

Arachidonzuurrijke olie (2)

Arachidonic acid-rich oil (2)

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

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. 2011-01 BNV, Den Haag, 7 April 2011
No 2011-01 BNV, The Hague, 7 April 2011

Inhoudsopgave

Samenvatting en conclusies	4
1 Inleiding	6
2 Volledigheid en juistheid van het dossier	7
2.1 Administratieve gegevens	7
2.2 Algemene beschrijving van het voedselingrediënt	7
2.3 Classificatie van het voedselingrediënt voor beoordeling	7
2.4 Informatievergaring over het voedselingrediënt	7
2.5 Beknopt overzicht door de aanvrager	8
2.6 Overige beoordelingen	8
2.7 Etiketteringsvoorstel van de aanvrager	8
3 Interpretatie en evaluatie van de voorgelegde gegevens	9
3.1 I Specificatie van het nieuwe voedselingrediënt	9
3.2 II Effecten van het gevolgde productieprocédé op het voedselingrediënt	10
3.3 III Achtergrondinformatie over het als bron voor het voedselingrediënt gebruikte organisme	12
3.4 IX Verwachte opname en gebruiksfrequentie van het voedselingrediënt	13
3.5 X Informatie op basis van eerdere blootstelling van de mens aan het voedselingrediënt of zijn bron	13
3.6 XI Informatie over de voedingswaarde van het voedselingrediënt	13
3.7 XII Microbiologische informatie over het voedselingrediënt	14
3.8 XIII Toxicologische informatie over het voedselingrediënt	14

BIJLAGEN

Literatuur	32
De commissie	34
Samenvatting van het dossier	36

Contents (English translation)

Executive summary	18
1 Introduction	20
2 Completeness and accuracy of the dossier	21
2.1 Administrative details	21
2.2 General description of the food ingredient	21
2.3 Classification of the food ingredient for assessment	21
2.4 Collection of information regarding the food ingredient	21
2.5 Brief summary provided by the applicant	22
2.6 Other assessments	22
2.7 The applicant's labelling proposal	22
3 Interpretation and evaluation of the data submitted	23
3.1 I Specification of the novel food ingredient	23
3.2 II Effects of the production process applied to the food ingredient	24
3.3 III History of the organism used as the source of the food ingredient	26
3.4 IX Anticipated intake and extent of use of the food ingredient	26
3.5 X Information from previous human exposure to the food ingredient or its source	27
3.6 XI Nutritional information on the food ingredient	27
3.7 XII Microbiological information on the food ingredient	28
3.8 XIII Toxicological information on the food ingredient	28
 APPENDICES	
Literature	32
The Committee	34
Summary of the dossier	36

Samenvatting en conclusies

De aanvrager, de firma Cargill, heeft een veiligheidsdossier ingediend voor geraffineerde arachidonzuurrijke olie afkomstig van de schimmel *Mortierella alpina*. De olie zal als ingrediënt in zuigelingenvoeding worden gebruikt. Het dossier is voorgelegd aan de commissie Veiligheidsbeoordeling Nieuwe Voedingsmiddelen ('de commissie'). Gezien de langdurige blootstelling en de kwetsbaarheid van de doelgroep heeft de commissie de grootst mogelijke zorgvuldigheid betracht. De aanvrager heeft daarom aanvullende gegevens over verscheidene onderwerpen moeten overleggen.

De aanvrager toont aan dat het productieorganisme *Mortierella alpina* niet schadelijk is. De productie vindt plaats in bioreactoren met deze schimmels. Hierin ontstaat door een gistingsproces onder aerobe condities een arachidonzuurrijke biomassa, die vervolgens wordt geëxtraheerd. Daarna wordt de verkregen ruwe arachidonzuurrijke olie grondig gezuiverd. Het arachidonzuurgehalte is minimaal 40 % van de totale hoeveelheid vetzuren. De aanvrager heeft de samenstelling en kwaliteitskenmerken van de nieuwe olie duidelijk gespecificeerd en voert de benodigde controles uit om afwezigheid van schadelijke chemische en micro-biologische verontreinigingen te garanderen. Volgens de commissie zijn de veiligheid van het productieproces en de kwaliteit van de arachidonzuurrijke olie gewaarborgd.

De nieuwe olie kan als bron van arachidonzuur worden gebruikt in de voeding van te vroeg geboren baby's en voldragen zuigelingen. Sinds 1996 is dit vetzuur toegestaan in zuigelingenvoeding waarvoor gebruiksvoorschriften zijn vastgelegd in nationale en Europese regelgeving. De aanvrager stelt voor ten hoogste 0,4 % van het totaal aan vetzuren als arachidonzuur toe te voegen aan zuigelingenvoeding. Gebaseerd op dit gebruik wordt de dagelijkse arachidonzuurinnname geschat op 27 en 22 mg per kg lichaamsgewicht voor respectievelijk te vroeg geboren en voldragen baby's. Dit komt overeen met respectievelijk maximaal 68 en 55 mg olie per kg lichaamsgewicht per dag.

Volgens de aanvrager is de nieuwe olie in chemisch opzicht vergelijkbaar met de soortgelijke arachidonzuurrijke olie die in december 2008 is toegelaten op de Europese markt. Dat de nieuwe olie ook net zo veilig is als het goedgekeurde product heeft de aanvrager onderbouwd met toxicologische onderzoeken. De hierbij gebruikte teststof is volgens de commissie representatief voor het op de markt te brengen product. De aanvrager heeft drie verschillende typen genotoxiciteitstesten uitgevoerd waaruit blijkt dat de arachidonzuurrijke olie niet genotoxisch is. Daarnaast beschrijft de aanvrager de resultaten van een speciaal subchronisch onderzoek bij jonge ratten. Behalve dat deze ratten zelf de arachidonzuurrijke olie met het voer kregen toegediend gedurende 90 dagen, waren zij al voor hun geboorte (tijdens de dracht) en tijdens het zogen blootgesteld doordat ook het moederdier voer met de teststof kreeg. De commissie is het eens met de aanvrager dat er geen nadelige effecten bij de dieren zijn waargenomen. De NOAEL-waarde is daarom gelijk aan de hoogst geteste dosis, te weten 3200 mg olie per kg lichaamsgewicht per dag. De bij zuigelingen beoogde inname (68 mg olie/kg/dag) is ruim een factor 45 lager dan de olie-inname die bij proefdieren geen nadelige gezondheidseffecten te weeg brengt. De

commissie acht het niet aannemelijk dat het voorgestelde consumptieniveau door baby's zal worden overschreden.

Ter ondersteuning van een veilig gebruik van de arachidonzuurrijke olie verwijst de aanvrager naar resultaten van onderzoeken bij pasgeboren kinderen met soortgelijke producten van andere firma's.

De commissie concludeert dat Cargill's fungusolie als bron van arachidonzuur veilig kan worden toegepast als ingrediënt voor zuigelingenvoeding.

1 Inleiding

Het Bureau Nieuwe Voedingsmiddelen (BNV) van het Agentschap voor het College ter Beoordeling van Geneesmiddelen adviseert de minister van VWS over de veiligheid van nieuwe voedingsmiddelen. Deze advisering is onderdeel van de Europese toelatingsprocedure voor nieuwe voedingsmiddelen die is vastgelegd in Verordening 258/97 (EC97). Dit rapport is het verslag van een zogenoemde eerste beoordeling volgens deze procedure, inzake de veiligheid voor de consument van het nieuwe voedsel ingrediënt 'geraffineerde arachidonzuurrijke olie'. Deze olie is afkomstig van de schimmel *Mortierella alpina* en zal worden toegepast in zuigelingenvoeding.

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 zeer beperkt gebruikt in de EU. Dit is toegelicht in een eerder verschenen rapport van BNV over een zelfde type olie (BNV05). De aanvrager beoogt een toepassing in zuigelingenvoeding en vraagt daarom toestemming om de nieuwe arachidonzuurrijke olie op de markt te mogen brengen conform de hierboven genoemde wetgeving. BNV heeft het rapport van de veiligheidsbeoordeling opgesteld. Dit rapport is getoetst door de commissie Veiligheidsbeoordeling Nieuwe Voedingsmiddelen, hierna te noemen 'de commissie'. De samenstelling van deze commissie is als bijlage opgenomen in dit rapport.

De beoordelingsprocedure is als volgt verlopen. Op 2 november 2009 heeft de aanvrager het dossier, waarin de veiligheid van het nieuwe product wordt geëvalueerd, ingediend (Car09). Dit is door BNV formeel in behandeling genomen nadat op 15 december 2009 de ontbrekende onderdelen waren verstrekt. De aanvrager heeft 9 februari 2010 een aanvulling gestuurd met wijzigingen van enkele details (Car10). Het dossier werd meerdere keren door de commissie besproken in haar plenaire vergaderingen sinds 1 december 2009, en in meer detail door een werkgroep uit de commissie op 7 juli 2010. In deze periode heeft de aanvrager een aantal malen extra informatie verstrekt op verzoek van de commissie (Car10a-c, Car11). Haar belangrijkste vragen hadden betrekking op de teststof die in het proefdieronderzoek is gebruikt, de productspecificatie en de kwaliteitsborging. Tenslotte heeft de commissie in de plenaire vergadering van 8 maart 2011 de beoordeling afgerond. Dit rapport is een weergave van de bevindingen van de commissie.

2 Volledigheid en juistheid van het dossier

2.1 Administratieve gegevens

De firma Cargill Alking Bioengineering Co Ltd (Hubei, China) is de producent van het nieuwe ingrediënt. De aanvrager is Cargill Incorporated (15407 McGinty Road West, Wayzata, Minnesota 55391, USA). De aanvraag is ingediend door een Europese vestiging van Cargill (Havenstraat 84, B-1800 Vilvoorde, België).

2.2 Algemene beschrijving van het voedselingrediënt

De arachidonzuurrijke olie wordt geïsoleerd uit schimmelculturen van *Mortierella alpina*, hierna ook aangeduid met 'de fungusolie'. De olie bestaat voor bijna de helft uit het meervoudig onverzadigde vetzuur arachidonzuur. Het product komt niet direct beschikbaar voor de consument, maar zal worden verwerkt in zuigelingenvoeding voor zowel te vroeg geboren als voldragen baby's. In het geval kinderen uitsluitend flesvoeding krijgen wordt door arachidonzuur toe te voegen hun voedingstoestand optimaal ondersteund volgens de aanvrager.

2.3 Classificatie van het voedselingrediënt voor beoordeling

De aanvrager spreekt zich niet uit over de classificatie van het nieuwe product. De commissie stelt vast dat het nieuwe ingrediënt valt onder categorie d 'voedingsmiddelen en voedselingrediënten bestaande of geïsoleerd uit micro-organismen, schimmels of algen' volgens artikel 1(2) van de verordening nieuwe voedingsmiddelen (EC97). In deel I van Aanbeveling 97/618 van de Europese Commissie (EC97a) worden zes klassen nieuwe voedingsmiddelen onderscheiden om de beoordeling van de veiligheid en de voedingsaspecten te vergemakkelijken. De commissie beschouwt het nieuwe product als een complex voedselingrediënt afkomstig van een niet-genetisch gemodificeerd 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 hoofdstuk 2.1 van referentie BNV05).

