

Arachidonzuurrijke olie SUNTGA40S

Arachidonic acid rich oil SUNTGA40S

Beoordeling van de veiligheid voor de consument, volgens de Europese verordening 258/97 betreffende nieuwe voedingsmiddelen en nieuwe voedsel ingrediënten

Assessment of safety for the consumer, in accordance with European Regulation 258/97 concerning novel foods and novel food ingredients

aan/to:

de Minister van Volksgezondheid, Welzijn en Sport/
the Minister of Health, Welfare and Sport

Nr. 2005-03BNV, Den Haag, 19 oktober 2005
No. 2005-03BNV, The Hague, 19 October 2005

Inhoudsopgave

Samenvatting en conclusies	4
1 Inleiding	6
1.1 Nederlandse beoordelingsprocedure	6
1.2 Het gebruik van arachidonzuurrijke en docosahexaeenzuurrijke oliën in zuigelingenvoeding in de EU	7
2 Volledigheid en juistheid van het dossier	9
2.1 Administratieve gegevens	9
2.2 Algemene beschrijving van het voedselingrediënt	9
2.3 Classificatie van het voedselingrediënt voor beoordeling	9
2.4 Informatievergaring over het voedselingrediënt	9
2.5 Beknopt overzicht door de aanvrager	10
2.6 Overige beoordelingen	10
2.7 Etiketteringsvoorstel van de aanvrager	11
3 Interpretatie en evaluatie van de voorgelegde gegevens	12
3.1 I Specificatie van het nieuwe voedselingrediënt	12
3.2 II Effecten van het gevolgde productieprocédé op het voedselingrediënt	12
3.3 III Achtergrondinformatie over het als bron voor het voedselingrediënt gebruikte organisme	14
3.4 IX Verwachte opname en gebruiksfrequentie van het voedselingrediënt	15
3.5 X Informatie op basis van eerdere blootstelling van de mens aan het voedselingrediënt of zijn bron	16
3.6 XI Informatie over de voedingswaarde van het voedselingrediënt	17
3.7 XII Microbiologische informatie over het voedselingrediënt	17
3.8 XIII Toxicologische informatie over het voedselingrediënt	18
Bijlagen	
Literatuur	41
De commissie	44
Samenvatting dossier	45

Contents (English translation)

Executive summary	23
1 Introduction	25
1.1 Dutch assessment procedure	25
1.2 The use of arachidonic acid rich oils and docosahexaenoic acid rich oils in infant formulae in the EU	26
2 Completeness and accuracy of the dossier	28
2.1 Administrative data	28
2.2 General description of the food ingredient	28
2.3 Classification of the food ingredient for assessment	28
2.4 Information on the food ingredient	28
2.5 Brief summary provided by the applicant	29
2.6 Other assessments	29
2.7 Labelling proposal by the applicant	29
3 Interpretation and evaluation of the data submitted	30
3.1 I Specification of the novel food ingredient	30
3.2 II Effects of the production process applied to the food ingredient	30
3.3 III History of the organism used as the source of the food ingredient	32
3.4 IX Anticipated intake and extent of use of the food ingredient	33
3.5 X Information from previous human exposure to the food ingredient or its source	33
3.6 XI Nutritional information on the food ingredient	35
3.7 XII Microbiological information on the food ingredient	35
3.8 XIII Toxicological information on the food ingredient	35
Appendices	
Literature	41
The Committee	44
Summary dossier	45

Samenvatting en conclusies

De firma Suntory Ltd vraagt toestemming om de arachidonzuurrijke olie SUNTGA40S op de Europese markt te brengen als ingrediënt van zuigelingenvoeding. Deze olie wordt geproduceerd door de schimmel *Mortierella alpina* en wordt hierna aangeduid met 'de fungusolie'. De olie bestaat voor ongeveer 41 % uit arachidonzuur, een meervoudig onverzadigd langketenvetzuur. De aanvrager heeft een veiligheidsdossier samengesteld met (bio)chemische, voedingskundige, microbiologische en toxicologische informatie en resultaten van mensgebonden onderzoek. Dit dossier is voorgelegd aan de commissie Veiligheidsbeoordeling Nieuwe Voedingsmiddelen. De commissie heeft de veiligheid van de fungusolie als nieuwe bron van arachidonzuur grondig geëvalueerd, omdat de effecten van de overige bestanddelen in de fungusolie voor pasgeboren baby's onbekend zijn. Niet alleen te vroeg geboren baby's maar ook voldragen zuigelingen zullen gedurende lange tijd aan het nieuwe ingrediënt worden blootgesteld.

De samenstellingsgegevens en producteigenschappen duiden op een zorgvuldige productie en zuivering. De commissie concludeert dat de kwaliteit van de fungusolie gewaarborgd is. Het gebruikte micro-organisme *Mortierella alpina* is onschadelijk en de fungusolie bevat geen verontreinigingen die schadelijk zijn voor de volksgezondheid.

Het nieuwe product is bestemd voor levensmiddelenfabrikanten van zuigelingenvoeding die het als bron van arachidonzuur kunnen gebruiken. Dit vetzuur is belangrijk voor een optimale ontwikkeling van de hersenen en mag sinds 1996 worden toegevoegd aan zuigelingenvoeding. De condities van dit gebruik zijn vastgelegd in nationale en Europese regelgeving betreffende zuigelingenvoeding. De aanvrager gaat uit van een verwachte inname van 75 mg fungusolie per kg lichaamsgewicht per dag, een hoeveelheid die overeenkomt met 30 mg arachidonzuur per kg lichaamsgewicht per dag.

De fungusolie is onderzocht in een aantal standaard toxiciteitstesten op genotoxiciteit en op acute en subchronische toxiciteit in proefdieren. Daarnaast is er een speciaal subchronisch onderzoek uitgevoerd met jonge ratten. Niet alleen werden deze dieren zelf 90 dagen blootgesteld aan de teststof, ook werden ze al voor hun geboorte (tijdens de dracht) en tijdens het zogen blootgesteld doordat het moederdier teststof met het voer kreeg toegediend. Uit de resultaten van de toxicologische onderzoeken concludeert de commissie dat herhaalde orale blootstelling geen toxische effecten te weeg brengt. Voor de veilige bovengrens van inname van het nieuwe voedsel ingrediënt baseert de commissie zich op het subchronisch onderzoek met jonge ratten. De commissie stelt dat de hoogst geteste dosis de NOAEL (*No Observed Adverse Effect Level*) weergeeft, te weten 2900 mg olie per kg lichaamsgewicht per dag. De inname van de fungusolie die in proefdieren geen nadelige gezondheidseffecten te weeg brengt is dus bijna een factor 40 hoger dan de bij zuigelingen beoogde inname van 75 mg olie per kg lichaamsgewicht per dag. De commissie acht het niet aannemelijk dat het voorgestelde consumptieniveau door baby's zal worden overschreden.

In klinisch onderzoek zijn pasgeboren kinderen tot een leeftijd van 12 maanden blootgesteld aan het nieuwe ingrediënt. Hieruit blijkt dat consumptie van zuigelingenvoeding met de nieuwe fungusolie als bron van arachidonzuur, in de

gebruikelijke combinatie met docosahexaeenzuur, geen nadelige effecten heeft op de algemene groei en ontwikkeling van zowel te vroeg geboren als voldragen baby's.

De commissie concludeert op basis van alle beschikbare gegevens, dat de fungusolie SUNTGA40S als bron van arachidonzuur veilig kan worden toegepast als ingrediënt voor zuigelingenvoeding.

1 Inleiding

1.1 Nederlandse beoordelingsprocedure

Op 3 juli 2000 vroeg de minister van VWS het oordeel van de commissie Veiligheidsbeoordeling Nieuwe Voedingsmiddelen van de Gezondheidsraad, hierna te noemen 'de commissie', over de veiligheid voor de consument van de arachidonzuurrijke olie SUNTGA40S. Deze olie wordt geproduceerd door de schimmel *Mortierella alpina* en zal als ingrediënt van zuigelingenvoeding worden toegepast. Voordat in mei 1997 de verordening 258/97 van het Europese Parlement en de Raad inzake nieuwe voedingsmiddelen en voedsel ingrediënten (EC97) in werking trad, werden producten afkomstig van deze schimmel beperkt gebruikt in de EU. Dit is verder toegelicht in paragraaf 1.2 hieronder. De firma Suntory beoogt een bredere toepassing van deze olie en heeft daarom toestemming gevraagd voor marktintroductie in overeenstemming met deze verordening.

De minister van VWS heeft de adviserende taak van de commissie met ingang van 1 januari 2005 overgedragen aan het Agentschap ten behoeve van het College ter Beoordeling van Geneesmiddelen. Het dossier van deze arachidonzuurrijke olie is daarmee één van de overgangsdossiers.

De beoordelingsprocedure is als volgt verlopen. Op 25 oktober 2000 besprak de commissie voor het eerst het dossier dat was opgesteld door de aanvrager¹, die hierin de veiligheid van het nieuwe ingrediënt heeft geëvalueerd (Abb00). De commissie heeft in mei 2000 de firma gevraagd aanvullende informatie te verstrekken. Zij stelde de bruikbaarheid van de resultaten van toxicologische onderzoek door derden met soortgelijke arachidonzuurrijke oliën ter discussie voor de beoordeling in kwestie. De commissie was het niet geheel eens met het antwoord van de aanvrager dat zij op 9 augustus 2001 ontving (Abb01). Zij bleef daarom van mening dat de beschikbare toxicologische informatie over de nieuwe olie onvoldoende was gezien de langdurige toepassing bij de speciale doelgroep, namelijk pasgeboren baby's. De commissie berichtte de aanvrager hierover in een brief van 24 oktober 2001. In dit schrijven specificeerde zij het type onderzoek waarvan de resultaten nodig waren om de veiligheidsbeoordeling te kunnen voortzetten. De commissie ontving de gevraagde gegevens op 18 mei 2004 (Abb04). Het dossier is voor het laatst besproken op 15 september 2005, waarna de commissie haar beoordeling heeft afgerond. Dit advies is een weergave van haar bevindingen.

¹ De firma Abbott Laboratories heeft deze aanvraag voor markttoelating op 6 juni 2004 overgedragen aan de firma Suntory Ltd die de fungusolie SUNTGA40S produceert (Abb04a). In augustus 2004 heeft Suntory het dossier opnieuw ingestuurd, inclusief alle aanvullende informatie (Sun04).

1.2 Het gebruik van arachidonzuurrijke en docosahexaeenzuurrijke oliën in zuigelingenvoeding in de EU

De aanvrager wil de nieuwe arachidonzuurrijke olie, die door een schimmel wordt geproduceerd, als voedsel ingrediënt op de Europese markt brengen voor levensmiddelenfabrikanten van zuigelingenvoeding. Het vetzuur arachidonzuur is als ingrediënt in zuigelingenvoeding toegestaan in de Europese Gemeenschap sinds 1996 (EC96). Gebleken is dat zuigelingen een grotere behoefte aan arachidonzuur en docosahexaeenzuur hebben dan waarin flesvoeding doorgaans voorziet (ACN96, Hor00, Luc99). Te vroeg geboren baby's hebben nog onvoldoende enzymatische capaciteit om deze meervoudig onverzadigde vetzuren vanuit de essentiële vetzuren, respectievelijk linolzuur en alfa-linoleenzuur, te synthetiseren. Arachidonzuur is, behalve voor een goede groei in het algemeen, essentieel voor de opbouw van membranen van zenuwcellen en dus belangrijk voor de algemene ontwikkeling van de hersenen. Dit geldt ook voor docosahexaeenzuur dat als structurele membraancomponent met name ook noodzakelijk is voor een optimale ontwikkeling van het netvlies (Hor00, FAO94, Luc99, ISS95). De aanbeveling om de vetzuren arachidonzuur en docosahexaeenzuur toe te voegen aan de voeding van zuigelingen, in het bijzonder te vroeg geboren baby's, zijn internationaal door verschillende organisaties onderschreven (ESG91, FAO94, ISS95, Kol01). Voor te vroeg geboren baby's (prematuren) levert deze toevoegingen volgens huidige wetenschappelijke inzichten in ieder geval tijdelijk een algemeen functioneel voordeel op (Cla05, Hor00). Uit een recente meta-analyse van elf gerandomiseerde onderzoeken, waarvan de resultaten voor 2003 bekend waren, blijkt dat positieve effecten met betrekking tot de hersenontwikkeling niet aantoonbaar zijn op de lange termijn (Sim04). Hoewel arachidonzuur en docosahexaeenzuur in de voeding voor voldragen zuigelingen steeds meer wordt gepropageerd, is het gezondheidkundige voordeel hiervan allerminst wetenschappelijk bewezen (Bak03, Hor00, ISS95, Kol01, Luc99, Mak05, Sim01, Sun04). De commissie stelt nadrukkelijk dat evaluatie van de werkzaamheid geen onderdeel is van deze veiligheidsbeoordeling.

De Europese verordening voor nieuwe voedingsmiddelen is in mei 1997 in werking getreden (EC97, EC97a). Nieuwe voedingsmiddelen die hiervoor reeds in substantiële hoeveelheden werden geconsumeerd of door één van de Europese lidstaten zijn goedgekeurd voor marktintroductie vallen buiten de werking van deze verordening. Een voorbeeld van dit laatste is de arachidonzuurrijke olie ARASCO² die door een schimmel wordt geproduceerd. In 1995 heeft de Nederlandse bevoegde autoriteit, op basis van het positieve advies van de voorlopige commissie Veiligheidsbeoordeling Nieuwe Voedingsmiddelen, toestemming verleend aan Numico (voorheen Nutricia) om deze olie toe te passen in zuigelingenvoeding voor zowel premature als voldragen zuigelingen. De commissie verwijst hiervoor naar 'Ontheffingen Warenwetregeling Nieuwe

² Dit gold ook voor DHASCO. ARASCO® (een arachidonzuurrijke olie verkregen uit de schimmel *Mortierella alpina*) en DHASCO® (docosahexaeenzuurrijke olie verkregen uit de alg *Cryptocodium cohni*) zijn producten van de firma Martek Biosciences Corporation (USA).

voedingsmiddelen' (Sta95). De firma Numico heeft echter nooit een vrij verkrijgbare flesvoeding met ARASCO als bron van arachidonzuur op de Nederlandse (of Europese) markt gebracht voor voldragen baby's.

Ten tijde van de inwerkingtreding van eerder genoemde Europese regelgeving betreffende nieuwe voedingsmiddelen werden, behalve meervoudig onverzadigde vetzuren verkregen uit conventionele bronnen (kippeneivet, visolie), vetzuren die geïsoleerd zijn uit micro-organismen al wel toegevoegd aan speciale zuigelingenvoedingen voor te vroeg geboren baby's. Voorbeelden hiervan zijn de producten 'Nenatal' en 'Premilon' die vanaf 1994 in België verkrijgbaar zijn voor zuigelingen, respectievelijk tijdens en na het verblijf in het ziekenhuis. Deze arachidonzuurrijke fungusoliën werden door de Britse pendant van de Nederlandse beoordelingsautoriteit, de 'Advisory Committee on Novel Foods and Processes' (ACNFP) daarom niet als nieuw voedingsmiddel beschouwd toen in 1997 de Europese verordening (EC97) in werking trad. De ACNFP heeft vervolgens twee beoordelingsprocedures, die in 1993 en 1994 waren begonnen, beëindigd. Hierbij ging het om aanvragen van twee verschillende fabrikanten van zuigelingenvoeding met onderling vergelijkbare dossiers. Beiden wilden de met behulp van micro-organismen geproduceerde vetzuurrijke oliën ARASCO en DHASCO² verwerken in zuigelingenvoeding (ACN96). De Franse beoordelingsautoriteit 'Direction générale de la concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes' (DGCCRF) ontving in oktober 1996 een autorisatieaanvraag van een zuigelingenvoedingfabrikant voor het gebruik van dezelfde ingrediënten. De Franse bevoegde autoriteit heeft in juni 1999 de oliën ARASCO en DHASCO goedgekeurd voor het gebruik in zuigelingenvoeding voor zowel premature en voldragen zuigelingen. Omdat niet bekend is onder welke regelgeving dit besluit valt, is de Europese status van deze goedkeuring onduidelijk.

De Nederlandse Commissie Veiligheidsbeoordeling nieuwe voedingsmiddelen ('de commissie') stelt vast dat uit schimmel afkomstige arachidonzuurrijke oliën nooit officieel getoetst zijn conform de Europese verordening 258/97 (EC97, EC97a) en meent dat de aanvrager Suntory terecht de volledige autorisatieprocedure wil doorlopen. Dit laatste baseert de commissie op argumenten die hieronder zijn weergegeven. De betreffende zuigelingenvoeding in België (zie hierboven) was primair bedoeld voor te vroeg geboren baby's. Het voedsel ingrediënt van de voorliggende beoordeling zal echter toegepast worden in producten voor een veel bredere doelgroep, te weten alle zuigelingen. Een gefundeerde uitspraak over eventuele wezenlijke gelijkwaardigheid met een bestaand product was niet mogelijk, omdat het oorspronkelijke dossier geen gedetailleerde samenstellingsgegevens bevatte van een soortgelijke arachidonzuurrijke olie van een andere firma (zie paragraaf 3.8.2 voor een toelichting). Tot slot wijst de commissie op het in 2004 verschenen rapport van de Amerikaanse commissie die de veiligheid van toevoegingen van nieuwe ingrediënten aan zuigelingenvoeding heeft geëvalueerd (IOM04). Deze Amerikaanse commissie stelt onder andere dat ingrediënten van nieuwe bronnen unieke veiligheidskwesties met zich mee kunnen brengen en dat grote voorzichtigheid is geboden gezien de kwetsbaarheid van de doelgroep.

2 Volledigheid en juistheid van het dossier

2.1 Administratieve gegevens

De naam en het adres van de aanvrager zijn als volgt: Suntory Limited, 3-3, 2-chome, Daiba, Minato-ku, Tokyo 135-8631, Japan. Dit adres geldt sinds 5 januari 2005. Deze firma is de fabrikant van de arachidonzuurrijke olie SUNTGA40S.

