

Le directeur général

Maisons-Alfort, le 28 août 2018

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 bêta-galactosidase
issue d'une souche de *Papiliotrema terrestris* (*Cryptococcus terrestris*)
non génétiquement modifiée pour la production de galacto-oligosaccharides**

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 6 décembre 2017 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 bêta-galactosidase issue d'une souche de *Papiliotrema terrestris* (*Cryptococcus terrestris*) non génétiquement modifiée pour la production de galacto-oligosaccharides.

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'Autorité européenne de sécurité des aliments/European Food Safety Authority (EFSA) pour la soumission d'un dossier sur les enzymes alimentaires.

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) ».

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.

Après consultation du Groupe de travail (GT) « Biotechnologie », réuni le 15 février 2018, l'Anses a effectué une demande de compléments d'information auprès de la DGCCRF, le 12 mars 2018. Le 3 août 2018, l'Anses a reçu des éléments de réponse permettant de poursuivre l'expertise.

L'expertise collective a été menée par le GT « Biotechnologie » les 15 février et 16 août 2018, sur la base de rapports initiaux rédigés par quatre rapporteurs et d'une expertise réalisée en interne par l'Unité d'évaluation des risques liés aux aliments avec l'appui de l'unité méthodologie et études, unités de la Direction de l'évaluation des risques (DER) de l'Anses.

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 bêta-D-galactoside galactohydrolase (ou bêta-galactosidase, E.C. 3.2.1.23). Les bêta-galactosidases appartiennent à la famille des glycosidases (enzymes hydrolysant les liaisons O- et S-glycosyles).

La bêta-galactosidase hydrolyse les liaisons bêta-1,4 dans le lactose en une molécule d'alpha-D-glucose et une molécule de bêta-D-galactose. En présence de concentrations élevées en substrat, l'enzyme présente également une activité de transgalactosylation. Elle catalyse alors la synthèse d'une famille d'oligosaccharides dénommés galacto-oligosides ou galacto-oligosaccharides (GOS) par ajout d'un ou plusieurs résidus D-galactosyle sur le galactose du lactose.

Une unité d'activité de la bêta-galactosidase est définie comme la quantité d'enzyme nécessaire pour libérer 1 µg de glucose par minute, à 40 °C et à pH 6,0.

Les caractéristiques de l'enzyme alimentaire sont décrites. La protéine est un homo-dimère. Les solides organiques totaux (TOS⁵) sont calculés selon la formule TOS = 100 % - humidité - cendres - diluants. La formulation finale de la bêta-galactosidase se présente sous forme poudre avec une activité minimale garantie de 1700 U/g et un TOS moyen de 31,26 % (p/p).

Le pétitionnaire présente les méthodes d'analyse utilisées pour la recherche des activités enzymatiques principale et secondaires ainsi que les résultats obtenus. Les mesures des deux activités enzymatiques de la bêta-galactosidase, activité hydrolase et activité de transgalactosylation sont réalisées. Une activité secondaire protéase est identifiée mais elle est faible.

Les critères de pureté chimique de l'enzyme alimentaire répondent aux exigences de l'arrêté du 19 octobre 2006 modifié⁶. Les critères de pureté biologique dont l'absence d'activité antibiotique

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.

sont respectés sauf pour la recherche de *Staphylococcus aureus* insuffisamment précise. L'arrêté du 19 octobre 2006 modifié exige le critère : absence de cellules de *Staphylococcus aureus* dans 1 g d'enzyme alimentaire. Les certificats d'analyse présents dans le dossier indiquent que les *Staphylococcus* à coagulase positive ne sont pas détectés mais avec une limite analytique de la méthode à 20 ufc/g d'échantillon. Toutefois, la méthode de production et les autres analyses microbiologiques permettent d'écarter le risque lié à la présence de *Staphylococcus*.

Les principales mycotoxines ont été recherchées et non détectées par les différentes méthodes analytiques utilisées et jugées recevables. L'absence de la souche de production dans l'enzyme alimentaire est démontrée par sa recherche dans différents lots.

3.2 Organisme de production et procédé de fabrication

3.2.1 Organisme de production

La souche de production de l'enzyme alimentaire est une souche de *Papiliotrema terrestris* (synonyme *Cryptococcus terrestris*) non génétiquement modifiée, obtenue par une série de mutations conventionnelles.