2.4 Informatievergaring over het voedselingrediënt

De aanvrager heeft de informatie die essentieel is voor de beoordeling van de geschiktheid voor de consumptie van het voedselingrediënt gestructureerd volgens 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 productieprocedé 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

De aanvrager bespreekt op overzichtelijke wijze elk van deze thema's, en verwijst voor de gebruikte gegevens naar bijlagen of wetenschappelijke artikelen. Bij elk thema vergelijkt de aanvrager de gegevens van de nieuwe olie met die van de reeds toegelaten olie van de firma Suntory (EFSA08, EC08). Het dossier inclusief aanvullende gegevens bevat voldoende informatie om de veiligheid van het nieuwe ingrediënt te kunnen beoordelen. Daarnaast heeft de commissie gebruik gemaakt van de informatie over een soortgelijke olie die zij eerder beoordeelde (BNV05).

2.5 Beknopt overzicht door de aanvrager

Het dossier bevat een samenvatting die aan de EU lidstaten is toegestuurd conform artikel 6 (2) van de Europese Verordening 258/97 (EC97). Deze samenvatting is als bijlage opgenomen in dit rapport.

2.6 Overige beoordelingen

Er zijn de commissie geen andere beoordelingen van dit product bekend

2.7 Etiketteringsvoorstel van de aanvrager

Etikettering dient in overeenstemming te zijn met Richtlijn 2000/13/EG betreffende de onderlinge aanpassing van de wetgeving der lidstaten inzake de etikettering en presentatie van levensmiddelen alsmede inzake de daarvoor gemaakte reclame, en met artikel 8 van Verordening 258/97 (EC97).

Het dossier bevat geen etiketteringsvoorstel. De commissie gaat ervan uit dat het nieuwe voedselingrediënt wordt aangeduid als "olie van *Mortierella alpina*" op het etiket van levensmiddelen die deze olie bevatten, conform artikel 2 van Beschikking 2008/968/EG van de reeds toegelaten arachidonzuurrijke olie (EC08).

3 Interpretatie en evaluatie van de voorgelegde gegevens

3.1 I Specificatie van het nieuwe voedsel ingrediënt

De aanvrager heeft een definitieve versie van de productspecificatie (Car11) verstrekt waarin alle eerdere wijzigingen (Car10, Car10a, Car10b) zijn opgenomen. De nieuwe olie is helder geel van kleur en bevat nauwelijks vocht ($\leq 0,1$ %). De olie bestaat voor ongeveer 95 % (w/w) uit triglyceriden en 1 % diglyceriden met een gehalte aan arachidonzuur (C20:4 n-6) van ten minste 40 gewichtsprocent van de vetzuren. Op basis van 39 partijen die in de afgelopen vijf jaren zijn geproduceerd heeft de aanvrager de samenstelling van de andere vetzuren, uitgedrukt als percentage van het totaal aan vetzuren, als volgt gespecificeerd.

- linolzuur (C18:2 n-6) 3,8 – 15,2
- lignocerinezuur (C24:0) 7,8 – 12,6
- oliezuur (C18:1 n-9) 3,4 – 9,5
- palmitinezuur (C16:0) 4,3 – 8,1
- stearinezuur (C18:0) 4,2 – 7,6
- dihomogammalinoleenzuur (C20:3 n-6) 3,0 – 5,0
- beheenzuur (C22:0) 2,5 – 4,1
- gammalinoleenzuur (C18:3 n-6) 1,7 – 2,7

Verder zijn er geringe hoeveelheden andere vetzuren aanwezig (≤ 1 %) zoals arachidinezuur (C20:0), myristinezuur (C14:0) en palmitoleïnezuur (C16:1).

Het dossier bevat de gedetailleerde samenstellingsgegevens van vijf productiepartijen uit de periode oktober 2007 tot april 2009 (Car09, Car10a) waaruit blijkt dat de olie normaliter tussen de 41 % en 45 % arachidonzuur bevat. Naast alle vetzuurgehalten zijn ook de testresultaten van andere chemische bestanddelen verstrekt. Het gehalte aan vrije vetzuren (gespecificeerd als $\leq 0,45$ % van het totaal aan vetzuren) varieert van 0,02 - 0,31 %. Transvetzuren zijn nauwelijks aanwezig in de onderzochte partijen (gespecificeerd als $\leq 0,5$ % van het totaal aan vetzuren). Het totale gehalte aan onverzeepbare vetten (gespecificeerd als $\leq 1,5$ w/w %) blijkt minder dan 1,3 %. Deze fractie bestaat grotendeels uit sterolen, zie paragraaf 3.8 voor meer informatie. Het joodgetal, dat een maat is voor het totaal aan onverzadigde bindingen ligt tussen de 178 en 188.

In de productspecificatie zijn twee stabiliteitskenmerken opgenomen. Voor de peroxidewaarde is dit maximaal 2.0 meq/kg, maar in de onderzochte partijen konden geen primaire oxidatieproducten worden aangetoond (detectiegrens 0,03 meq/kg; Car10a). Ook het zuurgetal dat varieert van 0,06 tot 0,17 mg KOH/g olie ligt ruim onder de gespecificeerde waarde van 1,0 mg KOH/g olie (Car10a).

Om eventuele eiwitrestanten afkomstig van het productie-organisme te kunnen aantonen, heeft de aanvrager een speciale methode gebruikt die gebaseerd is op metingen van individuele aminozuren. Het hiervan afgeleide eiwitgehalte in de onderzochte productiepartijen varieert volgens de aanvrager van 0,06 – 0,29 mg per kg olie.

De aanvrager heeft de testresultaten van uitgebreid onderzoek op aanwezigheid van schadelijke bestanddelen verstrekt. Dit is voor de vijf eerdere genoemde productiepartijen (2007-2009) weergegeven in de tabellen 11-15 van het dossier en betreft de volgende

categorieën: zware metalen, pesticiden (organchloor- en organofosforverbindingen) en andere veel voorkomende milieuverontreinigingen waaronder weekmakers zoals ftalaten, polycyclische aromatische koolwaterstoffen (PAKs), polychloorbifenylen (PCBs), dioxinen (PCDDs) en polychloordibenzofuranen (PCDFs). Uit de testresultaten blijkt dat er geen meetbare hoeveelheden van deze verontreinigingen worden aangetroffen in de olie (Car09, Car10b).

De commissie stelt vast dat voor het opsporen van mogelijke verontreinigingen up-to-date analysetechnieken zijn gebruikt door gekwalificeerde contractlaboratoria. In de productspecificatie heeft de aanvrager voor de verschillende zware metalen de volgende grenswaarden opgenomen, te weten 0,1 mg/kg voor lood, cadmium en arseen en 0,05 mg/kg voor kwik, maar de gehanteerde detectiegrenzen zijn een factor 5 tot 10 lager. Voor lood komt deze overeen met het maximumgehalte dat is toegestaan voor gebruiksklare zuigelingenvoeding (EC06). Voor benzo(a)pyreen (merkstof voor PAKs; EC06) en enkele pesticiden (EC06a) blijken de gehanteerde detectiegrenzen maximaal een factor tien hoger te zijn dan de limiet voor zuigelingenvoeding. Omdat een liter zuigelingenvoeding nog geen gram van de fungusolie zal bevatten, wordt ruimschoots aan de norm voldaan.

Voor de andere contaminanten, zoals dioxinen en PCB's, zijn er geen aparte limieten gedefinieerd voor zuigelingenvoeding maar deze worden geacht zo laag als redelijkerwijs haalbaar te zijn. Volgens de commissie zijn de detectiegrenzen, of indien van toepassing de bepaalbaarheids grenzen, voldoende laag gezien de grenswaarden die er bijvoorbeeld voor spijsoei zijn vastgelegd (Car10b). Bovendien wordt de olie sterk verdund in de uiteindelijke zuigelingenvoeding.

De commissie heeft geen reden te twijfelen aan de nauwkeurigheid en betrouwbaarheid van de inhouse technieken¹ waarmee de aanvrager zelf de kenmerken van de olie met betrekking tot de vetzuursamenstelling en de kwaliteit (peroxidewaarde, zuurgetal en vrije vetzuren) heeft bepaald (Car10a). De commissie concludeert dat er nauwelijks meetbare hoeveelheden eitwit in de olie aanwezig zijn (Car10b, Car10c). Zij stelt vast dat de vetzuursamenstelling van de productiepartijen uit 2007-2009 nagenoeg constant is.

De commissie concludeert dat de productinformatie betrouwbaar weergeeft wat de samenstelling van de te vermarkten olie is en dat het geleverde product voldoet aan de specificatie. Het nieuwe ingrediënt bevat geen verontreinigingen die schadelijk zijn voor de volksgezondheid.

3.2 II Effecten van het gevolgde productieproces op het voedsel ingrediënt

Bijlage 5 van het dossier bevat een uitgebreide beschrijving van het productieproces. Het begint met het opschalen van cultures van de schimmel *Mortierella alpina* I₄₉-N₁₈, waarna de micro-organismen worden overgebracht in een bioreactor met speciale kweekvloeistof. Dit medium bevat behalve de benodigde voedingstoffen ook bepaalde verbindingen om het proces optimaal te laten verlopen. Door fermentatie onder aerobe condities ontstaat een

¹ <http://www.cargill.com/company/research-development/capabilities/advancedanalytics/index.jsp>

arachidonzuurrijke biomassa die wordt gefilterd, daarna gedroogd en vervolgens geëxtraheerd. De zo verkregen ruwe arachidonzuurrijke olie wordt in de tweede fase van het proces grondig gezuiverd. Uiteindelijk worden antioxidanten aan de geraffineerde olie toegevoegd. Indien nodig gebruikt de aanvrager gezuiverde zonnebloemolie om het eindproduct te verdunnen voor het gewenste gehalte arachidonzuur. De olie wordt vervolgens onder stikstof opgeslagen in aluminium flessen bij een geschikte temperatuur onder het vriespunt.

Uit stabiliteitsonderzoek van drie productiepartijen uit 2006 blijkt dat het arachidonzuurgehalte niet significant verandert tijdens een opslagperiode van drie jaar. De aanvrager testte verschillende temperaturen onder 0 °C en toont aan dat oxidatieproducten niet toenemen.

De commissie heeft kennis genomen van het productieproces. Zij concludeert dat de arachidonzuurrijke olie wordt gezuiverd middels gangbare technieken uit de spijsolie-industrie (Car10a). Alle grondstoffen en hulpstoffen die worden gebruikt zijn van levensmiddelenkwaliteit. De aanvrager eist dat de toeleveranciers GMP-gekwalificeerd zijn en dat de stoffen voldoen aan tenminste één internationaal erkende specificatie (US FDA, Food Chemical Codex, Europese richtlijn 96/77 inzake zuiverheidseisen voor levensmiddelenadditieven of JECFA). Deze procedure waarborgt volgens de commissie de kwaliteit en veiligheid van de gebruikte materialen, voldoende. Met betrekking tot het verpakkingsmateriaal (Car10b, Car10c, Car11) accepteert de commissie de toezegging van de firma, dat naleving van de migratiewetgeving garandeert is voordat de olie op de Europese markt verschijnt.

