

## AVIS

### de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments relatif à l'autorisation d'emploi d'une hexose oxydase de *Hansenula polymorpha* B13-HOX4-Mut45 pour la production de produits de panification et de boulangerie fine

Par courrier reçu le 24 février 2004, l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments (Afssa) a été saisie le 16 février 2004 par la Direction générale de la concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes d'une demande d'avis relatif à l'autorisation d'emploi d'une hexose oxydase de *Hansenula polymorpha* B13-HOX4-Mut45 pour la production de produits de panification et de boulangerie fine.

#### Contexte

L'Afssa avait été saisie le 13 mai 2002 d'une demande d'avis relatif à l'autorisation d'emploi d'une hexose oxydase de *Hansenula polymorpha* génétiquement modifiée dans les produits de panification et boulangerie fine, les pâtes et nouilles, les fromages frais et affinés, les frites de pommes de terre, les poudres de blancs d'œufs, les produits à base de protéines de lactosérum, le tofu, le ketchup, la mayonnaise et les sauces salades. Suite à l'expertise de ce dossier par les Comités d'experts spécialisés « Biotechnologie » et « Additifs, arômes et auxiliaires technologiques », l'Afssa a rendu un avis défavorable à cette demande le 28 mars 2003.

La société limite aujourd'hui le champ d'application de son enzyme, et souhaite une autorisation de cette hexose oxydase pour la production de produits de panification et de boulangerie fine.

Le dossier est composé d'éléments de réponse à chaque point de l'avis de l'Afssa du 28 mars 2003 et des justificatifs s'y rapportant.

Après consultation des Comités d'experts spécialisés « Biotechnologie », réuni le 15 avril 2004, et « Additifs, arômes et auxiliaires technologiques », réuni le 27 avril 2004 et le 6 juillet 2004, l'Afssa rend l'avis suivant sur cette demande.

#### Sur les aspects technologiques

Considérant que les applications de l'enzyme hexose oxydase envisagées dans la présente demande concernent uniquement les farines issues du blé, du seigle et d'autres céréales, destinées à la production de produits de panification et de boulangerie fine ;

Considérant que le mécanisme d'action de l'hexose oxydase consiste à oxyder en lactones les monosaccharides (hexoses) et certains disaccharides comme le maltose, en produisant de manière stœchiométrique du peroxyde d'hydrogène et considérant que les glucono-lactones produites sont ensuite hydrolysées pour former des acides organiques : acides gluconique, maltobionique ;

Considérant que l'emploi de l'enzyme hexose oxydase a pour but de produire du peroxyde d'hydrogène dans des proportions supérieures à celles produites spontanément par l'addition de levure lors de la panification ;

Considérant que la présence naturelle de catalase dans les farines, enzyme capable de dégrader le peroxyde d'hydrogène, supporte la demande du pétitionnaire d'ajouter en hexose oxydase les farines afin de parvenir aux buts technologiques recherchés ;

Considérant que le peroxyde d'hydrogène ainsi produit oxyde des groupements thiols (-SH) du gluten et provoque la formation de ponts di-sulfures (S-S) responsables des modifications d'élasticité et de résistance mécanique recherchées pour la pâte ;

Considérant que selon les estimations du pétitionnaire, établies indirectement à partir des mesures analytiques de production d'acides gluconique et maltobionique, l'addition de 100 Unités (U) par kg de farine provoquerait une production de peroxyde d'hydrogène supérieure d'environ 2 mg à la production observée dans une farine non traitée avec l'enzyme ;

Considérant que ces estimations sont recevables à défaut de méthodes d'analyse directes pour le peroxyde d'hydrogène, utilisables dans ces matrices ;

Considérant que la diminution progressive de groupements thiols dans la pâte a été démontrée expérimentalement avec des doses croissantes d'hexose oxydase ;

Considérant que la demande du pétitionnaire est d'utiliser l'enzyme hexose oxydase à la dose maximale d'emploi de 24 U d'activité enzymatique par kg de farine mise en œuvre lors des étapes de réhydratation et de pétrissage ;

Considérant, toutefois, que dans la mesure où les données présentées sur les essais techniques sont essentiellement d'ordre qualitatif et non pas quantitatif, il n'est pas possible d'apprécier la justification technologique concernant le choix de la dose maximale d'emploi proposée. Par conséquent en l'absence de ces éléments, cette dose est simplement considérée comme efficace et répondant aux objectifs technologiques recherchés ;

#### **Identité de la souche de production**

Considérant que le schéma d'obtention de la souche de production B13-HOX4 -Mut 45 est fourni, ainsi qu'un certificat d'identification attestant que la souche de départ ATCC 344 38 est bien une *Hansenula polymorpha* ;

#### **Fourniture d'informations sur les BPF<sup>1</sup> pour production, conditionnement et stockage**

Considérant que des éléments de garantie d'application des bonnes pratiques de fabrication sont fournis par le pétitionnaire ;

#### **Fourniture d'un facteur de sécurité pour les applications revendiquées**

Considérant que le facteur de sécurité relatif à l'enzyme est calculé à partir de l'enquête sur les consommations alimentaires INCA<sup>2</sup> de 1999, et que celui-ci est satisfaisant ;

#### **Inactivation de la préparation enzymatique dans le produit final**

Considérant que l'inactivation de l'hexose oxydase se produit après 10 minutes à 70 °C, conditions rencontrées dans les conditions d'utilisation revendiquées,

