

2'-Fucosyllactose

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

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

aan/to:

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

Nr. 2016-03 BNV, Utrecht, 3 juni 2016

No. 2016-03 BNV, Utrecht, June 3, 2016

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 voedingsmiddel	7
2.3 Classificatie van het voedingsmiddel voor beoordeling	7
2.4 Informatievergaring over het voedingsmiddel	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 voedingsmiddel	9
3.2 II Effecten van het gevolgde productieprocedé op het voedingsmiddel	11
3.3 III Achtergrondinformatie over het als bron voor het voedingsmiddel gebruikte organisme	11
3.4 IX Verwachte opname en gebruiksfrequentie van het voedingsmiddel	12
3.5 X Informatie op basis van eerdere blootstelling van de mens aan het voedingsmiddel of zijn bron	12
3.6 XI Informatie over de voedingswaarde van het voedingsmiddel	13
3.7 XII Microbiologische informatie over het voedingsmiddel	13
3.8 XIII Toxicologische informatie over het voedingsmiddel	13
BIJLAGEN	
Literatuur	33
De commissie	36
Samenvatting van het dossier	38

Contents (English translation)

Executive summary	19
1 Introduction	21
2 Completeness and accuracy of the dossier	22
2.1 Administrative data	22
2.2 General description of the food	22
2.3 Classification of the food for assessment	22
2.4 Information on the food	22
2.5 Brief summary by the applicant	23
2.6 Other assessments	23
2.7 Applicant's labelling proposal	23
3 Interpretation and evaluation of data submitted	24
3.1 I Specification of the novel food	24
3.2 II Effects of the production process applied to the food	26
3.3 III History of the organism used as the source of the food	26
3.4 IX Anticipated intake and extent of use of the food	27
3.5 X Information from previous human exposure to the food or its source	27
3.6 XI Nutritional information on the food	27
3.7 XII Microbiological information on the food	28
3.8 XIII Toxicological information on the food	28
 APPENDICES	
Literature	33
The Committee	36
Summary of the dossier	38

Samenvatting en conclusies

De aanvrager, de firma Jennewein Biotechnologie GmbH, heeft een veiligheidsdossier ingediend over het gebruik van het oligosacharide 2'-fucosyllactose (2'-FL) als ingrediënt voor zuigelingenvoeding en opvolgzuigelingenvoeding. De stof 2'-FL is een endogeen bestanddeel van moedermelk, en vormt bij de meeste moeders het voornaamste oligosacharide in de melk. Het doel van de aanvraag is om gezuiverd 2'-FL toe te kunnen voegen aan kunstvoeding, waarin deze stof niet voorkomt. Daartoe wordt dit oligosacharide geproduceerd met behulp van een genetisch gemodificeerde stam van de bacterie *Escherichia coli*. Bij groei onder gecontroleerde omstandigheden scheidt dit micro-organisme het 2'-FL af in het cultuurmedium, waaruit het product vervolgens wordt opgezuiverd. De aanvrager heeft betoogd dat het genetisch gemodificeerde productieorganisme wordt toegepast als een proceshulpstof, zodat een beoordeling van de voedselveiligheid van het eindproduct als nieuw voedingsmiddel is aangewezen.

De aanvrager heeft specificaties opgesteld voor twee vormen van het product, een vloeibaar concentraat van 2'-FL en een poedervormig product dat wordt gemaakt door sproeidrogen van dit concentraat. Het 2'-FL in poedervorm bevat maximaal 9% water, en bestaat verder vrijwel volledig uit koolhydraten. Tenminste 90% daarvan is 2'-FL, en ook de andere aanwezige koolhydraten zijn geïdentificeerd. Voor deze bestanddelen zijn grenswaarden opgenomen in de specificatie. Die specificatie omvat verder grenswaarden voor as en eiwit, voor enkele denkbare verontreinigingen (zware metalen, endotoxines, aflatoxine M1), en voor enkele microbiologische parameters. Ook is vastgelegd op welke manier de afwezigheid van DNA van het gebruikte micro-organisme wordt vastgesteld. De aanvrager heeft door de analyse van vijf batches van het poedervormige product laten zien dat een consistente productie volgens de voorgestelde specificatie mogelijk is. Ook heeft men de stabiliteit van het product experimenteel bevestigd. Hoewel er minder analytische gegevens zijn verstrekt, die specifiek betrekking hebben op het vloeibare concentraat, geeft dit geen aanleiding tot onzekerheid over kwaliteit of stabiliteit van die vorm van het product.

Het productieproces is duidelijk beschreven in het dossier. Daarbij is nadrukkelijk aandacht besteed aan het gebruik van het genetisch gemodificeerde micro-organisme als proceshulpstof, waarvoor afwezigheid in het eindproduct een voorwaarde is. Voor endotoxines heeft de aanvrager een grenswaarde in de specificatie opgenomen, omdat het gezien de aard van het productieproces een potentiële verontreiniging betreft. Aan de hand van de EFSA-richtlijn voor de risicobeoordeling van genetisch gemodificeerde micro-organismen heeft de aanvrager daarnaast een onderbouwing gegeven van de veiligheid van het productieorganisme. Door de toegepaste processtappen kan een gunstige microbiologische kwaliteit worden bereikt, die wordt beheerst door een aantal parameters die zijn vastgelegd in de productspecificatie. Bovendien blijft specifieke wetgeving voor de microbiologische veiligheid van (opvolg-)zuigelingenvoeding van toepassing op alle toekomstige producten waaraan het 2'-FL als ingrediënt zal zijn toegevoegd.

Het beoogde gebruik van het nieuwe voedingsmiddel betreft de toevoeging van 2 g/l 2'-FL aan (opvolg-)zuigelingenvoeding, een gehalte dat volgens de literatuur slechts iets lager is dan het gemiddelde gehalte dat van nature aanwezig is in moedermelk. Daarom zijn ook geen belangrijke nutritionele effecten te verwachten van de beoogde toevoeging.

Onderzoek dat is uitgevoerd met het 2'-FL preparaat van de aanvrager toont aan dat het preparaat niet genotoxisch is. Ook werden bij ratten geen nadelige effecten waargenomen van consumptie van voer met 10% (w/w) 2'-FL gedurende 90 dagen in een toxicologisch onderzoek. In een ander toxicologisch onderzoek werden pasgeboren biggen gedurende drie weken gevoerd met een melkvervanger met maximaal 2 g/l 2'-FL. Daarbij werden geen ongewenste effecten op de gezondheid en ontwikkeling waargenomen. Wel trad bij een aantal dieren waterige ontlasting op, hetgeen kan worden gezien als een algemeen voorkomend effect bij consumptie van slecht verteerbare koolhydraten. In het dossier wordt ook experimenteel onderzoek beschreven met andere preparaten van 2'-FL. Hoewel verschillende preparaten verschillende verontreinigingen zullen bevatten, kan zulk onderzoek wel worden beschouwd als verdere bevestiging van de veiligheid van het hoofdbestanddeel, het oligosacharide 2'-FL. Het 2'-FL preparaat kan lactose bevatten. Dit zal worden vermeld op het etiket van eindproducten met toegevoegd 2'-FL, ter bescherming van consumenten met lactose-overgevoeligheid. Er is geen aanleiding om allergene eigenschappen te veronderstellen voor andere bestanddelen van het 2'-FL preparaat.

De commissie VNV concludeert dat de aanvraag een goed gekarakteriseerd preparaat van 2'-FL betreft, met een hoge zuiverheid. De voornaamste verontreinigingen bestaan uit een aantal bekende andere koolhydraten. Het 2'-FL zelf is chemisch identiek aan 2'-FL dat als endogeen bestanddeel voorkomt in moedermelk van de meeste vrouwen, en het doel van de aanvraag is om vergelijkbare gehalten 2'-FL in (opvolg-)zuigelingenvoeding te bereiken. Het uitgevoerde toxicologische onderzoek volstaat volgens de commissie VNV om eventuele ongewenste effecten uit te sluiten van sporen van onbekende verontreinigingen. Volgens de commissie VNV heeft de aanvrager voldoende onderbouwd dat het 2'-FL veilig kan worden gebruikt voor de in het dossier beschreven toepassing als ingrediënt van (opvolg-)zuigelingenvoeding. De commissie VNV wijst er op dat toevoeging van fructo- en galacto-oligosachariden (FOS/GOS) aan (opvolg-)zuigelingenvoeding al is toegestaan, en dat een ongewenst additioneel effect van een gecombineerde toevoeging van 2'-FL en GOS/FOS op basis van de beschikbare gegevens niet kan worden uitgesloten.

1 Inleiding

Het Bureau Nieuwe Voedingsmiddelen (BNV) van het Agentschap voor het College ter Beoordeling van Geneesmiddelen (CBG) adviseert het ministerie van VWS over de veiligheid van nieuwe voedingsmiddelen. Deze advisering is onderdeel van de Europese toelatingsprocedure voor nieuwe voedingsmiddelen, die is vastgelegd in EU verordening 258/97 (EU97). Dit rapport is het verslag van een zogenoemde eerste beoordeling volgens deze procedure. De tekst van het rapport is opgesteld door het Bureau Nieuwe Voedingsmiddelen, in nauwe samenspraak met de Commissie Veiligheidsbeoordeling Nieuwe Voedingsmiddelen (commissie VNV).

Op 4 augustus 2014 ontving het BNV het veiligheidsdossier voor het product 2'-fucosyllactose (Jen14). De aanvrager verstreekte in dezelfde maand een eerste aanvulling op het dossier (Jen14a). In maart 2015 volgde een tweede aanvulling (Jen15), in antwoord op formele vragen van de commissie VNV uit februari 2015. Interactie tussen de aanvrager en BNV leidde er toe dat die aanvullende informatie werd vervangen door een reeks opeenvolgende, aangepaste versies, tot de uiteindelijke versie in augustus 2015 (Jen15a). Gedurende de periode tussen september 2014 en december 2015 besprak de commissie VNV het dossier in een aantal vergaderingen. Dit rapport is het verslag van haar bevindingen, en werd vastgesteld via een schriftelijke consultatie in april 2016.

2 Volledigheid en juistheid van het dossier

2.1 Administratieve gegevens

De aanvrager is de firma Jennewein Biotechnologie GmbH (Maarweg 32, Rheinbreitbach, Duitsland). Het dossier is opgesteld door de firma Analyze & Realize GmbH, Waldseeweg 6, Berlijn, Duitsland).

2.2 Algemene beschrijving van het voedingsmiddel

De aanvraag betreft het oligosacharide 2'-fucosyllactose (2'-FL). Deze stof komt in de natuur voor als een endogeen bestanddeel van moedermelk. Het dossier beschrijft de productie van 2'-FL door een genetisch gemodificeerde stam van de bacterie *Escherichia coli*. De stof wordt door deze bacterie uitgescheiden en wordt vervolgens opgezuiverd uit het cultuurmedium. Daarbij wordt een concentraat van 2'-FL gevormd als eindproduct. Door sproeidrogen van dit concentraat kan 2'-FL in poedervorm als tweede eindproduct worden gemaakt. De aanvrager heeft een afzonderlijke specificatie opgesteld voor beide vormen van het product. De aanvraag betreft de toepassing van dit 2'-fucosyllactose in zuigelingenvoeding en opvolgzuigelingenvoeding.

