



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

Vitenskapskomiteen for mattrygghet

27.9.2010

ISBN: 978-82-8082-430-1

VKM Report 2010: 30

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 terrestriske og akvatiske dyr ønsker spesielt å takke *ad hoc*-gruppe ekspertene for deres verdifulle bidrag med denne risikovurderingen.

Medlemmer av *ad hoc*-gruppen er:

Knut Berdal (Faggruppe 3, leder), Aksel Bernhoft (Faggruppe 6), Gro-Ingunn Hemre (Faggruppe 6), 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), Jihong Liu Clarke, Helge Klungland, Casper Linnestad, Anne I. Myhr, Audun Nerland, Ingolf Nes, Kåre M. Nielsen, Hilde-Gunn Opsahl Sorteberg, Odd E. Stabbetorp, Vibeke Thrane,

og

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

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

Koordinatorer fra sekretariatet:

Arne Mikalsen og Tron Ø. Gifstad

SAMMENDRAG

Helserisikovurderingen av bakteriebiomasse PL73 *Escherichia coli* (*E. coli*) (LYS) (EFSA/GMO/FR/2007/40) (PL73 *E. coli* (LYS), PL73 (LYS)) fra Ajinomoto Eurolysine er utført av Faggruppe for genmodifiserte organismer (Faggruppe 3) og Faggruppe for fôr til terrestriske og akvatisk dyr (Faggruppe 6) under Vitenskapskomiteen for mattrygghet. Vitenskapskomiteen for mattrygghet er bedt av Mattilsynet om å vurdere bakteriebiomasse PL73 *E. coli* (LYS) (EFSA/GMO/FR/2007/40) til bruk i fôrvarer.

Bakteriebiomasse PL73 *E. coli* (LYS) fra firmaet Ajinomoto Eurolysine er produsert fra den genmodifiserte bakterien *Escherichia coli* (*E. coli*) K-12 stamme N°10S, som er modifisert for økt produksjon av L-lysin. Tørket og granulert biomasse fra *E. coli* stamme N°10S vil bli markedsført som PL73 *E. coli* (LYS) under handelsnavnet PROT-AEL-L, og vil kun bli brukt som tilsetning til fôrvarer.

Vurderingen av bakteriebiomasse PL73 *E. coli* (LYS) er basert på dokumentasjon som er gjort tilgjengelig på EFSAs nettside GMO EFSA-net. I tillegg er det benyttet informasjon fra uavhengige vitenskapelige publikasjoner i vurderingen. Bakteriebiomasse PL73 *E. coli* (LYS) er vurdert i henhold til tiltenkt bruk og i overensstemmelse med kravene i forordning 1829/2003/EF og Forskrift om fôrvarer (2002). Videre er EFSAs 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, 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 at den genmodifiserte *E. coli* K-12 stamme N°10S er fremkommet ved genmodifisering av *E. coli* K-12 stamme NVC578. Stamme NVC578 ble transformert med to plasmider, pS183dT og pAKID14. Plasmidet pAKID14 i *E. coli* K-12 stamme N°10S inneholder antibiotikaresistensgenet *nptI*. Genet fører til resistens mot antibiotikaene kanamycin og neomycin, men ikke mot amikacin. Hensikten med genmodifiseringen er å øke enzymaktiviteten 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 *E. coli* (LYS), se figur 1. Det opplyses også om at plasmidene pS183dT og pAKID14 ikke er tilstede i PL73 *E. coli* (LYS) bakteriebiomasse.

Faggruppe 3 og Faggruppe 6 finner informasjonen vedrørende molekylær karakterisering tilstrekkelig for vurdering av bakterien *E. coli* K-12 stamme N°10S. Faggruppene 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. Faggruppene mener at mht påvisning av *nptI*-genet er det analytiske begrensninger i de utførte PCR-analysene. Søker skal dokumentere bedre påvisningsgrensene for PCR-produktene, samt at kontrollene skal dokumenteres bedre. Southern-blot analyser med adekvate prober mot *nptI*-genet skal utføres på det fragmenterte DNA-et i biomassen.

Komparative analyser

Valg av komparator og forsøksdesign

Ajinomoto Eurolysine hevder at sammenligning med konvensjonelt motstykke ikke er aktuelt for PL73 *E. coli* (LYS) bakteriebiomasse, fordi biomasse fra L-lysinproduserende *E. coli*-stamme tidligere ikke er blitt produsert og markedsført. Faggruppe 3 og Faggruppe 6 er uenig med Ajinomoto

Eurolysine i at det ikke er mulig å foreta en komparativ vurdering av ernæringskomponenter med mere med et konvensjonelt motstykke. Bakterien *E. coli* K-12 stamme NVC578 kan genmodifiseres med to plasmider som ikke inneholder de gener og genelementer som trengs for økning av enzymaktiviteten i L-lysin biosynteseveien. Disse to plasmidene må med unntak av L-lysin biosynteseveien, ha samme genetisk bakgrunn som plasmidene pS183dT og pAKID14.

Ajinomoto Eurolysine har fremstilt tre partier av biomassen PL73 *E. coli* (LYS), parti S1, S2 og S3. Parti S1 er fra storskalaproduksjon, mens S2 og S3 er småskalaproduksjon som omfatter en industriell fermentor. Part S1, S2 og S3 er benyttet til analyser av hovedkomponenter. Søker hevder at bare parti S1 er representativ for produksjon av bakteriebiomasse, mens de to andre partiene som også er benyttet til analyser av hovedkomponenter gir indikasjoner på variasjoner som kan forekomme i bakteriebiomasseproduksjon.

Faggruppe 3 og Faggruppe 6 anser analyser av komponenter av ernæringsmessig betydning for å være tilstrekkelige. Faggruppene har likevel bemerkninger til analysene fordi det mellom de forskjellige partiene (S1, S2 og S3) er funnet store forskjeller i flere parametre, f.eks. uorganiske salter, enkelte fettsyrer, enkelte tungmetaller, ammoniumnitrogen, kadaverin og lysin. Når det gjelder analyse av andre kjemiske komponenter mener faggruppene at det mangler analyser for fosfolipider, liposakkarider og lipidløslige pigmenter.

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 laboratoriene som har utført de forskjellige analysene, er sertifiserte laboratorier.

Toksisitetsstudier og ernæringsstudier

Søker har utført akutt oral eksponeringsstudie, akutt inhaleringsstudie, prenatal toksisitetsstudie og 90 dagers fôringsforsøk på rotter med PL73 (LYS) biomasse. Søker konkluderer med at det ikke ble påvist vesentlige helseeffekter på forsøksdyrene. Det er også utført forskjellige fôringsforsøk på gris, ku, kanin, sau og regnbueørret. Fôringsforsøkene på rotter og kanin er utført i henhold til OECDs retningslinjer og EUs EC-direktiver. Flere av fôringsforsøkene på gris, ku og sau er utført i henhold til de nederlandske Dutch CVB protokoller. Faggruppene kjenner ikke til Dutch CVB protokollene.

Faggruppe 3 og Faggruppe 6 finner for rotteforsøkene at det er påvist doserelaterte endringer i organvekt, og endringer i hematologiske og klinisk kjemiske parametre som anses som vesentlige. Det er statistisk signifikante effekter på levervekt, gjennomsnittlig hemoglobinmengde (MCH) og bilirubin allerede ved laveste dosering (3 % innblanding). Det mangler undersøkelser av lymfatisk vev – spesielt i tarm, immunresponser og immunglobuliner. Faggruppene finner også at en del andre påviste effekter ikke er skikkelig vurdert.

Med unntak av fôringsforsøkene på rotte og kanin er svært mange av fôringsforsøkene ikke utført i henhold til retningslinjer for god laboratoriepraksis (GLP). For flesteparten av fôringsforsøkene er det ikke gjort forsøk på å balansere ernæringsmessig fôrereseptene som inneholder biomasse, dvs. forsøksfôrene har en annen protein-, lipid- og mikronæringsstoffsammensetning enn standardfôret.

Faggruppe 3 og Faggruppe 6 konkluderer med at fôrdesignet for flesteparten av fôringsforsøkene er utilstrekkelig for påvisning av testrelaterte helseeffekter, fordi forsøks- og standardfôret ikke er balansert ernæringsmessig, dvs. forsøksfôret har en annen protein, lipid og mikronæringsstoff-sammensetning enn standardfôret.

Miljørisiko

Søknaden gjelder godkjenning av varmeinaktivert PL73 *E. coli* (LYS) bakteriebiomasse til bruk i fôrvarer under forordning (EF) 1829/2003. Faggruppene har derfor ikke vurdert mulige miljøeffekter knyttet til levende *E. coli* K-12 stamme N°10S bakterier.

Samlet vurdering:

Fôringforsøkene viser effekter på forsøksdyr som anses som betydelige ved innblanding av biomassen i standardfôr. Endringer som ble påvist hos rotte var på levervekt, gjennomsnittlig hemoglobinnmengde og bilirubin. Det laveste innblandingsnivået det er funnet effekter var 3 % biomasse.

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

NØKKELORD

PL73 *E. coli* (LYS) bakteriebiomasse, fôr, helse, proteinkilde, EFSA/GMO/FR/2007/40

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. Etter saken er ferdig utredet blir <i>ad hoc</i> -gruppen oppløst.
ARMG	Antibiotikaresistensmarkørgen
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-lysin	essensielle aminosyre som kroppen ikke selv kan fremstille. Aminosyrer som er byggesteiner for proteiner har alltid L-konfigurasjon hos mennesker og dyr.
MCH	”mean cell hemoglobin” gjennomsnittlig hemoglobinmengde i en blodprøve
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 opptre 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.

INNHOLDSFORTEGNELSE

BIDRAGSYTERE.....	2
VURDERT AV	2
SAMMENDRAG	3
NØKKEWORD	5
FORKORTELSER OG ORDFORKLARINGER	6
INNHOLDSFORTEGNELSE	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
2.7 Delkonklusjon	12
3. Komparative analyser	13
3.1 Valg av komparator og forsøksdesign	13
3.2 Analyser av ernæringsmessige komponenter	14
3.3 Delkonklusjon	18
4. Dokumentasjon av næringsverdi, toksisitet og allergenisitet i dyreforsøk.....	19
4.1 Ernæringsmessig vurdering av biomassen for bruk som fôr i dyreforsøk	19
4.2 Toksisitet- og ernæringsstudier	20
4.2.1 Rotter	20
4.2.2 Gris	21
4.2.3 Kanin	23
4.2.4 Ku	24
4.2.5 Regnbueørret	25
4.2.6 Sau	26
4.3 Tester for gentoksisitet og mutagenitet	26
4.4 Generelle kommentarer til undersøkelser av toksisitets- og fordøyelsesstudier.....	27
4.5 Allergenisitet	28
4.6 Delkonklusjon	28
5. Miljøriskovurdering, nivå 1	29
6. Vurdering av søkers dokumentasjon og kunnskapshull	29
7. Innspill til EFSA-net	30
KONKLUSJON.....	33
REFERANSER.....	34

BAKGRUNN

Vitenskapskomiteen for mattrygghet er bedt av Mattilsynet om å foreta en vitenskapelig vurdering av helserisiko for dyr ved en eventuell godkjenning og bruk av fôrvarer som inneholde PL73 *Escherichia coli* (*E. coli*) (LYS) bakteriebiomasse (EFSA/GMO/FR/2007/40) fra Ajinomoto Eurolysine. PL73 *E. coli* (LYS) 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/2007/40, omfatter bruksområdene fôrvarer, og ble fremmet og anbefalt av franske myndigheter i februar 2007. Dokumentasjonen knyttet til søknaden ble lagt ut på EFSA-nett 16. januar 2008, med frist på 90-dager for innspill fra EU- og EØS/EFTA-landene. Norge har ikke tidligere uttalt seg om PL73 *E. coli* (LYS) 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 vurderingen gi innspill til EFSA-nett.

Faggruppe for genmodifiserte organismer og Faggruppe for fôr til terrestriske og akvatiske dyr skal i tråd med oppdragsbrevet utarbeide helserisikovurdering av PL73 *E. coli* (LYS) bakteriebiomasse (EFSA/GMO/FR/2007/40) som proteintilskudd til fôr. Vurderingen av PL73 *E. coli* (LYS) bakteriebiomasse skal utføres i henhold til tiltenkt bruk og i overensstemmelse Forskrift om fôrvarer (2002), og med prinsippene som er nedfelt i EFSA's 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 *E. coli* (LYS), EFSA/GMO/FR/2007/40, som er produsert fra den genmodifiserte bakterien *E. coli* K-12 stamme N°10S.

