



## **UTTALELSE OM SYNGENTA GENMODIFISERTE MAIS EVENT 3272 (EFSA/GMO/UK/2006/34)**

### **Vurdert og godkjent av Faggruppe for genmodifiserte organismer**

**DATO:06.10.07**

#### **SAMMENDRAG**

Vurderingen av den genmodifiserte maislinjen EVENT 3272 fra Syngenta er utført av Faggruppe for genmodifiserte organismer under Vitenskapskomiteen for mattrygghet. Mattilsynet (MT) ber Vitenskapskomiteen for mattrygghet om å vurdere den genmodifiserte maislinjen EVENT 3272. Søknaden omfatter bruksområdene mat, fôr, import og prosessering.

Hybriden EVENT 3272 er fremkommet ved genmodifisering av maislinjen A188. I henhold til Syngenta er formålet med EVENT 3272-maisen å gjøre den bedre egnet for produksjon av etanol, ved at stivelse i maiskorn omdannes til dekstrin, glukose og maltose under tørr-maling av kornene. Maisen har også toleranse overfor sukkerarten mannose. Biprodukter fra etanolproduksjonen skal benyttes som fôr.

Vurdering av den genmodifiserte maisen er basert på den dokumentasjonen som er gjort tilgjengelig på EFSA's nettside GMO EFSA-net. Maisen EVENT 3272 er vurdert i henhold til tiltenkt bruk og de prinsipper som er lagt til grunn i EFSA's retningslinjer for risikovurdering av genmodifiserte planter (EFSA 99, 2004) og Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) konsensusdokument for mais (OECD 2002). Den vitenskapelige vurderingen omfatter transformeringsprosessen, bruk av vektor og det transgene konstruktet, komparativ analyse av ernæringsmessig kvalitet, mineraler, kritiske toksiner, antinæringsstoffer, allergener og nye proteiner.

Analysene av ernæringsmessige viktige komponenter ble vurdert. Det er funnet statistiske forskjeller for enkelte komponenter. For noen av komponentene var forskjellene for variabel til at det kunne gjøres statistikk på effekter som teoretisk kan skyldes genmodifiseringen. De statistiske forskjellene for flere av disse komponentene er ikke konsistente da forskjellene som er påvist i enkelte forsøksfelt, ikke er påvist i de andre forsøksfeltene. Faggruppen anser analysene for å være tilstrekkelige for en vurdering av linje EVENT 3272 til bruk som mat og fôr.

Maislinjen inneholder ikke antibiotikaresistensgener.

Informasjon vedrørende allergenisitet viser at for de parametre som er målt, har ikke de uttrykte proteinene likheter med kjente allergener eller egenskaper som tilsier at de er allergener.

#### **NØKKELOD**

Genmodifisert mais, EVENT 3272,  $\alpha$ -amylase-gen, *amy797E*-gen, AMY797E  $\alpha$ -amylase, mannosetoleranse, fosfomannose-isomerase-gen, *manA*-gen, fosfomannoseisomerase (PMI), helsemessig trygghet, helse.

#### **BAKGRUNN**

Faggruppe for genmodifiserte organismer under Vitenskapskomiteen for mattrygghet er blitt bedt av Mattilsynet (MT) om en vitenskapelig risikovurdering av EFSA/GMO/UK/2006/34 genmodifisert mais (EVENT 3272) til bruk i næringsmidler og fôrvarer. Vurdering av den genmodifiserte maisen er basert på den dokumentasjonen som er gjort tilgjengelig på EFSA's nettside GMO EFSA.net. EVENT 3272 er vurdert i henhold til tiltenkt bruk og de prinsipper som er lagt til grunn i EFSA's dokument "Guidance document of the scientific panel on genetically modified plants for the risk assessment of genetically modified plants and derived food and feed" (EFSA 99, 2006). Ved vurdering av vesentlig likhet har Faggruppen lagt vekt på OECDs konsensusdokument for mais (OECD 2002) og dens anbefaling av hvilke parametre som bør undersøkes.

I henhold til Vitenskapskomiteen for mattrygghets uttalelse på møtet i 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, dvs. ved en noe forenklet risikovurdering. Det vil imidlertid bli tatt hensyn til særnorske forhold der slike kan påvises.