2.2 Algemene beschrijving van het voedselingrediënt

De aanvraag betreft het op de Europese markt brengen en verhandelen van een arachidonzuurrijke olie SUNTGA40S die wordt geïsoleerd uit de schimmel *Mortierella alpina*, hierna aangeduid met 'de fungusolie'. Deze olie bestaat voor ongeveer 41 % uit het meervoudig onverzadigde vetzuur arachidonzuur. De fungusolie wordt niet rechtstreeks verstrekt aan de consument, maar is bedoeld voor de levensmiddelenindustrie die het in zuigelingenvoeding zal verwerken. De samenstelling van flesvoeding wordt hiermee aangepast aan die van moedermelk voor wat betreft het gehalte aan arachidonzuur, teneinde een optimale groei en ontwikkeling van het zenuwstelsel te bevorderen (zie paragraaf 1.2 voor meer informatie). Het betreft voeding voor zowel te vroeg geboren als voldragen baby's. Dit is door de firma bevestigd op verzoek van de commissie, omdat de specificatie van de doelgroep in het dossier niet duidelijk is aangegeven.

2.3 Classificatie van het voedselingrediënt voor beoordeling

De aanvrager spreekt zich niet uit over de indeling van het nieuwe product in één van de zes hoofdklassen van nieuwe voedingsmiddelen en nieuwe voedselingrediënten zoals genoemd in tabel 1 in deel I van Aanbeveling 97/618 van de Europese Commissie (EC97a).

De commissie karakteriseert het nieuwe product als een complex voedselingrediënt afkomstig van een niet-genetisch gemodificeerd micro-organisme (klasse 2). De olie behoort tot de subklasse 2.1 omdat het bronorganisme in de Europese Unie eerder voor de voeding van te vroeg geboren baby's is gebruikt (zie paragraaf 1.2).

2.4 Informatievergaring over het voedselingrediënt

De informatie die essentieel is voor de beoordeling van de geschiktheid voor de consumptie van het voedselingrediënt in klasse 2.1, zou gespecificeerd moeten worden aan de hand van de onderstaande thema's die zijn voorgeschreven in Aanbeveling 97/618 van de Europese Commissie (EC97a):

- I Specificatie van het nieuwe voedselingrediënt
- II Effecten van het gevolgde productieproces op het voedselingrediënt

- III Achtergrondinformatie over het als bron voor het voedselingrediënt gebruikte organisme
- IX Verwachte opname en gebruiksfrequentie van het voedselingrediënt
- X Informatie op basis van eerdere blootstelling van de mens aan het voedselingrediënt of zijn bron
- XI Informatie over de voedingswaarde van het voedselingrediënt
- XII Microbiologische informatie over het voedselingrediënt
- XIII Toxicologische informatie over het voedselingrediënt

Het dossier bevat voldoende informatie om de veiligheid van het nieuwe voedselingrediënt te kunnen beoordelen. De aanvrager heeft de verstrekte informatie echter niet gestructureerd volgens bovengenoemde thema's. De commissie Veiligheidsbeoordeling nieuwe voedingsmiddelen houdt deze indeling van de gevraagde informatie wel aan. De commissie concludeert dat het dossier in zijn totaliteit acceptabel is en van voldoende kwaliteit. Daarnaast beschikt de commissie over aanvullende wetenschappelijke literatuur inzake toxicologische en mensgebonden onderzoeken.

2.5 Beknopt overzicht door de aanvrager

Het dossier bevat een zeer beknopte samenvatting die aan de lidstaten is toegestuurd, conform artikel 6, lid 2 van de Europese Verordening 258/97 (EC97). De commissie merkt op dat een goede interpretatie van deze summiere gegevens niet mogelijk is zonder raadpleging van het complete dossier. De samenvatting van het dossier die als bijlage in het voorliggende beoordelingsrapport is opgenomen (pagina's 45-55) is een recent aangepaste versie, verstrekt door de firma Suntory.

2.6 Overige beoordelingen

Het nieuwe product wordt niet in een ander kader beoordeeld dan dat van de Europese verordening voor nieuwe voedingsmiddelen en nieuwe voedselingrediënten 258/97 (EC97). De toepassing van voedselingrediënten in zuigelingenvoeding voor gezonde zuigelingen is gereguleerd in de richtlijn 91/321/EEG inzake volledige zuigelingenvoeding en opvolgzuigelingenvoeding (EC91), zoals gewijzigd bij Richtlijnen 96/4/EG, 1999/50/EG en 2003/14/EG. In het kader van de herziening van deze zuigelingenvoedingrichtlijnen (SCF03) zijn er voor het laatst op 12 september 2005 technische besprekingen geweest over de toegestane gehalten aan gewenste en ongewenste bestanddelen.

2.7 Etikettersvoorstel van de aanvrager

Etikettering dient in overeenstemming te zijn met Richtlijn 2000/13/EG (EC00) en artikel 8 van Verordening 258/97 (EC97). Verder gelden voor de etikettering van de nieuwe olie-bevattende zuigelingenvoeding de algemene bijzonderheden en verplichte vermeldingen die zijn opgenomen in Richtlijn 91/321/EEG, artikel 7.2 (EC91). Het etiketteringsvoorstel wordt in Nederland in het Regulier Overleg Warenwet besproken en wordt daarom niet beoordeeld in dit advies.

3 Interpretatie en evaluatie van de voorgelegde gegevens

3.1 I Specificatie van het nieuwe voedselingrediënt

De in de aanvraag bedoelde olie is helder geel en bestaat uit ten minste 90 % triglyceriden (en maximaal 7 % diglyceriden). De aanvrager specificeert het arachidonzuurgehalte als minimaal 40 % van het totaal aan vetzuren. De samenstelling van de belangrijkste vetzuren in de fungusolie, bepaald op basis van drie representatieve productiepartijen, is als volgt:

- arachidonzuur (40 - 46%)
- palmitinezuur (11 - 13 %)
- linolzuur (8 - 10 %)
- lignocerine zuur (7 - 8 %)
- stearinezuur (7 - 8 %)
- oliezuur (6 - 7 %)

Verder zijn geringe hoeveelheden gamma-linoleenzuur, dihomo-gamma-linolzuur en beheenzuur aanwezig, elk met een gehalte van 2 à 3,5 % van het totaal aan vetzuren, plus sporen (<1%) van andere vetzuren. Het gehalte aan vrije vetzuren is minder dan 0,2 %, uitgedrukt als oliezuur.

De resultaten van de chemische bepalingen gaan in het dossier vergezeld van uitvoerig gedocumenteerde analytische rapporten. De commissie meent dat de aanvrager de productsamenstelling zorgvuldig heeft geanalyseerd en gevalideerd. De productinformatie geeft betrouwbaar weer wat de samenstelling is van de te vermarkten fungusolie en is voldoende om de veiligheid te kunnen beoordelen.

3.2 II Effecten van het gevolgde productieprocédé op het voedselingrediënt

Het nieuwe voedselingrediënt wordt geproduceerd door fermentatie van de schimmel *Mortierella alpina*. Het fermentatieproces komt op gang door de schimmel 2-3 dagen te kweken in een vloeibaar medium met voedingstoffen onder aërobe omstandigheden bij 28 °C. Dit proces wordt voortgezet bij 26 °C gedurende 8-14 dagen. De verkregen biomassa wordt uiteindelijk gedroogd. Dit ruwe product kan koel worden opgeslagen in een stikstofatmosfeer of direct worden geëxtraheerd met hexaan. Het extract wordt gefilterd en van alle hexaanresten ontdaan. Hierna worden ongewenste bestanddelen en specifieke verontreinigingen verwijderd. Oorspronkelijk werd met een driestaps-proces het extract ontslijmd, geneutraliseerd, gewassen met water en gedroogd (Abb00).

Tegenwoordig gebeurt dit door selectieve adsorptie met behulp van een zogeheten gemengde kolombehandeling (Sun04). De ruwe fungusolie wordt verder gezuiverd met een nieuwe techniek (beschreven in de vertrouwelijke dossierinformatie), gevolgd door twee stoomdestillatieprocessen ter verwijdering van ongewenste geur- en smaakstoffen. Voorafgaand aan de opslag wordt een commercieel verkrijgbaar vitamine E-mengsel toegevoegd om oxidatieve afbraak tegen te gaan. Samen met het al aanwezige vitamine E komt het gehalte uit op 0,18 % (het totaal aan alfa-, gamma- en delta-tocoferol).

Het eindproduct wordt uitvoerig analytisch-chemisch gekarakteriseerd met behulp van standaardtechnieken en de resultaten hiervan zijn in het dossier opgenomen. Uit de zeer lage peroxidewaarde (gespecificeerd als ten hoogste 5 meq/kg, maar veelal minder dan 1) en de lage p-anisidinewaarde (minder dan 10) blijkt dat er nauwelijks primaire en secundaire oxidatieproducten aanwezig zijn. Er is een geringe hoeveelheid sterolen in de fungusolie aanwezig, die voornamelijk bestaat uit desmosterol (0,6 mg/ml). De aanvrager identificeert verder ergosterol en beta-sitosterol, elk met een gehalte van ongeveer 0,1 mg/ml en een tweetal onbekende sterolen (maximaal 0,1 mg/ml).

De aanvrager heeft zijn nieuwe product ook gecontroleerd op mogelijke aanwezigheid van verschillende verontreinigingen. Voor wat betreft de gechlorideerde koolwaterstoffen wordt vermeld dat de olie geen PCB's bevat en evenmin meetbare residuen van de pesticiden ppDDE, ppDDD, ppDDT. Ftalaatesters, die alom in het milieu aanwezig zijn, worden sporadisch in de olie aangetroffen. Het totaal aan zware metalen wordt door de aanvrager gespecificeerd als maximaal 1,0 mg per kg. Cadmium, kwik en lood waren afwezig waarbij detectiegrenzen werden gehanteerd van 0,01 of 0,02 mg per kg, arseen was eveneens niet detecteerbaar (< 0,2 mg/kg).

Op basis van de gegevens in het dossier heeft de commissie voldoende inzicht in het technisch-chemisch productieproces om de veiligheid van het nieuwe voedselingrediënt te kunnen beoordelen. Zij is het eens met de aanvrager dat uit de producteigenschappen blijkt dat de olie van hoge kwaliteit is. Dit duidt op een zorgvuldige productie en zuivering. Ook heeft de aanvrager algemene informatie over het productieproces ondersteund met gegevens over de zogenaamde kritische controlepunten. Zo worden bijvoorbeeld tijdens het fermentatieproces 'contaminatie checks' verricht om de microbiologische kwaliteit te waarborgen. De detectiegrenzen van de analysemethoden, waarmee de hierboven genoemde chemische verontreinigingen kunnen worden aangetoond, zijn voldoende laag. Om de levensmiddelenkwaliteit van het nieuwe voedselingrediënt te waarborgen, moet het nieuwe product voldoen aan alle wettelijke normen voor levensmiddelen in het algemeen³ en zuigelingenvoeding en opvolgzuigelingenvoeding in het bijzonder (zie paragraaf 2.6). Het moet hier vermeld worden dat de normstelling voor contaminanten volop in discussie is. De commissie gaat ervan uit dat de aanvrager de toegestane grenswaarden zoals die meest recent zijn vastgelegd in acht blijft nemen.

De commissie wijst er op dat gegevens over zowel de stabiliteit van de olie als over de aanwezigheid van transvetzuren ontbreken in de verstrekte product-technische informatie. Zij gaat er echter van uit dat voor dit nieuwe product de normale criteria ten aanzien van houdbaarheid en kwaliteit van eetbare oliën en vetten worden nageleefd. De aanwezigheid van transvetzuren zou tot een minimum beperkt moeten worden. Het lijkt de commissie overigens niet waarschijnlijk, gezien het productieproces, dat significante hoeveelheden transvetzuren in de opgewerkte olie aanwezig zullen zijn.

Het feit dat de zuiveringstap in het productieproces door de firma Suntory is aangepast gedurende de beoordelingsprocedure, is een belangrijk punt van aandacht. Op

³ Verwezen wordt naar onder andere de Europese verordening 852/2004 inzake levensmiddelenhygiëne (EC04) en de verordening 466/2001 tot vaststelling van maximumgehalten aan bepaalde verontreinigingen in levensmiddelen (EC01).

basis van de samenstellingsanalyses van drie recent geproduceerde productiepartijen (Sun04) stelt de commissie vast dat de chemische samenstelling van SUNTGA40S hierdoor niet wezenlijk is veranderd.

De commissie concludeert dat de arachidonzuurrijke fungusolie geen verontreinigingen bevat die schadelijk zijn voor de volksgezondheid.

3.3 III Achtergrondinformatie over het als bron voor het voedselingrediënt gebruikte organisme

De aanvrager refereert aan publicaties waaruit blijkt dat de mogelijkheid om bepaalde meervoudig onverzadigde vetzuren te produceren met de schimmel *Mortierella alpina*, naast andere *Mortierella* soorten, grondig is bestudeerd. De specifieke kweekomstandigheden in de biofermentoren zijn bepalend voor het karakter van de fungusolie (Abb00). De soorten van het schimmelgeslacht *Mortierella* zijn normale, veel voorkomende bodemschimmels. De aanvrager documenteert de taxonomische klassificatie van '*Mortierella alpina* Peyronel 1S-4'. In het dossier is een literatuurstudie uit 1989 opgenomen, waaruit blijkt dat *Mortierella alpina* niet pathogeen is en geen mycotoxinen produceert. Volgens de aanvrager is de schimmel zelf volledig onschadelijk en dit wordt ondersteund met de resultaten van toxicologisch onderzoek. In muizen zijn geen nadelige effecten waargenomen nadat deze proefdieren twee weken gevoerd werden met een dieet waarin 1,6, 4,0 of 10 % testmateriaal was verwerkt. De hoogste dosis kwam overeen met 13,9 g *Mortierella alpina* per kg lichaamsgewicht per dag.

De commissie vult de gegevens aan met het volgende. *Mortierella alpina* is een niet genetisch-gemodificeerd micro-organisme en wordt niet algemeen toegepast in de levensmiddelenindustrie. Echter, sinds een jaar of tien wordt deze schimmel gebruikt voor de productie van arachidonzuur als ingrediënt van speciale zuigelingenvoedingen, zoals in paragraaf 1.2 is toegelicht. De schimmel zelf is geen onderdeel van het nieuwe product. Gezien de alomtegenwoordigheid van *Mortierella alpina* in de bodem kunnen mens en dier veelvuldig blootgesteld worden aan de sporen van dit micro-organisme. Deze schimmel kan niet groeien bij temperaturen boven de 30-32 °C.

Het is van algemeen belang dat monsters beschikbaar zijn van micro-organismen waarmee nieuwe voedingsmiddelen worden bereid. De commissie stelt het dan ook op prijs dat de aanvrager een specimen van de betreffende schimmelsoort heeft toegevoegd aan de internationaal toegankelijke collectie van het laboratorium 'Applied Microbiology, Kyoto University'.

Op basis van de internationale vakliteratuur concludeert de commissie dat er geen aanwijzingen zijn dat *Mortierella alpina* bijzondere mycotoxinen produceert. Het dossier bevat negatieve testresultaten voor de volgende mycotoxinen: aflatoxine-B1, -B2, -G1, -G2, sterigmatocystine, ochratoxine, patuline, nivalenol, zearalenone, fumonisine-B1, -B2. De hierbij gebruikte detectiegrens is 50 µg/kg olie, behalve voor aflatoxinen die met een gevoeligheid van 5 µg/kg zijn bepaald. De commissie tekent aan dat de normstelling voor mycotoxinen volop in discussie is en dat de aanvrager zich heeft te houden aan de verscherpte limieten zoals meest recent zijn vastgelegd. Zij verwijst hierbij met name naar wijzigingen van Verordening 466/2001 (EC01).

3.4 IX Verwachte opname en gebruiksfrequentie van het voedselingrediënt

Het is de bedoeling van de aanvrager dat de fungusolie aan zuigelingenvoeding wordt toegevoegd om te bewerkstelligen dat de arachidonzuurconcentratie op hetzelfde niveau komt als die in moedermelk. De commissie merkt op dat de fungusolie zal worden geleverd als tussenproduct dat een gering bestanddeel vormt van een complex samengestelde zuigelingenvoeding. De olie zal hierin ten minste 2000 maal worden verdund. De commissie realiseert zich dat, naast de firma Abbott die oorspronkelijk het dossier heeft ingediend (zie voetnoot in paragraaf 1.1), ook andere fabrikanten van zuigelingenvoeding de nieuwe arachidonzuurrijke olie zullen gaan gebruiken. Volgens de commissie is het de verantwoordelijkheid van de aanvrager, en tevens producent, om de afnemers van de fungusolie te instrueren over het juiste gebruik. De commissie wijst hierbij op Richtlijn 96/4/EG (EC96) waarin is vastgelegd dat het arachidonzuurgehalte niet hoger mag zijn dan 1% van het totale vetgehalte.

De geschatte hoeveelheid die door baby's geconsumeerd zal gaan worden is in het dossier uitgewerkt aan de hand van de toepassing door Abbott Laboratories (Abb00). Deze firma stelt de beoogde inname van arachidonzuur op 30 mg per kg lichaamsgewicht per dag, overeenkomend met 75 mg fungusolie per kg per dag. Daarnaast is inname van docosahexaeenzuur noodzakelijk voor een uitgebalanceerde vetzuurverhouding in de voeding en hiervoor wordt 16 mg per kg per dag aangehouden. Deze doseringen zijn in overeenstemming met de berekende mediane inname door Europese zuigelingen die uitsluitend met moedermelk gevoed worden. De firma Abbott gebruikt hiervoor literatuurgegevens over moedermelk afkomstig van Europese vrouwen (Abb00, Abb01). Abbott gaat uit van een totale energie inname door te vroeg geboren baby's van 120 kcal per kg per dag. Voor de verwachte inname worden de voedingsgegevens van het eigen klinisch onderzoek representatief gesteld (zie paragraaf 3.5). Het betreft zuigelingenvoeding met een calorische waarde van 699 kcal per liter en 49 energieprocent vet, en met 0,40 % van het totale vetgehalte voor arachidonzuur. De zuigelingen zullen tot een leeftijd van 12 maanden worden gevoed met de zuigelingenvoeding in kwestie. Het arachidonzuurgehalte in de zuigelingenvoeding bedraagt voor zowel te vroeg geboren en voldragen baby's 0,40 % van het totale vetgehalte (voor DHA respectievelijk 0,25 en 0,15 %).