2.3 Classificatie van het voedingsmiddel voor beoordeling

De aanvrager betoogt in het dossier en in aanvullende informatie dat dit product niet hoeft te worden beoordeeld volgens de Europese wetgeving voor genetisch gemodificeerde organismen (ggo's). De reden hiervoor is dat het productieorganisme kan worden beschouwd als een proceshulpstof, zodat een beoordeling van het eindproduct als nieuw voedingsmiddel aangewezen is. Volgens de aanvrager kan het product worden ingedeeld in klasse 6 (volgens een nieuw procedé geproduceerde voedingsmiddelen) uit de aanbeveling 97/618 van de Europese Commissie (EC97a). Een indeling in klasse 5 (genetisch gemodificeerde micro-organismen en producten daarvan) lijkt misschien toepasselijker, maar deze klasse was oorspronkelijk gebaseerd op een indeling van producten in categorie a of b in Verordening 258/97, en die categorieën zijn verdwenen bij de introductie van afzonderlijke wetgeving voor genetisch gemodificeerde levensmiddelen en diervoeders (EC03). De aanvrager heeft er daarom voor gekozen om specifieke aspecten die samenhangen met de genetische modificatie te behandelen in een bijlage bij het dossier. De commissie VNV vindt die aanpak acceptabel.

2.4 Informatievergaring over het voedingsmiddel

De informatie die essentieel is voor de beoordeling van de veiligheid van consumptie van het voedingsmiddel in klasse 6 is gespecificeerd aan de hand van de onderstaande thema's die zijn voorgeschreven in Aanbeveling 97/618 van de Europese Commissie (EC97a):

- I Specificatie van het nieuwe voedingsmiddel
- II Effecten van het gevolgde productie procedé op het voedingsmiddel

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

De aanvrager bespreekt in het dossier de bovenstaande thema's uit de Europese aanbeveling. Aan thema III is in het dossier geen apart hoofdstuk gewijd, maar het dossier als geheel bevat ook over dit onderwerp voldoende informatie.

2.5 Beknopt overzicht door de aanvrager

Het dossier bevat een samenvatting die aan de andere EU lidstaten is toegezonden, zoals is vereist volgens Verordening (EG) nr. 258/97 (EC97). Deze samenvatting is ook als bijlage bij dit rapport gevoegd.

2.6 Overige beoordelingen

In de Verenigde Staten heeft de aanvrager een dossier ingediend bij de Food and Drug Administration (FDA) voor een zogenoemde GRAS-notificatie (Generally Recognized As Safe). In het kader van de Europese wetgeving voor nieuwe voedingsmiddelen is ook een aanvraag ingediend voor de autorisatie van een ander preparaat van 2'-FL, dat afkomstig is van chemische synthese. De Europese Autoriteit voor Voedselveiligheid heeft een aanvullende beoordeling uitgevoerd van de veiligheid van dat product (EFSA15). Ook voor dit chemisch synthetische 2'-FL is een dossier ingediend voor een GRAS-notificatie in de Verenigde Staten.

2.7 Etiketteringsvoorstel van de aanvrager

De aanvrager heeft aangegeven de mogelijke aanwezigheid van lactose in het product zal worden aangegeven op het etiket, in overeenstemming met de Europese Verordening 1169/2011 (Jen14a; EC11). Daarnaast wordt artikel 8 van Verordening (EG) nr. 258/97 (EC97) doorgaans zo toegepast, dat tenminste de aanwezigheid van het nieuwe voedingsmiddel op het etiket wordt vermeld. In Nederland wordt de etikettering van voedingsmiddelen overigens niet beoordeeld door het Bureau Nieuwe Voedingsmiddelen, maar door het Regulier Overleg Warenwet.

3 Interpretatie en evaluatie van de voorgelegde gegevens

3.1 I Specificatie van het nieuwe voedingsmiddel

De aanvrager geeft in het dossier een uitgebreide algemene beschrijving van de stof 2'-fucosyllactose (2'-FL), een oligosacharide dat bestaat uit drie suikereenheden. Moedermelk bevat een aantal endogene oligosachariden, waarvan 2'-FL de meest voorkomende is. In koemelk en daarvan afgeleide (opvolg-)zuigelingenvoeding komt dit oligosacharide echter niet voor. Het 2'-FL uit deze aanvraag wordt geproduceerd door zuivering uit het kweekmedium van een genetisch gemodificeerde bacteriestam. Het product is bedoeld voor toevoeging aan (opvolg-)zuigelingenvoeding.

Het dossier bevat afzonderlijke specificaties voor twee verschillende eindproducten, namelijk een vloeibaar concentraat van 2'-FL en een poeder dat ontstaat door sproeidrogen van dit concentraat. Het product in poedervorm bestaat vrijwel geheel uit koolhydraten. Daarvan bedraagt het gehalte 2'-FL tenminste 90%. Daarnaast kunnen enkele andere geïdentificeerde koolhydraten voorkomen, namelijk lactose, 3-fucosyllactose, difucosyllactose, fucosylgalactose, glucose, galactose en fucose. De specificatie omvat grenswaarden voor het gehalte aan water, eiwit en as. Ook zijn grenswaarden opgenomen voor de zware metalen arseen, cadmium, lood en kwik. Als microbiologische parameters zijn grenswaarden opgenomen voor het standaard kiemgetal, gisten en schimmels, Coliformen/*Enterobacteriaceae*, *Salmonella* spp., en *Cronobacter sakazaki* (de juiste benaming is *Cronobacter* spp.). Tenslotte zijn ook grenswaarden opgenomen voor de mogelijke verontreinigingen endotoxines en Aflatoxine M1. De specificatie voor het 2'-FL concentraat vermeldt het watergehalte niet, maar volgens de tekst van het dossier zou het gehalte 2'-FL in het concentraat 45% bedragen.

Voor de identificatie van 2'-FL als hoofdbestanddeel van het product heeft de aanvrager een groot aantal analyses uitgevoerd. Daarbij werd het product in poedervorm gebruikt. De structuur van het 2'-FL werd bevestigd op basis van ¹³C- en ¹H-NMR spectroscopie. Bovendien werd een drietal NMR-technieken toegepast voor een identificatie op basis van een vergelijking van vier productbatches met een commercieel verkrijgbaar preparaat van 2'-FL, geïsoleerd uit moedermelk. Ook de chromatografische techniek LC-MS/MS werd gebruikt om vijf batches van het 2'-FL van de aanvrager te vergelijken met het commerciële referentie-preparaat, waarbij overeenkomstige resultaten werden gevonden. Verder werd de chromatografische techniek HPAEC-PAD gebruikt om aan te tonen dat de retentietijd van 2'-FL overeenkomt met de referentiestof, en dat geringe hoeveelheden van andere koolhydraten in het 2'-FL preparaat voorkomen. Op basis van de retentietijden kan dit de stoffen 3-fucosyllactose, difucosyllactose, fucosylgalactose, lactose, fucose en galactose betreffen, die volgens de aanvrager ook aanwezig zijn in moedermelk. De aanwezigheid van 3-fucosyllactose, difucosyllactose en fucosylgalactose (naast 2'-FL) werd bevestigd door LC-MS/MS analyse. HPAEC-PAD chromatogrammen worden gebruikt om gehalten voor 2'-FL en andere suikers te kwantificeren, waarbij het bepalen van de AUC-waarde (*Area Under the Curve*) volgens de aanvrager volstaat. Tenslotte komt ook de specifieke optische rotatie van het product overeen met die van de referentiestof en met de literatuurwaarde hiervoor.

In het dossier worden gegevens gepresenteerd van analyses volgens de volledige productspecificatie voor vijf onafhankelijke batches 2'-FL in poedervorm. Voor vijf batches

van het 2'-FL concentraat werd een deel van de parameters uit de productspecificatie onderzocht (afzonderlijke koolhydraten, as, eiwit, en zware metalen). Alle gevonden waarden lagen binnen de specificaties. Voor twee van de batches van het 2'-FL concentraat werd ook een microbiologische analyse uitgevoerd, waarbij meer parameters werden getest dan in de productspecificatie zijn opgenomen.

Het in het dossier beschreven productieproces maakt het aannemelijk dat het productieorganisme afwezig zal zijn in het eindproduct. Die aanneme wordt bevestigd door de microbiologische analyses van meerdere productbatches. Om ook de afwezigheid van het DNA van het productieorganisme te bevestigen werd in de vijf batches 2'-FL in poedervorm met een qPCR-methode gezocht naar vijf antibioticumresistentiegenen uit deze bacteriestam. Deze genen werden volgens de aanvrager niet gedetecteerd. In antwoord op een vraag van de commissie VNV over de gebruikte detectiemethode berekende de aanvrager dat de gevoeligheid daarvan, afhankelijk van het specifieke antibioticumresistentiegen, varieerde van 38 kopieën tot 1 kopie in een monster van 4 mg van het 2'-FL preparaat (Jen15a).

De aanvrager beschrijft in het dossier en in de aanvullende informatie (Jen15a) onderzoek naar de stabiliteit van 2'-FL in poedervorm en als concentraat. Twee batches 2'-FL in poedervorm werden bewaard onder standaardomstandigheden (een temperatuur van 25°C en 60% luchtvochtigheid). Materiaal uit dezelfde twee batches werd daarnaast bewaard bij een temperatuur van 40°C en 75% luchtvochtigheid om te zien of van een versnelde afbraak sprake zou zijn. Op verschillende tijdstippen werd het gehalte 2'-FL bepaald via een HPLC-methode. In beide gevallen was er geen afname te zien in het gehalte 2'-FL gedurende de onderzochte tijdsperiode (104 weken onder standaardomstandigheden, en 26 weken bij hogere temperatuur en luchtvochtigheid). In de aanvullende informatie verstrekt de aanvrager ook voorlopige gegevens uit een stabiliteitsonderzoek onder standaardomstandigheden (een temperatuur van 25°C en 60% luchtvochtigheid) voor drie batches van het 2'-FL concentraat, met een geplande looptijd van 104 weken. Daaruit blijkt dat het gehalte 2'-FL in deze batches ongeveer 34% bedraagt, en niet 45%, zoals in de algemene beschrijving van het concentraat in het dossier wordt genoemd. Dit gehalte verandert niet noemenswaardig gedurende een periode van 52 weken. Er is geen informatie verstrekt over de stabiliteit van het 2'-FL in samengestelde eindproducten.