De commissie is het eens met de aanvrager dat de grenswaarden voor antioxidanten aanbevolen in de 'Codex Standard for edible fats and oils not covered by individual standards' (<http://www.fao.org/docrep/004/y2774e/y2774e03.htm#bm3.1>) niet van toepassing zijn op het nieuwe ingrediënt omdat dit niet beschouwd moet worden als een spijsolie (Car10a). Na verdunning in het eindproduct liggen de corresponderende gehalten ruim onder die maximaal zijn toegestaan voor vitamine C en E in de richtlijn voor zuigelingenvoeding (EG06a).

Bij verschillende processtappen worden hexaan en butaan gebruikt. Volgens de oorspronkelijke productspecificatie blijft hiervan niet meer dan 1 mg/kg achter in de gezuiverde olie. Deze residuwaarden zijn in overeenstemming met de Europese richtlijn 2009/32 inzake het gebruik van extractiemiddelen bij de productie van levensmiddelen en bestanddelen daarvan.

Met betrekking tot het antischuimmiddel dat bij de schimmelkweek wordt gebruikt (een toegelaten additief), heeft de aanvrager volgens de commissie voldoende onderbouwd dat er van deze stof geen significante hoeveelheden achterblijven na raffinage van de olie (Car10a).

Uit de specificatie van het leidingwater, dat bij enkele van de processtappen wordt gebruikt, blijkt dat dit van voldoende kwaliteit is (Car10b).

Het dossier bevat documenten waaruit blijkt dat er een internationaal erkend managementsysteem wordt gebruikt om de voedselveiligheid te bewaken in het

productiebedrijf in China (ISO 22000:2005 met bijhorend HACCP-plan). De aanvrager meent hiermee te voldoen aan de standaarden voor goede productiepraktijken (*good manufacturing practice* GMP). De commissie beschikt niet over documenten van derden om dit bevestigen, maar uit de omvang en zorgvuldigheid waarmee kritische processtappen worden gecontroleerd blijkt dat de risico's voor de voedselveiligheid voldoende kunnen worden beheerst (Car10a, Car10b).

Samenvattend concludeert de commissie dat de veiligheid van het productieproces voldoende is aangetoond. Er is sprake van een deugdelijke productie en de houdbaarheid van de olie lijkt gegarandeerd.

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

Over de afstamming van *Mortierella alpina* vermeldt de aanvrager dat de schimmel behoort tot het geslacht *Mortierella* in de orde Zygomycota binnen de klasse Zygomycetes. *Mortierella alpina* is één van de meest voorkomende soorten binnen een groep bodemorganismen van deze laatste klasse. De verschillende eigenschappen van *Mortierella alpina* onder laboratoriumcondities zijn goed gedocumenteerd. Volgens de aanvrager zijn er geen bevindingen gerapporteerd die deze schimmel in verband brengen met pathogeniteit of toxiciteit voor mens of dier.

De stam die de aanvrager gebruikt, *Mortierella alpina* I₄₉-N₁₈², is verkregen uit een in de bodem aanwezig wildtype. De aanvrager verklaart dat de schimmel volgens de definitie in de Europese richtlijn 2001/18/EG niet genetisch is gemodificeerd. De commissie is het hiermee eens op basis van aanvullende informatie over de toegepaste techniek (Car10a).

Volgens de aanvrager zijn van het geslacht *Mortierella* geen toxine producerende soorten bekend met uitzondering van *Mortierella wolfii* dat een bijzonder mycotoxine uitscheidt. De aanvrager onderbouwt de afwezigheid van toxische verbindingen ook met testresultaten van 12 bekende mycotoxinen. Vijf onderzochte productiepartijen (zie paragraaf 3.1) zijn allemaal negatief net als soortgelijke arachidonzuurrijke oliën afkomstig van twee andere stammen van *Mortierella alpina*. De aanvrager refereert hiermee aan al toegelaten ingrediënten in zuigelingenvoeding.

Voor de volledigheid bevat het dossier de resultaten van toxicologisch onderzoek bij muizen die een geconcentreerde oplossing met *Mortierella alpina* I₄₉-N₁₈ direct in de maag kregen toegediend. Gedurende de observatieperiode van 14 dagen werden geen ongewenste effecten waargenomen dat erop duidt dat de gebruikte schimmelstam onschadelijk is. Volgens de commissie is de relevantie van dit onderzoek beperkt, omdat de exacte dosering in termen van biomassa onbekend is (Car10a).

De commissie concludeert dat het voldoende is aangetoond dat het productieorganisme *Mortierella alpina* I₄₉-N₁₈ niet schadelijk is voor de mens.

² In het dossier is de *Mortierella alpina* stam consequent weergegeven met I₄₉-N₄₈. De juiste aanduiding van de stam is echter I₄₉-N₁₈ (Car10c).

3.4 IX Verwachte opname en gebruiksfrequentie van het voedselingrediënt

De olie is bedoeld om te worden toegevoegd aan zuigelingenvoeding zodat het arachidonzuurgehalte van flesvoeding overeenkomt met dat van moedermelk teneinde een optimale groei en ontwikkeling, in het bijzonder van de hersenen, te bevorderen. De aanvrager geeft een overzicht van de aanbevelingen voor de hoeveelheid arachidonzuur in zuigelingenvoeding die sinds 1992 door verschillende nationale en internationale instanties zijn gepubliceerd. Dit komt neer op 27-60 mg arachidonzuur/kg bw/dag voor te vroeg geboren baby's en 22-40 mg arachidonzuur/kg bw/dag voor voldragen baby's. Hierbij is in het dossier uitgegaan van een dagelijkse energie-inname van 100-120 kcal/kg bw en dat 50% van deze energie afkomstig is van vetzuren (en één gram vet levert 9 kcal).

De toepassing die de aanvrager voorstelt is ten hoogste 0,4 % arachidonzuur van het totaal aan vetzuren in de uiteindelijke zuigelingenvoeding. Gebaseerd op dit gebruik is de verwachte dagelijkse arachidonzuurinname 27 mg en 22 mg per kg bw voor respectievelijk te vroeg geboren en voldragen baby's. Dit komt overeen met respectievelijk 68 en 55 mg fungusolie per kg bw per dag, uitgaande van een arachidonzuurgehalte van 40 %.

De commissie heeft geen opmerkingen en stelt vast dat de fungusolie ten minste 2000 maal wordt verdund in de zuigelingenvoeding. Zij bevestigt dat de beoogde toepassing hetzelfde is als van een soortgelijke olie die sinds 12 december 2008 in de EU is toegelaten (BNV05, EC06a, EC08).

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

Het dossier bevat een uitgebreide beschouwing van ruim 20 onderzoeken bij zuigelingen die gepubliceerd zijn sinds de beoordeling van de veiligheid van een soortgelijke olie (EC08). Volgens de aanvrager ondersteunen deze resultaten dat arachidonzuurrijke oliën veilig kunnen worden toegepast bij pasgeboren kinderen.

De commissie vindt deze informatie niet direct relevant voor de veiligheid van het specifieke nieuwe product omdat het arachidonzuur in de onderzochte zuigelingenvoeding voor zover bekend maar bij 10 onderzoeken afkomstig was van een fungusolie en geen van deze oliën was geproduceerd door de aanvrager (Car10a). In meer algemene zin echter bevestigen deze gegevens dat er van dit type olie geen nadelige effecten op de algemene groei en ontwikkeling van pasgeboren baby's bekend zijn.

3.6 XI Informatie over de voedingswaarde van het voedselingrediënt

De olie wordt in de zuigelingenvoeding niet als energiebron (vet) gebruikt, maar is bedoeld om aan de arachidonzuurbehoefte tegemoet te komen die nodig is voor een optimale groei en ontwikkeling van te vroeg geboren en voldragen baby's. De aanvrager beschrijft dat arachidonzuur en docosahexaeenzuur (DHA) belangrijke vetzuren zijn voor het hersenweefsel en gezichtsvermogen, die zich snel ontwikkelen bij zuigelingen. Zenuwweefsel is in het bijzonder rijk aan arachidonzuur dat een essentiële bouwsteen is van alle celmembranen. Daarnaast is arachidonzuur een voorstadium van eicosanoiden, die niet

alleen belangrijk zijn als structurele component van zenuwweefsel maar ook bij overdracht van cellulaire informatie. Tevens zijn er bepaalde signaalstoffen die een rol spelen bij immunologische functies en fysiologische processen die uit arachidonzuur worden gevormd. Het dossier geeft een overzicht van recente wetenschappelijke onderzoeken bij proefdieren en zuigelingen. Geen van de arachidonzuurrijke ingrediënten die hiervoor werden gebruikt was afkomstig van de aanvrager (Car10a).

Volgens de commissie beschrijft de aanvrager duidelijk wat de rol van het toegevoegde arachidonzuur in het lichaam is. Naar aanleiding van bevindingen in het toxicologisch onderzoek met ratten (zie paragraaf 3.8) verklaart de aanvrager dat een hoge dosering arachidonzuur kan leiden tot verschuivingen in het wittebloedcelbeeld als er onvoldoende DHA aanwezig is. De commissie merkt op dat er in de Europese regelgeving voor zuigelingenvoeding geen voorschrift voor de verhouding van deze vetzuren is gespecificeerd (EC06a). Evenmin is er een minimum DHA-gehalte vastgesteld. Wel onderkent de aanvrager het belang van een evenwichtige vetzuurverhouding en stelt dat er minimaal evenveel arachidonzuur als DHA aanwezig moet zijn refererend aan recente internationale aanbevelingen op dit terrein.

3.7 XII Microbiologische informatie over het voedselingrediënt

Het dossier bevat testresultaten van verschillende categorieën ongewenste micro-organismen van vijf productiepartijen uit de periode 2007– 2009. Deze voldoen aan de grenswaarden die de aanvrager heeft gespecificeerd. Ook is de commissie niet bezorgd dat er andere ongewenste micro-organismen aanwezig zullen zijn, omdat er hoge temperaturen bij het productieproces worden gebruikt. Op basis hiervan voorziet de commissie geen problemen met betrekking tot de voedselveiligheid van het nieuwe ingrediënt.

3.8 XIII Toxicologische informatie over het voedselingrediënt

Volgens de aanvrager is de nieuwe olie in chemisch opzicht vergelijkbaar met de reeds toegelaten arachidonzuurrijke olie (BNV05, EFSA08, EC08). De olie bevat geen significante hoeveelheden eiwitten (zie paragraaf 3.1). Bovendien wordt de mogelijke allergeniteit van de eiwitten vernietigd door de hittebehandelingen tijdens de zuivering van de olie. De commissie verwijst voor een evaluatie van onderzochte chemische verontreinigingen en mycotoxinen naar de paragrafen 3.1 tot en met 3.3.

