



---

# Foreløpig helserisikovurdering av genmodifisert soya MON 87701 fra Monsanto Company (EFSA/GMO/BE/2010/79)

---

**Uttalelse fra Faggruppe for genmodifiserte organismer i  
Vitenskapskomiteen for mattrygghet**

**Innspill til EFSAs GMO Extranet**

Dato: 5.11.2010

Dok. nr.: 10-309-1- endelig

ISBN: 978-82-8259-007-5

**VKM Report 2010: 34**



## Bidragstere

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.

### Vurdert av

#### Faggruppe for genmodifiserte organismer:

Audun Nerland (leder), Åshild Andreassen, Per Brandtzæg, Askild Holck, Olavi Juntilla, Heidi Konestabo, Richard Meadow, Kåre M. Nielsen, Hilde-Gunn Opsahl Sorteberg, Rose Vikse

#### Koordinator(er) fra sekretariatet:

Arne Mikalsen og Merethe Aasmo Finne

## Sammendrag

Helserisikovurderingen av den insektsresistente soyalinjen MON 87701 (EFSA/GMO/BE/2010/79) fra Monsanto er utført av Faggruppe for genmodifiserte organismer i Vitenskapskomiteen for mattrygghet. Mattilsynet ber Vitenskapskomiteen for mattrygghet om å vurdere soyalinje MON 87701 til bruk i næringsmidler og fôrvarer, men ikke til dyrking.

Risikovurderingen av den genmodifiserte soyaen er basert på dokumentasjon som er gjort tilgjengelig på EFSA's nettside GMO EFSA Extranet. I tillegg er det benyttet informasjon fra uavhengige vitenskapelige publikasjoner i vurderingen. MON 87701 er risikovurdert i henhold til tiltenkt bruk i EU/EØS-området, og i overensstemmelse med prinsippene som er nedfelt i EFSA's retningslinjer for risikovurdering av genmodifiserte planter og avledete næringsmidler og fôrvarer (EFSA 2006) og Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD)s konsensusdokument for soya (OECD 2009).

Den vitenskapelige vurderingen omfatter transformeringsprosess, vektor, transgene konstrukt, komparativ analyse av ernæringsmessig kvalitet, mineraler, kritiske toksiner, metabolitter, antinæringsstoffer, allergener og nye proteiner. Videre er agronomiske egenskaper, potensiale for ikke tilsiktede effekter på fitness, samt mulig horisontal og vertikal genoverføring vurdert.

Soyalinjen MON 87701 er fremkommet ved *Agrobacterium*-mediert transformasjon av celler fra den kommersielle soyalinjen A5547. Den innsatte genkonstruksjonen i MON 87701 inneholder en enkeltkopi av et modifisert *cry1Ac*-gen fra bakterien *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*. Genet koder for  $\delta$ -endotoksinet Cry1Ac som gir plantene resistens mot enkelte skadegjørere i ordenen Lepidoptera, eksempelvis *Anticarsia gemmatalis* ("velvetbean caterpillar"), *Pseudoplusia includens* ("soybean looper"), *Epinotia aporema* ("soybean anvil borer") og *Rachiplusia nu* ("sunflower looper").

MON 87701 inneholder ingen markørgener for antibiotikaresistens.

Olje fra soyalinjen MON 87701 er primært tiltenkt brukt i næringsmiddelindustrien.

### Komparative analyser

Analyser av ernæringsmessige komponenter er i hovedsak utført i tråd med OECDs konsensusdokument for soya (OECD 2009). Det er påvist statistisk signifikante forskjeller mellom soyalinje MON 87701 og kontroll i enkeltparametere. Forskjellene er imidlertid ikke konsistente over forsøksfelt, og verdiene for de analyserte komponentene ligger innenfor typiske verdier for andre soyasorter som er rapportert i litteraturen, og innenfor variasjonsområdene til kommersielle referansesorter som er inkludert i søkers dokumentasjon. Faggruppen konkluderer med at forskjellene som er påvist ikke har ernæringsmessig betydning.

Faggruppen påpeker at søker ikke har foretatt analyser av fosfatider i lecitin. Det understrekes at konsensusdokumentet i størst mulig grad skal følges når det legges fram dokumentasjon på nivåene av næringsstoffer, antinæringsstoffer og metabolitter.

Når det gjelder antinæringsstoffene, har søker slått sammen resultatene for de enkelte isoflavoner innenfor hver av isoflavongruppene. Det er stor variabilitet innenfor hver gruppe, og faggruppen etterlyser statistiske analyser for hvert enkelt forbindelse innenfor hver isoflavongruppe.

Feltforsøk over en vekstsesong viser signifikante forskjeller mellom MON 87701 og umodifisert kontroll for enkelte av de agronomiske karakterene som er evaluert. Gjennomsnittsverdiene for disse karakterene ligger imidlertid innenfor variasjonsområdene for referansesortene som var inkludert feltforsøkene.

**Toksisitet og allergenisitet**

Cry1Ac-proteinet, som uttrykkes som følge av genmodifiseringen, har ingen likheter med kjente allergener eller egenskaper som tilsier at de kan virke som allergener. Basert på testene som er omtalt i søkers dokumentasjon, dvs. at det i proteinet ikke er påvist aminosyresekvenser som er lik allergene proteiners epitoper, at proteinene brytes raskt ned av mage-tarmsaft, samt at konsentrasjonene av Cry1Ac-protein er svært lave (mindre enn 0,002 % av total proteinmengde), anser faggruppen det som lite trolig at proteinet medfører et signifikant større potensiale for utvikling av matallergi hos mennesker sammenlignet med umodifisert soya. Akutte 14 dagers fôringsstudier (oral sondefôring EPA-OPPTS (870.1100)) på mus med reinfremstilt Cry1Ac-protein, 90 dagers fôringsforsøk på rotter og 42 dagers fôringsforsøk med broilere viste ingen skadelige helseeffekter. Søker har ikke utført toksisitetsstudier på fisk med fôr som inneholder soya MON 87701.

Faggruppen påpeker at 90-dagers repeterte dosestudier bør benyttes ved fastsettelse av NOAEL. I disse sub-kroniske studiene er det brukt minst to doser av testfôret, samt kontrollfôr av umodifisert soya. Forsøksdyrene er eksponert over et så langt tidsrom at eventuelle uheldige helseeffekter ville blitt oppdaget. Rottene er også eksponert for høyere konsentrasjoner av Cry1Ac enn hva mennesker og dyr ville vært eksponert for i en naturlig ernæringsmessig situasjon.

På bakgrunn fra forsøk med Cry1Ac-protein som er dokumentert i denne søknaden, konkluder faggruppen med at det er lite sannsynlig at eksponering for Cry1Ac-protein i seg selv, og i de mengder som tilføres via fôr fra den genmodifiserte soyaen, vil føre til helseskade hos dyr.

**Nøkkelord**

Soya, *Glycine max* (L.) Merr., genmodifisert soyalinje, MON 87701, EFSA/GMO/BE/2010/79, Cry1Ac, insektsresistens, helsemessig trygghet, helse, forordning 1829/2003/EF

## Forkortelser og ordforklaringer

ADF	Acid detergent fiber, fiberfraksjon av ufordøyelig plantemateriale i fôr, vanligvis cellulosefiber dekket med lignin og silikat. Plantematerialet fordøyes med en syre-detergentløsning (ADF). Ufordøyd masse betegnes som ADF. Fôr med lavt ADF-innhold er mer fordøyelig og har større energiinnhold.
Allele	Et bestemt gen kan foreligge i ulike varianter (alleler). Allelene kan være dominante (bestemmende for fenotypen) eller recessive (vikende).
ARMG	Antibiotikaresistensmarkørgen
Backcross (BC)	Tilbakekryssing. Kryssing mellom en hybridlinje (avkom fra to genetisk ulike foreldre) og en av foreldrelinjene, alternativt en genetisk ekvivalent organisme. Strategi i planteforedling for å overføre primært kvalitative karakterer, for eksempel sjukdomsresistens, til elitelinjer av både kryssbefruktede og selvpollinerte arter. Gjentatte tilbakekryssinger reduserer det genetiske bidraget, som uønskede alleler fra den andre donorplanten.
	BC <sub>1</sub> , BC <sub>2</sub> etc: betegnelse på 1. og 2. tilbakekryssingsgenerasjon, etc.
BLASTn	Algoritme som benyttes for homologisammenligning av nukleotidsekvenser.
BLASTP	Algoritme som benyttes for homologisammenligning av aminosyresekvenser i proteiner.
BLASTx	Algoritme som benyttes for oversetting fra kodende nukleotidsekvenser til aminosyresekvenser.
bp	Basepar
Codex	FAO/WHO-organ som etablerer globale handelsstandarder for mat.
CP4	<i>Agrobacterium</i> sp. stamme CP4
Cry	Krystallproteiner ( $\delta$ -endotoksiner) fra <i>Bacillus thuringiensis</i> .
Cry1Ac	Et Cry1-klasse krystallprotein fra <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i>
DN	Direktoratet for naturforvaltning
DNA	Deoxyribonukleinsyre (DNA)
Dominant allel	Et allel som uttrykker samme fenotype, uavhengig av om allelene i genparet er like (homozygot) eller ulike (heterozygot).
EFSA	European Food Safety Authority
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EPSPS	5-enolpyruvylsukinat-3-fosfatase
FAO	Food and Agriculture Organization, FN's organisasjon for ernæring og landbruk.
FIFRA	US EPA Federal Insecticide, Fungicide and Rodenticide Act. USAs føderale lov om insektdrepende midler, soppdrepende midler og midler mot skadedyr.
Fitness	Et individs relative evne til å føre sine gener/alleler videre til kommende generasjoner.
GLP	Good Laboratory Practices, retningslinjer for godt laboratoriearbeid.
GMO	Genmodifisert organisme
GMP	Genmodifisert plante
Locus	Spesifikk posisjon på kromosomet der et gen er lokalisert.
MALDITOF	Massespektrometrimetode for å måle molekylvekt til peptider.
Mendelsk nedarving	Lovmessig nedarvingsmønster ved ulike typer kryssinger.
MT	Mattilsynet
NDF	Neutral detergent fiber, dvs. fiberfraksjon som inneholder hemicellulose og ADF.
Northern blot	Teknikk for overføring av RNA til en membran for videre studier av overførte RNA-sekvenser.
Nær-isogen linje	Linjer eller sorter som er genetisk identiske, med unntak av ett lokus eller kromosomsegment.
OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development
ORF	Open Reading Frame (åpen leseramme)
OSWP	Overseason whole plant

PCR	Polymerase chain reaction. Polymerase kjedereaksjon. Metode for å syntetisere et stort antall kopier av en DNA-sekvens vha primere.
RNA	Ribonukleinsyre
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat (SDS)-polyakrylamidelektroforese. Elektroforesemetode for separasjon av proteiner.
Southern blot	Teknikk for overføring av DNA til en membran for videre studier av overførte DNA-sekvenser.
T-DNA	DNA fra Ti-plasmidet som er i jordbakterien <i>Agrobacterium tumefaciens</i> . Ti-plasmidet (Transfer-DNA) overføres fra bakterien, og settes inn i plantecellenes kjernegenom. T-DNAet som overføres avgrenses av V (venstre) og H (høyre) flankesekvenser, og begrenser derfor den delen av Ti-plasmidet som overføres og gjør at resten av vektoren ikke blir satt inn i plantekromosomene.

Utviklingsstadier hos soya:

Vegetative stadier

VE: oppspiring, synlige frøblad

V1: 1. nodium på hovedstengel med fullt utviklede blad

V(n): n'te nodium på hovedstengel med fullt utviklede blad

Reproduktive stadier

R1: begynnende blomstring (en åpen blomst ved et nodium)

R2: full blomstring

R3: begynnende belgdannelse

R4: fullt utviklede belger

R5: begynnende frødannelse

R6: fullt utviklede frø

R7: begynnende modning

R8: fysiologisk moden

USDA	United States Department of Agriculture
U.S. EPA	United States Environmental Protection Agency, USAs miljøvernmyndigheter
Western-blot	Metode for overføring av proteiner til en membran som binder protein.
WHO	World Health Organisation. Verdens helseorganisasjon, organ under FN.

# Innholdsfortegnelse

<b>Bidragstere</b> .....	<b>2</b>
<b>Sammendrag</b> .....	<b>3</b>
<b>Nøkkelord</b> .....	<b>4</b>
<b>Forkortelser og ordforklaringer</b> .....	<b>5</b>
<b>Innholdsfortegnelse</b> .....	<b>7</b>
<b>Bakgrunn</b> .....	<b>8</b>
<b>Oppdrag fra mattilsynet</b> .....	<b>8</b>
<b>Risikovurdering</b> .....	<b>9</b>
<b>1 Innledning</b> .....	<b>9</b>
1.1 Beskrivelse av egenskap(er) og virkningsmekanismer .....	9
<b>2 Molekylær karakterisering</b> .....	<b>9</b>
2.1 Transformasjonssystem og vektorkonstruksjon.....	9
2.2 Karakterisering av geninnsettingen/genkonstruksjonen.....	9
2.3 Informasjon vedrørende uttrykk av innsatte gener og åpne leserammer (ORF) .....	12
2.4 Nedarving og stabilitet av innsatt DNA .....	14
2.5 Vurdering basert på tilgjengelig datagrunnlag .....	14
<b>3 Komparative analyser</b> .....	<b>15</b>
3.1 Valg av komparator og forsøksdesign.....	15
3.2 Analyser av ernæringsmessige komponenter .....	15
3.3 Agronomiske egenskaper .....	22
3.4 Vurdering basert på tilgjengelig datagrunnlag .....	23
<b>4 Dokumentasjon av toksisitet, allergenisitet og næringsverdi</b> .....	<b>26</b>
4.1 Toksisitet.....	26
4.2 Allergenisitet.....	28
4.3 Vurdering basert på tilgjengelig datagrunnlag .....	29
<b>5 Vurdering av søkers dokumentasjon, kunnskapshull</b> .....	<b>29</b>
<b>6 Innspill til EFSA GMO Extranet søknad EFSA/GMO/BE/2010/79</b> .....	<b>32</b>
<b>Vurdering basert på tilgjengelig datagrunnlag</b> .....	<b>33</b>
<b>Referanser</b> .....	<b>34</b>
<b>Vedlegg 1</b> .....	<b>37</b>



## Bakgrunn

Faggruppe for genmodifiserte organismer i Vitenskapskomiteen for mattrygghet er bedt av Mattilsynet om å foreta en vurdering av helserisiko ved en eventuell godkjenning av den genmodifiserte soyalinjen MON 87701 (EFSA/GMO/BE/2010/79) for bruksområdene import, prosessering, næringsmidler og fôrvarer. MON 87701 er søkt omsatt i EU/EØS-området under forordning (EF) Nr. 1829/2003 om genmodifiserte næringsmidler og fôrvarer (artiklene 5,17,3 (1c) og 15(1c)), og i overensstemmelse med direktiv 2001/18/EF, del C.

Søknaden ble fremmet og anbefalt av tyske myndigheter i mai 2010. Dokumentasjonen knyttet til søknaden ble lagt ut på EFSA's nettside GMO Extranet 11. juni 2010, med frist på 90-dager for innspill fra EU- og EØS/EFTA-landene. Norge har ikke tidligere uttalt seg om soyalinjen MON 87701.