3.5 X Informatie op basis van eerdere blootstelling van de mens aan het voedselingrediënt of zijn bron

De aanvrager heeft in een grootschalig klinisch onderzoek de groei en ontwikkeling geëvalueerd van te vroeg geboren kinderen. Dit betrof 470 baby's met een geboortegewicht dat varieerde van 0,75 tot 1,8 kg. Het onderzoek was gerandomiseerd en dubbelblind uitgevoerd. Zowel het protocol als de resultaten zijn opgenomen in het dossier (Abb00, O'Co01). In één van de onderzoeksgroepen werden 140 baby's tot een leeftijd van 12 maanden gevoed met zuigelingenvoeding waaraan arachidonzuur uit fungusolie en docosahexaeenzuur uit visolie waren toegevoegd, met vetzuurgehalten van respectievelijk 0,40 % en 0,25 % gedurende het ziekenhuisverblijf, en 0,40 % en 0,15% in de periode daarna (uitgedrukt in % van het totale vetgehalte). De aanvrager concludeert dat tot op een leeftijd van 12 maanden geen klinisch relevante verschillen zijn waargenomen tussen de kinderen die gevoed werden met de arachidonzuur en docosahexaeenzuur bevattende zuigelingenvoeding en die in de controle groep. De geanalyseerde kenmerken waren groei (gewicht, lengte, hoofdomtrek), de ontwikkeling van de gezichtscherpte (indicatie voor netvliesrijping), de mentale, motorische en taalontwikkeling.

Het rapport van een vergelijkbaar onderzoek bij voldragen baby's is door de aanvrager in tweede instantie verstrekt (Abb01, Aue01). Ook dit onderzoek maakt aannemelijk dat een normale groei en ontwikkeling mogelijk is met zuigelingenvoeding verrijkt met arachidonzuur uit fungusolie en docosahexaeenzuur uit visolie (Aue03).

De aanvrager heeft op verzoek van de commissie de gebruikte fungusolie gespecificeerd, aangezien het dossier geen uitsluitsel gaf of het om de SUNTGA40S olie in kwestie ging. Het bleek dat in beide klinische onderzoeken een eerder ontwikkeld product met een lager arachidonzuur gehalte (25 %) was gebruikt, het zogenaamde SUN-TGA25. De commissie constateert dat de aanvrager zich in de klinische onderzoeken vooral heeft beperkt tot evaluatie van de effectiviteit van de toegevoegde meervoudig onverzadigde langketenvetzuren. Zij is het eens met de aanvrager dat consumptie van zuigelingenvoeding met de nieuwe fungusolie als bron van arachidonzuur, in de gebruikte combinatie met docosahexaeenzuur, geen nadelige effecten heeft op de algemene groei en ontwikkeling van zowel te vroeg geboren als voldragen baby's. Deze bevindingen worden ondersteund door onderzoeksresultaten van derden met een soortgelijke arachidonzuurrijke olie en is hieronder kort toegelicht. De firma Suntory heeft een update van de wetenschappelijke literatuur over de periode 2000 tot 2003 verstrekt als onderdeel van het dossier dat opnieuw is ingestuurd (Sun04). Het valt de commissie op dat de aanvrager de toevoeging van het vetzuur arachidonzuur als zodanig heeft geëvalueerd zonder zich primair op de bron toe te spitsen. Daarnaast beschikt de commissie over andere, deels meer recente, informatie (Cla05, Hor00, Mak05, Sim01, Sim04). Zij noemt hier met name het in januari 2004 gepubliceerde overzichtsartikel van Simmer en Patole, die elf gerandomiseerde onderzoeken met te vroeg geboren kinderen geëvalueerd hebben (Sim04). In deze onderzoeken werd het effect van toevoegingen van arachidonzuur plus docosahexaeenzuur aan flesvoeding

bestudeerd en in acht hiervan zijn de kinderen gevolgd tot een gecorrigeerde leeftijd van 12 maanden of ouder (18 of 24 maanden). Als bron van arachidonzuur werd in één van de onderzoeken de fungusolie van Suntory aan de zuigelingenvoeding toegevoegd (O'Co01). In vijf van de elf onderzoeken werden de kinderen gedurende vier tot 48 weken blootgesteld aan een andere arachidonzuurrijke olie afkomstig van dezelfde schimmelsoort, te weten ARASCO (zie paragrafen 1.2 en 3.8.2 voor meer informatie). Ook voor voldragen baby's is recentelijk het effect van dergelijke toevoegingen geëvalueerd, waarbij alle beschikbare gepubliceerde en ongepubliceerde, gerandomiseerde klinische onderzoeken zijn meegenomen (Mak05). Uit deze meta-analyse van veertien gekwalificeerde onderzoeken blijkt dat verrijking van zuigelingenvoeding met meervoudig onverzadigde langketenvetzuren gedurende minimaal de eerste drie levensmaanden de groei niet nadelig beïnvloedt, ongeacht de herkomst van de vetzuren (conventionele bron of micro-organisme). Het arachidonzuur was bij één van de 14 onderzoeken afkomstig van de nieuwe olie van de aanvrager (Aue01) en bij drie onderzoeken werd gebruik gemaakt van de fungusolie ARASCO als bron. Volgens de commissie blijkt uit beide systematische overzichten dat aanwezigheid van arachidonzuur en andere ingrediënten afkomstig van de schimmel *Mortierella alpina* de groei van zuigelingen niet nadelig beïnvloedt.

3.6 **XI Informatie over de voedingswaarde van het voedselingrediënt**

Het dossier bevat alleen in de inleiding algemene informatie over de voedingswaarde van arachidonzuur, het belangrijkste bestanddeel van de fungusolie.

De commissie stelt dat deze olie niet toegepast wordt als energiebron (vet) maar als bron van het vetzuur arachidonzuur dat van essentieel belang is als bouwstof voor celmembranen. Daarnaast is arachidonzuur een voorstadium van kort levende signaalstoffen (eicosanoiden) die een belangrijke rol spelen bij cellulaire informatieoverdracht. De commissie bevestigt dat arachidonzuur een normaal bestanddeel is van moedermelk. Bij baby's is het vooral belangrijk voor het snel groeiende zenuwweefsel. Arachidonzuur behoort niet tot de essentiële vetzuren maar uit wetenschappelijk onderzoek blijkt dat, vooral te vroeg geboren, baby's zelf onvoldoende arachidonzuur produceren om volledig in hun behoefte te kunnen voorzien (zie paragraaf 1.2).

3.7 **XII Microbiologische informatie over het voedselingrediënt**

Het originele dossier bevat geen informatie over de microbiologische kwaliteit van het nieuwe voedselingrediënt. De aanvullende informatie bevat gegevens waaruit blijkt dat coliformen afwezig zijn (Sun04). De commissie acht het onwaarschijnlijk dat in het nieuwe product micro-organismen aanwezig zijn, omdat er hoge temperaturen bij het productieproces worden gebruikt en het vochtgehalte van oliën in het algemeen gering is.

3.8 XIII Toxicologische informatie over het voedselingrediënt

3.8.1 Toxicologisch onderzoek met de arachidonzuurrijke olie SUNTGA40S

De nieuwe fungusolie is in verschillende toxiciteitstests geëvalueerd voor wat betreft de genotoxiciteit, de acute en de subchronische toxiciteit. Voor dit laatste zijn zowel volwassen als jonge dieren onderzocht. De teststof SUNTGA40S, met een arachidonzuurgehalte van gemiddeld 41 % van het totaal aan vetzuren, was verkregen volgens het procédé dat in de oorspronkelijke aanvraag is beschreven (Abb00). De commissie heeft vastgesteld dat het geteste product goed overeenkomt met het huidige handelspreparaat (zie paragraaf 3.2).

De aanvrager heeft met een *in vitro* test aangetoond dat de fungusolie geen oestrogenreceptor-bindende (hormonenversturende) eigenschappen heeft. Hieruit concludeert de commissie dat er geen aanwijzingen zijn voor een pseudohormonale werking van de fungusolie.

De olie vertoonde in de standaard bacteriële mutatietest geen activiteit. Ook zijn ten opzichte van de controle niet significant meer chromosoomafwijkingen vastgesteld in een standaardtest met gekweekte zoogdiercellen. De aanvrager concludeert op basis van deze negatieve testresultaten dat de arachidonzuurrijke fungusolie niet genotoxisch is. De commissie is het hiermee eens.

De aanvrager heeft ook onderzoek gedaan naar effecten van de fungusolie op de groei van pasgeboren biggetjes, die de teststof met de fles kregen toegediend gedurende de eerste vier levensweken (Sun04). De commissie concludeert dat uit de resultaten geen bijzonderheden naar voren komen die relevant zijn voor deze veiligheidsbeoordeling.

Een acute toxiciteitstest is uitgevoerd bij muizen. Na eenmalige orale toediening van 2 g fungusolie per kg lichaamsgewicht zijn geen nadelige effecten waargenomen.

In een 14 dagen durend toxiciteitsonderzoek met ratten, om de doseringen vast te stellen voor het subchronisch onderzoek, werd een significante stijging van het aantal vetdruppeltjes in de lever geconstateerd. De dieren hadden gedurende twee weken voer geconsumeerd dat voor 10 % bestond uit de fungusolie. In het 90 dagen durend vervolgonderzoek heeft de aanvrager lagere doseringen van het nieuwe voedselingrediënt getest, namelijk 0,5, 1,0 en 2,0 % olie w/w in het diervoeder. De door de aanvrager berekende blootstelling⁴ aan de teststof, varieerde in de hoogste dosisgroep bij de mannetjes van 2125 tot 829 mg olie per kg lichaamsgewicht per dag en bij de vrouwtjes van 1732 tot 1045 mg olie per kg lichaamsgewicht per dag. Omdat sekse gerelateerde afwijkingen niet zijn waargenomen is de inname van de fungusolie voor beide seksen gemiddeld. Dit kwam uit op ongeveer 312, 650 en 1250 mg/kg/dag, respectievelijk voor dosisgroepen met 0,5, 1,0 en 2,0 % fungusolie w/w in het voer. De aanvrager stelt dat dit ongeveer overeenkomt met 1,6, 3,3 en 6,6 maal de te verwachten maximale consumptie in te vroeg geboren zuigelingen.

⁴ Bij dit type test neemt in de loop van de tijd de voerinname normaliter af ten opzichte van het lichaamsgewicht, waardoor de blootstelling vermindert (deze wordt wekelijks berekend uit de gemeten voerinname).

De aanvrager concludeert dat klinisch relevante veranderingen als gevolg van de consumptie van de nieuwe olie niet zijn waargenomen. De kenmerken die hiervoor werden geëvalueerd waren lichaamsgewicht en voederinname tijdens de behandeling, en beoordeling van het oog (ophthalmoscopie), biochemische en hematologische analyses van het bloed, hormoonspiegels in het bloed, orgaangewichten en histopathologische weefselanalyses aan het eind van de behandelingsperiode. De meest in het oog springende verandering betrof de verlenging van de protrombinetijd en de geactiveerde partiële tromboplastinetijd bij mannetjes ratten bij alle geteste doseringen, maar niet bij vrouwtjes. De aanvrager stelt dat, mede gezien de afwezigheid van microscopische laesies en bloedingen, de klinische relevantie van de op zich geringe veranderingen in deze bloedstollingsparameters, onbekend is. In alle groepen die de teststof in het voer hadden, zijn geringe maar wel significante verhogingen van de gewichten van verscheidene organen geconstateerd (zowel absoluut als relatief ten opzichte van het lichaamsgewicht). De aanvrager beschouwt deze veranderingen niet klinisch relevant, omdat ze grotendeels vallen binnen de fysiologische variatie. Bovendien had microscopisch onderzoek aangetoond dat deze veranderingen niet gepaard gingen met afwijkingen in de weefsels.

De commissie heeft dit subchronisch toxiciteitsonderzoek (90 dagen) met de arachidonzuurrijke fungusolie bij ratten geëvalueerd. De maximale blootstelling was gemiddeld 1250 mg per kg lichaamsgewicht per dag. De commissie constateert dat de geringe verhogingen van enkele orgaangewichten niet sekse consistent en dosis afhankelijk werden waargenomen. Zij stemt in met de aanvrager dat het niet aangetoond is dat deze veranderingen behandelingsgerelateerd zijn. Dit wordt ondersteund door vergelijkbare bevindingen door derden, voor met name lever en milt (Bur99, Hem00). De commissie onderschrijft de verklaring dat dit mogelijk wordt veroorzaakt door het relatief hoge gehalte aan meervoudig onverzadigde vetzuren in het diervoeder (zie ook paragraaf 3.8.3). De aanvrager concludeert terecht dat deze resultaten aantonen dat de nieuwe fungusolie onder de geteste condities de groei niet nadelig beïnvloedt en voor de geteste kenmerken geen klinisch relevante afwijkingen te weeg brengt.

Op verzoek van de commissie heeft de aanvrager een meer uitgebreid toxicologisch onderzoek bij ratten laten uitvoeren, in navolging van Burns (Bur99) en Hempenius (Hem00). In paragraaf 3.8.2 licht de commissie haar argumenten toe. Dit onderzoek bestond uit twee fasen. Een eerste prenatale fase, waarbij de ouderparen aan de teststof werden blootgesteld gedurende vier weken voorafgaand aan en tijdens de conceptie (12 mannetjes en 24 vrouwtjes per groep); de blootstelling van de vrouwtjes werd gecontinueerd tijdens de dracht en de periode waarin de jongen werden gezoogd. De tweede fase bestond uit subchronische onderzoek aansluitend op de zoogperiode; hierin kregen de nakomelingen gedurende 90 dagen de teststof toegediend (10 mannetjes en 10 vrouwtjes per groep). De fungusolie was verwerkt in het diervoeder in de doseringen 0,5, 1,5 en 5,0 % (w/w). De overeenkomstige blootstellingen voor beide seksen in deze dosisgroepen waren gemiddeld 0,3, 0,9 en 2,9 g olie per kg lichaamsgewicht per dag. Een vierde experimentele groep werd behandeld met de arachidonzuurrijke fungusolie in combinatie met een docosahexaeenzuurrijke tonijnolie (met een

docosahexaeenzuurgehalte van 26,6 % van het totaal aan vetzuren) voor een evenwichtige voeding. De gemiddelde blootstelling van deze dieren bedroeg 2,1 g fungusolie en 1,2 g docosahexaeenzuurrijke tonijnolie g per kg lichaamsgewicht per dag.

De aanvrager vermeldt dat er in de prenatale fase van het onderzoek geen bijzonderheden zijn waargenomen bij de ouderdieren en dat er geen nadelige effecten zijn aangetoond voor de vruchtbaarheid, voortplanting, zwangerschap (o.a. duur, aantal vrouwtjes met levensvatbare nesten) en het nageslacht (o.a. aantal, geslachtsverhouding, overleving en ontwikkeling). De teststofinname van de ouderdieren waren vergelijkbaar met de blootstellingen van de nakomelingen in het 90 dagen durende vervolgonderzoek. Tijdens de zoogperiode was de blootstelling van de vrouwtjes echter ruim verdubbeld.

De tweede fase van het onderzoek is geëvalueerd aan de hand van standaardcriteria, te weten lichaamsgewicht, voederinname, klinische observatie, beoordeling van het oog (ophthalmoscopie), gedrag en motorische activiteit, klinisch-chemische (inclusief urine) en hematologische analyses, orgaangewichten en histopathologische analyses van een groot aantal weefsels. Voor de meeste kenmerken deden zich bij de jonge ratten geen behandelingsgerelateerde veranderingen voor als gevolg van de subchronisch blootstelling. Een aantal waarden in met name de hoogste dosisgroep, met arachidonzuur alleen en in combinatie met docosahexaeenzuur, bleken wel significant afwijkend ten opzichte van die in de controlegroep met ratten die evenveel toegevoegd vet in de vorm van maïsolie binnenkregen. Dit betrof een verlaging van triglyceriden, fosfolipiden en cholesterol in het plasma en een verhoging van het gewicht van de milt. Daarnaast werden ook veranderingen waargenomen van bepaalde hematologische kenmerken met betrekking tot het rode bloedcelsysteem. Als verklaring voor het feit dat genoemde veranderingen niet werden waargenomen in de controlegroep met maïsolie, stelt de aanvrager dat deze effecten het bekende gevolg zijn van een fysiologische reactie op de hoge inname aan meervoudig onverzadigde vetzuren. Het feit dat histologische veranderingen uitbleven ondersteunt dit. De resultaten van de gecombineerde blootstelling aan arachidonzuur en docosahexaeenzuur waren niet wezenlijk anders dan die van arachidonzuur alleen. De commissie stemt in met de conclusies van de aanvrager.

3.8.2 Wezenlijk gelijkwaardigheid afzonderlijk onderzochte fungusoliën.

Het oorspronkelijke veiligheidsdossier (Abb00) bevat de resultaten van verschillende toxicologische onderzoeken uitgevoerd door derden met een andere arachidonzuurrijke olie, die ook afkomstig is van de schimmel *Mortierella alpina* (Bur99, Kos97). De samenstellingsgegevens van deze olie waren niet in het dossier opgenomen. Daarnaast beschikte de commissie over, deels meer recente, informatie van andere toxicologische onderzoeken (Art00, Art00a, Hem97, Hem00, Wib97). Het in 2000 door Hempenius gepubliceerde onderzoek was in 1996 uitgevoerd en betrof evenals dat van Burns een 90 dagen toxiciteitstest van net gespeende ratten voorafgegaan door blootstelling tijdens de

dracht en het zogen (Bur99, Hem00). Op basis van informatie van de betrokken firma's⁵, die de teststof produceerden, heeft de commissie vastgesteld dat de arachidonzuurrijke oliën in de hierboven genoemde onderzoeken één en hetzelfde product betreft, te weten ARASCO (zie voetnoot 2 in paragraaf 1.2). De aanvrager beschouwde deze olie als wezenlijk gelijkwaardig met de fungusolie SUNTGA40S, maar onderbouwde deze claim niet in het dossier. Op verzoek van de commissie heeft de aanvrager alsnog de samenstellingsgegevens van deze andere olie verstrekt (Abb01). De commissie concludeerde op basis van deze informatie dat het hier echter om twee verschillende producten gaat met een vergelijkbaar arachidonzuurgehalte. De concentraties van in het bijzonder sterolen en lignocerinezuur verschilden dusdanig dat er volgens de commissie geen sprake is van wezenlijke gelijkwaardigheid van SUNTGA40S met ARASCO. De toxicologische informatie van derden voldoet derhalve niet voor het product van deze aanvraag.