Unik kode: Ingen unik kode.

Status i EU: Søknad under forordning (EF) Nr. 1829/2003/. EFSA's frist for innspill er 16.04.08.

Ønsket svarfrist til Mattilsynet: 16. april 2008.

RISIKOVURDERING

1. Innledning

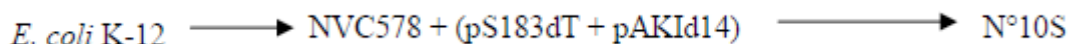
Helserisikovurderingen av PL73 *E. coli* (LYS) bakteriebiomasse for bruk i fôrvarer er i hovedsak basert på dokumentasjon som er gjort tilgjengelig på EFSAAs nettside GMO EFSAAnet. I tillegg er det benyttet uavhengige vitenskapelige publikasjoner i vurderingen. Vurderingen er gjort i henhold til tiltenkt 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 Faggruppen for genmodifiserte organismer (Faggruppe 3) er ansvarlig for helse- risikovurderingen av genmodifiserte organismer, mens medlemmene i Faggruppe for fôr til terrestrisk og akvatiske dyr (Faggruppe 6) er ansvarlig helserisikovurdering av fôrvarer.

1.1 Beskrivelse av egenskap(er) og virkningsmekanismer

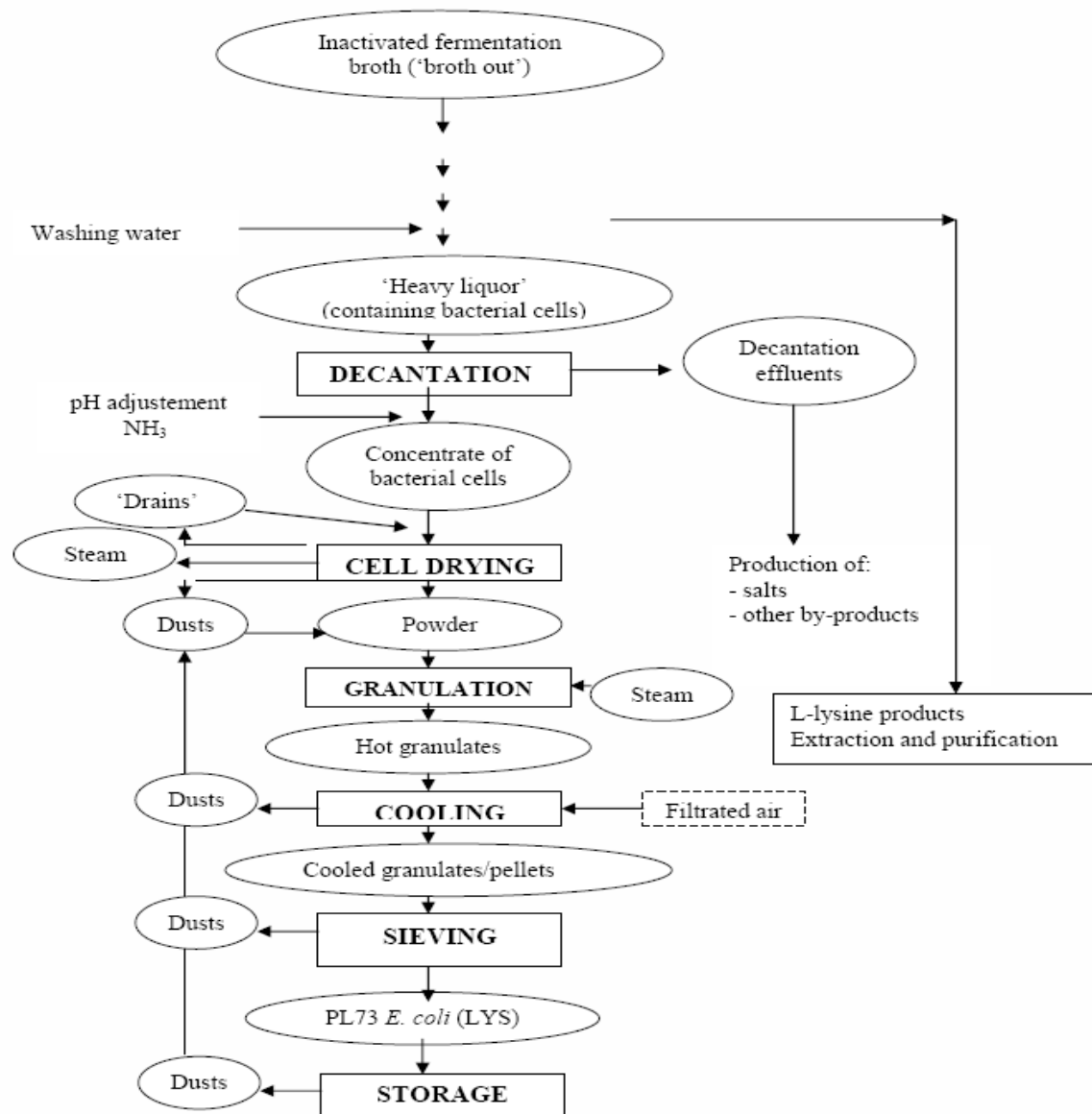
Den genmodifiserte bakterien *E. coli* K-12 stamme N°10S produserer økt mengde L-lysin. *E. coli* K-12 stamme N°10S er fremkommet ved transformering av *E. coli* K-12 stamme NVC578 med to plasmider, pS183dT og pAKID14, se diagram. Søker opplyser at plasmidet pAKID14 i *E. coli* K-12 stamme N°10S inneholder antibiotikaresistensgenet *nptI*. Hensikten med plasmidene er å øke enzymaktiviteten til L-lysin biosyntestveien, for kommersiell produksjon av L-lysin.



Genmodifiseringsprosessen frem til *E. coli* K-12 stamme N°10S og det DNA-materialet som er benyttet for konstruksjon av de to plasmidene 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 varmeinaktiverede bakteriemediet ble undersøkt for levende og levedyktige *E. coli* celler. 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, og i et selektivt og *E. coli* spesifikt dyrkingsmedium. Ingen levende eller levedyktige celler ble påvist.

Det varmeinaktiverede bakteriemediet ble behandlet som vist i figur 1. Bakterieceller ble skilt fra mediet, og behandlet med svovelsyre. Bakteriemassen ble så konsentrert og tørket. Det opplyses at plasmidene pS183dT og pAKID14 ikke er tilstede i PL73 *E. coli* (LYS) bakteriebiomasse. Den tørkede massen ble malt, presset ved høyt trykk og granulert. Granulatet benyttes som tilsetning til fôrvarer. Biomassen vil bli markedsført under navnet PL73 *E. coli* (LYS) med handelsnavn PROT-AEL-L, og vil kun bli benyttet som tilsetning til fôrvarer.



Decantation effluents (liquid): Supernatant coming from the decantation of bacterial creams.
'Drains' ('Egouttures'): 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 *E. coli* (LYS) biomasse

2. Molekylær karakterisering

Molekylærbiologiske analyser som er utført på den genmodifiserte *E. coli* K-12 stamme N°10S 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 *E. coli* K-12 stamme N°10S er fremkommet ved hjelp av konvensjonelle DNA teknikker. Plasmidene pS183dT og pAKID14 ble satt inn i *E. coli*-stammen NVC578 ved transformasjon. Genmodifiseringsprosessene er konfidensiell informasjon.

2.2 Karakterisering av geninnsettingen og genkonstruksjonen

Karakteriseringen av nye gener og genkonstruktene anses av søker som konfidensiell informasjon. I den konfidensielle dokumentasjonen har søker laget et detaljert sammendrag av genmodifiseringsprosessene. Søker beskriver "stamtavlene" til stammene NVC578 og N°10S. Stamtavlene er konfidensielle. Det er også laget en detaljert oversikt av genmodifiseringsprosessene for de to plasmidene. Plasmidet pAKID14 som er benyttet i genmodifiseringen inneholder antibiotikaresistensgenet *nptI*. Undersøkelser utført med Southern blot og prober mot det aktuelle antibiotikaresistensgenet viser i henhold til søker at dette genet ikke er tilstede i biomassen.

Faggruppene finner informasjonen tilstrekkelig for vurdering av *E. coli* K-12 stamme N°10S.

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

Det er foretatt analyse og identifikasjon av åpne leserammene. Det er påvist åpne leserammer, men søker hevder at det ikke ble påvist ukjente leserammer. Det hevdes at det ikke ble påvist homologi til aminosyresekvenser som kan være helseskadelige. Analyser av åpne leserammer er av søker betraktet som konfidensiell informasjon.

Faggruppene finner informasjonen tilstrekkelig for vurdering av *E. coli* K-12 stamme N°10S.

2.4 Nedarving og stabilitet av innsatt DNA

Undersøkelser over mer enn 15 generasjoner viser at L-lysinproduksjonen er stabil. *E. coli*-K12 N°10S ble sådd ut på minimum- og selektiv *E. coli*-medium. Undersøkelser av koloniene som vokste opp viser at tilnærmet 100 % av koloniene inneholder de to plasmidene. Ved undersøkelser med restriksjonskutting av plasmid-DNA, separasjon av fragmentene på agarosegel og Southern blot ble det ikke påvist endringer som kan skyldes delesjoner eller intra og inter plasmidiske rekombinasjoner. Stabil produksjon av L-lysin over flere generasjoner viser også at fenotypen er stabil.

Faggruppene finner informasjonen tilstrekkelig for vurdering av *E. coli* K-12 stamme N°10S.

2.5 Potensial for genoverføring

Vedrørende potensiale for genoverføring har Faggruppe 3 og Faggruppe 6 spilt 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 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 og dyr. DNA fra biomasse produsert av *E. coli* K-12 stamme N°10S

kan derfor overføres vertikalt til *E. coli* i tarmen, men også horisontalt til andre mikroorganismer som finnes i tarmen.

De to plasmidene pS183dT og pAKID14 er konstruert fra non-konjugative plasmider, og disse plasmidene har ikke homologe sekvenser med *mob* og *tra* sekvenser. Med unntak av kanamycin-resistensgenet inneholder plasmidene bare gener som er relatert til aminosyremetabolismen.

I henhold til søker vil den lave pHen (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 PL73 *E. coli* (LYS) biomasse. For ekstrahering av DNA ble to metoder benyttet, henholdsvis kloroform/fenol og alkalisk (NaOH). Fem mg og 50 mg biomasse er benyttet til opprensing av DNA. DNA er rensset for inhiberende komponenter. Rensset DNA fra bomassen er analysert med agarosegel for å undersøke graden av degradering. Størrelsen på det degraderte DNAet var ≤ 1000 bp, og størsteparten av det degraderte DNAet var ≤ 250 bp.

Rensset DNA fra biomassen ble undersøkt med konvensjonell PCR for om mulig å påvise *nptI*-genet. PCR analysen er utført med primerpar som oppformere hele *nptI*-genet (1529) og et primerpar som oppformerte 506 bp. PCR analysen viste at hele *nptI*-genet ikke er oppformert, men et PCR-fragmentet på 506 bp ble påvist. Mengden av 506 bp fragment i biomassen er estimert til 2 picogram per 0,01 mg biomasse. Southern blot med probe mot *nptI*-genet for å vise størrelsen på det degraderte genet er ikke utført.

Vurdering av transformeringsevnen til det degraderte *nptI*-genet er undersøkt med *E. coli* stamme XL1 Blue. Denne stammen har stor transformeringsevne. Transformasjon ble målt ved at eventuelle kanamycinresistente kloner vokste på medier tilsatt kanamycin. Det er ikke påvist noen kanamycinresistente kloner fra DNA som var ekstrahert fra 100 mg biomasse. Søker konkluderer med at genoverføring fra biomassen er svært lite sannsynlig.

