

AVIS

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

**relatif à une demande d'autorisation de mise sur le marché d'un nouvel aliment ou
d'un ingrédient alimentaire via la procédure d'équivalence substantielle : huile
contenant de la vitamine K₂ issue de *Bacillus subtilis natto***

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.

L'Agence nationale de la sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (Anses) a été saisie le mardi 17 juillet 2012 par la Direction générale de la concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes (Dgcrf) d'une demande d'autorisation de mise sur le marché d'un nouvel aliment ou d'un ingrédient alimentaire via la procédure d'équivalence substantielle : huile contenant de la vitamine K₂ issue de *Bacillus subtilis natto*.

1. CONTEXTE ET OBJET DE LA SAISINE

Cette demande s'inscrit dans le cadre du règlement 258/97/CE relatif aux nouveaux aliments et nouveaux ingrédients alimentaires. Elle se réfère à la décision de la Commission 2009/345/CE autorisant la mise sur le marché de la vitamine K₂ (ménaquinone) issue de *Bacillus subtilis natto* en tant que nouvel ingrédient alimentaire. Le pétitionnaire demande une équivalence substantielle à un produit huileux contenant de la vitamine K₂ issue de *Bacillus subtilis natto*, ci-après dénommé le « produit commercialisé ». Il s'agit d'évaluer si les ingrédients sont « substantiellement équivalents en ce qui concerne leur composition, leur valeur nutritive, leur métabolisme, l'usage auquel ils sont destinés et leur teneur en substances indésirables ».

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 réalisée par le Comité d'experts spécialisé (CES) « Nutrition humaine » réuni le 15 novembre 2012, sur la base de rapports de 2 rapporteurs.

3. ANALYSE ET CONCLUSIONS DU CES

3.1 Spécifications du nouvel ingrédient

Le terme « vitamine K » regroupe un ensemble de substances liposolubles possédant toutes le noyau 2-méthyl-1,4-naphtoquinone. Les formes les mieux connues sont la vitamine K₁ ou phylloquinone, d'origine végétale, et les vitamines K₂ ou ménaquinones (MKn), d'origine animale. Les ménaquinones se trouvent dans le jaune d'œuf, les produits laitiers, le poulet, le foie et peuvent être synthétisées par des bactéries du tube digestif. La vitamine K₂ peut aussi être concentrée après fermentation d'aliments comme le « natto », aliment japonais traditionnel à base de graines de soja fermentées.

Bacillus subtilis natto, sous-espèce de *Bacillus subtilis*, gram+, catalase+, est une bactérie communément trouvée dans les sols. Du point de vue taxonomique, cette bactérie appartient au règne Bacteria à la division des Firmicutes, classe des Bacilli, ordre des Bacillales, famille des Bacillaceae, genre *Bacillus*, espèce *subtilis*, sous-espèce *natto*. On l'utilise depuis plus de 50 ans au Japon pour des préparations traditionnelles fermentées de « natto » qui ont le statut d'aliment fonctionnel à allégation santé, « FOSHU » (Arai et al, 2002).

Le produit commercialisé ne contient pas plus de 99,85% d'huile de tournesol et, au minimum, 0,15% de vitamine K₂. Les données de composition ne sont pas détaillées dans le rapport publié par l'Efsa le 2 octobre 2008 (Efsa, 2008). Le rapport relève la conformité de l'indice d'acide et de l'indice de peroxyde, respectivement inférieurs à la spécification de 10 mg KOH/g d'acides gras et de 3 mEqH₂O₂/kg d'échantillon. Sur ces points, les résultats d'analyse rapportés par le pétitionnaire pour le produit commercialisé sont concordants, avec des valeurs de 0,15 mg KOH/g d'acides gras et 3,1 mEqH₂O₂/kg d'échantillon. En revanche, la concentration en vitamine K₂ de l'échantillon analysé est de 1350 µg/g de MK-7 ce qui est inférieur à la spécification revendiquée dans le rapport Efsa de 1500 µg/g au minimum.

Pour le NI, les informations fournies sont très succinctes et ne permettent pas de caractériser l'extrait de vitamine K₂ avant dilution par l'huile de tournesol (selon un facteur de dilution de l'ordre de 500). Il est uniquement indiqué que le NI a été fabriqué à partir de soja, par la mention « extrait fermenté de soja 100,0% ». Il s'agit d'une huile de couleur brune, sans odeur forte. Il n'est pas précisé les spécifications de l'huile de tournesol utilisée. Le NI contient 1,4 mg KOH/g d'acides gras, ce qui est conforme, et 10,6 mEqH₂O₂/kg d'échantillon, valeur supérieure à la norme définie par le Codex alimentarius pour les huiles raffinées (Codex alimentarius, 1999) et citée dans le rapport Efsa.

Selon les spécifications de référence du pétitionnaire, le NI devrait contenir entre 1500 et 2000 µg/g de MK-7 et une quantité négligeable de MK-6 mais l'analyse de 3 lots de production indique une concentration moyenne de 2364 µg/g de MK-7 et de 170 µg/g de MK-6. Le pétitionnaire conclut à une faible variabilité de la concentration en vitamine K du NI, sur la base du dosage réalisé sur 3 lots.