De commissie stelt vast dat de vetzuursamenstelling van de nieuwe fungusolie van de firma Suntory bij de beoogde toepassing geen aanleiding geeft tot bezorgdheid over de gezondheid van zuigelingen en ook niet over mogelijke nadelige effecten op latere leeftijd. Echter, om de afwezigheid van ongewenste schadelijke componenten of verontreinigingen te bevestigen heeft de commissie aanvullend toxicologisch onderzoek geëist met jonge dieren middels een zogeheten subchronisch onderzoek na prenatale blootstelling. Zij verwijst naar paragraaf 3.8.1 voor de evaluatie van de resultaten. Het belangrijkste punt in de overwegingen van de commissie is dat er vanuit toxicologisch oogpunt destijds geen precedent was voor de blootstellings situatie, te weten een dagelijkse inneming gedurende minimaal de eerste 3 á 6 maanden van het eerste levensjaar. De commissie meent dat voor het nieuwe product de grootst mogelijke zorgvuldigheid moet worden betracht gezien de toepassing bij zuigelingen (IOM04).

De commissie heeft kennis genomen van de resultaten van toxicologisch onderzoek door derden met de andere fungusolie ARASCO. Deze gegevens ondersteunen de bevindingen van de aanvrager voor dit type arachidonzuurrijke olie. Nadelige (toxische) effecten zijn niet waargenomen in onderzoeken naar genotoxiciteit, teratogeniteit/embryotoxiciteit en in subchronisch onderzoek na prenatale blootstelling (Art00, Art00a, Bur99, Hem97, Hem00, Inn96, Kos97, Wib97).

⁵ DSM Food Specialties is sinds 1996 de enige commerciële leverancier van het arachidonzuur dat Martek Biosciences Co verwerkt in 'Formulaid' dat als ingrediënt voor zuigelingenvoeding in de Verenigde Staten, Europa en Azië wordt vermarkt. Formulaid is een mengsel van arachidonzuurrijke en docosahexaeenzuurrijke oliën. Zie persbericht van 23 mei 2001, http://www.dsm.com/newsarchive/~en/g_fda_gras_en.htm, en http://www.martekbio.com/Nutritional_Products/Technical_Overview.asp.

In Bijlage 2 van de aanvullende informatie (Abb01) vermeldt de aanvrager de handelsovereenkomst tussen Gist-Brocades (nu DSM) en Martek. Deze bijlage bevat gegevens over de chemische samenstelling en het productieproces van ARASCO van het dossier dat door Martek bij de GRAS aanvraag is ingediend bij de US FDA.

3.8.3 Conclusie

De fungusolie SUNTGA40S is grondig geëvalueerd, aangezien het een nieuwe bron van arachidonzuur is. Samengevat concludeert de commissie dat de uitgevoerde onderzoeken voldoende zijn om de toxiciteit van het nieuwe voedselingrediënt te kunnen beoordelen en zij is het eens met de interpretatie van de aanvrager: herhaalde orale blootstelling brengt geen toxische effecten te weeg. Voor de veilige bovengrens van inname van het nieuwe voedselingrediënt baseert de commissie zich op het subchronisch onderzoek na prenatale blootstelling. Het onderzoeksrapport (Abb04) vermeldt als NOEL (*No Observed Effect Level*) de op de één na hoogste dosering, omdat bij de hoogste dosisgroepen veranderingen werden waargenomen die duidelijk behandelingsgerelateerd zijn. De commissie is het eens met de verklaring dat deze effecten waarschijnlijk worden veroorzaakt door het relatief hoog gehalte aan meervoudig onverzadigde vetzuren in het diervoeder. Het wijst op een metabole reactie, mogelijk veroorzaakt door een voedingskundige onbalans. Vergelijkbare bevindingen zijn ook door andere onderzoekers gerapporteerd (Bur99, Hem00). De commissie onderschrijft dat het hier niet om toxicologische effecten gaat omdat histopathologische veranderingen uitblijven na blootstelling aan de fungusolie. De commissie meent daarom dat de hoogst geteste dosis de NOAEL (*No Observed Adverse Effect Level*) weergeeft, te weten 2900 mg olie per kg lichaamsgewicht per dag (overeenkomend met ongeveer 1200 mg arachidonzuur/kg/dag). De inname van de fungusolie die in proefdieren geen nadelige gezondheidseffecten te weeg brengt is dus bijna een factor 40 hoger dan de bij zuigelingen beoogde inname van 75 mg olie per kg lichaamsgewicht per dag, zie hiervoor paragraaf 3.4 (overeenkomend met ongeveer 30 mg arachidonzuur/kg/dag). Aangezien het niet aannemelijk is dat het voorgestelde consumptieniveau door baby's zal worden overschreden, oordeelt de commissie dat de fungusolie SUNTGA40S als bron van arachidonzuur veilig kan worden toegepast als voedselingrediënt voor zuigelingen.

Executive summary

The company Suntory Ltd has applied for clearance to introduce the arachidonic acid-rich oil SUNTGA40S to the European market, for use as an ingredient in the manufacture of infant formula. The oil – referred to below simply as ‘the fungal oil’ – is produced by the fungus *Mortierella alpina*. It consists of roughly 41 per cent arachidonic acid, a long-chain polyunsaturated fatty acid. The applicant has compiled a safety dossier containing (bio)chemical, nutritional, microbiological and toxicological information and the results of research with human subjects. This dossier was submitted to the Committee on the Safety Assessment of Novel Foods. The Committee has thoroughly evaluated the safety of the fungal oil as a novel source of arachidonic acid, since nothing was previously known about the effects of the other components of the fungal oil on newborn babies. The applicant’s expectation is that not only premature babies but also full-term infants will be exposed to the novel ingredient over a prolonged period.

The compositional data and product properties are consistent with careful production and purification. The Committee therefore concludes that the quality of the fungal oil is adequately assured. The micro-organism used in the oil’s production (*Mortierella alpina*) is harmless, and the fungal oil contains no contaminants that could be harmful to human health.

The intention is that the novel product will be supplied to infant formula manufacturers for use as a source of arachidonic acid. This fatty acid is important in the context of optimal development of the brain; its addition to infant formula has been permitted since 1996. The conditions governing such use are set out in national and European legislation concerning infant formulae. The applicant anticipates that, for a baby fed on formula made using the novel ingredient, intake will be 75 mg of fungal oil per kg bodyweight per day, which equates to 30 mg of arachidonic acid per kg bodyweight per day.

The fungal oil has been studied in the context of a number of standard animal tests for genotoxicity, acute toxicity and subchronic toxicity. In addition, a special study has been carried out involving the subchronic exposure of young rats. These animals were directly exposed to the test substance for ninety days, after having been indirectly exposed via their mothers during the gestation and lactation period. On the basis of the toxicological study findings, the Committee concludes that repeated oral exposure has no toxic effect. In defining a safe upper intake limit for the novel food ingredient, the Committee has been guided by the findings of the research into the effects of subchronic exposure on young rats. The Committee takes the view that the NOAEL (*No Observed Adverse Effect Level*) in this study is represented by the highest experimental dose used, namely 2900 mg of oil per kg bodyweight per day. In other words, laboratory animals exhibited no adverse response to consumption of the fungal oil at an intake level nearly forty times higher than the anticipated intake of an infant fed on formula containing the novel ingredient, i.e. 75 mg of oil per kg bodyweight per day, corresponding to 30 mg of arachidonic acid per kg per day (see subsection 3.4). The Committee considers it unlikely that babies will consume more than the proposed amount of the product.

In clinical trials, newborn babies have been exposed to the novel ingredient from birth to the age of twelve months. From these trials, it is apparent that the consumption of infant formula to which the novel fungal oil has been added as a source of arachidonic acid, in its normal combination with docosahexaenoic acid, has no adverse effect on the general growth and development of either premature or full-term infants.

Taking all the available data into account, the Committee concludes that the fungal oil SUNTGA40S, as a source of arachidonic acid, can safely be used as an ingredient in infant formula.

1 Introduction

1.1 Dutch assessment procedure

On 3 July 2000, the Minister of Health, Welfare and Sport requested the advice of the Health Council's Committee on the Safety Assessment of Novel Foods, referred to below simply as 'the Committee', concerning the safety for consumers of the arachidonic acid-rich oil SUNTGA40S. The intention is to use this oil, which is produced by the fungus *Mortierella alpina*, as an ingredient in infant formula. Before the regulation 258/97 of the European Parliament and the Council on Novel Foods and Novel Food Ingredients (EC97) came into force in May 1997, products derived from this fungus were in limited use in the EU. Further details are given in subsection 1.2, below. The company Suntory plans to make wider use of this oil and, in compliance with the regulation referred to above, has accordingly sought clearance to introduce the product to the market.

With effect from 1 January 2005, the Minister of Health, Welfare and Sport transferred the Committee's advisory responsibilities to the Agency of the Medicines Evaluation Board. Hence, the application for the authorisation of arachidonic acid-rich oil has been processed under the transitional arrangements put in place in connection with the transfer.

The assessment procedure took the following course. On 25 October 2000, the Committee met for its first discussion of the dossier compiled by the applicant¹, which contained an evaluation of the safety of the novel ingredient (Abb00). In May 2000, the Committee asked the applicant to provide additional information, being concerned about the validity of using the results of toxicological research carried out on similar arachidonic acid-rich oils by third parties for the purpose of the assessment in question. The Committee was not entirely satisfied with the response received from the applicant on 9 August 2001 (Abb01). The Committee therefore remained of the view that the available toxicological information provided regarding the novel oil was insufficient, given that the oil was intended for prolonged use by a particular target group, namely newborn babies. The Committee informed the applicant accordingly in a letter dated 24 October 2001. In this letter, the Committee specified the type of research from which data were required in order to proceed with the safety assessment. The requested data were ultimately received on 18 May 2004 (Abb04). The dossier was discussed for the last time on 15 September 2005, after which the Committee completed its assessment. This advisory report sets out the Committee's findings.

¹ On 6 June 2004, the original applicant, Abbott Laboratories, transferred the application for authorisation to a company called Suntory Ltd, which produces the fungal oil SUNTGA40S (Abb04a). In August 2004, Suntory resubmitted the dossier, together with all the supplementary information provided by both companies (Sun04).

1.2 The use of arachidonic acid-rich oils and docosahexaenoic acid-rich oils in infant formulae in the EU

The applicant wishes to introduce a novel arachidonic acid-rich oil, which is produced by a fungus, to the European market as a food ingredient, for use in the manufacture of infant formula. Arachidonic acid is a fatty acid that has been a permitted infant formula ingredient within the European Community since 1996 (EC96). It has been discovered that infants need more arachidonic acid and docosahexaenoic acid than most infant formulae provide (ACN96, Hor00, Luc99). Premature babies have insufficient enzymatic capacity to synthesise these polyunsaturated fatty acids from the essential fatty acids linoleic acid and alpha-linolenic acid. Arachidonic acid is essential not only for healthy general growth, but as a component of the architecture it is also involved in the function of neuronal membrane; as such it is important for the general development of the brain. Similarly, docosahexaenoic acid, being a structural membrane component, is necessary for optimal development of the retina (Hor00, FAO94, Luc99, ISS95). Various organisations around the world recommend that arachidonic acid and docosahexaenoic acid should be given to infants, in particular premature babies (ESG91, FAO94, ISS95, Kol01). According to current scientific knowledge, premature babies derive at least a temporary general functional benefit from consuming these fatty acids (Cla05, Hor00). However, a recent meta-analysis of eleven randomised studies, the results of which were published prior to 2003, indicated that there was no demonstrable positive effect on brain development in the longer term (Sim04). Although the addition of arachidonic acid and docosahexaenoic acid to the diets of full-term infants is increasingly widely advocated, the health benefit is by no means scientifically proven (Bak03, Hor00, ISS95, Kol01, Luc99, Mak05, Sim01, Sun04). However, the Committee emphasises that an evaluation of the efficacy of these substances is outside the scope of this safety assessment.

The European regulation on novel foods came into effect in May 1997 (EC97, EC97a). Novel foods which prior to that date were already consumed in substantial quantities or had already received market approval from a European member state are exempt from the provisions of this regulation. An example of a substance that is thus not covered by the regulation is the arachidonic acid-rich oil ARASCO², which is also produced by a fungus. In 1995, the competent authority in the Netherlands, on the basis of a recommendation from the provisional Committee on the Safety Assessment of Novel Foods, granted Numico (previously Nutricia) permission to use this oil in infant formulae for both premature and full-term infants. In this context, the Committee would refer the reader to 'Exemptions Commodities Act Order on Novel Foods' (Sta95). However, Numico has never marketed a formula for full-term babies, either in the Netherlands or elsewhere in the EU, using ARASCO as a source of arachidonic acid.

² This applies equally to DHASCO. ARASCO® (an arachidonic acid-rich oil obtained from the fungus *Mortierella alpina*) and DHASCO® (docosahexaenoic acid-rich oil obtained from the alga *Cryptocodinium cohnii*) are produced by the Martek Biosciences Corporation (USA).

When the above-mentioned European regulation on novel foods came into force, both polyunsaturated fatty acids from conventional sources (egg yolk lipids, fish oils), and fatty acids isolated from micro-organisms were already being added to special infant formulae for premature babies. Examples of products containing such fatty acids are 'Nenatal' and 'Premilon' (the former intended for infants during hospitalisation and the latter for infants following discharge), which have been available on the Belgian market since 1994. Arachidonic acid-rich fungal oils were consequently not regarded as novel foods by the British assessment authority, the Advisory Committee on Novel Foods and Processes (ACNFP), when the European regulation (EC97) came into force in 1997. The ACNFP accordingly terminated two assessment procedures, which had started in 1993 and 1994. These procedures related to applications submitted by two separate infant formula manufacturers, which were accompanied by similar dossiers. Both manufacturers wished to use fatty acid-rich oils (ARASCO and DHASCO²) obtained from micro-organisms in infant formula (ACN96). In October 1996, the French assessment authority *Direction générale de la concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes* (DGCCRF) received an application for authorisation of the use of the same ingredients in infant formula. The French competent authority approved the oils ARASCO and DHASCO for use in infant formulae for premature and full-term infants in June 1999. Since the Committee was unable to ascertain what the legal basis for this approval was, its status under European law is unclear.

The Dutch Committee on the Safety Assessment of Novel Foods ('the Committee') notes that fungus-derived arachidonic acid-rich oils have never been officially assessed in accordance with European regulation 258/97 (EC97, EC97a) and therefore believes that the applicant Suntory is correct to seek to go through the full authorisation procedure. This view is based on the following considerations. The infant formulae previously marketed in Belgium (see above) were intended primarily for premature babies. By contrast, the food ingredient under assessment in this case is intended for use in products aimed at a much wider target group, i.e. all infants. No informed conclusion could previously be drawn regarding the substantial equivalence of the product under assessment to an existing product, because the original dossier did not contain any detailed information about the composition of a similar arachidonic acid-rich oil marketed by another company (see subsection 3.8.2 for details). Finally, a US committee that evaluated the safety of adding novel ingredients to infant formulae recently concluded that the use of an ingredient from a new source can raise unique safety questions and that great caution should be exercised, in view of the most vulnerable population members (IOM04).

2 Completeness and accuracy of the dossier

2.1 Administrative data

The name and address of the applicant are as follows: Suntory Limited, 3-3, 2-chome, Daiba, Minato-ku, Tokyo 135-8631, Japan. This address has been valid since 5 January 2005. Suntory Ltd is the manufacturer of the arachidonic acid-rich oil SUNTGA40S.

2.2 General description of the food ingredient

The application relates to the introduction to the European market and the trading of an arachidonic acid-rich oil, SUNTGA40S, which is isolated from the fungus *Mortierella alpina* and is referred to below simply as 'the fungal oil'. Arachidonic acid, a polyunsaturated fatty acid, makes up roughly 41 per cent of this oil. The applicant does not intend to supply the fungal oil directly to the consumer, but to food manufacturers for inclusion in infant formulae. The aim of including the fungal oil in infant formula would be to create a product whose arachidonic acid concentration is more similar to that of human milk, with a view to promoting optimal growth and development of the nervous system (see subsection 1.2 for more information). The novel ingredient will be added to formulae for both premature and full-term babies. This was confirmed by the applicant at the Committee's request, since the target group definition given in the dossier is not specific in this regard.

2.3 Classification of the food ingredient for assessment

The applicant does not indicate which of the six main categories of novel food and novel food ingredient, specified in table 1 in part I of Recommendation 97/618 of the European Commission (EC97a), the product under assessment belongs to.

The Committee's view is that the product is a complex food ingredient originating from a non-genetically modified micro-organism (class 2). The oil belongs to sub-class 2.1, since the source organism has previously been used within the European Union for feeding premature babies (see subsection 1.2).

2.4 Information on the food ingredient

The information needed to assess the suitability for consumption of a class 2.1 food ingredient should be organised under the following themes, which are defined in Recommendation 97/618 of the European Commission (EC97a):

- I Specification of the novel food ingredient
- II Effects of the production process applied to the food ingredient
- III History of the organism used as the source of the food ingredient
- IX Anticipated intake and extent of use of the food ingredient
- X Information from previous human exposure to the food ingredient or its source

- XI Nutritional information on the food ingredient
- XII Microbiological information on the food ingredient
- XIII Toxicological information on the food ingredient

The dossier contains sufficient information for assessment of the safety of the novel food ingredient. However, the applicant has not structured the information provided in accordance with the themes referred to above. In its assessment, the Committee on the Safety Assessment of Novel Foods has nevertheless adhered to the prescribed thematic structure. The Committee concludes that the dossier as a whole is acceptable and of sufficient quality. Furthermore, the Committee has access to additional scientific literature regarding toxicological and human studies.