Det er kun medlemmene i Faggruppen som har vurdert den genmodifiserte maisen.

#### **OPPDRAK FRA MATTILSYNET**

I sitt brev ber Mattilsynet Vitenskapskomiteen for mattrygghet om å vurdere den genmodifiserte maisen. Bruksområdet som søknaden gjelder for er import, prosessering, næringsmidler og fôrvarer i henhold til EUs Forordning (EC) nr. 1829/2003, artiklene 5 og 17. Søknaden gjelder ikke for kultivering, og krever derfor ikke vurdering for miljørisiko i henhold til Direktiv 2001/18/EØF. Mattilsynet ber VKM om vurdering av helseaspekter ved disse produktene, og legge risikovurderingen inn på EFSA.net, og sende kopi av vurderingen til Mattilsynet.

Produktet som ønskes vurdert er:

Genmodifisert mais, EFSA/GMO/UK/2005/34 (EVENT 3272). Unik kode er SYN-E3272-5.

Status i EU: Søknad under 1829/2003/EF. EFSA's frist for innspill er 06.10.07.

## RISIKOVURDERING

### Innledning

Den genmodifiserte maishybriden EVENT 3272 ble vurdert ut fra Mattilsynets oppdrag. I henhold til Syngenta er formålet med den genmodifiserte maisen å gjøre den bedre egnet for produksjon av etanol ved å erstatte behovet for ekstern tilførsel av  $\alpha$ -amylaseenzym under tørr-maleprosessen. Biprodukter fra etanolproduksjonen vil bli brukt som komponenter i dyrefôr. Syngenta hevder at utilsiktet innblanding av små mengder EVENT 3272 i annen mais som brukes til mat og fôr, ikke kan utelukkes. Derfor søkes det for import, prosessering, bruk som næringsmidler, fôrvarer og industrielle produkter, men ikke for dyrking. Primærbruken av maiskorn i Norge i dag er til dyrefôr, men mais brukes også til industriell produksjon av etanol, maismel, popkorn, raffinert stivelse og søtningsprodukter.

Faggruppe for genmodifiserte organismer har på faggruppemøtet 02.02.05 vedtatt å bruke EFSA's retningslinjer som gruppens 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 plants for the risk assessment of genetically modified plants and derived food and feed" (EFSA 99, 2006).

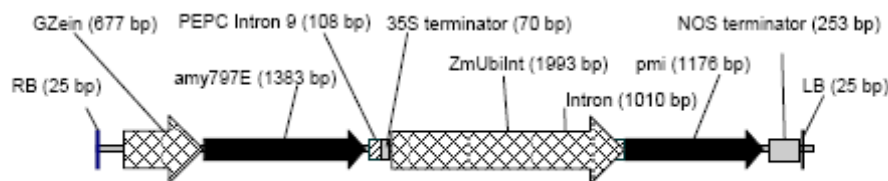
Faggruppe for genmodifiserte organismer vurderer søknaden om markedsføring av genmodifisert mais (EFSA/GMO/UK/2006/34) til bruk i næringsmidler og fôrvarer under forordning 1829/2003.

### Bakgrunnsinformasjon

Beskrivelse av de innsatte genene:

Den genmodifiserte maislinjen EVENT 3272 uttrykker  $\alpha$ -amylase og mannosetoleranse ved at et lineært DNA fragment fra plasmidet pNOV7013, ble overført med *Agrobacterium*-mediert transformasjon til embryomaisceller fra maislinjen A188. DNA-fragmentet inneholder ikke antibiotika-resistensen. Dette DNA fragmentet inneholder følgende gener og DNA elementer (se figur):

- a) *GZein* promoter fra mais, fra 27-kDa lagrings protein (zein-gen), gir endospermspesifikk ekspresjon i mais
- b) *amy797E* gen, en modifisert versjon fra archaeobakterien *Thermococcales*. Genet uttrykker termostabil AMY797E  $\alpha$ -amylase enzym. Genet er en kimær som inneholder genelementer fra mais, og er optimalisert for uttrykk i mais. AMY797E  $\alpha$ -amylase spalter  $\alpha$ -1,4-glykosidbindinger i stivelse slik at det dannes dekstrin, glukose og maltose.
- c) *PEPC9* Intron 9 fra fosfoenolpyruvatkarboksylase gen fra mais
- d) *35S* terminator, kommer fra blomkålmosaikkvirus.
- e) *ZmUbiIntron* promoter fra mais polyubiquitin gen, inneholder genets første intron.
- f) *Pmi* gen fra bakterien *E. coli*. *pmi* gen uttrykker enzymet fosfomannose-isomerase (PMI). PMI katalyserer isomerisering av mannose-6-fosfat til fruktose-6-fosfat. Enzymet er en seleksjonsmarkør.
- g) *NOS* terminator, kommer fra *Agrobacterium*



