

Le directeur général

Maisons-Alfort, le 21 février 2019

AVIS

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

**relatif à une demande d'autorisation d'emploi d'une bêta-galactosidase
issue d'une souche d'*Aspergillus oryzae* non génétiquement modifiée
pour la production de galacto-oligosaccharides (GOS)**

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 à 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 publiés sur son site internet.

L'Anses a été saisie le 22 octobre 2018 par la Direction Générale de la Concurrence, de la Consommation et de la Répression des Fraudes (DGCCRF) pour la réalisation de l'expertise suivante : Demande d'avis relatif à une demande d'autorisation d'emploi d'une bêta-galactosidase issue d'une souche d'*Aspergillus oryzae* non génétiquement modifiée pour la production de galacto-oligosaccharides (GOS).

1. CONTEXTE ET OBJET DE LA SAISINE

Ce dossier entre dans le cadre du décret du 10 mai 2011¹ fixant les conditions d'autorisation et d'utilisation des auxiliaires technologiques pouvant être employés dans la fabrication des denrées destinées à l'alimentation humaine. Selon l'article 1 de l'arrêté du 7 mars 2011², le dossier doit être établi selon le guide³ de l'Autorité européenne de sécurité des aliments/European Food Safety Authority (EFSA) pour la soumission d'un dossier sur les enzymes alimentaires.

¹ Décret n° 2011-509 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.

² 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.

³ 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.

2. 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 menée par le GT « Biotechnologie » les 7 décembre 2018 et 17 janvier 2019, sur la base de rapports initiaux rédigés par huit rapporteurs.

L'Anses analyse les liens d'intérêts déclarés par les experts avant leur nomination et tout au long des travaux, afin d'éviter les risques de conflits d'intérêts au regard des points traités dans le cadre de l'expertise.

Les déclarations d'intérêts des experts sont publiées sur le site internet de l'Anses (www.anses.fr).

3. ANALYSE ET CONCLUSIONS DU GT

3.1 Identité de l'enzyme alimentaire⁴

L'enzyme alimentaire est une bêta-D-galactoside galactohydrolase (ou bêta-galactosidase, E.C. 3.2.1.23). Les bêta-galactosidases appartiennent à la famille des glycosidases (enzymes hydrolysant les liaisons O- et S-glycosyles).

La bêta-galactosidase hydrolyse les liaisons bêta-1,4 dans le lactose en une molécule d'alpha-D-glucose et une molécule de bêta-D-galactose. En présence de concentrations élevées en substrat, l'enzyme présente également une activité de transgalactosylation. Elle catalyse alors la synthèse d'une famille d'oligosaccharides dénommés galacto-oligosides ou galacto-oligosaccharides (GOS) par ajout d'un ou plusieurs résidus D-galactosyle sur le galactose du lactose.

Une unité de l'activité hydrolase de la bêta-galactosidase est définie comme la quantité d'enzyme nécessaire pour libérer à partir d'o-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside, 1 µg d'o-nitrophénol par minute, à 37 °C et à pH 4,5.

Les solides organiques totaux (TOS⁵) sont calculés selon la formule TOS = 100 % - humidité - cendres - diluants. La formulation finale de la bêta-galactosidase se présente sous forme poudre avec une activité hydrolase minimale garantie de 12000 U/g et un TOS moyen de 11 % (p/p).

Le pétitionnaire présente les méthodes d'analyse utilisées pour la recherche de l'activité hydrolase de la bêta-galactosidase mais pas de l'activité de transgalactosylation qui est l'activité enzymatique revendiquée. La caractérisation de l'enzyme alimentaire doit être complétée par les mesures de l'activité de transgalactosylation et des activités enzymatiques secondaires avec la présentation des méthodes analytiques utilisées.

Le résultat de la recherche d'une activité antibactérienne est négatif dans l'enzyme alimentaire. Les critères de pureté chimique et biologique de l'enzyme alimentaire présents dans le dossier

⁴ Définition dans le Règlement (CE) 1332/2008 du parlement européen et du Conseil du 16 décembre 2008 : *produit obtenu à partir de plantes, d'animaux ou de micro-organismes ou de produits dérivés, y compris un produit obtenu par un procédé de fermentation à l'aide de micro-organismes qui contient une ou plusieurs enzymes capables de catalyser une réaction biochimique spécifique et qui est ajouté à des denrées alimentaires à des fins technologiques à toute étape de leur fabrication, transformation, préparation, traitement, conditionnement, transport ou entreposage.*

⁵ Total Organic Solids

répondent aux exigences de l'arrêté du 19 octobre 2006 modifié⁶. Toutefois, l'arrêté du 19 octobre 2006 modifié exige également les critères suivants qui n'ont pas été fournis :

- pas plus de 0,5 mg/kg pour le cadmium,
- pas plus de 0,5 mg/kg pour le mercure,
- moins de 30 germes d'anaérobies sulfito-réducteurs dans 1 g d'enzyme alimentaire,
- absence de cellules de *Staphylococcus aureus* dans 1 g d'enzyme alimentaire.