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

Søker hevder PL73 *E. coli* (LYS) biomassen ikke kan sammenlignes med et konvensjonelt motstykke, fordi en konvensjonell *E. coli* K-12 stamme som produserer L-lysin ikke tidligere har blitt markedsført. Faggruppene er uenig med søker. Faggruppene mener at *E. coli* K-12 stamme NVC578 kan genmodifiseres med to plasmider som ikke inneholder de gener og genelementer som trengs for økning av enzymaktiviteten i L-lysin biosynteseveien. Disse to plasmidene må med unntak av L-lysin biosynteseveien, ha samme genetisk bakgrunn som plasmidene pS183dT og pAKID14. Dette konvensjonelle motstykket kan benyttes for å skille effekter som skyldes genmodifiseringen fra generelle effekter som skyldes eksponering til *E. coli* biomasse (justert for L-lysin innhold) i føringsforsk.

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)

2.7 Delkonklusjon

Faggruppe 3 og Faggruppe 6 finner informasjonen tilstrekkelig for vurdering av den genmodifiserte stammen N°10S. Faggruppenene har ikke identifisert noe risiko knyttet til den molekylærbiologiske karakteriseringen. Faggruppene mener at den umodifiserte *E. coli*-stammen NVC578 kan benyttes som konvensjonelt motstykke. Faggruppene påpeker at dataene mht. størrelse på degradert DNA og transformeringsevnen til degraderte rekombinante DNA er begrenset. Faggruppene påpeker at fullstendig inaktivering av alt plasmid-DNA i biomassen kan være vanskelig ved prosessering av industrielle mengder bakterier. Det er derfor viktig at plasmidene som er benyttet i transformeringen ikke kan mobiliseres av konjugative plasmider. Søker hevder at det er liten homologi mellom plasmider som er benyttet i transformering av *E. coli*-bakterier som produserer biomassen PL73 *E. coli*

(LYS) og *tra* og *mob* sekvenser. Ettersom konjugering er den vanligste måten bakterier overfører plasmider på i en bakteriepopulasjon, burde søker utført tester med et panel av kjente konjugative plasmider for å forsikre seg om at overføring av plasmider ikke kan skje ved konjugasjon.

En svakhet ved de analyser søker har foretatt av potensialet for genoverføring av *nptI*-genet, er at størrelsen av det degraderte *nptI*-genet ikke er undersøkt med Southern blot.

Faggruppe 3 og Faggruppe 6 konkluderer med at søker må utføre en mer omfattende vurdering av helse-effekter relatert til utilsiktet spredning av *nptI* genet.

3. Komparative analyser

Ajinomoto Eurolysine har fremstilt tre partier av biomassen, parti S1, S2 og S3. S1 er produsert i november 2001 og er i fullskalaproduksjon. Det ble produsert totalt ca.16 tonn S1-biomasse, som ble fordelt på 16 store sekker, dvs. ca. 1 tonn i hver sekk. S2 og S3 er ned-skalerte laboratorieproduksjoner. Søker hevder at siden fremstillingsprosessene er forskjellige, kan en forvente forskjeller i mengder mellom de enkelte komponentene. Disse tre partiene er benyttet til analyser av hovedkomponenter, mens det er bare parti S1 som er benyttet som fôr i forsøk på dyr.

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 spilt 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 mht ernæringskomponenter etc. ikke er aktuelt for PL73 *E. coli* (LYS) bakteriebiomasse fordi biomasse fra L-lysinproduserende *E. coli* bakterien 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 har Ajinomoto Eurolysine utført en full risikovurdering i henhold til EFSA's retningslinjer.

Kommentarer fra Faggruppe 3 og Faggruppe 6:

Faggruppene er uenig med Ajinomoto Eurolysine i at det ikke er mulig å foreta en komparativ vurdering av ernæringskomponenter mm med et konvensjonelt motstykke. Kapittel 2.6 inneholder faggruppens begrunnelse.

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

3.2 Analyser av ernæringsmessige komponenter

For beskrivelse av analysemetoder som er benyttet for å analysere de forskjellige komponentene i biomassene henvises det til analytiske metoder utviklet av TNO-Quality of Life, Nederland. Imidlertid er analysene med referanse til Cotrel & Jacot (2002) utført av Laboratoire Veterinaire, Somme, og analysene med referanse til Mauclair (2003, 2004) og Jansman (2005) er Ajinomoto Eurolysine sine egne analyser.

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 og kontaminanter i biomassen

Det er foretatt følgende analyser av komponenter i biomassen. Nitrogenholdige komponenter (total og frie aminosyrer, ammonium N, amid N, urea N, biogene aminer, nukleinsyrer), total mengde lipider, fettsyrer, karbohydratfraksjon, organiske syrer, tørrstoff, vann, aske, organisk stoff, protein, fiber, stivelse, vitaminer, kritiske toksiner, mineraler, toksiske metaller, organofosfatpesticider, dioksiner, PCBer og polyaromatiske hydrokarboner (PAH).

Faggruppene finner at det knyttes usikkerhet til om alle analysene ble utført under god laboratoriepraksis (GLP).

Prøvene som er benyttet til analyser og tester er fra fullskalaproduksjon (S1) og ned-skalert laboratorieforsøk (S2 og S3) for å få tilstrekkelig mengde til analysene.

Kvantifisering av hovedkomponenter i biomassen

Hovedkomponenter som er kvantifisert i S1-, S2- og S3-biomasse er tørrstoff, vann, aske, organisk stoff, fett, protein, fiber, stivelse (kalkulert mengde) og nitrogenholdige komponenter (amid-N, ammonium-N, nitrat, nitritt, urea). PL73 *E. coli* (LYS) har høyt innhold av protein (837 g/kg tørrvekt), se tabell 1. Cirka 10 % av nitrogenet er til stede som ammonium-N. Den gjenværende delen av N-fraksjonen er hovedsaklig protein og aminosyrer. Biomassen inneholder også en del sulfat (89 g/kg tørrvekt). Innholdet av fett, sukker/karbohydrater og fiber er lavt eller svært lavt, henholdsvis cirka 63g, 24g and 10g per kg tørrvekt, se tabell 1. For noen av hovedkomponentene er det funnet til dels store forskjeller i mengder mellom de forskjellige partiene, se tabell 1.

Tabell 1. Kvantifisering av hovedkomponenter i biomassen

Table 3.3.1 Crude components

Crude components			'As is' basis			Dry matter basis		
	Sample	Unit	Reference			Reference		
			(a)	(b)	(c)	(a)	(b)	(c)
Dry matter	S1	%	90.02	91.1	90.6*			
	S2		95.66	93.7	94.8*			
	S3		93.75	93.1	93.9*			
Moisture	S1	%	9.98*	8.9*	9.4			
	S2		4.34*	6.3*	5.2			
	S3		6.25*	6.9*	6.1			
Crude ash	S1	g/kg	21.7	27.3*		24.1*	30	
	S2		26.2	34.7*		27.4*	37	
	S3		35.2	48.4*		37.6*	52	
Organic matter	S1	g/kg		884*			970	
	S2			902*			963	
	S3			883*			948	
Crude fat	S1	g/kg	60.5	57*	54	67.2*	63	59.6*
	S2			66*	90		71	94.9*
	S3			64*	87		69	92.6*
Crude protein	S1	g/kg	772.5	762.5*		858.1*	837	
	S2		781.3	756.2*		816.7*	807	
	S3		764.4	749.5*		815.4*	805	
Crude fibre	S1	g/kg		9*			10	
	S2			15*			16	
	S3			13*			14	
Starch**	S1	g/kg		6.4*			7	
	S2			1.9*			2	
	S3			1.9*			2	

(a) Mauclair, 2003 (for S1) or Mauclair, 2004 (for S2 and S3)

(b) Jansman, 2005

(c) Boerma, 2003 (for S1) or van Leeuwen, 2004b (for S2 and S3)

* result obtained by calculation either from the result expressed on DM basis or from the result expressed on the 'as is' basis.

** the fermentation substrate does not contain starch. The micro-organism does not contain starch but may contain complex polysaccharides which appear under this parameter.

Kvantifisering av fett, fosfolipider, lipidløslige pigmenter og fettsyrer

Totalt fettinnhold i biomassen er kvantifisert til mellom 59,6 til 67,2 g/kg tørrstoff. Det er ikke analysert for fosfolipider, lipidløslige pigmenter og uforsåpbare rester fordi det ikke var tilstrekkelig fettmengde for disse analysene. Det er analysert kvantitativ og kvalitativ for 16 fettsyrer. Fettsyrene som Det er analysert for er kaprinsyre C 10:0, laurinsyre C12:0, myristinsyre C14:0, pentadekansyre C15:0, palmitinsyre C16:0, trans-palmitoleinsyre C16:1 t9, cis-palmitoleinsyre C16:1 c9, heptadekansyre C17:0, C17:0 iso, stearinsyre C18:0, trans oljesyre (C18:1 t), cis-oljesyre(C18:1 c), linolsyre (C18:2 c 9,12), konjugerte linolsyrer (CLA) (C18:2 conj 9,11 (10, 12)), linolensyre C18:3 c9, 12, 15, behensyre C22:0, og en ikke-identifiserbar fettsyre. For enkelte fettsyrer er det påvist relative store forskjeller mellom partiene, for eksempel er det i S1 ikke påvist fettsyrene C16:1 t9, C18:2 conj 9,11 og C22:0, mens disse er påvist i S2 og S3.

Kvantifisering av aminosyrer og nitrogenholdige komponenter.

Bakteriekulturen tilsettes ammoniumsulfat, ammoniakk og protein fra soya. Størsteparten av nitrogenet som er påvist i (LYS)-biomasse kommer fra bakterieprotein og frie aminosyrer, og cirka 7-10 % av nitrogenet er til stede som ammonium-N, dvs fritt NH₃ og NH(3)-forbindelser. For noen av komponentene er det funnet til dels store forskjeller mellom de forskjellige partiene. Den største forskjellen finner en for ammonium-N, 25,4 g/kg i S1 og 1,3/2,2 g/kg i S2/S3.

Både essensielle og ikke-essensielle aminosyrer ble analysert, totalt 19 aminosyrer.

Syrehydrolyse av biomassen fører til at proteiner og peptider spaltes til aminosyrer. Totalinnholdet, dvs. summen av frie aminosyrer ble kvantifisert før og etter syrehydrolyse.

De frie aminosyrene som ble påvist og kvantifisert før syrehydrolyse er asparaginsyre, treonin, serin, glutaminsyre, glycin, alanin, valin, metionin, leucin, tyrosin, histidin og lysin base. I S1 er det ikke påvist fritt lysin, mens det i S2 og S3 er påvist henholdsvis 85,8 og 67,2 g/kg tørrvekt. Det er påvist store forskjeller mellom S1, S2 og S3 i totalmengde frie aminosyrer før syrehydrolyse, mengdene er henholdsvis 4-, 86- og 67 g/kg. Flere av de frie aminosyrene som er påvist i S1 er ikke påvist i S2 og S3.

Aminosyrer som ble kvantifisert etter syrehydrolyse er aspergin/asparagin, treonin, serin, glutaminsyre/glutamin, glycin, alanin, cystein, valin, metionin, isoleucin, leucin, tyrosin, fenylalanin, histidin, lysin base, arginin, prolin, og tryptofan. Totalmengden av aminosyrer etter syrehydrolyse er 603 g/kg tørrvekt i parti S1, 701 g/kg tørrvekt i parti S2 og 677 g/kg tørrvekt i S3. Aminosyrene glutamin, asparagin/arsperginsyre, leucin og alanin foreligger i størst mengde i alle partiene, fra 83 (glutamin) g/kg tørrvekt i S1 til 48(alanin) g/kg tørrvekt i S3. Mengde lysin i S1 var 37 g/kg tørrvekt, 127 - i S2 og 107 - i S3. For totalinnholdet av aminosyrer etter syrehydrolyse er det med unntak for lysin base ikke funnet større forskjeller enn ca. 30 % mellom de forskjellige partiene. For de fleste aminosyrene er forskjellene mindre enn 20 %.

Kvantifisering av biogene aminer

Det er analysert for agmatin, fenyletylamin, histamin, kadaverin, putrescin, spermidin, spermin og tyramin. Agmatin, fenyletylamin, histamin, spermin og tyramin er ikke påvist over påvisningsgrensene i noen av partiene. For kadaverin er det påvist ca. 400 % større mengde i S1 enn i S2 og S3.

Kvantifisering av nukleinsyrer

Mengde nukleinsyrer i PL73 *E. coli* (LYS) S1-biomasse er 0,2 g RNA/kg og 0,7 g DNA/kg.