MON 87701 er foreløpig ikke godkjent for kommersiell dyrking eller omsetning som mat og/eller fôr i noen land (CERA 2010; EFSA/GMO/BE/2010/79). I følge søker er soyalinjen primært tenkt dyrket i Brasil og Argentina. Søknader om godkjenning av MON 87701 for alle bruksområder er levert i USA, Brasil, Japan og Canada. I tillegg vil det bli søkt om godkjenning av MON 87701 til import og bruk som mat og fôr i Kina, Australia, New Zealand, Filippinene, Mexico, Malaysia, Taiwan, Sør-Korea og Indonesia.

## Oppdrag fra Mattilsynet

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

Søknad EFSA/GMO/BE/2010/79, genmodifisert soyalinje MON 87701, ble lagt ut på EFSA-nett 11. juni 2010. Faggruppe for genmodifiserte organismer skal i tråd med oppdragbrev utarbeide helserisikovurdering av soyalinjen til import og industriell prosessering, samt til bruk som næringsmiddel og fôrvare. Søknaden omfatter ikke dyrking. Vurderingen skal utføres i henhold til tiltenkt bruk og i overensstemmelse med prinsippene som er nedfelt i EFSA's retningslinjer for risikovurdering av genmodifiserte planter og avledete næringsmidler og fôrvarer ("Guidance document of the scientific panel on genetically modified organisms for the risk assessment of genetically modified plants and derived food and feed" (EFSA 2006).

### *Produktet som ønskes vurdert*

Genmodifisert soya, EFSA/GMO/BE/2010/79 (soya MON 87701).

Unik kode: MON-877Ø1-2

Status i EU: Søknad under 1829/2003/EF. EFSA's frist for innspill er 11.9.10.

Ønsket svarfrist til Mattilsynet er 8. september 2010.



# Risikovurdering

## 1 Innledning

Helserisikovurderingen av den genmodifiserte soyalinjen MON 87701 er basert på dokumentasjon som er gjort tilgjengelig på EFSA's nettside GMO Extranet. I tillegg er det benyttet uavhengige vitenskapelige publikasjoner med referee i vurderingen.

Faggruppen har vedtatt å benytte EFSA's retningslinjer for vurdering av genmodifiserte planter. Prinsippene som er lagt til grunn for vurderingen, er derfor hentet fra EFSA's dokument "Guidance document of the scientific panel on genetically modified organisms for the risk assessment of genetically modified plants and derived food and feed" (EFSA 2006). Ved vurdering av vesentlig likhet har faggruppen lagt vekt på OECDs konsensusdokument for soya (OECD 2009), som gir anbefalinger over hvilke parametere som bør undersøkes.

Det er kun medlemmene i Faggruppe for genmodifiserte organismer som har vurdert den genmodifiserte soyaen.

### 1.1 Beskrivelse av egenskap(er) og virkningsmekanismer

Soyalinjen MON 87701 er fremkommet ved *Agrobacterium*-mediert transformasjon av celler fra den kommersielle soyalinjen A5547. Den innsatte genkonstruksjonen i MON 87701 inneholder en enkeltkopi av et modifisert *cry1Ac*-gen fra bakterien *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*. Genet koder for  $\delta$ -endotoksinet Cry1Ac som gir plantene resistens mot enkelte skadegjørere i ordenen *Lepidoptera*, eksempelvis *Anticarsia gemmatilis* ("velvetbean caterpillar"), *Pseudoplusia includens* ("soybean looper"), *Epinotia aporema* ("soybean anvil borer") og *Rachiplusia nu* ("sunflower looper").

## 2 Molekylær karakterisering

### 2.1 Transformasjonssystem og vektorkonstruksjon

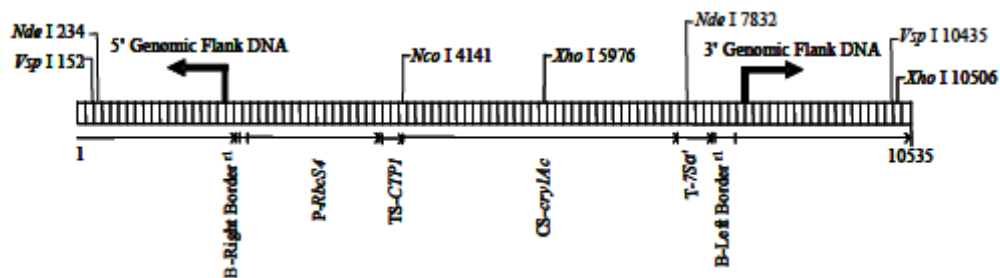
MON 87701 er fremkommet ved *Agrobacterium*-mediert transformasjon av meristematisk vev fra den kommersielle soyalinjen A5547. Den binære vektoren PV-GMIR9, som inneholder to rekombinante DNA-fragmenter (T-DNA I og II), ble benyttet til transformasjonen. De rekombinante DNA-fragmentene inneholder henholdsvis en *cry1Ac*-ekspresjonskassetten (T-DNA I) og en *cp4 epsps*-ekspresjonskassetten (T-DNA II). Ved transformasjonen ble ekspresjonskassetten satt inn som to uavhengige loki. Transformanter ble selektert ved at de overlevde og vokste i nærvær av virkestoffet glyfosat. Påfølgende innavl av F<sub>1</sub>-generasjonen førte til at T-DNA I (*cry1Ac*-kassetten) ble selektert fra T-DNA II (*cp4 epsps*-kassetten), og genotyper som inneholdt *cp4 epsps*-kassetten (T-DNA II) ble eliminert. MON 87701-plantene inneholder kun ett rekombinant DNA-fragment med *cry1Ac*-genkassetten (T-DNA I).

### 2.2 Karakterisering av geninnsettingen/genkonstruksjonen

*Cry1Ac*-ekspresjonskassetten inneholder to DNA-sekvenser fra vårskrinneblom (*Arabidopsis thaliana*). Vårskrinneblomsekvensene stammer fra genet *ribulose 1,5-difosfatkarboksylase* small subunit 1A (*RbcS4*-gen), promoter og ledersekvens P-*RbcS4*, samt N-terminal kloroplasttransittpeptid TS-CTP. TS-CTP-peptidet bidrar til å målrette uttrykket av Cry1Ac-proteinet til kloroplastene. Videre inneholder ekspresjonskassetten *cry1Ac*-sekvenser. T-7S a', en 3' ikke-translatert sekvens fra soya,

avslutter transkripsjonen (se figur 1 og tabell 1 og 2). DNA-fragmentet inneholder ikke antibiotikaresistensgener.

Southern blot og sekvensanalyse er benyttet for å karakterisere det rekombinante DNA-fragmentet i planten. Molekylærbiologisk karakterisering viser at det er satt inn en enkelt kopi av DNA-fragmentet i soyaens genom. Gener og DNA-elementer i dette fragmentet er vist i figur 1 og tabell 1 og 2.



Figur 1. Rekombinant T-DNA I-fragment i soyaens genom.

Tabell 1. Beskrivelse av de innsatte genene.

CryIAc-ekspresjonskasset	
<i>P-RbcS4</i>	Promoter, ledesequens og 5' ikke-translatert område fra <i>ribulose 1,5-difosfatkarboksylase (RbcS4)</i> -genet fra vårskrinneblom ( <i>Arabidopsis thaliana</i> ). Uttrykkes ikke i planten.
<i>TS-CTP1</i>	N-terminal kloroplasttransittpeptid (TS-CTP) fra <i>RbcS4</i> -genet. Overfører CryIAc til kloroplast.
<i>CS-cryIAc</i>	Gen som koder for et syntetisk CryIAc-protein. Genet stammer fra <i>Bacillus thuringiensis</i> .
<i>T-7S' a' 3'</i>	DNA- sekvens fra soya som avslutter transkripsjonen (se tabell 2). Uttrykkes ikke i planten

Tabell 2. Størrelsesfordeling av gener og regulatoriske elementer i MON 87701

Genetic element <sup>1, 2</sup>	Location in sequence <sup>3</sup>	Function and/or reference
Sequence flanking 5' end of the insert	1-2000	Soybean genomic DNA
B-Right Border <sup>†1</sup>	2001-2045	45 bp DNA region from the Right Border region remaining after integration (Depicker <i>et al.</i> , 1982)
IS	2046-2154	Sequence used in DNA cloning
P- <i>RbcS4</i>	2155-3877	Promoter, leader, and 5' non-translated region of the <i>Arabidopsis thaliana RbcS4</i> gene encoding ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase small subunit 1A (Krebbers <i>et al.</i> , 1988)
TS- <i>CTP1</i>	3878-4141	Targeting sequence encoding the transit peptide of the <i>Arabidopsis RbcS4</i> encoding small subunit 1A transit peptide, from <i>Arabidopsis thaliana</i> , present to direct the Cry1Ac protein to the chloroplast, (Krebbers <i>et al.</i> , 1988)
CS- <i>Cry1Ac</i>	4142-7678	Codon-modified coding sequence of the Cry1Ac protein of <i>Bacillus thuringiensis</i> (Fischhoff and Perlak, 1995)
IS	7679-7687	Sequences used in DNA cloning
T- <i>7S α'</i>	7688-8126	3' region of the <i>Sphas1</i> gene of <i>Glycine max</i> encoding the 7S α' seed storage protein, β-conglycinin, including 35 nucleotides of the carboxyl terminal β-conglycinin coding region with the termination codon and the polyadenylation sequence (Schuler <i>et al.</i> , 1982). The element functions to terminate transcription and direct polyadenylation of the mRNA.
IS	8127-8162	Sequence used in DNA cloning
B-Left Border <sup>†1</sup>	8163-8426	264 bp DNA region from the Left Border region remaining after integration (Barker <i>et al.</i> , 1983)
Sequence flanking 3' end of the insert	8427-10535	Soybean genomic DNA

<sup>1</sup> Flanking sequences and intervening sequences (IS) are not regarded as functional genetic elements.

<sup>2</sup> P - Promoter; I - Intron; CS - Coding Sequence; T - 3' non-translated transcriptional termination sequence and polyadenylation signal sequences; B - Border.

<sup>†1</sup> Suscript in Left and Right Border indicates that the border sequences in MON 87701 are smaller than those in PV-GMIR9 plasmid due to the mechanism of *Agrobacterium* transformation.

<sup>3</sup> Numbering refers to the sequence in Arackal *et al.* (2009).

Molekylærbiologiske analyser viser at det rekombinante fragmentet i planten inneholder de samme gener som er på det tilsvarende rekombinante T-DNA I-fragmentet i plasmidet PV-GMIR9. Ett DNA-fragment på 6426 bp gjenfinnes som et enkelt lokus i soyaens genom.

Cry1Ac proteinet som uttrykkes i MON 87701 er undersøkt med Western-blot analyse og densitometri, SDS-PAGE og densitometri, proteolytisk peptidkartlegging med MALDI-TOF MS analyse av peptider, N-enden sekvensering ved Edman-degradering. For Cry1Ac er det foretatt undersøkt med insektslarver for se på insekticidvirkning. Det ble konkludert med at toksinet ikke var forskjellig fra *E. coli*-produsert toksin. Disse analysene viser at Cry1Ac-proteinet som produseres i soyaene er ekvivalent med Cry1Ac- proteinet som produseres i *E. coli*. Det ble ikke påvist glykoliserings seter på proteinene.

Søker har sekvensert 2000 baser oppstrøms for 5'-enden og ca. 2100 baser nedstrøms for 3'-enden av innskuddet (tabell 2). I henhold til søker er flankesekvensene brukt ved søk i "Genbank non-redundant cDNA nucleotide database" (oppdatert 2. mai 2009), og "Genbank public non-redundant amino acid database" (oppdatert 28. april 2009). Søker har benyttet BLASTn og BLASTx algoritmer i sekvenssøkene. Søkene viser at flankesekvensene er soyasekvenser uten homologi til kodende eller regulatoriske sekvenser. DNA-analyser ved hjelp av Southern blot, DNA- sekvensanalyser, PCR og primere, som er spesifikke for sekvensene ved 5'-enden og 3'-enden for det transgene innskuddet, viser at ved innsetningen av plasmidets rekombinante T DNA I-fragment ble 32 bp fjernet og 16 bp satt inn i 5'-enden til det rekombinante DNAet. Søker har også vist at T-DNA II, "backbone"

elementer og seleksjonsmarkørsekvenser fra plasmidet PV-GMIR9 ikke er tilstede i genomet til MON 87701. Videre er det vist at insertet er stabilt over fem generasjoner. Søker konkluderer ut fra sine sekvensanalyser med at innsettingen av det rekombinante DNA-fragmentet ikke har ødelagte kode- eller regulatoriske sekvenser i området rundt innskuddet.

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

I dokumentasjonen fra søker presenteres resultater fra to proteinekspressjonsstudier med soyalinjen MON 87701. Feltforsøkene, som ligger til grunn for studiene, ble gjennomført på henholdsvis fem lokaliteter i USA vekstsesongen 2007 og fem lokaliteter i Argentina 2007/2008 (tabell 3). Forsøkene ble lagt ut som fullstendig randomiserte blokkdesign med tre gjentak, og inkluderte foruten testlinjen MON 87701 (generasjon R<sub>8</sub> og R<sub>9</sub>) en umodifisert kontroll med tilsvarende genetisk bakgrunn (A5547). I begge forsøksseriene ble det tatt prøver av bønne (frø), fôrfraksjon, røtter, samt blad på ulike tidspunkt gjennom vekstsesongen. I forsøkene i USA ble det også tatt prøver av pollen. Ekspressjonen av Cry1Ac-protein ble målt ved hjelp av enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

Med unntak for røtter, ble det detektert Cry1Ac-protein i alle undersøkte vev. I de nordamerikanske forsøkene varierte nivåene av Cry1Ac mellom 340 µg pr. g tørrvekt (t.v.) i blad på vekststadium V14-V16, til 2,3 µg pr. g råvekt i pollen (tabell 3). Resultatene fra de argentinske forsøkene viser høyere konsentrasjoner av det transgene proteinet i blad tidlig i vekstsesongen. I motsetning til resultatene fra USA, ble nivåene av Cry1Ac her redusert utover i vekstsesongen.

