

Le directeur général

Maisons-Alfort, le 05 JUIL, 2013

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 lysophospholipase
issue d'une souche de *Trichoderma reesei* porteuse d'un gène
d'*Aspergillus nishimurae* pour la fabrication de sirop de glucose

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 4 décembre 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 d'autorisation d'emploi d'une lysophospholipase issue d'une souche de *Trichoderma reesei* porteuse d'un gène d'*Aspergillus nishimurae* pour la fabrication de sirop de glucose.

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° 2011-529 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

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 les 21 février et 21 mars 2013, l'Anses a effectué une demande de compléments d'information auprès de la DGCCRF, le 26 mars 2013. Les 29 avril et 31 mai 2013, 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 21 février, 21 mars, 16 mai et 20 juin 2013.

3. ANALYSE ET CONCLUSIONS DU GT

3.1 Identité de l'enzyme alimentaire⁴

L'enzyme alimentaire est une lysophospholipase (E.C. 3.1.1.5, CAS 9001-85-8). Elle hydrolyse les phospholipides en libérant un acide gras et un glycérophosphate par clivage d'une liaison ester. Cette enzyme appartient à la famille des hydrolases de liaisons esters carboxyliques.

Une unité d'activité de lysophospholipase (LPL U) est définie comme la quantité d'enzyme nécessaire pour produire à partir d'une solution à 0,01 M de lysolécithine, 1 µmol d'acides gras par minute à 55 °C et à pH 4,5.

Les caractéristiques de l'enzyme alimentaire sont décrites. La protéine est composée de deux sous-unités N-glycosylées. Les solides organiques totaux (TOS⁵) sont calculés selon la formule $TOS = 100 \% - \text{humidité} - \text{cendres} - \text{diluants}$. La formulation finale de la lysophospholipase se présente sous forme liquide avec une activité minimale garantie de 10000 LPL U/g et un TOS de 1,56 % (p/p), forme préconisée par le pétitionnaire pour cette application. Le pétitionnaire mentionne également une forme poudre sans présenter ses spécifications.

Des activités secondaires alpha-amylase, amyloglucosidase, bêta-glucanase, cellulase, protéase et xylanase sont indiquées par le pétitionnaire.

Les critères de pureté chimique et biologique de l'enzyme alimentaire répondent aux exigences de l'arrêté du 19 octobre 2006 modifié⁶. La recherche de la souche de production et d'une activité antibactérienne est négative dans l'enzyme alimentaire.

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

Sécurité du micro-organisme hôte

La souche hôte de *Trichoderma reesei* est issue de la souche QM6a par mutagénèses classiques et transformation génétique. *Trichoderma reesei*, organisme considéré non-pathogène et non-toxinogène, a un historique d'utilisation pour la production d'enzymes.

Identité des micro-organismes donneurs

La séquence codante de la lysophospholipase a été isolée d'une souche d'*Aspergillus nishimurae*, classée initialement comme *Aspergillus fumigatus*.

La séquence codante d'un gène de résistance aux antibiotiques de la famille de la phléomycine (gène *ble*) a été isolée d'une souche de *Streptoalloteichus hindustanus*.

Obtention de la souche de production

Les transgènes sont intégrés dans le génome fongique. Des informations sont présentées sur différentes étapes de la généalogie et de la transformation de la souche de production.

La stabilité de la souche de production est documentée par le pétitionnaire.

La souche de production de la préparation enzymatique est la souche de *Trichoderma reesei* génétiquement modifiée RF 7206 (RH31920 ou CBS 125079). La sélection de la souche de production se fait sur une résistance aux antibiotiques de la famille de la phléomycine.

L'utilisation de cette résistance aux antibiotiques pour la sélection de la souche transformée n'apparaît pas dans ces conditions, comme un facteur particulièrement préoccupant puisque :

- le gène *ble* est intégré de façon stable dans le génome de la souche de production,
- le procédé de fabrication conduit à l'absence de la souche de production et de son ADN dans l'enzyme alimentaire,
- et que ces antibiotiques ne sont pas utilisés à des fins d'antibiothérapie humaine.

3.2.2 Procédé de fabrication

Le procédé de production de l'enzyme alimentaire est un procédé de fermentation submergée aérobie, suivie d'étapes de séparation du micro-organisme, de concentrations, de filtrations et de formulation de l'enzyme. Les additifs et auxiliaires technologiques utilisés dans cette production sont indiqués et leur sécurité documentée.

L'enzyme alimentaire est produite selon les Bonnes Pratiques de Fabrication pour l'alimentation humaine (cGMP) sur une analyse HACCP⁷. L'usine de production est certifiée aux normes ISO 9001 : 2008 et ISO 22000 : 2005. Les matières premières utilisées sont de qualité alimentaire.

3.3 Réaction et devenir dans les denrées alimentaires

Les produits de la réaction de la lysophospholipase sont des acides gras libres et du phosphatide de glycérol. La lysophospholipase est inactivée par les étapes de chauffage, de purification et de filtration des sirops de glucose, intervenant dans les procédés de fabrication de ces ingrédients, dans les conditions recommandées par le pétitionnaire.