De commissie VNV constateert dat het 2'-FL preparaat door de aanvrager grondig is geanalyseerd. Het preparaat bevat enkele procenten water, en bestaat verder vrijwel uitsluitend uit 2'-FL en geringe hoeveelheden andere suikers. Die samenstelling is vastgelegd in de productspecificatie, naast eisen voor de identificatie van 2'-FL en voor de afwezigheid van het productieorganisme, en grenswaarden voor as, residueel eiwit, en de mogelijke verontreinigingen endotoxines (LPS) en Aflatoxine M1. Daarmee is het product volgens de commissie VNV voldoende gespecificeerd. Wel wijst de commissie erop dat de gebruikte qPCR-detectiemethode is gebaseerd op de aanwezigheid van antibioticumresistentiegenen, en niet van DNA-sequenties die uniek zijn voor dit bepaalde genetisch gemodificeerde productieorganisme. Daardoor kan een relatief hoge gevoeligheid worden bereikt, maar kan deze methode niet worden gebruikt om bij eventuele aanwezigheid van genetisch gemodificeerde micro-organismen in een product onomstotelijk vast te stellen of het al dan niet dit specifieke productieorganisme betreft. De analyse van vijf batches van het poedervormige product toont aan dat een consistente

productie volgens deze specificatie mogelijk is. Op basis van de resultaten van de batchanalyses heeft de commissie VNV gevraagd of de grenswaarden in de specificatie konden worden verlaagd voor eiwit, endotoxines, standaard kiemgetal en de zware metalen arseen, cadmium en kwik. In antwoord daarop heeft de aanvrager verklaard dat deze specificaties nog een voorlopig karakter hebben, omdat de productie nog zal worden opgeschaald. Volgens de commissie VNV is aangetoond dat 2'-FL in poedervorm zeer stabiel is. Er zijn minder analytische gegevens verstrekt voor batches van het 2'-FL concentraat dan voor het product in poedervorm. Ook is het onderzoek naar de stabiliteit van dit concentraat nog niet afgerond, maar de voorlopige gegevens geven geen aanleiding voor twijfel over de stabiliteit van deze vorm van het product.

3.2 II Effecten van het gevolgde productieprocedé op het voedingsmiddel

Het 2'-FL van deze aanvraag wordt geproduceerd door fermentatie, waarbij een genetisch gemodificeerde stam van de bacterie *E. coli* wordt gebruikt (de stam *E. coli* BL21 (DE3) #1540). Dit genetisch gemodificeerde micro-organisme (ggm) is in staat om lactose om te zetten in 2'-FL, en dat vervolgens uit te scheiden in het medium. Omdat het product op een zodanige wijze uit het fermentatiemedium wordt geïsoleerd dat het productieorganisme en het DNA daarvan niet meer voorkomen in het eindproduct, kan dit ggm worden beschouwd als een proceshulpstof (*processing aid*) volgens een rapport van de Europese Commissie over de implementatie van de wetgeving voor genetisch gemodificeerde levensmiddelen en diervoeders (EC06). In antwoord op een vraag van de commissie VNV heeft de aanvrager dit nader toegelicht (Jen15) In die reactie noemt de aanvrager een aantal voorbeelden van andere producten van genetisch gemodificeerde micro-organismen, die om vergelijkbare redenen niet als ggm zijn beoordeeld, maar onder een ander toelatingsregime. Dat geldt voor het als nieuw voedingsmiddel geautoriseerde product *Ice Structuring Protein*, en de als nieuw voedingsmiddel genotificeerde stof resveratrol, die beide worden geproduceerd met genetisch gemodificeerde bakkersgist (*Saccharomyces cerevisiae*), maar het geldt ook voor een aantal toegelaten voedseladditieven en voedingsenzymen.

In het dossier is schematisch weergegeven hoe de toepassing van een groot aantal zuiveringsstappen na de fermentatie leidt tot het eindproduct 2'-FL. Hierbij worden gebruikelijke technieken toegepast, en in het dossier wordt voor elke stap aangegeven wat het specifieke doel is. Zowel aan het begin als aan het einde van de zuivering wordt een steriele filtratie toegepast. Het eerste eindproduct is het 2'-FL concentraat, dat door sproeidrogen verder kan worden verwerkt tot het tweede eindproduct, het 2'-FL in poedervorm.

Volgens de commissie VNV is het productieprocedé voldoende beschreven, en geeft die beschrijving geen aanleiding tot bedenkingen.

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

Het dossier bevat een uitgebreide beschrijving van het productieorganisme *E. coli* BL21 (DE3) #1540. Volgens de aanvrager is deze bacterie door genetische modificatie afgeleid van de uitgangsstam *E. coli* BL21 (DE3). De laatstgenoemde stam zou veel worden

gebruikt als basis voor de productie van therapeutische eiwitten, maar niet eerder voor de productie van voedsel ingrediënten. Hoewel het productieorganisme niet als een ggo hoeft te worden beoordeeld, zoals in de vorige paragraaf is besproken, heeft de aanvrager een eigen veiligheidsbeoordeling van het productieorganisme uitgevoerd, die als bijlage bij het dossier is gevoegd. Daarin heeft de aanvrager gebruik gemaakt van de richtlijnen van EFSA voor de veiligheidsbeoordeling van genetisch gemodificeerde micro-organismen (EFSA11).

Volgens de commissie VNV zijn de richtlijnen van EFSA in grote lijnen gevolgd door de aanvrager, en is op dit punt voldoende informatie aangeleverd.

3.4 IX Verwachte opname en gebruiksfrequentie van het voedingsmiddel

De aanvrager beschrijft dat het 2'-FL zal worden toegepast als ingrediënt in zuigelingenvoeding en opvolgzuigelingenvoeding in zowel vloeibare vorm als in poedervorm. In alle gevallen zal het gehalte 2'-FL in het te consumeren product 2 g/l bedragen. Dit gehalte is gekozen om het gehalte 2'-FL in moedermelk te benaderen. In het dossier wordt ook een schatting gemaakt van de absolute hoeveelheid 2'-FL die dagelijks zal worden geconsumeerd. Afhankelijk van de leeftijd bedraagt dit maximaal 2 g 2'-FL per dag. De aanvrager merkt verder op dat de oligosachariden GOS en FOS volgens Europese wetgeving tot een gehalte van 8 g/l mogen worden toegevoegd aan (opvolg-)zuigelingenvoeding (EC06a).

De commissie VNV merkt op dat de innameschatting bij deze toepassing tamelijk eenvoudig is, omdat de voorgestane toevoeging aan (opvolg-)zuigelingenvoeding is gebaseerd op het nabootsen van de inname van 2'-FL uit moedermelk. Een berekening op basis van dit gehalte komt aan de orde bij de conclusies van paragraaf 3.8.

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

Hoewel het 2'-FL preparaat uit deze aanvraag niet eerder door de mens is geconsumeerd, maakt het hoofdbestanddeel hiervan (het oligosacharide 2'-FL zelf) deel uit van moedermelk. De aanvrager bespreekt in het dossier gegevens uit de wetenschappelijke literatuur, waaruit blijkt dat het voorkomen van verschillende oligosachariden in moedermelk kan variëren, afhankelijk van de genetische achtergrond van de moeder. Volgens de aangehaalde literatuur bevat moedermelk in veruit de meeste gevallen 2'-FL. Qua gehalte is het in die gevallen ook het meest voorkomende oligosacharide, met gemiddelde waarden van 2,38 g/l en 2,43 g/l volgens twee geciteerde bronnen. In colostrum kan het gehalte 2'-FL nog aanzienlijk hoger zijn. In koemelk komt 2'-FL daarentegen vrijwel niet voor.

Volgens de commissie VNV heeft de aanvrager het voorkomen van de stof 2'-FL als endogeen bestanddeel van moedermelk bij de meeste vrouwen voldoende onderbouwd. De aanvrager heeft het voorgestelde gebruiksgehalte gebaseerd op de genoemde gemiddelde gehalten van 2'-FL in moedermelk. Uit de achterliggende gegevens blijkt wel dat die gehalten aanzienlijk verschillen tussen individuele moeders, en afnemen in de loop van de periode dat borstvoeding wordt gegeven. Dit onderwerp is ook

al uitgebreid besproken in de aanvullende veiligheidsbeoordeling door EFSA van een eerder dossier voor synthetisch 2'-FL als nieuw voedingsmiddel (EFSA15).

3.6 XI Informatie over de voedingswaarde van het voedingsmiddel

De aanvrager vermeldt dat oligosachariden in moedermelk niet van substantieel belang zijn voor het energiemetabolisme van zuigelingen. Men noemt in het dossier slechts zeer beperkte literatuurgegevens over de verteerbaarheid van zulke oligosachariden in de darm. Men gaat er vanuit dat calorische waarde bij omzetting door de bacterieflora vergelijkbaar zal zijn met die voor de oligosachariden GOS en FOS (geschat op 8 kJ/g in een EFSA-advies uit 2010).

Volgens de commissie VNV is deze schatting erg ruw, maar zijn hoe dan ook geen belangrijke nutritionele effecten te verwachten van de voorgestelde toevoeging van 2'-FL aan (opvolg-)zuigelingenvoeding. Het gehalte 2'-FL zal immers vergelijkbaar zijn met moedermelk.

3.7 XII Microbiologische informatie over het voedingsmiddel

Zoals eerder is besproken, zijn in de productspecificatie voor 2'-FL een aantal parameters opgenomen voor het beheersen van de microbiologische kwaliteit. De analyse van een aantal productbatches toont aan dat het product binnen die specificaties kan worden geproduceerd.

Volgens de commissie VNV is daarmee de microbiologische kwaliteit van 2'-FL als ingrediënt voldoende gegarandeerd, ervan uitgaande dat hierin geen veranderingen optreden bij het opschalen van de productie. De commissie benadrukt echter dat er daarnaast in de EU ook specifieke microbiologische vereisten bestaan voor (opvolg-)zuigelingenvoeding, waarin 2'-FL als ingrediënt zal worden gebruikt (EC05). Anders dan in de productspecificatie voor 2'-FL, zijn daarbij niet alleen grenswaarden van belang, maar worden ook eisen gesteld aan het bemonsteringsschema, waardoor een hogere gevoeligheid wordt bereikt.