Figur: Lineært rekombinant DNA-fragment satt inn i maisgenomet. DNA-fragmentet kommer fra plasmidet pNOV7013. Størrelsen på fragmentet i maisgenomet er ca. 6100 bp.

### *Karakterisering av geninnsettingen*

Southern blot-, PCR- og sekvensanalyse viser at et rekombinante DNA-fragment på ca 6100 bp fra pNOV7013 er satt inn i genomet til maisen. Sekvenseringsanalyser av DNA fra BC4 (tilbakekrysning 4 ganger med mais NP2222) viser at det er blitt kuttet bort 23 bp fra RB(høyre grense) og 7 bp fra LB(venstre grense) av DNA fragmentet. Disse endringene har ikke resultert i endringer i enzymenes funksjoner.

Western blot og påvisning med polyklonale antistoffer viser at både AMY797E  $\alpha$ -amylase, og PMI proteinene har de forventede molekylvektene. AMY797E  $\alpha$ -amylase ble påvist i alt plantevev med unntak i pollen. Mengdene av AMY797E  $\alpha$ -amylase, i hel plante, rot og stengel er fra ca.  $<0,02$  – ca.  $3 \mu\text{g/g}$  tørrvekt. Gjennomsnittsverdier i alle stadier av korn er fra ca.  $1004$  –  $3365 \mu\text{g/g}$  tørrvekt. PMI ble påvist i lave mengder i de fleste vev. Gjennomsnittsmengde i alle stadier av korn er  $<0,5$  –  $1,8 \mu\text{g/g}$  tørrvekt. Høyest mengde ble funnet i pollen, fra  $17,0$  –  $18,2 \mu\text{g/g}$  tørrvekt.

### *Påvisning av åpne leserammer (ORF)*

Det er gjort studier for å påvise kodende sekvenser. Det er ikke påvist åpne leserammer.

Den genmodifiserte maisen ble tilbakekrysset henholdsvis 4 og 3 ganger med maislinjen NP2222 og NP911. Frø fra tre tilbakekrysnings-generasjoner ble undersøkt. Blad fra de tre generasjonene ble undersøkt for AMY797E  $\alpha$ -amylase og PMI med Southern blot analyse. Analysene viser at det rekombinante DNA fragmentet er stabilt over tre tilbakekrysnings-generasjoner.

Det konkluderes med at det er kun én kopi av ekspresjonskassetten i EVENT 3272. Sammenlignende DNA-analyser mellom de forskjellige generasjonene fra hybridene EVENT 3272 viser at bruttostørrelsen på det innsatte DNA-fragmentet er intakt.

### Dokumentasjon av ”vesentlig likhet”

Analyser av ernæringsmessige viktige komponenter ble foretatt av to EVENT 3272 hybrider (A1 og B1) og to umodifiserte hybrider (A2 og B2) fra 6 separate forsøksfelt i USA for 2003, samt analyser av EVENT 3272-hybrid B3 og umodifisert hybrid B4 fra 7 separate forsøksfelt i USA for 2004. De umodifiserte hybridene som er det benyttet har samme genetisk bakgrunn

som de genmodifiserte plantene. EVENT 3272 og umodifiserte hybrider ble plantet i randomiserte blokkmønstre, tre plotreplikater per lokalitet. Fra hver lokalitet ble det tatt ut kornprøver som bestod av aks fra 15 planter av hver hybrid. Disse kornprøvene ble tatt fra hvert plotreplikat.