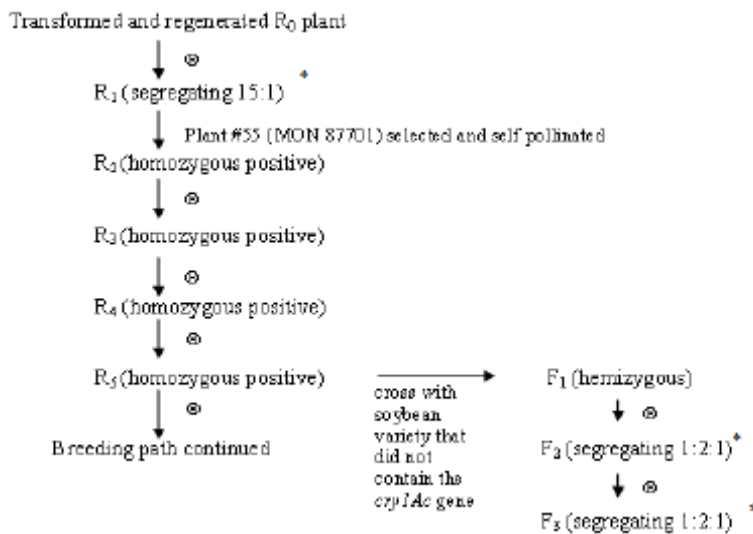
**Tabell 3. Nivå av Cry1Ac-protein i blad, hel plante, røtter, bønne og pollen fra MON87701 på ulike utviklingsstadier. Resultater fra feltforsøk i USA i 2007 og Argentina i 2007/2008.**

Vevstype	Utviklingstrinn <sup>1</sup>	USA	Argentina
		Gjennomsnitt (SD) Variasjonsområde (µg/g tørrvekt)	Gjennomsnitt (SD) Variasjonsområde (µg/g tørrvekt)
Blad	OSL-1 (V3-V4)	220 (70) 110-350	450 (77) 320-580
	OSL-2 (V6-V8)	260 (100) 130-500	290 (130) 150-580
	OSL-3 (V10-V12)	240 (110) 94-480	140 (52) 61-250
Hel plante (fôr)	OSL-4 (V14-V16)	340 (290) 78-960	180 (49) 78-250
	R6	29 (28) 8,2-95	70 (43) 10-150
Røtter R6	R6	LOD <sup>2</sup>	LOD
Bønne	R8	4,7 (0,79) 3,4-5,7	5,1 (0,82) 3,9-6,7
		(µg/g råvekt.)	
Pollen	R2	2,3 (0,58) 1,8-3,1	Ikke analysert

1 Utviklingstrinnene er beskrevet i oversikten over ordforklaringer/forkortelser

2 LOD: 0,347 µg/g råvekt

I henhold til søkers dokumentasjon er det gjort studier for å påvise endogene åpne leserammer i 5'- og 3' flankerende ende til det rekombinante DNA-fragmentet i soyaens genom. Det er søkt etter seks potensielle åpne leserammer, dvs. i 5'- og 3'-flankerende områder. Det ble ikke påvist endogene åpne leserammer ved 5'-enden og i 3'-enden. For de seks åpne leserammene i endene av insertet er det undersøkt for polypeptider som er lik eller større enn 8 aminosyrer. Det er påvist 5 mulige polypeptider som kan uttrykkes fra hver ende av insertet. Videre er det utført teoretiske analyser av de 5 mulige polypeptidene fra hver leseramme ved bruk av oppdatert versjoner av AD\_2009 (allergendatabase), BLOSUM50 (identifiserer sekvenslikheter som omfatter gaps), PRT\_2009 (GenBank protein database, utgave 169.0) og TOx\_2009. Databasene viser ingen biologisk relevante strukturelle likheter til allergener, toksiner eller farmakologiske aktive proteiner. Resultatene fra disse teoretiske analysene viser at dersom noen av disse leserammene skulle bli transkribert, er det lite sannsynlig at dette vil resultere i polypeptid(er) som medfører potensielle toksiske, allergene eller har uheldige helsemessige konsekvenser.



Figur 2. Kryssingsskjema for generering av spaltingsdata fra MON 87701.

## 2.4 Nedarving og stabilitet av innsatt DNA

I henhold til dokumentasjonen fra søker er genetisk stabilitet undersøkt ved analyse av genomisk DNA fra fem ulike generasjoner (R<sub>4</sub>, R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub>, R<sub>8</sub>, R<sub>9</sub>). Resultatene fra Southern blot-analysene viser at det rekombinante DNA-innskuddet er integrert i genomet og nedarves stabilt over generasjoner. Fenotypisk stabilitet er vist ved spaltingsdata fra generasjonene R<sub>1</sub>, F<sub>2</sub> og F<sub>3</sub> (se figur 2). Segregasjonsanalysene (chi-kvadrat-test) viser forventet spaltingsstall for insektsresistens, og det konkluderes med at rekombinante DNA-fragmentet følger mønsteret for mendelsk nedarving av et enkelt, dominant lokus (forventet hemizygot nedarving).

## 2.5 Vurdering basert på tilgjengelig datagrunnlag

Den transgene soyalinjen MON 87701 har fått tilført et *cry1Ac*-gen. I henhold til søkers informasjon vedrørende integreringsplass og flankesekvenser til de integrerte transgenene, samt analyser vha Southern blot er det grunn til å tro at transgenet sitter i et lokus i genomet. Det konkluderes med at nedarvingen av *cry1Ac*-genet i soyalinjen MON 87701 følger mønsteret for mendelsk nedarving av et dominant locus, og at fusjonsproteiner ikke uttrykkes i MON 87701.

Faggruppen har ikke identifisert noe risiko knyttet til den molekylærbiologiske karakteriseringen av det rekombinante innskuddet i MON 87701. Faggruppen finner informasjonen tilstrekkelig for vurdering av soyalinjen.

### Kommentarer fra faggruppen:

På side 169 fotnote 40 i det tekniske dossieret har Monsanto presentert gjennomsnittresultater for Cry1Ac til 4,9 % per tørrvekt i MON87701 bønner. Det riktige er 4,9 mikrogram/g tørrvekt.

## 3 Komparative analyser

### 3.1 Valg av komparator og forsøksdesign

I henhold til søkers dokumentasjon er den transgene soyalinjen MON 87701 testet i en serie feltforsøk over en vekstsesong i sentrale dyrkingsområder for soya i USA og Argentina.

Feltforsøkene for komparative analyser av ernæringsmessige karakterer ble utført på henholdsvis fem lokaliteter i USA i 2007 og fem lokaliteter i Argentina i 2007/2008. Den konvensjonelle soyalinjen A5547, med tilsvarende genetisk bakgrunn som testlinjen men som ikke uttrykker Cry1Ac-protein, ble benyttet som umodifisert kontroll. I tillegg var det inkludert henholdsvis 24 og 20 umodifiserte, kommersielle soyalinjer som referansesorter i forsøkene (fire sorter på hvert forsøkssted). Testlinje, komparator og referansesorter ble plantet i fullstendig randomiserte blokkdesign med tre gjentak på hver lokalitet. Søker viser til at dyrkingsregimet var i henhold til vanlig praksis i den enkelte region der forsøkene var lokaliserte. Det ble tatt ut prøver fra tre gjentak per lokalitet for analyser av ernæringsmessig viktige komponenter både hos test- og kontrollinjen, mens prøver fra ett gjentak ble lagt til grunn for analyser av referansesortene.

#### *Statistiske analyser*

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

### 3.2 Analyser av ernæringsmessige komponenter

#### *Hovedkomponenter i soyabønne og fôr*

Med unntak for analyser av fosfatider i lecitin, er valg av analyseparametere gjort i henhold til OECDs konsensudokument for soya (OECD 2009). Det er foretatt en rekke analyser av hovedkomponenter i fôr og bønne, samt belg, olje, mel, rostet mel, proteinisolat og lecitin. Resultatene av analyser av hovedkomponenter i bønne og fôr er sammenlignet med analytiske data for soya fra databasen ILSI Crop Composition (ILSI 2008).

Det ble totalt analysert for 64 ulike komponenter, 57 i bønne og syv i fôr. Konsentrasjonen av ni av fettsyrene var imidlertid lavere enn påvisningsgrensene, noe som medførte at disse ble ekskludert fra de statistiske analysene.

#### *Fôrfraksjon*

Fôrfraksjonen ble analysert med hensyn på innhold av aske, fett, protein, kalorier, total fiber, vann, ADF (acid detergent fiber), NDF (neutral detergent fiber) og karbohydrater. Statistiske analyser over steder viste ingen signifikante forskjeller mellom MON 87701 og den nær-isogene linjen for noen av de analyserte komponentene (tabell 4).



**Tabell 4. Resultater fra analyser av fôrfraksjon fra testlinjen MON 87701 og kontrollinjen A5547. Fra feltforsøk i Argentina 2007/2008 og USA 2007.**

Komponenter analysert (g/100 g tørrvekt)	Argentina 2007/2008 Gj.snitt [Variasjonsområde]		USA 2007 Gj.snitt [Variasjonsområde]	
	Kontroll A5547	MON 87701	Kontroll A5547	MON 87701
Vann (% råvekt)	69,78 (62,76-72,79)	69,10 (59,81-73,17)	73,41 (69,4-78,1)	72,86 (70,1-76,8)
Aske	6,09 (5,56-6,53)	6,02 (5,45-6,84)	6,32 (5,10-8,13)	5,84 (5,05-7,46)
Fett	4,91 (3,73-7,22)	5,01 (3,45-6,99)	5,65 (4,23-7,23)	5,30 (3,60-6,82)
Protein	18,31 (14,93-20,38)	18,78 (15,87-21,34)	17,07 (14,20-23,3)	17,39 (13,56-20,034)
Karbohydrater	70,70 (66,44-73,87)	70,18 (65,73-74,36)	70,97 (63,68-74,26)	71,04 (68,29-76,80)
ADF	34,70 (29,71-46,90)	34,87 (30,51-40,14)	36,53 (27,42-42,06)	37,17 (30,04-58,25)
NDF	41,46 (35,55-50,64)	39,53 (32,80-44,60)	45,57 (34,24-64,19)	47,16 (37,02-55,99)

#### *Soyabønne*

Når det gjelder soyabønne er det foretatt analyser av følgende komponenter: protein, fett, aske, karbohydrater, ADF, NDF, total fiber, råfiber, vann, karbohydrater, aminosyrer (18), fettsyrer (C14-C22), fosfor, jern, kalium, kalsium, magnesium, totalmengde vitamin E, isoflavoner (daidzein, glycitein, genistein), oligosakkaridene raffinose og staktyose, sekundære metabolitter og anti-næringsstoffene (lektiner, trypsinhemmer, og fytinsyre).

#### *Hovedkomponenter i soyabønne*

Følgende hovedkomponenter i soyabønne er analysert: vann, protein, fett, aske, ADF, NDF, råfiber og karbohydrater (tabell 5). Analysene ble utførte under god laboratoriepraksis (GLP) Det ble påvist signifikante forskjeller mellom MON 87701 og isogen kontroll for protein og karbohydrat ved analyse over steder i USA ( $p < 0,05$ ). Tilsvarende forskjeller ble ikke vist i de argentinske feltforsøkene.

**Tabell 5. Resultater fra analyser av hovedkomponenter og fiber i bønner fra testlinjen MON 87701 og kontrollinjen A5547. Fra feltforsøk i Argentina 2007/2008 og USA 2007.**

Komponenter analysert (g/100 g tørrvekt)	Argentina 2007/2008 Gj.snitt [Variasjonsområde]		USA 2007 Gj.snitt [Variasjonsområde]	
	Kontroll A5547	MON 87701	Kontroll A5547	MON 87701
Vann (% råvekt)	10,04 (8,70 - 11,63)	10,05 (9,53 - 11,25)	6,84 (5,44 - 8,74)	7,52 (5,86 - 10,70)
Aske	4,92 (4,46 - 5,25)	4,86 (4,57 - 5,24)	5,14 (4,70 - 5,88)	5,20 (4,70 - 5,90)
Fett	18,41 (17,59-19,28)	18,49 (18,05-19,35)	20,12 (17,24 - 22,55)	20,29 (17,33 - 23,08)
Protein	37,89 (36,35-39,62)	38,05 (36,05 - 39,20)	37,80 (32,29-41,87)	39,27 (36,49-42,23)
Karbohydrater	38,78 (36,73 - 40,36)	38,62 (36,73 - 39,92)	36,44 (29,88 - 43,48)	34,22 (21,58 - 39,61)
ADF	14,88 (12,61 - 19,45)	15,06 (13,30-20,51)	15,62 (14,00 - 19,02)	15,58 (13,53 - 17,05)
NDF	16,23 (15,00 - 17,53)	16,12 (14,22 - 19,09)	17,28 (15,02 - 22,45)	17,33 (15,06 - 21,80)

#### *Fettsyresammensetning i soyabønne*

Fettsyresammensetningen i soyabønne er målt i henhold til OECDs konsensusdokument for soya (OECD 2009). OECD anbefaler at følgende fettsyrer analyseres: palmitinsyre (C16:0), stearinsyre (C18:0), oljesyre (C18:1), linoljesyre (C18:2), linolensyre (C18:3) og arakidonsyre (C20:0). I henhold til søkers dokumentasjon er det analysert for innhold av totalt 14 fettsyrer i den transgene linjen MON 87701 (tabell 6). Innholdet av de enkelte fettsyrene ble sammenlignet både innen og over lokaliteter. Statistiske analyser over alle lokaliteter i USA viser signifikante forskjeller mellom testlinje og kontroll for fettsyren behensyre ( $p=0,022$ ). Tilsvarende viser resultater fra forsøkene i Argentina signifikante forskjeller for linolensyre ( $p\leq 0,001$ ). Resultatene viser imidlertid at forskjellene er små og innenfor toleranseintervallene som ble målt med grunnlag i referansesortene som inngikk i studien. Verdiene ligger også innenfor typiske verdier som er rapportert i litteraturen.

#### *Aminosyrer i soyabønne*

I henhold til dokumentasjonen er innholdet av både essensielle og ikke-essensielle aminosyrer analysert (tabell 7). Analysene er gjort i henhold til OECDs konsensusdokument for soya (OECD 2009). Statistiske analyser over steder i USA viser signifikante forskjeller mellom testlinje og kontroll for alanin ( $p=0,027$ ), glycin ( $p=0,007$ ), histidin ( $p<0,001$ ), isoleucin ( $p=0,031$ ), leucin ( $p=0,046$ ), lysin ( $p=0,012$ ), serin ( $p=0,004$ ), treonin ( $p=0,024$ ) og valin ( $p=0,04$ ). Videre ble det påvist signifikante forskjeller for aminosyren tryptofan ( $p=0,001$ ) i prøver fra de argentinske feltene. Verdiene for alle aminosyrene ligger imidlertid innenfor typiske verdier som er rapportert i litteraturen og toleranseintervallene for referansesortene som inngikk i studien.

