

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 peroxydase
d'une souche d'*Aspergillus niger* génétiquement modifiée
porteuse d'un gène de fusion codant une peroxydase de *Marasmius scorodoni*
pour le traitement du lactosérum, de boissons à base de soja,
de la crème et du beurre**

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'Anses a été saisie le 16 juin 2011 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 peroxydase d'une souche d'*Aspergillus niger* génétiquement modifiée porteuse d'un gène de fusion codant une peroxydase de *Marasmius scorodoni* pour le traitement du lactosérum, de boissons à base de soja, de la crème et du beurre.

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.

Après examen initial du dossier puis après des consultations des Comités d'experts spécialisés (CES) « Biotechnologie » et CES « Nutrition humaine », l'Anses a effectué deux demandes de compléments d'information auprès de la DGCCRF, les 3 août et 15 novembre 2011. Le 13 septembre 2011 et les 6 et 24 février 2012, l'Anses a reçu des éléments de réponse permettant de poursuivre l'expertise.

¹ 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.

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 sur la base de 8 rapports par le Comité d'experts spécialisé (CES) « Biotechnologie », réuni les 15 septembre et 20 octobre 2011 et les 16 février et 19 avril 2012 et par voie télématique les 22 et 26 avril 2012, et le CES « Nutrition humaine », réuni les 20 octobre 2011 et 22 mars 2012 et par voie télématique le 16 avril 2012.

Selon l'article 1 de l'arrêté du 7 mars 2011², le dossier doit être établi selon le guide³ de l'EFSA pour la soumission d'un dossier sur les enzymes alimentaires.

3. ANALYSE ET CONCLUSIONS DES CES

3.1 Identité de l'enzyme alimentaire⁴

L'enzyme alimentaire est une peroxydase (E.C. 1.11.1.7, CAS 9003-99-0). En présence de peroxyde d'hydrogène, les peroxydases oxydent différents substrats.

Une unité (DBLU⁵) d'activité de peroxydase est définie comme la quantité d'enzyme nécessaire pour oxyder 1 µmole d'ABTS⁶ par minute à pH 3,5 et à 37 °C.

Les caractéristiques de l'enzyme alimentaire sont décrites. Les solides organiques totaux (TOS⁷) sont calculés selon la formule $TOS = 100 \% - \text{humidité} - \text{cendres} - \text{diluants} - \text{stabilisants}$. La formulation finale présente une activité garantie de peroxydase de 5000 DBLU/g avec un TOS entre 11 et 16 % (p/p).

Une glucoamylase tronquée est également présente dans l'enzyme alimentaire. Une unité (AGIS⁸) de glucoamylase est définie comme la quantité d'enzyme nécessaire pour libérer, à partir d'un substrat d'amidon soluble, 1 µmole de glucose par minute à pH 4,3 et à 60 °C. Cette activité enzymatique est présente en quantité significative mais elle n'agit pas dans les denrées traitées faute de substrat. Les caractéristiques de cette enzyme ont été fournies.

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

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 Dairy BLeaching Unit

⁶ 2,2' azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid

⁷ Total Organic Solids

⁸ AmyloGlucosidase Side Activity

La peroxydase et la glucoamylase sont présentes sous forme glycosylée dans l'enzyme alimentaire.

Aucune autre activité enzymatique secondaire en quantité significative ayant un impact sur les applications technologiques revendiquées n'est indiquée par le pétitionnaire.

Les critères de pureté chimique et biologique de la préparation enzymatique répondent aux exigences de l'arrêté du 19 octobre 2006 modifié⁹. La recherche de la souche de production et d'une activité antibactérienne est négative dans l'enzyme alimentaire.

La stabilité de l'enzyme alimentaire au cours de sa conservation est présentée.

3.2 Organisme de production et procédé de fabrication

3.2.1 Organisme de production

Sécurité du micro-organisme hôte

La souche initiale d'*Aspergillus niger* utilisée (souche GAM53 ou DS 3045) est un micro-organisme non pathogène, utilisé pour la fabrication de préparations enzymatiques destinées à l'alimentation humaine.

Sécurité du micro-organisme donneur

Le gène d'intérêt est basé sur la séquence codant la peroxydase de *Marasmius scorodonius*. Le gène codant la glucoamylase est isolé d'une souche d'*Aspergillus niger*. Des mutations ainsi que la création d'un gène de fusion sont commentées dans le dossier.

