

Le directeur général

Maisons-Alfort, le 24 février 2017

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 triacylglycérol lipase
issue d'une souche non génétiquement modifiée de *Penicillium roqueforti* en panification
(à l'exception du pain de tradition française) et panification spéciale, pour la production
de produits laitiers utilisés à des fins aromatiques, de matières grasses hydrolysées
et d'ingrédients pour les préparations aromatisantes**

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 11 mars 2016 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 triacylglycérol lipase issue d'une souche non génétiquement modifiée de *Penicillium roqueforti* en panification (à l'exception du pain de tradition française) et panification spéciale, pour la production de produits laitiers utilisés à des fins aromatiques, de matières grasses hydrolysées et d'ingrédients pour les préparations aromatisantes.

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'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) ».

Après consultation du Groupe de travail (GT) « Biotechnologie », réuni les 19 mai et 19 octobre 2016, l'Anses a effectué deux demandes de compléments d'information auprès de la DGCCRF, les 27 mai et 3 novembre 2016. Elles ont fait l'objet de réponses respectivement les 3 octobre 2016 et 1^{er} février 2017 permettant de poursuivre l'expertise.

L'expertise collective a été menée par le GT « Biotechnologie » les 19 mai et 19 octobre 2016 et le 16 février 2017, sur la base de rapports initiaux rédigés par quatre 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 triacylglycérol lipase (E.C. 3.1.1.3). L'enzyme hydrolyse préférentiellement les acides gras à courtes et moyennes chaînes. L'hydrolyse a lieu en position 1 et 3 du triacylglycérol.

Une unité d'activité de la triacylglycérol lipase est définie comme la quantité d'enzyme nécessaire pour libérer à partir d'huile d'olive, une micromole d'acides gras en une minute, à 37 °C et pH 7.0.

Les caractéristiques de l'enzyme alimentaire sont décrites. Les solides organiques totaux (TOS⁵) sont calculés selon la formule $TOS = (100 \% - \text{humidité} - \text{cendres})/\text{niveau de dilution}$. La formulation finale de la triacylglycérol lipase se présente sous forme de poudre avec une activité minimale garantie de 900 U/g et un TOS d'environ 1,98 % (p/p). La stabilité de l'enzyme alimentaire est documentée.

Le pétitionnaire présente les méthodes d'analyse utilisées pour la recherche des activités enzymatiques secondaires ainsi que les résultats obtenus. Une activité alpha-amylase est présente en quantité limitée.

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 répondent aux exigences de l'arrêté du 19 octobre 2006 modifié⁶. Les principales mycotoxines des moisissures ainsi que des mycotoxines plus spécifiquement présentes chez *Penicillium roqueforti* (roquefortine C, citrinine, patuline, acide pénicillique, acide mycophénolique) ont été recherchées. Le pétitionnaire indique que le dosage des PR-toxines n'est pas possible par manque de produit de référence.

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

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

3.2 Organisme de production et procédé de fabrication

3.2.1 Organisme de production

La souche de production de l'enzyme alimentaire est la souche de *Penicillium roqueforti* AE-LRF non génétiquement modifiée, sélectionnée après repiquage d'une souche parentale par dosage de la production de la triacylglycérol lipase.

Une revue de la littérature sur *Penicillium roqueforti* montre que cette espèce n'est pas pathogène pour l'Homme. Le pétitionnaire identifie les différentes mycotoxines potentiellement produites par l'espèce *Penicillium roqueforti* et le danger de chacune. Il argumente sur la production potentielle de mycotoxines par la souche de production et leurs présences dans l'enzyme alimentaire.

3.2.2 Procédé de fabrication

L'enzyme alimentaire est obtenue en culture submergée, suivie d'étapes de filtrations, de purifications, de séchage et de formulation de l'enzyme alimentaire. Les additifs et auxiliaires technologiques utilisés sont indiqués.

L'enzyme alimentaire est produite selon les Bonnes Pratiques de Fabrication pour l'alimentation humaine (cGMP) et les principes de l'HACCP. La production de l'enzyme répond aux normes FSSC ISO 22000 et ISO 14001 :2004. Les matières premières utilisées sont de qualité alimentaire. Compte tenu de l'organisme de production, espèce potentiellement productrice de mycotoxines et d'autres métabolites secondaires toxiques, il convient de mettre en place une surveillance de ces substances dans la production de l'enzyme alimentaire en actualisant les contrôles en fonction de la disponibilité des standards.

3.3 Réaction et devenir dans les denrées alimentaires

Les produits de réaction de la triacylglycérol lipase sont des acides gras, des mono et diglycérides et du glycérol.

