



## **AVIS**

### **de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail**

**relatif à la demande d'autorisation d'emploi d'une xylanase issue d'une souche de *Trichoderma longibrachiatum* porteuse d'un gène muté codant une xylanase de *Thermopolyspora flexuosa* (synonyme antérieur *Nonomuraea flexuosa*) en biscuiterie, viennoiserie, pâtisserie, biscotterie, panification courante (à l'exception du pain de tradition française) et panification spéciale**

---

*L'Anses met en œuvre une expertise scientifique indépendante et pluraliste.*

*L'Anses contribue principalement à assurer la sécurité sanitaire dans les domaines de l'environnement, du travail et de l'alimentation et à évaluer les risques sanitaires qu'ils peuvent comporter.*

*Elle contribue également à assurer d'une part la protection de la santé et du bien-être des animaux et de la santé des végétaux et d'autre part l'évaluation des propriétés nutritionnelles des aliments.*

*Elle fournit aux autorités compétentes toutes les informations sur ces risques ainsi que l'expertise et l'appui scientifique technique nécessaires à l'élaboration des dispositions législatives et réglementaires et à la mise en œuvre des mesures de gestion du risque (article L. 1313-1 du code de la santé publique).*

*Ses avis sont rendus publics.*

---

#### **1. RAPPEL DE LA SAISINE**

L'Agence nationale de la sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (Anses) a été saisie le 13 septembre 2011 par la Direction Générale de la Concurrence, de la Consommation et de la Répression des Fraudes (DGCCRF) d'une demande d'avis relatif à la demande d'autorisation d'emploi d'une xylanase issue d'une souche de *Trichoderma longibrachiatum* porteuse d'un gène muté codant une xylanase de *Thermopolyspora flexuosa* (synonyme antérieur *Nonomuraea flexuosa*) en biscuiterie, viennoiserie, pâtisserie, biscotterie, panification courante (à l'exception du pain de tradition française) et panification spéciale.

#### **2. CONTEXTE ET OBJET DE LA SAISINE**

Ce dossier entre dans le cadre du décret du 10 mai 2011<sup>1</sup> fixant les conditions d'autorisation et d'utilisation des auxiliaires technologiques pouvant être employés dans la fabrication des

---

<sup>1</sup> Décret n° 2011-529 du 10 mai 2011 fixant les conditions d'autorisation et d'utilisation des auxiliaires technologiques pouvant être employés dans la fabrication des denrées destinées à l'alimentation humaine

denrées destinées à l'alimentation humaine. Selon l'article 1 de l'arrêté du 7 mars 2011<sup>2</sup>, il doit être établi selon le guide<sup>3</sup> de l'EFSA pour la soumission d'un dossier sur les enzymes alimentaires.

Suite à l'expertise d'un dossier de demande d'autorisation d'emploi d'une xylanase issue d'une souche de *Trichoderma longibrachiatum* porteuse d'un gène muté codant une xylanase de *Thermopolyspora flexuosa* (synonyme antérieur *Nonomuraea flexuosa*) en biscuiterie, viennoiserie, pâtisserie, biscotterie, panification courante (à l'exception du pain de tradition française) et panification spéciale, l'Anses a rendu un avis défavorable le 17 novembre 2010 en raison de données insuffisantes ou d'imprécisions du dossier.

Le 19 septembre 2011, une suite de dossier portée par le pétitionnaire a été transmise à l'Anses par la DGCCRF.

### 3. ORGANISATION DE L'EXPERTISE

L'expertise a été réalisée dans le respect de la norme NF X 50-110 « Qualité en expertise – Prescriptions générales de compétence pour une expertise (Mai 2003) ».

L'expertise collective a été réalisée par le Comité d'experts spécialisé (CES) « Biotechnologie », réuni les 20 octobre et 17 novembre 2011.

### 4. ANALYSE ET CONCLUSION DU CES

#### 4.1 Identité de l'enzyme alimentaire

##### 4.1.1 Activité enzymatique principale

L'enzyme est une endo-1,4- $\beta$  xylanase thermorésistante (E.C. 3.2.1.8 ; CAS 9025-57-4). Elle hydrolyse les liaisons 1,4- $\beta$ -D-xylosidiques à l'intérieur des chaînes de xylanes et d'arabinoxylanes libérant ainsi des sucres réducteurs.

Les éléments de réponse apportés sous forme de références bibliographiques sont insuffisants pour prouver l'identité de l'enzyme principale [preuve sur le clivage de la protéine de fusion par le micro-séquençage de l'extrémité N terminale de l'enzyme, objet de la demande, et données sur les modifications post-traductionnelles de la protéine (glycosylation)].

##### 4.1.2 Activités enzymatiques secondaires

La préparation enzymatique contient des activités xylanases endogènes à la souche hôte *Trichoderma longibrachiatum* à faible niveau. D'autres activités enzymatiques secondaires mineures (cellulase et  $\beta$ -glucanase) sont présentes en raison de la nature de l'organisme de production.

<sup>2</sup> Arrêté du 7 mars 2011 relatif aux lignes directrices pour la constitution des dossiers de demande d'autorisation d'emploi d'auxiliaires technologiques en alimentation humaine

<sup>3</sup> Guidance of EFSA prepared by the Scientific Panel of Food Contact Material, Enzymes, Flavourings and Processing Aids on the Submission of a Dossier on Food Enzymes. *The EFSA Journal* (2009) 1305, 1-26

## **4.2 Organisme de production et procédé de fabrication**

### 4.2.1 Organisme de production

La souche de production de la préparation enzymatique est la souche de *Trichoderma longibrachiatum* génétiquement modifiée CBS 114044.