2.5 Brief summary provided by the applicant

The dossier includes a very brief summary, copies of which have been forwarded to the member states, in accordance with article 6, section 2 of the European Regulation (EC) 258/97 (EC97). However, the Committee considers the data presented in this summary too concise to support proper interpretation; to reach an informed opinion, one would need to consult the complete dossier. The dossier summary that is appended to this assessment report (pages 45-55) is a recently modified version provided by Suntory Ltd.

2.6 Other assessments

The product under consideration is not being assessed in any context other than that of the European regulation on novel foods and novel food ingredients (EC) 258/97 (EC97). The use of food ingredients in formulae intended for healthy infants is regulated in Directive 91/321/EEC on infant formula and follow-on formula (EC91), as amended by Directives 96/4/EC, 1999/50/EC and 2003/14/EC. As part of the review of these infant formula directives (SCF03), technical discussions regarding permissible concentrations of desirable and undesirable components have taken place, most recently on September 12, 2005.

2.7 Labelling proposal by the applicant

Labelling needs to comply with Directive 2000/13/EC (EC00) and article 8 of Regulation (EC) 258/97 (EC97). In addition, the labelling of novel oil-containing infant formulae would have to include the general particulars and obligatory statements specified in Directive 91/321/EEC, article 7.2 (EC91). The labelling proposal is to be discussed in the Netherlands in the context of the Regular Consultations on the Commodity Act and is not therefore considered in this report.

3 Interpretation and evaluation of the data submitted

3.1 I Specification of the novel food ingredient

The oil referred to in the application is bright yellow and consists of at least 90 per cent triglycerides (and up to 7 per cent diglycerides). The applicant states that the arachidonic acid content accounts for at least 40 per cent of total fatty acid content. On the basis of analysis of three representative production batches, the fungal oil's fatty acid content may be broken down into the following primary components:

- Arachidonic acid (40 - 46 per cent)
- Palmitic acid (11 - 13 per cent)
- Linoleic acid (8 - 10 per cent)
- Lignoceric acid (7 - 8 per cent)
- Stearic acid (7 - 8 per cent)
- Oleic acid (6 - 7 per cent)

The oil also contains small quantities of gamma-linolenic acid, dihomo-gamma-linoleic acid and behenic acid, each accounting for 2 to 3.5 per cent of the total fatty acid content, plus traces (<1 per cent) of other fatty acids. The free fatty acid content is less than 0.2 per cent, expressed as oleic acid.

The results of the chemical analyses are accompanied in the dossier by comprehensively documented analytical reports. The Committee concludes that the applicant has analysed and validated the composition of the product thoroughly. The product information provides a reliable picture of the composition of the fungal oil that the applicant wishes to market and is sufficient for assessment of the product's safety.

3.2 II Effects of the production process applied to the food ingredient

The novel food ingredient is produced by fermentation of the fungus *Mortierella alpina*. The fermentation process is set in motion by cultivating the fungus for two to three days in a liquid medium with a supply of nutrients under aerobic conditions at 28°C. Fermentation is then allowed to continue at 26°C for eight to fourteen days. The resulting biomass is ultimately dried. This raw product can be cold-stored under a nitrogen atmosphere, or extraction can be carried out immediately, using hexane. The extract is filtered and all hexane residues removed, then any unwanted components and specific contaminants are eliminated. Originally, the producer used a three-stage process to degumm, neutralise, wash with water and dry the extract (Abb00). However, this process has now been superseded by selective adsorption involving the use of a 'mixed column treatment' (Sun04). The raw fungal oil is subsequently purified using a new technique described in a confidential dossier section, before undergoing a two-step deodorization process. Prior to storage, a commercially available tocopherol mixture is added to counter oxidative decomposition. Since the product already contains some tocopherol, the addition brings

the overall tocopherol content (i.e. the total amount of alpha, gamma and delta-tocopherol) up to 0.18 per cent.

The end product undergoes thorough chemical analysis, using standard techniques, and the results are documented. From the very low peroxide value (specified as not exceeding 5 milli-equivalents per kg, but typically less than 1 milli-equivalents per kg) and the low p-anisidine value (less than 10), it would appear that the product contains almost no primary or secondary oxidation products. Sterols are present in the fungal oil in small quantities, the principal sterol being desmosterol (0.6 mg/ml). The applicant indicates that ergosterol and beta-sitosterol are also found, each in concentrations of roughly 0.1 mg/ml, as are two unidentified sterols (each in concentrations not exceeding 0.1 mg/ml).

The applicant has also tested the novel product for the presence of various environmental contaminants. With regard to chlorinated hydrocarbons, the dossier states that the oil contains no PCBs or detectable residues of the pesticides ppDDE, ppDDD and ppDDT. Phthalate esters, which are generally present in the environment, are sporadically found in the oil. The overall heavy metal content does not exceed 1.0 mg per kg. Tests with a detection limit of 0.01 or 0.02 mg per kg, failed to find any cadmium, mercury or lead, and no arsenic was detected in a test with a limit of 0.2 mg per kg.

The technical and chemical information in the dossier was sufficient to allow the Committee to assess the safety of the novel food ingredient. The Committee accepts the applicant's assertion that the product properties are indicative of high quality. Production and purification are evidently carried out with due care. The applicant supported the general information regarding the production process with details of the so-called critical control points. During the fermentation process, for example, contamination checks are performed to assure microbiological quality. The Committee regards the detection limits of the analytical techniques used to test for the chemical contaminants referred to above to be sufficiently low. For the novel food ingredient to be qualified as food grade, it must comply with all the statutory requirements applicable to foodstuffs in general³ and those applicable to infant formulae and follow-on formulae in particular (see subsection 2.6). However, it should be noted that the requirements regarding contaminants are presently under review. The Committee assumes that the applicant will ensure that the product continues to meet the most recently specified upper limits.

The Committee notes that the product-technical information provided by the applicant includes no data regarding either the stability of the oil or the presence of trans-fatty acids. However, it is assumed that the novel product will comply with the normal criteria regarding the storage life and quality of edible oils and fats. The amount of trans-fatty acid in the product should be minimised. However, in view of the production process, the Committee considers it unlikely that the refined oil will contain significant quantities of trans-fatty acid.

³ Reference is made to, for example, European Regulation 853/2004 on the hygiene of foodstuffs (EC04) and Regulation 466/2001 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs (EC01).

Particular attention was given to the fact that the purification stage of the production process was modified by Suntory while the assessment procedure was in progress. On the basis of the compositional analyses of three recent production batches (Sun04), the Committee is of the view that the chemical composition of SUNTGA40S has not been substantially affected by the modification in question.

The Committee concludes that the arachidonic acid-rich fungal oil contains no contaminants that might be harmful to public health.

3.3 III History of the organism used as the source of the food ingredient

The applicant makes reference to several publications, which indicate that the production of certain polyunsaturated fatty acids using the fungus *Mortierella alpina*, or other *Mortierella* species, has been thoroughly studied. The precise culture conditions in the biofermenters have a decisive influence on the nature of the fungal oil (Abb00). The *Mortierella* family consists of various ordinary, commonly occurring species of soil-dwelling fungi. The applicant provides the taxonomical classification of '*Mortierella alpina* Peyronel 1S-4'. The dossier includes a literature study from 1989, which concluded that *Mortierella alpina* was not pathogenic and did not produce mycotoxins. According to the applicant, the fungus is completely harmless; this contention is supported by the results of toxicological research. No adverse effects were observed in laboratory mice fed for two weeks on a diet containing 1.6, 4.0 or 10 per cent test material. The highest dose given to the mice equated to 13.9 grams of *Mortierella alpina* per kg bodyweight per day.

The Committee would add the following observations. *Mortierella alpina* is a not genetically modified micro-organism and is not generally used in the food industry. However, for about ten years, the fungus has been used for the production of arachidonic acid for use as an ingredient in special infant formulae, as described in subsection 1.2. The fungus itself does not form part of the novel product under assessment. In view of the general prevalence of *Mortierella alpina* in the soil, humans and animals are commonly exposed to the spores of this micro-organism. This fungus cannot grow at temperatures in excess of 30-32°C.

It is of general interest that samples of micro-organisms used in the production of novel foods should be available to the scientific community. The Committee therefore appreciates that the applicant has made a specimen of the fungus species available to the internationally accessible collection held by the Laboratory of Applied Microbiology at Kyoto University.

On the basis of the international scientific literature, the Committee concludes that there is no reason to believe that *Mortierella alpina* produces any unusual mycotoxins. The dossier includes negative results from tests for the following mycotoxins: aflatoxin-B1, -B2, -G1, and -G2, sterigmatocystin, ochratoxin, patulin, nivalenol, zearalenone, and fumonisin-B1, and -B2. These tests had a detection threshold of 50 µg per kg of oil, with the exception of the test for aflatoxins, which was sensitive down to 5 µg per kg. The Committee would point out that the limits for mycotoxins are under active review and that the applicant will need to ensure that the product complies with the most recently specified

upper limits. In this context, particular attention should be paid to amendments of Regulation 466/2001 (EC01).

3.4 IX Anticipated intake and extent of use of the food ingredient

The applicant anticipates that the fungal oil will be added to infant formulae in order to create a product whose arachidonic acid concentration corresponds to that of human milk. It should be emphasised that the fungal oil will be supplied as an intermediate product, which will ultimately form a small component of complex infant formulae. In the finished consumer product, the oil will be diluted at least two thousand times. The Committee recognises that, in addition to Abbott, the company that originally submitted the dossier (see footnote to subsection 1.1), various other infant formula manufacturers are likely to use the novel arachidonic acid-rich oil. The Committee regards it as the responsibility of the applicant, being the producer, to ensure that purchasers are instructed as to the correct use of the fungal oil. In this context, the Committee would draw attention to Directive 96/4/EC (EC96), which states the arachidonic acid content of a product covered by the directive must not exceed 1 per cent of the total fat content.

The dossier contains an estimate of the amount of the novel food ingredient that would be consumed by babies fed on formula made with it. This estimate is based on the application by Abbott Laboratories (Abb00). The latter company puts arachidonic acid intake at 30 mg per kg bodyweight per day, corresponding to 75 mg of fungal oil per kg per day. In order to maintain an appropriate nutritional fatty acid balance, formulae made using the novel food ingredient would need to include docosahexaenoic acid as well, thus resulting in an intake of 16 mg per kg per day. These dosages are consistent with the calculated median intakes of exclusively breastfed European infants. Abbott calculated the above figures using published data on human milk from European women (Abb00, Abb01). The calculations are based on the overall energy intake of a premature baby of 120 kcal per kg per day. In addition, it is assumed that the nutritional information obtained from Abbott's own clinical research is representative (see subsection 3.5). This research involved infant formulae with a calorific value of 699 kcal per litre and 49 per cent of the energy supplied by fat, and 0.40 per cent of the total fat content for arachidonic acid. The infant formulae in question are intended for consumption throughout the first twelve months of life. Arachidonic acid content will be 0.40 per cent of the total fat content in both the formula for premature babies and that for full-term babies; the figures for DHA being 0.25 per cent and 0.15 per cent, respectively.

3.5 X Information from previous human exposure to the food ingredient or its source

The applicant has evaluated the growth and development of premature babies in a large-scale clinical study involving 470 babies with birth weights varying from 0.75 to 1.8 kg. The research was organised on the randomised double-blind principle. Both the research protocol and the results were included in the dossier (Abb00, O'Co01). One of the subject groups was made up of 140 babies who until the age of twelve months were reared on

infant formulae containing arachidonic acid from fungal oil and docosahexaenoic acid from fish oil. The concentrations of these fatty acids in the formula given during the hospitalisation period were 0.40 per cent and 0.25 per cent, respectively, of the total fat content; the corresponding figures for the formula given thereafter were 0.40 per cent and 0.15 per cent. On the basis of this study, the applicant concluded that, up to the age of twelve months, no clinically relevant differences could be discerned between babies fed on infant formulae containing arachidonic acid and docosahexaenoic acid and those in the control group. The parameters monitored were growth (weight, length, head circumference), the development of the visual acuity (an indicator of retinal maturity), and cognitive, motor and language development.

The report on a comparable study involving full-term babies was provided by the applicant at a later date (Abb01, Aue01). This research indicated that infant formula enriched with arachidonic acid from fungal oil and docosahexaenoic acid from fish oil adequately supports normal growth and development (Aue03).

It was not apparent from the dossier whether the fungal oil used in these studies was SUNTGA40S; the Committee accordingly asked for clarification on this point. The applicant's response indicated that both clinical studies involved a previously developed product with a lower arachidonic acid concentration (25 per cent), called SUN-TGA25. The Committee notes that, in the clinical studies, the applicant focused mainly on evaluating the effectiveness of the polyunsaturated long-chain fatty acids added to the formulae. Furthermore, the Committee accepts the applicant's contention that the consumption of infant formula to which the novel fungal oil has been added as a source of arachidonic acid, in combination with docosahexaenoic acid in the investigated proportions, has no adverse effect on the general growth and development of either premature or full-term babies. These findings are supported by the results of research undertaken by others, using similar arachidonic acid-rich oil, which is briefly described below.

In the more recently submitted dossier (Sun04), Suntory provided an update to the scientific literature from the period 2000 to 2003. The Committee has noticed that the applicant has evaluated the addition of fatty arachidonic acid as such, without differentiating on the basis of the source. The Committee additionally has access to other information, some of it more recently published (Cla05, Hor00, Mak05, Sim01, Sim04). Of particular interest is the review article published in January 2004 by Simmer and Patole, who evaluated eleven randomised studies involving premature babies (Sim04). These studies examined the effect of adding arachidonic acid and docosahexaenoic acid to infant formula; in eight of the eleven studies, the subjects were followed up until a term corrected age of twelve months or older (eighteen or twenty-four months). In one of the studies, the source of arachidonic acid was Suntory's fungal oil (O'Co01). In five of the eleven studies, the children were exposed from four to forty-eight weeks to ARASCO, another arachidonic acid-rich oil obtained from the same fungus species (see subsections 1.2 and 3.8.2 for more information). The effect of such fatty acid supplementation has more recently been assessed in relation to full-term babies, taking account of all the available published and unpublished randomised clinical studies

(Mak05). This meta-analysis of fourteen qualified studies found that the enrichment of infant formulae with polyunsaturated long-chain fatty acids, for at least the first three months of life, had no adverse effect on growth regardless of the origin of the fatty acids (i.e. whether obtained from conventional sources or micro-organisms). In one of the fourteen studies, the arachidonic acid originated from the applicant's novel oil (Aue01), while three other studies involved the use of the fungal oil ARASCO as source of arachidonic acid. The Committee considers that the two systematic reviews demonstrate that the presence of arachidonic acid and other ingredients derived from the fungus *Mortierella alpina* does not adversely affect the growth of infants.

3.6 XI Nutritional information on the food ingredient

The only nutritional information on the novel food ingredient contained in the dossier is some general information in the introduction regarding arachidonic acid, the primary component of the fungal oil.

The Committee's would point out that this oil is not used as an energy source (fat) but as a source of arachidonic acid. This fatty acid is of vital importance as cell membrane constituent. In addition, arachidonic acid is a precursor of certain short-lived hormone like substances (eicosanoids), which play an important role in cellular signal transfer. The Committee confirms that arachidonic acid is a normal component of human milk. In babies, it is important mainly for the rapidly growing nervous tissues. Arachidonic acid is not classed as an essential fatty acid, but it is apparent from scientific research that premature babies in particular produce insufficient arachidonic acid themselves to entirely meet their needs (see subsection 1.2).

3.7 XII Microbiological information on the food ingredient

The original dossier contained no information regarding the microbiological quality of the novel food ingredient. The additional information provided by the applicant did, however, include data indicating that coliforms are not present in the ingredient (Sun04). The Committee considers it unlikely that the novel product contains micro-organisms, since the production process involves the use of high temperatures, and the moisture content of oils is generally small.

3.8 XIII Toxicological information on the food ingredient

3.8.1 Toxicological studies with arachidonic acid-rich oil SUNTGA40S

The novel fungal oil has been tested for genotoxicity, acute toxicity and subchronic toxicity. Where the latter form of toxicity was concerned, testing involved both adult and young laboratory animals. The test substance SUNTGA40S, in which arachidonic acid accounted for an average of 41 per cent of the total fatty acid content, was produced using the procedure described in the original application (Abb00). The Committee has established that the tested product corresponded closely to the product now commercially available (see subsection 3.2).

By *in vitro* testing, the applicant established that the fungal oil has no oestrogen receptor-binding (hormone disturbing) properties. The Committee therefore concludes that there is no reason to suppose that the fungal oil has any a pseudo-hormonal effect.

No activity was observed when the oil was subjected to a standard bacterial mutation test. Furthermore, in a standard test with cultivated mammalian cells, the number of chromosome abnormalities was not significantly increased relative to the control. The applicant concluded from these negative test results that the arachidonic acid-rich fungal oil was not genotoxic. The Committee supports this conclusion.

The applicant has also investigated the effect of the fungal oil on the growth of newborn piglets bottle-fed on formula containing the test substance for the first four weeks of life (Sun04). The Committee concludes that this research revealed no abnormalities that might be relevant in the context of this safety assessment.

An acute toxicity test was carried out using mice. Following a single oral administration of 2 g of fungal oil per kg bodyweight, no adverse effects were observed.

In a fourteen-day toxicity study using rats, designed to establish appropriate doses for use in subchronic toxicity testing, a significant rise was observed in the number of fat droplets in the liver. This observation was made after a two-week exposure period in which the fungal oil accounted for 10 per cent of the animals' diet. In the ninety-day follow-up study, the applicant administered lower doses of the novel food ingredient, i.e. 0.5, 1.0 and 2.0 per cent oil (by weight) in the animals' feed. For the highest dose group, the level of exposure⁴ to the test substance calculated by the applicant varied from 2125 to 829 mg of oil per kg bodyweight per day in males and from 1732 to 1045 mg of oil per kg bodyweight per day in females. Since no sex-related differences were observed, fungal oil intake was averaged across both sexes. Calculated on this basis, the intake figures for the groups whose diets included 0.5, 1.0 and 2.0 per cent fungal oil by weight were, respectively, about 312, 650 and 1250 mg of oil per kg bodyweight per day. The applicant estimated that this equated to roughly 1.6, 3.3 and 6.6 times the maximum level of consumption likely in premature infants.