Om te bevestigen dat Cargill's olie net zo veilig is als het goedgekeurde product, heeft de aanvrager toxicologisch onderzoek uitgevoerd. Al deze testen zijn gedaan met arachidonzuurrijke olie die in maart 2006 op productieschaal is verkregen. Gebaseerd op de aanvullende informatie met uitgebreide analyseresultaten, concludeert de commissie dat de teststof representatief is voor het op de markt te brengen product (Car10a). De volledige rapporten van de verschillende toxicologische onderzoeken zijn als bijlagen in het dossier opgenomen. Hiervan is ook een samenvatting gepubliceerd door Casterton (Cas09). De commissie bespreekt hieronder de belangrijkste gegevens.

Het totale gehalte aan sterolen is driemaal hoger in de nieuwe olie ten opzichte van dat in de toegelaten olie van Suntory (EC08) en het sterolenprofiel is ook duidelijk anders.

Volgens de commissie heeft de aanvrager voldoende onderbouwd dat de aanwezige sterolen geen veiligheidsrisico met zich meebrengen.

De arachidonzuurrijke olie is niet genotoxisch. Dit blijkt uit drie *in vitro* testen die de aanvrager heeft uitgevoerd zowel met en zonder metabole activatie door S9-mix. De testserie omvatte twee standaard mutageniteitstesten waarvan één met bacteriën (zogenoeten Ames test) en één met zoogdiercellen (muis lymfomacellen). In een derde testsysteem werden chromosoom-aberraties onderzocht in zoogdiercellen (*Chinese hamster ovary* cellen). De verkregen resultaten zijn allemaal negatief.

Het dossier bevat een speciaal subchronisch onderzoek met ratten dat uit twee fasen bestaat. Een eerste prenatale fase, waarbij de ouderparen aan de teststof werden blootgesteld gedurende vier weken voorafgaand aan en tijdens de conceptie (8 mannetjes en 16 vrouwtjes per groep). De blootstelling van de vrouwtjes werd gecontinueerd tijdens de dracht en de periode waarin de jongen werden gezoogd. Direct na het spenen op dag 21 werden de jonge dieren op voer met teststof gezet, en twee weken daarna startte de tweede fase van subchronisch onderzoek. Hierin kregen de nakomelingen gedurende 90 dagen de teststof toegediend (10 mannetjes en 10 vrouwtjes per groep). De arachidonzuurrijke olie was verwerkt in het diervoeder in de doseringen 0,5, 1,5 en 5,0 % (w/w). Voor beide geslachten waren de overeenkomstige blootstellingen in deze dosisgroepen gemiddeld 0,3, 0,9 en 3,2 g olie per kg lichaamsgewicht (bw) per dag. Door de teststof aan te vullen met maïsolie bevatte het voer van alle experimentele groepen evenveel toegevoegd vet (5 %). Daarom waren er twee controle groepen, één met dieren die voer kreeg zonder extra toegevoegd vet en één met extra 5 % maïsolie.

Gedurende het hele onderzoek werden de dieren dagelijks gecontroleerd op klinisch relevante symptomen. Het lichaamsgewicht en de voederinname werd wekelijks bepaald.

In de prenatale fase van het onderzoek waren de teststofinname van de ouderdieren vergelijkbaar met de blootstellingen van de nakomelingen in het 90 dagen durende vervolgonderzoek (afgezien van een iets lagere blootstelling bij de mannetjes in de hoogste dosisgroep, te weten 2,6 g/kg bw/dag). Tijdens de zoogperiode was de blootstelling van de vrouwtjes echter ruim verdubbeld. In de gehele eerste fase zijn er volgens de aanvrager geen bijzonderheden waargenomen bij de ouderdieren. Evenmin zijn er nadelige effecten aangetoond voor de vruchtbaarheid en voortplanting, zwangerschap (o.a. duur, post-implantatie verlies, aantal vrouwtjes met levensvatbare nesten) en het nageslacht (o.a. aantal, geslachtsverhouding, overleving en ontwikkeling). Bij één van de bevindingen plaatst de commissie echter een kanttekening. In de hoogste dosisgroep was de worpgrootte bij de helft van de vrouwtjes van de F₀ abnormaal klein. Dit was statistisch significant ten opzichte van die in beide controle groepen. Volgens de aanvrager zou een slechte spermakwaliteit van één van de mannetjes dit ten dele kunnen verklaren en zou er geen verband zijn met de teststof. Dit lijkt plausibel maar gegevens die dit kunnen onderbouwen ontbreken. De commissie concludeert dat –als er al een effect zou zijn– dit niet relevant is voor de toepassing van de olie bij zuigelingen. Ook is er geen aanleiding tot bezorgdheid over bijvoorbeeld onvruchtbaarheid van de nakomelingen (F₁).

In de tweede fase van het onderzoek zijn de volgende standaardkenmerken bepaald bij alle dieren tenzij anders vermeld. Een uitgebreid lichamelijk onderzoek werd wekelijks

uitgevoerd. Eén of twee weken voor het einde van het onderzoek zijn gedrag en motorische activiteit getest. De beoordeling van het oog (ophthalmoscopie) is, bij afwezigheid van bijzonderheden, alleen uitgevoerd bij dieren van de hoogste dosisgroep en de controlegroep met 5 % maïsolie. In laatste week werd 24-uurs urine verzameld voor (bio)chemische analyse en werd gelijktijd de waterinname gemeten. Voor de analyse van standaard biochemische en hematologische kenmerken is nuchter bloed afgenomen vlak voordat de dieren werden geofferd. Aansluitend zijn de dieren gecontroleerd op zichtbare afwijkingen waarna sectie is verricht. Van een serie organen is het gewicht bepaald. De lever en nieren van alle dieren werden histopathologische onderzocht, net als een groot aantal andere weefsels van de dieren uit de hoogste dosisgroep en de controlegroep met 5 % maïsolie. Daarnaast vond uitgebreid microscopisch onderzoek plaats van alle zichtbare afwijkingen.

De commissie is het eens met de aanvrager dat de middendosering geen nadelige effecten veroorzaakt. Bij de hoogste testdosis werden wel enkele statistisch significant afwijkende parameters gerapporteerd voor beide geslachten ten opzichte van één of beide controle groepen. De geconstateerde dalingen van de plasmaconcentraties van cholesterol, fosfolipiden en triglyceriden (alleen bij mannetjes) waren volgens de aanvrager te verwachten, omdat bekend is dat meervoudig onverzadigde vetzuren verlagingen van plasmalipiden te weeg kunnen brengen. Evenzo zouden de verhogingen van het lever- en miltgewicht het gevolg zijn van de hoge inname van dit type vetzuren. Deze effecten doen zich niet voor in de controlegroep met 5 % maïsolie. De commissie is het er daarom mee eens dat deze veranderingen het gevolg zijn van een fysiologische reactie op het relatief hoog gehalte aan meervoudig onverzadigde vetzuren in het diervoeder. Vergelijkbare bevindingen zijn eerder gerapporteerd. De commissie onderschrijft dat het hier niet om toxicologische effecten gaat, omdat histopathologische veranderingen uitblijven na blootstelling aan de fungusolie.

Met betrekking tot de verhoogde concentraties witte bloedcellen vond de commissie de argumentatie in het dossier, dat er ook hier geen verband zou zijn met de teststofbehandeling, ontoereikend (Car09, Cas09). Voor de hoogste testdosis waren de waargenomen verschillen bij de vrouwtjes statistisch significant ten opzichte van beide controlegroepen en bij de mannetjes alleen ten opzichte van de controlegroep met 5 % maïsolie. De commissie merkt hierbij op dat, behalve veranderingen in absolute aantallen, er ook verschuivingen in het bloedcelbeeld zijn waargenomen. Voor de neutrofielen en lymfocyten zijn deze effecten bij mannetjes en vrouwtjes niet helemaal vergelijkbaar, maar de aantallen monocyten bleken bij beide geslachten ruwweg te zijn verdubbeld ten opzichte van beide controles (dit was statistisch significant voor zowel de relatieve als absolute waarden). In een aanvullende toelichting verklaart de firma (Car10b) dat de beschreven veranderingen in het bloedcelbeeld veroorzaakt kunnen zijn door hoge doseringen van het arachidonzuur in afwezigheid van voldoende docosahexaeenzuur en, met andere woorden, niets te maken hebben met de bron van de nieuwe olie. Een dergelijke onbalans tussen de beide vetzuren zou kunnen resulteren in concentratieveranderingen van de hiervan afgeleide signaalstoffen, zogeheten eicosanoiden en prostaglandinen die celpopulaties van het immuunsysteem beïnvloeden. De commissie beschikt echter over onvoldoende informatie om te kunnen beoordelen of dit heeft bijgedragen aan de waargenomen effecten. Na consultatie

van externe deskundigen op het terrein van immunotoxicologie en hematologie concludeert de commissie dat de mate van veranderingen in de wittebloedcellen bij de rat binnen fysiologische grenzen blijft. Er is daarom geen reden tot zorg. Voor wat betreft de overige afwijkende bevindingen in de dieren van de hoogste dosisgroep is de commissie het eens met de aanvrager dat deze veranderingen niet als toxicologisch significant moeten worden beschouwd. Alles bij elkaar genomen heeft de commissie geen aanwijzingen dat er voor de pasgeboren mens nadelige effecten zijn te verwachten van de nieuwe bron van het arachidonzuur.

Volledigheidshalve refereert de aanvrager aan toxicologisch onderzoek van derden, dat gepubliceerd is nadat de veiligheidsbeoordeling van de recent toegelaten arachidonzuurrijke olie was afgerond (EC08). Bijzonderheden deden zich niet voor in dit 90 dagen onderzoek bij ratten, die werden blootgesteld aan een arachidonzuurrijke biomassa van *Mortierella alpina*. De commissie meent echter dat deze gegevens niet direct relevant zijn voor de huidige veiligheidsbeoordeling. Behalve dat er een andere schimmelstam dan in de huidige aanvraag is gebruikt, ontbreekt ook een verwijzing naar een internationale richtlijn voor de uitvoering.

Gebaseerd op het subchronisch onderzoek na prenatale blootstelling kan een veilige bovengrens van inname van het nieuwe voedselingrediënt worden afgeleid. De commissie is het eens met de aanvrager dat de hoogst geteste dosis de NOAEL (No Observed Adverse Effect Level) weergeeft, te weten 3200 mg olie per kg bw per dag. Dit komt overeen met ongeveer 1300 mg arachidonzuur/kg/dag. De inname van de fungusolie die in proefdieren geen nadelige gezondheidseffecten te weeg brengt is dus minstens een factor 45 hoger dan de bij zuigelingen beoogde inname van 68 mg olie/kg bw/dag (overeenkomend met ongeveer 27 mg arachidonzuur/kg/dag) zoals toegelicht in paragraaf 3.4. Aangezien het niet aannemelijk is dat het voorgestelde consumptieniveau door baby's zal worden overschreden, oordeelt de commissie dat de nieuwe fungusolie als bron van arachidonzuur veilig kan worden toegepast als voedselingrediënt voor zuigelingen.