La généalogie de la souche de production est présentée de façon trop sommaire dans les réponses. Les différentes étapes doivent être détaillées.

L'utilisation de la nomenclature taxonomique la plus récente des micro-organismes est souhaitée comme l'indique le guide de l'EFSA<sup>3</sup> et l'avis de l'Anses du 30 juin 2010 (saisine 2010-SA-0091). L'organisme donneur du transgène doit donc être nommé *Thermopolyspora flexuosa*<sup>4</sup>, le synonyme antérieur *Nonomuraea flexuosa* peut être cité entre parenthèses pour rappel.

L'absence d'ADN exogène autre que la cassette d'expression du transgène doit être confirmée par des hybridations de type Southern blot.

### 4.2.2 Procédé de production

Des éléments de réponse sont apportés mais il convient de les compléter par la composition du milieu de culture dans le fermenteur ainsi que par les données de sécurité de l'agent antimousse utilisé dans une étape de purification de la préparation enzymatique.

Les deux bulletins d'analyse microbiologique des anaérobies sulfito-réducteurs et de *Staphylococcus aureus* doivent être fournis.

## **4.3 Exposition alimentaire**

Le résultat du calcul de la marge de sécurité d'emploi de la préparation enzymatique présenté par le pétitionnaire est erroné. Un nouveau calcul de marge de sécurité pour la population des adultes et des enfants devrait être présenté.

## **4.4 Allergénicité**

Une recherche bioinformatique ne met pas en évidence de potentiel allergique de l'activité enzymatique principale. Toutefois, il conviendrait de discuter l'immunogénicité de la protéine glycosylée.

## **4.5 Conclusion du CES**

Le Comité d'experts spécialisé « Biotechnologie » estime que l'absence de risque sanitaire pour le consommateur lié à l'emploi d'une xylanase issue d'une souche de *Trichoderma longibrachiatum* (CBS 114044) porteuse d'un gène muté codant une xylanase de *Thermopolyspora flexuosa* en biscuiterie, viennoiserie, pâtisserie, biscotterie, panification courante (à l'exception du pain de tradition française) et panification spéciale ne peut être garantie dans les conditions d'emploi présentées par le pétitionnaire, en raison de données insuffisantes ou d'imprécisions sur les points suivants :

- Présentation des caractéristiques précises de l'enzyme recombinante et micro-séquençage de l'extrémité N terminale de la protéine recombinante clivée,
- Obtention et généalogie de la souche de *Trichoderma longibrachiatum* hôte,
- Preuve de l'absence d'ADN exogène autre que la cassette d'expression du transgène dans la souche de production,

---

<sup>4</sup> Reclassification of *Nonomuraea flexuosa* (Meyer 1989) Zhang *et al.* 1998 as *Thermopolyspora flexuosa* gen. nov., comb. nov., nom. rev. (Goodfellow *et al.*, 2005)

- Composition du milieu de culture utilisé dans la production de la préparation enzymatique et des données sur la sécurité de l'anti-mousse utilisé dans une étape de la purification,
- Fourniture de deux bulletins d'analyses des critères de pureté biologique,
- Calcul d'une marge de sécurité d'emploi de la préparation enzymatique prenant en compte l'ensemble des denrées alimentaires revendiquées pour une population adulte et d'enfants,
- Documentation du potentiel allergique concernant la protéine sous forme glycosylée.

## 5. CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS DE L'AGENCE

L'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (Anses) estime que l'absence de risque sanitaire pour le consommateur lié à l'emploi d'une xylanase issue d'une souche de *Trichoderma longibrachiatum* (CBS 114044) porteuse d'un gène muté codant une xylanase de *Thermopolyspora flexuosa* en biscuiterie, viennoiserie, pâtisserie, biscotterie, panification courante (à l'exception du pain de tradition française) et panification spéciale ne peut être garantie dans les conditions d'emploi présentées par le pétitionnaire, en raison de données insuffisantes ou d'imprécisions sur les points suivants :

- Présentation des caractéristiques précises de l'enzyme recombinante et micro-séquençage de l'extrémité N terminale de la protéine recombinante clivée,
- Obtention et généalogie de la souche de *Trichoderma longibrachiatum* hôte,
- Preuve de l'absence d'ADN exogène autre que la cassette d'expression du transgène dans la souche de production,
- Composition du milieu de culture utilisé dans la production de la préparation enzymatique et des données sur la sécurité de l'anti-mousse utilisé dans une étape de la purification,
- Fourniture de deux bulletins d'analyses des critères de pureté biologique,
- Calcul d'une marge de sécurité d'emploi de la préparation enzymatique prenant en compte l'ensemble des denrées alimentaires revendiquées pour une population adulte et d'enfants,
- Documentation du potentiel allergique concernant la protéine sous forme glycosylée.

L'Anses rend donc un avis défavorable à cette demande.

**Le directeur général**

**Marc MORTUREUX**

## MOTS-CLES

Auxiliaire technologique, enzyme, xylanase, *Trichoderma longibrachiatum*, *Thermopolyspora flexuosa*, *Nonomuraea flexuosa*, biscuiterie, viennoiserie, pâtisserie, biscotterie, panification, panification spéciale