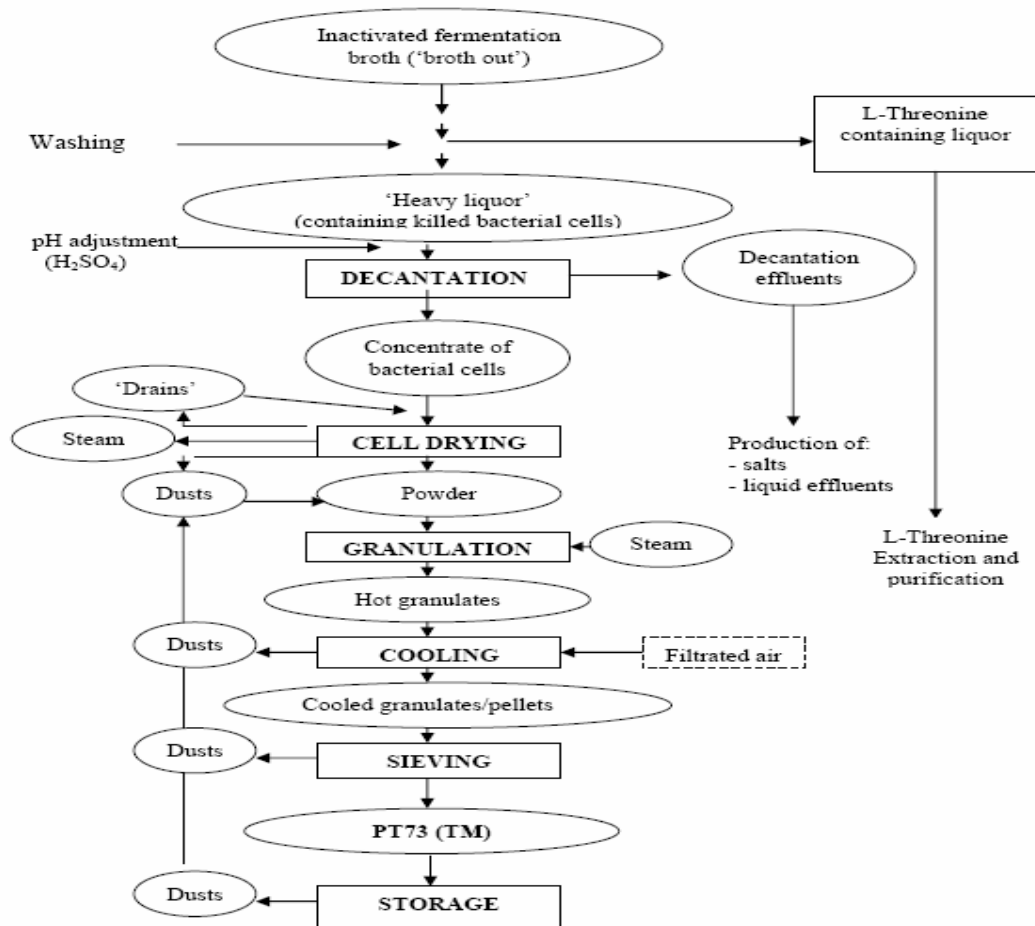
Den genmodifiserte *E. coli* K-12 stamme TK7 som er utgangspunktet til biomasse PT73 *E. coli* (THR), produserer også L-treonin. Stamme TK7 inneholder tilsvarende gener for L-treoninsyntese som AG3139, men hos TK7 er disse innført ved at et rekombinant plasmid er transformert inn i *E. coli*-stammen TKIIHΔPPC. Hensikten med rekombinant DNA er å øke enzymaktiviteten til L-treonin biosyntestveien, for kommersiell produksjon av L-treonin. Biomasse fra *E. coli* K-12 stamme TK7 blir brukt som komparator for biomasse PT73 (TM).

Genmodifiseringsprosessen frem til *E. coli* K-12 stamme AG3139 og det DNA-materialet som er benyttet for konstruksjon av AG3139 er konfidensiell informasjon. Faggruppene har vurdert denne konfidensielle informasjonen, men informasjonen kan ikke gjengis her.

Når produksjonen av L-treonin er ferdig blir bakteriekulturen varmeinaktivert ved 121 °C. Etter varmeinaktivering blir L-treonin separert fra bakteriemediet. Det gjenværende varmeinaktiverede bakteriemediet er undersøkt for levende og levedyktige *E. coli* bakterier. Metodene som ble benyttet for påvisning av levende og levedyktige celler, var undersøkelse 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 AG3139 bakterier er påvist.

Det varmeinaktiverede bakteriemediet er behandlet som vist i figur 1. Bakteriene ble skilt fra mediet, og 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 PT73 (TM) med handelsnavn PROT-AEL-T, og vil kun bli benyttet som tilsetning til fôrvarer.

Figure 1.2 Manufacturing process of PT73 (TM)



*Decantation effluents (liquid):* Supernatant coming from the decantation of bacterial creams.  
*'Drains' ('Egouttures' in technical French):* 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 PT73 (TM) biomasse

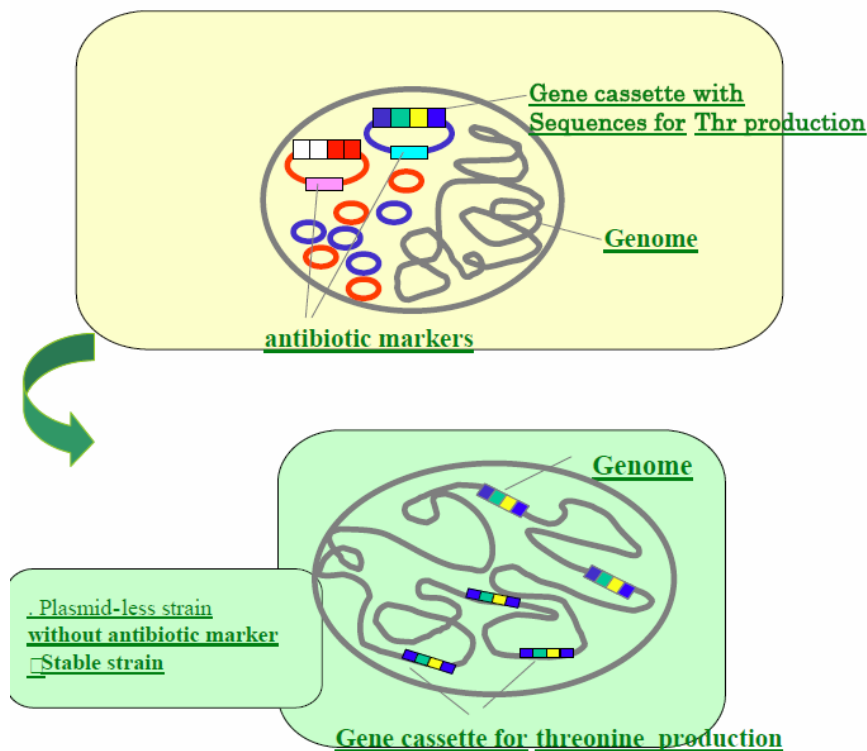
## 2. Molekylær karakterisering

Molekylærbiologiske analyser som er utført på den genmodifiserte bakterien *E. coli* K-12 stamme AG3139, 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

