

Le directeur général

Maisons-Alfort, le 31 mars 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 *Candida cylindracea* en panification  
(à l'exception du pain de tradition française) et panification spéciale  
ainsi que pour la production de produits laitiers utilisés à des fins aromatiques  
et de matières grasses concentrées en EPA et en DHA**

---

*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 3 octobre 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 *Candida cylindracea* en panification (à l'exception du pain de tradition française) et panification spéciale ainsi que pour la production de produits laitiers utilisés à des fins aromatiques et de matières grasses concentrées en EPA et en DHA.

#### **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'European Food Safety Authority (EFSA) pour la soumission d'un dossier sur les enzymes alimentaires.

---

<sup>1</sup> 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

<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

<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

## **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 le 15 décembre 2016, l'Anses a effectué une demande de compléments d'information auprès de la DGCCRF, le 23 décembre 2016. Le 28 février 2017, l'Anses a reçu des éléments de réponse permettant de poursuivre l'expertise.

L'expertise collective a été menée par le GT « Biotechnologie » le 15 décembre 2016 et le 16 mars 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 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 triacylglycérol lipase (E.C. 3.1.1.3). L'enzyme hydrolyse préférentiellement les acides gras à courtes et moyennes chaînes.

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 (TOS<sup>5</sup>) 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 30000 U/g et un TOS moyen de 8,22 % (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.

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 modifié<sup>6</sup>. Le pétitionnaire indique que les filtrations et micro-filtration réalisées lors de la production de l'enzyme alimentaire permettent d'éliminer les cellules de la souche de production de l'enzyme alimentaire. La recherche de la souche de production dans différents lots d'enzyme alimentaire qui permettrait de vérifier cette déclaration n'a pas été réalisée.

<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

<sup>6</sup> 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 *Candida cylindracea* AE-LAYH non génétiquement modifiée, obtenue par une série de mutations conventionnelles.

L'EFSA a classé cette espèce « qualified presumption of safety » (QPS) depuis 2014. Elle figure dans la liste actualisée en 2016<sup>7</sup>. *Candida cylindracea* est considérée QPS par l'EFSA, uniquement pour la production d'enzyme.

L'espèce *Candida cylindracea* appartient toutefois au même genre que *Candida albicans*, pathogène pour l'Homme via la production de gliotoxines. Par sécurité, les gliotoxines ont été recherchées sur trois lots d'enzyme alimentaire et ces dosages ont été négatifs.

Des études d'identification phénotypique et moléculaire ont été conduites sur la souche de production AE-LAYH et permettent de caractériser l'espèce du micro-organisme comme *Candida cylindracea*. Le certificat de dépôt dans une collection de souches de micro-organismes est fourni pour une souche intermédiaire mais pas pour la souche de production.

La souche de production de l'enzyme alimentaire est la souche de *Candida cylindracea* non génétiquement modifiée AE-LAYH.

#### 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 de qualité alimentaire.

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 à la norme FSSC ISO 22000. Les matières premières utilisées sont de qualité alimentaire.

### 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 est inactivée 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 concentrées en EPA et en DHA.

### 3.5 Exposition alimentaire

La marge de sécurité est calculée selon la méthode du Budget<sup>8</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

<sup>7</sup> Scientific Opinion on the maintenance of the list of QPS biological agents intentionally added to food and feed (2013 update). EFSA Journal 2013;11(11):3449, 107 pp.

EFSA BIOHAZ Panel (EFSA Panel on Biological Hazards), 2016. Statement on the update of the list of QPS-recommended biological agents intentionally added to food or feed as notified to EFSA 4: suitability of taxonomic units notified to EFSA until March 2016. EFSA Journal 2016;14(7):4522, 37 pp. doi:10.2903/j.efsa.2016.4522

<sup>8</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)

denrées alimentaires/kg de poids corporel. L'exposition alimentaire est calculée en considérant que 50 % des denrées alimentaires 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 choix des 50 % est basé sur l'étendue des denrées alimentaires, objets de la demande d'autorisation d'emploi de l'enzyme. Les produits traités par l'enzyme étant des ingrédients entrant dans la composition de denrées complexes, le pétitionnaire présente des pourcentages correctifs sur les calculs d'exposition pour les différentes applications et utilise la dose d'enzyme la plus élevée pour une application représentative de son emploi.