Hovedkomponenter i maiskorn og andre plantedeler:

Valget av analyseparametre er gjort i henhold til OECDs (OECD 2002) konsensusdokument for mais, og det er analysert for flertallet av de parametrene som er anbefalt i OECD dokumentet. Det ble analysert for protein, fett, aske, karbohydrater, ADF (acid detergent fibre), NDF (neutral detergent fibre), total fiber, vann, aminosyrer, fettsyrer (5 stykker), fosfat, kobber, jern, kalium, kalsium, kromat, magnesium, mangan, natrium, selen, sink, vitaminer (Vit. B1(tiamin), vit. B2 (riboflavin) vit. B3(niacin), vit. B6, vit C, vit E (flere tokoferoler),  $\beta$ -karoten og karotenoiden kryptoxantin), de sekundære metabolittene ferulsyre, p-kumarsyre, furfural og inositol, samt anti-næringsstoffene fytinsyre, trypsinhemmer og raffinose. Analysene ble utført under god laboratoriepraksis (GLP).

Det er funnet statistiske forskjeller i mengde protein for en av EVENT 3272-hybridene (B1) men ikke for de andre, i mengde TDF (EVENT 3272-B1 og -B3) og karbohydrater (B1), men de signifikante forskjellene er ikke konsistente for alle hybridene.

Fettsyresammensetning i maiskorn:

Fettsyresammensetningen for EVENT 3272 er målt i henhold til OECDs konsensusdokument for mais. Det ble analysert for 5 fettsyrer. Det er ikke funnet statistiske forskjeller mellom forsøksfelt, og verdiene ligger innenfor typiske verdier for andre maissorter som er rapportert i litteraturen.

Aminosyrer i maiskorn:

Analyser av aminosyrer er gjort i henhold til OECDs konsensusdokument. Det er målt for 18 aminosyrer. Hybrid B1 har større mengder av alle aminosyrene enn umodifisert B2-hybrid, og forskjellene er statistisk signifikante, men disse forskjellene ble ikke påvist for de to andre hybridparene (dvs. A1/A2 og B3/B4). Det er funnet for begge vekstsesongene statistiske større mengde tryptofan i de tre genmodifiserte hybridene i forhold til umodifisert hybrider. Forskjellene som ble målt er innenfor 15 %, og for alle aminosyrene ligger verdiene innenfor de typiske verdiene som er rapportert i litteraturen.

Vitaminer:

Vitaminer som i henhold til OECDs konsensusdokument for mais bør undersøkes for er A, B1, B2, B6, E, folat og niacin. Det er ikke målt for vitamin A, men for provitaminet beta-karoten og karotenoidet kryptoxantin. Det er også målt for alfa-, beta-, delta- og gammatokoferol. Det er funnet statistiske forskjeller for flere vitaminer. For noen av vitaminene var genotype- x lokalitetinteraksjonseffekter for variabel til at det kunne gjøres statistikk på genotypeffekter. De observerte forskjellene er ikke konsistente da de variable effektene er funnet i en til to lokaliteter, men ikke i alle tre. Gjennomsnittsverdiene er innenfor typiske verdier som er rapportert i litteraturen.

**Mineraler:**

Mineralene som er målt er i henhold til OECDs konsensusdokument for mais. Mais er en viktig selenkilde i dyrefôr (Watson 1987). Det er også målt for mangan. Det er ikke påvist store statistiske forskjeller for noen av mineralene. For natrium og selen var mengdene i flere av prøvene lavere enn påvisningsgrensen. De statistiske forskjellene som er påvist er små og ligger innenfor typiske verdier for andre maissorter som er rapportert i litteraturen.

**Sekundære metabolitter og antiernæringskomponenter:**

Det er analysert for fenolsyrene ferul- og p-koumarinsyre, furfural, fytinsyre, inositol, proteasehemmeren trypsinhemmer og for raffinose. Det er funnet statistiske forskjeller for inositol og ferulsyre for hybridparet B3/B4, men ikke for de to andre hybridparene. Forskjellene er mindre enn 14 %. Verdiene for alle analysene ligger innen for typiske verdier som er rapportert i litteraturen.

**Delkonklusjon:**

Det er funnet statistiske forskjeller i enkeltparametre. Verdiene for de enkelte analyserte komponentene ligger innenfor typiske verdier for andre maissorter som er rapportert i litteraturen.

Faggruppen anser at de forskjellene som er påvist, ikke har noen helsemessig betydning.