Den genmodifiserte bakterien AG3139 er fremkommet ved hjelp av konvensjonelle - og rekombinante DNA teknikker. All genmodifisering er utført på genomet til *E. coli* K12 stamme MG1655. Den totale genomsekvensen til stamme MG1655 er publisert (Hayashi *et al*, 2006). Genmodifiseringsprosessen er av søker ansett som 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* AG3139, se figur 2. Det er fortsatt undersøkelser om noen av de antibiotikaresistensgenene som er i vektorene, kan ha blitt overført til AG3139 genomet. Undersøkelsen er utført med Southern blot og prober mot de aktuelle antibiotikaresistensgenene. Det opplyses at AG3139 ikke inneholder disse genene.

Figure 3a: Illustration of the benefits resulting from the approach implemented for the construction of strain AG3139



Figur 2: Illustrasjon av prosessen frem til den genmodifiserte bakterien AG3139.

### 2.2 Karakterisering av geninnsettingen og genkonstruksjonen

Karakteriseringen av nye 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 AG3139. Hele stamtavlen er konfidensiell. Det er også laget en detaljert oversikt av genmodifiseringsprosessen frem til AG3139.

Det er opplyst at ekspresjonskassetten foreligger i flere kopier i AG3139-genomet. Oversikten omfatter også konstruksjon av vektorer og plasmider, genmodifikasjonen som fører til L-treoninproduksjon og strukturene til de integrerte genkassettenes, m.m.

Faggruppene finner informasjonen tilstrekkelig for vurdering av AG3139.

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

Det er påvist 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 AG3139.

### **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 ekspresjonskassettenes er utført med probe mot en bestemt sekvens på kassettenes. Stabil produksjon av L-treonin over flere generasjoner viser også at fenotypen er stabil.

Faggruppene finner informasjonen tilstrekkelig for vurdering av AG3139.

### **2.5 Potensial for genoverføring**

Vedrørende potensiale for genoverføring har Faggruppe 3 og Faggruppe 6 spill 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* AG3139 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 ( $\text{pH} < 4,5$ ) i svovelsyren som benyttes ved behandlingen av de varminaktiverte *E. coli* bakteriene, depurinere DNA. For å undersøke potensialet for overføring av DNA, ble DNA ekstrahert fra PT73 (TM) biomasse. For ekstrahering av DNA er to forskjellige metoder benyttet, henholdsvis kloroform/fenol og alkalisk (NaOH). To milligram biomasse er benyttet til opprensning av DNA. DNA er renset for inhiberende komponenter. Renset DNA ble analysert med gelelektroforese på agarosegel for å undersøke graden av degradering av DNA. Størrelsen på det degraderte DNAet var  $\ll 400$  bp.

Renset DNA er undersøkt med konvensjonell PCR analyse med et primerpar som oppformerer 452 bp av en spesifikk DNA-sekvens til ekspresjonskassetten på det rekombinante DNAet. Det ble påvist svært liten mengde av DNA-sekvensen på 452 bp. Mengden var nær deteksjonsgrensen på 0,001 ppm DNA. Ved bruk av Real Time PCR, et primerpar og en probe til 84 bp av ekspresjonskassetten, ble det påvist ca. 20 ppm av dette rekombinante DNA-fragmentet. To kontroller ble benyttet. En kontroll med AG3139 celler og en annen kontroll med AG3139 DNA som ble tilsatt PT73 (TM) biomasse for opprensning. Analysen viser at det rekombinante DNA-innskuddet er degradert, og at størrelsene på rekombinante DNA-sekvenser i biomassen er mellom 84 bp og 450 bp. Southern blot med probe mot

rekombinante DNA sekvenser for å vise størrelsen på det degraderte rekombinante DNAet, er ikke utført.

Vurdering av transformeringsevnen til degraderte rekombinante DNA-et er undersøkt med en *E. coli* K-12 stamme, som er konstruert fra stamme JC7623 (Central Collection of Strains IBBPAS N°1069). JC7623 inneholder mutasjonene recB21, recC22 og sbcB15. Disse mutasjonene begunstiger integrasjon av lineært DNA i genomet. En auxotrof mutasjon i genet CysG har ført til en delesjon på 332 bp. Det muterte genet benevnes  $\Delta$ cysG.  $\Delta$ cysG-genet fører til at JC7623-transformanter kan vokse på et bakteriemedium som mangler L-cystein. Transformeringsevnen til JC7623 er målt ved tilsetning av økende mengde rensset AG3139 DNA. Transformeringsevnen er målt til  $8 \times 10^4$  transformanter/ $\mu$ g AG3139 DNA. Det ble ikke påvist transformanter ved bruk av DNA som var ekstrahert fra 5 mg PT73 (TM) biomasse. Det er utført 20 transformeringsforsøk å 5 mg PT73 (TM) biomasse. Søker konkluderer med at genoverføring fra PT73 (TM) biomassen er svært lite sannsynlig.

#### **Kommentarer fra faggruppene til potesialet for genoverføring.**

Dataene som er presentert i den konfidensielle analysen utført av Bailly & Labat (2007) har begrenset verdi, og er til dels mangelfull. Innhold og størrelsefordeling av DNA synes å være noe forskjellig fra søknaden PT73 *E. coli* (THR). Faggruppene påpeker at analyse av rensset DNA med agarosegel i søknaden PT73 (TM) er forskjellig med hensyn til tilsvarende analyse i PT73 *E. coli* (THR) søknaden. Mengde DNA som er påsatt gel er forskjellig, noe som har betydning for påvisning av degradert DNA. Faggruppene påpeker at en svakhet ved analysene av degradert DNA, er at det ikke er utført Southern blot med probe mot det rekombinante DNAet.