Des études d'identification phénotypique et moléculaire ont été conduites sur la souche de production AE-BLC et permettent de caractériser l'espèce du micro-organisme comme *Cryptococcus terrestris*. Le certificat de dépôt dans une collection de souches de micro-organismes n'est pas fourni.

Des informations complémentaires sur la sécurité ont été apportées étant donné que cette espèce fongique n'a jamais été utilisée pour la production d'enzymes alimentaires. Une recherche bibliographique ne met pas en évidence de signaux d'alerte sur la pathogénicité et la toxigénicité de cette espèce. Une étude de pathogénicité a été réalisée en exposant des souris par voie intraveineuse et voie orale à des cellules de souche de production. Cette étude n'a pas révélé d'effet néfaste observé quel que soit le mode d'exposition.

3.2.2 Procédé de fabrication

L'enzyme alimentaire est obtenue par fermentation suivie d'étapes de séparation du micro-organisme, de filtrations, de purifications et de formulation de l'enzyme. Les additifs et auxiliaires technologiques utilisés sont indiqués et leur sécurité documentée pour une utilisation en production alimentaire.

L'enzyme alimentaire est produite selon les Bonnes Pratiques de Fabrication pour l'alimentation humaine (cGMP) et les principes de l'HACCP⁷. Les usines de production sont certifiées FSSC⁸ 22000 : 2005. Les matières premières utilisées sont de qualité alimentaire.

Compte tenu que l'organisme de production est une souche de *Papiliotrema terrestris* (*Cryptococcus terrestris*), espèce fongique et donc potentiellement susceptible de produire des métabolites secondaires toxiques, le GT « Biotechnologie » conseille de mettre en place une surveillance de ces substances lors de 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 bêta-galactosidase sur le lactose sont du glucose, du galactose et des galacto-oligosides. La bêta-galactosidase serait utilisée pour produire un ingrédient alimentaire composé d'un mélange de galacto-oligosides ou galacto-oligosaccharides (GOS). Ce sont des molécules fortement hyperosmotiques et très fermentescibles.

⁷ Hazard Analysis and Critical Control Points

⁸ Food Safety System Certification

Dans les conditions recommandées par le pétitionnaire, la bêta-galactosidase et l'activité secondaire protéase sont inactivées de façon irréversible dans l'ingrédient alimentaire (sirop de GOS) par chauffage et également éliminées par filtration, étapes présentes dans le procédé de fabrication de cet ingrédient. La recherche de ces deux activités enzymatiques est négative dans plusieurs lots d'ingrédient alimentaire (sirop de GOS).

3.4 Utilité technologique de l'enzyme et conditions d'utilisation proposées du produit

L'enzyme alimentaire serait un auxiliaire technologique destiné uniquement à la production d'un ingrédient alimentaire composé d'un mélange de galacto-oligosides ou galacto-oligosaccharides (GOS). Ce produit est un sirop qui serait potentiellement incorporé dans de nombreuses denrées alimentaires consommées par la population générale mais aussi dans des denrées alimentaires destinées spécifiquement à des nourrissons et enfants en bas âge. Les niveaux d'incorporation potentiels de cet ingrédient dans la fabrication de ces différentes denrées sont notifiés par le pétitionnaire.

3.5 Exposition alimentaire

La marge de sécurité est calculée selon la méthode du Budget⁹ pour la population générale. Les niveaux de consommation alimentaire utilisés sont basés sur la consommation physiologique maximale, c'est-à-dire une consommation quotidienne de 0,1 l/kg p.c. de boissons (en dehors du lait) et de 50 g/kg p.c. pour les autres denrées alimentaires. Le calcul de la marge de sécurité est fait en considérant que 25 % des boissons et 25 % des autres denrées alimentaires consommées quotidiennement par la population générale contiennent le sirop de GOS à la concentration maximale indiquée par le pétitionnaire pour chaque grand type de denrées et que ce sirop de GOS a été synthétisé en utilisant l'enzyme à la dose maximale recommandée avec une activité enzymatique conservée intégralement dans le sirop de GOS puis dans les denrées. La dose sans effet néfaste observé (NOAEL¹⁰) obtenue avec l'étude de toxicité orale subchronique pendant 90 jours chez le Rat divisée par l'estimation de l'exposition liée à la consommation quotidienne de bêta-galactosidase *via* les boissons et autres denrées permet de calculer une marge de sécurité de 2000.

