



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

**relatif à une demande de modification de la souche de production
d'une alpha-amylase maltogène d'une souche de *Bacillus subtilis*
porteuse d'un gène de *Geobacillus stearothermophilus* pour la panification
(à l'exception du pain de tradition française), la panification spéciale, la biscuiterie,
la pâtisserie et la viennoiserie**

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 10 mai 2012 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 de modification de la souche de production d'une alpha-amylase maltogène d'une souche de *Bacillus subtilis* porteuse d'un gène de *Geobacillus stearothermophilus* pour la panification (à l'exception du pain de tradition française), la panification spéciale, la biscuiterie, la pâtisserie et la viennoiserie.

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, il doit être établi selon le guide³ de l'EFSA pour la soumission d'un dossier sur les enzymes alimentaires.

L'Anses a rendu un avis favorable le 18 octobre 2011 sur une demande d'avis relatif à une demande d'autorisation d'emploi d'une alpha-amylase maltogène d'une souche de *Bacillus subtilis* porteuse d'un gène de *Geobacillus stearothermophilus* pour la panification (à

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 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

l'exception du pain de tradition française) et la panification spéciale, la biscuiterie, la pâtisserie et la viennoiserie (saisine 2011-SA-0093). L'enzyme principale est une alpha-amylase maltogène (glucane 1,4- α -maltohydrolase, EC 3.2.1.133). Cette enzyme alimentaire est un auxiliaire technologique destiné à la biscuiterie, viennoiserie, pâtisserie, panification courante (à l'exception du pain de tradition française) et panification spéciale. Cette enzyme alimentaire figure également dans l'avis de l'Anses sur le projet d'arrêté modifiant l'arrêté du 19 octobre 2006 (avis du 18 avril 2012, saisine 2012-SA-0043).

L'objet de cette nouvelle saisine est le remplacement de la souche de production de cette enzyme alimentaire afin d'améliorer la stabilité génétique de la souche de production et la productivité de l'enzyme alimentaire.

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) ».

Après consultation du CES « Biotechnologie », réuni le 21 juin 2012, l'Anses a effectué une demande de compléments d'information auprès de la DGCCRF, le 4 juillet 2012. Le 4 octobre 2012, l'Anses a reçu des éléments de réponse permettant de poursuivre l'expertise.

L'expertise collective a été réalisée par le Comité d'experts spécialisé (CES) « Biotechnologie », réuni le 21 juin 2012 et par le Groupe de travail (GT) « Biotechnologie », réuni le 15 novembre 2012.

3. ANALYSE ET CONCLUSIONS DU GT

Le procédé de production, les applications technologiques et l'exposition alimentaire du consommateur de denrées traitées ne sont pas modifiés dans cette nouvelle demande, par rapport à la demande initiale (avis du 18 octobre 2011, saisine 2011-SA-0093).

3.1 Identité de l'enzyme alimentaire

L'enzyme principale est une glucane 1,4- α -maltohydrolase (ou alpha-amylase maltogène, EC 3.2.1.133). Elle appartient à la famille des glycosyl transférases. Elle dégrade l'amylopectine et réduit le poids moléculaire de l'amylose en générant du maltose à partir des extrémités non réductrices des chaînes.

Aucune activité enzymatique secondaire en quantité significative n'est indiquée par le pétitionnaire.

Les critères de pureté chimique et biologique de l'enzyme alimentaire répondent aux exigences de l'arrêté du 19 octobre 2006 modifié⁴.

⁴Arrêté du 19 octobre 2006 modifié relatif à l'emploi d'auxiliaires technologiques dans la fabrication de certaines denrées alimentaires

Les éléments présentés par le pétitionnaire (électrophorèse en SDS PAGE et analyse HPLC) permettent de prouver l'identité en termes de contenu protéique entre l'enzyme alimentaire, objet de l'avis du 18 octobre 2011 (saisine 2011-SA-0093), et l'enzyme alimentaire, objet de cette saisine.

Les valeurs de TOS⁵ sont similaires entre les enzymes produites par les deux souches de production différentes. Les lots d'enzyme alimentaire, objet de cette saisine, présentent une activité α -amylase 4 fois supérieure à celle de l'enzyme alimentaire produite avec la souche initiale (avis du 18 octobre 2011, saisine 2011-SA-0093) montrant ainsi que le protocole de purification bien qu'identique pour les deux productions d'enzyme est mieux adapté à l'utilisation de la nouvelle souche de production.