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

Søker hevder at biomasse PT73 (TM) ikke kan sammenlignes med et konvensjonelt motstykke, fordi konvensjonell *E. coli* K-12 stamme som produserer L-treonin ikke tidligere har blitt markedsført. Faggruppene er uenig med søker. Faggruppene mener at den umodifiserte stammen MG1655 kan benyttes som konvensjonelt motstykke, og anfører at denne *E. coli* stammen uten tilførte gener kan benyttes for å skille effekter som skyldes genmodifiseringen fra generelle effekter som skyldes eksponering til *E. coli* biomasse (justert for L-treonin innhold) i føringforsøk.

### **2.7 Informasjon om den genmodifiserte mikroorganismen og sammenligning med konvensjonelt motstykke**

Stammen AG3139 er blitt deponert i en japansk bakteriekultursamling med benevnelsen FERM BP-10942. 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 AG3139 og MG1655 kommer fra samme *E. coli* K-12 stamme. Videre er det undersøkt for følsomhet overfor 32 antibiotika. AG3139 var følsom for alle 32 antibiotikaene som det ble undersøkt for.

Vedrørende valg av komparator og forsøksdesign har faggruppene spilt inn kommentarer til EFSA-net, 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 AG3139. Faggruppene har ikke identifisert noe risiko knyttet til den molekylærbiologiske karakteriseringen. Faggruppene mener at den umodifiserte *E. coli*-stammen MG1655 kan benyttes som konvensjonelt motstykke. Faggruppene påpeker at dataene mht. størrelse på degradert DNA og transformeringsevnen til degraderte rekombinante DNA er begrenset.

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 tre partier av PT73 (TM) i fullskalaproduksjon, parti 14/10/06 (B1-2006), parti 15/10/06 (B2-2006) og parti 16/10/06 (B3-2006). Disse partiene er benyttet til analyser og tester, samt til sammenligning med PT73 *E. coli* (THR) parti S1 (2001), se helserisikovurdering av PT73 *E. coli* (THR) 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  $\pm 20$  %. 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 PT73 (TM) bakteriebiomasse, fordi biomasse fra L-treoninproduserende *E. coli* ikke tidligere er blitt produsert og markedsført. En komparativ risikovurdering med et 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 at en fullstendig risikovurdering og fullstendig analyse av næringskomponenter ikke er nødvendig fordi dette ble utført på biomasse PT73 *E. coli* (THR). Forskjellene mellom biomasse PT73 *E. coli* (THR) og PT73 (TM) er endret bakteriestamme, fra *E. coli* K-12 stamme TK7 til *E. coli* K12 stamme AG3139, endret genmodifikasjon samt det er benyttet forskjellige vektorer ved genmodifiseringene. Fremstillingsprosessen av L-treonin 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 MG1655 kan benyttes som konvensjonelt motstykke, se kapittel 2.6 for faggruppens begrunnelse.

Faggruppene er også uenige med Ajinomoto Eurolysine i at biomasse fra PT73 *E. coli* (THR) er tilstrekkelig for vurdering av helserisiko for PT73 (TM), fordi PT73 (TM) og PT73 *E. coli* (THR) 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* TK7 sitter på et plasmid, mens i *E. coli* AG3139 sitter rekombinant DNA i genomet. Faggruppene mener at *E. coli* TK7 prinsipielt ikke er lik *E. coli* AG3139, og det knyttes derfor usikkerhet til om biomasse PT73 *E. coli* (THR) og PT73 (TM) 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:

Lipider, fettsyrer, vitaminer, 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 PT73 E. coli (THR) biomasse er dokumentert i Faggruppe 3s og Faggruppe 6s helserisikovurdering av PT73 E. coli (THR) (VKM 2008).*

Da prosesseteknikk og tilsatsstoffer i fremstillingen av biomasse stort sett er den samme for PT73 *E. coli* (THR) og PT73 (TM), og at analysene av miljøgifter viser lave tall for PT73 *E. coli* (THR), kan det aksepteres at det ikke foretas egne analyser av miljøgifter i PT73 (TM) biomasse.

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

For beskrivelse av analysemetoder som er benyttet for å analysere noen av de forskjellige komponentene i biomassen henvises det 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 (2007) utført av Laboratoire Veterinaire, Somme, og analysene med referanse til Mauclair (2006) er Ajinomoto Eurolysine sine 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.

*Analyser av ernæringsmessige komponenter, metaller og kontaminanter i biomassen*

Biomasse PT73 *E. coli* (THR) S1 (2001) (EFSA/GMO/FR/2007/44) er benyttet som komparator for B1-2006, B2-2006 og B3-2006, se tabell 1

Det er foretatt følgende analyser av komponenter i biomasse PT73 (TM) fra de tre partiene:

Nitrogenholdige komponenter (total og frie aminosyrer, ammonium N, amid N, urea N, biogene aminer, nukleinsyrer), karbohydrat, organiske syrer, tørrstoff, vann, aske, organisk stoff, protein, fiber, stivelse, mineraler, spormetaller, toksiske metaller og andre uorganiske komponenter.

Biomassene har høyt innhold av protein, PT73 (TM) inneholder 850 g/kg tørrvekt, mens i PT73 *E. coli* (THR) er innholdet 775 g/kg tørrvekt. Cirka 1 % av nitrogenet er til stede som ammonium-N. Den gjenværende delen av N-fraksjonen er hovedsaklig protein og aminosyrer, se tabell 1.