Dans les conditions recommandées par le pétitionnaire, la triacylglycérol lipase ainsi que l'activité secondaire alpha-amylase sont inactivées de façon irréversible par la cuisson ou par des étapes de chauffage intervenant dans la production des différentes denrées alimentaires revendiquées.

3.4 Utilité technologique et conditions d'utilisation proposées

L'enzyme alimentaire serait un auxiliaire technologique destiné à la panification (à l'exception du pain de tradition française) et la panification spéciale, à la production de produits laitiers utilisés à des fins aromatiques, de matières grasses hydrolysées et d'ingrédients pour les préparations aromatisantes.

3.5 Exposition alimentaire

La marge de sécurité est calculée selon la méthode du Budget⁷ 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/kg de poids corporel, et de 100 ml de boissons/kg de poids corporel. L'exposition alimentaire est calculée en considérant que 12,5 % des denrées alimentaires et 25 % des boissons 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 dans les denrées et boissons.

Le rapport de la dose sans effet observé (NOAEL), établie par l'étude de toxicité subchronique pendant 90 jours chez le Rat (895 mg TOS/kg de poids corporel/jour) divisée par la consommation alimentaire maximale de l'enzyme permet de calculer une marge de sécurité de 1119.

⁷ 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

Le pétitionnaire présente également des calculs d'exposition alimentaire (moyenne et au 95^{ème} percentile) pour différentes classes d'âge de la population en utilisant des données de consommation alimentaire françaises présentes dans la base de données européenne Datex⁸ pour les catégories de denrées correspondantes à la demande d'autorisation d'emploi de l'enzyme. Les marges de sécurité calculées à partir de ces données de consommation (moyenne et au 95^{ème} percentile) et de la NOAEL de l'enzyme, sont toutes supérieures à la marge de sécurité obtenue par la méthode du Budget.

3.6 Données toxicologiques

Toutes les études de toxicité ont été réalisées en conformité avec les Bonnes Pratiques de Laboratoire.

L'étude de toxicité subchronique par administration orale répétée pendant 90 jours chez le Rat conclut à une NOAEL⁹ de 2000 mg d'enzyme/kg poids corporel/jour soit 895 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 quatre souches de *Salmonella* Typhimurium histidine dépendante et une souche d'*Escherichia coli* tryptophane dépendante) n'a pas révélé d'augmentation du nombre de révertants en présence de l'enzyme alimentaire jusqu'à 5000 µg d'enzyme/boîte et donc pas d'effet mutagène. Le test d'aberrations chromosomiques sur des fibroblastes pulmonaires de hamster chinois, *in vitro*, réalisé selon la ligne directrice OCDE¹⁰ 473 n'a pas mis en évidence d'effet clastogène ou aneugène de l'enzyme alimentaire jusqu'à la dose de 5000 µg d'enzyme/ml en absence ou en présence de système d'activation métabolique S9. Ces deux tests indiquent que l'enzyme alimentaire n'est pas génotoxique dans ces conditions.

3.7 Allergénicité

Une recherche bioinformatique n'a pas mis 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 triacylglycérol lipase.

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 pas mis en évidence de risque sanitaire pour le consommateur vis-à-vis de l'emploi de cette triacylglycérol lipase issue de la souche non génétiquement modifiée de *Penicillium roqueforti* AE-LRF en panification (à l'exception du pain de tradition française) et panification spéciale, pour la production de produits laitiers utilisés à des fins aromatiques, de matières grasses hydrolysées et d'ingrédients pour les préparations aromatisantes.

⁸ <http://www.efsa.europa.eu/en/datexfoodcdb/datexfooddb.htm>

⁹ No Observed Adverse Effect Level

¹⁰ Organisation de Coopération et de Développement Economiques

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 triacylglycérol lipase issue de la souche non génétiquement modifiée de *Penicillium roqueforti* AE-LRF en panification (à l'exception du pain de tradition française) et panification spéciale, pour la production de produits laitiers utilisés à des fins aromatiques, de matières grasses hydrolysées et d'ingrédients pour les préparations aromatisantes. L'Anses rend donc un avis favorable à cette demande.

Dr Roger Genet

MOTS-CLES

Enzyme, auxiliaire technologique, triacylglycérol lipase, *Penicillium roqueforti*, panification, panification spéciale, produits laitiers à des fins aromatiques, matières grasses hydrolysées, préparations aromatisantes.

Enzyme, processing aid, triacylglycerol lipase, *Penicillium roqueforti*, baking industry, enzymatic modified cheese, enzymatic modified dairy products, enzymatic modified oil, flavouring substances