Faggruppe 3 og Faggruppe 6 mener søker bør kommentere hvorfor denne biomassen har mye lavere mengde nukleinsyrer enn annen bakteriell biomasse.

Kvantifisering av vitaminer

Vitaminer som det er analysert for er tiamin, riboflavin, pyridoxin, α -tokoferol, folin, kobalamin (vitamin B12), vitamin C, total karoten, pantotensyre, biotin og vitamin K1. For enkelte vitaminer er det påvist relative store forskjeller mellom partiene. For eksempel er mengde karoten i S1 kvantifisert til 2,2 mg/kg, mens karoten er ikke påvist over påvisningsgrensen (< 0,1 mg/kg) i partiene S2 og S3. For niacin er det funnet ca. 300 % og 600 % større mengde i S2 og S3 enn i S1, og mengde tiamin i S1 er ca. 500 % større i S1 enn i S2 og S3.

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

Det er analysert for mineralene kalium, kalsium, magnesium og natrium, og for fosfat, klorid og sulfat. Spor- og toksiske metaller som er analysert er arsen, bly, jern, kadmium, kopper, krom, kvikksølv, nikkel og sink. Biomassen inneholder relativt store mengder sulfat (89 g/kg tørrvekt i S1). For enkelte mineraler er det påvist relative store forskjeller mellom partiene, for eksempel er mengde natrium i S3 ca. 250 % større enn i partiene S1 og S2. Sulfatmengden i S1 er ca. 200 % større enn i S2 og S3. Metallanalysene viser for enkelte metaller store forskjeller. Mengde jern i S2 og S3 er 1100 % og 500 % større enn i S1, tilsvarende for arsen er mengdene i S2 og S3 ca. 2800 % og 400 % større enn i S1. For de andre mineralene og metallene er det ikke påvist så store forskjeller mellom partiene. Ingen av de toksiske metallene overstiger maksimum grenseverdi som er fastsatt i EUs førdirektiv 2002/32/EF.

Kvantifisering av organiske syrer

Det er analysert for melkesyre, maursyre, eddiksyre, propionsyre, smørsyre, iso-smørsyre, valeriansyre og iso-valeriansyre. Det er kun påvist melkesyre og maursyre i S1 over påvisningsgrensene. I S2 og S3 er det ikke påvist organiske syrer over påvisningsgrensene.

Kvantifisering av stivelse og oligosakkarider

Biomassen inneholder ikke stivelse, men kan inneholde komplekse polysakkarider. Søker har i dokumentasjonen under sekkebetegnelsen "Stivelse" kvantifisert polysakkarider i biomassen. Mengde "stivelse" i biomassen er 7 g/kg tørrstoff. Det er analysert for flere oligosakkarider. De sakkaridene som er dokumentert i S1 er total sukker (17 g/kg tørrstoff), maltose (0,22 g/kg tørrstoff), isomaltose (0,22 g/kg tørrstoff) og andre oligosakkarider (<0,1 g/kg). I tillegg er det analysert for totalt reduserende sukkerarter (<1 g/kg).

I partiene S2 og S3 er det ikke påvist sukkerarter over påvisningsgrensene.

Kvantifisering av pesticider, dioksiner, polyklorerte bifenyler(PCB) og polyaromatiske hydrokarboner(PAH)

Pesticider, dioksiner, PCBer og PAH er kun analysert i parti S1.

Pesticider:

Organoklorpesticider som er analysert er:

Aldrin/dieldrin, toksafen (kamfeklor), klordan, alfa-klordan, gamma-klordan, DDT/DDE (alle former), endosulfaner (alfa, beta, endosulfan-sulfat), endrin, heptaklor, heksaklorsyκλοheksan (alfa-, beta- og gamma-), metoksyklor og TDA-p,p'. Organoklorpesticider er ikke påvist over påvisningsgrensene.

Organofosfatpesticider som er analysert er:

Klorfenvinfos, klorpyrifos (etyl- og metyl-), diazinon, diklorfos, fenitroton, malation, paration (etyl- og metyl-), metylpirimifos og sulfotep. Organofosforpesticider er ikke påvist over påvisningsgrensene.

Dioksiner:

Dioksiner som er analysert er:

2378 T4DD, 12378 P5CDD, 123678 H6CD, 123789 H6CDD, 1234678 H7CDD, 1234789 O8CDD, 2378 T4CDF, 12378 P5CDF, 23478 P5CDF, 123478 H6CDF, 123678 H6CDF, 123789 H6CD, 234678 H6CD, 1234678 H7CD, 1234789 H7CD, 12346789 O8CD.

Mengdene av de enkelte dioksinene oppgis til generelt å være <1 ng/kg "as is basis" i S1-biomasse. Totalinnholdet av dioksiner er av søker summert til 10 ng/kg biomasse, mens totalinnholdet av toksiske dioksinekvivalenter (TEQ) er av søker summert til 0,72 ng TEQ/kg biomasse.

Polyklorerte bifenyler(PCBer):

PCBer som er analysert er:

PCB-28, PCB-52, PCB-101, PCB-118, PCB-138, PCB-153 og PCB-180. Det er ikke påvist PCBer over påvisningsgrensen.

PAH:

PAH som er analysert er:

Naftalen, acenaften, fluoren, fenantren, antracen, fluoranten, pyren, benzo[a]antracen, krysen, benzo[b]fluoranten, perylen, benzo[k]fluoranten, benzo[a]pyren, dibenzo[a,h]antracen, benzo[g,h,i]pyrilen, inden[1,2,3-c,d]pyren, benzo[e]pyren, anantren og coronen.

For naftalen, fenantren og pyren er det påvist henholdsvis 1,0, 1,2 og 0,8 µg/kg biomasse. Andre polyaromatiske hydrokarboner er ikke påvist over påvisningsgrensene.

Kvantitativ og kvalitativ analyse av mikroorganismer i biomasse

Dyrkbare mikroorganismer

Søker har undersøkt for dyrkbare mikroorganismer i PL73 (LYS) S1-biomasse. Det er ikke påvist *Salmonella* bakterier i 50 gram biomasse. Det er påvist færre enn 10 bakterier per gram biomasse av henholdsvis koagulase positive stafylokokker, *Clostridium perfringens*, sulfitt-reduserende 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. Totalantall aerobe bakterier dyrket ved 30 °C var færre enn 100 per gram. Antall gjærsopper dyrket ved 25 °C var færre enn 100 per gram, mens Det er påvist 100 muggsopper per gram. Analysemetodene for påvisning av mikroorganismer er utført i henhold til AFNOR-normer (Association française de normalisation). Oppvekst av mikroorganismer er ikke målt for i partiene S2 og S3.

Veksthemming av mikroorganismer i biomassen under lagring.

Vekst av mikroorganismer er utført på S1-biomasse som er lagret ved 2-3 °C og 70 % fuktighet. Biomassen ble lagret i 23 måneder. Resultatene fra studien viste at antall aerobe mikroorganismer sank fra $1,1 \cdot 10^5$ til 20 cfu/g, mens antall anaerobe- og melkesyre bakterier sank fra ≈ 1000 til ca. 50. Antall gjærsopper, mugg, osmofile gjærsopper og - mugg sank til < 10 cfu/g. Måling av veksthemming av mikroorganismer er ikke utført for partiene S2 og S3.

Lagringsstabilitet av fôr som inneholder S1-biomasse.

Søker har utført undersøkelser av lagringsstabilitet av grisefôr som inneholder S1-biomasse. Griseføret ble lagret i henholdsvis 0, 3 og 6 måneder ved 20 °C og relative fuktighet på 60 %, samt ved 40 °C og relative fuktighet på 30 % og 60 %. Søker konkludert med at lagring av PL73 *E. coli* (LYS) S1-biomassen ved de angitte temperaturene, relative fuktigheter og tid ikke har ført til endringer av griseføret.

Undersøkelser av lagringsstabilitet av fôr til kyr som inneholder S1-biomasse er også utført. Kuføret ble lagret i 0, 3 og 6 måneder ved 20 °C og relative fuktighet på 60 %, samt ved 40 °C og relative fuktighet på 30 % og 60 %. Søker konkludert med at lagring av PL73 *E. coli* (LYS) biomassen ved de angitte temperaturene, relative fuktigheter og tid ikke har ført til endringer av kuføret.

Søker har utført undersøkelser av opptak av oksygen og frigivelse av flyktig komponenter fra biomassen. Undersøkelsene viser at biomassen tar opp oksygen, og at det ble dannet frie fettsyrer og CO₂. Det er ikke påvist lipidperoksydering, Maillard reaksjon eller økt vekst av mikroorganismer. Søker forklarer det økte oksygenopptaket i biomassen med at oksygenet blir tatt opp av mikroorganismer som ikke gror, og at dannelsen av frie fettsyrer peker også i den retningen.

3.3 Delkonklusjon

Ettersom fosfolipider og lipopolysakkarider er forventet å utgjøre en viktig bestanddel i slike biomasser, mener Faggruppe 3 og Faggruppe 6 at det bør foretas analyser av fosfolipider og lipopolysakkarider i PL73 *E. coli* (LYS) 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 dokumentasjon på at metodene er sertifiserte metoder. 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).

Faggruppe 3 og faggruppe 6 er uenig med Ajinomoto Eurolysine i at det ikke er mulig å foreta en komparativ vurdering av ernæringskomponenter mm med et konvensjonelt motstykke. *E. coli* K-12 stamme NVC578 kan genmodifiseres med to plasmider som ikke inneholder de gener og genelementer som trengs for økning av enzymaktiviteten i L-lysin biosynteseveien. Disse to plasmidene må med unntak av L-lysin biosynteseveien, ha samme genetisk bakgrunn som plasmidene pS183dT og pAKID14. Faggruppene mener at en full risikovurdering av biomassen likevel må utføres.

Faggruppe 3 og Faggruppe 6 konkluderer med at partiene S2 og S3 er lite egnet til bruk for sammenligning med parti S1 mht til komparativ analyser av kjemiske komponenter, fordi analysene viser til dels store forskjeller mellom biomassene i enkelte komponenter.

4. Dokumentasjon av næringsverdi, toksisitet og allergenisitet i dyreforsøk

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

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

4.1 Ernæringsmessig vurdering av biomassen for bruk som fôr i dyreforsøk

Fôringsforsøkene på dyr er utført med fôr fra parti S1-biomasse. Foruten analyse av viktige ernæringskomponenter er det også foretatt analyse av fordøyelighet med *in vitro* tester, samt analyse av fordøyelighet, fôrverdi og fôrytelse på ku, sau, gris og regnbueørret.

In vitro fordøyelighetstest

Animal Sciences Group, Wageningen, Nederland (Jansman et al 2003, rapport nr: 03/0028056) har utført *in vitro* fordøyelighetstest for Ajinomoto Eurolysine. Studien er ikke utført i henhold til noen retningslinjer, og er heller ikke utført i henhold til GLP. Testen er utført på S1-biomasse. Det er benyttet 6 forskjellige metoder: a) Fordøyelighet av organisk stoff (gassproduksjonsmetode); b) Løselig protein; c) Rumen escape protein (metode der biomassen inkuberes i 24-timer i nærvær av *Streptomyces griseus* proteaser); d) Løselig N-fraksjon (4 timers *in vitro* inkubasjon i rumen-væske); e) Udegradert fraksjon (4 timers *in vitro* inkubasjon i rumen-væske); f) Fordøyelighet av protein (Babinszky metode). Det blir konkludert med at biomassen har rimelig høy fordøyelighet av organisk stoff og protein. På grunnlag av *in vitro* testene er det satt opp en tabell over fôrverdien av PL73 *E. coli* (LYS) sammenlignet med fôrverdien til PT73 *E. coli* (THR), se tabell 2.

Tabell 2: *In vitro* digestibility and degradability of PT73 *E. coli* (THR) and PL73 *E. coli* (LYS) according to different methods.

Parameter (<i>in vitro</i>)	Unit	Applies for	PT73 <i>E. coli</i> (THR)	PL73 <i>E. coli</i> (LYS)
Organic matter digestibility ¹	%	Ruminants	81.2	77.3
Organic matter digestibility ²	%	Ruminants	84.2	75.0
Soluble protein ³	% of crude protein	Ruminants	27.9	28.3
Rumen escape protein ⁴	% of crude protein	Ruminants	33.9	34.5
<i>In vitro</i> soluble N-fraction ⁵	%	Ruminants	30	34
<i>In vitro</i> un-degraded fraction ⁵	%	Ruminants	67	64
Crude protein digestibility ⁶	%	Monogastrics	63.0	63.0

Reference:

1: Tilley and Terry method (rumen fluid incubation and subsequent incubation with enzymes).