Tabell 1: Kvantifisering av kjemiske komponenter av ernæringsmessig betydning i PT73 (TM) – og PT73 *E. coli* (THR) biomasse.

| Crude components               | Unit   | Ref | 'As is basis'      |                    |                   |                           | Dry matter basis |         |         |                           |
|--------------------------------|--------|-----|--------------------|--------------------|-------------------|---------------------------|------------------|---------|---------|---------------------------|
|                                |        |     | PT73 (TM)          |                    |                   | PT73 <i>E. coli</i> (THR) | PT73 (TM)        |         |         | PT73 <i>E. coli</i> (THR) |
|                                |        |     | B1-2006            | B2-2006            | B3-2006           | S1 (2001)                 | B1-2006          | B2-2006 | B3-2006 | S1 (2001)                 |
| Dry matter                     | g/100g | (a) | 89.14              | 88.36              | 93.34             | 88.51                     |                  |         |         |                           |
|                                |        | (b) | NM                 |                    |                   |                           | 89.7*            |         |         |                           |
|                                |        | (c) |                    |                    |                   | 88.6                      |                  |         |         |                           |
| Moisture                       | g/100g | (a) | 10.86 <sub>1</sub> | 11.64 <sup>1</sup> | 6.66 <sup>1</sup> | 11.49 <sup>1</sup>        |                  |         |         |                           |
|                                |        | (b) | NM                 |                    |                   |                           | 10.3             |         |         |                           |
|                                |        | (c) |                    |                    |                   | 11.4*                     |                  |         |         |                           |
| Crude protein (N total x 6.25) | g/100g | (a) | 78.13              | 76.06              | 75.88             | 68.56                     | 87.64*           | 86.08*  | 81.29*  | 77.46*                    |
|                                |        | (b) | NM                 |                    |                   |                           | NM               |         |         |                           |
|                                |        | (c) |                    |                    |                   | 68.49*                    |                  |         |         | 77.30                     |
| Crude fat                      | g/100g | (a) | NM                 |                    |                   | 7.01                      |                  |         |         | 7.92*                     |
|                                |        | (b) | 5.60               | 6.00               | 6.70              | 6.80                      |                  |         |         | 7.58*                     |
|                                |        | (c) |                    |                    |                   | 6.29*                     |                  |         |         | 7.10                      |
| Crude fibre                    | g/100g | (c) |                    |                    |                   | 0.62*                     |                  |         | 0.70    |                           |
| Starch                         | g/100g | (c) |                    |                    |                   | 2.48*                     |                  |         | 2.80    |                           |
| Organic matter                 | g/100g | (c) |                    |                    |                   | 83.37*                    |                  |         | 94.10   |                           |
| Crude ash                      | g/100g | (a) | 3.02               | 3.40               | 3.59              | 3.64                      | 3.39*            | 3.85*   | 3.85*   | 4.11*                     |
|                                |        | (b) | 4.50               | 3.80               | 4.30              | NM                        |                  |         |         |                           |
|                                |        | (c) |                    |                    |                   | 5.23*                     |                  |         |         | 5.90                      |
| pH (suspension at 10%)         |        | (b) | 4.94               | 5.24               | 5.22              | 4.00                      |                  |         |         |                           |

N.M: not measured

<sup>1</sup>: By calculation either from Dry matter or from moisture.

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

(a): Mauclair, 2006 for samples B1-, B2- and B3-2006 of PT73 (TM) and Mauclair 2003 for sample S1 of PT73 *E. coli* (THR)

(b): de Haan, 2007 for samples B1-, B2- and B3-2006 of PT73 (TM) and Boerma, 2003 for Sample S1 of PT73 *E. coli* (THR)

(c): (Jansman A.J.M. and van Diepen J.Th.M., 2005) for sample S1 of PT73 *E. coli* (THR)

#### Analyser av fett, fosfolipider, lipidløslige pigmenter og fettsyresammensetning

Totalt fettinnhold i biomassen er målt til mellom 56 til 67 g/kg "as is basis", se tabell 1.

For analyse av fettsyrer henvises det til PT73 *E. coli* (THR), jfr. VKMs helserisikovurdering av PT73 (THR) (VKM 2008).

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

Faggruppe 3 og Faggruppe 6 mener at søker må utføre analyser av fettsyrer, fosfolipider og lipopolysakkarider.

#### Kvantifisering av aminosyrer og nitrogenholdige komponenter

Bakteriekulturen tilsettes ammoniumsulfat, ammoniakk og protein fra soya. Størsteparten av nitrogenet som er påvist i PT73 (TM)-biomasse kommer fra bakterieprotein og frie aminosyrer, mens cirka 7-10 % av nitrogenet er ammonium-N, dvs fritt NH<sub>3</sub> og NH(3)-forbindelser. Det er ikke funnet statistisk signifikante forskjeller mellom de forskjellige partiene.

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, glutaminsyre, glysin, alanin, fenylalanin, valin, metionin, leucin, isoleucin, tyrosin, histidin, lysin



(base) og tyrosin. Metionin, leucin, valin, tyrosin og asparaginsyre ble kun kvantifisert i parti B2-2006, for de to andre partiene var konsentrasjonen for disse aminosyrene lavere enn kvantifiseringsgrensene. Det ble ikke analysert for prolin og tryptofan. Totalmengde frie aminosyrer før syrehydrolyse er henholdsvis 32,2 -, 75,8 - og 33,2 g/kg tørrvekt for B1-2006, B2-2006 og B3-2006. Konsentrasjonen av treonin utgjør henholdsvis 31,3 -, 73,7 – og 32,2 g/kg tørrvekt for B1-2006, B2-2006 og B3-2006.

Aminosyrer som er kvantifiserte etter syrehydrolyse er lysin (base), treonin, metionin, cystin, isoleucin, leucin, valin, arginin, histidin, fenylalanin, tyrosin, serin, alanin, aspergin/aparagin, glutaminsyre/glutamin, glycin, prolin og tryptofan. Totalmengden av aminosyrer er 771 g/kg i parti B1, 775 g/kg i parti B2 og 775 g/kg i parti B3. Aminosyrene glutamin, asparagin/arsperginsyre, leucin, treonin og alanin foreligger i størst mengde i alle tre partiene, fra 97(glutamin) i parti B1 til 57 (alanin) g/kg tørrvekt i parti B2.

Faggruppene mener det bør etterspørres hvorfor biomasse B2-2006 inneholder ca. 2,3 ganger større konsentrasjon av frie aminosyrer før syrehydrolyse, og ca. 50 % større konsentrasjon treonin etter syrehydrolyse enn de to andre partiene.

#### *Kvantifisering av biogene aminer*

Det er analysert for agmatin, fenyletylamin, histamin, kadaverin, putresin, spermidin, spermin, og tyramin. Søker har ikke diskutert hvorfor mengde putrescin og spermidin er ca. 10 ganger større i PT73 (THR) parti S1 enn i partiene B1-2006, B2-2006 og B3-2006. Søker har heller ikke gitt forklaring på hvorfor B2-2006 har ca.3-4 ganger større mengde kadavarin enn de to andre (TM)-biomassene.