⁷ Hazard Analysis and Critical Control Points

3.4 Utilité technologique et conditions d'utilisation proposées

L'enzyme alimentaire serait un auxiliaire technologique destiné à la production industrielle de sirop de glucose. Les conditions d'utilisation de l'enzyme alimentaire dans les denrées alimentaires revendiquées sont présentées par le pétitionnaire.

3.5 Exposition alimentaire

La marge de sécurité est calculée selon la méthode du Budget⁸. 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. de denrées alimentaires solides. Le calcul de la marge de sécurité est fait en considérant que 50 % des denrées solides et 25 % des boissons consommées quotidiennement par la population générale sont traitées par l'enzyme à la dose maximale recommandée et que l'activité enzymatique est conservée intégralement dans les denrées. La NOAEL⁹ obtenue avec l'étude de toxicité orale sub-chronique pendant 90 jours chez le Rat est de 955 mg TOS/kg p.c./jour. La marge de sécurité calculée en utilisant cette NOAEL et la consommation quotidienne de lysophospholipase estimée est alors de 138405.

3.6 Données toxicologiques

Toutes les études de toxicité ont été réalisées selon les lignes directrices internationales de l'OCDE¹⁰ et en conformité avec les Bonnes Pratiques de Laboratoire.

Une augmentation dose-dépendante de la natrémie est observée chez les mâles sans autre modification constatée sur l'ionogramme sanguin. Les données mesurées entrent dans l'intervalle des données historiques du laboratoire et les autres données mesurées ne permettent pas de suspecter une atteinte de la fonction rénale.

L'étude de toxicité orale sub-chronique pendant 90 jours chez le Rat conclut donc à une NOAEL de 1000 mg d'enzyme/kg p.c./jour soit 955 mg TOS/kg p.c./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 révélé aucune augmentation du nombre de révertants en présence de l'enzyme alimentaire et donc aucun effet mutagène. Le test d'aberrations chromosomiques sur des cellules pulmonaires de hamster chinois, en culture, 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

Singh *et al.* (2010) ont montré le caractère allergénique de deux lysophospholipases d'une souche d'*Aspergillus fumigatus*, PBL1 et PBL3. La comparaison de séquences de

⁸ 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

⁹ No Observed Adverse Effect Level

¹⁰ Organisation de Coopération et de Développement Economiques

la lysophospholipase d'*Aspergillus nishimurae* avec les séquences de ces deux lysophospholipases montrent une identité de 88,14 % avec PBL 3 et de 66,43 % avec PBL1. Ces homologues laissent supposer un potentiel allergénique respiratoire de la lysophospholipase, objet de la demande.

La consommation orale de la lysophospholipase d'*Aspergillus nishimurae* 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 alimentaire, particulièrement pour la forme poudre de l'enzyme. Le port de masque et de vêtements de protection devra être recommandé pour prévenir les sensibilisations des opérateurs comme le prévoit le pétitionnaire.

3.8 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 lysophospholipase issue d'une souche de *Trichoderma reesei* porteuse d'un gène d'*Aspergillus nishimurae* (RF 7206, RH31920 ou CBS 125079) pour la fabrication de sirop de glucose.

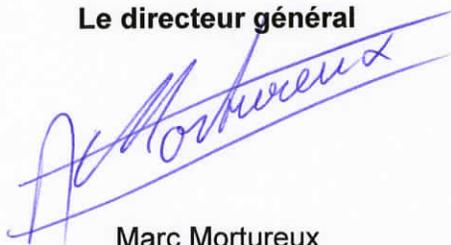
En accord avec les indications du pétitionnaire, le GT « Biotechnologie » préconise des mesures de protection respiratoire et cutanée des opérateurs afin de prévenir leur sensibilisation à la lysophospholipase.

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 lysophospholipase issue d'une souche de *Trichoderma reesei* porteuse d'un gène d'*Aspergillus nishimurae* (RF 7206, RH31920 ou CBS 125079) pour la fabrication de sirop de glucose. L'Anses rend donc un avis favorable à cette demande.

En accord avec les indications du pétitionnaire, l'Anses préconise des mesures de protection respiratoire et cutanée des opérateurs afin de prévenir leur sensibilisation à la lysophospholipase.

Le directeur général



Marc Mortureux

MOTS-CLES

Enzyme, auxiliaire technologique, lysophospholipase, *Trichoderma reesei*, *Aspergillus nishimurae*, sirop de glucose

BIBLIOGRAPHIE

Singh, B., Oellerich, M., Kumar, R., Bhadoria, D.P., Reichard, U., Gupta, V.K., Sharma, G.L., Asif, A.R. (2010) Immuno-reactive molecules identified from the secreted proteome of *Aspergillus fumigatus*. J. Proteome Res. 9, 5517-5529.