



Le directeur général

Maisons-Alfort, le 25 février 2015

## **Extrait de l'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 xylanase  
issue d'une souche d'*Aspergillus acidus* modifiée génétiquement porteuse d'un gène muté  
codant une xylanase d'*Aspergillus acidus* en biscuiterie, biscotterie, pâtisserie,  
viennoiserie, panification courante (à l'exception du pain de tradition française)  
et panification spéciale**

*Le présent document est un extrait de l'avis du 25 février 2015, après suppression des parties confidentielles  
qui relèvent du secret industriel ou commercial, non publiables.*

---

*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 22 avril 2014 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 xylanase issue d'une souche d'*Aspergillus acidus* modifiée génétiquement porteuse d'un gène muté codant une xylanase d'*Aspergillus acidus* en biscuiterie, biscotterie, pâtisserie, viennoiserie, panification courante (à l'exception du pain de tradition française) et panification spéciale.

### **1. 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 denrées destinées à l'alimentation humaine.

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

---

<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.

<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

## 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 GT « Biotechnologie », réuni le 19 juin et le 17 juillet 2014, l'Anses a effectué une demande de compléments d'information auprès de la DGCCRF, le 23 juillet 2014. Le 14 novembre 2014, l'Anses a reçu des éléments de réponse permettant de poursuivre l'expertise. L'expertise collective a été menée par le Groupe de travail (GT) « Biotechnologie » les 19 juin 2014, 17 juillet 2014, 18 décembre 2014 et 18 février 2015, sur la base de rapports initiaux rédigés par six 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 rendues publiques *via* le site internet de l'Anses ([www.anses.fr](http://www.anses.fr)).

## 3. ANALYSE ET CONCLUSIONS DU GT

### 3.1 Identité de l'enzyme alimentaire<sup>4</sup>

L'enzyme alimentaire est une endo-1,4- $\beta$  xylanase (ou xylanase, E.C. 3.2.1.8). Les xylanases appartiennent à la famille des glycosidases (enzymes hydrolysant les liaisons O- et S-glycosyles). Une xylanase hydrolyse les liaisons 1,4- $\beta$ -D-xylosidiques à l'intérieur des chaînes de xylanes et d'arabinoxylanes en libérant des sucres réducteurs.

Une unité d'activité de la xylanase (XylH) est définie comme la quantité d'enzyme nécessaire pour obtenir une micromole d'équivalents xylose à partir de xylane d'avoine par minute, à 30 °C et pH 4,5.

Les caractéristiques de l'enzyme alimentaire sont décrites. Les solides organiques totaux (TOS<sup>5</sup>) sont calculés selon la formule TOS = 100 % - humidité - cendres - diluants. La formulation finale de la xylanase se présente sous forme de poudre avec une activité minimale garantie de 1700 XylH/g et un TOS d'environ 42 % (p/p).

Le pétitionnaire présente les méthodes d'analyse utilisées pour la recherche des activités enzymatiques secondaires ainsi que les résultats obtenus. Concernant les activités issues de la souche hôte, une activité cellulase est présente ainsi que des activités enzymatiques secondaires de type protéase et amylase en quantités négligeables.

<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

<sup>4</sup> 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.

<sup>5</sup> Total Organic Solids

Les critères de pureté chimique et biologique de l'enzyme alimentaire répondent aux exigences de l'arrêté du 19 octobre 2006 modifié<sup>6</sup>.

### 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 acidus* (anciennement nommée *Aspergillus foetidus*) utilisée est un micro-organisme non pathogène, utilisé pour la fabrication de préparations enzymatiques destinées à l'alimentation humaine.

##### Identité des micro-organismes donneurs

La séquence codante de la xylanase a été synthétisée à partir de la séquence codante du gène de la xylanase d'une souche d'*Aspergillus acidus* et modifiée afin d'optimiser la séquence protéique.

##### Obtention de la souche de production

Un nombre connu de copies du transgène est intégré de façon stable dans le génome hôte. Les différentes étapes de la transformation et la généalogie jusqu'à la souche de production sont décrites. 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.

La stabilité de la souche de production est documentée.

La souche de production de l'enzyme alimentaire est la souche d'*Aspergillus acidus* génétiquement modifiée RF 7398.

#### 3.2.2 Procédé de fabrication

L'enzyme alimentaire est obtenue par fermentation submergée suivie d'étapes de séparation du micro-organisme, de concentrations, de purifications, de séchage et de formulation de l'enzyme. Les additifs et auxiliaires technologiques utilisés dans cette production sont indiqués, leur sécurité documentée et des estimations des résidus potentiels présentées.

L'enzyme alimentaire est produite selon les Bonnes Pratiques de Fabrication pour l'alimentation humaine (cGMP) et les principes de l'HACCP. L'usine de production est certifiée aux normes ISO 9001 : 2008 et ISO 22000 : 2005. Les matières premières utilisées sont de qualité alimentaire. De faibles quantités de déoxynivalénol (DON) sont mesurées dans certains lots d'enzyme alimentaire présentés dans le dossier. L'origine de cette mycotoxine est liée à un substrat de culture utilisé dans la production de l'enzyme. Par analogie, le pétitionnaire se réfère à une denrée alimentaire présente dans le règlement 1881/2006<sup>7</sup> et montre que le niveau de DON présent dans le substrat de culture utilisé est inférieur à la teneur maximale réglementaire. Ce raisonnement par analogie est recevable.