3.8 XIII Toxicologische informatie over het voedingsmiddel

De aanvrager benadrukt in het dossier dat er geen reden is voor bezorgdheid over de intrinsieke veiligheid van het oligosacharide 2'-FL, dat immers in vergelijkbare hoeveelheden voorkomt in moedermelk. Men richt de aandacht daarom vooral op eventuele verontreinigingen, die zouden kunnen voorkomen in het gezuiverde 2'-FL preparaat van deze aanvraag, inclusief mogelijke componenten uit het productieorganisme. Bij het opstellen van de productspecificatie en het analyseren van partijen 2'-FL is rekening gehouden met bekende mogelijke verontreinigingen, waaronder bacteriële endotoxines (LPS). In antwoord op een vraag van BNV heeft de aanvrager een nadere toelichting uit het oogpunt van veiligheid gegeven op de grenswaarde voor endotoxines die in de productspecificatie is opgenomen (Jen15a). Volgens de firma bestaan er geen vastgestelde limieten voor endotoxines in zuigelingenvoeding, maar is de eigen specificatie van ten hoogste 300 EU/g in 2'-FL als een interne kwaliteitsstandaard vastgesteld. Men stelt dat deze grenswaarde voldoende laag is als deze wordt vergeleken

met endotoxinegehalten in commerciële zuigelingenvoedingen. In de literatuur is een onderzoek beschreven aan 75 monsters van producten uit Zuid-Afrika, Nederland, Spanje, Zwitserland, de Verenigde Staten, België, Ierland, Slovenië en het Verenigd Koninkrijk, waarin het gehalte endotoxine varieerde tussen 40 EU/g en $5,5 \times 10^4$ EU/g (Tow07). Overigens werd in onderzochte batches 2'-FL van de aanvrager een veel lager endotoxinegehalte gevonden dan de specificatie toelaat, maar volgens de aanvrager is het niet nodig om de grenswaarde voor endotoxine in de specificatie verder te verlagen, en is dat op dit moment ook niet wenselijk, omdat men rekening wil houden met het verder opschalen van de productie van 2'-FL. In aanvulling op de beschikbare kennis over het hoofdbestanddeel 2'-FL, de zuiverheid van het product, en bekende mogelijke verontreinigingen is toxicologisch onderzoek uitgevoerd met het 2'-FL preparaat van de aanvrager.

Toxiciteit bij herhaalde orale blootstelling

In het dossier worden drie onderzoeken gepresenteerd naar de gevolgen van herhaalde blootstelling van proefdieren aan het 2'-FL van de aanvrager. In de eerste plaats wordt een verkennend onderzoek beschreven, waarbij het effect werd onderzocht van de consumptie van 2'-FL van de aanvrager (met een zuiverheid van 96%) door vrouwelijke ratten, gedurende zeven dagen. Vijf ratten kregen diervoeder met 10% 2'-FL te eten, en vijf ratten een controlevoeding. Geen van de dieren stierf of vertoonde klinische verschijnselen. Er werden geen verschillen waargenomen in lichaamsgewicht, voedselinname, of consistentie van de feces.

Hierna werd een toxicologisch onderzoek in ratten uitgevoerd waarbij 2'-FL (met een zuiverheid van 94,1%) gedurende 90 dagen bij dezelfde dosering van 10% via het voer werd toegediend aan tien mannelijke en tien vrouwelijke ratten. Het onderzoek werd uitgevoerd volgens OECD-richtlijn 408, maar met slechts één dosering. Er was geen sprake van voortijdige sterfte gedurende het onderzoek, en evenmin van klinische verschijnselen die met de blootstelling aan de teststof zouden samenhangen. Ook werden geen verschillen opgemerkt in gewicht, gewichtstoename of voedselinname tussen de testgroep en de controlegroep. Zeven van de tien mannelijke dieren en vier van de tien vrouwelijke dieren uit de testgroep hadden lichtgekleurde ontlasting gedurende perioden van maximaal 69 dagen vanaf de negende dag van het onderzoek, hetgeen verklaard werd als het gevolg van uitscheiding van onverteerde teststof. Eén mannetje uit de testgroep had zachte ontlasting gedurende 15 dagen vanaf dag 14 van het onderzoek, maar deze geïsoleerde observatie werd niet beschouwd als gerelateerd aan de teststof. Er werden geen aan de teststof gerelateerde verschillen beschreven bij onderzoek aan bloed, urine en beenmerg, bij de bepaling van orgaangewichten, of bij histopathologisch onderzoek. De inname van de teststof werd bepaald per week van het onderzoek, en varieerde tussen 11,54 en 5,25 g/kg bw/d voor de mannetjes (gemiddeld 7,66), en tussen 12,07 en 5,78 g/kg bw/d voor de vrouwtjes (gemiddeld 8,72). De aanvrager concludeert dat in de rat 7,66 g/kg bw/d een veilig niveau van inname is voor mannetjes, en 8,72 g/kg bw/d voor vrouwtjes.

De aanvrager beschrijft in het dossier ook een preklinisch onderzoek, waarbij 2'-FL (met een zuiverheid van 97,9%) gedurende drie weken werd gevoerd aan groepen pasgeboren biggen, als toevoeging aan een melkvervanger in gehalten van 0,22, 0,5, en 2 g/l. De hoogste onderzochte dosis komt overeen met het in het dossier voorgestelde

gebruiksniveau voor 2'-FL in zuigelingenvoeding. De controlegroep en de genoemde dosisgroepen bestonden ieder uit twaalf dieren, waarbij de verdeling in mannelijke/vrouwelijke dieren respectievelijk 6/6, 8/4, 7/5 en 6/6 was. De resultaten van dit (GLP) onderzoek zijn inmiddels ook gepubliceerd (Han15). Volgens de onderzoekers werden geen effecten van de toediening van 2'-FL waargenomen op groei en voedselconsumptie. Wel vertoonden een aantal dieren uit de testgroepen waterige ontlasting. Op dag 7 en dag 21 van het onderzoek werden bloedmonsters genomen voor hematologisch en klinisch chemisch onderzoek, en voor het bepalen van bloedstollingsparameters. Op dag 22 werden de dieren gedood en werd een urinemonster genomen. Orgaangewichten werden bepaald en er werd histopathologisch onderzoek uitgevoerd. De publicatie beschrijft een aantal waargenomen verschillen, maar die waren volgens de onderzoekers niet gerelateerd aan de blootstelling aan 2'-FL. Men concludeert daarom dat 2'-FL in concentraties tot 2 g/l goed werd verdragen door pasgeboren biggen, en geen ongewenste effecten had op de gezondheid en de ontwikkeling van deze dieren.

Genotoxiciteit

In het dossier zijn resultaten opgenomen van twee onderzoeken naar eventuele genotoxiciteit. Het eerste onderzoek is een Ames-test volgens OECD-richtlijn 471, waarbij als teststof 2'-FL van de aanvrager werd gebruikt, met een zuiverheid van 92,4% en een watergehalte van 4,4%. Bij dit onderzoek, in vijf stammen van de bacterie *Salmonella* Typhimurium, werden zes gehalten van de teststof gebruikt (van 31,6 tot 5000 µg per plaat), met en zonder metabole activatie met S9-homogenaat. In geen van de combinaties in dit onderzoek werd een toename gevonden van het aantal revertanten.

Daarnaast is een *in vivo* micronucleustest uitgevoerd volgens OECD-richtlijn 474. Daarvoor werd 2'-FL van de aanvrager (met een zuiverheid van 92,4%) eenmalig via gavage toegediend aan ratten bij een dosering van 500, 1000 of 2000 mg/kg bw. Na 24 uur, of na 48 uur voor een additionele groep voor de hoogste dosis, werden de dieren gedood, waarna het beenmerg microscopisch werd onderzocht. Daarbij werd geen toename waargenomen van de hoeveelheid micronucleï in polychromatische erythrocyten.

De Commissie VNV heeft gevraagd om deze informatie aan te vullen met resultaten van een *in vitro* micronucleustest. Dat is volgens de commissie VNV in overeenstemming met het advies van het Wetenschappelijk Comité van EFSA over de aanpak van onderzoek naar genotoxiciteit bij de veiligheidsbeoordeling van voedsel en diervoeders (EFSA11a). In antwoord hierop heeft de aanvrager in maart 2015 de resultaten overlegd van een *in vitro* micronucleustest met 2'-FL volgens OECD-richtlijn 487 (Jen15a). Gekweekte menselijke lymphocyten werden daarbij blootgesteld aan 2'-FL in concentraties van 500, 1000, 2000, en 5000 µg/ml medium gedurende 4 uur of 20 uur zonder metabole activatie, en gedurende 4 uur met metabole activatie met S9-homogenaat. Hierbij werd geen dosisafhankelijke toename van het relatieve aantal micronucleï waargenomen.

Informatie over 2'-FL uit andere bron

De aanvrager beschrijft in het dossier ook uitgebreid een gepubliceerd onderzoek naar de veiligheid van (synthetisch) 2'-FL van een andere fabrikant (Cou11). Dit 2'-FL preparaat was onderwerp van een afzonderlijke autorisatie-aanvraag als nieuw voedingsmiddel,

waarbij een aanvullende beoordeling door EFSA werd uitgevoerd (EFSA15). Het preparaat is inmiddels toegelaten in de EU (EC16). Dat synthetische 2'-FL heeft ook een hoge graad van zuiverheid, maar zal andere verontreinigingen bevatten door de volledig andere productiewijze. Ook betreft de aanvraag voor dat product meer toepassingen dan alleen (opvolg-)zuigelingenvoeding. Tenslotte heeft het oordeel van EFSA over de toepassing van 2'-FL in (opvolg-)zuigelingenvoeding betrekking op gebruik in combinatie met het andere oligosacharide LNnT. De beschikbare gegevens over het andere 2'-FL preparaat zijn daarom van beperkte waarde voor de veiligheidsbeoordeling van het 2'-FL uit de huidige aanvraag.

In het oorspronkelijke dossier was geen informatie opgenomen over klinisch onderzoek met 2'-FL, maar in de aanvullende informatie (Jen15a) verwijst de aanvrager naar een recente publicatie (Mar15). Die beschrijft onderzoek waarbij vier verschillende groepen zuigelingen werden gevoed met moedermelk, een zuigelingenvoeding met 2,4 g/l galacto-oligosachariden (GOS), en twee identieke zuigelingenvoedingen, waarbij deze hoeveelheid GOS deels werd vervangen door een ander (synthetisch) preparaat van 2'-FL (0,2 g/l of 1,0 g/l 2'-FL, in combinatie met GOS tot een totaal van 2,4 g/l). Voor zover het de drie groepen betreft die een kunstmatige voeding gebruikten, werden zuigelingen daarover willekeurig verdeeld. Bij kinderen in alle vier groepen werden gewicht, lichaamslengte en hoofdomvang bepaald tussen dag 5 en dag 119 na de geboorte. In totaal werden 304 zuigelingen gevolgd tot het einde van die periode. Er werden geen significante verschillen waargenomen tussen de groepen. De verschillende voedingen werden volgens de onderzoekers goed verdragen, en er werden geen significante verschillen in ongewenste effecten gevonden.