2: Gas production technique.

3: Aufrère method (after 0h incubation in proteases from *Streptomyces griseus*)

4: Aufrère method (after 24h incubation in proteases from *Streptomyces griseus*)

5: Broderick method (4h *in vitro* incubation in rumen fluid). The rate of *in vitro* protein degradation (% per h) could not be calculated due to the small fraction that was degraded during the 4 h incubation.

6: According to the method of Babinszky

4.2 Toksisitet- og ernæringsstudier

Vedrørende dokumentasjon av toksisitet og allergenisitet i dyreforsøk har Faggruppene spilt inn kommentarer til EFSA-nett se kapittel 7.

Faggruppene har spilt inn på:

4.4 *Studies on target animals,*

og

5. *Considerations for human health of the product*

5.1 *Toxicology*

4.2.1 Rotter

Akutt oral eksponeringsstudie

TNO Nutrition and Animal Research, Zeist, Nederland (Prinsen 2002a, rapport nr: V4410/20) har utført for Ajinomoto Eurolysine akutt oral eksponeringsstudier på Wistar rotter (CrI:(WI)WU BR). Forsøket er utført i henhold til GLP. Studien er utført i henhold til retningslinjene fra OECD, retningslinje 423 og EC, direktiv 96/EC, Annex IV B: B.1 tris. Testsubstansen er PL73 *E. coli* (LYS) S1-biomasse. I studiene ble det benyttet 6 hunnrotter fordelt på 2 grupper, ca. 8 uker ved start av studien. Det var ingen kontroller. Biomassedosen var 2000 mg/kg kroppsvekt. Etter 14 dagers observasjonsperiode ble alle dyrene avlivet. Det er utført makropatologiske undersøkelser. Det er ikke påvist testrelaterte skader på dyrene. Siden alle dyrene overlevde forsøket ble oral LD₅₀ antatt å være større enn 2000 mg/kg kroppsvekt.

Akutt inhaleringsstudie

TNO Nutrition and Animal Research, Zeist, Nederland (Muijser 2003, rapport nr: V4401/09) har utført for Ajinomoto Eurolysine akutt inhaleringsstudie på Wistar rotter (CrI:(WI)WU BR). Studien er utført i henhold til OECDs retningslinje 403 og EC direktiv 92/69/EC, Annex IV B: B.2. Forsøket er utført i henhold til GLP. Testsubstansen er PL73 *E. coli* (LYS) S1-biomasse. I studiene ble det benyttet 5 hann- og 5 hunnrotter, alder var 12-13 uker ved start av studien. Det var ingen kontroller. Eksponeringen var gjennom nesene, og lufthastigheten var 114,9 l/min. Det nominelle biomassenivå var 29,1 g/m³, mens den reelle biomassedosen i luften var 5,26 ± 0,35 g/m³. Eksponeringstid var 4 timer. De kliniske tegnene som dyrene viste ved slutten av eksponeringsperioden var piloereksjon og langsomme bevegelser, samt at dyrene følte kalde. Etter 14 dagers observasjonsperiode ble alle dyrene avlivet. Det er utført makropatologiske undersøkelser. Det er ikke påvist testrelaterte skader på dyrene. Siden alle dyrene overlevde forsøket ble oral LC₅₀ antatt å være større enn 5,26 g/m³ luft.

Prenatal toksisitet

TNO Nutrition and Animal Research, Zeist, Nederland (Wolterbeek 2003, rapport nr: V4840) har utført for Ajinomoto Eurolysine fødingsforsøk med drektige Wistar (CrI:(WI)WU BR) hunnrotter. I studien ble det benyttet 3 grupper à 24-26 rotter/dose og en kontrollgruppe med 48 hunnrotter. Studien er utført i henhold til retningslinjene fra OECD, retningslinje 414, og EU, EC direktiv 87/302/EEC. Forsøket er utført i henhold til GLP. I føret var det innblandet henholdsvis 0, 3, 8 og 15 % (vekt/vekt) PL73 *E. coli* (LYS) S1-biomasse. Gjennomsnittlig inntak av biomassen for hver førgruppe var 0; 1,6-1,9; 4,1-5,1; og 7,6-9,8 g/kg kroppsvekt/dag. Eksponeringstid for biomassen var fra fertilisering til det ble utført keisersnitt. Kroppsvekt og førinntak er målt på alle dyrene ved dag 0, 3, 7, 10, 14, 17 og 21 etter fertilisering. Det er utført kliniske undersøkelser, undersøkelser av organvekter (drektige og tom livmor, ovarier), netto kroppsvekt, skrottevekt, undersøkelser av kullrespons (fruktbarhets-indeks, antall gule legemer (*corporea lutea*), antall implanteringssteder, antall levende og døde fostre, fostervekt, pre- og post implanteringsstap, resorpsjon, forholdet mellom hann og hunn fostre), og undersøkelser av

fostrene. Statistiske analyser ble utført ved bruk av flere forskjellige statistiske metoder, som Fisher eksakt sannsynlighetstest, ANOVA, m.m. Det er funnet statistiske signifikante forskjeller mht kroppsvekt for de rottene som ble føret med 15 % innblanding av biomasse. Vektendringen ble funnet ved dagene 0-3 og 10-14. Søker konkluderte med at ikke var noen observerte endringer på reproduksjonsparametere, makroskopiske endringer på mødrene, vekten av fostrene, antall fostre, ytre og indre tegn på skade hos fostrene.

Subkronisk toksisitetsstudie

TNO Nutrition and Animal Research, Zeist, Nederland (Appel 2003, rapport nr: V4619/03) har utført for Ajinomoto Eurolysine et 13 ukers fødingsforsøk på hann- og hunnrotter, 3 grupper à 10 rotter/kjønn samt en kontrollgruppe med 20 rotter/kjønn. Studien er utført i henhold til OECDs retningslinje 408 og EUs direktiv 2001/59/EC, B.26 (87/302/EEC). Forsøket er utført i henhold til GLP. I føret var det innblandet henholdsvis 0, 3, 8 og 15 % (vekt/vekt) PL73 *E. coli* (LYS) S1-biomasse. Gjennomsnittlig inntak av biomasse i hver førgruppe for henholdsvis hannedyr og hundedyr var 1,4; 3,8; 7,5 og 1,5; 4,1; 7,7 g/kg kroppsvekt/dag. Kroppsvekt og førinntak ble målt på alle dyrene en gang i uken. Det er utført detaljert kliniske undersøkelser, måling av førinntak, makroskopiske og mikroskopiske undersøkelser av utvalgte organer (nyre, lever, livmor, binyrer) og klinisk patologisk undersøkelser av urin og blod fra 10 dyr i hver gruppe. Det er funnet statistisk signifikante forskjeller i enkelte parametere for lav, midt- og høyinntaksgruppen. Forskjellene relaterer seg til flere parametre bl.a. økt levervekt, økt bilirubin nivå i serum og redusert gjennomsnittlig mengde hemoglobin i blod (MCH), høyere førinntak, økt vanninntak, nedsatt trombocytall, økt mengde alkalisk fosfatase, økte relative organvekter av nyre, lever, livmor og binyrer, lavere plasma kolesterolnivå, økt bilirubinnivå, samt lavere fosfolipidnivå mm. Disse forskjellene forklares med at standardføret har større mengde kasein, soyaolje og stivelse, og at slike endringer er funnet i fø som er basert på lavt nivå av cerealier. Den økende mengde biomasse i føret forklarer også noe av forskjellene. Søker konkludert med at det ikke er påvist vesentlige endringer i de andre undersøkte parametrene, og at inntak av den høyeste førmengden ikke fører til helseskadelige effekter på dyrene.

Kommentarer fra Faggruppe 3 og Faggruppe 6:

Faggruppene mener at føreseptene ikke er optimale da næringsinnholdet er forskjellig i forsøks- og standardfø.

I den prenatal toksisitetsstudien er det påvist lavere kroppsvekt for mødre ved 15 % innblanding av biomasse. I den subkroniske toksisitetsstudien på rotter ble det påvist svært mange kliniske endringer, økt levervekt og bilirubinnivå i serum fra laveste dose på 3 % og økende innblanding av biomasse i føret. Noen av de påviste effektene var generelt doseavhengige, og noen av effektene var statistisk signifikant forskjellige ved innblanding med 3 %, 8 % og 15 % biomasse.

Faggruppene mener at søker bør undersøke lymfatisk vev – spesielt i tarm, immunglobuliner og immunrespons.

Faggruppene finner at for rotter er det laveste observerte skadelige effektnivå (LOAEL) 3 % biomasse i forsøksføret.

Faggruppene finner at en del påviste effekter ikke er tatt med i søkers vurdering.

Delkonklusjon:

Faggruppe 3 og Faggruppe 6 mener at føreseptene ikke er tilstrekkelig sammelignbare, og påpeker at en forutsetter at søker utfører fødingsforsøkene med standardfø som har samme nærings sammensetning som forsøksføret. Faggruppene konkluderer med at toksisitetsstudiene på rotter er velkrevne studier med haltende studiedesign.

4.2.2 Gris

Fødingsforsøk

Animal Sciences Group, Wageningen, Nederland (Jansman & van Diepen 2004b, rapport nr: 04/0003190) har utført for Ajinomoto Eurolysine fødingsforsøk på gris, type (GY x Pietrain) x Dalland. Studien er ikke utført i henhold til noen retningslinjer, og er heller ikke utført i henhold til

GLP. Kontroll og testgruppene bestod av hanner og hunner, 4 grupper á 4 dyr/kjønndose. Ved start av fôringsperioden veide grisene 32 kg, og fôringsperioden ble avsluttet når grisene veide 105 kg. Hver gruppe ble fôret med vekstfôr i 6 uker og slutfôr i minst 4 uker. Soyamelfraksjonen i standardfôret ble erstattet av null; 5; 10; 15 og 20 % PL73 *E. coli* (LYS) S1-biomasse. Ved innblanding av 20 % biomassen i forsøksfôret var ca. 65 % av den totale proteinmengden i standardfôret erstattet med bakterieprotein. Det ble utført undersøkelser av kroppsvekt, fôrinntak, vanninntak, avføringskonsistens og klinisk blodkjemi, post mortem undersøkelser av vekt av lever, milt og tom magesekk, makroskopiske undersøkelser av nyrer, lever, milt, magesekkenes pars oesophagea og fundus. Det er også tatt vevsprøver for histologi fra nyrer, lever, milt og magesekk. Sammenlignet med kontrollene viste fôring med biomassen bløtere avføring for alle forsøksfôrene, utover dette ble det ikke påvist andre endringer ved 5 % tilsetning av biomasse til fôret. Større mengde innblanding av biomasse, dvs. 10 %, 15 % og 20 %, førte til redusert fôrinntak og som resultat lavere kroppsvekt enn kontroll. Det er påvist økt vanninntak i forsøksfôrgruppene som ble fôret med 10 til 20 % biomasse. Årsakene til det økte vanninntaket ble forklart med økt proteinnivå og følgelig økt ureasynthese, høyt inntak av natrium, kalium og spesielt økt sulfatmengde. Klinisk blodkjemi var normal, med unntak av et statistisk signifikant høyere nivå av bilirubin i forsøksfôringsgruppene 10 % og 15 %. Søker hevder at fordi det ikke er en klar dose-respons betraktes denne økningen ikke å ha noen toksikologisk relevans. Organvektene var normale med unntak av at ved fôring med 20 % var levervekten statistisk signifikant forøket.