Les principales mycotoxines connues ont été recherchées et non détectées par les différentes méthodes analytiques utilisées et jugées recevables. Il serait nécessaire de compléter ces recherches par celles des mycotoxines potentiellement produites par *Aspergillus oryzae* (acides kojique, cyclopiazonique et 3 nitro propionique).

Le pétitionnaire indique que les filtrations et micro-filtration réalisées lors de la production de l'enzyme alimentaire permettent d'éliminer les formes mycéliennes et sporulées de la souche de production. La recherche de la souche de production dans différents lots d'enzyme alimentaire qui permettrait de vérifier cette déclaration n'a toutefois pas été réalisée.

3.2 Organisme de production et procédé de fabrication

3.2.1 Organisme de production

Le pétitionnaire indique que la souche de production de l'enzyme alimentaire serait une souche d'*Aspergillus oryzae* non génétiquement modifiée, obtenue par une série de mutations conventionnelles. En raison de l'existence d'espèces productrices de mycotoxines, proches d'*Aspergillus oryzae*, il est nécessaire de confirmer l'identité de la souche de production GL 470 par identification moléculaire et phénotypique.

3.2.2 Procédé de fabrication

L'enzyme alimentaire est obtenue par culture en milieu solide suivie d'étapes de séparation du micro-organisme, de filtrations, de purifications et de formulation de l'enzyme. Les additifs et auxiliaires technologiques utilisés sont indiqués et leur sécurité documentée pour une utilisation en production alimentaire.

L'enzyme alimentaire est produite selon les Bonnes Pratiques de Fabrication pour l'alimentation humaine (cGMP) et les principes de l'HACCP⁷. Les matières premières utilisées sont de qualité alimentaire.

Compte tenu de l'origine fongique de l'organisme de production et donc de sa capacité potentielle à produire des métabolites secondaires toxiques, le GT « Biotechnologie » conseille de mettre en place une surveillance de ces substances lors de la production de l'enzyme alimentaire en actualisant les contrôles des nouveaux métabolites identifiés en fonction de la disponibilité des standards.

3.3 Réaction et devenir dans les denrées alimentaires

Les produits de réaction de la bêta-galactosidase sur le lactose sont du glucose, du galactose et des galacto-oligosides. La bêta-galactosidase serait utilisée pour produire un ingrédient alimentaire composé d'un mélange de galacto-oligosides ou galacto-oligosaccharides (GOS). Ce sont des molécules fortement hyperosmotiques et très fermentescibles.

⁶Arrêté du 19 octobre 2006 modifié relatif à l'emploi d'auxiliaires technologiques dans la fabrication de certaines denrées alimentaires.

⁷ Hazard Analysis and Critical Control Points

L'inactivation irréversible ou l'élimination de la bêta-galactosidase et des activités enzymatiques secondaires (si elles existent) doivent être démontrées dans plusieurs lots d'ingrédient alimentaire (sirop de GOS) en utilisant les conditions de production recommandées par le pétitionnaire.

3.4 Utilité technologique de l'enzyme et conditions d'utilisation proposées du produit

L'enzyme alimentaire serait un auxiliaire technologique destiné uniquement à la production d'un ingrédient alimentaire composé d'un mélange de galacto-oligosides ou galacto-oligosaccharides (GOS). Ce produit est un sirop de GOS qui serait destiné à être incorporé dans des préparations pour nourrissons⁸ et préparations de suite⁹ destinées spécifiquement à des nourrissons¹⁰.

3.5 Exposition alimentaire

Le pétitionnaire présente des hypothèses pour des calculs d'exposition alimentaire des nourrissons, seule population consommant les préparations pour nourrissons et préparations de suite. Il considère que le sirop de GOS incorporé a été synthétisé en utilisant l'enzyme à la dose maximale recommandée avec une activité enzymatique conservée intégralement dans le sirop de GOS puis que le sirop de GOS est incorporé dans les denrées revendiquées à la limite d'incorporation réglementaire (arrêté du 11 avril 2008 modifié¹¹). La population des nourrissons est répartie en 3 classes d'âge : moins de 16 semaines, 4-6 mois, 6-12 mois. Les marges de sécurité n'ont pas été présentées.

En conservant les hypothèses d'incorporation potentielle d'enzyme *via* l'ajout du sirop de GOS dans les denrées revendiquées par le pétitionnaire et en prenant la NOAEL retenue par le GT « Biotechnologie » de 100 mg TOS/kg de poids corporel/jour, les calculs de marge de sécurité devraient être fournis pour les différentes classes d'âge en utilisant des données de consommation françaises pour les nourrissons.