Executive summary

The applicant, Cargill Incorporated, has filed an application for refined arachidonic acid-rich oil derived from the fungus *Mortierella alpina*. The oil will be used as an ingredient in infant formula. The safety dossier has been submitted to the Committee on the Safety Assessment of Novel Foods (“the Committee”). Given the prolonged exposure and vulnerability of the target group, the Committee has exercised the utmost care in this matter. Accordingly, the applicant was required to submit additional data on a range of topics.

The applicant has demonstrated that the production organism *Mortierella alpina* is not harmful. Production takes place in bioreactors containing this fungus. Here, fermentation takes place under aerobic conditions to produce a biomass rich in arachidonic acid, which is then extracted. The crude arachidonic acid-rich oil is then thoroughly refined. The level of arachidonic acid is equivalent to at least 40% of the total fatty acid content. The applicant has clearly specified the composition and quality characteristics of the novel oil, in addition to performing the necessary checks to guarantee that it is free of harmful chemical and microbiological contaminants. The Committee takes the view that the safety of the production process and the quality of the arachidonic acid-rich oil are sufficiently well safeguarded.

The novel oil can be used as a source of arachidonic acid in the diet of premature babies and full-term infants. This fatty acid has been authorized for use in infant formula since 1996. Regulations governing its use have been laid down in national and European legislation. The applicant proposes that the amount of arachidonic acid to be added to infant formulas should not exceed 0.4% of total fatty acids. Based on this use, the daily intakes of arachidonic acid for premature and full-term babies are estimated to be 27 mg and 22 mg per kg body weight respectively. This corresponds to maximum values of 68 mg and 55 mg of oil per kg body weight per day, respectively.

According to the applicant, in chemical terms, the novel oil is comparable to the related arachidonic acid-rich oil that was authorized for use in the European market in December 2008. In toxicology studies, the applicant has demonstrated that the novel oil is just as safe as the authorized product. The test substance used for this purpose is, according to the Committee, representative of the product to be marketed. The applicant has conducted three different types of genotoxicity studies, which have demonstrated that the arachidonic acid-rich oil is not genotoxic. The applicant also describes the results of a special subchronic study in young rats. These rats were directly exposed to the arachidonic acid-rich oil via their feed for ninety days. However, they had already been exposed before birth (during pregnancy) and during lactation, as their mothers had also consumed diets containing the test substance. The Committee concurs with the applicant’s statement that no adverse effects were observed in these animals. The NOAEL value is therefore equal to the highest dose tested, i.e. 3200 mg of oil per kg body weight per day. The proposed intake for infants (68 mg oil/kg/day) is more than a factor of 45 lower than the oil intake that produced no adverse health effects in laboratory animals. The Committee considers it unlikely that babies will exceed the proposed level of consumption.

In support of the statement that it is safe to use arachidonic acid-rich oil, the applicant cites the results of studies in newborn infants involving similar products made by other companies.

The Committee concludes that, as a source of arachidonic acid, Cargill's fungal oil can be safely used as an ingredient in infant formulas.

1 Introduction

The Novel Foods Unit (BNV) of the Medicines Evaluation Board Agency advises the Dutch Minister of Health, Welfare and Sport on the safety of novel foods. This advisory process is part of the European authorisation procedure for novel foods and food ingredients, laid down in EU Regulation 258/97 (EC97). This present document is the report of the so-called “initial assessment” in accordance with this procedure, in the matter of the safety to consumers of the novel food ingredient “refined arachidonic acid-rich oil”. This oil is derived from the fungus *Mortierella alpina*, and will be used in infant formulas.

Prior to May 1997, when Regulation 258/97 of the European Parliament and of the Council, regarding novel foods and novel food ingredients (EC97) came into effect, products derived from this fungus were used to only a very limited extent in the EU. Details are provided in an earlier report from the BNV regarding the same type of oil (BNV05). The applicant intends to use this product in infant formula, and is therefore asking permission to market the novel arachidonic acid-rich oil in accordance with the above-mentioned legislation. The report on the safety assessment was drawn up by the BNV and has been reviewed by the Committee on the Safety Assessment of Novel Foods, hereinafter referred to as ‘the Committee’. The members of the Committee are listed in one of the appendices of this report.

The assessment procedure went as follows. On 2 November 2009, the applicant submitted the dossier in which the safety of the novel product is evaluated (Car09). Formal processing of this dossier by the BNV commenced on 15 December 2009, when the missing parts were submitted. On 9 February 2010, the applicant submitted a supplementary document containing amendments to various details (Car10). The dossier was discussed by the Committee in various plenary meetings, starting on 1 December 2009, and by a working group (derived from the Committee) in more detail on 7 July 2010. During this period, the applicant provided additional information requested by the Committee (Car10a-c, Car11) on a number of occasions. Its main questions concerned the test substance used in the animal studies, the product specification, and quality assurance measures. In conclusion, the assessment was completed in a plenary meeting of the Committee, held on 8 March 2011. This report reflects the Committee’s findings.

2 Completeness and accuracy of the dossier

2.1 Administrative details

Cargill Alking Bioengineering Co. Ltd (of Hubei, China) is the manufacturer of the novel ingredient in question. The applicant is Cargill Incorporated (15407 McGinty Road West, Wayzata, Minnesota 55391, USA). The application was submitted by a European branch of Cargill (Havenstraat 84, B-1800 Vilvoorde, Belgium).

2.2 General description of the food ingredient

The arachidonic acid-rich oil, which is isolated from fungal cultures of *Mortierella alpina*, is hereinafter also referred to as 'the fungal oil'. Arachidonic acid, a polyunsaturated fatty acid, makes up almost half of the oil. The product will not be directly available to consumers, but will be incorporated into infant formulas for both premature and full-term babies. In the case of children who are exclusively bottle-fed, the applicant states that the addition of arachidonic acid to infant formula is an ideal way to support their nutritional status.

2.3 Classification of the food ingredient for assessment

The applicant expresses no views concerning the classification of the novel product. The Committee notes that the novel ingredient falls under category (d) "foods and food ingredients consisting of, or isolated from, microorganisms, fungi or algae", as referred to in Article 1(2) of the Regulation on novel foods (EC97). Part I of the European Commission's Recommendation 97/618/EC (EC97a) identifies six classes of novel foods, to facilitate assessment of the safety and nutritional aspects of such foods. The Committee considers the novel product to be a complex food ingredient derived from a non-genetically modified organism (class 2). The oil belongs to subclass 2.1, as the source organism has been previously used in the European Union in conjunction with the feeding premature babies (see section 2.1 of reference BNV05).

2.4 Collection of information regarding the food ingredient

The applicant specified the information required for assessing the suitability of the food ingredient for consumption in accordance with the following themes, as defined in the European Commission's Recommendation 97/618/EC (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 applicant clearly discusses each of these themes, and refers to appendices or scientific articles for the data presented. In each theme, the applicant compares the data on the novel oil with that of the Suntory company's oil (EFSA08), which has already been authorized for use (EC08). The dossier, along with the additional data, contains sufficient information to enable the safety of the novel ingredient to be assessed. Furthermore, the Committee made use of information on a similar oil that it had evaluated previously (BNV05).

2.5 Brief summary provided by the applicant

The dossier contains a summary that was sent to the EU member states, as required under Article 6 (2) of European Regulation 258/97 (EC97). The summary is appended to this report.

2.6 Other assessments

The Committee is not aware of any other assessments of this product.

2.7 The applicant's labelling proposal

Labelling should comply with Directive 2000/13/EC on the approximation of the laws of the Member States relating to the labelling, presentation and advertising of foodstuffs, and with Article 8 of Regulation 258/97 (EC97).

The dossier does not contain a labelling proposal. The Committee assumes that the novel food ingredient will be designated as "oil of *Mortierella alpina*" on the labels of foods containing this oil, as required under Article 2 of Commission Decision 2008/968/EC for the arachidonic acid-rich oil which has already been authorized for use (EC08).

3 Interpretation and evaluation of the data submitted

3.1 I Specification of the novel food ingredient

The applicant has provided a final version of the product specification (Car11), incorporating all previous amendments (Car10, Car10a, Car10b). The novel oil is bright yellow in colour and contains little moisture ($\leq 0.1\%$). About 95% (w/w) of the oil consists of triglycerides and 1% of diglycerides. The level of arachidonic acid (C20:4 n-6) is equivalent to at least 40% by weight of the total fatty acid content. Based on 39 batches produced over the past five years, the applicant has specified the composition of other fatty acids, expressed as a percentage of the total fatty acid content, as follows.

- | | |
|---|------------|
| • linoleic acid (C18:2 n-6) | 3.8 – 15.2 |
| • lignoceric acid (C24:0) | 7.8 – 12.6 |
| • oleic acid (C18:1 n-9) | 3.4 – 9.5 |
| • palmitic acid (C16:0) | 4.3 – 8.1 |
| • stearic acid (C18:0) | 4.2 – 7.6 |
| • dihomo-gamma-linolenic acid (C20:3 n-6) | 3.0 – 5.0 |
| • behenic acid (C22:0) | 2.5 – 4.1 |
| • gamma-linolenic acid (C18:3 n-6) | 1.7 – 2.7 |

Small quantities of other fatty acids are also present ($\leq 1\%$) as arachidic acid (C20:0), myristic acid (C14:0) and palmitoleic acid (C16:1).

The dossier contains detailed compositional data on five production batches, spanning the period from October 2007 to April 2009 (Car09, Car10a), which shows that the oil's arachidonic acid level normally ranges from 41% to 45%. In addition to data on the concentrations of all the fatty acids involved, the applicant has provided test results for other chemical components. The level of free fatty acids (specified as $\leq 0.45\%$ of total fatty acids) varies from 0.02% to 0.31%. Virtually no trans fatty acids are present in the batches that were investigated (specified as $\leq 0.5\%$ of total fatty acids). The total unsaponifiable fat content (specified as ≤ 1.5 w/w%), was found to be less than 1.3%. This fraction consists largely of sterols, see section 3.8 for further details. The iodine value (a measure of the total number of unsaturated bonds) is between 178 and 188.

The product specification lists two stability characteristics. The maximum peroxide value is 2.0 meq/kg, but investigation of the five production batches was unable to detect any primary oxidation products (detection limit 0.03 meq/kg; Car10a). The acid value ranges from 0.06 to 0.17 mg KOH/g oil, which is also well below the specified value of 1.0 mg KOH/g oil (Car10a).

To detect any protein residues from the production organism, the applicant used a special method based on measurements of individual amino acids. According to the applicant, the results obtained by this means for the protein level of the production batches investigated vary from 0.06 to 0.29 mg per kg of oil.