Le rapport de la dose sans effet néfaste observé (NOAEL<sup>9</sup>), établie par l'étude de toxicité subchronique pendant 90 jours chez le Rat (570 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 3167.

Le pétitionnaire présente également des calculs d'exposition alimentaire, moyenne et au 95<sup>ème</sup> percentile, pour différentes classes d'âge de la population en utilisant des données de consommation alimentaire françaises présentes dans la base de données européenne Datex<sup>10</sup> 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 et de la NOAEL de l'enzyme sont supérieures à la marge de sécurité obtenue par la méthode du Budget.

### 3.6 Données toxicologiques

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

L'étude de toxicité subchronique par administration orale réitérée pendant 90 jours chez le Rat conclut à une NOAEL de 570 mg TOS/kg 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 5,7 mg TOS/boîte et donc pas d'effet mutagène. Le test d'aberrations chromosomiques sur des fibroblastes pulmonaires de hamster chinois, *in vitro*, n'a pas mis en évidence d'effet clastogène ou aneugène de l'enzyme alimentaire à la dose de 285 mg TOS/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. Les concentrations d'enzyme mises en œuvre dans les études de génotoxicité sont exprimées en pourcentage du lot test dans les données fournies. Les données figurant ci-dessus ont été calculées par le GT « Biotechnologie ».

### 3.7 Allergénicité

La comparaison de séquences de la triacylglycérol lipase de *Candida cylindracea* avec la séquence de la cholestérol estérase de *Candida rugosa* identifiée comme allergène respiratoire potentiel (Allergome.org) montre une identité de 86,5 %. Ces homologies laissent supposer un potentiel allergique respiratoire de la triacylglycérol lipase, objet de la demande.

La consommation orale de la triacylglycérol lipase de *Candida cylindracea* *via* les denrées traitées n'est pas une voie à risque pour ce potentiel allergénique. Mais sur le site de production et lors de la mise en œuvre de l'enzyme, il conviendra de prévenir chez les opérateurs, le risque de sensibilisation par inhalation et par contact cutané d'aérosols ou de particules de cette enzyme

<sup>9</sup> No Observed Adverse Effect Level

<sup>10</sup> <http://www.efsa.europa.eu/en/datexfoodcdb/datexfooddb.htm>

alimentaire. Le port de masque et de vêtements de protection devra être recommandé pour prévenir les sensibilisations des opérateurs.

### **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 d'une souche non génétiquement modifiée de *Candida cylindracea* (AE-LAYH) en panification (à l'exception du pain de tradition française) et panification spéciale ainsi que pour la production de produits laitiers utilisés à des fins aromatiques et de matières grasses concentrées en EPA et en DHA.

## **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 d'une souche non génétiquement modifiée de *Candida cylindracea* (AE-LAYH) en panification (à l'exception du pain de tradition française) et panification spéciale ainsi que pour la production de produits laitiers utilisés à des fins aromatiques et de matières grasses concentrées en EPA et en DHA. L'Anses rend donc un avis favorable à cette demande.

Dr Roger Genet

## **MOTS-CLES**

Enzyme, auxiliaire technologique, triacylglycérol lipase, *Candida cylindracea*, panification, panification spéciale, produits laitiers à des fins aromatiques, matières grasses hydrolysées

Enzyme, processing aid, triacylglycerol lipase, *Candida cylindracea*, baking industry, enzymatic modified cheese, enzymatic modified dairy products, enzymatic modified oil