Le pétitionnaire présente également des calculs d'exposition alimentaire, moyenne et au 95^{ème} percentile (P95), pour différentes classes d'âge de la population en utilisant des données françaises de consommation alimentaire présentes dans la base de données européenne Datex¹¹ pour les denrées sélectionnées par le pétitionnaire comme susceptibles de faire l'objet d'un ajout de GOS. Afin de maximiser l'exposition, les moyennes de consommation utilisées sont calculées uniquement sur l'échantillon des « individus consommateurs » (exclusion des individus non consommateurs de ces denrées). Pour les classes d'âge au-dessus de 3 ans, les marges de sécurité calculées à partir des moyennes de consommation « seuls consommateurs » et de la NOAEL de l'enzyme sont supérieures à la marge de sécurité obtenue par la méthode du Budget et chez les forts consommateurs (P95), sont inférieures pour la classe d'âge « autres enfants »¹² avec une valeur de 861 et proches pour deux autres classes d'âge : 1687 pour les adolescents¹³ et 1792 pour les seniors¹⁴.

⁹ 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

¹⁰ No Observed Adverse Effect Level

¹¹ <http://www.efsa.europa.eu/en/datexfoodcdb/datexfooddb.htm>

¹² De 36 mois à 9 ans

¹³ De 10 à 17 ans

¹⁴ De 65 à 74 ans

Le pétitionnaire présente également des calculs d'exposition alimentaire pour les nourrissons et enfants en bas âge à partir des données de consommation moyenne de l'annexe de la publication de Hulin *et al.* (2014)¹⁵ qui s'appuie sur les résultats de l'enquête BEBE-SFAE¹⁶. Le pétitionnaire a considéré les 4 classes d'âge définies sur la base des stades de diversification alimentaire (1-4 mois, 5-6 mois, 7-12 mois et 13-36 mois) et sélectionné les denrées susceptibles de faire l'objet d'un ajout de GOS. Ces denrées correspondent à des aliments infantiles et des aliments « courants »¹⁷. Dans ses calculs de contribution potentielle, le pétitionnaire a utilisé les teneurs d'incorporation de GOS qu'il recommande pour chaque denrée, teneur différente aussi selon la destination (alimentation infantile ou courante). Ne disposant pas de données de 95^{ème} percentile, le pétitionnaire a estimé cette forte consommation en multipliant par trois la consommation moyenne de chaque aliment, ce qui est une approche recevable.

En utilisant l'ensemble de ces données de consommation et d'incorporation de GOS, la NOAEL de l'enzyme et en considérant que le sirop de GOS incorporé a été synthétisé en utilisant l'enzyme à la dose maximale recommandée avec une activité enzymatique conservée intégralement dans le sirop de GOS puis dans les denrées, les marges de sécurité calculées à partir des moyennes de consommation ainsi que des estimations des forts consommateurs sont supérieures à la marge de sécurité obtenue par la méthode du Budget pour les trois classes d'âge : 1-4 mois, 5-6 mois, 7-12 mois. Pour la classe d'âge 13-36 mois, la marge de sécurité calculée à partir de la moyenne de consommation est de 1944, proche de la marge de sécurité obtenue par la méthode du Budget, et elle est de 648 avec l'estimation des forts consommateurs.

3.6 Données toxicologiques

Toutes les études de toxicité ont été réalisées selon les lignes directrices internationales de l'OCDE¹⁸ et les Bonnes Pratiques de Laboratoire.

L'étude de toxicité orale subchronique pendant 90 jours chez le Rat conclut à une NOAEL de 2000 mg d'enzyme alimentaire/kg de poids corporel/jour soit 1800 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 jusqu'à 5000 µg d'enzyme alimentaire/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 jusqu'à 5000 µg d'enzyme alimentaire/ml en l'absence ou en présence de système d'activation métabolique S9 pour le temps court (4 h), jusqu'à 2000 µg/ml pour le temps long de traitement sans activation métabolique (24 h) et jusqu'à 75 µg/ml pour le second temps long de

¹⁵ M. Hulin, N. Bemrah, A. Nougadère, J.L. Volatier, V. Sirot & J.C. Leblanc (2014) Assessment of infant exposure to food chemicals: the French Total Diet Study design, Food Additives & Contaminants: Part A, 31:7, 1226-1239 and online supplemental material.