The applicant has provided details of the results of extensive testing for the presence of harmful components. The results of the five above-mentioned production batches (2007-2009) are set out in Tables 11-15 of the dossier. They involve the following categories: heavy

metals, pesticides (organochlorine compounds and organophosphorus compounds) and other common environmental pollutants, including plasticizers such as phthalates, polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), polychlorinated biphenyls (PCBs), dioxins (PCDDs) and polychlorinated dibenzofurans (PCDFs). The test results show that the oil contained no measurable quantities of these contaminants (Car09, Car10b).

The Committee has determined that the tests for possible contaminants were carried out by qualified contract laboratories, using up-to-date analysis techniques. The applicant has included limit values for various heavy metals in the product specification. These are 0.1 mg/kg for lead, cadmium and arsenic, and 0.05 mg/kg for mercury, but the actual detection limits used are a factor of five to ten lower. For lead, this corresponds to the maximum level allowed for ready-to-use infant formulas (EC06). For benzo(a)pyrene (marker for PAHs; EC06) and some pesticides (EC06a), the detection limits used are up to a factor of ten higher than the limit for infant formula. As each litre of infant formula will contain less than a gram of the fungal oil, this will easily comply with the standard.

With regard to the other contaminants, such as dioxins and PCBs, no separate limits have been defined for infant formulas but they are considered to be as low as is reasonably achievable. The Committee takes the view that the detection limits or the limits of quantification (if applicable) are sufficiently low, given the limit values that have been established for edible oils, for example (Car10b). Moreover, in the final infant formulas, the oil is highly diluted.

The Committee has no reason to doubt the accuracy and reliability of the in-house techniques¹ used by the applicant to determine the oil's characteristics in terms of fatty acid composition and quality (peroxide value, acid value, and free fatty acids; Car10a). The Committee concludes that the amount of protein present in the oil is barely measurable (Car10b, Car10c). It notes that the fatty acid composition of the production batches dating from 2007-2009 is virtually constant.

The Committee concludes that the product information gives a reliable representation of the composition of the oil to be marketed, and that the product supplied meets the specifications. The novel ingredient does not contain any contaminants that are harmful to public health.

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

Annex 5 of the dossier contains a detailed description of the production process. It starts with the scaling up of cultures of the fungus *Mortierella alpina* I₄₉-N₁₈, after which the micro-organisms are transferred into a bioreactor containing a special fermentation broth. In addition to the necessary nutrients, this medium includes certain process control substances. Fermentation under aerobic conditions creates a biomass rich in arachidonic acid, which is then filtered, dried, and extracted. In the second stage, the crude arachidonic acid-rich oil obtained by this

¹ <http://www.cargill.com/company/research-development/capabilities/advancedanalytics/index.jsp>

means is thoroughly refined. Finally, antioxidants are added to the refined oil. If necessary, the applicant dilutes the final product with refined sunflower oil to obtain the desired concentration of arachidonic acid. The oil is then stored in aluminium bottles, under nitrogen, at a suitably low temperature (below freezing point).

Stability tests conducted on three production batches from 2006 showed that the arachidonic acid content did not change significantly throughout a three-year period of storage. These tests were carried out at various sub-zero temperatures and the applicant demonstrated that there was no increase in oxidation products.

The Committee has examined the production process. It concludes that the arachidonic acid-rich oil is refined by means of standard techniques used in the edible oil industry (Car10a). All of the raw materials and additives used are of food grade. The applicant requires that suppliers must be GMP-qualified and that the substances comply with at least one internationally recognized specification (US FDA, Food Chemical Codex, European Directive 96/77 on purity criteria for food additives or JECFA). The Committee takes the view that this procedure adequately safeguards the quality and safety of the materials used. With regard to the packaging material (Car10b, Car10c, Car11), the Committee accepts the company's undertaking to guarantee compliance with food packaging migration legislation before the oil is introduced to the European market.

The Committee concurs with the applicant's statement that the limit values for antioxidants recommended by the "Codex Standard for edible fats and oils not covered by individual standards" (<http://www.fao.org/docrep/004/y2774e/y2774e03.htm#bm3.1>) do not apply to the novel ingredient because it should not be regarded as an edible oil (Car10a). After dilution in the final product, the corresponding levels are well below the maximum permitted levels for vitamins C and E set out in the Directive on infant formulae (EC06a).

Hexane and butane are used at different steps in the process. According to the original product specification, the amount of such substances remaining in the refined oil is no more than 1 mg/kg. These residue values are in line with European Directive 2009/32, on the use of extraction solvents in the production of food and food ingredients.

With regard to the anti-foaming agent used when culturing the fungus (an authorized food additive), the Committee feels that the applicant has adequately demonstrated that no significant quantities of this substance remained after the oil has been refined (Car10a).

The specification of the tap water used in some of the process steps shows it to be of adequate quality (Car10b).

The dossier contains documents indicating that an internationally recognized food safety management system is used to monitor the production plant in China (ISO 22000:2005 with the associated HACCP plan). The applicant takes the view that, by using this system, they are in compliance with Good Manufacturing Practice standards (GMP). The Committee does not have third-party documents to confirm this, but the extent and care with which critical process steps are monitored shows that any risks to food safety can be adequately managed (Car10a, Car10b).

In summary, the Committee concludes that the safety of the production process has been adequately demonstrated. Production is of a good standard and the oil's shelf life appears to be guaranteed.

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

With regard to the classification of *Mortierella alpina*, the applicant indicates that the fungus belongs to the genus *Mortierella* in the order Zygomycota of the class Zygomycetes. *Mortierella alpina* is one of the most common species within the group of soil organisms belonging to the latter class. The characteristics of *Mortierella alpina* under laboratory conditions are well documented. According to the applicant, no findings have been reported that might associate this fungus with pathogenicity or toxicity in humans or animals.

The strain used by the applicant, *Mortierella alpina* I49-N18² was derived from a wild type present in the soil. The applicant states that the fungus has not been genetically modified, as defined by European Directive 2001/18/EC. The Committee concurs with this view, on the basis of additional information on the technique used (Car10a).

According to the applicant, the genus *Mortierella* is not known to contain any toxin-producing species, with the exception of *Mortierella wolfii* that secretes a particular mycotoxin. The applicant also provides evidence for the absence of toxic compounds, in the form of test results for 12 known mycotoxins. Five production batches (see Section 3.1) all tested negative, as did similar arachidonic acid-rich oils derived from two other strains of *Mortierella alpina*. Here, the applicant refers to ingredients that have already been authorized for use in infant formulas.

In the interests of completeness, the file contains the results of toxicological studies in which a concentrated solution of *Mortierella alpina* I49-N18 was administered directly into the stomachs of mice. No adverse effects were observed during the 14-day observation period, indicating that the fungal strain used is harmless. The Committee takes the view that this study is of limited relevance, as there is no data on the exact dose (in terms of biomass) used (Car10a).

The Committee concludes that it has been adequately demonstrated that the production organism, *Mortierella alpina* I49-N18, is not harmful to humans.

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

The oil is intended to be added to infant formula, to bring the arachidonic acid level of infant formula milk up to the level found in breast milk. The aim is to support optimal growth and development, especially of the brain. The applicant provides a summary of recommendations published by various national and international bodies since 1992, concerning the arachidonic acid content of infant formula. This equates to 27-60 mg arachidonic acid/kg bw/day for premature babies and 20-40 mg arachidonic acid/kg bw/day for full-term babies.

² In the dossier, the *Mortierella alpina* strain is consistently designated as I49-N48. However, the correct designation of this strain is I49-N18 (Car10c).

On this point, the dossier is based on the assumption that daily energy intake amounts to 100-120 kcal/kg bw, and that 50% of this is derived from fatty acids (and one gram of fat provides 9 kcal).

In the use proposed by the applicant, the amount of arachidonic acid in the final infant formula should not exceed 0.4% of total fatty acids. Based on this use, the anticipated daily intakes of arachidonic acid for premature and full-term babies are 27 mg and 22 mg per kg bw respectively. This corresponds to 68 mg and 55 mg of fungal oil, respectively, per kg bw per day, assuming an arachidonic acid content of 40%.

The Committee has no comments on this matter, but notes that the fungal oil is diluted at least 2000 times in the infant formula. It confirms that the intended application is the same as that for a similar oil that has been authorized for use in the EU since 12 December 2008 (BNV05, EC06a, EC08).

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

The dossier contains a detailed examination of over twenty studies in infants which have been published since the safety assessment of a similar oil (EC08). According to the applicant, these results support the view that arachidonic acid-rich oils can be safely used in newborn infants.

The Committee believes that this information is not directly relevant to the safety of the novel product in question. This is because in only ten of the studies was the arachidonic acid in the infant formulas tested derived from a fungal oil, and none of these oils were produced by the applicant (Car10a). More generally, however, this data confirms that this type of oil has no known adverse effects on the overall growth and development of newborn babies.

3.6 XI Nutritional information on the food ingredient

The oil in the infant formula is not used as an energy source (fat), but is designed to meet the arachidonic acid requirement for the optimal growth and development of premature and full-term babies. The applicant notes that arachidonic acid and docosahexaenoic acid (DHA) are important fatty acids for brain tissue and vision, which develop rapidly in infants. Neural tissue is particularly rich in arachidonic acid, which is an essential component of all cell membranes. Arachidonic acid is also a precursor of eicosanoids, which, in addition to being major structural components of nerve tissue, play an important role in cellular signal transfer. Arachidonic acid is also required for the synthesis of other signalling molecules, which are involved in immunological functions and physiological processes. The dossier includes a summary of recent scientific studies in laboratory animals and infants. None of the arachidonic acid-rich ingredients used in these studies was supplied by the applicant (Car10a).

According to the Committee, the applicant clearly describes the added arachidonic acid's role in the body. Following findings in the toxicological study in rats (see Section 3.8), the applicant states that if insufficient DHA is present, high doses of arachidonic acid can lead to changes in the white blood cell count. The Committee notes that EU legislation on

infant formulae does not specify a requirement for the ratio of these fatty acids. Nor is a minimum DHA content stipulated. However, the applicant does acknowledge the importance of a balanced fatty acid ratio. Referring to recent international recommendations in this area, they propose that at least as much as arachidonic acid as DHA must be present.

3.7 XII Microbiological information on the food ingredient

The dossier includes the results of tests for various categories of undesirable micro-organisms performed on five production lots from 2007-2009. The results meet the limit values specified by the applicant. Moreover, given the high temperatures used in the production process, the Committee is not concerned about the possible presence of other undesirable micro-organisms. On this basis, the Committee does not anticipate any food safety issues with regard to the novel ingredient.

3.8 XIII Toxicological information on the food ingredient

According to the applicant, the novel oil is chemically comparable to the arachidonic acid-rich oil which has already been authorized for use (BNV05, EFSA08, EC08). The oil contains no significant amounts of protein (see Section 3.1). Moreover, the potential allergenicity of those proteins that are present is destroyed by the heat treatments to which the oil is subjected during the refining process. For a detailed assessment of the chemical contaminants and mycotoxins investigated, the Committee refers the reader to sections 3.1 to 3.3.