**Tabell 6. Resultater fra analyser av fettsyrer i bønner fra testlinjen MON 87701 og kontrollinjen A5547. Fra feltforsøk i Argentina 2007/2008 og USA 2007.**

Komponenter analysert (% av totale fettsyrer)	Argentina 2007/2008 Gj.snitt (S.E.) [Variasjonsområde]		USA 2007 Gj.snitt (S.E.) [Variasjonsområde]	
	Kontroll A5547	MON 87701	Kontroll A5547	MON 87701
14:0 Myristinsyre P <sup>1</sup> =0,203; p <sup>2</sup> =0,769	0,084 (0,0017) [0,075 - 0,096]	0,086 (0,0017) [0,075 - 0,096]	0,094 (0,0031) [0,083 - 0,11]	0,093 (0,0031) [0,082 - 0,10]
16:0 Palmitinsyre P <sup>1</sup> =0,570; p <sup>2</sup> =0,359	11,43 (0,12) [10,80 - 12,04]	11,49 (0,12) [10,80 - 12,04]	11,88 (0,12) [11,50 - 12,13]	11,80 (0,12) [11,32 - 12,30]
16:1 Palmitolsyre P <sup>1</sup> =0,468; p <sup>2</sup> =0,372	0,087 (0,0033) [0,070 - 0,10]	0,084 (0,0033) [0,063 - 0,10]	0,095 (0,0033) [0,078 - 0,11]	0,092 (0,0033) [0,073 - 0,11]
17:0 Heptadekansyre P <sup>1</sup> =0,309; p <sup>2</sup> =0,553	0,11 (0,0025) [0,096 - 0,11]	0,11 (0,0025) [0,095 - 0,12]	0,093 (0,0021) [0,082 - 0,099]	0,094 (0,0021) [0,084 - 0,10]
18:0 Stearinsyre P <sup>1</sup> =0,948; p <sup>2</sup> =0,328	4,98 (0,11) [4,59 - 5,63]	4,98 (0,11) [4,76 - 5,35]	4,70 (0,22) [4,03 - 5,36]	4,59 (0,22) [3,97 - 5,36]
18:1 Oljesyre P <sup>1</sup> =0,513; p <sup>2</sup> =0,486	18,73 (0,32) [17,69 - 19,99]	18,64 (0,32) [17,84 - 19,93]	22,71 (1,28) [20,34 - 28,78]	22,35 (1,28) [19,21 - 26,64]
18:2 Linolsyre P <sup>1</sup> =0,062; p <sup>2</sup> =0,320	54,51 (0,33) [53,20 - 55,53]	54,17 (0,33) [53,20 - 54,80]	51,76 (0,95) [47,18 - 54,07]	52,16 (0,95) [49,32 - 54,63]
18:3 Linolensyre P <sup>1</sup> =<0,001; p <sup>2</sup> =0,276	8,97 (0,20) [8,32 - 9,90]	9,34 (0,20) [8,58 - 9,91]	7,11 (0,45) [5,34 - 8,26]	7,24 (0,45) [5,55 - 8,41]
20:0 Arkidonsyre P <sup>1</sup> =0,913; p <sup>2</sup> =0,836	0,46 (0,012) [0,42 - 0,55]	0,46 (0,012) [0,42 - 0,52]	0,51 (0,025) [0,41 - 0,57]	0,51 (0,025) [0,41 - 0,58]
20:1 Gadolinsyre P <sup>1</sup> =0,983; p <sup>2</sup> =0,683	0,15 (0,0040) [0,13 - 0,19]	0,15 (0,0040) [0,13 - 0,17]	0,23 (0,012) [0,18 - 0,28]	0,24 (0,012) [0,19 - 0,28]
20:2 Eikosadiensyre P <sup>1</sup> =0,870; p <sup>2</sup> =0,585	0,046 (0,0040) [0,020 - 0,077]	0,042 (0,0040) [0,019 - 0,062]	0,042 (0,0030) [0,020 - 0,047]	0,040 (0,0030) [0,020 - 0,054]
22:0 Behensyre P <sup>1</sup> =0,367; p <sup>2</sup> =0,022	0,44 (0,0095) [0,39 - 0,49]	0,45 (0,0095) [0,40 - 0,50]	0,54 (0,028) [0,45 - 0,65]	0,56 (0,028) [0,46 - 0,65]
10:0 Kaprinsyre p <sup>2</sup> =0,607	ikke analysert	ikke analysert	0,21 (0,014) [0,16 - 0,26]	0,20 (0,014) [0,14 - 0,25]
17:1 Heptadekansyre p <sup>2</sup> =0,981	ikke analysert	ikke analysert	0,041 (0,0032) [0,019 - 0,047]	0,041 (0,0031) [0,023 - 0,048]

p<sup>1</sup>= feltforsøk i 2007/2008; p<sup>2</sup>=feltforsøk i 2007

**Tabell 7. Resultater fra analyser av aminosyrer i bønner fra testlinjen MON 87701 og kontrollinjen A5547. Fra feltforsøk i Argentina 2007/2008 og USA 2007.**

Komponenter analysert (% av totale fettsyrer)	Argentina 2007/2008 Gj.snitt (S.E.) [Variasjonsområde]		USA 2007 Gj.snitt (S.E.) [Variasjonsområde]	
	Kontroll A5547	MON 87701	Kontroll A5547	MON 87701
Alanin $p^1=0,636$ $p^2=0,027$	1,62 (0,021) [1,43 - 1,75]	1,63 (0,021) [1,55 - 1,78]	1,69 (0,029) [1,59 - 1,82]	1.72 (0,029) [1.66 - 1.84]
Arginin $p^1=0,571$ $p^2=0,138$	2,67 (0,062) [2,34 - 2,97]	2,70 (0,062) [2,41 - 3,03]	2,58 (0,069) [2,37 - 2,89]	2.68 (0,069) [2.36 - 3.00]
Asperginsyre $p^1=0,700$ $p^2=0,339$	4,75 (0,095) [4,01 - 5,18]	4,79 (0,095) [4,22 - 5,62]	4,85 (0,10) [4,46 - 5,34]	4.90 (0,10) [4.61 - 5.26]
Cystin $p^1=0,190$ $p^2=0,718$	0,57 (0,018) [0,46 - 0,69]	0,54 (0,018) [0,41 - 0,70]	0,61 (0,0051) [0,56 - 0,69]	0.62 (0,0051) [0.57 - 0.67]
Glutaminsyre $p^1=0,521$ $p^2=0,177$	7,19 (0,16) [5,49 - 7,82]	7,31 (0,16) [6,35 - 8,41]	7,53 (0,15) [6,89 - 8,26]	7.65 (0,15) [7.25 - 8.21]
Glycin $p^1=0,804$ $p^2=0,007$	1,63 (0,034) [1,42 - 1,77]	1,64 (0,034) [1,49 - 1,79]	1,70 (0,026) [1,64 - 1,85]	1.75 (0,026) [1.63 - 1.89]
Histidin $p^1=0,818$ $p^2<0,001$	1,04 (0,021) 0,90 - 1,19]	1,04 (0,021) [0,92 - 1,17]	1,08 (0,015) [1,03 - 1,15]	1.12 (0,015) [1.05 - 1.18]
Isoleucin $p^1=0,586$ $p^2=0,031$	1,69 (0,030) [1,41 - 1,84]	1,71 (0,030) [1,49 - 1,84]	1,76 (0,037) [1,64 - 1,96]	1.81 (0,037) [1.68 - 1.99]
Leucin $p^1=0,551$ $p^2=0,046$	2,81 (0,043) [2,41 - 3,01]	2,84 (0,043) [2,61 - 3,06]	2,94 (0,066) [2,73 - 3,29]	3.04 (0,066) [2.82 - 3.36]
Lysin $p^1=0,509$ $p^2=0,012$	2,49 (0,045) [2,22 - 2,75]	2,53 (0,045) [2,28 - 2,85]	2,62 (0,060) [2,42 - 2,91]	2.74 (0,060) [2.48 - 2.99]
Metionin $p^1=0,118$ $p^2=0,754$	0,50 (0,014) [0,42 - 0,59]	0,47 (0,014) [0,39 - 0,55]	0,53 (0,012) [0,47 - 0,59]	0.53 (0,012) [0.48 - 0.58]
Fenylalanin $p^1=0,478$ $p^2=0,073$	1,90 (0,038) [1,63 - 2,10]	1,93 (0,038) [1,75 - 2,17]	2,04 (0,056) [1,91 - 2,38]	2.15 (0,056) [1.91 - 2.48]
Prolin $p^1=0,849$ $p^2=0,082$	1,93 (0,029) [1,71 - 2,06]	1,94 (0,029) [1,80 - 2,12]	1,96 (0,035) [1,85 - 2,12]	2.01 (0,035) [1.86 - 2.19]
Serin $p^1=0,533$ $p^2=0,004$	1,89 (0,033) [1,51 - 2,06]	1,91 (0,033) [1,74 - 2,07]	1,96 (0,032) [1,87 - 2,13]	2.03 (0,032) [1.90 - 2.19]
Threonin $p^1=0,601$ $p^2=0,1024$	1,47 (0,024) [1,23 - 1,60]	1,48 (0,024) [1,35 - 1,59]	1,55 (0,020) [1,49 - 1,68]	1.60 (0,020) [1.50 - 1.72]
Tryptophan $p^1=0,001$ $p^2=0,102$	0,49 (0,0058) [0,41 - 0,51]	0,52 (0,0058) [0,49 - 0,56]	0,50 (0,0068) [0,46 - 0,53]	0.51 (0,0068) [0.47 - 0.54]
Tyrosin	1,01 (0,033)	0,99 (0,033)	1,10 (0,034)	1.13 (0,034)

p <sup>1</sup> =0,686 p <sup>2</sup> =0,213	[0,74 - 1,22]	[0,85 - 1,26]	[0,98 - 1,22]	[0,96 - 1,13]
Valin p <sup>1</sup> =0,622 p <sup>2</sup> =0,040	1,81 (0,04) [1,50 - 1,94]	1,83 (0,040) [1,59 - 2,00]	1,86 (0,032) [1,76 - 2,04]	1,92 (0,032) [1,80 - 2,07]

p<sup>1</sup>= feltforsøk i 2007/2008; p<sup>2</sup>=feltforsøk i 2007

### Vitaminer

OECDs konsensusdokument har ikke satt opp vitaminer som komponenter det skal måles for i soya (OECD 2009). Konsensusdokumentet inkluderer imidlertid en oversikt der vitaminene folinsyre, vitamin B1, vitamin B2, vitamin E og vitamin K inngår. I OECD-dokumentet blir det fremhevet at soyabønne er en god kilde til vitaminene folinsyre og vitamin K, og at soyaolje en god kilde til vitamin K. Data vedrørende disse vitaminene kommer fra de internasjonale databasene ILSI, USDA Nutrient database og Stuttgart. Dokumentasjonen knyttet til foreliggende søknad inneholder kun analyser av vitamin E. Det ble påvist signifikante forskjeller mellom testlinje og den nær-isogene kontrollen ved analyse over steder i USA og Argentina for dette vitaminet (p<0.001) (tabell 8). Verdiene ligger imidlertid innenfor typiske verdier som er rapportert i litteraturen, samt toleranseintervallene for referansesortene som inngikk i studien.

**Tabell 8 Resultater fra analyser av vitamin E i prøver fra testlinjen MON 87701 og kontrollinjen A5547. Fra feltforsøk i Argentina 2007/2008 og USA 2007.**

Komponenter analysert (g/100 g tørrvekt)	Argentina 2007/2008 Gj.snitt [Variasjonsområde]		USA 2007 Gj.snitt [Variasjonsområde]	
	Kontroll A5547	MON 87701	Kontroll A5547	MON 87701
Vitamin E	3,42 [2,87-4,11]	4,40 [3,61 – 5,29]	6,24 [4,88- 7,94]	7,69 [6,36 – 9,62]

### Mineraler

OECDs konsensusdokument har ikke satt opp mineraler som komponenter det skal måles for i soya (OECD 2009). Konsensusdokumentet inneholder imidlertid en oversikt der mineralene fosfat, jern, kalium, kalsium, kobber, mangan, magnesium, natrium og sink inngår. I OECD-dokumentet blir det fremhevet at soyabønne er en god kilde til mineralene jern, kalsium, kalium og magnesium. Data vedrørende disse mineralene kommer fra de internasjonale databasene ILSI, USDA Nutrient database, NRC (US National Research Council) og Stuttgart. Søkers dokumentasjon inneholder ingen analyser av mineraler.

Søkers dokumentasjon inneholder ingen analyser av mineraler.

### Isoflavoner (fytøstrogener)

Valget av analyseparametere er gjort i henhold til OECDs konsensusdokument for soya (OECD 2009). I henhold til søkers dokumentasjon er det målt for følgende isoflavoner: daidzein, glycitein, og genistein. Det er funnet statistisk signifikante forskjeller for daidzein (p=0,04) over alle lokaliteter i USA, men ikke i Argentina.. Søker har kun beregnet totalmengdene for isoflavongruppene daidzeiner, genisteiner og glyciteiner over steder (tabell 9).

**Tabell 9. Resultater fra statistiske analyser av ulike isoflavoner i prøver fra testlinjen MON 87701 og kontrollinjen A5547. Fra feltforsøk i Argentina 2007/2008 og USA 2007.**

Komponenter analysert (g/100 g tørrvekt)	Argentina 2007/2008 Gj.snitt [Variasjonsområde]		USA 2007 Gj.snitt [Variasjonsområde]	
	Kontroll A5547	MON 87701	Kontroll A5547	MON 87701
Daidzein	934,74 [826,96 - 1095,41]	960,33 [930,62 - 1090,89]	604,88 [198,95 - 830,65]	667,54 [188,96 - 983,26]
Genistein	858,71 [757,45 - 976,36]	886,75 [778,99 - 960,43]	594,58 [244,95 - 760,87]	655,57 [214,73 - 863,84]
Glycitein	184,78 [136,52 - 217,42]	200,02 [143,11 - 252,60]	156,93 [61,28 - 227,25]	164,87 [61,08 - 228,79]

*Oligosakkarider og antinæringsstoffer*

Valget av analyseparametere er gjort i henhold til OECDs konsensusdokument for soya (OECD 2009) (tabell 10). Variansanalyse over steder viser signifikante forskjeller mellom MON 87701 og kontroll for komponentene staktyose og trypsinhemmer både i USA og Argentina. Verdiene ligger innenfor typiske verdier som er rapportert i litteraturen.

**Tabell 10. Resultater fra analyser av oligosakkarider og antinæringsstoffer fra testlinjen MON 87701 og kontrollinjen A5547. Fra feltforsøk i Argentina 2007/2008 og USA 2007.**

Komponenter analysert	Argentina 2007/2008 Gj.snitt (SD) [Variasjonsområde]		USA 2007 Gj.snitt (SD) [Variasjonsområde]	
	Kontroll A5547	MON 87701	Kontroll A5547	MON 87701
Lektin (H.U./mg råvekt)	3,46 (0,43) [1,60 - 8,39]	2,70 (0,42) [1,48 - 5,03]	0,72 (0,19) [0,28 - 1,28]	0,96 (0,19) [0,062 - 2,01]
Fytinsyre (% tørrvekt)	1,55 (0,12) [1,02 - 2,10]	1,46 (0,12) [0,99 - 1,92]	1,97 (0,12) [1,31 - 2,66]	1,85 (0,12) [1,39 - 2,29]
Raffinose (% tørrvekt)	1,15 (0,039) [0,98 - 1,29]	1,14 (0,039) [0,95 - 1,35]	1,34 (0,19) [0,43 - 1,85]	1,33 (0,19) [0,49 - 1,70]
Staktyose (% tørrvekt)	4,02 (0,11) [3,14 - 4,38]	3,82 (0,11) [3,35 - 4,21]	4,93 (0,63) [2,27 - 6,65]	4,59 (0,63) [1,83 - 6,42]
Trypsinhemmer (TIU/mg t.v.)	27,21 (1,42) [23,45 - 30,96]	27,77 (1,41) [18,89 - 33,26]	28,57 (1,24) [22,49 - 34,20]	26,06 (1,23) [21,65 - 32,53]

*Fosfolipider*

I OECDs konsensusdokument for soya er det foreslått at fosfatider, som er en sekkebetegnelse på fosfolipider, bør måles i lecitin. Konsensusdokumentet spesifiserer imidlertid ikke hvilke fosfolipider som bør analyseres. Søker har ikke analysert for innhold av fosfolipider i soyabønner og i lecitin.