Allergeniciteit

In een aanvulling op het dossier bespreekt de aanvrager de mogelijke allergene eigenschappen van het product (Jen14a). Er is daarvoor geen specifiek experimenteel onderzoek uitgevoerd, en de aanvrager baseert zich alleen op de samenstelling van het product. Men stelt dat er slechts sporen van eiwit in het preparaat voorkomen. Volgens de specificatie zou het product maximaal 100 mg/kg eiwit bevatten, en bij batchanalyses bleek dit zelfs minder dan 10 mg/kg te zijn. Ook vermeldt men dat het product niet in aanraking komt met bekende voedselallergenen, waarvoor een etiketteringsverplichting bestaat. Wel kan lactose voorkomen in het eindproduct, volgens de specificatie tot maximaal 5% van de aanwezige koolhydraten. Bij de batchanalyses bleek dit nog aanzienlijk lager te liggen. Hoe dan ook is lactose een belangrijk bestanddeel in moedermelk en in zuigelingenvoeding, en zou lactose-intolerantie volgens de aanvrager zeer weinig voorkomen bij zuigelingen. Daarom acht men het zeer onwaarschijnlijk dat ongewenste effecten zouden optreden. De aanwezigheid van lactose zal worden vermeld op het etiket van eindproducten met toegevoegd 2'-FL.

Conclusies over de toxicologische informatie

De commissie VNV is van mening dat in het dossier en de aanvullende informatie voldoende toxicologische gegevens zijn verstrekt om de veiligheid te onderbouwen van het beoogde gebruik van 2'-FL van de aanvrager. Daarbij is van belang dat het product een goed gekarakteriseerd preparaat van 2'-FL is van een hoge zuiverheid, waarin de voornaamste verontreinigingen bestaan uit een aantal bekende andere koolhydraten.

Verder vormt het oligosacharide 2'-FL een endogeen bestanddeel van moedermelk van de meeste vrouwen, en is het doel van de aanvraag om vergelijkbare gehalten 2'-FL in (opvolg-)zuigelingenvoeding te bereiken.

Uit het beschreven experimentele onderzoek blijkt dat het 2'-FL preparaat van de aanvrager niet genotoxisch is. Verder werden bij een toxicologisch onderzoek in ratten gedurende 90 dagen geen nadelige effecten waargenomen van consumptie van voer dat 10% van het 2'-FL preparaat bevatte. De gemiddelde blootstelling aan 2'-FL gedurende dat experiment bedroeg 7,66 g/kg bw/d bij de mannetjes en 8,72 g/kg bw/d bij de vrouwtjes. Rekenend met één enkele standaardwaarde van 5 kg voor het lichaamsgewicht bij een kind in de leeftijd van 0-12 maanden leidde de aanvrager hieruit af dat er voor zuigelingen in verschillende leeftijdsgroepen een veiligheidsfactor van 19 tot 48 zou bestaan tussen deze (hoogste) onderzochte dosering en het beoogde gebruik door de mens. De commissie VNV vindt dit een nogal ruwe benadering. Als meer realistische waarden voor het lichaamsgewicht per leeftijdsgroep en geslacht worden gebruikt, blijkt dat andere waarden op te leveren voor de afzonderlijke groepen. Wel blijven die waarden binnen een vergelijkbaar bereik, en bedragen ze tenminste een factor 20. De commissie VNV ziet de resultaten van het toxicologische onderzoek vooral als een bevestiging van de afwezigheid van onbekende toxicologisch relevante verontreinigingen in het 2'-FL preparaat van de aanvrager. Bij het onderzoek in pasgeboren biggen merkt de commissie VNV op dat het optreden van waterige ontlasting bij een aantal dieren in elk van de testgroepen kan worden gezien als een algemeen voorkomend effect van toediening van slecht verteerbare koolhydraten. In dat verband wijst de commissie VNV er op dat het denkbaar is dat een gecombineerde toevoeging van hoge gehalten 2'-FL en andere slecht verteerbare koolhydraten, zoals fructo- en galacto-oligosachariden (FOS/GOS), tot ongewenste additionele effecten zou kunnen leiden. Dat is van belang omdat FOS/GOS volgens de Europese richtlijn 2006/141 al aan (opvolg-)zuigelingenvoeding kan worden toegevoegd tot een gehalte van 8 g/l. Een gecombineerde toevoeging van 2'-FL met GOS/FOS is daarom volgens de commissie VNV ongewenst, totdat de afwezigheid van een ongewenst additioneel effect door nader onderzoek is vastgesteld. Combinaties van GOS en 2'-FL werden weliswaar goed verdragen in een klinisch onderzoek, maar daarbij werden lagere gehalten gebruikt. Bovendien betrof dat onderzoek een ander preparaat van 2'-FL.

In het dossier wordt ook ander onderzoek aangehaald, waarbij sprake was van een ander 2'-FL preparaat. Zulk onderzoek kan worden beschouwd als een verdere bevestiging van de veiligheid van de stof 2'-FL zelf, maar heeft maar beperkte waarde voor de veiligheidsbeoordeling van het 2'-FL preparaat van de aanvrager.

Tenslotte meent de commissie VNV dat het vermelden van de mogelijke aanwezigheid van lactose op het etiket volstaat om eventuele overgevoeligheidsreacties te voorkomen. Er is geen aanleiding om allergene eigenschappen te veronderstellen voor andere bestanddelen van het 2'-FL preparaat.

Executive summary

The applicant, Jennewein Biotechnologie GmbH, has submitted a safety dossier on the use of the oligosaccharide 2'-fucosyllactose (2'-FL) as an ingredient for infant formulae and follow-on formulae. 2'-FL is an endogenous component of breast milk, and – in the majority of mothers – it is the main oligosaccharide in the milk. The purpose of the application is to add purified 2'-FL to formulae that do not contain this compound. To this end, this oligosaccharide is produced by using a genetically modified strain of the bacterium *Escherichia coli*. When grown under controlled conditions, this microorganism secretes 2'-FL into the culture medium, from which the product is then purified. The applicant has contended that the genetically modified production organism is used as a processing aid. Accordingly, the food safety of the final product must be assessed as a novel food.

The applicant has drawn up specifications for two forms of the product, a liquid concentrate of 2'-FL and a powdered product prepared by spray-drying this concentrate. The 2'-FL in powder form has a water content of up to 9%, and is composed almost entirely of carbohydrates. At least 90% of this is 2'-FL. All of the other carbohydrates present have also been identified. Limit values for these components are set out in the specification. That specification also includes limit values for ash and protein, for several possible contaminants (heavy metals, endotoxins, aflatoxin M1), and for various microbiological parameters. Details are also recorded of the method used to establish that none of the microorganism's DNA was present. By analysing five batches of the powdered product, the applicant has demonstrated that it is possible to achieve consistent production according to the proposed specification. The stability of the product has also been confirmed experimentally. Although fewer analytical data relating specifically to the liquid concentrate have been provided, this has not given rise to any uncertainty about the quality or stability of that form of the product.

The production process is clearly described in the dossier. In this connection, there is a specific focus on the use of the genetically modified microorganism as a processing aid, subject to the condition that no traces of this microorganism are present in the final product. Given the nature of the production process, the potential contaminants include endotoxins. The applicant has, therefore, included a limit value for these substances in the specification. Based on the EFSA guidelines for the risk assessment of genetically modified microorganisms, the applicant has substantiated the safety of the production organism. The process steps used make it possible to achieve a favourable microbiological quality. This quality is governed by various parameters, which are defined in the product specification. Moreover, specific legislation on the microbiological safety of infant formulae and follow-on formulae continues to apply to all future products to which 2'-FL will be added as an ingredient.

The intended use of the novel food involves the addition of 2 g/l 2'-FL to infant formulae and follow-on formulae, a concentration that (according to the literature) is only slightly lower than the average concentration naturally present in breast milk. The proposed addition of this substance is not, therefore, expected to have significant nutritional effects.

Research carried out with the applicant's 2'-FL preparation shows that the preparation is not genotoxic. Also, no adverse effects were observed in rats that, during

the course of a 90-day toxicology study, consumed feed containing 10% (w/w) of 2'-FL. In another toxicology study, newborn piglets were fed for three weeks on a milk replacer containing a maximum of 2 g/l 2'-FL. No adverse effects on their health and development were observed. However, a number of animals did develop watery stools, which may be a general effect of consuming poorly digestible carbohydrates. The dossier also describes experimental studies with other 2'-FL preparations. Although different preparations will contain different contaminants, such studies can be seen as further confirmation of the safety of the main component, the oligosaccharide 2'-FL. The 2'-FL preparation may contain lactose. This will be indicated on the label of final products with added 2'-FL, to protect consumers who have lactose intolerance. There is no reason to suppose that other components of the 2'-FL preparation will have allergenic properties.

The Committee on Safety Assessment of Novel Foods (VNV Committee) concludes that the application involves a well characterised 2'-FL preparation, of high purity. The main contaminants consist of various other, known, carbohydrates. The 2'-FL itself is chemically identical to the 2'-FL that is an endogenous component of breast milk in most women, and the purpose of the application is to achieve similar concentrations of 2'-FL in infant formulae and follow-on formulae. According to the VNV Committee, the toxicological research conducted was sufficiently well-designed to exclude possible adverse effects from traces of unidentified contaminants. According to the VNV Committee, the applicant has adequately demonstrated that 2'-FL can be safely used for the application as an ingredient in infant formulae and follow-on formulae, as described in the dossier. The VNV Committee notes that the addition of fructo-oligosaccharides and galacto-oligosaccharides (FOS/GOS) to infant formulae and follow-on formulae has already been authorised, and that – based on the available data – the possibility of an undesirable additional effect resulting from the combined addition of 2'-FL and GOS/FOS can not be excluded.

1 Introduction

The Novel Foods Unit (NFU) of the Medicines Evaluation Board Agency advises the Ministry of Health, Welfare and Sport regarding the safety of novel foods. This advice is given within the context of the European approval procedure for novel foods, which is set out in EU Regulation 258/97 (EU97). This document is the report of a so-called initial assessment, which was carried out in accordance with this procedure. The text of the report was drawn up by the Novel Foods Unit, in close consultation with the Committee on Safety Assessment of Novel Foods (VNV Committee).

On 4 August 2014, the NFU received the safety dossier for the product 2'-fucosyllactose (Jen14). That same month, the applicant provided an initial supplement to the dossier (Jen14a). A second supplement (Jen15) followed in March 2015, in response to formal questions posed by the VNV Committee in February 2015. As a result of the interactions between the applicant and the NFU, that additional information was replaced by a series of modified versions, leading to the final version in August 2015 (Jen15a). The VNV Committee discussed this dossier in a number of meetings, between September 2014 and December 2015. This document, the report of its findings, was adopted by written consultation in April 2016.

2 Completeness and accuracy of the dossier

2.1 Administrative data

The applicant is a German company, Jennewein Biotechnology GmbH (Maarweg 32, Rheinbreitbach, Germany). The dossier was drawn up by Analyze & Realize GmbH (Waldseeweg 6, Berlin, Germany).