#### *Kvantifisering av nukleinsyrer og nukleotider*

Søker har ikke målt mengdene av RNA og DNA i PT73 (TM) biomasse.

Søker har kvantifisert for nukleotidene adenin-, cytidin-, guanosin-, inosin- og uridin-5-monofosfat. Summen av disse nukleotidene er 12 g/kg ”as is” basis. I søknaden EFSA/GMO/FR/2007/44 PT73 *E. coli* (THR) er det ikke dokumentert for disse nukleotidene.

Biomasse/bioprotein fra andre bakterier inneholder generelt relative store mengder nukleinsyrer, dvs. fra 50 til 150 g/kg (VKM 2006). I søknaden PT73 (TM) er mengde RNA og DNA for biomasse PT73 *E. coli* (THR) oppgitt til mindre enn henholdsvis 4 - og 0,4 g/100g ”as is basis”. I søknaden PT73 *E. coli* (THR) (EFSA/GMO/FR/2007/44) er imidlertid mengdene oppgitt til mindre enn 4 – og 0,4 g/kg ”as is basis”.

Faggruppe 3 og Faggruppe 6 mener at søker bør analysere og kvantifisere for totalmengde RNA og DNA i PT73 (TM). Mengde nukleinsyrer i biomassen er svært mye lavere enn det som generelt påvises i biomasse som er fremstilt fra andre bakterier. Faggruppe 3 og Faggruppe 6 mener søker bør beskrive hvorfor denne biomassen har mye lavere mengde nukleinsyrer enn annen biomasse.

#### *Kvantifisering av vitaminer*

Søker har ikke analysert for vitaminer. Søker henvises til PT73 *E. coli* (THR) parti S1-biomasse produsert i 2001, dokumentasjonen er gjengitt i VKMs helserisikovurdering av PT73 *E. coli* (THR) (VKM 2008).

Faggruppe 3 og Faggruppe 6 mener at søker må utføre analyser av vitaminer i PT73 (TM).

#### *Kvantifisering av organiske syrer*

I PT73 (TM) er det analysert for melkesyre (LOQ), maursyrer (LOQ), eddiksyre (3,7 g/100g), propionsyre (0,15 g/100g), smørsyre (0,1 g/100g), iso-smørsyre (LOQ), valeriansyre (LOQ) og iso-valeriansyre (0,2 g/100g). Med unntak for eddiksyre og maursyre er disse organiske syrene ikke målt i

parti S1. Innholdet av eddiksyre og maursyre i PT73 (TM) er ikke vesentlig endret i forhold til mengdene i PT73 (THR) parti S1.

*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. Det er målt for polysakkarider, og gjennomsnittlig mengde for de tre partiene er 2,3 g/100g tørrvekt. Søker har ikke gitt noen forklaring på hvorfor påvisningsgrensene for flere av sukkerartene i PT73 (TM) er høyere enn lavest påviste mengder for parti S1.

*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 i PT73 (TM) og i PT73 *E. coli* (THR). For spor – og toksiske metaller er det målt for arsen, bly, jern, kadmium, kopper, kvikksølv og sink, se tabell 2.

Søker gir ingen forklaring på hvorfor de laveste påviste grensen for As og Cu i PT73 (TM) er høyere enn de mengdene som er målt i PT73 *E. coli* (THR) parti S1 (2001), se tabell 2. Sammenlignet med parti S1 er det for PT73 (TM) funnet til dels store forskjeller for mineralene kalium (ca 1/10 i (TM)), kalsium (ca. 1/20 i (TM)), magnesium (ca. 1/20 i (TM)) og natrium (ca. 2 ganger større i (TM)). Kloridmengden i (TM) er ca. 1/10 av mengden i parti S1.

Biomassen inneholder også en del sulfat ca. 12 g/kg tørrvekt i PT73 (TM) og 30 g/kg tørrvekt i PT73 *E. coli* (THR).

Tabell 2: Analyse av metaller.

| (Heavy) metals | Max. Limit <sup>(1)</sup>  | Unit  | Ref.       | 'As is basis' |             |             |   | Dry matter basis   |                   |                    |   |
|----------------|----------------------------|-------|------------|---------------|-------------|-------------|---|--------------------|-------------------|--------------------|---|
|                |                            |       |            | PT73 (TM)     |             |             | PT73<br><i>E. coli</i><br>(THR)<br>S1<br>(2001) | PT73 (TM)          |                   |                    | PT73<br><i>E. coli</i><br>(THR)<br>S1<br>(2001) |
|                |                            |       |            | B1-<br>2006   | B2-<br>2006 | B3-<br>2006 |   | B1-<br>2006        | B2-<br>2006       | B3-<br>2006        |   |
| As             | 2<br>mg/kg                 | µg/kg | (a)<br>(b) | < 20          | < 20        | < 20        | 11  |                    |                   |                    |   |
| Pb             | 10 <sup>(2)</sup><br>mg/kg | µg/kg | (a)<br>(b) | < 20          | 21          | < 20        | 113   |                    |                   |                    |   |
| Hg             | 0.1<br>mg/kg               | µg/kg | (a)<br>(b) | 6             | 6           | 6           | 4   |                    |                   |                    |   |
| Cd             | 1 <sup>(3)</sup><br>mg/kg  | µg/kg | (a)<br>(b) | < 10          | 12          | < 10        | 65  |                    |                   |                    |   |
| Cr             | -                          | mg/kg | (a)<br>(b) | NM            | NM          | NM          | 0.49  |                    |                   |                    |   |
| Cu             | -                          | mg/kg | (a)<br>(b) | < 5           | < 5         | < 5         | 3.6<br>3.5*                                     |                    |                   |                    | 4   |
| Ni             | -                          | mg/kg | (a)<br>(b) |               |             |             | 0.49  |                    |                   |                    |   |
| Fe             | -                          | mg/kg | (a)<br>(b) | 60            | 54          | 63          | 61*   | 67 <sup>(4)</sup>  | 61 <sup>(4)</sup> | 67 <sup>(4)</sup>  | 69  |
| Zn             | -                          | mg/kg | (a)<br>(b) | 3.1           | 1.8         | 1.4         | 17.5<br>13.3*                                   | 3.5 <sup>(4)</sup> | 2 <sup>(4)</sup>  | 1.5 <sup>(4)</sup> | 15  |

(a): 'de Haan, 2007' for samples B1-, B2- and B3-2006 of PT73 (TM) and 'Rooseboom-Reimers, 2002' for Sample S1 of PT73 *E. coli* (THR). For a description of the analytical methods used for arsenic, heavy metals and mercury by TNO, see the (TNO-Quality of Life, 2007f), (TNO-Quality of Life, 2007b) and (TNO-Quality of Life, 2007c) respectively.