### Prosesserte produkter

Soyabønne blir prosessert til en rekke ulike formål, hovedsakelig fôr, olje og mel (OECD 2009) (vedlegg 1). Avfettet rostet mel blir hovedsakelig benyttet til fôr, mens avfettet mel blir brukt som mat. De ulike proteinfraksjonene fra avfettet soyamel blir brukt i forskjellige matvarer for mennesker. Soyaolje brukes primært i næringsmidler, som matolje og i salatdressinger.

#### *Analyser av soyaolje*

I dokumentasjonen fra Monsanto er det ikke presentert data fra analyser av soyaolje. I henhold til OECDs konsensusdokument (OECD, 2009) er soyaolje en god kilde til vitamin K.

#### Kommentarer fra FG3-medlemmer:

Grønne bladgrønnsaker, vegetabiliske oljer og plantemargarin er gode kilder for vitamin K. Et fermentert soyaprodukt er en god kilde for vitamin K<sub>2</sub>, som er formen som produseres av bakterier. Vitamin K<sub>2</sub> produseres også av bakterier i menneskets tarm. Litteraturstudier utført av EFSA viser at gjennomsnittinntaket hos voksne i europeiske land og USA varierer fra 60 til 250 mikrogram/dag (EFSA 2008). Anbefalt inntak for både barn og voksne er 1 mikrogram/kg kroppsvekt/dag (EFSA 2008).

Etter faggruppens oppfatning er analyser av vitamin K i soyaolje ikke påkrevet. Dette fordi vitamin K-mangel er svært sjelden eller ikke eksisterende hos voksne.

#### *Analyser av allergener fra soya.*

I OECDs konsensusdokument for soya er ett av kapitlene viet allergener i soya. Soyabønner inneholder ca. 16 proteiner som binder IgE (L'Hocine & Boye 2007), og disse betraktes som potensielle allergener. Både uraffinert og raffinert soyaolje er vist å inneholde allergene proteiner (Ramazzoti *et al.* 2008).

OECDs konsensusdokument gir ingen anbefalinger med hensyn på analyser av mulige allergene proteiner i soya.

## 3.3 Agronomiske egenskaper

Registreringer av agronomiske karakterer ble foretatt i feltforsøk i USA og Argentina i 2007 og 2007/2008. De nordamerikanske forsøkene ble etablert på 16 ulike lokaliteter i sentrale dyrkingsområder for soya i USA. Den konvensjonelle soyalinjen A5547, med tilsvarende genetisk bakgrunn som testlinjen men som ikke uttrykker Cry1Ac-protein, ble benyttet som umodifisert kontroll i forsøkene. I tillegg var det inkludert fire kommersielle soyasorter som referansesorter på hvert av forsøksfeltene, til sammen 25 ulike sorter. Testlinje, komparator og referansesorter ble plantet i randomiserte forsøksdesign med tre gjentak per lokalitet. Hver forsøksrute bestod av åtte planterekker, der registreringer av fenotypiske karakterer ble foretatt på to av rekkene. I henhold til søker var dyrkingsregimet for øvrig i tråd med vanlig praksis i den enkelte region der forsøkene var lokaliserte.

De argentinske feltforsøkene ble lagt ut på åtte ulike lokaliteter i områder der en forventer at den kommersielle produksjonen av soyalinjen MON 87701 i hovedsak vil foregå. Forsøksdesign og – opplegg er i hovedsak tilsvarende de nordamerikanske feltforsøkene.

I dokumentasjonen fra søker er det presentert data fra registreringer av fenotypiske og agronomiske karakterer, samt samspill med en rekke miljøfaktorer. Fenotypiske karakterer som ble vurdert inkluderte kvantitative karakterer som vitalitet hos frøplanten, plantetetthet, plantehøyde, legde, tidlighet (målt som antall dager til 50 % blomstring), frøstørrelse og frøavling. I tillegg ble det gjort observasjoner av ulike karakterer knyttet til resistens mot ulike biotiske (sjukdommer, skadedyr) og abiotiske stressfaktorer. I henhold til søkers dokumentasjon er det foretatt statistiske analyser over



lokaliteter for hver av de fenotypiske karakterene. Det er også kjørt statistiske analyser innen hvert av forsøksstedene. Det er ikke foretatt statistiske sammenligninger mellom testlinje og referansesorter, men det er beregnet referanseområde for hver karakter basert på minimums- og maksimumsverdier for de kommersielle sortene.

Resultatene fra de nordamerikanske forsøkene viste ingen signifikante forskjeller mellom testlinje MON 87701 og konvensjonell kontroll for noen av de undersøkte karakterene ved analyse over forsøkssteder (tabell 11). Statistiske analyser innen lokaliteter viste signifikante forskjeller mellom MON 87701 og kontroll for 20 av 140 sammenligninger ( $p < 0,05$ ) (data ikke vist).

Resultatene fra variansanalysen over forsøksfelt i Argentina viser signifikante forskjeller mellom MON 87701 og nær-isogen kontroll for tre av de observerte variablene ( $p < 0,05$ ) (tabell 12). Plantetetthet tidlig i vekstsesongen og vanninnhold i frø ved høsting var signifikant lavere hos den transgene soyalinjen sammenlignet med umodifisert kontroll. Tilsvarende ble det dokumentert signifikant høyere testvekt hos testlinjen sammenlignet med kontroll. Forskjellene i plantetetthet på vekststadium V2-V4 hadde imidlertid ingen effekt på avling eller plantetetthet ved høsting. Gjennomsnittsverdiene for disse karakterene ligger også innenfor variasjonsområdene for referansesortene som var inkludert feltforsøkene. For de øvrige agronomiske karakterene ble det ikke påvist forskjeller mellom MON 87701 og kontroll.

I henhold til søker ble seks karakterer knyttet til abiotisk stress og sjukdomsresistens evaluert på hver av de åtte forsøkslokalitetene fire ganger i løpet av vekstsesongen. Valg av skadegjørere og øvrige parametere ble valgt ut fra relevans i den enkelte region i den aktuelle dyrkingsperioden. Dokumentasjonen inkluderer ikke resultater fra disse observasjonene, og det er ikke utført statistisk analyse av dette datamaterialet. I henhold til søker ble det, med unntak av mottagelighet for mosaikkvirus ved en lokalitet en gang i løpet av vekstsesongen, ikke observert forskjeller mellom testlinje og kontroll for noen av karakterene som ble observert.

### 3.4 Vurdering basert på tilgjengelig datagrunnlag

Analyser av ernæringsmessige komponenter er i hovedsak utført i tråd med OECDs konsensusdokument for soya (OECD 2009). Det er påvist statistisk signifikante forskjeller mellom soya MON 87701 og kontroll i enkeltparametere. Forskjellene er imidlertid ikke konsistente over forsøksfelt, og verdiene for de analyserte komponentene ligger innenfor typiske verdier for andre soyasorter som er rapportert i litteraturen, og innenfor variasjonsområdene til kommersielle referansesorter som er inkludert i søkers dokumentasjon. Faggruppen konkluderer med at forskjellene som er påviste ikke har ernæringsmessig betydning.

Faggruppen påpeker at søker ikke har foretatt analyser av fosfatider i lecitin. Det understrekes at konsensusdokumentet i størst mulig grad skal følges når det legges fram dokumentasjon på nivåene av næringsstoffer, antinæringsstoffer og metabolitter.

Når det gjelder antinæringsstoffene, har søker slått sammen resultatene for de enkelte isoflavoner innenfor hver av isoflavongruppene. Det er stor variabilitet innenfor hver gruppe, og faggruppen etterlyser statistiske analyser for hvert enkelt forbindelse innenfor hver isoflavongruppe.

Feltforsøk over en vekstsesong viser signifikante forskjeller mellom MON 87701 og umodifisert kontroll for enkelte av de agronomiske karakterene som er evaluert. Gjennomsnittsverdiene for disse karakterene ligger imidlertid innenfor variasjonsområdene for referansesortene som var inkludert feltforsøkene. Søker viser til at forskjellene som er påviste er uten biologisk relevans, og konkluderer med morfologisk og agronomisk ekvivalens mellom den transgene linjen MON 87701 og nær-isogen kontroll.

**Tabell 11. Resultater fra variansanalyse over steder for fenotypiske og agronomiske karakterer for testlinjen MON 87701, nær-isogen kontroll A5547, samt kommersielle referansesorter. Fra feltforsøk i USA vekstsesongen 2007.**

Fenotypiske karakterer	MON 87701		Kontroll A5547		Test-kontroll p-verdi <sup>1</sup>	Variasjonsområde referansesorter inkl. RR-sorter <sup>2</sup>		Variasjonsområde konvensjonelle referansesorter <sup>3</sup>	
	Gj. snitt	S.E.	Gj. snitt	S.E.		Min.	Max.	Min.	Max.
Plantetetthet (V2-V4) (antall pl. i 2 av planterk.)	230,7	7,90	233,1	6,19	0,8679	135,9	298,0	135,9	274,9
Frøplantevitalitet (V2-V4) (1-9)	3,7	0,20	3,8	0,20	0,6353	2,3	5,8	2,7	5,8
Tidlighet (R1-R2) (antall dager til 50 % blomstring)	206,5	1,69	206,7	1,67	0,3920	197,6	219,7	200,2	219,7
Plantehøyde (R8) (cm)	81	0,61	78	0,52	0,1075	49,3	102,4	49,3	102,4
Legde (R8) (0-9)	2,0	0,31	1,8	0,24	0,5639	0,0	7,3	0,0	7,3
Tap av knopper (R8) (0-9)	0,6	0,15	0,4	0,09	0,2039	0,0	2,0	0,0	2,0
Plantetetthet (R8)	206,2	8,09	211,7	7,01	0,5621	111,5	284,8	111,5	257,3
Vanninnhold frø (høsting) (%)	13,1	0,40	12,7	0,36	0,2567	10,0	14,7	10,0	14,7
100-frøvekt (g)	16,8	0,36	16,5	0,34	0,4909	13,2	20,6	13,2	20,6
Testvekt (kg/L)	0,71	0,75	0,71	0,83	0,2276	0,65	0,78	0,65	0,78
Avling (kg/ha)	3063	3,14	3164	2,79	0,2320	1174	4595	1174	4595

<sup>1</sup>\*: p<0,05

<sup>2</sup> Minimums- og maksimumsverdier for 23 kommersielt tilgjengelige referansesorter, inkludert Roundup Ready (RR)-soya 40-3-2.

<sup>3</sup> Minimums- og maksimumsverdier for 20 konvensjonelle, kommersielle referansesorter.

**Tabell 12. Resultater fra variansanalyse over steder for fenotypiske og agronomiske karakterer for testlinjen MON 87701, nær-isogen kontroll A5547, samt kommersielle referansesorter. Fra feltforsøk i Argentina vekstsesongen 2007/2008.**

Fenotypiske karakterer	MON 87701		Kontroll A5547		Test-kontroll p-verdi <sup>1</sup>	Variasjonsområde konvensjonelle referansesorter <sup>3</sup>	
	Gj. snitt	S.E.	Gj. snitt	S.E.		Min.	Max.
Plantetetthet (V2-V4) (antall pl. i 2 av planterk.)	96,9* <sup>1</sup>	5,42	105,9	5,50	0,0468	103,8	204,0
Frøplantevitalitet (V2-V4) (1-9)	2,2	0,37	2,1	0,35	0,8288	1,0	6,0
Tidlighet (R1-R2) (antall dager til 50 % blomstring)	48,2	0,17	48,2	0,25	0,8125	39,0	52,3
Plantehøyde (R8) (cm)	99,8	3,65	95,3	3,39	0,1805	73,9	124,2
Legde (R8) (0-9)	3,9	0,29	3,3	0,27	0,0990	0,5	6,7
Tap av knopper (R8) (0-9)	0,2	0,08	0,2	0,08	0,9541	0,0	0,7
Plantetetthet (R8)	90,5	5,38	97,1	5,20	0,1200	86,0	190,3
Vanninnhold frø (høsting) (%)	11,0*	0,21	11,6	0,18	0,0020	9,4	13,2
100-frøvekt (g)	15,8	0,21	16,0	0,23	0,6108	10,9	18,5
Testvekt (kg/L)	171,3*	0,95	169,2	1,14	0,0144	157,0	181,4
Avling (kg/ha)	2,7	0,13	2,5	0,14	0,0523	1,3	3,7

<sup>1</sup>\*: p<0,05

## 4 Dokumentasjon av toksisitet, allergisitet og næringsverdi

### 4.1 Toksisitet

#### *Akutt oral toksisitetsstudie på mus ved eksponering av renfremstilt Cry1A-c protein*

Monsanto har utført en akutt-toksisk studie på mus (studie **CRO-2007-325**) med oral eksponering av Cry1Ac-protein produsert av bakterien *E. coli*. Forsøket er utført i henhold til god laboratoriepraksis (GLP) (EU-direktiv 88/320/EC) og akutt oral toksisitetsretningslinjene fra U.S. EPA og OECD (U.S. EPA Health Effects Test Guidelines, OPPTS 870.1100; Acute Oral Toxicity (August 1998), OECD Guideline for Testing of Chemicals; Method No. 420: Acute Oral Toxicity-Fixed Dose Method; July 17, 1992). Hunn- og hannmus fra stamme Crl:CD-1 ble eksponert for 1290 mg Cry1Ac-protein/kg kroppsvekt. Som kontroll ble det benyttet bovint serumalbumin (BSA) (1280 mg/kg kroppsvekt). Samtlige forsøksdyr ble observert for kliniske tegn på forgiftning over en periode på 15 dager. Observasjonene ble foretatt to ganger daglig på arbeidsdager og en gang daglig i helger.

Følgende parametre ble vurdert: "Unormal oppførsel ved håndtering", pels, skinn, holdning (posture), spyttavsondring, respirasjon, aktivitet/våkeperiode (arousal level), kramper, skjelving, unormale bevegelser, unormalt ganglag ("gait abnormalities"), tåreflyt, palpebral closure, exophthalmus, vurdering av avføring og urin, samt pupillestørrelse. Ved avslutning av forsøket ble alle dyrene avlivet, og bukhole, toraks, samt en rekke organer og vev ble undersøkt makroskopisk. Det ble ikke påvist økt mortalitet eller toksiske effekter på dyrene som ble eksponert for Cry1Ac. Det ble imidlertid påvist signifikant redusert kroppsvekt hos hannmus, men ikke hos hunnmus. Monsanto har foretatt en ny studie på hannmus med 1460 mg Cry1Ac/kg kroppsvekt. Denne studien viste ingen redusert kroppsvekt hos dyr føret med transgent protein sammenlignet med kontrollgruppen. NOAEL for hann- og hunnmus ble satt til henholdsvis 1460 og 1290 mg Cry1Ac-protein/kg kroppsvekt. For BSA ble NOAEL satt til 1280 mg/kg kroppsvekt.

#### Kommentarer fra arbeidsgruppe mat & fôr:

"Acute oral toxicity"-studier (OECD 401 eller 423) er ikke anbefalte studier for beregning av NOAEL, siden disse studiene utføres i løpet av 14 dager. Fra 14 dagers akuttstudier bestemmes LD50, ikke NOAEL. I henhold til OECD retningslinje 401 og 423 "Acute oral toxicity", skal det benyttes tre doser pr kjønn der den høyeste dosen er 2000 mg substans/kg kroppsvekt.