Obtention de la souche de production

Un nombre connu de copies du transgène est intégré de façon stable dans le génome hôte dans des sites identifiés. Les différentes étapes de la transformation et la généalogie jusqu'à la souche de production sont décrites de façon détaillée. La sélection de la souche transformée se fait sur une auxotrophie. Aucun gène de résistance à des antibiotiques n'est présent dans la souche de production.

Le Comité scientifique du HCB¹⁰ a classé le 11 janvier 2010, la production de cette peroxydase par des souches d'*Aspergillus niger* dans la classe 1- Groupe I- Confinement L1.

La souche de production de l'enzyme alimentaire est la souche d'*Aspergillus niger* MOX54 (DS 63019). Des éléments sur la stabilité de cette souche sont apportés dans le dossier.

3.2.2 Procédé de fabrication

Le procédé de production de la préparation enzymatique est un procédé de fermentation aérobie confiné, suivie d'étapes d'inactivation de la biomasse, de filtrations, de concentration par ultrafiltration et formulation de l'enzyme. Les additifs et auxiliaires technologiques utilisés dans cette production sont indiqués et leur sécurité documentée. Toutefois, il convient de compléter le dossier par le calcul d'exposition du consommateur aux auxiliaires technologiques utilisés dans la procédure d'inactivation de la souche productrice lors de la purification de l'enzyme alimentaire.

⁹Arrêté du 19 octobre 2006 modifié relatif à l'emploi d'auxiliaires technologiques dans la fabrication de certaines denrées alimentaires

¹⁰ Haut Conseil des Biotechnologies

L'enzyme alimentaire est produite selon les Bonnes Pratiques de Fabrication pour la production d'enzyme alimentaire d'origine microbienne¹¹. Les matières premières utilisées sont de qualité alimentaire.

3.3 Réaction et devenir dans les denrées alimentaires

La peroxydase est susceptible d'oxyder de nombreux substrats. L'emploi de l'enzyme alimentaire est donc susceptible d'avoir des effets sur la composition nutritionnelle des ingrédients traités.

Le CES « Nutrition Humaine » souhaitait recevoir des compléments d'information sur l'effet du traitement par la peroxydase sur la composition nutritionnelle de chacune des 4 matrices susceptibles d'être traitées par l'enzyme. Pour répondre à cette demande, le pétitionnaire a fourni des analyses de teneurs en matière grasse, en acides gras et en acides aminés, ainsi que de teneurs en vitamines, avant et après traitement à la peroxydase. Il a comparé ces résultats à ceux obtenus avec un traitement blanchissant à l'H₂O₂. Les deux traitements blanchissants ont été réalisés à température ambiante et à 50 °C. Le pétitionnaire n'a réalisé ces analyses que sur une des 4 matrices, le lactosérum, car il estime que cette matrice sera la plus concernée en pratique par le traitement proposé.

3.3.1 Remarques sur la méthode utilisée

Le CES « Nutrition humaine » souligne un certain nombre de manquements dans la méthode utilisée :

- l'analyse des nutriments ne porte que sur un lot de lactosérum, dont l'origine n'est pas précisée, alors que la composition du lactosérum est grandement influencée par son processus d'obtention ;
- le pétitionnaire a choisi d'étudier l'effet du traitement sur les teneurs en vitamines alors qu'elles sont présentes en quantités très faibles dans le lactosérum. Le pétitionnaire est ainsi obligé d'ajouter des vitamines au lactosérum afin de montrer les effets du traitement à la peroxydase. Le CES « Nutrition Humaine » regrette par ailleurs qu'aucune analyse de la composition minérale n'ait été réalisée ;
- comme les résultats sont présentés sans estimation de la variabilité, ils n'ont pas pu être retenus pour comparer les méthodes de blanchiment ;
- les méthodes utilisées pour l'analyse de la composition en matière grasse, en lipides totaux et en acides aminés sont pertinentes. Bien que la technique d'analyse utilisée pour la détermination des vitamines soit courante, il serait souhaitable qu'elle soit validée par des publications,
- le pétitionnaire considère que les résultats qu'il fournit sur le lactosérum sont extrapolables au beurre, à la crème et aux boissons à base de soja. Il se fonde sur une publication de 1979 portant sur le blanchiment à l'H₂O₂ pour soutenir l'hypothèse selon laquelle l'impact du blanchiment sur les nutriments est indépendant de la matrice (Federation of American Societies for Experimental Biology - FASEB, 1979). Le CES « Nutrition Humaine » estime que cette référence n'étaye pas une extrapolation à d'autres produits puisqu'il ne s'agit pas de la même méthode. Il ajoute qu'une publication récente citée par le pétitionnaire (van Scheppingen *et al.*, 2012), mais peu décrite dans le dossier, montre des différences de formation de produits de décomposition de la norbixine selon que la matrice est de l'eau ou du lactosérum. Il estime ainsi que la complexité de composition des différentes matrices alimentaires et les différentes interactions

¹¹ Good manufacturing practice in microbial food enzyme production.

possibles entre les constituants ne permettent pas une extrapolation pertinente à d'autres matrices alimentaires.