(b): (Jansman A.J.M. and van Diepen J.Th.M., 2005) for sample S1 of PT73 *E. coli* (THR)

NM: Not measured

<sup>(1)</sup> According to EU Directive 2002/32/EC, for feed materials, in general.

<sup>(2)</sup> Directive 2005/87/EC amending Directive 2002/32/EC: 10 mg/kg for feed materials in general, 5 mg/kg for yeasts

<sup>(3)</sup> Directive 2005/87/EC amending Directive 2002/32/EC: feed material of vegetable origin

<sup>(4)</sup> Approximate value calculated from the content on the product as is measured by de Haan (2007) and the dry matter content measured by Mauclair (2006)

- No maximum limits set

\* Result obtained by calculation, either from the result expressed on DM basis or from the result expressed on the product 'as is'

Faggruppe 3 og Faggruppe 6 mener at på grunnlag av til dels store forskjeller i uorganiske komponenter samt større mengde sulfat(ca. 2,5 ganger) i PT73 *E. coli* (THR) biomasse enn i PT73 (TM) biomasse, kan det ikke konkluderes med vesentlig likhet mellom biomassene.

#### *Kvantifisering av pesticider, dioksiner og polyaromatiske hydrokarboner (PAH)*

For analyser av pesticider henvises det til PT73 *E. coli* (THR). Dokumentasjonen i PT73 *E. coli* (THR) inneholder målinger av klororganisk forbindelser, organofosfater og polyaromatiske hydrokarboner (PAH), se VKMs helserisikovurdering av PT73 *E. coli* (THR) (VKM 2008).

#### *Kvantitativ og kvalitativ analyse av mikroorganismer i biomasse*

##### *Dyrkbare mikroorganismer*

Søker har undersøkt for dyrkbare mikroorganismer i PT73 (TM) biomasse. Det er ikke påvist *Salmonella* bakterier i 50 gram biomasse. Det er påvist færre enn 10 per gram biomasse av henholdsvis koagulase positive *Stafyllococcus*, *Clostridium perfringens*, sulfit-reducerende bakterier dyrket ved 46 °C, termotolerante koliforme, koliforme dyrket ved 30 °C og enterobakterier 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 biomasse og muggsopper til 90 per gram. Den mikrobielle status for PT73 (TM) biomasse er som for PT73 *E. coli* (THR). Analysemetodene for påvisning av mikroorganismer er utført i henhold til AFNOR-normer (Association française de normalisation).

##### Vekst av mikroorganismer ved lagring.

Det er ikke foretatt målinger av mikrobiell status ved langtidslagring av PT73 (TM) biomasse. Søker henviser til studier utført på PT73 *E. coli* (THR), se VKMs helserisikovurdering av PT73 *E. coli* (THR) (VKM 2008).

##### *Lagringsstabilitet av fôr som inneholder biomasse PT73 (TM).*

Søker har ikke utført undersøkelser av lagringsstabilitet av fôr som inneholder biomasse PT73 (TM). Søker henviser til lagringsforsøk av grisefôr og fôr til kyr som inneholder biomasse PT73 *E. coli* (THR).

Andre studier som ikke er utført på PT73 (TM), men som er utført på PT73 *E. coli* (THR) er opptak av oksygen i biomassen og frigivelse av flyktig komponenter fra biomassen. Se for øvrig VKMs helserisikovurdering av PT73 *E. coli* (THR) (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 PT73 (TM) 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 prossteknikken etter modifisering av bakteriene stort sett er den samme for PT73 *E. coli* (THR)- og PT73 (TM) biomasse, og analysene av miljøgifter (fremmedstoffer) viser så lave tall for PT73 *E. coli* (THR), aksepterer Faggruppe 3 og Faggruppe 6 at det ikke foretas egne analyser av miljøgiftinnhold i PT73 (TM) biomasse.

Faggruppe 3 og Faggruppe 6 mener at PT73 (TM) bakteriebiomasse prinsipielt ikke er lik PT73 *E. coli* (THR) fordi biomassene er produsert fra ulike *E. coli*-stammer. Faggruppene mener også at modifiseringen av *E. coli* stammene som produserer PT73 *E. coli* (THR) og PT73 (TM) er forskjellige,

fordi det er plasmider i bakteriene som produserer PT73 *E. coli* (THR) biomasse. Det knyttes derfor usikkerhet til om biomasse fra PT73 *E. coli* (THR) og PT73 (TM) 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 PT73 (TM) er smalere enn for PT73 *E. coli* (THR).

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 PT73 *E. coli* (THR). Faggruppene er viser til at bredden av studiene for PT73 (TM) er smalere enn for PT73 *E. coli* (THR), og det er påvist store endringer i innhold av analyserte komponenter i PT73 (TM) sammenlignet med biomasse PT73 *E. coli* (THR). Faggruppene mener derfor det er uakseptabelt at søker henviser til PT73 *E. coli* (THR)-dokumentasjonen mht de komponentene som ikke er målt for i biomasse PT73 (TM).

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 PT73 (TM) biomasse.

Faggruppene konkluderer med at PT73 *E. coli* (THR) biomasse i prinsippet ikke er lik PT73 (TM) biomasse, fordi ved sammenligning av forskjellige komponenter er det funnet til dels store forskjeller mellom PT73 *E. coli* (THR) og PT73 (TM).

Faggruppe 3 og Faggruppe 6 konkluderer med at biomasse fra PT73 *E. coli* (THR) ikke er tilstrekkelig for vurdering av ernæringsrelaterte komponenter, kritiske toksiner, toksiske metaller og kjemiske kontaminanter for biomasse PT73 (TM), men biomasse PT73 *E. coli* (THR) 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**

### **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 PT73 (TM) biomasse viser at PT73 (TM) ikke er vesentlig endret i forhold til PT73 *E. coli* (THR).