I studien CRO-2007-325 er det oppgitt en EC50, som heller burde ha vært benyttet av søker. Faggruppen påpeker at NOAEL skal vurderes ut fra en 90 dagers repetert dosestudie. I disse sub-kroniske studiene er det benyttet to doser av henholdsvis testfôr og umodifisert kontrollfôr. Faggruppen påpeker at i 90-dagersstudien er forsøksdyrene eksponert over et så langt tidsrom at eventuelle uheldige helseeffekter ville blitt oppdaget. Rottene er også tilført høyere konsentrasjoner av Cry1Ac enn hva mennesker (ca. 5 ganger), og dyr ville vært eksponert for i en naturlig ernæringsmessig situasjon.

#### *Fôringforsøk på broiler*

Søknaden inneholder dokumentasjon fra ett 42-dagers fôringforsøk på Cobb x Cobb 800 broilere. Det ble benyttet totalt 900 dyr. Forsøksdyrene ble fordelt på 9 grupper med 100 dyr per gruppe, halvparten av hvert kjønn (studie **MSL0021800**). Soyabønner som ble benyttet i dette forsøket kommer fra feltforsøk utført i Arkansas, Illinois og Nebraska vekstsesongen 2007. Dyrene ble føret med prosessert mel fra den transgene linjen MON 87701, isogen kontrollinje A5547 og 6 umodifiserte kommersielle sorter. Soyamelet ble undersøkt for mykotoksiner og pesticider, uten at det ble påvist mykotoksiner, organofosfater, organonitrogener, organoklorider eller metylkarbamater. I tidlig vekstfase (0-21 dager) var andelen soyamel i føret ca. 33 %, i mellomvekstfasen og avslutningsfasen (21-42 dager) ca. 30 %. Fôringforsøket ble utført i 2009. Følgende parameter ble undersøkt: mortalitet, vektøkning og

fôreffektivitet. Skrott, bryst, lår, leggmuskel, vinger, og abdominalt fett ble målt både som gjennomsnittlig vekt og som % av kroppsvekt til avkjølte, avlivede broilere. I henhold til søker ble det ikke påvist statistisk signifikante forskjeller mellom testlinjen MON 87701, kontrollinjen A5547 og de seks umodifiserte referansesortene.

#### *Fôringsforsøk på rotter -90 dager*

Monsanto har utført to 13 ukers (90 dagers) toksisitetstester på gnagere (rotter) med fôr som inneholder mel fra MON 87701 og A5547 (**studie WIL-50352,2009 og WIL-50362, 2009**).

#### **1. Studie WIL-50352, 2009**

Fôringsforsøket inkluderte hann- og hunnrotter, total 5 grupper à 12 rotter/kjønn. Forsøksdyrene ble fôret med standard rottefôr (PMI certified Rodent LabDiet #5002) tilsatt 30 % soyamel. Standard rottefôr inneholder normalt 15 % soyamel. LabDiet of Purina Mills Inc. omformulerte standardfôret slik at det ble tilpasset et innhold med 30 % soya. Dette fôret ble tilsatt henholdsvis soya MON 87701, en umodifisert kontrollsort (A5547) og tre kommersielle umodifiserte referansesorter (Anand, UA4805, Ozark). Fôringsforsøket er utført i henhold til GLP (U.S. EPA FIFRA 40 CFR part 160), samt OECDs retningslinjer nummer 408 subkroniske tester på dyr (Guidelines for Testing of Chemicals, Health Effects Test Guidelines, Section 408), U.S. EPA, OPPTS 870.3100 90-Day Oral Toxicity in Rodents, Health Effects Test Guidelines (1998) og Commission Directive 2001/59/EC, Part B.26, Methods for the Determination of Toxicity (2001).

Alle forsøksdyrene ble observert to ganger daglig for døde eller døende individer. Kroppsvekt og fôrintak ble målt på alle dyrene en gang per uke. Gjennomsnittlig inntak av MON 87701 for henholdsvis hanndyr og hunddyr var 22,0 g/kg kroppsvekt/dag og 25,5 g/kg kroppsvekt/dag. Det ble utført detaljerte kliniske undersøkelser, målinger av fôrintak, makroskopiske og mikroskopiske undersøkelser av organene, samt klinisk patologisk undersøkelser av urin og blod fra samtlige dyr i hver gruppe ved avliving. Det ble ikke påvist vesentlige endringer i de undersøkte parametrene. I forhold til hunnrotter i kontrollgruppen, ble det påvist signifikante lavere kroppevekt hos hunnrotter (4,7 % - 9,6 %) fôret med MON 87701. De statistiske forskjellene ble påvist i uke 6 og ukene 9 til 13. Det ble imidlertid ikke påvist signifikante forskjeller i kroppsvekt mellom kontroll- og hannrotter i testgruppen. I henhold til søker ble det ikke påvist andre testrelaterte kliniske endringer.

#### **2. Studie WIL-50362, 2009**

Fôringsforsøket inkluderte både hann- og hunnrotter, totalt 4 grupper à 20 rotter/kjønn. Standard rottefôr inneholder normalt 15 % soyamel. LabDiet of Purina Mills Inc. omformulerte standardfôret slik at det ble tilpasset et innhold med 15 % og 30 % soya. Dette fôret ble tilsatt henholdsvis soya MON 87701 og en umodifisert kontrollsort (A5547).

Studien inkluderte to grupper eksponert for fôr med MON 87701, hhv 15 og 30 % modifisert soya, og to kontrollgrupper eksponert for fôr tilsatt 15 % og 30 % umodifisert kontroll A5547. Det ble ikke brukt kommersielle, umodifiserte referansesorter i dette fôringsforsøket. Fôringsforsøket er utført i henhold til GLP (U.S. EPA FIFRA 40 CFR part 160), samt OECDs retningslinjer nummer 408 subkroniske tester på dyr (Guidelines for Testing of Chemicals, Health Effects Test Guidelines, Section 408), U.S. EPA, OPPTS 870.3100 90-Day Oral Toxicity in Rodents, Health Effects Test Guidelines (1998) og Commission Directive 2001/59/EC, Part B.26, Methods for the Determination of Toxicity (2001).

Alle forsøksdyrene ble observert to ganger daglig for døde eller døende individer. Kroppsvekt og fôrintak ble målt på alle dyrene en gang per uke. Gjennomsnittlig inntak av MON 87701 var 10,8- og 21,1 g/kg kroppsvekt/dag for hanndyr, og 12,0- og 24,3 g/kg kroppsvekt/dag for hunddyr. Det ble utført detaljerte kliniske undersøkelser, målinger av fôrintak, makroskopiske og mikroskopiske undersøkelser av organene, samt klinisk patologisk undersøkelser av urin og blod fra alle dyr i hver gruppe ved avliving. Det ble ikke påvist noen vesentlige endringer i de undersøkte parametrene. I

forhold til hannrotter, både kontroll og testrotter, ble det påvist noe høyere kroppsvekt hos hannrotter (både kontroll og testrotter). I henhold til søker ble det ikke påvist testrelaterte kliniske endringer.

#### Kommentarer fra arbeidsgruppen:

Arbeidsgruppen påpeker at NOAEL burde vurderes ut fra 90-dagers repeterte dosestudier. I disse sub-kroniske studiene er det benyttet to doser av henholdsvis testfôr og umodifisert kontrollfôr. Forsøksdyrene er eksponert over et så langt tidsrom at eventuelle uheldige helseeffekter ville blitt oppdaget. Rottene er også eksponert for høyere konsentrasjoner av Cry1Ac enn hva mennesker (>4 og >7 ganger for henholdsvis barn og voksne, 97,5 persentil (tabell 12)), og dyr ville vært eksponert for i en naturlig ernæringsmessig situasjon.

## 4.2 Allergenitet

### *Cry1Ac-protein*

Med enkelte unntak, er proteiner som er matallergener generelt varme- og syrestabile. Proteinene er stabile både overfor mage- og tarmsafter, og er ofte hovedprotein-komponenter i matvaren. Typiske mengder er fra 1 til 80 % av proteininnholdet. Cry1Ac-proteinet som er benyttet i undersøkelsene for allergenitet er produsert av bakterien *E. coli*. Proteinet er modifisert slik at det er identisk med proteinet som er i MON 87701. Cry1Ac er testet i simulert mage (SGF)- og tarmsaft (SIF). Mengde Cry1Ac i SGF- og SIF-analysene var henholdsvis 176 µg og 280 µg. Nedbrytning av bakterielt produsert Cry1Ac i SGF ved pH 2 er hurtig, og Cry1Ac protein ble degraderer fullstendig innen 30 sekunder. Påvisningsgrensen med fargestoffet Brilliant Blue G på SDS-PAGE gel er 0,0025 µg. Cry1Ac-proteinet ble fragmentert innen 5 minutter i SIF (pH 7,5). Den trypsinresistente delen av proteinet var stabilt i mere enn 24 timer. Påvisningen av Cry1Ac og fragmenter fra proteinet er utført med Western-blot ved bruk av antistoff mot proteinet. Søker hevder med grunnlag i disse testene at proteinet også brytes raskt ned i menneskets mage- og tarmkanal.

Søkers dokumentasjon inkluderer en undersøkelse av glykosylering av Cry1Ac-proteinet. Cry1Ac-protein ble renfremstilt fra 1 kg frø (bønne) fra MON 87701-planter. Analyse av eventuelle bundne suktermolekyler på Cry1Ac-protein ble foretatt med en metode fra firmaet Molecular Probe. Det ble ikke påvist suktermolekyler på Cry1Ac- proteinet.

På bakgrunn av at det ikke ble funnet sekvenshomologi til allergene proteiner, glykosyleringssteder på Cry1Ac-proteinet, samt at mengden av Cry1Ac-protein i bønner fra MON 87701 er målt til ca. 0,0013 % av totalt proteininnhold, konkluderes det med at det er lite sannsynlig at Cry1Ac- proteinet vil utgjøre et allergent potensiale for mennesker.

### *Bt-proteiner*

Flesteparten av *Bacillus thuringiensis* (*Bt*)-plantevernmidler inneholder krystalltoksiner (protoksin) og levende sporer fra *Bt*-bakterien (EHC 1999). Laboratoriestudier med pattedyr indikerer ingen potensielle allergiske reaksjoner mot *Bacillus thuringiensis* eller dets komponenter, innbefattet delta ( $\delta$ )-endotoksinet i krystallproteinene (EHC 1999). Til tross for vel 50 års bruk av plantevernmidler med *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* er det med ett unntak, ingen bekreftede rapporter over øyeblikkelige eller forsinkede allergiske reaksjoner. Dette til tross for betydelig human oral-, dermal- og inhalasjonseksponering (EHC 1999). Helseundersøkelse av en liten gruppe gårdsarbeidere (48 arbeidere) som brukte *Bt*-plantevernmidler viste ved hudtesting en signifikant reaksjon mot *Bt*-sporeekstrakter i forhold til lav- og medium *Bt*-eksponeringsgrupper (Bernstein *et al.* 1999). Lav- og medium-eksponeringsgruppene var ikke i direkte kontakt med *Bt*-plantevernmidler. Positiv hudtest mot *Bt* pro- $\delta$ -endotoksiner ble også påvist hos to arbeidere i gruppen som benyttet *Bt*-plantevernmidler (Bernstein *et al.* 1999).



### 4.3 Vurdering basert på tilgjengelig datagrunnlag

Cry1Ac-proteinet, som uttrykkes som følge av genmodifiseringen, har ingen likheter med kjente allergener eller egenskaper som tilsier at de kan virke som allergener. Basert på testene som er omtalt i søkers dokumentasjon, dvs. at det i proteinet ikke er påvist aminosyresekvenser som er lik allergene proteiners epitoper, at proteinet brytes raskt ned av mage-tarmsaft, samt at konsentrasjonen av Cry1Ac-protein er svært lav (mindre enn 0,002 %), anser faggruppen det som lite trolig at proteinet medfører et signifikant større potensiale for utvikling av matallergi hos mennesker sammenlignet med umodifisert soya. Akutte føringsstudier (oral sondeføring) på mus med reinfremstilt Cry1Ac-protein, 42 – og 90 dagers føringsforsøk med henholdsvis broilere og rotter viste ingen skadelige helseeffekter.

## 5 Vurdering av søkers dokumentasjon, kunnskapshull

### *Adjuvans (fremming av immunreaksjon mot andre stoffer)*

Det har ikke vært utført immunologiske studier med de transgene produktene. Det er vist at Cry1Ac-proteinet binder seg til musetarmoverflaten (Vazquez-Padron *et al.* 2000a) og induserer immunologiske reaksjoner mot seg selv og mot proteiner gitt samtidig (Vazquez *et al.* 1999). Immunologisk kartlegging av systemisk og mukosal immunreaksjon på Cry1Ac har videre påvist at mus lager både systemisk IgM, IgG og sekretorisk IgA etter intraperitoneal og intragastrisk immunisering (Vazquez-Padron *et al.* 2000b). I en annen studie er det vist at Cry1Ac hadde utpreget mukosal adjuvanseffekt ved å potensere IgM-, IgG- og IgA-responsen mot hepatittvirusantigen og bovint serumalbumin som ble gitt med sondeføring samtidig med Cry1Ac (Vazquez *et al.* 1999). Produksjonen av IgE-antistoff, som er knyttet til allergisk reaksjon, ble ikke målt. Også i tidligere studier (Prasad & Shetna 1975) er det påvist adjuvanseffekt av krystallprotein fra *Bacillus thuringiensis*. Adjuvanseffekten av Cry1Ac er bekreftet ved intranasal og intraperitoneal immunisering i to senere publikasjoner med henholdsvis pneumokokk-antigen (Moreno-Fierros *et al.* 2003) og amøbe-lysat (Rojas-Hernández *et al.* 2004). Adjuvanseffekten av Cry1Ac ble funnet å være like sterk som adjuvanseffekten av koleratoksin (Vazquez-Padron *et al.* 1999), som er et mye brukt slimhinneadjuvans i eksperimentelle studier av vaksinasjon og av allergi, og som regnes for å være det sterkeste slimhinneadjuvans vi kjenner.

I en senere studie av Guimaraes *et al.* 2008 (Guimaraes *et al.* 2008) undersøkte man adjuvanseffekter av Cry1Ab i forbindelse med allergisk sensibilisering overfor peanøttekstrakt (PE). Koleratoksin (CT), som er en kjent Th2 adjuvant, ble benyttet for sammenligning. I disse forsøkene ble det ikke induert spesifikk IgE ved bruk av Cry1Ab som adjuvant, mens induksjon av spesifikk IgE ble påvist ved bruk av CT som adjuvant. Imidlertid viste den samme undersøkelsen at når PE ble gitt sammen med Cry1Ab så medførte dette at når musene på et senere tidspunkt ble provosert med PE så økte produksjon av leukotriener (CTC4 og CTE4) i bronkiene umiddelbart. I tillegg ble det 36 timer etter provokasjonen målt økt produksjon av Th2- og Th17 cytokiner og økt influks av neutrofiler og eosinofiler. Det ble dermed konkludert med at Cry1Ab har en adjuvant effekt i forhold til allergi.