¹⁶ Fantino M. et Gourmet E., 2008. Apports nutritionnels en France en 2005 chez les enfants non allaités âgés de moins de 36 mois. Archives de pédiatrie, 15, 446-455.

Cette enquête a été réalisée sur le terrain du 12 janvier au 10 mars 2005 par la TNS-SOFRES pour le compte du Syndicat Français des Aliments de l'Enfance, membre de l'Alliance 7. Le recueil des données de consommation a été effectué au domicile de 713 enfants (âgés de 15 jours à 36 mois), selon la technique du carnet alimentaire sur trois jours consécutifs (incluant un jour de week-end), repas par repas, noté par les personnes prenant soin des enfants (le plus souvent la mère, et/ou la nourrice, avec la participation des pères).

Ont été inclus dans cette enquête, des nourrissons ou jeunes enfants non allaités au sein (ni exclusivement, ni partiellement) et ne fréquentant pas une crèche collective ou une école durant les trois jours suivant le recrutement. En effet, la quantité de lait consommée par un bébé allaité au sein étant difficile à évaluer, elle aurait nécessité un protocole spécifique et une analyse du lait maternel pour chaque nourrice, voir à chaque prise, compte tenu des variations de la teneur du lait de femme. Les enfants nourris au sein ont donc été exclus par la TNS-SOFRES.

¹⁷ Aliment non spécifique et consommé aussi par les enfants

¹⁸ Organisation de Coopération et de Développement Economiques

traitement sans activation métabolique (48 h). 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'identités de séquences avec des allergènes connus et donc ne conduit pas à suspecter un potentiel allergique de l'activité enzymatique principale, la bêta-galactosidase. Le test de digestion gastrique et intestinale simulée *in vitro* réalisée sur l'enzyme montre une digestion complète.

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 bêta-galactosidase issue d'une souche de *Papiliotrema terrestris* (*Cryptococcus terrestris*) (souche AE-BLC) non génétiquement modifiée pour la production de galacto-oligosaccharides.

Le GT « Biotechnologie » rappelle que les galacto-oligosides (ou galacto-oligosaccharides) ne présentent pas d'effet délétère majeur pour les consommateurs sur le plan toxicologique ou nutritionnel. Seul le risque de diarrhée osmotique temporaire devrait faire l'objet d'une mention en limitant la consommation à 12 g de GOS par jour pour les adultes (Niittynen *et al.*, 2007¹⁹). Une limite d'incorporation à 7,2 g de GOS/l de préparation pour nourrissons est imposée par la réglementation (arrêté du 11 avril 2008 modifié²⁰). Il est par ailleurs important de rappeler que les préparations de GOS contiennent, pour la plupart, de grandes quantités de sucres (lactose, glucose et galactose) dont il faut tenir compte dans les apports nutritionnels.

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 bêta-galactosidase issue d'une souche de *Papiliotrema terrestris* (*Cryptococcus terrestris*) (souche AE-BLC) non génétiquement modifiée pour la production de galacto-oligosaccharides. L'Anses rend donc un avis favorable à cette demande.

Dr Roger Genet

¹⁹ Niittynen L., Kajander K., Korpela R. (2007). Galacto-oligosaccharides and bowel function. *Scand J Food Nutr.* Jun 2007; 51(2): 62–66.

²⁰ Arrêté du 11 avril 2008 relatif aux préparations pour nourrissons et aux préparations de suite et modifiant l'arrêté du 20 septembre 2000 relatif aux aliments diététiques destinés à des fins médicales spéciales.

MOTS-CLES

Enzyme, auxiliaire technologique, bêta-galactosidase, *Papiliotrema terrestris*, *Cryptococcus terrestris*, sirop de galacto-oligosides, galacto-oligosaccharides, GOS

Enzyme, processing aid, beta-galactosidase, *Papiliotrema terrestris*, *Cryptococcus terrestris*, galacto-oligosaccharides, GOS