3.3.2 Impact du traitement sur la composition en acides gras et la teneur en lipides

Le blanchiment, qu'il soit réalisé par la peroxydase ou par l' H_2O_2 , ne semble pas affecter la teneur totale en lipides. De même, sous réserve des remarques formulées plus haut concernant l'absence de test statistique, les concentrations des différents acides gras du lactosérum ne semblent pas affectées par le blanchiment à température ambiante, réalisé avec la peroxydase ou l' H_2O_2 (500 ppm). A la température de 50 °C, une légère diminution des teneurs en acides gras est observée suite au traitement par l' H_2O_2 , alors que le traitement par la peroxydase induit une augmentation importante et surprenante des teneurs en acides gras (d'environ 20 % en moyenne). Le CES « Nutrition humaine » regrette que cette augmentation des teneurs en acides gras après traitement par la peroxydase ne soit pas discutée par le pétitionnaire.

3.3.3 Impact du traitement sur la composition en acides aminés

Les teneurs en acides aminés diminuent après le blanchiment par l' H_2O_2 à 500 ppm, à température ambiante et à 50 °C. Le traitement par la peroxydase, au contraire, semble induire une augmentation de leurs teneurs à température ambiante, et de manière plus marquée à 50 °C.

Le CES « Nutrition humaine » regrette de nouveau que cette augmentation ne soit pas discutée par le pétitionnaire.

3.3.4 Impact du traitement sur la composition en vitamines

La destruction des vitamines C et A est totale quel que soit le traitement. Pour la nicotinamide, on observe une diminution de 30 % de sa teneur pour le traitement par la peroxydase et de 3 % pour le traitement par l' H_2O_2 (500 ppm) à 40 °C.

Les teneurs en vitamines B2, B3 et B5 ne diminuent pas après blanchiment, quelle que soit la méthode utilisée, ce qui est conforme à la littérature scientifique citée dans le rapport pour un traitement par l' H_2O_2 (FASEB, 1979). Le CES « Nutrition humaine » estime que des données plus récentes seraient nécessaires.

3.4 Utilité technologique et conditions d'utilisation proposées

L'enzyme alimentaire est proposée comme un auxiliaire technologique pour le traitement du lactosérum, de boissons à base de soja, de la crème et du beurre.

Le pétitionnaire revendique que cette enzyme alimentaire oxyderait les caroténoïdes conduisant à une décoloration des ingrédients traités. Des résultats de décoloration pour les différentes matrices revendiquées sont présentés.

Les conditions d'utilisation de l'enzyme alimentaire dans les denrées alimentaires revendiquées sont décrites. Les conditions d'inactivation de la peroxydase sont présentées pour la matrice « lactosérum ». Il est nécessaire de les présenter pour les 3 autres matrices ainsi que celles de la glucoamylase pour les 4 matrices.

3.5 Exposition alimentaire

Le pétitionnaire présente un calcul de marge de sécurité pour la population la plus exposée, consommant exclusivement des boissons à base de soja¹² à la place du lait, conduisant à une valeur acceptable de 369.

3.6 Données toxicologiques

Toutes les études de toxicité ont été réalisées selon les lignes directrices internationales de l'OCDE¹³ et en conformité avec les Bonnes Pratiques de Laboratoire.

L'étude de toxicité orale sub-chronique pendant 90 jours chez le Rat conclut à une NOAEL¹⁴ supérieure à 2,3 g d'enzyme alimentaire/kg de poids corporel/jour soit 2 g TOS⁷/kg de poids corporel/jour, correspondant à la dose la plus forte testée.

L'étude de mutagénicité *in vitro* (test d'Ames sur quatre souches de *Salmonella typhimurium* histidine dépendante et une souche d'*Escherichia coli* tryptophane dépendante) n'a révélé aucune augmentation du nombre de révertants en présence de l'enzyme alimentaire et donc aucun effet mutagène. Le test d'aberrations chromosomiques sur des lymphocytes périphériques humains, en culture, n'a pas mis en évidence d'effet clastogène de l'enzyme alimentaire. Selon ces deux tests, l'enzyme alimentaire n'est pas génotoxique.