Det gjennomsnittlige inntaket av tørket soyabønne er beregnet av Monsanto Company (tabell 13). Det daglige inntaket av disse matvarene i Europa er beregnet som g/person/dag, mens 97,5 persentilen for høyt inntak på verdensbasis er beregnet som g/kg kroppsvekt/dag.



Tabell 13. Estimerer over inntak av soya fra WHO GEMS/Food Programme.

Råvare	DAGLIG INNTAK (g/person/dag)			HØYT INNTAK (g/kg kroppsvekt/dag)	
	Gjennomsnittlig inntak per capita i EU			Høyest 97,5 percentil	
	Cluster B (Sør-Europa)	Cluster E (Sentral-Europa)	Cluster F (Nord-Europa)	Generell befolkning	Barn ≤ 6 år
Soyabønne (tørket)	36,4	35,3	39,2	3,03	5,55

Kilde: Monsanto Company, søknad EFSA/GMO/BE/2010/79.

Spesielle målgrupper, som barn, har et større inntak av soya enn det beregnede gjennomsnittlige inntaket på verdensbasis. Det estimerte inntaket for store porsjoner, 97,5 percentil, for barn under 6 år er beregnet til 5,55 g/kg kroppsvekt/dag, mens inntaket for den generell befolkningen er beregnet til 3,03 g/kg kroppsvekt/dag (tabell 13). Teoretiske beregninger fra søker viser at dersom hele soyainntaket (97,5 percentilen) kommer fra MON 87701 vil dette kunne medføre et inntak for den generelle befolkningen på 18,4 µg/kg kroppsvekt/dag og for barn som er lik eller yngre enn 6 år på 33,7 µg/kg kroppsvekt/dag. Den totale inntaksmengden av Cry1Ac for voksent individ som veier 60 kg og et barn på 6 års som veier 21 kg, vil bli henholdsvis ca. 1100 - og 710 µg/dag. For de estimerte inntaksmengdene av Cry-protein som er presentert her er det ikke tatt hensyn til eventuelle nedbrytning av proteinet ved prosessering. De estimerte inntaksmengdene av Cry-protein antas å representere den høyest tenkelige mengden. Tilsvarende konsentrasjoner av Cry1Ac som er vist å gi mukosal adjuvanseffekt ved sondefôring av mus er fra 0,1 µg til 100 µg per mus (Vazquez *et al.* 1999).

Adjuvansdosene som benyttes for immunisering av mus og mennesker i andre sammenhenger (ved injeksjoner) er ofte av samme størrelsesorden, det vil si at om lag samme dose (ca. 10 µg) brukes til mus og menneske. Det er tvilsomt om denne sammenligningen kan overføres til tarmimmunisering siden den effektive konsentrasjonen av Cry-protein/tarmareal vil bli langt lavere hos menneske enn mus. Teoretisk sett kan konsentrasjonen av Cry1Ac i soya føre til økt utvikling av allergi mot matvarer spist sammen med soyaen, foruten mot soya i seg selv. Man ville vente at adjuvanseffekten kom til syne først og fremst som økt forekomst av allergi mot de matvarene der matallergi fra før er vanligst. IgE ble ikke målt i de refererte studiene av adjuvanseffekt av Cry1Ac-protein.

Et realistisk inntak av Cry-protein vil være vesentlig lavere enn de mengdene som er angitt ovenfor. Soya er en bulkvare hvor flere typer soya fra mange åkre samles i felles siloer før videre prosessering. Man vil således aldri spise 100 % MON 87701. Stort sett spiser vi prosessert soyaprodukter hvor, i mange tilfeller, Cry-protein er helt eller delvis degradert eller er fjernet. Søker oppgir at Cry1Ac - proteinet brytes raskt ned i magesaft. Eksponering av tarmepitel for Cry1Ac-protein forventes dermed å være marginal.

Cry proteiner er ikke varmemestabile. I maisgrøt er det for eksempel vist at konsentrasjonen av Cry1Ab ble redusert med 90 % etter 3 minutters oppvarming ved 75 °C. Proteinene kunne ikke påvises etter steking av tortillas ved 190 °C i 10 s (de Luis *et al.* 2009). Dette innebærer igjen at eksponering av tarmepitel for Cry proteiner vil være marginal hvis maten er kokt eller stekt.

Induksjon av IgE er ikke vist for Cry1Ac Det finnes lite litteratur på området omkring betydning av adjuvanter for induksjon av IgE-mediert allergisk respons. Den foreliggende litteratur tyder i flere tilfeller på at betydningen er liten. I en musemodell for allergiutvikling mot lupin ga bruk av koleratoksine (CT) økt immunrespons for andre klasser av immunoglobuliner, men ingen IgE respons.

Forfatterne antyder at IgE-respons er mer avhengig av indre egenskaper ved allergenene, og ikke relatert til CT-adjuvans (Foss *et al.* 2006). I en lignende rottemodell viste CT også kun en begrenset effekt på utvikling av peanøttallergi (de Jonge *et al.* 2007). De Jonge *et al.* viste også at det var krevende å klare å indusere allergi i rottene. Rotter som gikk på streng diett i 3 generasjoner ga IgE respons, mens rotter som gikk på allergenfri diett i én generasjon ga ikke IgE respons etter indusering. Disse forsøkene indikerer en begrenset betydning av adjuvans for utvikling av IgE-mediert allergi. Utvikling av matallergi skyldes et komplekst samspill av faktorer som genetisk predisposisjon, alder ved introduksjon av allergenet, amming, sammensetning av ernæring, sammensetning av tarmfloraen og infeksjonsstatus i mage-tarmsystemet (van Wijk & Knippels 2007).

## 6 Innspill til EFSA GMO Extranet søknad EFSA/GMO/BE/2010/79

### General comments

There seems to be a misprinting on page 169 in the Technical Dossier where it is stated: “The mean levels of Cry1Ac protein in harvest seed is 4.9%”. According to Table 7 and Table 8 the mean Cry1Ac levels are 4.7 µg/g dw and 5.1 µg/g dw, respectively. The mean Cry1Ac level should therefore be 4.9 µg/g dw, not 4.9%, since 4.9% is 49 mg/g dw.

### D.07.08

#### Toxicology

In the acute toxicity studies in mice, the applicant has used a single dose of Cry1Ac-protein, i.e. 1290 mg/kg body weight. According to the OECD guideline 401 “Acute oral toxicity”, a limit test at one dose level of at least 2000 mg/kg bodyweight should be carried out. In the OECD guideline 423 it is recommended to use 3 doses.

“Acute oral toxicity” studies (OECD 401 or 423) is not recommended studies for evaluation of NOAEL since these studies are only performed for 14 days and will not be able to show long term effects of the substance. According to toxicological practice NOAEL is the lowest dose where there is no adverse effect, i.e. at least one higher dose has to give an adverse effect. The Norwegian GMO Panel is of the opinion that the applicant should use neither NOAEL nor MOE (margin of exposure) when assessing potential health risk from dietary exposure of Cry1Ac derived from MON 87701.

### D 7.09

#### Allergenicity:

According to the applicant the epitope test shows that Cry1Ac protein does not share structurally and immunologically relevant amino acid sequence similarities with known allergens, and that the Cry-protein has no similarities to IgE epitopes of allergenic proteins. However, this Cry-protein has immunogenic potential to elicit strong IgG-response (Vazquez et al. 1999) and the induction of IgG antibodies to food antigen and even crosspriming against a bystander antigen may be of biological significance (Brandtzaeg, 2010). Experimental studies both *in vitro* and *in vivo* have demonstrated that IgG antibodies that are not balanced by a mucosal IgA response can enhance the epithelial penetration of bystander proteins (Brandtzaeg, 2010).

Due to remaining uncertainty that Cry1Ac may enhance systemic and mucosal immune responses to co-administrated antigens, the Norwegian GMO Panel still sees the need for further clarification on the possible role of Cry proteins as adjuvants.

Brandtzaeg, P. (2010) Food allergy: separating the science from the mythology. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 7, 380–400; doi:10.1038/nrgastro.2010.80

Vazquez RI. Moreno-Fierros L. Neri-Bazan L. De La Riva GA. Lopez-Revilla R., 1999. *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac protoxin is a potent systemic and mucosal adjuvant. *Scand J Immunol.*, 49: 578-84.

## Vurdering basert på tilgjengelig datagrunnlag

Analyser av ernæringsmessige komponenter er i hovedsak utført i tråd med OECDs konsensusdokument for soya (OECD 2009). Det er påvist statistisk signifikante forskjeller mellom soyahybrid MON 87701 og kontroll i enkeltparametere. Forskjellene er imidlertid ikke konsistente over forsøksfelt, og verdiene for de analyserte komponentene ligger innenfor typiske verdier for andre soyasorter som er rapportert i litteraturen, og innenfor variasjonsområdene til kommersielle referansesorter som er inkludert i søkers dokumentasjon. Faggruppen konkluderer med at forskjellene som er påvist ikke har ernæringsmessig betydning.

Faggruppen påpeker at søker ikke har foretatt analyser av fosfatider i lecitin. Det understrekes at konsensusdokumentet i størst mulig grad skal følges når det legges fram dokumentasjon på nivåene av næringsstoffer, antinæringsstoffer og metabolitter.

Når det gjelder antinæringsstoffene, har søker slått sammen resultatene for de enkelte isoflavoner innenfor hver av isoflavongruppene. Det er stor variabilitet innenfor hver gruppe, og faggruppen etterlyser statistiske analyser for hvert enkelt forbindelse innenfor hver isoflavongruppe.

Cry1Ac-proteinet som uttrykkes som følge av genmodifiseringen, har ingen likheter med kjente allergener eller egenskaper som tilsier at proteinet kan virke som allergen. Basert på testene som er omtalt i søkers dokumentasjon, dvs. at det i proteinet ikke er påvist aminosyresekvenser som er lik allergene proteiners epitoper, at proteinet brytes raskt ned av mage-tarmsaft, samt at konsentrasjonen av Cry1Ac-protein er svært lave (mindre enn 0,002 % av total proteinmengde), anser faggruppen det som lite trolig at proteinet medfører et signifikant større potensiale for utvikling av matallergi hos mennesker sammenlignet med umodifisert soya.

Akutte 14 dagers fôringsstudier (oral sondeføring EPA-OPPTS (870.1100)) på mus med reinfremstilt Cry1Ac-protein, 90 dagers fôringsforsøk på rotter og 42 dagers fôringsforsøk med broilere viste ingen skadelige helseeffekter. Søker har ikke utført toksisitetsstudier på fisk med fôr som inneholder soya MON 87701.

Faggruppen påpeker at 90-dagers repeterte dosestudier bør benyttes ved fastsettelse av NOAEL. I disse sub-kroniske studiene er det brukt minst to doser av testfôret, samt kontrollfôr av umodifisert soya. Forsøksdyrene er eksponert over et så langt tidsrom at eventuelle uheldige helseeffekter ville blitt oppdaget. Rottene er også eksponert for høyere konsentrasjoner av Cry1Ac enn hva mennesker og dyr ville vært eksponert for i en naturlig ernæringsmessig situasjon.

På bakgrunn fra forsøk med Cry1Ac-protein som er dokumentert i denne søknaden, konkluderer faggruppen med at det er lite sannsynlig at eksponering for Cry1Ac-protein i seg selv, og i de mengder som tilføres via fôr fra den genmodifisert soyaen, vil føre til helseskade hos dyr.

## Referanser

- CERA (2010). Center for Environmental Risk Assessment. GM Database for safety information. [http://cera-gmc.org/index.php?action=gm\\_crop\\_database](http://cera-gmc.org/index.php?action=gm_crop_database)
- Bernstein, I.L., Bernstein, J.A., Miller, M., Tierzieva, S., David I. Bernstein, D.I., Zana Lummus, Z., Selgrade, M.J.K., Doerfler, D.L. & Seligy, V.L. (1999). Immune Responses in Farm Workers after Exposure to *Bacillus Thuringiensis* Pesticides. *Environ. Health Perspect.* **107**(7), 575-582.
- Brandtzaeg, P. (2010) Food allergy: separating the science from the mythology. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **7**, 380–400; doi:10.1038/nrgastro.2010.80
- de Jonge, J. D., Knippels, L.M.J., Ezendam, J., Odink, J. Penninks, A. H. & van Loveren, H. (2007). The importance of dietary control in the development of a peanut allergy model in Brown Norway rats *Methods*, **41**, 99-111.
- de Luis, R., Lavilla, M., Sanchez, L., Calvo, M. & Perez, M. D. (2009). Immunochemical detection of Cry1A(b) protein in model processed foods made with transgenic maize. *European Food Research Technology* DOI 10.1007/s00217-009-1021-4.
- EFSA (2006). *Guidance document of the scientific panel on genetically modified organisms for the risk assessment of genetically modified plants and derived food and feed*. ISBN: 92-9199-019-1. European Food Safety Authority, Parma, Italy. 100 p. [http://www.efsa.europa.eu/en/science/gmo/gmo\\_guidance/660.html](http://www.efsa.europa.eu/en/science/gmo/gmo_guidance/660.html)
- EFSA (2008). Vitamin K2 added for nutritional purposes in foods for particular nutritional uses, food supplements and foods intended for the general population, and Vitamin K2 as a source of vitamin K added for nutritional purposes to foodstuffs, in the context of Regulation (EC) N° 258/971. *The EFSA Journal* **822**, 1- 31.
- EHC (1999). *Bacillus thuringiensis*. Environmental Health Criteria Monograph 217, International Programme on Chemical Safety, World Health Organization, Geneva, 1999.
- EPA-FIFRA(1989). US Environmental Protection Agency, Title 40 CFR, Part 160-Federal Insecticide, Fungicide and Rodenticide Act (FIFRA); Good Laboratory Practice Standards, Final Rule.
- FAOSTAT (2006). <http://faostat.fao.org>
- Foss, N., Duranti, M., Magni, C. & Frøkiær, H. (2006). Assessment of Lupin Allergenicity in the Cholera Toxin Model: Induction of IgE Response Depends on the Intrinsic Properties of the Conglutins and Matrix Effects. *Int Arch Allergy Immunol*, **141**, 141-150 (DOI: 10.1159/000094716).
- Guimaraes, V. D., Drumare, M. F., Ah-Leung, S., Lereclus, D., Bernard, H., Creminon, C., Wal, J. M. & Adel-Patient, K. (2008). Comparative study of the adjuvanticity of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab protein and cholera toxin on allergic sensitisation and elicitation to peanut. *Food and Agricultural Immunology*, **19**, DOI 10.1080/09540100802495651|PII 09540100906477739.
- ILSI (2008). ILSI Crop Composition Database (2008) International Life Science Institute, Washington, DC. Accessible at: <http://www.cropcomposition.org/>.