#### **Aspects toxicologiques**

Considérant que l'hexose oxydase est un système enzymatique normal impliqué dans le métabolisme cellulaire oxydatif des mono- et disaccharides et que le mécanisme d'action est comparable à celui d'un système glucose oxydase, ce dernier étant commercialisé depuis plus de cinquante ans pour le traitement des farines ;

---

<sup>1</sup> Bonnes pratiques de fabrication

<sup>2</sup> Individuelle et nationale sur les consommations alimentaires

Considérant que la production accrue de peroxyde d'hydrogène et de ses produits de réaction par l'enzyme hexose oxydase et l'éventuelle présence de résidus bromure de lauryl triméthyle ammonium (LTAB), constituent les principaux dangers qui nécessitent une évaluation du risque dans cette demande ;

Considérant recevable le raisonnement du pétitionnaire, soutenu par certains essais expérimentaux, selon lequel l'excès de peroxyde d'hydrogène (inférieur à 2 mg par kg de farine) produit par l'addition de 24 U de l'enzyme hexose oxydase, est en grande partie consommé dans l'oxydation de thiols du gluten et dégradé par la catalase présente naturellement dans la farine ;

Considérant que le dossier présente une étude de toxicité de 13 semaines chez le rat, réalisée avec une préparation enzymatique d'hexose oxydase, dans laquelle aucun effet indésirable n'a été observé à la plus haute dose testée, 5 000 U d'hexose oxydase/kg de poids corporel (p.c.) par jour ;

Considérant recevable l'argumentaire du pétitionnaire selon lequel sont comparables la toxicité génique ainsi que la toxicité sur la reproduction et le développement des ammoniums quaternaires, dont le LTAB et le bromure d'hexadécyltriméthyle ammonium (CTAB) ;

Considérant que les nombreux tests toxicologiques réalisés sur le CTAB n'ont pas montré d'effets indésirables ;

Considérant que les mesures analytiques réalisées sur la préparation enzymatique utilisée pour l'étude précédente, contenant 420 000 U d'hexose oxydase par kg de préparation enzymatique, montrent la présence de 1 100 ppm de LTAB (1 100 mg par kg de préparation) ;

Considérant que la dose maximale d'emploi d'enzyme hexose oxydase préconisée par le pétitionnaire est de 24 U d'activité enzymatique par kg de farine mise en œuvre lors des étapes de réhydratation et de pétrissage ;

Considérant que cette dose maximale d'emploi contiendrait environ 63 µg de LTAB par kg de farine mise en œuvre ;

Considérant que les données françaises de consommation de pain, des biscottes, des pâtes, des viennoiseries, des biscuits, des pâtisseries, des pizzas, des quiches, des tartes salées et des sandwiches aboutissent à une consommation moyenne cumulée de farine d'environ 263 g et 231 g par individu et par jour, respectivement pour les adultes et les enfants<sup>3</sup> ;

Considérant que dans ces conditions et selon un scénario d'exposition extrême, l'exposition au LTAB provenant des emplois préconisés serait de l'ordre de 16 µg et 14 µg par personne et par jour, respectivement pour les adultes et les enfants ;

Considérant que la plus haute dose testée de la préparation enzymatique (5 000 U) dans l'étude de 13 semaines chez le rat qui n'a pas présenté d'effets indésirables, correspondrait à une dose d'environ 13 mg de LTAB / kg p.c. par jour ;

Considérant, en comparaison, que compte tenu des estimations de consommation et des emplois revendiqués, l'exposition maximale théorique au LTAB de la population serait d'environ 0,3 µg/kg p.c. par jour et 0,5 µg/kg p.c. par jour, respectivement pour les adultes et les enfants<sup>4</sup> ;

Considérant en conséquence que cette exposition maximale théorique reste très en dessous (entre 26 000 et 43 000 fois moindre) de la plus haute dose testée de LTAB qui n'a pas présenté d'effets indésirables dans l'étude toxicologique de 13 semaines chez le rat ;

<sup>3</sup> Enquête INCA individuelle et nationale sur les consommations alimentaires. Ed. Tec&Doc. 2000.

<sup>4</sup> Pour un adulte de 60 kg,  $16\mu\text{g LTAB par jour}/60 = 0,3\ \mu\text{g LTAB/kg p.c. par jour}$  ; pour un enfant de 31,6 kg :  $\mu\text{g}/31,6 = 0,5\ \mu\text{g LTAB/kg p.c. par jour}$ .

**Aspect des autorisations existantes**

Considérant que l'hexose oxydase a obtenu le statut GRAS (Generally recognised as safe) aux Etats-Unis depuis 2001 ; que son emploi est autorisé au Danemark pour les produits de panification à une dose maximale de 2 500 U/kg de farine depuis 2002 et en Australie et en Nouvelle Zélande dans les denrées alimentaires en général depuis 2003,

**Conclusion**

Le document complémentaire produit par le pétitionnaire, à l'appui de sa demande d'autorisation d'emploi d'une hexose oxydase produite par une souche recombinée de *Hansenula polymorpha* répond aux différentes questions soulevées dans le premier avis de l'Afssa.

L'Afssa estime en conséquence que, sous réserve de la non utilisation de méthanol en tant qu'inducteur dans le procédé de fabrication de la préparation enzymatique, l'emploi de l'hexose oxydase de *Hansenula polymorpha* B13-HOX4-Mut45 pour la production de produits de panification et de boulangerie fine à la dose maximale de 24 U d'activité enzymatique par kg de farine mise en œuvre et conduisant à la présence maximale de 63 µg de LTAB par kg de farine mise en œuvre, ne présente pas de risque sanitaire pour le consommateur.

**Martin HIRSCH**