Fordøyelighetstest

Animal Sciences Group, Wageningen, Nederland (Jansman & van Diepen 2004c, rapport nr. 04/0001625) har utført for Ajinomoto Eurolysine fôringsforsøk på hanngris. Studien er utført i henhold til de nederlandske retningslinjene Dutch CVB protocol (CVB 1996). Studien er ikke utført i henhold til GLP. To testgrupper (A og B) bestod av 9 dyr/gruppe. Det ble ikke benyttet kontrolldyr. Dyrene ble fôret fra startvekt på 28 - 30 kg. Gruppe A ble kanulert ved terminal ileum for å studere ileal fordøyelighet. Gruppe B ble undersøkt for fekal fordøyelighet. Standardfôret bestod av soyamel, hvete, bygg, tapioka, vitaminblanding, soyaolje og 0,25 g kromoksid/kg standardfôr. Forsøksfôret bestod av 15 % S1-biomasse og 85 % standardfôr. Fôringsforsøkene varte i 8 uker. Fôret i terminal ileum og avføring ble undersøkt for tørrstoff, aske, organisk stoff, protein, fett, aminosyrer, energi, sulfat og fosfat. Fordøyelighet i ileum av aminosyrene cystein, alanin og glycin var lav, mens for metionin, arginin og glutamin/glutaminsyre var den høy. Søker konkluderte med at ileal og fekal fordøyelighet var høy sammenlignet med standardfôret, og at biomassen er en egnet proteinkilde for gris.

Innvirkning av fôret på vekst, fôrfordøyelighet, sykdom og mortalitet

Animal Sciences Group, Wageningen, Nederland (Jansman & van Diepen 2004d, rapport nr. 04/0005732) har utført for Ajinomoto Eurolysine fôringsforsøk på gris, type (GY x pie) x (GY x Pie). Studien er utført i henhold til de nederlandske retningslinjene Dutch CVB protocol (CVB 1996 og 2002), men ikke utført i henhold til GLP. Kontroll- og testgruppene bestod av hanner og hunner, 8 grupper á 32 dyr/dose, totalt 128 hann- og 128 hunndyr. Dyrene ble fôret fra startvekt på 30 kg til 103 kg ved avslutning av forsøket, totalt ca. 14 uker. Fra begynnelsen av fôringsperiode og i seks uker ble dyrene fôret med vekstfôr. Deretter ble dyrene fôret med slutfôr til dyrene nådde vekten på 103 kg. Vekststandardfôret bestod av soyamel, hvete, bygg, mais, tapioka, erter, mineraler og vitaminblanding, mens sluttstandardfôret ikke inneholder erter. Erter ble erstattet med større mengde tapioka. Forsøksfôrene bestod av 60-, 90- og 120 gram S1-biomasse blandet med henholdsvis 940 -, 910 - og 880 gram standardfôr, dvs. forsøksfôrene inneholder 6 %, 9 % og 12 % biomasse. I forsøksfôret ble soyamel og erter erstattet med S1-biomasse. Forsøksfôrene inneholdt ca. 10 % mere hvete enn standardfôrene. Innholdet av biomasse i forsøksfôrene var basert på biomassens fordøyelighet av aminosyrer i ileum, se Fordøyelighetstest. NaHCO₃ og K₂CO₃ ble tilsatt forsøksfôret for å justere elektrolytter.

Det er utført undersøkelser av kroppsvekt, fôrinntak, fôrkonvertingsratio, slaktevekt, skrottevekt, kjøttprosent av skrotten, ryggfett og muskelytkkelse. Helsetilstanden til dyrene var generelt god, med

unntak av at 9 griser fikk lammelse i bena. Grisene ble behandlet med antibiotika, hvorav 2 ikke responderte på behandlingen. De ble derfor fjernet fra fôringsforsøket.

Sammenlignet med kontrollene viste fôring med biomassen ingen endringer ved 6 % tilsetning av biomasse til fôret. Større mengde biomasse, dvs. 9 % og 12 %, førte til noe redusert fôrinntak, lavere kroppsvekt, høyere fôrkonverteringsratio og signifikant økt skrottevekt, ca. 2 % høyere enn kontroll.

Søker konkluderte med at et tilskudd av biomasse på opp til 6 % ikke vil påvirke fôrinntak, kroppsvekt eller fôrkonverteringsratio.

Organoleptisk undersøkelse

Kjøtt

Kjøtt fra grisene som ble benyttet i forsøket *Innvirkning av fôret på vekst, fôrfordøyelighet, sykdom og mortalitet*, ble benyttet til organo-leptisk undersøkelser (Veldman & Schelvis-Smit 2004, rapport nr: C017/04). De organo-leptiske undersøkelsene er ikke utført i henhold til noen retningslinjer, og er heller ikke i henhold til GLP. Kjøttprøver fra muskelen *M. Longissimus lumborum* ble tatt fra 7 tilfeldig utvalgte griser. Kjøttprøvene som var 2 cm tykke ble stekt ”well done” ved 180 °C. Testpanelts vurderingskriterier er i henhold til ISO standard 6564 (1985, Sensory analysis, Methodology flavour profile methods). Prøvene ble evaluert for 23 sensoriske egenskaper. Det er undersøkt på utseende, lukt, struktur, smak og ettersmak. Det er ikke påvist noen signifikante forskjeller mellom kontroll- og testgris. Kjøtt fra gris som ble fôret med 12 % biomasse ble karakterisert som mindre seigt enn kjøtt fra kontrollgris.

Kommentarer fra Faggruppe 3 og Faggruppe 6:

Faggruppene påpeker at sammenlignet med kontrollene viste fôring med biomassen bløtere avføring for alle forsøksfôrene, utover dette ble det ikke påvist andre endringer ved 5 % tilsetning av biomasse til fôret. Større mengde biomasse, dvs. 10 %, 15 % og 20 %, førte til redusert fôrinntak og som resultat lavere kroppsvekt enn kontroll. Det er påvist økt vanninntak i fôrgruppene 10 % til 20 %. Bilirubin i serum var økt ved 10 % og over. I studien *Innvirkning av fôret på vekst, fôrfordøyelighet, sykdom og mortalitet* førte innblanding av biomasse på 9 % og 12 % til noe redusert fôrinntak, lavere kroppsvekt, høyere fôrkonverteringsratio og signifikant økt skrottevekt, ca. 2 % høyere enn kontroll.

Faggruppene mener at avhengig av hvordan bløt avføring skal vurderes, så er LOAEL (det laveste observerte nivå for skadelige effekter) på 5 %, som er det laveste nivået der det er påvist bløt avføring. Alternativt har man en NOAEL (nivået der ingen skadelige effekter er observert) på 6 %, som er det laveste nivået der det ikke ble påvist redusert fôrinntak, lavere kroppsvekt, høyere fôrkonverteringsratio og signifikant økt skrottevekt.

4.2.3 Kanin

Test for hudirritasjon

TNO Nutrition and Animal Research, Zeist, Nederland (Prinsen 2002a, rapport nr: V4411/08) har utført for Ajinomoto Eurolysine hudirritasjonstest på kaniner, New Zealand white albino. Studien er utført i henhold til retningslinjene fra OECDs retningslinje 404 og EC direktiv 92/69/EC, Annex IV B: B.4. Forsøket er utført i henhold til GLP. Testsubstansen er PL73 *E. coli* (LYS) S1-biomasse. I studiene ble det benyttet 3 hanner, ca. 9 uker ved start av studien. Det var ingen kontroller. Eksponeringen var på klippet flanke. Biomassedosen var 0,5 g og eksponeringstid var 4 timer. Huden ble undersøkt etter 1, 24, 48 og 72 timer. Det er ikke påvist testrelaterte endringer på huden. Søker konkluderer med at i henhold til EUs-direktiv og OECDs retningslinje, irriterer PL73 *E. coli* (LYS) biomasse ikke hud.

Test for øyeirritasjon

TNO Nutrition and Animal Research, Zeist, Nederland (Prinsen 2002b, rapport nr: V4415/15) har utført for Ajinomoto Eurolysine test for irritasjon på øye på 3 kaniner, New Zealand white albino. Studien er utført i henhold til OECDs retningslinje 405 og EC direktiv 92/69/EC, Annex IV B: B.5. Forsøket er utført i henhold til GLP. Testsubstansen er PL73 *E. coli* (LYS) S1-biomasse. I studiene ble det benyttet 3 hanner, ca. 9 uker ved start av studien. Det var ingen kontroller. Kaninene ble eksponert

på et øye, og påsatte dose var 0,1 ml, som inneholder ca 0,075 g biomasse. Øyet ble undersøkt etter 1, 24, 48 og 72 timer. Det er påvist noen endringer som rødhet m.m. Etter 72 timer ble det ikke påvist testrelaterte endringer på øyet. Søker konkluderer med at i henhold til EUs-direktiv og OECDs retningslinje, irriterer PL73 *E. coli* (LYS) biomasse ikke øye.

Hudsensibilisering

På grunn av at PL73 *E. coli* (LYS) biomasse inneholder store mengder protein antar Ajinomoto Eurolysine at biomassen er en potensiell kilde for hudsensibilisering. På dette grunnlaget mener Ajinomoto Eurolysine at det ikke er nødvendig å utføre sensibiliseringsstudie på kanin.

4.2.4 Ku

Fôringsforsøk a)

Animal Sciences Group, Wageningen, Nederland (Van Vuuren et al 2004a, rapport nr. 04/0007858) har utført for Ajinomoto Eurolysine fôringsforsøk på 2-6 års gamle melkekyr, type Holstein-Frieser. Paritet er fra første til fjerde kalv. Melkeperioden er fra 93 til 241 dager. Undersøkelsen er ikke utført i henhold til noen retningslinjer, og er heller ikke utført i henhold til GLP. Testgruppene bestod av 10 grupper á 2 dyr. Hver gruppe fikk tre forskjellige fôringsjoner i tre påfølgende eksperimentperioder. Hver eksperimentperiode varte i 4 uker. Standardfôret bestod av gras- og maisensilasje, tørket sukkerbetemasse og soyamel. Dyrene fikk forsøksfôr som bestod av standardfôr tilsatt henholdsvis 0; 5,2; 11; 16 og 21 % PL73 *E. coli* (LYS) S1-biomasse på tørrstoffbasis. I forsøksfôret erstattet biomassen standardfôrets forholdmessige mengder av soyamel og sukkerbetemasse. Sammenlignet med kontroll eksperimentene viste fôring med biomassen ingen negative effekter ved tilsetning opptil 11 %. Større mengde, dvs. 16 % - og 21 % biomasse, førte til redusert fôrintak, redusert melkeproduksjon (kun 21 % biomasse), redusert laktosekonsentrasjon og økt ureakonsentrasjon i melk. Lavere innblanding av biomasse (11 % og lavere), førte til signifikant økt melkeproduksjon, økt proteinmengde, økt fett og urea i melk.

Faggruppene mener at studien ikke er tilstrekkelig for vurdering av dyrehelse. Det er påvist økt ureakonsentrasjon i melk på alle nivå. Det er ikke undersøkt for klinisk kjemi, hematologi, patologi, immunologi.

Fôringsforsøk b) Innvirkning på vekst, fôrfordøyelighet, sykdom og mortalitet

Animal Sciences Group, Wageningen, Nederland (Van Vuuren et al 2004c, rapport nr. 04/I01245) har utført for Ajinomoto Eurolysine fôringsforsøk på melkekyr, alder 2 til 9-10 år. Studien er utført i henhold til nederlandsk retningslinje Dutch CVB protocol (CVB 2002). Studien er ikke utført i henhold til GLP. Testgruppen bestod av 24 dyr fordelt på 12 par. Hver gruppe fikk tre forskjellige fôringsjoner i tre påfølgende eksperimentperioder. Hver eksperimentperiode vart i 5 uker. Standardfôret bestod av gras- og fôrmaisensilasje, samt et konsentrat som bestod av sukkerbete, soyamel, mineral & vitaminmiks m.m. Dyrene fikk forsøksfôr som bestod av standardfôr blandet med henholdsvis 0; 3,4; 7,3 og 10,7 % PL73 *E. coli* (LYS) biomasse på tørrstoffbasis. I forsøksfôret erstattet biomassen standardfôrets forholdmessige mengder av konsentrat.