**Dokumentasjon av toksisitet og allegenisitet****Toksisitet:**

Søknaden inneholder dokumentasjon på akutt fôringsforsøk med renfremstilt PMI fra bakterier og lyofilisert AMY797E  $\alpha$ -amylase fra 3272-maiskorn, samt et 49- og 90 dagers fôringsforsøk med maismel fra modifiserte og umodifiserte maiskorn.

**Akuttstudie:**

Det er utført akutt studie på mus med PMI og AMY797E  $\alpha$ -amylase protein. Studiene er utført i henhold til EUs (EEC 1992), EPAs (EPA 1998a) og OECDs (OECD 1987) retningslinjer for oral akuttoksisitetsstudier. PMI er fremstilt fra bakterier, mens AMY797E er fremstilt fra maiskorn. Testsubstansen fra maiskorn inneholder ca. 42 vekt-% AMY797E  $\alpha$ -amylase protein. Mus ble føret AMY797E  $\alpha$ -amylase, mengde er 1511 mg/kg kroppsvekt (dvs. 635 mg AMY797E/kg kroppsvekt), og PMI, mengde er 3030 mg/kg kroppsvekt, ved sondeføring. Det er benyttet 5 hann- og 5 hunnmus i studiet med AMY797E-proteinet og 7 hann- og 6 hunnmus i studiet med PMI. Hjerne, lever, nyrer, bitestikler, testikler, ovarier, binyrer, og milt ble veid og utvalgt vev ble tatt ut for histopatologiske studier. Det er ikke vist tegn på toksisk påvirkning i noen av forsøkene etter 14 dager. Dyrene ble avlivet og det er ikke påvist organskader ved grov patologisk undersøkelse. Det var heller ikke påvist testrelaterte endringer i kroppsvekt, forinntak, organvekt og makro- og mikroskopisk patologi. Faggruppen finner disse studiene tilfredsstillende. Generelt, med unntak for allergene proteiner, er proteiner ikke akuttoksiske.

Faggruppen konkluderer med at AMY797E  $\alpha$ -amylase og PMI ikke er akutt toksisk?

#### Fôringsforsøk på rotter:

Det ble utført et 13 ukers fôringsforsøk med hann- og hunnrotter, 4 grupper à 12 rotter/kjønn. Studien er gjort i henhold til EPAs (EPA 1998b) og OECDs (OECD 1998) retningslinjer for sub-kroniske toksisitetstudier. Fôret bestod av 10 % og 41,5 % (vekt/vekt) maiskorn fra EVENT 3272 og foreldrelinje (EVENT 3272 negativ isolinje). I korn og de to fôrene er det undersøkt for mengde AMY797E  $\alpha$ -amylase og PMI. Mengde av AMY797E  $\alpha$ -amylase i korn og i de to fôrblandingene er henholdsvis 1519, 449 og 88  $\mu\text{g/g}$  tørrvekt, PMI-mengde er henholdsvis ca. 3,95, 1,09 og  $<0,27$   $\mu\text{g/g}$  tørrvekt. I foreldrelinjen er det påviste AMY797E  $\alpha$ -amylase, og mengden i korn og de to fôrblandingene er på henholdsvis ca. 0,1 % (= ca. 1  $\mu\text{g/g}$ ), 0,2 % (= ca. 0,9  $\mu\text{g/g}$ ) og 0,1 % (= ca. 0,1  $\mu\text{g/g}$ ). Undersøkelser og kliniske observasjoner av dyrene samt analyser av forskjellige parametere er utført i henhold til EPAs og OECDs retningslinjer. Det ble ikke påvist testrelaterte endringer for noen av dyrene.

#### Fôringsforsøk på broiler:

Søknaden inneholder dokumentasjon fra 49-dagers fôringsforsøk på broilere, 900 dyr, fordelt i seks grupper à 150 dyr, 36 bur à 25 hunn eller hann, som ble fôret med henholdsvis mais fra EVENT 3272, foreldrelinje (EVENT 3272 negativ) og en kommersiell maissort fra Nord-Carolina, NC 2004. Gjennomsnittlig mengde AMY797E  $\alpha$ -amylase- og PMI-protein i korn og fôr er henholdsvis 864-1640  $\mu\text{g/g}$  tørrvekt og 0,77-2,12  $\mu\text{g/g}$  tørrvekt. I foreldrelinjen er det påvist lave mengder av AMY797E tilsvarende 1,6-2,6 % av mengdene i genmodifisert korn. Det er ikke funnet tilsvarende mengder i den kommersielle maisen NC2004. I henhold til søker er det ikke påvist testrelaterte statistiske endringer i de parametrene som ble målt.