The applicant conducted toxicological research, to confirm that Cargill's oil is just as safe as the authorized product. All of these studies were carried out using production-scale, arachidonic acid-rich oil dating from March 2006. Based on the additional information and extensive analysis results, the Committee concludes that the test substance is representative of the product to be marketed (Car10a). The full reports of the various toxicological studies are appended to the dossier. A summary of this was published by Casterton (Cas09). The Committee discusses the main points below.

The novel oil's total sterol content is three times higher than that of the authorized oil produced by the Suntory company (EC08). Its sterol profile is also clearly different. According to the Committee, the applicant has adequately demonstrated that the sterols present pose no safety risk.

The arachidonic acid-rich oil is not genotoxic. This is demonstrated by three *in vitro* tests, which the applicant performed both with and without metabolic activation by S9 mix. The test series involved two standard mutagenicity tests, one using bacteria (the Ames test) and one using mammalian cells (mouse lymphoma cells). A third system tested for chromosome aberrations in mammalian cells (Chinese hamster ovary cells). The results obtained were all negative.

The dossier contains details of a special, two-stage, subchronic study in rats. During the initial, prenatal stage, the parent animals were exposed to the test substance for four weeks prior to and during conception (8 males and 16 females per group). Exposure of the females was continued during gestation and lactation. At 21 days, immediately after being weaned,

the young animals were started on feed containing the test substance. The second stage of the subchronic study commenced two weeks later. During this stage, the test substance was administered to the offspring for a period of 90 days (10 males and 10 females per group). The arachidonic acid-rich oil was incorporated into their diet, at concentrations of 0.5%, 1.5% and 5.0% (w/w). For both sexes, the corresponding exposures in these dose groups averaged 0.3 g, 0.9 g, and 3.2 g of oil per kg bw per day. The test substance was supplemented with corn oil to ensure that the feed given to all experimental groups contained the same amount of added fat (5%). This required the use of two control groups, one with animals that were given feed without extra fat, and one with an extra 5% of corn oil.

Throughout the study, the animals were checked daily for clinical signs (i.e. general condition and behaviour). Body weight and feed intake were measured each week.

In the prenatal stage of the study, the parents' test substance intakes were comparable to their offspring's exposure during the 90-day follow-up study (with the exception of a slightly lower exposure for males in the highest dose group, i.e. 2.6 g/kg bw/day). During the lactation period, however, the females' exposure was more than doubled. According to the applicant, examinations of the parent animals did not reveal any test substance effects throughout the entire first stage. Nor have any adverse effects been demonstrated on fertility, on reproductive performance, on pregnancy (e.g. duration, post-implantation loss, number of females with viable litters) or on the offspring (e.g. number, sex ratio, survival, and development). However, the Committee did make a comment on one of the findings. In the highest dose group, litter size in half of the females of the F₀ generation was abnormally small. This was statistically significant compared to those in both control groups. The applicant states that this can be partly accounted for by poor sperm quality in one of the males, and that it has nothing to do with the test substance. While this claim does seem plausible, there is no data to substantiate it. The Committee concludes that, if such an effect does indeed exist, then it would be not be relevant to the use of the oil in infants. Nor is there any cause for concern with regard to sterility of the offspring (F₁ generation), for example.

In the second stage of the study, the following standard characteristics were determined for all animals, unless stated otherwise. Extensive physical examinations were performed on a weekly basis. Behaviour and motor activity were tested one or two weeks before the end of the study. In the absence of any unusual observations, examinations of the eye (ophthalmoscopy) were only performed for animals in the highest dose group and for those in the control group with 5% corn oil. In the last week, urine was collected over a 24-hour period for chemical and biochemical analysis. Water intake was measured at the same time. For the analysis of standard biochemical and haematological features, fasting blood samples were taken just before the animals were sacrificed. The animals were then inspected for visible abnormalities, after which they were autopsied. A series of organs were then weighed. The liver and kidneys of all animals were subjected to a histopathological examination, as were many other tissues from animals in the highest dose group and from those in the control group with 5% corn oil. An extensive microscopic examination of all visible abnormalities was also carried out.

The Committee concurs with the applicant's statement that the middle dose level produced no adverse effects. Nevertheless, at the highest test dose, a few statistically

significant abnormal parameters were reported – for both sexes – relative to one or both control groups. According to the applicant, the observed falls in plasma concentrations of cholesterol, phospholipids and triglycerides (males only) were to be expected, as polyunsaturated fatty acids are known to cause declines in plasma lipid levels. Similarly, increases in the weights of livers and spleens were claimed to be due to the high intakes of these types of fatty acids. These effects were not seen in the control group with 5% corn oil. The Committee therefore concurs that these changes are the result of a physiological response to the feed's relatively high polyunsaturated fatty acid content. Similar findings have been reported in the past. The Committee subscribes to the view that toxicological effects are not involved, as exposure to the fungal oil did not produce any histopathological changes.

With regard to the elevated concentrations of white blood cells, the Committee felt that the arguments put forward in the dossier (that this was unrelated to treatment with the test substance) were inadequate (Car09, Cas09). At the highest test dose, the observed differences in the females were statistically significant compared to both control groups. Those in the males were only statistically significant in comparison to the control group with 5% corn oil. The Committee notes that, aside from changes in absolute numbers, shifts in the differential blood cell count were also observed. These effects in males and females are not entirely comparable, in terms of neutrophils and lymphocytes. However, the numbers of monocytes in both sexes were found to have roughly doubled, relative to both controls (this was statistically significant for both the relative and absolute values). The company submitted an additional, explanatory document (Car10b) in which it stated that the changes described in the blood cell count might have been caused by high doses of arachidonic acid in the absence of sufficient docosahexaenoic acid. In other words, these changes were unrelated to the source of the novel oil. An imbalance of this kind between these two fatty acids could result in concentration changes in the signalling molecules derived from them (eicosanoids and prostaglandins), which influence the populations of cells in the immune system. However, the Committee does not have sufficient information to determine whether or not this contributed to the observed effects. After consulting external experts in the fields of immunotoxicology and haematology, the Committee has concluded that the magnitude of the changes in white blood cells in the rat are within physiological limits. Accordingly, there is no cause for concern. As for the other abnormal findings in animals in the highest dose group, the Committee concurs with the applicant's statement that these changes should not be regarded as toxicologically significant. All in all, the Committee has no evidence that the novel source of arachidonic acid might be expected to produce adverse effects in human newborns.

In the interests of completeness, the applicant refers to a third-party toxicological study that was published after the safety assessment of the recently authorized arachidonic acid-rich oil was completed (EC08). These authors did not observe any treatment related effects in the 90-day study in rats that were exposed to an arachidonic acid-rich biomass consisting of *Mortierella alpina*. However, the Committee takes the view that this data is not directly relevant to the current safety assessment. Aside from the fact that the fungal strain in that

case was not the one used in the current application, there is no reference to an international guideline for the study protocol and testing procedures.

A safe upper intake level for the novel food ingredient can now be derived, based on the subchronic study following prenatal exposure. The Committee agrees with the applicant that the highest dose tested represents the NOAEL (No Observed Adverse Effect Level), i.e. 3200 mg of oil per kg bw per day. This corresponds to about 1300 mg of arachidonic acid/kg/day. Accordingly, the intake of fungal oil that produces no adverse health effects in experimental animals is at least a factor of 45 higher than the anticipated intake for infants of 68 mg oil/kg bw/day (equivalent to about 27 mg of arachidonic acid/kg/day) as explained in section 3.4. Since it is unlikely that babies will consume more than the proposed amount of the product, the Committee takes the view that, as a source of arachidonic acid, the novel fungal oil can be safely used as a food ingredient for infants.

Literature / Literatuur

- BNV05 Novel Foods Unit, Medicines Evaluation Board, The Hague: Arachidonic acid-rich oil SUNTGA40S, available from www.novel-foods.nl, see 'Finished assessments' 19 October 2005.
Bureau Nieuwe Voedingsmiddelen van het agentschap ten behoeve van het College ter Beoordeling van Geneesmiddelen, Den Haag. Arachidonzuurrijke olie SUNTGA40S, beschikbaar via http://www.cbg-meb.nl/CBG/nl/nieuwe_voedingsmiddelen/beoordelingen/, zie onder 'Afgeronde beoordelingen' bij 19 oktober 2005.
- Car09 Application for the approval of refined arachidonic acid-rich oil. Novel food dossier for refined arachidonic acid-rich oil (RAO). Cargill (Vilvoorde, Belgium), November 2, 2009.
- Car10 Addendum to the application for the approval of refined arachidonic acid-rich oil. Cargill (Vilvoorde, Belgium), February 9, 2010.
- Car10a Additional information. Reply to the request of the Dutch Novel Foods Unit via e-mail dated March 3, 2010. Cargill (Vilvoorde, Belgium), May 10, 2010.
- Car10b Additional information, addendum 2. Cargill (Vilvoorde, Belgium), September 10, 2010.
- Comments no 1 – no 5 in reply to the request of the Dutch Novel Foods Unit via e-mail dated June 24, 2010. Addendum no 3 with test results on PCB congeners completing comment no 2 was received by the Dutch Novel Foods Unit October 6, 2010.
 - Comments no 6 and no 7 in response to questions of the VNV Committee, via e-mail by the Dutch Novel Foods Unit on July 13, 2010.
- Car10c Additional information, addendum 4. Reply to the request of the Dutch Novel Foods Unit via e-mail dated November 3, 2010. Cargill (Vilvoorde, Belgium), November 19, 2010.
- Car11 Additional information, addendum 5. Reaction to critical comments of the Dutch VNV Committee in its letter dated 14 December, 2010. Cargill (Vilvoorde, Belgium), March 1, 2011.
- Cas09 Casterton PL, Curry LL, Lina BA, Wolterbeek AP, Kruger CL. 90-Day feeding and genotoxicity studies on a refined arachidonic acid-rich oil. Food Chem Toxicol 2009; 47: 2407-2418. (This is included in the dossier)
- 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 and of the Council. Official Journal of the European Communities 1997; L253: 1-36.
(Aanbeveling (EG) nr. 97/618/EG 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.