- L'Hocine, L. & Boye, J.I. (2007). Allergenicity of Soybean: New Developments in Identification of Allergenic Proteins, Cross-Reactivities and Hypoallergenization Technologies. *Crit. Rev. Food Sci. and Nutr.* **47**, 2127-2143.
- Moreno-Fierros, L., Ruiz-Medina, E.J., Esquivel, R., López-Revilla, R., Piña-Cruz, S. (2003). Intranasal Cry1Ac protoxin is an effective mucosal and systemic carrier and adjuvant of *Streptococcus pneumoniae* polysaccharides in mice. *Scand. J. Immunol.*, **57**, 45-55.
- OECD (1997). OECD Series on Principles of Good Laboratory Practice AND Compliance Monitoring, Number 1. OECD Principles on Good Laboratory Practice (revised 1997) ENV/MC/CHEM (98)17.
- OECD (2000). Consensus Document on the Biology of *Glycine max* (L.) Merr. (Soybean). *Series on Harmonization of Regulatory Oversight in Biotechnology, Series on Harmonization of Regulatory Oversight in Biotechnology No.15 document, ENV/JM/MONO (2000)9*.  
[http://www.olis.oecd.org/olis/2000doc.nsf/LinkTo/env-jm-mono\(2000\)9](http://www.olis.oecd.org/olis/2000doc.nsf/LinkTo/env-jm-mono(2000)9)
- OECD (2009). Consensus Document on Compositional Consideration for New Varieties of Soybean: Key Food and Feed Nutrients and Anti-nutrients. Revised document. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.  
[http://www.olis.oecd.org/olis/2001doc.nsf/LinkTo/env-jm-mono\(2001\)15](http://www.olis.oecd.org/olis/2001doc.nsf/LinkTo/env-jm-mono(2001)15)
- Prasad, S.S.S.V. & Shethna, Y.I. (1975). Enhancement of immune response by the proteinaceous crystal of *Bacillus thuringiensis* var *thuringiensis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **62**, 517-521.
- Ramazzoti, M., Mulinacci, N., Pazzagli, L., Moriondo, M., Manao, G., Vincieri, F.F., & Degl'Innocenti, D. (2008). Analytic Investigations on Protein Content in Refined Seed Oils: Implications in Food Allergy. *Food Chem. Toxicol.* **46 (11)**, 3383-3388.
- Rojas-Hernández, S., Rodríguez-Monroy, M.A., López-Revilla, R., Reséndiz-Albor, A.A., Moreno-Fierros, L. (2004). Intranasal coadministration of the Cry1Ac protoxin with amoebal lysates increases protection against *Naegleria fowleri* meningoencephalitis. *Infect. Immun.*, **72**, 4368-4375.
- 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.
- van Wijk, F. & Knippels, L. (2007). Initiating mechanisms of food allergy: oral tolerance versus allergic sensitization. *Biomed. Pharmacother.*, **61**, 8–20.
- Vazquez-Padron, R.I., Martinez-Gil, A.F., Ayra-Pardo, C., Gonzalez-Cabrera, J., Prieto-Samsonov, D.L., De la Riva, G.A. (1998). Biochemical characterization of the third domain from *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxins. *Biochem. Mol. Biol Int.*, **45(5)**, 1011-20.
- Vazquez, R.I., Moreno-Fierros, L., Neri-Bazan, L., De La Riva GA. Lopez-Revilla, R. (1999). *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac protoxin is a potent systemic and mucosal adjuvant. *Scand. J. Immunol.*, **49**, 578-84.
- Vazquez-Padron, R.I., Gonzales-Cabrera, J. Garcia-Tovar, C., Neri-Bazan, L., Lopez-Revilla, R., Hernandez, M., Moreno-Fierro, L., De la Riva, G.A. (2000a). Cry1Ac protoxin from *Bacillus thuringiensis* sp. *kurstaki* HD73 binds to surface proteins in the mouse small intestine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **271**, 54-8.

Vazquez-Padron, R.I., Moreno-Fierros, L., Neri-Bazan, L., Martinez-Gil, A.F., De La-Riva, G.A., Lopez-Revilla, R., (2000b). Characterization of the mucosal and systemic immune response induced by Cry1Ac protein from *Bacillus thuringiensis* HD 73 in mice. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, **33**, 147-55.

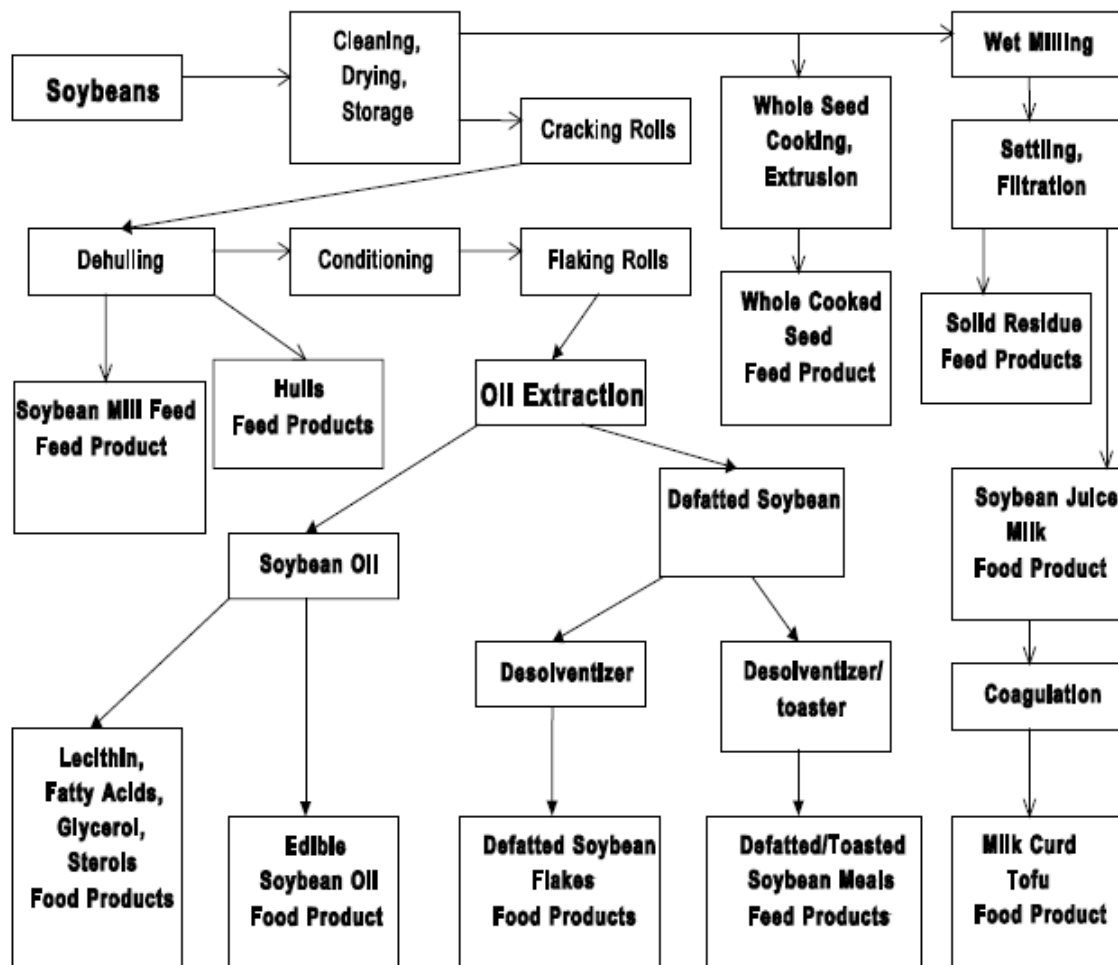


# Vedlegg 1

## Prosessering av soyabønne.

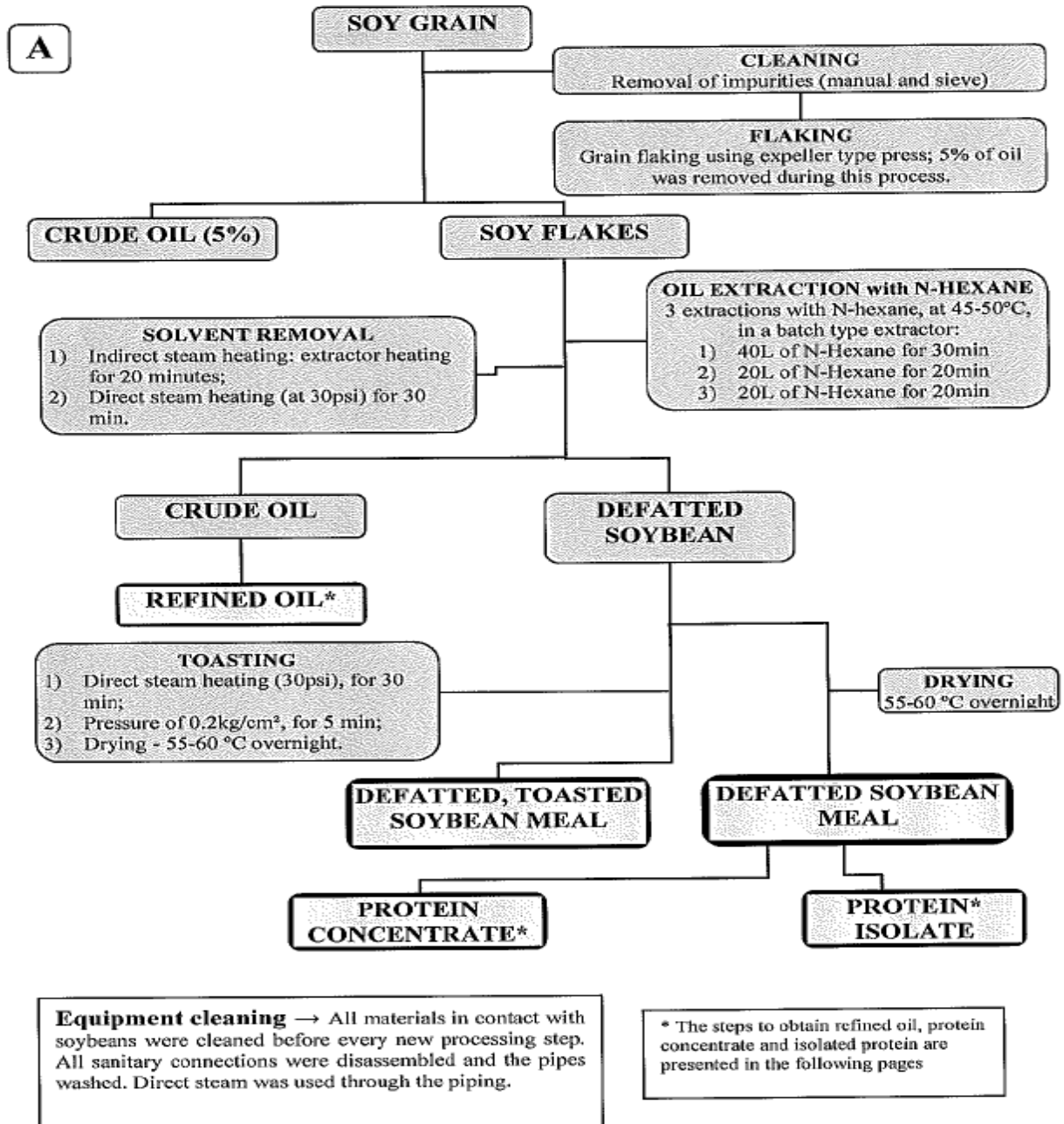
Ved prosessering av soyabønne dannes det en rekke produkter, som olje, proteinisolat, proteinkonsentrat, avfette rostet mel, avfettet mel, fôrprodukter m.m., se oversikt hentet fra OECDs soyadokument. Søker har lagt ved oversikter over produksjon av de forskjellige fraksjonene som ble produsert hos ITAL, se oversikt merket henholdsvis figur A, B og C.

### WHOLE SOYBEAN PROCESSING

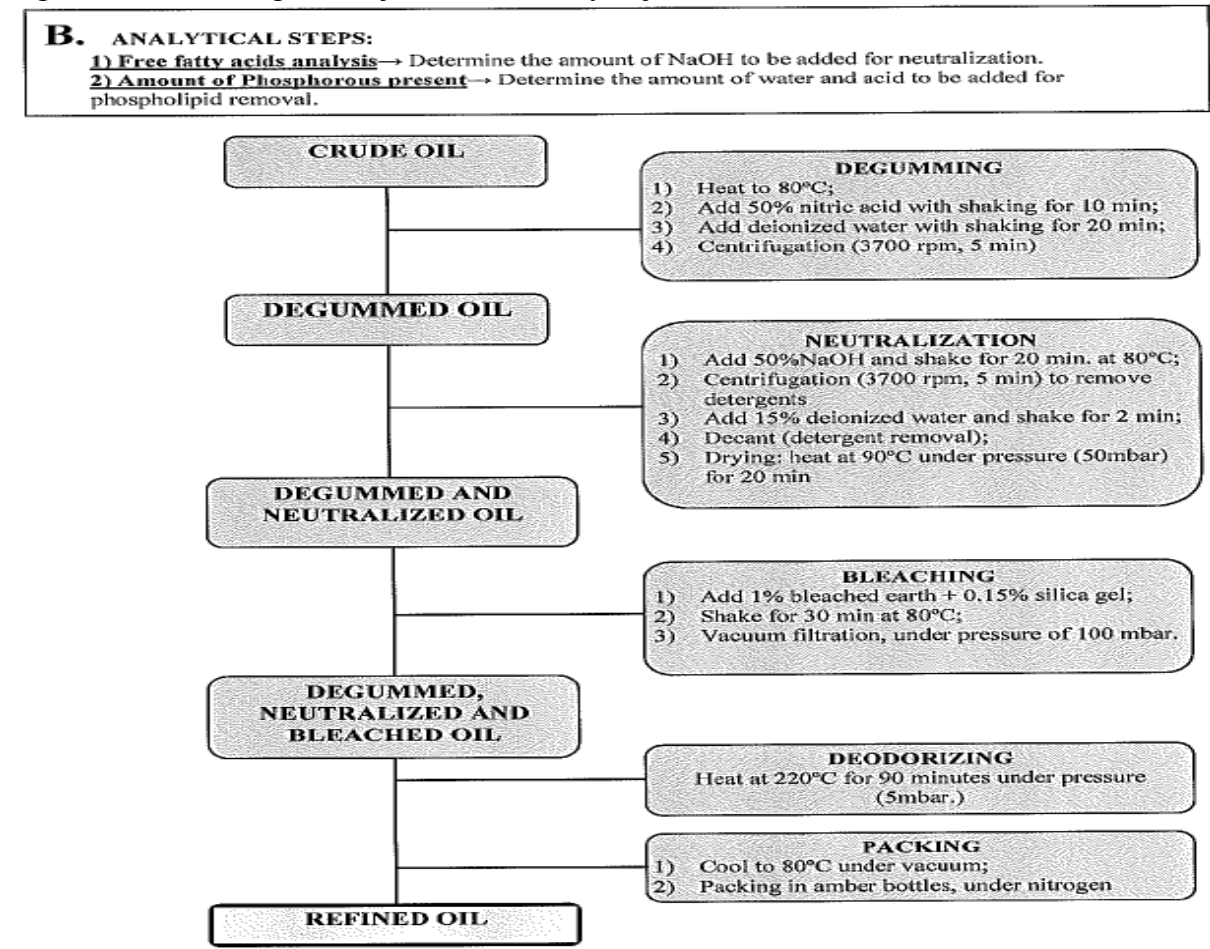


Søkers skjematisk fremstilling av prosessering av soyabønne (figur A), soyaolje (figur B) og proteinisolat og proteinkonsentrat (figur C).

Figur A. Prosessering av soyabønne



Figur B: Prosessering av råolje til raffinert soyaolje



Figur C: Prosessering av avfettet soyamel til proteinisolat og proteinkonsentrat.