Compte tenu de l'organisme de production *Aspergillus acidus*, espèce potentiellement productrice de mycotoxines et d'autres métabolites secondaires toxiques, et d'un des substrats de culture mis en œuvre pendant la fermentation, il convient de mettre en place une surveillance de ces substances dans la production de l'enzyme alimentaire afin qu'elle ne contienne pas de quantités détectables de mycotoxines ni d'autres métabolites toxiques<sup>8</sup>.

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

<sup>7</sup> Règlement (CE) n°1881/2006 portant fixation de teneurs maximales pour certains contaminants dans les denrées alimentaires

<sup>8</sup> Arrêté du 19 octobre 2006, annexe II, Point I. Critères de pureté des enzymes- Critères de pureté b) Pureté biologique : ...Les préparations ne doivent pas renfermer de quantités détectables de mycotoxines ni d'autres métabolites toxiques....

### 3.3 Réaction et devenir dans les denrées alimentaires

Les produits de réaction de la xylanase sont des sucres réducteurs, constituants naturels des produits à base de céréales.

La xylanase et les activités enzymatiques secondaires sont inactivées de façon irréversible par la cuisson des denrées alimentaires dans les conditions recommandées par le pétitionnaire.

### 3.4 Utilité technologique et conditions d'utilisation proposées

L'enzyme alimentaire serait un auxiliaire technologique destiné à la biscuiterie, biscotterie, pâtisserie, viennoiserie et panification courante (à l'exception du pain de tradition française) et panification spéciale.

### 3.5 Exposition alimentaire

La marge de sécurité est calculée selon la méthode du Budget<sup>9</sup> pour la population générale. Les niveaux de consommation alimentaire utilisés sont basés sur la consommation physiologique maximale, c'est-à-dire une consommation quotidienne hors boissons (sauf pour le lait) de 50 g de denrées alimentaires solides/kg de poids corporel. La marge de sécurité est calculée en considérant que 50 % des denrées solides consommées quotidiennement par la population générale sont traitées par l'enzyme à la dose maximale recommandée pour les usages revendiqués avec une activité enzymatique conservée intégralement.

Le rapport de la dose sans effet observé, établie par l'étude de toxicité subchronique pendant 90 jours chez le Rat (860 mg TOS/kg de poids corporel/jour) divisée par la consommation maximale de l'enzyme *via* les denrées alimentaires permet de calculer une marge de sécurité de 123 000.

### 3.6 Données toxicologiques

Toutes les études de toxicité ont été réalisées selon les lignes directrices internationales de l'OCDE<sup>10</sup> 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 NOAEL<sup>11</sup> de 860 mg TOS/kg de poids corporel/jour, correspondant à la dose la plus forte testée.

L'étude de mutagénicité *in vitro* (test d'Ames sur cinq souches de *Salmonella* Typhimurium histidine dépendante) n'a pas révélé d'augmentation du nombre de révertants en présence de l'enzyme alimentaire et donc pas d'effet mutagène. Le test d'aberrations chromosomiques sur des cellules V79 de hamster chinois, *in vitro*, n'a pas mis en évidence d'effet clastogène ou aneugène de l'enzyme alimentaire. Ces deux tests indiquent que l'enzyme alimentaire n'est pas génotoxique.

### 3.7 Allergénicité

Une recherche bioinformatique ne met pas en évidence d'homologies de séquence avec des allergènes connus et donc ne conduit pas à suspecter un potentiel allergique de l'activité enzymatique principale, la xylanase.

### 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 » n'a mis en évidence aucun facteur de risque sanitaire pour le consommateur vis-à-vis de l'emploi de cette xylanase issue d'une souche d'*Aspergillus*

<sup>9</sup> FAO/WHO (2009). Principles and methods for the risk assessment of chemicals in food: Chapter 6. Dietary exposure assessment of chemicals in food. Environmental health criteria 240, World Health Organization 2009. [http://whqlibdoc.who.int/ehc/WHO\\_EHC\\_240\\_9\\_eng\\_chapter6.pdf](http://whqlibdoc.who.int/ehc/WHO_EHC_240_9_eng_chapter6.pdf)

<sup>10</sup> Organisation de Coopération et de Développement Economiques

<sup>11</sup> No Observed Adverse Effect Level

*acidus* modifiée génétiquement porteuse d'un gène muté codant une xylanase d'*Aspergillus acidus* (souche RF 7398) en biscuiterie, biscotterie, pâtisserie, viennoiserie, panification courante (à l'exception du pain de tradition française) et panification spéciale.

#### **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 pas mis en évidence de risque sanitaire pour le consommateur vis-à-vis de l'emploi de cette xylanase issue d'une souche d'*Aspergillus acidus* modifiée génétiquement porteuse d'un gène muté codant une xylanase d'*Aspergillus acidus* (souche RF 7398) en biscuiterie, biscotterie, pâtisserie, viennoiserie, panification courante (à l'exception du pain de tradition française) et panification spéciale. L'Anses rend donc un avis favorable à cette demande.

Marc Mortureux

#### **MOTS-CLES**

Enzyme, auxiliaire technologique, xylanase, *Aspergillus acidus*, biscuiterie, biscotterie, pâtisserie, viennoiserie, panification, panification spéciale