3.2 Organisme de production

Sécurité des micro-organismes producteur et donneur

La souche initiale de *Bacillus subtilis* 168 utilisée est non-pathogène et non-toxinogène. La séquence codante du gène d'intérêt a été isolée d'une souche de *Geobacillus stearothermophilus*, organisme de classe 1.

Description des deux souches de production

La souche de production de l'enzyme alimentaire, objet de l'avis du 18 octobre 2011 (saisine 2011-SA-0093) est la souche de *Bacillus subtilis* MAMB-1 (DS 63113). Le HCB⁶ a classé le 23 février 2010, cette souche dans la classe 1, groupe I, confinement L1, pour la production d'alpha-amylase maltogène envisagée. Le transgène y est présent sur un plasmide multicopie.

Dans la nouvelle souche de production, objet de la demande, le transgène est intégré dans le chromosome bactérien afin d'améliorer la stabilité génétique et d'éliminer les gènes plasmidiques. La modification entre les deux souches de production de ces enzymes alimentaires est donc l'intégration génomique du transgène au lieu de la présence d'un plasmide multicopie porteur du transgène. Les différentes étapes de la construction génétique sont décrites précisément et l'absence de séquence plasmidique résiduelle est vérifiée dans la nouvelle souche de production.

La nouvelle souche de production de la préparation enzymatique est la souche de *Bacillus subtilis* MAM14A (DS 67348). Le HCB a classé le 5 avril 2011, cette souche dans la classe 1, groupe I, confinement L1, pour la production d'alpha-amylase maltogène envisagée.

3.3 Données toxicologiques

Les souches de production étant très proches, le procédé de fabrication identique et les deux enzymes alimentaires similaires, l'enzyme alimentaire produite par la nouvelle souche de production n'a pas fait l'objet d'un nouveau test de toxicité orale sub-chronique pendant 90 jours chez le Rat. La NOAEL⁷ de 1000 mg TOS/kg de poids corporel/jour fixée avec l'enzyme alimentaire, objet de l'avis du 18 octobre 2011 (saisine 2011-SA-0093), est conservée pour l'enzyme alimentaire, objet de cette demande.

Les études de génotoxicité ont été réalisées selon les lignes directrices internationales de l'OCDE⁸ et en conformité avec les Bonnes Pratiques de Laboratoire.

⁵ Total Organic Solids

⁶ Haut Conseil des Biotechnologies

⁷ No Observed Adverse Effect Level

⁸ Organisation de Coopération et de Développement Economiques

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 significative du nombre de révertants en présence de la préparation enzymatique, objet de la demande, et donc pas d'effet mutagène. Le test d'aberrations chromosomiques sur des lymphocytes périphériques humains, en culture, n'a pas mis en évidence d'effet clastogène de la préparation enzymatique. On peut donc conclure de ces deux tests que la préparation enzymatique produite avec la nouvelle souche de production, objet de la demande, ne montre pas de potentiel génotoxique.

3.4 Conclusion du GT

Au vu des résultats fournis et dans les conditions d'emploi présentées par le pétitionnaire, le Groupe de travail « Biotechnologie » n'a mis en évidence aucun facteur de risque sanitaire pour le consommateur vis-à-vis de l'emploi de cette alpha-amylase maltogène d'une souche de *Bacillus subtilis* porteuse d'un gène de *Geobacillus stearothermophilus* [MAM14A (DS 67348)] pour la panification (à l'exception du pain de tradition française), la panification spéciale, la biscuiterie, la pâtisserie et la viennoiserie.

4. CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS DE L'AGENCE

Au vu des résultats fournis et dans les conditions d'emploi présentées par le pétitionnaire, l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (Anses) n'a mis en évidence aucun facteur de risque sanitaire pour le consommateur vis-à-vis de l'emploi de cette alpha-amylase maltogène d'une souche de *Bacillus subtilis* porteuse d'un gène de *Geobacillus stearothermophilus* [MAM14A (DS 67348)] pour la panification (à l'exception du pain de tradition française), la panification spéciale, la biscuiterie, la pâtisserie et la viennoiserie. L'Anses rend donc un avis favorable à cette demande.

Le directeur général

Marc Mortureux

MOTS-CLES

Enzyme, auxiliaire technologique, alpha-amylase, *Bacillus subtilis*, *Geobacillus stearothermophilus*, souche, panification, panification spéciale, biscuiterie, pâtisserie, viennoiserie