3.6 Données toxicologiques

Afin de pouvoir évaluer la sécurité de l'enzyme, il est indispensable pour le GT « Biotechnologie » d'avoir la preuve que l'ensemble des études de toxicité ont été conduites avec l'enzyme alimentaire, objet de la demande. Les bulletins d'analyse fournis dans le dossier n'apportent pas les confirmations que le produit testé est l'enzyme alimentaire produite avec la souche de production GL 470 et selon les procédés présentés dans le dossier.

Une première étude de toxicité orale subchronique par administration répétée pendant 90 jours chez le Rat a été réalisée en 1995 aux doses de 97,7, 195 et 977 mg TOS/kg de poids corporel/jour. Les résultats conduisant à suspecter un effet toxique sur la fonction rénale dès la plus faible dose testée ne permettent pas de fixer une dose sans effet néfaste observé (NOAEL¹²). Les résultats d'une seconde étude réalisée en 2015 aux doses de 50, 75 et 100 mg TOS/kg de

⁸ Préparation pour nourrissons = Denrée alimentaire destinée à être utilisée par des nourrissons pendant les premiers mois de leur vie et qui répond elle seule aux besoins nutritionnels de ces nourrissons jusqu'à l'introduction d'une alimentation complémentaire appropriée [définition du Règlement (UE) n° 609/2013 du parlement européen et du conseil du 12 juin 2013 concernant les denrées alimentaires destinées aux nourrissons et aux enfants en bas âge, les denrées alimentaires destinées à des fins médicales spéciales et les substituts de la ration journalière totale pour contrôle du poids et abrogeant la directive 92/52/CEE du Conseil, les directives 96/8/CE, 1999/21/CE, 2006/125/CE et 2006/141/CE de la Commission, la directive 2009/39/CE du Parlement européen et du Conseil et les règlements (CE) n° 41/2009 et (CE) n° 953/2009 de la Commission]

⁹ Préparation de suite = Denrée alimentaire destinée à être utilisée par des nourrissons lorsqu'une alimentation complémentaire appropriée est introduite et qui constitue le principal élément liquide d'une alimentation progressivement diversifiée de ces nourrissons (définition du Règlement (UE) n° 609/2013)

¹⁰ Enfant âgé de moins de 12 mois (définition du Règlement (UE) n° 609/2013)

¹¹ Arrêté du 11 avril 2008 relatif aux préparations pour nourrissons et aux préparations de suite et modifiant l'arrêté du 20 septembre 2000 relatif aux aliments diététiques destinés à des fins médicales spéciales.

¹² No Observed Adverse Effect Level

poinds corporel/jour ne montrent aucun signe fonctionnel ou lésionnel pertinent sur le plan toxicologique. Le GT « Biotechnologie » considère que si l'identité du matériel testé est confirmée comme étant l'enzyme alimentaire, objet de cette demande, cette seconde étude de toxicité subchronique pourrait permettre de conclure à une NOAEL de 100 mg TOS/kg de poids corporel/jour, correspondant à la dose la plus forte testée dans cette seconde étude.

Les études de génotoxicité ont été réalisées en 1995. Elles ne répondent pas aux lignes directrices OCDE¹³ 471 et 473 en cours. Elles présentent un manque de sensibilité au regard des exigences actuelles.

L'étude de mutagénicité *in vitro* (test d'Ames sur quatre souches de *Salmonella* Typhimurium histidine dépendante) n'a pas révélé d'augmentation du nombre de révertants jusqu'à 10 mg d'enzyme alimentaire/boîte. Elle ne met cependant pas en œuvre une souche possédant un système de réparation de l'ADN telle que la souche d'*E. coli* WP2 (pKM101) ou *S. Typhimurium* TA 102, souches destinées à mettre en évidence certains mécanismes mutagènes (agents pontants et/ou oxydants). Des contrôles positifs supplémentaires sont également à réaliser pour les expériences en présence de système d'activation métabolique S9.

Le test d'aberrations chromosomiques sur des lymphocytes primaires humains, *in vitro*, n'a pas mis en évidence d'effet clastogène ou aneugène de l'enzyme alimentaire jusqu'à 5 mg d'enzyme alimentaire/ml en l'absence ou en présence de système d'activation métabolique S9 pour le temps court (3 h) et pour le temps long de traitement sans activation métabolique (20 h). Seulement 200 cellules en métaphase ont été examinées par échantillon alors que les exigences actuelles des lignes directrices OCDE 473 sont de 300 cellules en métaphase pour pouvoir conclure à un résultat négatif.