2.2 General description of the food

The application concerns the oligosaccharide 2'-fucosyllactose (2'-FL). This substance occurs in nature as an endogenous component of breast milk. The dossier describes the production of 2'-FL, using a genetically modified strain of the bacterium *Escherichia coli*. The bacterium secretes this substance, which is then purified from the culture medium. This yields a 2'-FL concentrate as a final product. This concentrate can be spray dried to create 2'-FL in powder form, as a second final product. The applicant has drawn up separate specifications for both forms of the product. The application concerns the use of this 2'-fucosyllactose in infant formulae and follow-on formulae.

2.3 Classification of the food for assessment

Both in the dossier and in additional information, the applicant contends that this product does not need to be assessed in accordance with the European legislation on genetically modified organisms (GMOs). The reason for this is that the production organism can be seen as a processing aid. Accordingly, the final product must be assessed as a novel food. According to the applicant, the product can be classified as Class 6 (foods produced using a novel process) of European Commission Recommendation 97/618 (EC97a). While a Class 5 classification (genetically modified microorganisms and their products) might seem more appropriate, this class was originally based on a classification of products from categories a or b of Regulation 258/97. These categories disappeared following the introduction of separate legislation for genetically modified food and feed (EC03). The applicant has, therefore, opted to address specific aspects associated with the genetic modification in question in an annex to the dossier. The VNV Committee finds this approach to be acceptable.

2.4 Information on the food

The information necessary for assessment of the safety of the food for consumption, in Class 6, was specified based on the following themes, which are prescribed in European Commission Recommendation 97/618 (EC97a).

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

- XII Microbiological information on the food
- XIII Toxicological information on the food

In the dossier, the applicant discusses the above themes from the European recommendation. While the dossier does not devote a separate section to theme III, the dossier as a whole contains sufficient information on the subject.

2.5 Brief summary by the applicant

The dossier contains a summary, and this is sent to the other EU Member States, as required under Regulation (EC) no. 258/97 (EC97). This summary is also attached to this report as an annex.

2.6 Other assessments

In the United States, the applicant has submitted a dossier to the Food and Drug Administration (FDA) for a GRAS (Generally Recognized As Safe) notification. In the framework of European legislation on novel foods, an application has also been submitted for the authorisation of another 2'-FL preparation, derived from chemical synthesis. The European Food Safety Authority has carried out a further assessment of that product's safety (EFSA15). A dossier for a GRAS notification for this chemically synthesised 2'-FL has also been submitted in the United States.

2.7 Applicant's labelling proposal

The applicant has indicated that the possible presence of lactose in the product will be indicated on the label, in accordance with European Regulation 1169/2011 (Jen14a; EC11). In addition, Article 8 of Regulation (EC) No. 258/97 (EC97) is usually applied to the extent that at least the presence of a novel food is stated on the label. It should be noted that, in the Netherlands, the labelling of foodstuffs is not assessed by the Novel Foods Unit, but by the Regular Consultation on the Commodities Act.

3 Interpretation and evaluation of data submitted

3.1 I Specification of the novel food

In the dossier, the applicant provides a comprehensive general description of 2'-fucosyllactose (2'-FL), an oligosaccharide consisting of three sugar units. Of the various endogenous oligosaccharides contained in breast milk, 2'-FL is the most common. However, this oligosaccharide is not present in cow's milk, nor in the infant formulae and follow-on formulae derived from it. The 2'-FL in this application is produced by purification of the culture medium in which a genetically modified strain of bacteria is grown. The intention is that this product will be added to infant formulae and follow-on formulae.

The dossier contains separate specifications for two final products, a liquid concentrate of 2'-FL and a powder prepared by spray-drying this concentrate. The product in powder form consists almost entirely of carbohydrates. At least 90% of this is 2'-FL. It may also contain various other identified carbohydrates, such as lactose, 3-fucosyllactose, difucosyllactose, fucosylgalactose, glucose, galactose and fucose. The specification includes limit values for water, protein and ash contents. It also includes limit values for the heavy metals arsenic, cadmium, lead and mercury. Limit values have been included (as microbiological parameters) for the standard plate count, yeasts and moulds, Coliforms/*Enterobacteriaceae*, *Salmonella* spp. and *Cronobacter sakazaki* (the correct name is *Cronobacter* spp.). Finally, limit values have also been included for endotoxins and Aflatoxin M1, which are potential contaminants. The specification for the 2'-FL concentrate gives no details of its water content, but the wording of the dossier indicates that the concentrate is 45% 2'-FL.

To identify 2'-FL as the main constituent of the product, the applicant carried out a large number of tests. The powder form of the product was used for this purpose. The structure of the 2'-FL produced was confirmed using NMR spectroscopy (¹³C and ¹H). In addition, three NMR techniques were used in an identification process in which four batches of this product were compared with a commercially available 2'-FL preparation, isolated from breast milk. The LC-MS/MS chromatographic technique was also used to compare five batches of the applicant's 2'-FL with a commercial reference preparation. This produced similar results. The HPAEC-PAD chromatographic technique was also used to show that the 2'-FL's retention time corresponded to that of the reference substance, and that the 2'-FL preparation contains small amounts of other carbohydrates. Based on the retention times, these may be 3-fucosyllactose, difucosyllactose, fucosylgalactose, lactose, fucose and galactose, which, according to the applicant, are also present in breast milk. The presence of 3-fucosyllactose, difucosyllactose and fucosylgalactose (in addition to 2'-FL) was confirmed by LC-MS/MS analysis. HPAEC-PAD chromatograms are used to quantify levels of 2'-FL, and other sugars. This method involves a determination of the AUC (Area Under the Curve) which, according to the applicant, is adequate for this purpose. Finally, the product's specific optical rotation corresponds to that of the reference substance and to the corresponding value given in the literature.

The dossier presents test data, in accordance with the full product specification, for five independent batches of 2'-FL in powder form. For five batches of the 2'-FL concentrate, a subset of the product specification parameters (separate carbohydrates,

ash, protein, and heavy metals) were examined. All the values found were within the specifications. Two of the batches of 2'-FL concentrate were also subjected to microbiological tests, in which more parameters were tested than are included in the product specification.

The production process described in the dossier shows that, in all likelihood, the production organism will not be present in the final product. This assumption is confirmed by subjecting several product batches to microbiological testing. In order to confirm that none of the production organism's DNA was present in the five batches of 2'-FL in powder form, a qPCR method was used to search for five antibiotic resistance genes that are known to exist in this bacterial strain. According to the applicant, these genes were not detected. In response to a question from the VNV Committee regarding the detection method used, the applicant calculated that, depending on the specific antibiotic resistance genes involved, its sensitivity ranged from 1 to 38 copies in a 4 mg sample of the 2'-FL preparation (Jen15a).

In the dossier and the additional information (Jen15a), the applicant gives details of studies into the stability of 2'-FL in powder form and as a concentrate. Two batches of 2'-FL in powder form were stored under standard conditions (a temperature of 25°C and 60% humidity). In addition, material from the same two batches was stored at a temperature of 40°C and at 75% humidity, to see whether this resulted in accelerated breakdown. At various intervals, the 2'-FL content was determined using an HPLC method. In both cases, there was no visible decrease in 2'-FL content during the test period (104 weeks under standard conditions, and 26 weeks at higher temperature and humidity). In the additional information, the applicant also provides preliminary data from a stability study conducted under standard conditions (at a temperature of 25°C and at 60% humidity) for three batches of 2'-FL concentrate, with a planned duration of 104 weeks. It shows that the 2'-FL concentration in these batches is about 34%, and not 45% as stated in the dossier's general description of the concentrate. This concentration does not change significantly over a period of 52 weeks. No information was provided concerning the stability of the 2'-FL in composite final products.

The VNV Committee notes that the 2'-FL preparation has been thoroughly tested by the applicant. The preparation contains a little water (a few percent), and is composed almost entirely of 2'-FL, plus limited amounts of other sugars. That composition is defined in the product specification, in addition to requirements concerning the identification of 2'-FL and the absence of the production organism, as well as limit values for ash, for residual protein, and for the potential contaminants endotoxin (LPS) and aflatoxin M1. For this reason, the VNV Committee feels that the product is adequately specified. However, the Committee points out that the qPCR detection method used is based on the presence of antibiotic resistance genes, rather than on DNA sequences that are unique to this particular genetically modified production organism. This makes it possible to achieve a relatively high degree of sensitivity, but where genetically modified micro-organisms are present in a product, this method can not be used to conclusively determine whether or not this specific production organism is present. By analysing five batches of the powdered product, the applicant has demonstrated that it is possible to achieve consistent production according to this specification. Based on the results of batch tests, the VNV Committee asked whether the specification's limit values for protein, endotoxins, standard plate count, and the heavy metals arsenic, cadmium and mercury could be lowered. In

response, the applicant stated that these specifications are still of a provisional nature, as production still has to be scaled up. According to the VNV Committee, 2'-FL in powder form has been shown to be very stable. Less analytical data was provided for batches of the 2'-FL concentrate than for the product in powder form. Nor have tests of this concentrate's stability been completed yet. However, the preliminary data give no reason to doubt the stability of this form of the product.

3.2 II Effects of the production process applied to the food

The 2'-FL that is the subject of this application is produced by fermentation, involving a genetically modified strain of the bacterium *E. coli* (strain: *E. coli* BL21 (DE3) # 1540). This genetically modified micro-organism (GMM) is able to convert lactose to 2'-FL, which it then secretes into the culture medium. The product is isolated from the fermentation medium in such a way that the final product is entirely free of the production organism and its DNA. As a result, this GMM can be considered to be a processing aid, according to a report by the European Commission on the implementation of the legislation on genetically modified food and feed (EC06). In response to a question from the VNV Committee, the applicant explained this aspect in greater detail (Jen15). In that response, the applicant cites a number of examples of other products of genetically modified microorganisms, which – for similar reasons – are assessed under a different licensing regime, and not as GGMs. That applies to Ice Structuring Protein, which has been authorised as a novel food product, and to resveratrol, which has been notified as a novel food. Both are produced using genetically modified baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*), but it also applies to a number of authorised food additives and food enzymes.

The dossier contains diagrams showing how fermentation is followed by a large number of purification steps to obtain 2'-FL, the final product. This involves the use of conventional techniques, and the dossier gives details of the specific purpose for each step. Sterile filtration is used both at the beginning and at the end of the purification process. The first final product is the 2'-FL concentrate, which can be further processed by spray drying to create the second final product, 2'-FL in powder form.

According to the VNV Committee, the production process is adequately described, and that description does not give rise to any concerns.

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

The dossier contains a detailed description of the production organism, *E. coli* BL21 (DE3) # 1540. According to the applicant, this bacterium was derived by genetic modification of the starting strain: *E. coli* BL21 (DE3). The latter strain, it is stated, is widely used as a basis for the production of therapeutic proteins, but has not previously been used for the production of food ingredients. As discussed in the previous section, the production organism does not need to be assessed as a GMO. Nevertheless, the applicant has carried out its own safety assessment of the production organism, which is attached to the dossier as an annex. In that annex, the applicant has followed the EFSA guidelines on conducting safety assessments of genetically modified microorganisms (EFSA11).