The applicant concluded that no clinically relevant changes resulting from consumption of the novel oil had been observed. This conclusion was based on monitoring bodyweight and food consumption during treatment, plus examination of the eye (ophthalmoscopy), biochemical and haematological blood analyses, measurement of blood-hormone levels, organ weights, and macroscopic and microscopic tissue examinations at necropsy. The most striking change was that the prothrombin time and the activated partial thromboplastin time were extended in the male rats at all the tested dosages, but not in the females. The applicant stated that the clinical relevance of these (in themselves minor) changes in blood coagulation parameters was unclear, partly because of the absence of hepatic or hemorrhagic lesions. In all groups that received the test substance in their diet, small but significant increases were observed in the weights of

⁴ In this type of test, feed intake relative to bodyweight normally declines over time, thus resulting in declining exposure (as calculated on a weekly basis from the measured feed intake).

various organs (both in absolute terms and relative to bodyweight). The applicant characterised these changes as not clinically relevant, since they fell largely within the limits of normal physiological variation. Furthermore, microscopic examination had failed to reveal any accompanying tissue abnormalities.

The Committee has evaluated the above-mentioned (ninety-day) study of the subchronic toxicity of the arachidonic acid-rich fungal oil to rats. The maximum exposure averaged 1250 mg per kg bodyweight per day. The Committee notes that the minor increases in the weights of certain organs were not observed to be sex-consistent or dose-dependent. Hence, the Committee accepts the applicant's view that the changes are not demonstrably treatment-related. This conclusion is supported by the fact that others have made similar findings, particularly where the liver and spleen are concerned (Bur99, Hem00). The Committee agrees that the observed changes may be attributable to the relatively high concentration of polyunsaturated fatty acids in the animal diet (see also subsection 3.8.3). The applicant is therefore right to conclude that the findings demonstrate that, under the test conditions, the novel fungal oil does not adversely affect growth or cause any clinically relevant changes in the monitored parameters.

At the Committee's request, the applicant commissioned a more thorough toxicological study using rats, along the lines of the studies by Burns (Bur99) and Hempenius (Hem00). In subsection 3.8.2, the Committee sets out the reasons for this request. The study comprised two phases. First, there was an *in utero* phase, during which parent animals were exposed to the test substance for four weeks prior to and during mating (twelve males and twenty-four females per group); exposure of the females continued during gestation and lactation. The second phase involved subchronic exposure in the period following weaning of the offspring; during this phase, the young animals (ten males and ten females per group) were given the test substance for ninety days. The fungal oil was incorporated into the animals' diet in concentrations of 0.5, 1.5 and 5.0 per cent by weight. The corresponding average levels of exposure for both sexes in these dosage groups were 0.3, 0.9 and 2.9 g oil per kg bodyweight per day. A fourth experimental group was given the arachidonic acid-rich fungal oil in combination with a docosahexaenoic acid-rich tuna oil (with a docosahexaenoic acid concentration of 26.6 per cent of the total fatty acid level) in the interest of a balanced diet. The average levels of exposure in this group of animals was 2.1 grams of fungal oil and 1.2 grams of docosahexaenoic acid-rich tuna oil per kg bodyweight per day.

The applicant reported that, in the *in utero* phase of the study, no notable changes were observed in the parent animals and that there was no demonstrable adverse effect on fertility, reproductive performance, gestation (e.g. duration, number of females with live-born) or offspring (e.g. number, sex ratio, survival and development). The levels of intake of the test substance among the parent animals resulted in exposure levels comparable to those experienced by the offspring in the ninety-day follow-up phase. However, in the lactation period, the females' exposure was more than doubled.

The second phase of the study was evaluated by reference to standard criteria, i.e. bodyweight, food consumption, clinical observation, neurobehavioural observations, eye

examination (ophthalmoscopy), clinical biochemistry determinations (including urine analyses), haematological analyses, organ weight and histopathological analyses of numerous tissues. Where most of these variables were concerned, no treatment-related changes attributable to the subchronic exposure were observed in the young rats. However, certain values, particularly for variables determined in the highest dosage group, which received arachidonic acid on its own and in combination with docosahexaenoic acid, did prove to differ significantly from the corresponding values for the control group, made up of rats whose diet included similar amounts of added fat in the form of maize oil. The divergences involved reduced plasma concentrations of triglycerides, phospholipids and cholesterol and increased spleen weight. Changes were also observed in certain haematological variables relating to the red blood cell system. These changes, the applicant argued, were part of a previously observed physiological response to the high intake of polyunsaturated fatty acids, which explained why there were no similar changes in the maize-oil control group. The absence of histological changes would tend to support this argument. Combined exposure to arachidonic acid and docosahexaenoic acid produced results that were essentially the same as the results of exposure to arachidonic acid on its own. The Committee supports the applicant's conclusions in this regard.

3.8.2 Substantial equivalence of various fungal oils

The original safety dossier (Abb00) contained the results of various toxicological studies performed by other investigators, using a different arachidonic acid-rich oil, also obtained from the fungus *Mortierella alpina* (Bur99, Kos97). However, no data on the composition of this oil were provided in the dossier. The Committee additionally had access to information from a number of other toxicological studies, some of it more recently published (Art00, Art00a, Hem97, Hem00, Wib97). The study reported by Hempenius in 2000 was carried out in 1996; like Burns' study, it involved a ninety-day toxicity test on newly weaned rats, which had previously been exposed *in utero* and while suckling⁵ (Bur99, Hem00). On the basis of the information provided by the companies involved⁵ (the producers of the test substance), the Committee has established that the arachidonic acid-rich oils used in the above-mentioned studies were one and the same product, namely ARASCO (see footnote 2 in subsection 1.2). The applicant considered this oil to

⁵ Since 1996, DSM Food Specialties has been the exclusive commercial supplier of the arachidonic acid that Martek Biosciences Co uses in the production of Formulaid®, which is marketed as an infant formula ingredient in the United States, Europe and Asia. Formulaid is a mixture of arachidonic acid-rich and docosahexaenoic acid-rich oils. See press release dated 23 May 2001, http://www.dsm.com/newsarchive/~en/g_fda_gras_en.htm, and http://www.martekbio.com/Nutritional_Products/Technical_Overview.asp.

In Appendix 2 of the supplementary information (Abb01), the applicant refers to the partnership agreement between Gist-Brocades (now DSM) and Martek. The appendix in question contains data on the chemical composition of ARASCO and the manufacturing process, taken from the dossier provided by Martek in support of the GRAS petition submitted to the US FDA.

be substantially equivalent to the fungal oil SUNTGA40S, but provided no evidence in the dossier to support this claim. However, at the Committee's request, the applicant was able to provide data on the composition of this other oil (Abb01). Having examined this information, the Committee took the view that the two oils were distinct products, albeit with a comparable arachidonic acid content. The concentrations of other components, in particular sterols and lignoceric acid, differed to such an extent that the Committee was unable to agree that SUNTGA40S and ARASCO were substantially equivalent. Accordingly, the toxicological findings obtained by the other investigators were not felt to constitute an adequate basis for assessment of the product covered by the application.

The Committee accepts that, given the product's intended use, the fatty acid composition of the novel fungal oil produced by Suntory does not give rise to concerns regarding the health of consumers during infancy or in later life. However, to confirm that the product contained no undesirable harmful components or contaminants, the Committee required the results of additional toxicological research involving young laboratory animals, ie a so-called subchronic toxicity test preceded by *in utero* exposure. An evaluation of the results is presented in subsection 3.8.1. The most important consideration influencing the Committee in this context is that there was at the time no toxicological precedent for the anticipated exposure pattern, i.e. daily intake for at least the first three to six months of life. The Committee accordingly takes the view that, because the product is intended for consumption by infants, great caution should be exercised in connection with its introduction (IOM04).

The Committee has examined the findings of the toxicological studies performed by others using the fungal oil ARASCO. These findings support those of the applicant regarding this type of arachidonic acid-rich oil. No adverse (toxic) effects were observed in tests for genotoxicity or teratogenicity/embryotoxicity, or in tests involving subchronic exposure following *in utero* exposure (Art00, Art00a, Bur99, Hem97, Hem00, Inn96, Kos97, Wib97).

3.8.3 Conclusion

As a novel source of arachidonic acid, the fungal oil SUNTGA40S has been thoroughly evaluated. In summary, the Committee concludes that the studies undertaken provide an adequate basis for assessment of the toxicity of the novel food ingredient, and that the applicant's interpretation of the findings is justified: repeated oral exposure has no toxic effect. In defining a safe upper intake limit for the novel food ingredient, the Committee has been guided by the findings of the research into the effects of subchronic exposure following *in utero* exposure. The study report (Abb04) identifies the second highest experimental dosage as the NOEL (*No Observed Effect Level*), since animals in the highest dosage groups did exhibit changes that were clearly treatment-related. The Committee accepts the explanation that these effects were probably caused by the relatively high concentration of polyunsaturated fatty acids in the animals' diet. The observations are consistent with a metabolic response, possibly triggered by a nutritional imbalance. Similar observations have been reported by other researchers as well (Bur99, Hem00). The Committee would nevertheless emphasise that the observed effects were

not toxic effects: histopathological changes were not detected following exposure to the fungal oil. The Committee accordingly takes the view that the NOAEL (*No Observed Adverse Effect Level*) is represented by the highest experimental dose, namely 2900 mg of oil per kg bodyweight per day (corresponding to roughly 1200 mg of arachidonic acid per kg per day). In other words, laboratory animals exhibited no adverse response to consumption of the fungal oil at an intake level nearly forty times higher than the anticipated intake of an infant fed on formula with the novel ingredient, i.e. 75 mg of oil per kg bodyweight per day, corresponding to 30 mg of arachidonic acid per kg per day (see subsection 3.4). Since it is unlikely that babies will consume more than the proposed amount of the product, the Committee considers that the fungal oil SUNTGA40S, as a source of arachidonic acid, can safely be used as an ingredient in infant formula.

Literature/ Literatuur

- Abb00 Abbott Laboratories b.a.. Dossier: Application for novel food assessment. Fungal oil SUNTGA40S. Abbott Park (USA): Abbott, May 2000.
- Abb01 Abbott Laboratories b.a.. SUNTGA40S novel food application responses (Volumes 1-3). Abbott Park (USA): Abbott, August 2001.
- Abb04 Abbott Laboratories b.a.. Subchronic (13-week) oral toxicity study, preceeded by an in utero exposure phase with SUNTGA40S in rats (TNO Report V 4965). Abbott Park (USA): Abbott, May 2004.
- Abb04a Abbott Laboratories b.a.. Letter dated June 6, 2004: Transfer SUNTGA40S oil application to Suntory. Abbott Park (USA): Abbott, 2004.
- ACN96 ACNFP Annual Report 1996, Appendix VIII: ACNFP report on arachidonic acid single cell oil (ARASCO) and docosahexaenoic acid single cell oil (DHASCO) for use in infant feeding (pages 94-106).
- Art00 Arterburn LM, Boswell KD, Henwood SM, *et al.* A developmental safety study in rats using DHA- and ARA-rich single-cell oils. *Food Chem Toxicol* 2000; 38: 763-771.
- Art00a Arterburn LM, Boswell KD, Lawlor T, *et al.* In vitro genotoxicity testing of ARASCO® and DHASCO® oils. *Food Chem Toxicol* 2000; 38: 971-976.
- Aue01 Auestad N, Halter R, Hall RT, *et al.* Growth and development in term infants fed long-chain polyunsaturated fatty acids: a double-masked, randomized, parallel, prospective, multivariate study. *Pediatrics* 2001; 108: 372-381. Is included in the dossier (Sun04).
- Aue03 Auestad N, Scott DT, Janowsky JS, *et al.* Visual, cognitive, and language assessments at 39 months: a follow-up study of children fed formulas containing long-chain polyunsaturated fatty acids to 1 year of age. *Pediatrics* 2003; 112: 177-183.
- Bak03 Bakker EC, Ghys AJ, Kester AD, *et al.* Long-chain polyunsaturated fatty acids at birth and cognitive function at 7 y of age. *Eur J Clin Nutr*, 2003; 57: 89-95.
- Bur99 Burns RA, Wibert GJ, Diersen-Schade DA. Evaluation of single cell sources of docosahexaenoic acid and arachidonic acid: 3-month rat oral safety study with an in utero phase. *Food Chem Toxicol* 1999; 37: 23-36. Is included in the dossier (Abb00).
- Cla05 Clandinin MT, Van Aerde JE, Merkel KL, *et al.* Growth and development of preterm infants fed infant formulas containing docosahexaenoic acid and arachidonic acid. *J Pediatr* 2005; 146: 461-468.
- EC91 Commission Directive 91/321/EEC of 14 May 1991 on infant formulae and follow-on formulae. *Official Journal of the European Communities* 1991; L175: 35-49.
Richtlijn 91/321/EEG van de Commissie van 14 mei 1991 inzake volledige zuigelingenvoeding en opvolgzuigelingenvoeding. *Publicatieblad van de Europese Gemeenschappen* 1991; L175: 35-49.
- EC96 Commission Directive 96/4/EC, Euratom of 16 February 1996 amending Directive 91/321/EEC on infant formulae and follow-on formulae. *Official Journal of the European Communities* 1996; L49: 12-16.
Richtlijn 96/4/EG, Euratom van de Commissie van 16 februari 1996 tot wijziging van Richtlijn 91/321/EEG inzake volledige zuigelingenvoeding en opvolgzuigelingenvoeding. *Publicatieblad van de Europese Gemeenschappen* 1996; L49: 12-16.

- EC97 Regulation (EC) No 258/97 of the European Parliament and of the Council of 27 January 1997 concerning novel foods and novel food ingredients. Official Journal of the European Communities 1997; L43: 1-6.
Verordening (EG) nr. 258/97 van het Europees Parlement en de Raad van 27 januari 1997 betreffende nieuwe voedingsmiddelen en nieuwe voedsel ingrediënten. Publicatieblad van de Europese Gemeenschappen 1997; L43: 1-6.
- EC97a 97/618/EC: Commission Recommendation of 29 July 1997 concerning the scientific aspects and the presentation of information necessary to support applications for the placing on the market of novel foods and novel food ingredients and the preparation of initial assessment reports under Regulation (EC) No 258/97 of the European Parliament of the Council. Official Journal of the European Communities 1997; L253: 1-36.
97/618/EG: Aanbeveling van de Commissie van 29 juli 1997 betreffende de wetenschappelijke aspecten en de presentatie van de informatie die nodig is om aanvragen voor het in de handel brengen van nieuwe voedingsmiddelen en nieuwe voedsel ingrediënten te ondersteunen alsmede het opstellen van de verslagen van de eerste beoordeling uit hoofde van Verordening (EG) nr. 258/97 van het Europees Parlement en de Raad. Publicatieblad van de Europese Gemeenschappen 1997; L253: 1-36.
- EC00 Directive 2000/13/EC of the European Parliament and of the Council of 20 March 2000 on the approximation of the laws of the Member States relating to the labelling, presentation and advertising of foodstuffs. Official Journal of the European Communities 2000; L109: 29-42.
Richtlijn 2000/13/EG van het Europees Parlement en de Raad van 20 maart 2000 betreffende de onderlinge aanpassing van de wetgeving der lidstaten inzake de etikettering en presentatie van levensmiddelen alsmede inzake de daarvoor gemaakte reclame. Publicatieblad van de Europese Gemeenschappen 2000; L109: 29-42.
- EC01 Commission Regulation (EC) No 466/2001 of 8 March 2001 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. Official Journal of the European Communities 2001; L77: 1-3.
Verordening (EG) nr. 466/2001 van de Commissie van 8 maart 2001 tot vaststelling van maximumgehalten aan bepaalde verontreinigingen in levensmiddelen. Publicatieblad van de Europese Gemeenschappen 2001; L77: 1-3.
- EC04 Regulation (EC) No 852/2004 of the European Parliament and of the Council of 29 April 2004 on the hygiene of foodstuffs. Official Journal of the European Communities 2004; L139: 1-54.
Verordening (EG) nr. 852/2004 van het Europees Parlement en de Raad van 29 april 2004 inzake levensmiddelenhygiëne. Publicatieblad van de Europese Gemeenschappen 2004; L139: 1-54.
- ESG91 European Society for Pediatric Gastroenterology and Nutrition (ESGPAN) Committee on Nutrition. Comment on the content and composition of lipids in infant formulas. Acta Paediatrica Scandinavica 1991; 80: 887-896.
- FAO94 FAO/WHO Expert Committee (joint report of the 'Food and Agriculture Organization of the United Nations' and the 'World Health Organisation') Fats and oils in human nutrition. Food Nutr Paper 1994; 57.
- Hem97 Hempenius RA, Van Delft JMH, Prinsen M, *et al.* Preliminary safety assessments of an arachidonic acid-enriched oil derived from *Mortierella alpina*: summary of toxicological data. Food Chem Toxicol 1997; 35: 573-581.
- Hem00 Hempenius RA, Lina BAR, Haggitt RC. Evaluation of a subchronic (13-week) oral toxicity study, preceded by an in utero exposure phase, with arachidonic acid oil derived from *Mortierella alpina* in rats. Food Chem Toxicol 2000; 38: 127-139.
- Hor00 Hornstra G. Essential fatty acids in mothers and their neonates. Am J Clin Nutr 2000; 71(suppl): 1262S-1269S.