I blod ble det undersøkt for protein, fett, laktose, urea, natrium, kalium, kalsium fosfat, magnesium, protrombintid, alkalisk fosfatase, total protein, albumin, kolesterol, fosfolipider, uorganisk fosfat, hematokrit, hemoglobin og blodceller. I melk ble det undersøkt for sink. Fire kyr hadde helseproblemer i løpet av eksperimentperioden, slik som selvpåført skade, jur- og klauvbetennelse. Søker konkluderte med at disse helseproblemene ikke hadde noen årsakssammenheng med PL73 *E. coli* (LYS) S1-biomasse i fôret. Størst mengde S1-biomasse per kg tørrvekt førte til et lavere tørrstoffinntak. Et tilskudd opptil 7,3 % S1-biomasse førte ikke til statistisk signifikante endringer i produksjon av melk. Det er heller ikke påvist endringer i konsentrasjonen av melkefett, melkeprotein, K, Mg, Na, P og Zn i melken. Konsentrasjon av laktose og Ca i melk sank noe ved økende mengde biomasse, men reduksjon i mengdene var kun statistisk signifikant ved tilskudd på 7,3 og 10,7 % S1-biomasse. Urea i melk økte med økende tilskudd av S1-biomasse. Søker konkluderer med at et

tilskudd opptil 7,3 % PL73 *E. coli* (LYS) S1-biomasse ikke påvirker inntaket av tørrstoff, produksjon av melk, innholdsstoffer i melk og dyrehelse.

Faggruppene mener at studien ikke er tilstrekkelig for vurdering av dyrehelse. Det er påvist økt ureamengden i melk på alle nivå. Det ikke er undersøkt for patologi og immunologi.

Organoleptisk undersøkelse

Melk

Melkeprøver fra forsøket utført av van Vuuren et al (2004a) (rapport nr: 04/0007858) ble bruk til organoleptisk undersøkelser (Burgering et al 2002, rapport nr: 2002/195). Undersøkelsen er ikke utført i henhold til noen retningslinjer, og er heller ikke utført i henhold til GLP. Melken ble homogenisert og pasteurisert. Testpanelet kunne ikke påvise store endringen i organoleptiske parametre, og melk fra kyr føret med biomasse ble vurdert som god.

4.2.5 Regnbueørret

Fordøyelighetstest

Fish Nutrition Laboratory INRA/IFREMER, St Pée sur Nivelles, Frankrike, (Kaushik 2003) har utført for Ajinomoto Eurolysine fôringsforsøk på regnbueørret (*Oncorhynchus mykiss*), vekt ca 100 g ved start av forsøket. Studien er ikke utført i henhold til noen retningslinjer, og heller ikke i henhold til GLP. Tre kontrollgrupper á 15 fisk fikk standardfôr og tre testgrupper á 15 fisk fikk forsøksfôr. Standardfôret bestod av fiskemel CP 70 (60 %), gelatinisert hvetestivelse (24 %), fiskeolje (12 %), bindemiddel (1 %), mineraler (1 %), vitaminblanding (1 %) og kromoksid (1 %). Forsøksfôret bestod av 30 % (vekt/vekt) S1-biomasse og 70 % standardfôr. Fôringsforsøkene varte i 21 dager, den første uken var tilpassningsperiode, de to siste ukene var testperiode. Avføringsprøver ble tatt en gang per uke. Avføringen er undersøkt for kromoksid, protein, fett, aske, fosfat, tørrstoff, organisk stoff, aminosyrer (tilgjengelighet for essensielle og ikke-essensielle) og energi. Søker konkluderte med at fordøyeligheten var høy, men lavere enn for fiskemel. Opptak av aminosyrer var høy, men lavere enn for fiskemel. Tilgjengelighet av essensielle aminosyrer var for metionin ca. 45 %, metionin + cystein 56 %, arginin 90 % og histidin 95 %. Søker konkluderte med at biomassen kan benyttes i fiskefôr.

Innvirkning på vekst, fôrfordøyelighet, sykdom og mortalitet

Fish Nutrition Laboratory INRA/IFREMER, St Pée sur Nivelles, Frankrike, (Kaushik 2003) har utført for Ajinomoto Eurolysine fôringsforsøk på regnbueørret (*Oncorhynchus mykiss*). Vekten til ørreten var ved start av forsøket ca 100 g. Studien er ikke utført i henhold til noen retningslinjer, og er heller ikke i henhold til GLP. Tre kontrollgrupper á 40 fisk fikk standardfôr og 12 testgrupper á 40 fisk fikk forsøksfôr. Standardfôret bestod av fiskemel CP 70 (65,2 %), gelatinisert hvetestivelse (21,5 %), fiskeolje (10,3 %), bindemiddel (1 %), mineraler (1 %), vitaminblanding (1 %) og kromoksid (1 %). Forsøksfôret bestod av 10 -; 20 -; 40 - og 60 % (vekt/vekt) S1-biomasse og tilpasset mengde standardfôr. Hver forsøksfôrgruppe bestod av 3 grupper á 40 fisk. Fôringsforsøkene varte i 12 uker, den første uken var tilpassningsperiode, de siste ukene var testperiode. Det er undersøkt for fôrinntak, kroppsvekt, spesifikk veksthastighet, daglig vekstkoefisient, fôreffektivitet, protein-effektivitetsratio, innvolls-kroppsvektindeks, lever-kroppsvektindeks, sløyd-kroppsvektindeks, blodplasma-komponentene total ammonium-N, urea-N og konsentrasjon av urinsyre, pH i muskel, rigor mortis-indeks, tørrstoff, aske, protein, energi og fett fra helkroppsanalyser. Søker konkluderte med at overlevelse var høy (> 90 %) og Det er ikke påvist synlige patologiske endringer. Det er påvist statistiske signifikante forskjeller som redusert fôrinntak, redusert vekst, redusert bevaring av protein og energi ved 60 % biomassen i forsøksfôret. Det er ikke påvist endringer i kroppsvekt ved lavere innblanding av S1-biomasse. Det er ikke påvist endringer i innvolls-kroppsvektindeks, lever-kroppsvektindeks, og sløyd-helkroppsvektindeks. Plasma ammonium-N sank med økende mengde biomasse, men det var ingen indikasjoner på at nukleinsyreinnholdet i biomassen hadde effekter på plasmaurea- og urinsyremengden. Det er påvist redusert fôrutnyttelse og proteinutnyttelse ved 20, 40 og 60 %, samt senere rigor mortis ved 10 %, 20 % - og 40 % biomasse. Søker har ikke målt rigor mortis ved 60 % biomasse. Senere rigor mortis vises generelt ved fôring med *E. coli*-biomasse i fôr.

Søker konkluderte med at et tilskudd av biomassen opptil 20 % kan benyttes i fiskefôr.

Kommentarer fra Faggruppe 3 og Faggruppe 6:

Bakteriebiomassen er testet på regnbueørret for å identifisere egnethet som proteinkilde og erstatter for fiskemel. Designet på forsøkene er gjort i henhold til vektutbytting av bakteriebiomasse med fiskemel. Det er ikke forsøkt å balansere førene ernæringsmessig, dvs. forsøksfôret har en annen protein, lipid og mikronæringsstoffsammensetning enn standardfôret. Ingen av mikronæringsstoffene er balansert med unntak av bruk av standardtilsetninger, dvs. standardfôr og bakteriebiomassefôr er ikke "compositional equivalent". Med bakgrunn i dette kan man ikke konkludere på om det er biomassen eller den ernæringsmessige sammensetningen som har ført til de endringer som er funnet. Standard helseparametre, som hematologi og lekkasje av organspesifikke enzymer er ikke fortatt, og man kan dermed ikke konkludere om fiskens helse var god, med unntak av de effektene som var målt på appetitt.

Ingen målinger av immunrespons er foretatt, jfr. Risikoevaluering av bioprotein (VKM (2006) tidligere foretatt av VKM. Denne delen må derfor ansees som mangelfull.

4.2.6 Sau

Fordøyelighetstest

Animal Sciences Group, Wageningen, Nederland (van Vuuren *et al*, 2004b, Rapport nr: 04/0000759) har utført for Ajinomoto Eurolysine fôringsforsøk på vær, alder 2 til 10 år. Kroppsvekt ved forsøksstart var 70 – 100 kg. Studien er utført i henhold til nederlandsk retningslinje Dutch CVB protocol (CVB 1996). Studien er ikke utført i henhold til GLP. En kontrollgruppe på 6 dyr ble føret med 900 g standardfôr/dag, og testgruppen på 6 dyr ble føret med 1000 g forsøksfôr/dag. Standardfôret bestod av høy, sukkerroemasse, molasse og vitaminblanding. Forsøksfôret bestod av 25 % (vekt/vekt) S1-biomasse og 75 % standardfôr. Fôringsforsøkene varte i 2x7 dager, første 7 dagene var fôrinntaksperiode, de siste 7 dagene var fekal undersøkelsesperiode. To værere nektet å spise forsøksfôret de første 7 dagene, og ble derfor fjernet fra gruppen. Det er utført undersøkelser av organisk reststoff, protein, fett, fiber, og N-fritt ekstrakt i avføringen. Søker konkluderte med at fekal fordøyelighet var høy sammenlignet med standardfôret, og at biomassen er en egnet proteinkilde for sau.

4.3 Tester for gentoksisitet og mutagenitet

Ames test:

TNO Nutrition and Animal Research, Zeist, Nederland (Krul 2002, rapport nr: V4405/19) 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 i henhold til GLP og i henhold til retningslinjene fra OECD, retningslinje 471. For metabolsk aktivering er det benyttet Aroclor 1254-induserte rottelever-homogenater 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. Konsentrasjonen av biomasse i skålene er 62 – 5000 µg/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-aminoantracen (TA 1535, TA 98, TA 100 og WP 2 *uvrA*), benzo(a)pyren (TA 1537) med S9-miks.

Det er ikke påvist noen cytotoxissitet (± S9-miks) ved mengder opptil 5000 µg/ml. Det er heller ikke påvist frame-shift mutasjon eller baseparsubstitusjon. Søker konkluderte med at PL73 *E. coli* (LYS) biomasse ikke er mutagen i Amestest.

Test for kromosomale abersasjoner (avvik) i pattedyrceller:

TNO Nutrition and Animal Research, Zeist, Nederland (De Vogel 2002, rapport nr: V4402/12) har utført for Ajinomoto Eurolysine test på kromosomabersasjon på cellelinje CHO K-1 (Chinese hamster ovary cells). Studien er utført 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 kulturmedium uten serum i ca. 24 timer, etterfulgt av sentrifugering, sterilfiltrering og fortynning i kulturmedium. Konsentrasjonen av biomasse i skålene er (\pm S9-miks) 10 – 5000 $\mu\text{g/ml}$ i første forsøk, og 500 – 5000 $\mu\text{g/ml}$ 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.

Test for genmutasjon i pattedyrceller:

TNO Nutrition and Animal Research, Zeist, Nederland (Steenwinkel 2002, rapport nr: V4403/07) har utført for Ajinomoto Eurolysine test for mutasjoner i cellelinjen muslymfom L5178A. Studien er utført 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 kulturmedium uten serum i ca. 24 timer, etterfulgt av sentrifugering, sterilfiltrering og fortynning i kulturmedium. Konsentrasjonen av biomasse i skålene er \pm S9-miks 312 – 5000 $\mu\text{g/ml}$. 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.

Kommentarer fra Faggruppe 3 og Faggruppe 6:

Til testene er det benyttet saltvann eller kulturmedium uten serum. Faggruppe 3 og Faggruppe 6 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 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. Behandling av den genmodifiserte *E. coli* K-12 stamme N°10S med svovelsyre (pH < 4,5) kan gi nedbrytningsprodukter som er vanskelig å karakterisere.

4.4 Generelle kommentarer til undersøkelser av toksisitets- og fordøyelsesstudier

Ettersom det ikke er utført toksisitets- og ernæringsstudier med konvensjonelt motstykke, råder det usikkerhet om de påvist skadelige effektene på dyrene relaterer seg til genmodifikasjonen eller til egenskaper til biomassen.

Fosfolipider og lipopolysakkarider er viktige komponenter i slike biomasser. Mengdene av disse komponentene skulle ha vært målt i PL73 *E. coli* (LYS) biomasse. Økt inntak av bakterielle fosfolipider og fosfatidyletanolamin kan være av klinisk viktighet. Fosfatidyletanolamin omdannes til homocystein, og høyt nivå av homocystein kan gi effekt i vaskulært endotel. Det er antatt at homocystein kan være involvert i de mekanismene som fører til vaskulære sykdommer, jfr. Risikoevaluering av bioprotein (VKM (2006), samt at lipopolysakkarider i gram-negative bakterier er vist å føre til ugunstig høy stimulering av immunsystemet i gastrointestinale systemet (VKM (2006), Raetz & Whitefield (2002)).