Seules les méthodes d'analyse de la vitamine K₂ sont indiquées en annexe. Les méthodes analytiques concernant les autres composés ne sont pas indiquées. Ainsi le pétitionnaire revendique une stabilité de son produit, à température ambiante pendant 12 mois mais la méthode d'évaluation n'est pas indiquée. On ne sait pas par exemple si la méthode a consisté en une mesure unique ou des mesures répétées, ni quel était le conditionnement utilisé, et s'il y a eu plusieurs ouvertures.

Le CES « Nutrition humaine » estime que les spécifications fournies dans le dossier du pétitionnaire ne permettent pas une comparaison des critères d'identité et de pureté de la substance vectrice de vitamine K₂ et que l'équivalence des suspensions huileuses ne peut pas être accordée quantitativement et qualitativement. En effet, la concentration du NI est plus élevée en MK-7 (2364 µg/g contre 1350 µg/g) et MK-6 (170 µg/g contre 50 µg/g) et le rapport des concentrations est différent (14 contre 27). Par ailleurs, l'indice de peroxyde du NI est significativement plus élevé (10,6 contre 3 milliéquivalents d'oxygène actif présent dans 1 kg d'huile), ce qui témoigne d'une oxydation plus importante.

3.2 Composition nutritionnelle du nouvel ingrédient

La composition en acides gras du NI n'est pas indiquée. Le pétitionnaire fournit les teneurs en lipides, protéines, glucides ainsi que la valeur calorique. La teneur en glucides est très supérieure dans l'extrait de vitamine K (2,9 contre 0,2 g/100g). Le pétitionnaire n'explique pas cette différence.

Le CES « Nutrition humaine » estime que les caractéristiques de l'extrait de vitamine K sont différentes, du fait de la teneur en glucides. Cette différence n'est pas de nature à affecter la qualité nutritionnelle du NI mais permet de douter d'une équivalence substantielle.

3.3 Effet du procédé de production appliqué au nouvel ingrédient

Le rapport de l'Efsa mentionne, pour le produit commercialisé, une description satisfaisante du procédé de préparation comprenant des étapes de fermentation, d'extraction à l'éthanol, de filtration, de purification puis de dégommage et enfin l'ajout d'huile de tournesol. L'étape de purification, après la filtration de l'extrait de vitamine K₂, n'est pas clairement explicitée dans le rapport Efsa.

Le pétitionnaire ne justifie pas le choix du solvant (le pouvoir solvant de l'hexane, très lipophile, étant différent de celui de l'éthanol) ni l'absence d'étape de purification. Le procédé de désodorisation n'est pas détaillé et il n'est pas mentionné à quel stade le mélange avec l'huile de tournesol est effectué.

Le CES « Nutrition humaine » souligne que la description très sommaire du procédé de production du NI et l'absence d'étape de purification ne permettent pas de garantir l'élimination des composés toxiques pouvant être présents dans l'extrait de vitamine K₂ avant sa dilution par l'huile de tournesol. Les données présentes dans le dossier ne permettent pas d'assurer que le procédé est standardisé.

3.4 Métabolisme et biodisponibilité du nouvel ingrédient

Aucun test biologique n'ayant été pratiqué avec le NI, on ne dispose pas d'information concernant sa disponibilité et son effet.

Le CES « Nutrition humaine » s'interroge sur la biodisponibilité de la vitamine K₂ dans le NI étant donné les concentrations en MK-7 et MK-6 du NI et les différences des concentrations par rapport au produit commercialisé.

3.5 Recherche de substances indésirables

Le pétitionnaire rapporte le résultat d'analyses conduites uniquement sur le NI, et non sur l'extrait. Compte tenu de la très forte dilution, ces données permettent surtout la caractérisation de l'excipient (l'huile de tournesol). Le taux de micro-organismes aérobies est inférieur à 100 UFC/g. Les niveaux de contamination par des coliformes totaux, des *Escherichia coli*, des Staphylocoques à coagulase, des *Salmonella* spp et des aflatoxines sont conformes aux normes. Le dénombrement des levures et des moisissures indique des teneurs inférieures à 300 UFC/g. Les taux de métaux lourds (cadmium, mercure et plomb) et d'arsenic sont conformes aux normes. La recherche de substances anti-nutritionnelles, telles que les saponines, n'a pas été réalisée. On ne dispose pas non plus d'information sur la présence éventuelle de phyto-œstrogènes. La recherche de substances allergènes ne se justifie pas selon le pétitionnaire, sur le principe de l'absence de protéines dans le NI.

Le CES estime que la composition de l'extrait avant son incorporation à l'huile de tournesol n'étant pas établie et ses impuretés (l'hexane mis à part) n'étant pas recherchées, il n'est pas possible de se prononcer sur la sécurité d'emploi du NI.