- EC06 Commission Regulation (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. Official Journal of the European Communities 2006; L364; 5-24, available from <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CONSLEG:2006R1881:20090701:EN:PDF> (Verordening (EG) Nr. 1881/2006 van de commissie van 19 december 2006 tot vaststelling van de maximumgehalten aan bepaalde verontreinigingen in levensmiddelen. Publicatieblad van de Europese Unie 2006; L364; 5-24, zie <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CONSLEG:2006R1881:20090701:NL:PDF>)
- EC06a Commission Directive 2006/141/EC of 22 December 2006 on infant formulae and follow-on formulae and amending Directive 1999/21/EC. Official Journal of the European Communities 2006; L401:1-33, available from <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2006:401:0001:0033:EN:PDF> (Richtlijn 2006/141/EG van de Commissie van 22 december 2006 inzake volledige zuigelingenvoeding en opvolgzuigelingenvoeding en tot wijziging van Richtlijn 1999/21/EG. Publicatieblad van de Europese Unie 2006; L401:1-33, zie <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2006:401:0001:0033:NL:PDF>)
- EC08 Commission Decision 2008/968/EC of 12 December 2008 authorising the placing on the market of arachidonic acid-rich oil from *Mortierella alpina* as a novel food ingredient under Regulation (EC) No 258/97 of the European Parliament and of the Council, available from <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2008:344:0123:0124:EN:PDF> (2008/968/EG: Beschikking van de Commissie van 12 december 2008 tot verlening van een vergunning voor het in de handel brengen van arachidonzuurrijke olie van *Mortierella alpina* als een nieuw voedsel ingrediënt krachtens Verordening (EG) nr. 258/97 van het Europees Parlement en de Raad, zie <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2008:344:0123:0124:NL:PDF>)
- EFSA08 European Food Safety Authority. Safety of 'fungal oil from *Mortierella alpina*'. Scientific Opinion of the Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies. Adopted on 10 July 2008 (Available from <http://www.efsa.europa.eu/en/scdocs/doc/770.pdf>)

The Committee/ De commissie

- Prof. dr. G.J. Mulder, *voorzitter / chairman*
emeritus hoogleraar toxicologie, Universiteit Leiden
professor emeritus toxicology, Leiden University
- Prof. dr. C.A.F.M. Bruijnzeel-Koomen, *adviseur / advisor*
hoogleraar dermatologie/allergologie; UMC Utrecht
professor of dermatology/allergology; University Medical Centre Utrecht
- Dr. ir. M. Dekker
levensmiddelentechnoloog; Wageningen Universiteit en Researchcentrum
food technologist; Wageningen University and Research Centre
- Dr. A.F.M. Kardinaal
voedingskundige; TNO, Zeist
nutritional expert; TNO, Zeist
- Dr. ir. E.J. Kok
toxicoloog; RIKILT Instituut voor Voedselveiligheid, Wageningen
toxicologist; RIKILT, Institute of Food Safety, Wageningen
- Dr. C.F. van Kreijl
moleculair-bioloog (gepensioneerd); RIVM Bilthoven
molecular biologist (retired); National Institute of Public Health and the Environment, Bilthoven
- Dr. F.M. Nagengast
gastro-enteroloog; UMC St Radboud, Nijmegen
gastro-enterologist; University Medical Centre St Radboud, Nijmegen
- Dr. ir. J.M.A. 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
- Dr. G.J.A. Speijers
toxicoloog (gepensioneerd); RIVM Bilthoven
toxicologist (retired); National Institute of Public Health and the Environment, Bilthoven
- Dr. ir. E.H.M. Temme
voedingskundige; RIVM Bilthoven
nutritional expert; National Institute of Public Health and the Environment, Bilthoven
- Drs. A.I. Viloría Alebesque, *adviseur / advisor*
Ministerie van VWS, Den Haag
Ministry of Health, Welfare and Sport, The Hague
- Dr. R.A. Woutersen
toxicoloog, toxicologisch patholoog; TNO, Zeist
toxicologist, toxicologic pathologist; TNO, Zeist

Bureau Nieuwe Voedingsmiddelen, CBG/ Novel Foods Unit, MEB

- Dr. C.M.A. van Rossum, *beoordelaar voedselveiligheid / scientific assessor food safety*
- Dr. ir. M. Rutgers, *beoordelaar voedselveiligheid / scientific assessor food safety*
- Drs. E. van Galen, *hoofd BNV / head NFU*

Summary of the dossier / Samenvatting van het dossier



SUMMARY OF THE APPLICATION
FOR THE APPROVAL OF REFINED ARACHIDONIC-ACID RICH OIL

THIS SUMMARY DOES NOT
CONTAIN CONFIDENTIAL BUSINESS INFORMATION

*Regulation (EC) No 258/97 of the European Parliament and of the
Council of 27th January 1997 concerning novel foods and
novel food ingredients*

**Novel Food Dossier for Refined
Arachidonic Acid-Rich Oil (RAO)
Manufactured by Cargill Alking Bioengineering**

Cargill, Incorporated
15407 McGinty Road West
Wayzata, MN 55391, United States

30 October 2009

THIS PAGE INTENTIONALLY LEFT BLANK

ADMINISTRATIVE DATA

Name and Address of Applicants/Manufacturers

The application (hereinafter referred to as Cargill) is submitted by:

Cargill, Incorporated,
a Delaware corporation,
with its principal place of business at
15407 McGinty Road West, Wayzata,
Minnesota 55391 (USA),

Acting through,
Cargill Research & Development Centre
Havenstraat 84, B-1800 Vilvoorde, Belgium

Name and Address of Person(s) Responsible for Dossier

Information removed for the version to be loaded in the EC database.

Cargill, Incorporated is requesting European Commission authorization to introduce a refined arachidonic acid-rich oil, (RAO), produced by Cargill Alking Bioengineering Co., Ltd, Wuhan, China, to the European market, as a novel food for use as an ingredient in the manufacture of infant formula and follow-on formula that will be consumed by premature as well as full term infants. RAO is produced by the fungus *Mortierella alpina* and specifications for the oil stipulate an arachidonic acid (ARA) minimum content of 40% of the fatty acid composition. The following safety dossier includes information on composition, intake, nutritional, microbiological, and toxicological data for RAO as well as appropriate corroborative data from chemically similar/essentially equivalent ARA-rich oils.

The compositional data and product properties are consistent with carefully controlled cGMP production and purification. RAO contains no impurities or contaminants of concern for human health. The morphology, biochemistry, and physiology of *M. alpina* are well documented and there is no concern for human or animal pathogenicity or toxigenicity. *M. alpina* is not genetically modified.

With the EC's novel food authorization, the intended use for RAO is as an ingredient in infant formula. The roles and functional importance of long-chain polyunsaturated fatty acids (LCPUFA) in pregnancy, lactation and infancy have been the subject of numerous clinical evaluations, particularly as they relate to the n-6 and n-3 LCPUFA, ARA (C20:4n-6) and docosahexaenoic acid (DHA; C22:6n-3). In humans, the essential dietary fatty acids, linoleic (C18:2n-6) and α -linolenic (C18:3n-3) are the precursors for *in situ* desaturation and elongation reactions that result in the synthesis of ARA and DHA, respectively. Both substances are associated with normal growth and maturation of numerous organ systems and rapid accretion of LCPUFA takes place in an infant's nervous tissue during pre- and early postnatal life. Studies have suggested that infants may not synthesize sufficient amounts of ARA and DHA *de novo* from their precursors to cover the high demand during this period of rapid accretion. Breast milk is the preferred method of providing an exogenous supply of ARA and DHA. However, when for medical or personal reasons, infant formula is chosen as a sole source or supplementary infant food, addition of ARA and DHA to the formula may support optimal nutritional status of preterm

and term infants. Based on current knowledge regarding the importance of LCPUFA and their presence in human milk, guidelines and recommendations established by the World Association of Perinatal Medicine, the Early Nutrition Academy, and the Child Health Foundation collectively recommend that the level of DHA in infant formula be 0.20 to 0.50 weight percent of total fat; with the minimum amount of ARA being equivalent to the DHA content (Koletzko *et al.*, 2008). These recommendations lead to the use of highly refined oils as sources of ARA and DHA for addition to infant formulas. The conditions governing such use are set out in member states and European legislation concerning infant formula.

An estimate of exposure to the novel food ingredient from its addition to infant formula is based on a mean target ARA level of 0.40 g/100g total fat. Assuming human infants consume about 100 kcal/kg bwt/day (term infants) to 120 kcal/kg bwt/day (pre-term infants), of which fat comprises about 50%, an infant will consume about 5.6 – 6.7 g of fat/kg bwt/day (1 g fat = 9 kcal), corresponding to an intake of ARA of 22 – 27 mg ARA/ kg bwt/day (or 56 – 67 mg of RAO/kg bwt/day). This consumption is in the range of intake of ARA from human breast milk (Brenna *et al.*, 2007). This intake is also consistent with intakes resulting from currently approved levels of ARA supplementation of commercially available infant formula (Generally Recognized as Safe (GRAS) in the U.S. (FDA, 2001a, 2001b, 2006), approved by the Dutch authority (NFU, 2005), and concluded to be safe by the European Food Safety Authority (EFSA, 2008). Use of this novel food ingredient will comply with the restrictions set out in Commission Directive 2006/141/EC (EC, 2006) regarding the maximum limit of 1% for ARA of total fat in infant formula.

Numerous animal safety studies have been conducted over a period of more than a decade on ARA-rich oils derived from *M. alpina*. Submissions of these data along with production process and final product specification information and corroborative information from growth and tolerance studies in infant populations have been reviewed by scientific agencies and regulatory bodies including those in the EU, Australia/New Zealand and the US. In all jurisdictions, the conclusions reached were that these commercially available ARA-rich oils derived from *M. alpina*, meeting appropriate food grade specifications, provide a safe ARA source for supplementation into infant formula. These decisions have led to its availability for this use in at least 50 countries worldwide. Because the proposed food application for RAO involves the

potentially sensitive non-breast-fed infant population, the existence of published safety data on other refined ARA-rich oils does not relieve Cargill of the obligation to demonstrate the safety of RAO. A critical part of the safety evaluation is bridging new ingredient information to existing information on chemically similar/essentially equivalent ingredients identified in the published literature. Animal and *in vitro* studies similar to those conducted on other commercially available ARA-rich oils were conducted using RAO to corroborate its safety as another ARA source for infant formula manufacturers. Thus, the purpose of conducting safety studies on RAO is to confirm that the safety profile for this oil matched that of other refined ARA-rich oils reported in the scientific literature.

The safety of RAO was evaluated for reverse mutation, chromosome aberration and gene mutation *in vitro*, and in a 90-day Wistar rat feeding study with *in utero* exposure. The results of the genotoxicity assays were all negative. The *in utero* phase of the 90-day study involved dietary exposure to 0.5%, 1.5% and 5% RAO and two controls diets, a standard feed low-fat diet and a high-fat diet supplemented with 5% corn oil. This exposure covered four weeks prior to mating, through mating, gestation and lactation until offspring (F₁) weaning. A subsequent 90-day feeding study with the F₁ rats evaluated the same test and control diets. No adverse test article-related effects occurred at even the highest dietary RAO concentration administered in that study, equal to approximately 3,000 mg RAO/kg bwt/day. This represents a daily RAO intake that is approximately 45-fold greater than the anticipated intake by a preterm or term infant fed formula containing the ingredient at 1% total fat content (*i.e.*, 67 mg RAO /kg bwt/day or 27 mg ARA/kg bwt/day).

Results from the toxicology studies of RAO are consistent with those from toxicology studies on other ARA-rich oils. This information corroborates the safety of RAO as another safe source of ARA-rich oil. Together, all the available data establish a strong body of evidence for the safety of RAO as a source of ARA for supplementation into infant formula.