- Inn96 Innis SM, Hansen JW. Plasma fatty acids responses, metabolic effects, and safety of microalgal and fungal oils rich in arachidonic and docosahexaenoic acids in healthy adults. *Am J Clin Nutr* 1996; 64: 159-167.
- IOM04 Institute of Medicine of the National Academy. Infant formula: Evaluating the safety of new ingredients. Washington, DC: the National Academy Press, 2004. Website: www.iom.edu/report.asp?id=19034.
- ISS95 International Society for the Study of Fatty Acids and Lipids (ISSFAL). Recommendations for the essential fatty acid requirement for infant formulas. *J Am Coll Nutr* 1995; 14: 213-214. Updated in April 1999, see website www.issfal.org.uk/adequateintakes.htm.
- Kos97 Koskelo E-K, Boswell B, Carl L, *et al.* High levels of dietary arachidonic acid triglyceride exhibit no subchronic toxicity in rats. *Lipids* 1997; 32: 387-405. Is included in the dossier (Abb00).
- Kol01 Koletzko B, Agostoni C, Carlson SE, *et al.* Report of workshop. Long chain polyunsaturated fatty acids (LC-PUFA) and perinatal development. *Acta Paediatr* 2001; 90: 460-464.
- Luc99 Lucas A, Stafford M, Morley R, *et al.* Efficacy and safety of long-chain polyunsaturated fatty acids supplementation of infant-formula milk: a randomized trial. *Lancet* 1999; 354:1948-1954, and page 1919 with comments of R.A. Gibson (Erratum. *Lancet* 2002; 360: 1178).
- Mak05 Makrides M, Gibson RA, Udell T, Ried K. Supplementation of infant formula with long-chain polyunsaturated fatty acids does not influence the growth of term infants. *Am J Clin Nutr* 2005; 81: 1094-101.
- O'Co01 O'Connor DL, Hall R, Adamkin D, *et al.* Growth and development in preterm infants fed long-chain polyunsaturated fatty acids: a prospective, randomized controlled trial. *Pediatrics* 2001; 108: 359-371. Is included in the dossier (Sun04).
- SCF03 Scientific Committee on Food. Report on Food on the Revision of Essential Requirements of Infant Formulae and Follow-on Formulae (adopted on 4 April 2003). Brussels, May 18, 2003.
- Sim01 Simmer K. Longchain polyunsaturated fatty acid supplementation in infants born at term. The Cochrane Database of Systematic Reviews 2001, Issue 4. Art. No.: CD000376. DOI: 10.1002/14651858.CD000376.
- Sim04 Simmer K, Patole S. Longchain polyunsaturated fatty acid supplementation in preterm infants. The Cochrane Database of Systematic Reviews 2004, Issue 1. Art. No.: CD000375.pub2. DOI: 10.1002/14651858.CD000375.pub2.
- Sta95 Staatscourant 8 maart 1995, nr 48. Ontheffing Nieuw Voedingsmiddel verleend aan Nutricia B.V. te Zoetermeer. [Netherlands State Journal, Number 48 of March 8, 1995. Novel food exemption for Nutricia B.V., Zoetermeer, The Netherlands.]
- Sun04 Suntory Ltd. The novel food dossier for fungal oil SUNTGA40S according to Regulation (EC) No 258/97 of the European Parliament and of the council, and the Commission Recommendation 97/618/EC. Contains dossier submitted 1999, and updates submitted 2001 and 2004. Tokyo (Japan): Suntory Limited, August 4, 2004.
- Wib97 Wibert GJ, Burns RA, Diersen-Schade DA, *et al.* Evaluation of single cell sources of docosahexaenoic acid and arachidonic acid: a 4-week oral safety study in rats. *Food Chem Toxicol* 1997; 35: 967-974.

The Committee/ De commissie

- Prof. dr CAFM Bruijnzeel-Koomen
hoogleraar dermatologie/allergologie; UMC Utrecht
professor of dermatology/allergology; University Medical Centre Utrecht
- Ir EJ Kok
toxicoloog; RIKILT Instituut voor Voedselveiligheid, Wageningen
toxicologist; RIKILT, Institute of Food Safety, Wageningen
- Dr CF van Kreijl
moleculair-bioloog; RIVM Bilthoven
molecular biologist; National Institute of Public Health and the Environment, Bilthoven
- Prof. dr P van der Laan
emeritus hoogleraar statistiek; Technische Universiteit Eindhoven
emeritus professor of statistics; Technical University Eindhoven
- Dr FM Nagengast
gastro-enteroloog; UMC St Radboud, Nijmegen
gastro-enterologist; University Medical Centre St Radboud, Nijmegen
- Dr ir JMA van Raaij
voedingsfysioloog; Wageningen Universiteit en Researchcentrum; RIVM Bilthoven
food physiologist; Wageningen University and Research Centre; National Institute of Public Health and the Environment, Bilthoven
- Prof. dr ir G Schaafsma
hoogleraar voeding; Wageningen Universiteit en Researchcentrum
professor of nutrition; Wageningen University and Research Centre
- Dr GJA Speijers
toxicoloog; RIVM Bilthoven
toxicologist; National Institute of Public Health and the Environment, Bilthoven
- Prof. dr WJ Stiekema
hoogleraar bioinformatica; Wageningen Universiteit en Researchcentrum
professor of bioinformatics; Wageningen University and Research Centre
- Ir B van der Heide, adviseur
Ministerie van VWS, Den Haag
Ministry of Health, Welfare and Sport, The Hague
- Prof. dr WM de Vos
hoogleraar microbiologie; Wageningen Universiteit en Researchcentrum
professor of microbiology; Wageningen University and Research Centre
- Dr RA Woutersen
toxicoloog, toxicologisch patholoog; TNO Kwaliteit van Leven, Zeist
toxicologist, toxicologic pathologist; TNO Quality of Life, Zeist
- Dr M Rutgers, beoordelaar voedselveiligheid / scientific assessor food safety
Bureau Nieuwe Voedingsmiddelen, CBG, Den Haag
Novel Foods Unit, Medicines Evaluation Board, The Hague

**Summary dossier
of the applicant Suntory Limited**

(received by The Novel Foods Unit of The Netherlands, d.d. 30-8-2005)

Summary of the Novel Food dossier on Fungal Oil SUNTGA40S

I. Overview

Background and history

This document summarizes the dossier that was submitted by Suntory Limited to the Dutch authorities aiming at registration of the product Fungal Oil SUNTGA40S as a novel food for addition to preterm and term infant formulas. SUNTGA40S is an oil containing approximately 40% arachidonic acid (ARA) and is derived from the fungal species, *Mortierella alpina*.

In 1999, Suntory submitted an application to the Dutch authorities for the Novel Food Fungal Oil SUNTGA40S. A comprehensive overview of the use of ARA in infant formulas was given in a letter dated 9 Aug 2001 to the Health Council of the Netherlands. The Dutch authorities requested additional data in the form of a 13-week toxicology study in rats with a 4-week *in utero* phase and a review of the scientific literature published during the period January 1999-May 2004. Suntory has compiled the necessary data (toxicity study and literature review) and resubmitted the updated dossier in 2004. In addition, the dossier update includes an overview of the modified purification process of ARA oil.

Introduction

Arachidonic acid (ARA) is an omega-6 fatty acid with 20 carbons and four double bonds. ARA is member of the family of the long-chain polyunsaturated fatty acids (LCPUFAs) which are fatty acids with 20 or more carbons and two or more double bonds. There are two families of LCPUFAs, the omega-3 (n-3) and the omega-6 (n-6) families. Another member of the family of LCPUFAs is docosahexaenoic acid (DHA). DHA is an omega-3 fatty acid with 22 carbons and six double bonds.

ARA and DHA are found in breastmilk, red blood cells, plasma, cell membranes of many tissues and organs of all mammals. ARA and DHA are not found in vegetables typically found in human diets or other plants.

ARA and DHA typically represent about 0.5% to 1.0% of the total fatty acids in breastmilk. The amount of DHA in human breastmilk is highly variable depending on the usual type of fat in the maternal diet¹⁻³ or whether DHA supplements are taken during lactation⁴. ARA levels are less variable^{1,5,6}.

In humans, the most rapid period of brain growth begins in the third trimester of pregnancy and continues through the second year after birth^{7,8,9}. The brain, a lipid rich organ, approximately doubles its size during this period with much of the growth attributed to the formation of glial and neuronal cell processes and myelin⁹. Retinal development occurs during the last half of gestation and is paralleled by an increased DHA accumulation.

In studies with preterm infants, Lucas and colleagues^{10,11} were among the first to suggest that early nutrition may affect the development of the central nervous system. In a randomized, controlled clinical study with infants born prematurely, those fed a standard preterm infant formula for an average of 3 weeks in-hospital had lower developmental scores at 18 months and at 7-8 years of age than those fed human breastmilk. Higher scores on tests of cognitive

development are often reported for children who were breastfed as infants compared with those fed formula¹²⁻¹⁵.

The absence of ARA and DHA in infant formulas is only one of many differences in the composition of human breastmilk and infant formulas. Examples of differences between infant formula and human milk composition include growth factors, hormones, immunological components, and fat.

Recommendations to add ARA and DHA to infant formulas, especially those for infants born prematurely, were first published in 1991 by the ESPGAN Committee on Nutrition and shortly thereafter by the World Health Organization (FAO/WHO, 1994). Many formula manufacturers throughout the world have subsequently added ARA and DHA to their marketed formulas, especially formulas for infants who are born prematurely.

Infant formula containing ARA and/or DHA has been commercially available for several years. More than 1 tonne of formula was given to preterm and term infants in 2003.

The novel food submitted for consideration by Suntory Limited, Japan, is SUNTGA40S, an oil containing approximately 40% ARA that is derived from the fungal species, *Mortierella alpina*. Upon completion of evaluation of the submission, and a positive marketing decision, SUNTGA40S will be considered for addition to preterm and term infant formulas.

II. Technical Assessment

Source/Origin

Two references are included in the dossier which demonstrate the use of microorganisms for the production of long chain polyunsaturated fatty acids, and more specifically microorganisms screened for high ARA productivity^{16,17}.

Manufacturing Process

In the original dossier (1999) the following information on the manufacturing process is described (referred to as procedure A). SUNTGA40S is an ARA enriched oil derived from the fermentation of the fungal species *Mortierella alpina*. The initial and second fermentation process of seed culture are conducted for 2-3 days in a flask and a stirred tank, respectively, under aerobic conditions at 28°C. The main culture is then fermented for 8-14 days under aerobic conditions at 26°C, also in a stirred tank. The oil is extracted from the biomass. The biomass can be stored under refrigeration until extraction of the oil. The oil purification process utilizes a hexane extraction. The extract is filtered, and the solvent is removed via evaporation. The extract is degummed and then deacidified using phosphoric acid and sodium hydroxide, respectively. The oil slurry is washed with water, and the water is removed using vacuum evaporation. A novel technique described in the confidential part of the dossier is used to further purify the oil prior to a two steps deodorization process. Mixed tocopherols are added to the oil to help maintain the oxidative quality, and the oil is filled into storage containers.

Diagrams illustrating the fermentation and purification processes are included in the dossier.

The critical control points in the manufacturing process from fermentation through recovery of dry biomass are included in the dossier.

To optimise the extraction and purification of SUNTGA40S, the original production process has been modified at the purification step (referred to as procedure B).

In purification procedure A, the oil slurry is washed with water, and the water is removed using vacuum evaporation. In purification procedure B, the successive degumming, deacidification, washing and water removal processes are replaced by a mixed column treatment. A new technique described in the confidential part of the dossier is used to further purify the oil, prior to a two-step deodorization process. Mixed tocopherols are added to the oil to help maintain the oxidative quality, and the oil is poured into storage containers.

The purification process has been modified in order to highly purify the oil. Impurities are removed from the oil by a mixed column, ensuring an improvement in the quality of the oil. Essentially, the initial fermentation step and the hexane removal step remain the same.

To ensure that the purity of the SUNTGA40S oil produced with the improved procedure B is comparable to that of the oil purified in procedure A, a comprehensive analysis of all the components of the oil treated in procedure A and B, respectively, was performed. The results did not indicate significant differences between the samples, confirming that SUNTGA40S still conforms to the Certificate of Analysis submitted with the original dossier.

The modification of the production process of SUNTGA40S does not constitute a novel process, and does not change the product significantly.

Product Specifications

Certificates of Analyses describing product specifications for three representative lots (Lot Nos. 98041751, 98071451, 98100651) are included. The parameters tested are: appearance, fatty acid composition, peroxide value, acid value, anisidine value, free fatty acids, unsaponifiable matter, color, heavy metals, arsenic, cadmium, mercury, lead, bacteria, and coliforms.

Fatty acid compositions of the three representative lots are included in the dossier.

A Safety Data Sheet for SUNTGA40S is included which describes any potential physical and chemical hazards, environmental effects, first aid measures, fire-fighting measures, and accidental release measures, when applicable. Handling and storage information, ingredient information, engineering measures, personal protective equipment, physical and chemical properties, physical hazard (stability and reactivity), ecological information, disposal considerations, and transport information are also included in the Safety Data Sheet.

A sample label of SUNTGA40S is included in the dossier.

Analytical Reports

A series of oil analyses reports, including an analysis of SUNTGA40S, are included from Dr. R.G. Ackman, Canadian Institute of Fisheries Technology, DalTech, Dalhousie University, Halifax, NS. Reports by Dr. Ackman of analysis of Soybean Oil and Human Milk are included for comparative purposes. SUNTGA40S was analyzed for the presence of environmental

organochlorine materials and phthalate esters. The results are compared to those found in human milk, soybean oil, egg phospholipid oil, and marine oil. The same oils were analyzed for polymeric compounds. Reports of these analyses are included. An additional report is included by Dr. Ackman on acceptable ranges of impurities in oils for infant consumption.

Fatty acid methyl esters (FAME) were prepared from aliquots of the oil sample of SUNTGA40S. Gas liquid chromatography of the methyl esters was performed. A table of the fatty acids identified is listed in the report. Additional fatty acid identification was performed from the alkali-esterification product. These results are also listed in the report. The FAME were a mixture dominated by ARA, accompanied by other n-6 fatty acids. The oil had only one unexpected and unknown fatty acid, possibly a small trienoic fatty acid of partially n-6 structure.

The oil sample of SUNTGA40S was analyzed in duplicate for the Wijs iodine value, peroxide value, free fatty acid content and p-anisidine value. Results show a Wijs iodine value (IV) of 176, which is in agreement with that calculated from the fatty acid composition (173). The peroxide value is extremely low. Fish oils of similar IV may contain iron, copper etc., or other catalysts that cause the oil to "revert" to a higher oxidation status even after refining. A microbial oil may not contain such pro-oxidants. The p-anisidine value is remarkably low for an oil with so much highly unsaturated fatty acid. The report states that this suggests careful production and early refining. Additional evidence of thorough refining is offered by the very low FFA value that was found.

The amount of tocopherol present in SUNTGA40S was calculated by comparison to known amounts of reference standard materials injected into the same HPLC system. The tocopherol peaks observed in the analysis matched co-injected authentic tocopherols exactly.

Identification of sterols was performed on SUNTGA40S and was facilitated by comparison with standard reference materials and comparison of the molecular ion produced by the ITDS with the molecular weights of standard reference materials. Quantitation of the identified sterols and unknowns was made relative to the internal standard. The principal sterols identified matched the spectrum for desmosterol (molecular weight 385). The next clearest peak appeared to be ergosterol (molecular weight 397).

Duplicate aliquots of SUNTGA40S were saponified according to A.O.C.S. Official Method Ca 6b-53 and the unsaponifiable matter was recovered. The components present were identified by co-development with standard reference material as follows: hydrocarbon, alpha tocopherol, gamma tocopherol, delta tocopherol, octadecanol and various sterols. The results are presented in the report.

SUNTGA40S did not show any positive finding of organochlorine material nor with any obvious contamination with common phthalate esters.

III. Toxicological Assessment

Toxicology Studies

Toxicity studies that have been conducted on behalf of Suntory on SUNTGA40S include a mutagenicity assay (Ames), a chromosome aberration study, an acute oral toxicity study in mice, a 90-day toxicity study in rats and a 13-week toxicity study in rats with a 4-week *in utero* phase. A final report for each of the studies is included in the dossier.

SUNTGA40S was determined to be non-mutagenic by both the Ames and chromosome aberration assays. The product was not acutely toxic to mice at doses up to 2 g/kg body weight.

In the 90-day toxicity study, rats were fed SUNTGA40S at levels of approximately 312, 625, or 1250 mg/kg/day (average intake for males and females combined). All diets were adjusted to 2% fat, including a fat-equivalent control group and a comparative control group that received 1% fish oil and 1% SUNTGA40S, which was equivalent to 625 mg/kg/day SUNTGA40S. These dosages provided rats with a daily intake of SUNTGA40S that might be expected to be consumed by a preterm infant at hospital discharge, assuming an 800 ml maximum daily intake by a 1.8 kg infant. There were no toxicologically significant effects on body weight, food consumption, clinical signs, ophthalmology, or gross and microscopic pathology. ARA-rich fungal oils, as a class, do not have a history of overt toxicity. Available information on SUNTGA40S suggests there does not appear to be any serious toxicity concerns.

The 13-week toxicology study in rats with a 4-week *in utero* phase was performed to assess the possible toxicity of SUNTGA40S on rat offspring during gestation and lactation and growth until adulthood. Thereby, the preterm infant period as well as the term period of feeding is covered. The first phase of the study comprised an *in utero* exposure phase in which parental (F0) animals were exposed from 4 weeks prior to mating, throughout mating, gestation and lactation until weaning of the offspring (F1-rats). In the second phase, a sub-chronic study was conducted during which the F1-rats were exposed for 13 weeks. The rats were administered SUNTGA40S at dietary levels of 0.5%, 1.5% and 5%, adjusted with corn oil to 5.76% added fat, and at a level of 3.65% in combination with 2.11% High DHA tuna oil, containing the n-3 PUFA DHA, to provide a ratio of ARA to DHA of 2.7:1. The first control group was not administered extra oil, while the second control group was given 5.76% corn oil in the standard rodent diet.

No effects were seen on the F0-animals or the F1-pups during lactation. After weaning, no adverse effects were observed on clinical signs, neurotoxicity, ophthalmology, bodyweight, urinary parameters, and macroscopic and microscopic pathology. The dietary administration of levels up to 5% SUNTGA40S for 13 weeks following *in utero* exposure resulted only in changes that have been observed before with other PUFA sources. The effects on certain blood parameters, spleen weight, plasma triglycerides, plasma phospholipids and cholesterol are considered to be physiological responses to the intake of high levels of PUFA. It was furthermore concluded that the administration of High DHA tuna oil simultaneous with SUNTGA40S did not significantly modify the results.