Et relativt høyt nivå av nukleinsyrer er forventet i biomasser. Det er uløste spørsmål om hvilke effekter et høyt inntak av nukleinsyrer har på f.eks immunsystemet. Et uventet lavt nivå (0,2 g RNA/kg og 0,7 g DNA/kg) er målt i PL73 *E. coli* (LYS) biomasse.

Faggruppe 3 og Faggruppe 6 mener at undersøkelser av lymphoid vev, særlig slikt vev i tarmen samt immunrespons skulle ha vært målt. Forprodukter fra encellede organismer fører til økt størrelse og histopatologiske effekter på mesenteriske lymfeknuter, men også andre påviste effekter på immunresponsen er antatt å kunne være helseskadelig.

Faggruppe 3 og Faggruppe 6 mener at søker ofte betrakter påviste effekter på dyr som resultat av forskjeller i ernæringsinnhold mellom biomassefôret og standardfôret. Dersom dette er tilfelle må det bevises. Fôrdesignet skulle ha vært slik at biomassefôret og standardfôret er sammenlignbare mht ernæringsstoffer

I den subkroniske toksisitetsstudien på rotter ble det påvist økt levervekt, økt bilirubinnivå samt en rekke andre effekter. Noen av disse effektene var generelt doseavhengige, og noen av de antatte skadelige effektene var statistisk signifikant forskjellige ved innblanding med 8 % og 15 % biomasse. For eksempel viste prenatalstudien lavere vekt for mødrene ved innblanding med 15 % biomasse. Generelt sett skulle undersøkelser av lymfatisk vev, særlig vev som er relatert til tarm, og immunrespons vært inkludert i rottestudiene.

Studiene på kyr viste doseavhengig økning av mengde urea i melk fra laveste dosenivå på 5 % PL 73 *E. coli* (LYS) biomasse, samt redusert fôrinntak, redusert laktose- og kalsiumnivå i melk.

Fôringsstudien på gris viste lav konsistens på avføring ved alle innblandinger av biomasse i fôret. Det er også påvist redusert vektøkning, økt vanninntak og økt levervekt ved mer enn 10 % innblanding av biomasse.

Fôringsstudiene på regnbueørret viste forsinket rigor mortis ved dosenivåene 10 %, 20 % og 40 %, samt redusert bevaring av protein og energi ved mer enn 10 % innblanding av biomasse i fôret.

Faggruppe 3 og Faggruppe 6 påpeker at uttrekksmediene som benyttes i tester for gentoksisitet og mutagenisitet trekker hovedsakelig ut polare komponenter. Faggruppene mener at det også bør utføres tester på uttrekk fra testsubstanser der det er benyttet upolart uttrekksmedium.

4.5 Allergenisitet

I henhold til EFSA's retningslinjer kapittel C.6.8 er vurdering av allergenisitet angående dyrehelse, et tema som det ikke er behov for å rette spesiell oppmerksomhet til.

Det er imidlertid foretatt en vurdering av allergenisitet/risiko for sensibilisering av arbeidere. Mat/fôr, inkludert PL73 *E. coli* (LYS) biomasse, som inneholder proteiner kan medføre risiko for hud og/eller respiratorisk sensibilisering for arbeidere. PL73 *E. coli* (LYS) biomasse 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 fordi det i forsøkene med regnbueørret er undersøkelser av standard helseparametre, som hematologi og lekkasje av organspesifikke enzymer ikke er foretatt, kan søker ikke konkludere om fiskens helse var god, med unntak av de effektene som var målt på appetitt. Faggruppe 3 og Faggruppe 6 finner at fordi ingen målinger av immunrespons hos fisken er foretatt, jfr. Risikoevaluering av bioprotein (VKM (2006)) som tidligere er utørt av VKM, må denne delen av fôringsforsøkene derfor ansees som mangelfull.

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. Faggruppene mener at det råder usikkerhet om det ved overproduksjon av L-lysin kan dannes komponenter som kan være upolare mutagener.

Fordi søker ikke har forsøkt å balansere forsøksfôrene ernæringsmessig, dvs. forsøksfôret har en annen protein, lipid og mikronæringsstoffsammensetning enn standardfôret, finner faggruppene det vanskelig å konkludere på om de endringer som er funnet i forsøk med dyr skyldes biomassen eller ubalanse i den ernæringsmessige sammensetningen.

Faggruppene finner det derfor vanskelig å vurdere om bruk av PL73 *E. coli* (LYS) bakteriebiomasse vil medføre endret risiko for dyrs helse i forhold til annet fôr.

Faggruppe 3 og Faggruppe 6 konkluderer 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.

Spredning av genmodifisert mikroorganisme fra biomassen til miljø

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

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

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

Overføring av rekombinant DNA

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

Vurdering av søkers dokumentasjon og kunnskapshull mht miljørisikovurdering

Ikke aktuelt da det ikke foretas miljørisikovurdering.

6. Vurdering av søkers dokumentasjon og kunnskapshull

Faggruppene mener at søker ikke har lagt ved tilstrekkelig dokumentasjon for både kjemiske og biologiske undersøkelser samt at det er mangler ved fôringsstudiene. Analyser av nukleinsyrer viser lave konsentrasjoner, 0,2 g RNA/kg og 0,7 g DNA/kg. Faggruppene mener at det bør sjekkes om analysene er tilstrekkelig pålitelige, og om de lave nukleinsyremengdene skyldes fullstendig degradering. Med bakgrunn i at mange analyser, 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 analyser av fosfolipider og lipopolysakkarider samt at fôrdesignene ikke er tilfredsstillende, finner faggruppene det vanskelig å vurdere om mulige påviste skadelige effektene skyldes biomassen. Denne delen anses derfor å være mangelfull. Fordi det ikke er utført målinger av immunrespons i dyreforsøkene inkludert fiskestudiene, må også denne delen anses som mangelfull.

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* K-12 NVC578 could be used as a counterpart.

3. Characterisation of the product

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

Complete inactivation of all the present plasmid DNA may be difficult when processing industrial amounts of bacteria. It is therefore especially important that the plasmids in question can not be mobilized by any type of conjugative plasmids. As conjugation is the highway method for bacteria to transfer plasmids through bacterial populations. The applicant claims that there is low homology between the plasmid vectors they have used and known *mob* and *tra* sequences. However, tests with a panel of known conjugative plasmids should be conducted in order to be sure that conjugative transfer of the plasmids does not occur.

PL73 *E. coli* (LYS) cells confer resistance to neomycin and kanamycin. The Norwegian GMO Panel is of the opinion that a more extensive assessment of health effects related to unintentionally spread of the *nptI* gene should have been performed. The natural reservoirs, resistance profile, assumed and documented spread in European countries (both geographically and presence in host bacterial populations), and also the usage and utility of the antibiotics to which the *nptI* gene confers resistance.

The limits of detections and adequate controls of the PCR based analysis should be better documented. Southern blots with adequate probes against the *nptI* gene should be performed of the fragmented DNA in order to estimate the size of the fragmented *nptI* gene.

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 main bacterial phospholipids and phosphatidylethanolamin, 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*

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 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.

A third important general comment is that studies on target animals should have been more toxicologically comprehensive, including examination of histopathology, immunopathology as well as reproduction.

The first performance study on cows revealed a dose related increase of milk urea from the lowest dosage level, 5 % PL73. Reduced feed intake and reduced lactose level in the milk were found at 15 % and above. Haematology and clinical chemistry were not determined. In the second performance study on cows was found reduced feed intake, reduced lactose and Ca levels in the milk at the highest dosage level, 10.7 % PL73. No effects, except slightly increased milk urea level were found at 7.3 or 3.4 %. Some haematological and clinical chemical parameters were determined without effects. For cows it depends on how an almost double concentration of urea in milk (which was found at dosage level 5 %) is valued. We either have a LOAEL at 5 % or a NOAEL at 7.3 %.

From the performance studies on pigs, the first study revealed low faecal consistency at all dosage levels from 5-20 % PL73. Bilirubin in serum was increased at 10 % and above. Reduced body weight gain and increased water intake were found at 15 % and above, and increased liver weight at 20 %. No macroscopic effects of other selected organs. The second performance study on pigs did not include haematology, clinical chemistry or autopsy but described carcass parameters. No effects were revealed at the lowest dosage level, 6 %. At 9 and 12 % were found reduced body weight gain. At 12 % was also found reduced feed intake. For pigs it depends on how the low faecal consistency is valued. We either have a LOAEL at 5 % or a NOAEL at 6 %.

A performance study on rainbow trout revealed delayed rigor mortis at the three lowest dosage levels 5.8, 11.7 and 23.3 % PL73 (not checked in fish fed the highest dosage levels 40 %). Fish fed 11.7 % and above showed reduced protein and energy retention. Fish fed the two lowest levels did not show adverse effects on growth, feed intake or feed utilisation. For rainbow trout it depends on how the delayed rigor mortis is valued. We either have a LOAEL or NOAEL at 5.8 %. Neither haematology nor leakage of organ specific enzymes has been tested. Therefore it cannot be concluded that the health of the fishes were good. Also, no response on the immune system has been tested.

The design of the feed tests for Salmonids has been performed by substitution of fishmeal by biomass according to weight. No attempts have been done to balance the test feed with the basal/reference fish diets. The test feed and the basal diets are not "compositional equivalent".

Therefore it cannot be concluded whether it is the test feed or the change in nutritional composition which have caused the found changes.

5. Considerations for human health of the product

5.1 *Toxicology*

As no risk assessments with conventional counterpart strains have been done it is not known if adverse effects connected to the GMM PL73 *E. coli* (LYS) is related to the gene modification or to more basic properties of these bacterial biomasses.

An elevated level of nucleic acids in the bacterial biomass was expected. A low nucleic acid level (0,2 g RNA /kg and 0,7 g DNA/kg) was presented for the PL73 biomass. There are some unsolved questions related to high intake of nucleic acids, f.i. on immunity.

The subchronic toxicity study on rats found increased liver weight at lowest dose 3 % PL73 and above and also increased bilirubin serum level at 3 %. The number of variables significantly affected and the severities were in general dose related at the higher dosage levels 8 and 15 %. Examinations of lymphoid tissues, particularly those related to the intestine, and immune response should have been included. For rat we have a lowest observed adverse effect level (LOAEL) at 3 %.

In the prenatal developmental toxicity study in rats, no significant effects thought related to the test feed were found at 3 or 8 % PL73. The body weight gain of dams was decreased at 15 % level. Examinations of lymphoid tissues, particularly those related to the intestine, and immune response should have been included.

KONKLUSJON

Faggruppe 3 og Faggruppe 6 konkluderer med at PL73 *E. coli* (LYS) biomassepartiene S2 og S3 er lite egnet til bruk for sammenligning med parti S1-biomasse mht til komparativ analyser av ernæringsrelaterte komponenter. Faggruppe 3 og Faggruppe 6 mener det bør foretas analyser av mengde fosfolipider og lipopolysakkarider i biomassen.

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 finner for mange indikasjoner på helseeffekter, og stiller også spørsmål ved utførelsen av de enkelte forsøkene. Faggruppe 3 og Faggruppe 6 mener det er en vesentlig mangel ved at tradisjonelt motstykke K-12 stamme NVC578 ikke er benyttet som kontroll. Av den grunn vet en ikke om risikoen er knyttet til genmodifiseringen eller til grunnleggende egenskaper til denne biomassen, og en har derfor ikke grunnlag for å skille helse-effekter fra generelle effekter.

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 dyr skyldes biomassen eller ubalanse i den ernæringsmessige sammensetningen.

Undersøkelser av standard helseparametre hos regnbueørret, som hematologi og lekkasje av organspesifikke enzymer er ikke fortatt, og Faggruppe 3 og Faggruppe 6 kan derfor ikke konkludere om fiskens helse var god, med unntak av de effektene som var målt på appetitt. Fordi det ikke er utført målinger av immunrespons hos fisken, jfr. Risikoevaluering av bioprotein (VKM (2006)) tidligere foretatt av VKM, må denne delen derfor ansees som mangelfull.

Samlet vurdering

Faggruppene finner det vanskelig å vurdere om bruk av PL73 *E. coli* (LYS) bakteriebiomasse vil medføre endret risiko for dyrs helse i forhold til annet fôr.

REFERANSER

- 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.lovdatab.no/for/sf/fi/xi-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