3.7 Allergénicité

La comparaison de séquences de la peroxydase de *Marasmius scorodoni* et de la glucoamylase tronquée d'*Aspergillus niger* avec les séquences d'allergènes et de toxines connus selon les deux protocoles (recherche d'une identité supérieure à 35 % sur les différents blocs de 80 acides aminés ou une identité sur 8 acides aminés contigus) n'a révélée aucune homologie.

3.8 Conclusion des CES

Le CES « Nutrition humaine » estime que les données fournies par le pétitionnaire ne sont pas suffisantes pour évaluer les effets du blanchiment par la peroxydase sur la qualité nutritionnelle des produits susceptibles d'être traités. Il souligne que la bibliographie est peu fournie, les objectifs peu clairs, les expérimentations mal identifiées. Il rappelle qu'aucune analyse statistique n'a été réalisée et regrette que les résultats ne soient pas davantage discutés.

En outre, il estime que le pétitionnaire n'a pas apporté la preuve que la peroxydase a des effets similaires sur les 4 matrices proposées. Aussi rappelle-t-il la nécessité d'évaluer spécifiquement l'impact du traitement sur chacune des matrices susceptibles d'être traitées.

¹² Données de consommation des Pays-Bas (Dutch food consumption survey, Voedingscentrum, 1998). Le calcul de la consommation est fait en utilisant les données de consommation de lait. La consommation utilisée est le 90^{ème} percentile de la consommation des enfants de 1 à 4 ans.

¹³ Organisation de Coopération et de Développement Economiques

¹⁴ No Observed Adverse Effect Level

Par ailleurs, il regrette l'absence de données concernant les teneurs des divers caroténoïdes présents dans ces produits, qui sont pourtant *a priori* rapidement dégradés par un traitement blanchissant et concernant les teneurs en minéraux.

Enfin, le CES « Nutrition humaine » souligne que, du fait de son principe, le blanchiment d'un produit altère sa qualité nutritionnelle, en termes de teneurs en vitamines C et A et probablement de caroténoïdes.

Le Comité d'experts spécialisé « Biotechnologie » estime que l'absence de risque sanitaire pour le consommateur lié à l'emploi d'une peroxydase d'une souche d'*Aspergillus niger* génétiquement modifiée (MOX-54) porteuse d'un gène de fusion codant une peroxydase de *Marasmius scorodonius* pour le traitement du lactosérum, de boissons à base de soja, de la crème et du beurre ne peut être garantie dans les conditions d'emploi présentées par le pétitionnaire, en raison de données insuffisantes ou des imprécisions sur les points suivants :

- le calcul d'exposition du consommateur aux auxiliaires technologiques utilisés dans la procédure d'inactivation de la souche productrice,
- la preuve de l'inactivation des deux activités enzymatiques de l'enzyme alimentaire (peroxydase et glucoamylase) dans les boissons à base de soja, la crème et le beurre,
- et de façon très documentée, les données obtenues sur les conséquences nutritionnelles et de composition des ingrédients traités par cette enzyme alimentaire.

4. CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS DE L'AGENCE

L'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (Anses) ne peut pas statuer sur l'absence de risque sanitaire pour le consommateur lié à l'emploi d'une peroxydase d'une souche d'*Aspergillus niger* génétiquement modifiée (MOX-54) porteuse d'un gène de fusion codant une peroxydase de *Marasmius scorodonius* pour le traitement du lactosérum, de boissons à base de soja, de la crème et du beurre dans les conditions d'emploi présentées par le pétitionnaire en raison des données insuffisantes ou des imprécisions identifiées par les CES « Biotechnologie » et « Nutrition humaine ».

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

Le directeur général

Marc Mortureux

MOTS-CLES

Enzyme, auxiliaire technologique, peroxydase, *Aspergillus niger*, *Marasmius scorodoni*, lactosérum, boissons à base de soja, crème, beurre

BIBLIOGRAPHIE

Federation of American Societies for Experimental Biology (FASEB). (1979) Evaluation of the health aspects of hydrogen peroxide as a food ingredient

van Scheppingen WB, Boogers IALA and Duchateau ALL (2012). Study on decomposition products of norbixin during bleaching with hydrogen peroxide and a peroxidase by means of UPLC-UV and mass spectrometry. Food Chemistry 132(3): 1354-1359