According to the VNV Committee, the applicant has broadly followed the EFSA guidelines, and has provided sufficient information on this point.

3.4 IX Anticipated intake and extent of use of the food

The applicant states that the 2'-FL will be used as an ingredient in infant formulae and follow-on formulae, in liquid form or in powder form. In all cases, the concentration of 2'-FL in the product will be 2 g/l. This concentration was selected to approach the concentration of 2'-FL in breast milk. The dossier includes an estimate of the absolute quantity of 2'-FL that will be consumed daily. Depending on age, this amounts to a maximum of 2 g of 2'-FL per day. The applicant further notes that, under European law, GOS and FOS oligosaccharides may be added to infant formulae and follow-on formulae to a concentration of 8 g/l (EC06a).

The VNV Committee notes that, in this application, it is a fairly simple matter to estimate the intake, as the proposed addition to infant formulae and follow-on formulae is based on mimicking the intake of 2'-FL from breast milk. A calculation based on this concentration appears in the conclusions to section 3.8.

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

Although the 2'-FL preparation that is the subject of this application has not been previously consumed by humans, its main component (the oligosaccharide 2'-FL itself) is found in breast milk. In the dossier, the applicant discusses data from the scientific literature showing that the occurrence of several oligosaccharides in breast milk can vary, depending on the mother's genetic background. In the vast majority of cases, according to the literature cited, breast milk contains 2'-FL. In terms of concentration, in those cases it is also the most abundant oligosaccharide, with mean values of 2.38 g/l and 2.43 g/l, according to two cited sources. The concentration of 2'-FL in colostrum can be considerably higher. In cow's milk, however, 2'-FL is almost entirely absent.

According to the VNV Committee, the applicant has adequately demonstrated that 2'-FL is present, as an endogenous component, in most women's breast milk. The applicant has based the proposed use level on the above-mentioned mean concentrations of 2'-FL in breast milk. The underlying data indicates that these concentrations vary considerably between individual mothers, and that they decrease during the period of breastfeeding. This topic has already been extensively discussed in the EFSA's further safety assessment of an earlier dossier for synthetic 2'-FL as a novel food (EFSA15).

3.6 XI Nutritional information on the food

The applicant states that oligosaccharides in breast milk are not of substantial importance to the energy metabolism of infants. The dossier provides only a very limited number of references concerning these oligosaccharides' digestibility in the intestine. The assumption is that the caloric value involved in conversion by the bacterial flora will be comparable to that of the oligosaccharides GOS and FOS (which a 2010 EFSA opinion estimated at 8 kJ/g).

According to the VNV Committee, this is a very crude estimate. Nevertheless, the proposed addition of 2'-FL to infant formulae and follow-on formulae is not expected to have a significant nutritional impact. The 2'-FL concentration will, after all, be similar to the level in breast milk.

3.7 XII Microbiological information on the food

As discussed previously, the 2'-FL product specification includes a number of parameters for the purpose of controlling microbiological quality. Tests conducted on a number of product batches revealed that the product can be produced to specification.

According to the VNV Committee, this provides an adequate guarantee of the microbiological quality of 2'-FL as an ingredient, assuming that no changes will result from the scaling up of production. The Committee emphasises, however, that the EU also has specific microbiological requirements for infant formulae and follow-on formulae in which 2'-FL is to be used as an ingredient (EC05). This differs from the product specification for 2'-FL in that it is not only limit values that are important. Requirements are also imposed on the sampling plan, as a result of which a higher degree of sensitivity is achieved.

3.8 XIII Toxicological information on the food

In the dossier, the applicant stresses that there is no reason for concern with regard to the intrinsic safety of the oligosaccharide 2'-FL, which, after all, occurs in similar quantities in breast milk. Accordingly, the main focus is on the potential contaminants (including components of the production organism) that could occur in the purified 2'-FL preparation that is the subject of this application. When drawing up the product specification and when testing batches of 2'-FL, known potential contaminants, including bacterial endotoxins (LPS), were taken into account. In response to a question from the NFU, and with a view to safety issues, the applicant provided further details concerning the limit value for endotoxins cited in the product specification (Jen15a). According to the company, there are no established limits for endotoxins in infant formula. However, their own specification of no more than 300 Endotoxin Units (EU)/g in 2'-FL has been adopted as an internal standard. The applicant contends that this limit value is sufficiently low when compared to endotoxin levels in commercial infant formulas. The literature describes a study in which 75 product samples from South Africa, the Netherlands, Spain, Switzerland, the United States, Belgium, Ireland, Slovenia and the United Kingdom were tested. These tests revealed endotoxin concentrations ranging from 40 EU/g to 5.5×10^4 EU/g (Tow07). Tested batches of the applicant's 2'-FL were found to have much lower endotoxin concentrations than stated in the specification. According to the applicant, however, it is not necessary to further reduce the limit value for endotoxin in the specification nor, indeed, is this desirable at the moment, since they want to allow for the further scaling up of 2'-FL production. In addition to current knowledge about the main component (2'-FL), about the purity of the product, and about known potential contaminants, the applicant's 2'-FL preparation has been subjected to toxicological tests.

Toxicity following repeated oral exposure

The dossier gives details of three experimental animal studies into the effects of repeated exposure to the applicant's 2'-FL. Firstly, it describes a seven-day exploratory study in female rats, into the effects of consuming the applicant's 2'-FL (at a purity of 96%). Five rats were given animal feed containing 10% 2'-FL, and another five rats were given a control diet. None of the animals died or exhibited any clinical signs. No differences were observed in body weight or food intake, or in the consistency of the faeces.

This was followed by a toxicological study in rats, in which 2'-FL (at a purity of 94.1%) at the same dose of 10% was administered to ten male rats and ten female rats for 90 days, via the feed. The study was performed according to OECD guideline 408, but only a single dose was used. There were no cases of premature death during the study, nor were there any clinical signs that might be associated with exposure to the test substance. Nor were any differences found in weight, weight gain or food intake between the experimental group and the control group. Seven of the ten male animals and four of the ten female animals from the experimental test group had light coloured stools for periods of up to 69 days, starting from the ninth day of the study. The explanation given was that this resulted from the elimination of undigested test substance. A single male from the test group had soft stools for a period of 15 days, starting on day 14 of the study. However, this isolated observation was not considered to be related to the test substance. No differences related to the test substance were described in tests of blood, urine and bone marrow, in measurements of organ weights, or in histopathological examinations. Test substance intake was determined in each week of the study. It ranged from 11.54 to 5.25 g/kg bw/d for the males (mean 7.66), and from 12.07 to 5.78 g/kg bw/d for the females (average 8.72). The applicant concludes that, in rats, 7.66 g/kg bw/day is a safe level of intake for males, while 8.72 g/kg bw/d is the corresponding intake for females.

In the dossier, the applicant also describes a pre-clinical study, in which 2'-FL (at a purity of 97.9%) was fed to groups of new-born piglets for a period of three weeks, by adding it to a milk replacer, at concentrations of 0.22 g/l, 0.5 g/l, and 2 g/l. The highest dose tested corresponds to the use level for 2'-FL in infant formula proposed in the dossier. The control group and the above-mentioned dosage groups consisted of twelve animals each, and featured male/female gender distributions of 6/6, 8/4, 7/5 and 6/6 respectively. The results of this GLP study have now been published (Han15). According to the researchers, no effects on growth and food consumption were observed following the administration of 2'-FL. However, a number of animals in the test groups did produce watery stools. On days 7 and 21 of the study, blood samples were taken for haematology testing and clinical chemistry testing, and for the determination of blood coagulation parameters. On day 22, the animals were sacrificed and urine samples were taken. Organ weights were determined, and histopathological examinations were carried out. The publication describes a number of observed differences but, according to the researchers, these were not related to exposure to 2'-FL. It was, therefore, concluded that, in concentrations of up to 2 g/l, 2'-FL was well tolerated by newborn piglets, and had no adverse effects on their health and development.

Genotoxicity

The dossier contained the results of two studies into possible genotoxicity. The first study was an Ames test conducted in accordance with OECD guideline 471. The test substance was the applicant's 2'-FL, at a purity of 92.4% and with a water content of 4.4%. This study involved five strains of the bacterium *Salmonella* Typhimurium. Six concentrations of the test substance were used (ranging from 31.6 µg to 5000 µg per plate), with and without metabolic activation using S9 homogenate. In none of the combinations used in this study was an increase in the number of revertants found.

In addition, an *in vivo* micronucleus test was carried out in accordance with OECD guideline 474. To this end, single doses (of 500, 1000 or 2000 mg/kg bw) of the applicant's 2'-FL (at a purity of 92.4%) were administered to rats. The animals were sacrificed after 24 hours (or after 48 hours for an additional group at the highest dose). Bone marrow samples were then taken and examined under a microscope. Here, no increase was observed in the numbers of micronuclei in polychromatic erythrocytes.

The VNV Committee has asked the applicant to supplement this information with the results of an *in vitro* micronucleus test. According to the VNV Committee, this is in compliance with the opinion of EFSA's Scientific Committee regarding the methods of genotoxicity testing used when assessing the safety of food and feed (EFSA11a). In March 2015, the applicant responded by submitting the results of an *in vitro* micronucleus test of 2'-FL, carried out in accordance with OECD guideline 487 (Jen15a). In this test, cultured human lymphocytes were exposed to 2'-FL at concentrations of 500, 1000, 2000, and 5000 µg/ml of medium for 4 hours or 20 hours without metabolic activation, and for 4 hours with metabolic activation (using S9 homogenate). No dose-dependent increase in the relative number of micronuclei was observed.

Information about 2'-FL from another source

The applicant has included in the dossier extensive details of a published study into the safety of synthetic 2'-FL from another manufacturer (Cou11). This 2'-FL preparation was the subject of a separate authorisation request as a novel food, for which the EFSA carried out an additional assessment (EFSA15). The preparation has since been authorised in the EU (EC16). That synthetic 2'-FL also has a high degree of purity, but it will contain other contaminants as the production method used is completely different. The application for that product also involves more applications than infant formulae and follow-on formulae alone. Finally, the EFSA's opinion regarding the application of 2'-FL in infant formulae and follow-on formulae relates to its use in combination with lacto-N-neotetraose (LNnT), another oligosaccharide. Accordingly, the available data on the other 2'-FL preparation is of limited value to the safety assessment of the 2'-FL that is the subject of the current application.