Faggruppe 3 og Faggruppe 6 er uenig i søkers argumentasjon fordi det mangler dokumentasjon på at bakteriestammene er like. Faggruppe 3 og Faggruppe 6 mener at *E. coli*-stammen som produserer PT73 (TM) biomasse er genotypisk og fenotypisk forskjellig fra de *E. coli*-stammen som produserer PT73 *E. coli* (THR) biomassen. Sammenlignende studier mht. ernæringsrelaterte komponenter støtter også opp om at PT73 *E. coli* (THR) biomassen er forskjellig fra *E. coli*-stammen som produserer biomasse PT73 (TM).

Faggruppe 3 og Faggruppe 6 mener at studiene som er utført på PT73 *E. coli* (THR) biomasse kan være nyttige som bakgrunnsmateriale ved vurdering av PT73 (TM) biomasse, men egne studier av PT73 (TM) biomasse skal følge med dokumentasjonen.

#### *In vitro fordøyelighetstest*

Det er ikke utført fordøyelighetsstudier på PT73 (TM) biomasse. Søker henviser til studier utført på PT73 *E. coli* (THR) biomasse. For informasjon se VKMs helserisikovurdering av PT73 *E. coli* (THR) (VKM 2008).

Medlemmene i Faggruppe 3 og Faggruppe 6 mener at studiene som er utført på PT73 *E. coli* (THR) – biomasse kan være nyttige som bakgrunnsmateriale ved vurdering av PT73 (TM) biomasse, men egne fordøyelighetsstudier av PT73 (TM) 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-net, se kapittel 7:

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

#### *4.4. Studies in target animals*

og

### *5. Considerations for human health of the product.*

Søker har utført et 13 ukers fôringsforsøk på rotter med PT73 (TM) biomasse. Det er ikke utført andre toksisitet og ernæringsstudier på PT73 (TM) biomasse. Søker henviser til studier utført på PT73 *E. coli* (THR) biomasse.

For toksisitet og ernæringsstudier utført på PT73 *E. coli* (THR) biomasse, se VKMs helserisikovurdering av PT73 *E. coli* (THR) 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 føret med fôr som inneholder PT73 (TM) og en kontrollgruppe med 10 rotter/kjønn ble føret 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 føret var det innblandet henholdsvis 0, 5, 10 og 20 % (vekt/vekt) PT73 (TM)-biomasse. Gjennomsnittlig inntak av biomasse i hver fôrgruppe var for hannedyr 2,5-; 4,9-; 10,1- og for hunndyr 2,6-; 5,1-; 10,9 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, hjerne, milt, 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, milt, hjerne, 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 føret 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 føret som har størst mengden PT73 (TM) biomasse ikke fører til toksisk påvirkning.

*Kommentarer fra faggruppene:*

Fôringsstudien viser forskjellige testrelaterte effekter på hematologi, klinisk kjemi og organvekter. Økt eller minskede 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 (5 %) 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 konkluderer 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: V7405/03) 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 PT73 (TM) 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 rotteleverhomogenater blandet med S9-miks. Siden testsubstansen (TM)-biomasse er relativt uløselig ble 10 mg/ml ekstrahert med saltvann i ca. 24 timer, etterfulgt av sentrifugering, sterilfiltrering og fortykning i saltvann. Konsentrasjon i skålene er 62 – 5000 µg biomasse/skål. 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 er ikke påvist cytotoksisitet (± S9-miks) ved mengder opptil 5000 µg/ml. Det er heller ikke påvist frame shift mutasjon eller baseparsubstitusjon. Søker konkluderte med at PT73 (TM) biomasse ikke er mutagent i Amestest. Søker har lagt ved Amestest på PT73 *E. coli* (THR). Resultatene fra denne testen er som for (TM).

*Test for kromosomale abberasjoner (avvik) i mammalske celler:*

TNO Nutrition and Animal Research, Zeist, Nederland (Usta & Vogel 2007, rapport nr: V7402/04) har utført for Ajinomoto Eurolysine test på kromosomabberasjon på cellelinje CHO K-1 (Chinese hamster ovary cells). Testen er utført på PT73 (TM) 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 50 mg/ml ekstrahert med saltvann i ca. 24 timer, etterfulgt av sentrifugering, sterilfiltrering og fortykning i saltvann. Konsentrasjon i skålene er (± S9-miks) 10 – 5000 µg/ml i første forsøk, og 500 – 5000 µg/ml i andre forsøk. For positiv kontroll ble det benyttet, mitomycin C uten S9-miks og cyklofosamid med S9-miks. Det er ikke påvist induksjon av kromosomal abberasjon. Søker har lagt ved test for kromosomal abberasjon på PT73 *E. coli* (THR). Resultatene fra denne testen er som for PT73 (TM) biomasse.

#### *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 PT73 (TM) 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 12,5 mg/ml ekstrahert med saltvann i ca. 24 timer, etterfulgt av sentrifugering, sterilfiltrering og fortynning i saltvann. Konsentrasjon i skålene er  $\pm$  S9-miks 312 – 5000  $\mu$ g/ml. For positiv kontroll ble det benyttet, metylmetansulfonat uten S9-miks og 3-metylcholantren med S9-miks. Det er ikke påvist testrelaterte mutasjoner i cellelinjen muslymfom L5178Y. Søker har lagt ved test for genmutasjon i mammalske celler på PT73 *E. coli* (THR). Resultatene fra denne testen er som for PT73 (TM) biomasse.

#### *Kommentarer fra Faggruppe 3 og Faggruppe 6 til tester for mutagenitet og gentoksisitet*

Til testene er det benyttet saltvann eller kulturmedium uten serum. Faggruppene mener at uttrekksmediene 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-treonin kan dannes komponenter som kan være upolare mutagener. Behandling av *E. coli* K12 AG3139 celler 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 PT73 *E. coli* (THR) studiene kan være nyttige som bakgrunnsmateriale ved vurdering av PT73 (TM) biomasse, men at egne toksisitets- og ernæringsstudier utført på PT73 (TM) biomasse 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 EFSA's retningslinjer kapittel C.6.8 er vurdering av allergenitet angående 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 PT73 (TM). Mat og fôr, inkludert PT73 (TM), som inneholder proteiner kan medføre risiko for hud og/eller respiratorisk sensibilisering for arbeidere. PT73 (TM) 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, og at det råder usikkerhet om det ved overproduksjon av L-treonin kan dannes 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 PT73 *E. coli* (THR) biomasse. Faggruppene presiserer at studiene som er utført på PT73 *E. coli* (THR) biomasse kan eventuelt brukes som referanser for tilsvarende publiserte data i en risikovurdering, og er av denne grunn verdifulle, dog utilstrekkelige, ved helserisikovurdering av PT73 (TM)-bakteriebiomasse.