Faggruppen konkluderer med at det på bakgrunn av disse forsøkene er ingen grunn til å anta at den ernæringsmessige kvaliteten til den genmodifiserte maisen er forskjellig fra umodifisert mais.

#### Allergenitet:

For AMY797E- og PMI-enzymet er det foretatt sammenligning med allergene aminosyreepitoper i Syngenta Biotechnology, Inc. (SBI) Allergen Database. I denne databasen er det sammenstilt fra offentlige proteindatabaser oppføringer som er identifisert som allergener eller mulige allergener, samt fra vitenskapelige litteratur aminosyresekvenser som er identifisert som allergener eller mulige allergener. For AMY797E er det funnet en epitoplighet til Per a 3 proteinet fra amerikansk kakerlakk. For PMI er det funnet en epitoplighet til  $\alpha$ -parvalbumin fra frosk. Det er ikke funnet andre epitopligheter til allergener. Sammenligning av andre karakteristika for allergener som molekylvekt, glykosilering, stabilitet overfor varme, fordøyelse, serum fra en person med  $\alpha$ -parvalbuminallergi, etc. viser at disse to proteinene ikke ligner allergener i så henseende.

#### Delkonklusjon:

Faggruppen konkluderer med at det på bakgrunn av disse forsøkene er ingen grunn til å anta at den ernæringsmessige kvaliteten til den genmodifiserte maisen er forskjellig fra umodifisert mais, og at AMY797E  $\alpha$ -amylase og PMI ikke er akutt toksisk.

## **KONKLUSJON**

Det er funnet statistiske forskjeller i enkeltparametre, men verdiene for de enkelte analyserte komponentene ligger innenfor typiske verdier for andre maissorter som er rapportert i litteraturen. Faggruppen anser at disse forskjellene ikke har noen helsemessig signifikans. Faggruppen konkluderer med at det på bakgrunn av den tilgjengelige informasjonen ikke er grunn til å anta at den ernæringsmessige kvaliteten til den genmodifiserte maisen EVENT 3272 er forskjellig fra umodifisert mais.

Studier viser at proteinene AMY797E  $\alpha$ -amylase og PMI ikke er akutt toksiske. Syngenta har utført sub-kroniske studier på rotter og kyllinger med EVENT 3272. Faggruppen konkluderer med at det er lite sannsynlig for at eksponering for AMY797E  $\alpha$ -amylase og PMI-proteinet i seg selv og i de mengder som tilføres via genmodifisert mais, er helsemessig betenkelige.

## **VURDERT AV**

### Faggruppe for genmodifiserte organismer:

Knut Berdal (leder), Jihong Liu Clarke, Sonja Klemsdal, Helge Klungland, Casper Linnestad, Anne I. Myhr, Audun Nerland, Ingolf Nes, Kåre M. Nielsen, Hilde-Gunn O. Sorteberg, Odd E. Stabbetorp, Vibeke Thrane.

Koordinator fra sekretariatet: Arne Mikalsen



**REFERANSER**

EEC 1992. EEC Methods Number B.1 Acute Toxicity (Oral).

EFSA 99, 2006. ” Guidance document of the scientific panel on genetically modified plants for the risk assessment of genetically modified plants and derived food and feed”.

EPA 1998a. EPA Health Effects Test Guidelines; OPPTS 870.1100.

EPA 1998b. U.S. EPA Health Effects Test Guidelines OPPTS 870.3100, 90-Day Oral Toxicity in Rodents (1998).

OECD 1987. OECD Guidelines No. 401 Acute Oral Toxicity

OECD 1998. OECD Guideline for the Testing of Chemicals Section 4: Health Effects, Number 408 (1998)

OECD 2002. Consensus Document on Compositional Consideration for New Varieties of Maize (*Zea Mays*): Key Food and Feed Nutrients, Anti-nutrients and Secondary Plant Metabolites, No. 6, Series on Safety of Novel Foods and Feeds.