3.6 Consommation et utilisation prévue du nouvel ingrédient

En France, les apports nutritionnels conseillés en vitamine K sont de 10 µg/j pour le nouveau-né et l'enfant, de 65 µg/j pour les adolescents (16-19 ans), de 45 µg/j chez les adultes et de 70 µg/j chez les personnes âgées de plus de 75 ans (Afssa, 2001).

Le pétitionnaire envisage une utilisation de son ingrédient similaire à celle pratiquée actuellement par le produit commercialisé, c'est-à-dire les denrées alimentaires destinées à une alimentation particulière, les aliments enrichis et les compléments alimentaires.

Le pétitionnaire préconise un enrichissement équivalent à 10 µg par portion d'aliment pour les différentes familles d'aliments suivantes : boissons, céréales et produits céréaliers, produits laitiers, graisses et huiles, pâtes, riz et autres céréales diverses. La simulation d'exposition fournie dans le dossier, issue du rapport Efsa, conduit à une consommation quotidienne de vitamine K qui varie entre 40 et 909 µg pour chacun de ces différents aliments. Sur la base des éléments fournis, il est donc impossible de simuler la consommation de vitamine K₂ qui proviendrait d'un enrichissement des denrées alimentaires. En outre, même si le pétitionnaire précise qu'il ne prévoit pas d'enrichir des formules infantiles et aliments pour enfants, il n'indique pas quelle est la population ciblée. Il est probable qu'il s'agisse de la population générale.

L'Agence rappelle qu'on ne dispose pas de limites maximum d'adjonction en vitamine K telles que prévues par le règlement CE n°1925/2006 concernant l'adjonction de vitamines, minéraux, et de certaines autres substances aux denrées alimentaires.

Par ailleurs, il convient de rappeler que des avis antérieurs de l'Agence (Afssa, 2008 ; Anses, 2012) indiquaient que « bien qu'une limite de sécurité ne puisse être définie pour la population générale, la prévalence élevée de sujets suivant un traitement anticoagulant par anti-vitamine K justifie une extrême prudence quant à l'enrichissement des aliments courants en vitamine K. ». L'Afssa s'était prononcée en défaveur d'un enrichissement des aliments courants en vitamine K (Afssa, 2008).

En ce qui concerne l'utilisation du NI dans les compléments alimentaires, un niveau d'apport d'environ 25 µg/j est prévu par le pétitionnaire chez l'adulte. En France, l'arrêté du 9 mai 2006 relatif aux nutriments pouvant être employés dans la fabrication des compléments alimentaires autorise l'emploi de vitamine K₁ à la dose journalière maximale de 25 µg. La dose proposée par le pétitionnaire correspond donc bien à la dose maximum retenue pour les compléments alimentaires, tenant compte de la population sous anti-vitamine K.

Sur la base des éléments fournis, le CES « Nutrition humaine » ne peut pas assurer que la consommation de ce produit n'est pas susceptible de conduire les personnes sous traitement anticoagulant anti-vitamine K à dépasser la dose journalière maximale de 25 µg apportée par les compléments alimentaires et les aliments enrichis (Afssa, 2008). Des informations plus précises quant aux populations ciblées et aux doses respectives préconisées sont nécessaires, ainsi que concernant la durée de consommation prévue.

3.7 Conclusion du CES

Le CES « Nutrition humaine » estime qu'en l'état actuel du dossier, il n'est pas possible de conclure à une équivalence en substance, ni de garantir la sécurité d'emploi du NI.

4. CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS DE L'AGENCE

L'Agence nationale de la sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail adopte les conclusions du CES « Nutrition humaine ». Elle émet un avis défavorable sur ce dossier.

Le directeur général

Marc Mortureux

MOTS-CLES

Bacillus subtilis natto, vitamine K₂, huile, équivalence substantielle.

BIBLIOGRAPHIE

Afssa (2008). Avis du CES Nutrition humaine relatif à l'évaluation des teneurs en vitamines et minéraux des denrées enrichies et des compléments alimentaires: vitamine K. Saisine 2007-SA-0315.

Afssa (2001). Apports nutritionnels conseillés pour la population française – 3^{ème} éditions – Editions Tech&Doc.

Anses (2012). Avis de l'Anses relatif à la demande d'évaluation du rapport d'évaluation initiale des autorités allemandes concernant la mise sur le marché d'un nouvel ingrédient alimentaire: vitamine K₂, ou ménaquinone, synthétique. Saisine 2011-SA-0328.

Arai S. (2002). Global view on functional foods : Asian perspectives. Br J Nutr 88 Suppl 2:S139-43.

Codex alimentarius (1999). Programme mixte FAO/OMS sur les normes alimentaires. FAO, Rome.
European Food Safety Authority (2008). Vitamin K₂ added for nutritional purposes in foods for particular nutritional uses, food supplements and foods intended for the general population and vitamin K₂ as a source of vitamin K added for nutritional purposes to foodstuff, in the context of Regulation (EC) No 258/97. The Efsa Journal. 822, 1-31