Faggruppe 3 og Faggruppe 6 konkluder med at egne studier på dyr med fôr som inneholder PT73 (TM) biomasse må utføres for om mulige å påvise helseeffekter på dyrene.

## **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 PT73 (TM) 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 TM-biomasse er trygt å tilsette som fôringrediens.



## 7. Innspill til EFSA-net

### 2. Characterisation of the genetically modified microorganism (GMM)

The Norwegian GMO Panel disagrees with Ajinomoto Eurolysine concerning comparison of the GM product with its conventional counterpart. The host strain *E. coli* K12 MG1655 could be used as a counterpart.

### 3. Characterisation of the product

#### 3.2. *Description of the product.*

The experts do not agree that PT 73 (THR) can substitute (TM) in analysing key components. The modification process of (TM) is not the same as for (THR). The strains used for modification are not comparable, e.g. different composition of several amino acids, content of ash, crude protein, sulphate is about 50 % in (TM) than (THR).

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

The documentation by Bailly & Labat 2007 are of limited value, and insufficient. Using DNA-purification methods also when using the method of Quiagen, some shearing of DNA during extraction happens. This is shown in figure 1 in Labat, 2002. According to Figure 2 in Bailly\_and\_Labat, 2007 no shearing of DNA is visualised. Why.

### 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 the main bacterial phospholipid, phosphatidylethanolamin, may be of clinical importance via biotransformation to homocysteine which may 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.

An elevated level of nucleic acids in the bacterial biomass is also expected. An unexpected low nucleic acid level was presented for the PT73 biomass. There are some unsolved questions related to high intake of nucleic acids, f.i. on immunity.

#### 4.4. *Studies in target animals*

The experts do not agree that PT 73 (THR) can substitute PT 73 (TM) in toxicity studies and nutritional assessment on target animals. The experts found when evaluating toxicity studies using PT73 *E. coli* (THR) numbers of test feed related effects, e.g in the performance studies on pigs it was found increased kidney weight at 10% biomass and above, and at 15 and 20 % dosages reduced body weight gain reduced faeces consistency, increased serum bilirubin and haemoglobin and increased packed cell volume were found. The performance study on rainbow trout revealed delayed rigor mortis at the two lowest dosage levels 6.6 and 13.1 % PT73 (THR) (not checked in fish fed the two highest dosage levels 26.3 and 39.4 %). Fish fed the two highest levels showed, however, reduced growth, and at highest level were also found fluid in the peritoneal cavity. Fish fed 13.1 % and above showed reduced protein and energy retention.

The experts have three important comments on the in vivo toxicity studies. In general, examinations of lymphoid tissues, particularly those related to the intestine, and immune responses should have been

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 second comment is that the applicant often considers the effects shown in the presented studies 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. The third comment is that studies on target animals should be more toxicologically comprehensive, including examination of histopathology, immunopathology as well as reproduction.

#### 5. Considerations for human health of the product

The experts do not agree that PT 73 (THR) can substitute PT73 (TM) in toxicity studies and nutritional assessment on target animals. The experts found when evaluating toxicity studies using PT73 E.coli (THR) numbers of test feed related effects, e.g toxicity study on rats found increased liver weight, reduced thrombocyt counts, and reduced cholesterol and phospholipids in serum at the lowest dose.

## 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 PT73 (TM) er smalere enn for PT73 *E. coli* (THR). Faggruppe 3 og Faggruppe 6 er uenige med søker 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 er utført på PT73 *E. coli* (THR).

Faggruppene mener det er for mange indikasjoner på helseeffekter ved bruk av PT73 *E. coli* (THR) og PL73 *E. coli* (LYS), og det er stilt mange spørsmål til de enkelte dyreforsøkene. Faggruppene mener at PT73 (TM) prinsipielt ikke er lik PT73 *E. coli* (THR), og det knyttes derfor usikkerhet til om biomasse fra PT73 *E. coli* (THR) og PT73 (TM) 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 PT73 (TM) bakteriebiomasse prinsipielt ikke er lik PT73 *E. coli* (THR) fordi det er ulike *E. coli*-bakteriestammer og ulike genmodifiseringsmetoder.

Faggruppe 3 og Faggruppe 6 kan ikke konkludere på om biomasse PT73 (TM) er egnet for tilsetning til fôr fordi søker ikke har utført egne fôringsstudier på dyr med biomasse PT73 (TM).

### Samlet vurdering

Faggruppe 3 og Faggruppe 6 konkluderer med det er påvist endringer i innhold av analyserte komponenter sammenlignet med biomasse PT73 *E. coli* (THR.). Faggruppene mener derfor det er uakseptabelt at søker henviser til PT73 *E. coli* (THR)-dokumentasjonen mht de komponentene som ikke er målt for i biomasse PT73 (TM).

Faggruppe 3 og Faggruppe 6 finner på grunn av at det foreligger utilstrekkelig dokumentasjon, både kjemisk og biologisk (med manglende fôringsstudier), og at det er påviste endringer hos forsøksdyrene ved bruk av PT73 *E. coli* (THR) og PL73 *E. coli* (LYS) biomasse i forsøksfôr, kan faggruppene ikke konkludere på om PT73 (TM) biomasse 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.
- 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](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.lovdatab.no/cgi-wift/ldles?doc=/sf/sf/sf-20021107-1290.html>
- Hayashi, K., Morooka, N., Yamamoto, Y., Fujita, K., Isono, K., Choi, S., Ohtsubo, E., Baba, T., Wanner, BL, Mori, H., & Horiuchi, T (2006). Highly accurate genome sequences of *Escherichia coli* K-12 strains MG1655 and W3110, *Molecular systems biology* 2, doi:10.1038/msb4100049.
- 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 PT73 *E. coli* (THR) bakteriebiomasse (EFSA/GMO/FR/2007/44) fra Ajinomoto Eurolysine. Uttalelse fra Faggruppe for genmodifiserte organismer og Faggruppe for fôr til terrestriske og akvatiske dyr. 16.04.08. 08/310-endelig. Vitenskapskomiteen for mattrygghet, Oslo, Norge. ISBN: 978-82-8082-431-8