The original dossier contained no information on clinical trials involving 2'-FL, but in the additional information (Jen15a) the applicant refers to a recent publication (Mar15). That describes a study in which four different groups of infants were fed breast milk, an infant formula containing 2.4 g/l of galacto-oligosaccharides (GOS), and two identical infant formulas, in which this quantity of GOS was partly replaced by a different (synthetic) preparation of 2'-FL (0.2 g/l or 1.0 g/l 2'-FL, in combination with GOS up to a total of 2.4 g/l). The infants in the three artificial diet groups were randomly distributed between these

groups. The weight, body length, and head circumference of children in all four groups were measured between days 5 and 119 after birth. A total of 304 infants were monitored until the end of that period. No significant differences were observed between the groups. According to the researchers, the various formulae were well tolerated, and no significant differences in adverse effects were found.

Allergenicity

In a supplement to the dossier, the applicant discusses the product's potential allergenic properties (Jen14a). No specific experimental study has been carried out; the applicant relies purely on the composition of the product. The applicant suggests that the preparation only contains traces of protein. According to the specification, the product contains no more than 100 mg/kg of protein. Batch tests showed that this was, in fact, even less than 10 mg/kg. The applicant also reports that the product does not come into contact with known food allergens, for which a labelling obligation applies. Lactose may occur in the final product, however. According to the specification, it can account for as much as 5% of the carbohydrates present. The batch tests showed that the actual concentration was substantially lower than this. Whatever the case, lactose is a major component of breast milk and infant formula. Moreover, according to the applicant, lactose intolerance is very rare among infants. For this reason, the occurrence of adverse effects is considered to be highly unlikely. The presence of lactose will be indicated on the label of final products with added 2'-FL.

Conclusions about the toxicological information

The VNV Committee considers that the quantity of toxicological data provided in the dossier and in the additional information adequately demonstrates the safety of the intended use of the applicant's 2'-FL. It should be considered that the product is a well-characterised preparation of 2'-FL, of high purity, in which the main contaminants consist of various other, known, carbohydrates. Moreover, the oligosaccharide 2'-FL is an endogenous component of most women's breast milk, and the purpose of the application is to achieve similar concentrations of 2'-FL in infant formulae and follow-on formulae.

The experimental research described above shows that the applicant's 2'-FL preparation is not genotoxic. Also, no adverse effects were observed in rats that, during the course of a 90-day toxicology study, consumed feed containing 10% of the 2'-FL preparation. The average exposure to 2'-FL during that experiment was 7.66 g/kg bw/d in males and 8.72 g/kg bw/d in females. For the purposes of calculation, the applicant used a single standard body weight of 5 kg for a child aged 0-12 months. Based on this, the applicant concludes that there is a safety factor of 19 to 48 for infants in different age groups between the highest dose tested and the intended use by humans. The VNV Committee feels that this is a rather crude estimate. When more realistic values are used for body weight per age and gender, this generates different values for the individual groups. Nevertheless, these values remain within a similar range, and they amount to a factor of at least 20. The VNV Committee sees the results of toxicological testing mainly as a confirmation that no unknown contaminants of toxicological concern are present in the applicant's 2'-FL preparation. With regard to the study in newborn piglets, the VNV Committee notes that the incidence of watery stools in a number of animals in each of the test groups can be seen as a general effect of the administration of poorly digestible

carbohydrates. In that regard, the VNV Committee notes that it is conceivable that the combined addition of high concentrations of 2'-FL and other poorly digestible carbohydrates, such as fructo-oligosaccharides and galacto-oligosaccharides (FOS/GOS), could lead to undesirable additional effects. This is important because, according to European Directive 2006/141, FOS/GOS may be added to infant formulae and follow-on formulae up to a concentration of 8 g/l. Thus, according to the VNV Committee, the combined addition of 2'-FL and FOS/GOS is undesirable, until such time as further research has established that it has no undesirable cumulative effects. While combinations of GOS and 2'-FL were, admittedly, well tolerated in a clinical trial, the concentrations used in that case were lower. Moreover, that study involved a different preparation of 2'-FL.

The dossier also cites other studies, which involved a different 2'-FL preparation. While studies of this kind can be seen as further confirmation of the safety of 2'-FL itself, they have only limited value in terms of the safety assessment of the applicant's 2'-FL preparation.

Finally, the VNV Committee believes that indicating the possible presence of lactose, on the label, is enough to prevent any intolerance reactions. There is no reason to suppose that other components of the 2'-FL preparation will have allergenic properties.

Literatuur / Literature

- Cou14 Coulet, M., Phothirath, P., Constable, A., Allais, L. & Schilter, B. 2014. Pre-clinical safety evaluation of the synthetic human milk, nature-identical, oligosaccharide 2'-O-Fucosyllactose (2'FL). Regul. Toxicol. Pharmacol., 68, 59-69.
- EC97 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.
(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)
- EC97a 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. Publicatieblad van de Europese Gemeenschappen 1997; L253: 1-36
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.)
- EC03 Verordening (EG) nr. 1829/2003 van het Europees Parlement en de Raad van 22 september 2003 inzake genetisch gemodificeerde levensmiddelen en diervoeders
(Regulation (EC) No 1829/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003 on genetically modified food and feed.)
- EC05 2073/2005. Verordening (EG) nr. 2073/2005 van de Commissie van 15 november 2005 inzake microbiologische criteria voor levensmiddelen.
(Commission Regulation (EC) No 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs)
- EC06 Commission of the European Communities. (2006). Report from the Commission to the Council and the European Parliament on the implementation of Regulation (EC) No 1829/2003 of the European Parliament and of the Council on genetically modified food and feed. COM (2006) 626 final.
- EC06a Richtlijn 2006/141/EG van de Commissie van 22 december 2006 inzake volledige zuigelingenvoeding en opvolgzuigelingenvoeding en tot wijziging van Richtlijn 1999/21/EG
(Commission Directive 2006/141/EC of 22 December 2006 on infant formulae and follow-on formulae and amending Directive 1999/21/EC)
- EC11 Regulation (EU) No 1169/2011 of the European Parliament and of the Council of 25 October 2011 on the provision of food information to consumers, amending Regulations (EC) No 1924/2006 and (EC) No 1925/2006 of the European Parliament and of the Council, and repealing Commission Directive 87/250/EEC, Council Directive 90/496/EEC, Commission Directive 1999/10/EC, Directive 2000/13/EC of

- the European Parliament and of the Council, Commission Directives 2002/67/EC and 2008/5/EC and Commission Regulation (EC) No 608/2004
(Verordening (EU) nr. 1169/2011 van het Europees Parlement en de Raad van 25 oktober 2011 betreffende de verstrekking van voedselinformatie aan consumenten, tot wijziging van Verordeningen (EG) nr. 1924/2006 en (EG) nr. 1925/2006 van het Europees Parlement en de Raad en tot intrekking van Richtlijn 87/250/EEG van de Commissie, Richtlijn 90/496/EEG van de Raad, Richtlijn 1999/10/EG van de Commissie, Richtlijn 2000/13/EG van het Europees Parlement en de Raad, Richtlijnen 2002/67/EG en 2008/5/EG van de Commissie, en Verordening (EG) nr. 608/2004 van de Commissie.)
- EC16 Uitvoeringsbesluit (EU) 2016/376 van de Commissie van 11 maart 2016 tot verlening van een vergunning voor het in de handel brengen van 2'-O-fucosyllactose als nieuw voedselingrediënt krachtens Verordening (EG) nr. 258/97 van het Europees Parlement en de Raad
(Commission Implementing Decision (EU) 2016/376 of 11 March 2016 authorising the placing on the market of 2'-O-fucosyllactose as a novel food ingredient under Regulation (EC) No 258/97 of the European Parliament and of the Council)
- EFSA11 EFSA Panel on Genetically Modified Organisms (GMO). Guidance on the risk assessment of genetically modified microorganisms and their products intended for food and feed use. EFSA Journal 2011;9(6):2193.
- EFSA11a EFSA Scientific Committee; Scientific Opinion on genotoxicity testing strategies applicable to food and feed safety assessment. EFSA Journal 2011;9(9):2379.
- EFSA15 EFSA NDA Panel (EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies), 2015. Scientific opinion on the safety of 2'-O-fucosyllactose as a novel food ingredient pursuant to Regulation (EC) No 258/97. EFSA Journal 2015;13(7):4184, 32 pp. doi:10.2903/j.efsa.2015.4184.
- Jen14 Application for the pre-market approval of the human milk oligosaccharide 2'-fucosyllactose, manufactured by fermentation using a metabolically engineered strain of *Escherichia coli* BL21 (DE3). Date: August 2, 2014.
- Jen14a Jennewein Biotechnologie GmbH. Amendment 1 to the application for the pre-market approval of the human milk oligosaccharide 2'-fucosyllactose, manufactured by fermentation using a metabolically engineered strain of *Escherichia coli* BL21 (DE3). Date: August 7, 2014
- Jen15 Jennewein Biotechnologie GmbH. Additional information concerning the application for the pre-market approval of the human milk oligosaccharide 2'-fucosyllactose, manufactured by fermentation using a metabolically engineered strain of *Escherichia coli* BL21 (DE3) and application extension: use for all age groups other than infants. Date: March 2, 2015.
- Jen15a Jennewein Biotechnologie GmbH. Additional information (final) concerning the application for the pre-market approval of the human milk oligosaccharide 2'-fucosyllactose, manufactured by fermentation using a metabolically engineered strain of *Escherichia coli* BL21 (DE3) and application extension: use for all age groups other than infants. Date: August 17, 2015.
- Han14 Hanlon PR, Thorsrud BA. A 3-week pre-clinical study of 2'-fucosyllactose in farm piglets. Food Chem Toxicol. 2014 Dec;74:343-8.

- Mar15 Marriage BJ, Buck RH, Goehring KC, Oliver JS, Williams JA. Infants Fed a Lower Calorie Formula With 2'FL Show Growth and 2'FL Uptake Like Breast-Fed Infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2015 Dec;61(6):649-58.
- Tow07 Townsend, S., Caubilla Barron, J., Loc-Carrillo, C., & Forsythe, S. (2007). The presence of endotoxin in powdered infant formula milk and the influence of endotoxin and *Enterobacter sakazakii* on bacterial translocation in the infant rat. *Food Microbiol*, 24(1), 67-74.

De commissie / The Committee

- 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. 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
MDL-arts (gepensioneerd); UMC St Radboud, Nijmegen
gastroenteroloog (retired); 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. Vioria Alebesque, *adviseur / advisor*
Ministerie van VWS, Den Haag
Ministry of Health, Welfare and Sport, The Hague
- Prof. dr. R.A. Woutersen
hoogleraar translationele toxicologie / toxicologisch patholoog; TNO Kwaliteit van
Leven, Zeist
professor translational toxicology / toxicologic pathologist; TNO Quality of Life, Zeist
- Prof. dr. ir. M.H. Zwietering
Hoogleraar levensmiddelenmicrobiologie; Wageningen Universiteit en
Researchcentrum
professor food microbiology; Wageningen University and Research Centre

Bureau Nieuwe Voedingsmiddelen, CBG/ Novel Foods Unit, MEB

- W. Buitenhuis, M.Sc., *regulatory project officer NFU*
- 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*