Potential Allergenicity

The question of potential allergenicity from *Mortierella alpina* has previously been addressed. Current oil extraction and refinement processes eliminate protein contamination of food grade oils. Term and preterm infant formulas containing ARA rich oil produced by *Mortierella alpina* are currently in the marketplace. Thus there will be no new exposure to oil components not already in marketed infant formulas.

IV. Safety Assessment

Clinical Study

An intent-to-treat, prospective, randomized, double-blinded, multicenter, international feeding study was conducted in premature infants. The primary objective of the first phase of the study was to confirm that the addition of the LCPUFAs ARA and DHA in premature formula would support normal growth.

Infants were randomized within 72 hours of first enteral feeding to one of three formula groups. Infants were initially fed human milk and/or one of three study formulas for premature infants. Premature formulas included control (no added ARA or DHA) or one of two triglyceride oils containing ARA and DHA, from the time of randomization until term corrected age (CA). Two distinct oil blends were used to deliver the LCPUFAs, ARA and DHA, added at 0.40 and 0.25 g/100g total fatty acids (wt%), respectively, to the in-hospital milkbased premature formula. In one of the supplemented formulas, fungal oil and a low-eicosapentaenoic acid (EPA) fish oil (fish/fungal) were added to provide ARA and DHA. In the other LCPUFA formula, egg-derived triglyceride (egg-DTG) provided both ARA and DHA and a low-EPA fish oil provided additional DHA. Four hundred and seventy infants were randomized.

Results showed that there were no consistent differences among infants in the three study formula groups with respect to growth (weight, length and head circumference) from study day one until hospital discharge and from study day one until term CA, regardless of whether or not the analyses were controlled for human milk intake. Small, but statistically significant differences in length gain from study day one to hospital discharge were found between infants in the control and egg-DTG/Fish study formula groups. No statistically significant differences were found with regard to feeding tolerance, in-hospital clinical problems/morbidity, or postdischarge morbidity to term CA across study feeding groups.

It was concluded that preterm infants fed a modified version of the premature formula with a source of ARA and DHA in-hospital and until term CA did not substantially differ in their growth rate, feeding tolerance, or morbidity (in-hospital or post discharge) compared to infants fed the premature formula without a source of ARA and DHA.

Potential Intake and Extent of Use

It is proposed that ARA (from SUNTGA40S) and DHA would be added to preterm formulas at a level that is similar to that occurring in human breast milk. Preterm infants consuming 120 kcal/kg/day would receive 30 mg/kg/day ARA (which equates to 75 mg/kg/day SUNTGA40S) and 16 mg/kg/day DHA. These levels are consistent with the calculated median ARA and DHA intake of exclusively human milk fed European infants. The infants would receive the feedings in-hospital until their anticipated discharge weight of approximately 1800 gm is reached, and then post discharge for up to 12 months of age.

V. Supportive Information

A copy of 54 references regarding polyunsaturated fatty acids, published between 1987 and 1995 by Kyoto University and Suntory Ltd., are included in the dossier. Furthermore, a review of the available scientific literature published during the period January 1999 - May 2004 pertaining to the use of ARA and/or LCPUFAs in infant formulae was performed to assess the current knowledge of safety, toxicological effects and physiological effects on pre-term and term infants.

The search was performed in the comprehensive database Current Contents (a part of Webspirs) in the period January 1999-May 2004, with relevant combinations of the terms ARACHIDONIC ACID OIL, AA OIL, ARACHIDONIC ACID, TOXICOLOGY, SAFETY, INFANT*, LONG-CHAIN POLYUNSATURATED FATTY ACID, PUFA, LCP. In addition, the documents available on the web sites of the Food and Agricultural Organisation of the United Nations/World Health Organisation (FAO/WHO), the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) and the European Food Agency were scanned for additional information by using the search term 'ARACHIDONIC ACID'. The relevant literature was retrieved for inclusion in the dossier update. The literature has been evaluated, in brief, below.

Animal studies

In one developmental toxicology study¹⁸ and two 3-months toxicology studies^{19,20} with an *in utero* phase, ARA oil and/or DHA oil was fed to rats at levels up to 2500 mg/kg bw/d. Effects in F1-animals on organ weight, certain blood parameters, cholesterol, triglycerides and phospholipids concentration were noted in the three-month studies at levels of 970 mg ARA oil/kg bw/d and 1100 mg ARA oil + DHA oil/kg bw/d. However, no corresponding macroscopic or microscopic effect was observed, and similar effects have been observed previously in animals receiving a high-fat diet. The effects are most likely physiological or metabolic responses to the test substance, and are not considered to be signs of specific toxicity. No test substance-related effects were seen in newborn piglets fed infant formula with ARA oil and/or DHA oil from day 3-19²¹, while a study by Sarkadi-Nagy *et al.*²² indicated that a ARA and DHA supplement in the diet of newborn piglets (day 1-2) did not cause excess lipid peroxidation in the plasma and liver tissue. Several studies on newborn baboons indicate that enriched formulas may have a positive effect on retinal function^{23,24} and increase the levels of ARA and DHA in the lung²⁵, while it is unclear whether tissue levels of ARA are linked to the dietary intake.

Clinical studies on infants

A number of clinical studies with preterm or term infants have been performed to assess the safety and efficacy of infant formula enriched with a combination of long-chain polyunsaturated fatty acids (LCPUFA), or ARA oil and DHA oil. The studies have focused on comparing one or more of the parameters growth, neurological development, plasma fatty acid composition, tolerance of the diet and infection rates between breast-fed infants, infants fed with an enriched formula and infants fed with a control formula from birth to 3-18 months of age²⁶⁻³⁶. The great majority of the studies indicate that an enriched formula is safe to use. No clear pattern of positive effects has emerged from the results. Some studies indicate that an enriched formula may induce a more rapid neurological maturation^{28,29,30,33,35}, i.e. that visual acuity improved from 4 to 6 months corrected age for preterm infant by adding ARA oil isolated from *Mortierella alpina* and fish DHA³³ and that supplementation of healthy term infant with ARA and DHA during the first 3 months of life reduces the occurrence of mildly abnormal general movement²⁸, while in other trials no such effect was observed^{26,30}. Several studies have also demonstrated that the source of the LCPUFAs does not influence the effect of an enriched formula, i.e. that

LCPUFAs in the form of triglycerides isolated from *Mortierella alpina* are equivalent to LCPUFAs in the form of phospholipids isolated from egg yolk^{26,32,34}.

Finally, a comprehensive review of clinical studies and meta-analyses of the available studies found the enrichment of infant formulae with LCPUFAs, primarily in the form of ARA and DHA, to be safe for preterm and term infants³⁷. Adverse effects on one or more growth parameters were noted in 8 studies, of which 2 described preterm infants fed with ARA and DHA. In one study³⁶, the rate of length gain between term and 12 months was lower in preterm infants fed a formula supplemented with 0.35% DHA and 0.65% ARA than in the control group. In the other, the rate of length gain between study entry and 4 months was lower in infants fed a formula supplemented with a mixture of egg triglyceride and fish oil providing 0.41% ARA and 0.25% and 0.15% DHA until and after discharge, respectively³³. However, the growth of a concurrent study group receiving a formula supplemented with the same amounts of ARA and DHA from a mixture of fish and fungal oils did not differ from the control group. Lapillone concluded that the observed effects on growth did not appear to be biologically significant. The conclusion of several recent reviews^{38,39} are in line with Lapillone, both consider the enrichment of infant formulae with ARA and DHA to be safe, although Koo³⁹ recommends that infant foods other than formulae are not fortified to avoid excessive consumption. The relative benefit of supplementation for neurological development remains unclear. Based on the available data, a group of independent scientists recommended that infant formulae for term infants should contain at least 0.2% of total fatty acids as DHA and 0.35% as ARA, while preterm infant formulae should include the slightly higher levels of 0.35% DHA and 0.4% ARA⁴⁰.

Infant formula containing ARA and/or DHA has been commercially available for several years. More than 1 tonne of formula was given to preterm and term infants in 2003 with no unexpected effects.

VI. Conclusion

The information included in this dossier indicates that SUNTGA40S is safe for use in preterm and term infant formula. The toxicity studies indicate that there is no concern for toxicity. The result of the literature review likewise indicates that preterm and term infants tolerate arachidonic acid oil in the formula, although a positive effect on growth and development was not clearly demonstrated. Infant formulae containing arachidonic acid oil and docosahexaenoic acid oil have furthermore been produced on a commercial scale and have been available worldwide for several years.

VII. References

1. Jenson RG. The lipids in human milk. *Prog Lipid Res* 1996;35: 53-92.
2. Ruan C, Liu X, Man H, Ma X, Lu G, Duan G, DeFrancesco CA, and Connor WE. Milk composition in women from five different regions of China: the great diversity of milk fatty acids. *J Nutr* 1995;125:2993-2998.
3. Connor WE, Lowensohn R, and Hatcher L. Increased docosahexaenoic acid levels in human newborn infants by administration of sardines and fish oil during pregnancy. *Lipids* 1996;31:S183-S187.
4. Makrides M, Neumann MA, and Gibson RA. Effect of maternal docosahexaenoic acid (DHA) supplementation on breast milk composition. *Eur J Clin Nutr* 1996;50:352-357.
5. Innis SM. Human milk and formula fatty acids. *J Pediatr* 1992;120:S56-S61.
6. Koletzko B, Thiel I, and Abiodun PO. The fatty acid composition of human milk in Europe and Africa. *J Pediatr* 1992;120:S62-S70.
7. Dobbing J. Vulnerable periods of brain development. In: *Lipids, Malnutrition and the Developing Brain* Elliot K. and Knights J. (eds), Ciba Foundation Symposium, Elsevier North Holland, Amsterdam, 1972, pp 1-7.
8. Dobbing J and Sands J. Comparative aspects of the brain growthspurt. *Early Human Dev* 1979;3:79-83.
9. Hershkowitz N. Brain development in the fetus, neonate and infant. *Biol. Neonate* 1988;54:1-19.
10. Lucas A, Morley R, Cole TJ, Gore SM, Lucas PJ, Crowle P, Pearse R, Boon AJ, and Powell R. Early diet in preterm babies and development status at 18 months. *Lancet* 1990;335:1477-1481.
11. Lucas A, Morley R, Cole TJ, Lister G, and Leeson-Payne C. Breast milk and subsequent intelligence quotient in children born preterm. *Lancet* 1992;339:261-264.
12. Fergusson DM, Beautrais AL, and Silva PA. Breast-feeding and cognitive development in the first seven years of life. *Soc Sci Med* 1982;16:1705-1708.
13. Morrow-Tlucak M, Haude RH, Ernhart CB. Breastfeeding and cognitive development in the first 2 years of life. *Soc Sci Med* 1988;26:635-639.
14. Johnson DL, Swank PR, Howie VM, Baldwin CD, and Owen M. Breast feeding and children's intelligence. *Psychol Rep* 1996;79:1179-1185.
15. Horwood LJ and Fergusson DM. Breastfeeding and later cognitive and academic outcomes. *Pediatrics* 1998;101:e9.
16. Shimizu S, and Yamada H. Production of dietary and pharmacologically important polyunsaturated fatty acids by microbiological processes. *Comments Agric. Food Chem* 1990;2:211-235.
17. Yamada H, Shimizu S, and Shinmen Y. Production of arachidonic acid by *Mortierella elongata* 1S-5. *Agric. Biol. Chem* 1987;51:785-790.
18. Arterburn L.M., Boswell K.D., Henwood S.M., Kyle D.J. A development safety study in rats using DHA- and ARA-rich single-cell oils. *Food and Chemical Toxicology*, 2000; 38:763-771
19. Burns R.A., Wibert G.J., Diersen-Schade, Kelly C.M. Evaluation of Single-cell Sources of Docosahexaenoic Acid and Arachidonic Acid: 3-Month Rat Oral Safety Study with An In Utero Phase. *Food and Chemical Toxicology*, 1999; 37:23-36
20. Hempenius R.A., Lina B.A.R., Haggitt R.C. Evaluation of Subchronic (13-Week) Oral Toxicity Study, Preceded by an In Utero Exposure Phase, with Arachidonic Acid Oil Derived from *Mortierella alpine* in Rats. *Food and Chemical Toxicology*, 2000; 38: 127-139
21. Merritt R.J., Auestad N., Kruger C., Buchanan S. Safety evaluation of sources of docosahexaenoic acid and arachidonic acid for use in infant formulas in newborn piglets. *Food and Chemical Toxicology*, 2003; 41:897-904
22. Sarkadi-Nagy E., Huang M.C., Diao G.Y., Kirwan R., Chao A.C., Tschanz C., Brenna J.T. Long chain polyunsaturated supplementation does not induce excess lipid peroxidation of piglet tissues. *European Journal of Nutrition*, 2003; 42:293-296
23. Diao G.Y., Loew E.R., Wijendran V., Sarkadi-Nagy E., Nathanielsz P.W., Brenna J.T. Docosahexaenoic and Arachidonic Acid Influence on Preterm Baboon Retinal Composition and Function. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 2003; 44:4559-4566
24. Sarkadi-Nagy E., Wijendran V., Diao G.Y., Chao A.C., Hsieh, A.T., Turpeinen A., Nathanielsz P.W., and Brenna J.T. The Influence of Prematurity and Long Chain Polyunsaturate Supplementation in 4-Week Adjusted Age Baboon Neonate Brain and Related Tissues. *Pediatric Research*, 2003; 54:244-252

25. Chao A.C., Ziadeh B.I., Diau G.Y., Wijendran V., Sarkadi-Nagy E., Hsieh A.T., Nathanielsz P.W., Brenna J.T. Influence of Dietary Long-Chain PUFA on Premature Baboon Lung FA and Dipalmitoyl PC Composition. *Lipids*, 2003; 38:425-429
26. Auestad N., Halter R., Hall R.T., Blatter M., Bogle M.L., Burks W., Erickson J.R., Fitzgerald K.M., Dobson V., Innes S.M., Singer L.T., Montalto M.B., Jacobs J.R., Qiu W., Bornstein M.H., Growth and Development in Term Infants Fed Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acids: A Double-Masked, Randomized, Parallel, Prospective, Multivariate Study. *Pediatrics*, 2001; 108:372-381
27. Bondía-Martínez E., López-Sabater M.C., Castellote-Bargallo A.I, Rodríguez- Palmero M., González-Corbella M.J., Rivero-Urgell M., Campoy-Folgozo C., Bayés-García R. Fatty acid composition of plasma and erythrocytes in term infants fed human milk and formulae with and without docosahexaenoic and arachidonic acids from egg yolk lecithin. *Early Human Development*, 1998; 53:S109-S119
28. Bouwstra H., Dijk-Brouwer, D.A.J., Wildeman, J.A.L., Tjoonk, H.M., Heide J.C. van der, Boersma E.R., Muskiet F.A.J., Hadders-Algra M. Long-chain polyunsaturated fatty acids have a positive effect on the quality of general movements of healthy term infants. *American Journal of Clinical Nutrition*, 2003; 78:313-318
29. Fewtrell M.S., Morley R., Abbott R.A., Singhal A., Isaacs E.B., Stephenson T., MacFadyen U., Lucas A. Double-Blind, Randomized Trial of Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acid Supplementation in Formula Fed to Preterm Infants. *Pediatrics*, 2002; 110:73-82
30. Lucas A., Stafford M., Morley R., Abbott R., Stephenson T., MacFadyen U, Elias-Jones A., Clements H. Efficacy and safety of long-chain polyunsaturated fatty acid supplementation of infant-formula milk: a randomized trial. *Lancet*, 1999; 354:1948-1954
31. Martinez F.E., Santos M.M. dos, Sieber V.M., Camelo Jr. J.S., Ferlin M.L., Gonçalves A.K., Pinhata M.M.M., Jorge S.M. Growth and nitrogen balance in preterm infants fed formula with long chain polyunsaturated fatty acids. *Nutrition Research*, 1999; 19: 1497-1505
32. Morris G., Moorcraft J., Mountjoy A., Wells J.C.K. A novel infant formula milk with added long-chain polyunsaturated fatty acids from single-cell sources: a study of growth, satisfaction and health. *European Journal of Clinical Nutrition*, 2000; 54:883-886
33. O'Connor D.L., Hall R., Adamkin D., Auestad N., Castillo M., Connor W.E., Connor S.L., Fitzgerald K., Groh-Wargo S., Hartmann E.E., Jacobs MA J., Janowsky J., Lucas A., Margeson D., Mena P., Neuringer M., Nesin M., Singer L., Stephenson T., Szabo J., Zemon V. Growth and Development in Preterm Infants Fed Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acids: A Prospective, Randomized Controlled Trial. *Pediatrics*, 2001;108:359-371
34. Sala-Vila A., Castellote A.I., Campoy C., Rivero M., Rodriguez-Palmero M., López-Sabater M.C. The Source of Long-Chain PUFA in Formula Supplements Does Not Affect the Fatty Acid Composition of Plasma Lipids in Full-Term Infants. *Journal of Nutrition*, 2004; 134:868-873
35. Ünay B., Sarici S.Ü., Ula, Ü.H., Akin R., Alpay F., Gökçay E. Nutritional effects on auditory brainstem maturation in healthy term infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*, 2004; 89:F177-F179
36. Vanderhoof J., Gross S., Hegyi T. A Multicenter Long-Term Safety and Efficacy Trial of Preterm Formula Supplemented with Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acids. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 2003; 31:121-127
37. Lapillone A., Clarke S.D., Heird W.C. Plausible mechanisms for effects of longchain polyunsaturated fatty acids on growth. *Journal of Pediatrics*, 2003; 143:59-516
38. Gil A., Ramirez M., Gil M. Role of long-chain polyunsaturated fatty acids in infant nutrition. *European Journal of Clinical Nutrition*, 2003; 57:S31-S34
39. Koo W.W.K. Efficacy and Safety of Docosahexaenoic Acid and Arachidonic Acid Addition to Infant Formulas: Can One Buy Better Vision and Intelligence? *Journal of the American College of Nutrition*, 2003; 22:101-107
40. Koletzko B., Agostini C., Carlson S.E., Clandinin T., Hornstra G., Neuringer M., Uauy R., Yamashiro Y., Willatts, P. Long chain polyunsaturated fatty acids (LCPUFA) and perinatal development. *Acta Paediatr*, 2001; 90:460-464