Le GT « Biotechnologie » considère donc que les données issues des études présentées ne lui permettent pas de conclure sur le potentiel génotoxique de l'enzyme alimentaire. La réalisation de deux autres études conformes aux lignes directrices OCDE en cours est nécessaire. En complément d'un test d'Ames (OCDE 471), ce pourrait être soit un test du micronoyau *in vitro* sur cellules humaines (OCDE 487), soit un test d'aberrations chromosomiques *in vitro* sur cellules humaines en utilisant une lignée de cellules humaines génétiquement stable (OCDE 473).

3.7 Allergénicité

Le blé étant un allergène à déclaration obligatoire, l'utilisation de matières premières issues du blé dans le procédé de production nécessite de vérifier l'absence de protéines de blé dans l'enzyme alimentaire ou un étiquetage approprié.

Une recherche bioinformatique n'a pas mis pas en évidence d'identités de séquences entre la séquence de l'enzyme et des allergènes connus et donc ne conduit pas à suspecter un potentiel allergique de l'activité enzymatique principale, la bêta-galactosidase. Sur la base des données fournies et des données de la littérature (Binkley, 1996 ; Voisin et Borici-Mazi, 2016), le risque d'allergie alimentaire associée à cette enzyme apparaît faible.

Des réactions allergiques suite à des expositions par voie aéroportée ont été signalées dans la littérature en tant que maladies professionnelles observées dans l'industrie de production et de conditionnement de bêta-galactosidases. Sur le site de production et lors de la mise en œuvre de l'enzyme, il conviendra de prévenir par des mesures spécifiques de protection des personnels le risque de sensibilisation par inhalation et par contact cutané d'aérosols ou de particules de cette enzyme alimentaire.

¹³ Organisation de Coopération et de Développement Economiques

3.8 Conclusion du GT

Au vu des résultats fournis et dans les conditions d'emploi présentées par le pétitionnaire, le Groupe de travail (GT) « Biotechnologie » estime que l'absence de risque sanitaire pour le consommateur lié à l'emploi de la bêta-galactosidase issue de la souche d'*Aspergillus oryzae* non génétiquement modifiée GL 470 pour la production de galacto-oligosaccharides (GOS) n'est pas démontrée en raison de l'absence des informations suivantes :

- Caractérisation de l'activité de transgalactosylation de la bêta-galactosidase (méthode, activité, pH, température),
- Identification des activités enzymatiques secondaires et des méthodes analytiques utilisées pour ces recherches,
- Vérification des critères de pureté manquants (cadmium, mercure, anaérobies sulfito-réducteurs, *Staphylococcus aureus*),
- Recherche des mycotoxines potentiellement produites par *Aspergillus oryzae* (acides kojique, cyclopiazonique et 3 nitro propionique),
- Identification moléculaire et phénotypique de la souche de production GL 470,
- Démonstration de l'inactivation irréversible ou de l'élimination de la bêta-galactosidase et des activités enzymatiques secondaires (si elles existent) dans plusieurs lots d'ingrédient alimentaire (sirop de GOS) en utilisant les conditions de production recommandées par le pétitionnaire,
- Calculs de marge de sécurité pour différentes classes d'âge de nourrissons,
- Confirmation de l'identité du matériel testé dans les tests de toxicité comme étant l'enzyme alimentaire, objet de cette demande,
- Résultats de deux tests de génotoxicité respectant les exigences des lignes directrices OCDE en cours,
- Vérification de l'absence de protéines de blé dans l'enzyme alimentaire.

Le GT « Biotechnologie » rappelle qu'il existe une limite d'incorporation à 7,2 g de GOS/l de préparation pour nourrissons imposée par la réglementation (arrêté du 11 avril 2008 modifié). Il est important également de rappeler que les préparations de GOS contiennent, pour la plupart, de grandes quantités de sucres (lactose, glucose et galactose) dont il faut tenir compte dans les apports nutritionnels.

4. CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS DE L'AGENCE

L'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (Anses) endosse les conclusions du GT « Biotechnologie ». L'absence de risque sanitaire pour le consommateur n'étant pas démontrée pour les raisons précisées dans cette conclusion, l'Anses propose à la DGCCRF de ne pas donner, en l'état, une suite favorable à cette demande d'autorisation.

Dr Roger Genet

MOTS-CLES

Enzyme, auxiliaire technologique, bêta-galactosidase, *Aspergillus oryzae*, sirop de galacto-oligosides, galacto-oligosaccharides, GOS, nourrissons

Enzyme, processing aid, beta-galactosidase, *Aspergillus oryzae*, galacto-oligosaccharides, GOS, infants

BIBLIOGRAPHIE

Binkley KE. 1996. Allergy to supplemental lactase enzyme. J. Allergy Clin. Immunol. Vol 97 n° 6:1414-1416.

Voisin MR and Borici-Mazi R. 2016. Anaphylaxis to supplemental oral lactase enzyme. Allergy, Asthma Clin. Immunol. 12 66:1-4.