

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 alpha-amylase issue d'une souche de *Bacillus licheniformis* génétiquement modifiée contenant le gène codant une alpha-amylase de *Geobacillus stearothermophilus* pour la brasserie, l'amidonnerie, la production de sirops de glucose et l'industrie de l'alcool potable

Version pour publication de l'avis du 18 avril 2012

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 9 septembre 2011 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 alpha-amylase issue d'une souche de *Bacillus licheniformis* génétiquement modifiée contenant le gène codant une alpha-amylase de *Geobacillus stearothermophilus* pour la brasserie, l'amidonnerie, la production de sirops de glucose et l'industrie de l'alcool potable.

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.

Après consultation du CES « Biotechnologie », réuni le 15 décembre 2011, l'Anses a effectué une demande de compléments d'information auprès de la DGCCRF, le 22 décembre 2011. Le 22 février 2012, l'Anses a reçu des éléments de réponse permettant de poursuivre l'expertise.

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. 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) ».

L'expertise collective a été réalisée sur la base de 6 rapports d'expertise, par le Comité d'experts spécialisé (CES) « Biotechnologie », réuni les 15 décembre 2011 et 15 mars 2012 et par voie télématique le 13 avril 2012.

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.

3. ANALYSE ET CONCLUSIONS DU CES

3.1 Identité de l'enzyme alimentaire⁴

L'enzyme alimentaire est une 1,4 α -D-glucan glucanohydrolase (ou alpha-amylase ; E.C. 3.2.1.1, CAS 9000-90-2). Elle hydrolyse les liaisons endo- α -(1,4)-D-glucosidiques des polysaccharides de l'amidon comportant au minimum 3 unités - α -(1,4)-D-glucosidiques, en dextrans solubles et oligosaccharides. Cette enzyme appartient à la famille des glycosidases.

Une unité (AAU⁵) d'activité de l'alpha-amylase est définie comme la quantité d'enzyme nécessaire pour hydrolyser 10 mg d'amidon par minute dans des conditions données.

Les caractéristiques de l'enzyme alimentaire sont décrites. Les solides organiques totaux (TOS⁶) sont calculés selon la formule TOS = 100 % - humidité - cendres - diluants - stabilisants. La formulation finale de l'alpha-amylase présente une activité minimale garantie de 13775 AAU/g avec un TOS de 3,5 % (p/p).

Aucune activité enzymatique secondaire en quantité significative n'est indiquée par le pétitionnaire.

Les critères de pureté chimique et biologique de la préparation enzymatique répondent aux exigences de l'arrêté du 19 octobre 2006 modifié⁷. La recherche de la souche de production et d'une activité antibactérienne est négative dans l'enzyme alimentaire.

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

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 Alpha-Amylase Unit

⁶ Total Organic Solids

⁷ 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 initiale de *Bacillus licheniformis* est la souche Bra7. L'identité de cette souche hôte a été vérifiée par ribotypage et séquençage de l'ARN16S ce qui confirme son appartenance à l'espèce *Bacillus licheniformis*. Un test de cytotoxicité sur cellules ovariennes de hamster chinois avec le surnageant de culture de cette souche n'a pas mis en évidence de toxines. La souche de *Bacillus licheniformis* Bra7 est non-pathogène et non-toxinogène.

De plus, cette souche a un historique d'utilisation dans la production industrielle d'enzymes.

Sécurité du micro-organisme donneur

La séquence codante du gène d'intérêt a été isolée d'une souche de *Geobacillus stearothermophilus*, organisme de classe 1. Des mutations de la séquence nucléique sont réalisées et commentées dans le dossier.

Obtention de la souche de production

Le transgène est intégré dans un site défini dans le chromosome bactérien. Les différentes étapes de la transformation et la généalogie jusqu'à la souche de production sont décrites de façon détaillée. La sélection de la souche transformée se fait sur la résistance au chloramphénicol, résistance naturelle pour cette espèce.

La souche de production de l'enzyme alimentaire est la souche de *Bacillus licheniformis* H03305bQ. Cette souche est non sporulante. Sa stabilité est assurée par la résistance au chloramphénicol.

3.2.2 Procédé de fabrication

Le procédé de production de la préparation enzymatique est un procédé de fermentation aérobie confiné, suivie d'étapes d'inactivation de la biomasse, de filtrations, de concentration par ultrafiltration et 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 la production d'enzyme alimentaire d'origine microbienne⁸. L'usine de production est certifiée à la norme ISO 9001 : 2008 et possède un plan HACCP. Les matières premières utilisées sont de qualité alimentaire.

3.3 Réaction et devenir dans les denrées alimentaires

Les produits de la réaction de l'alpha-amylase sont des oligosaccharides naturels (malto-oligosaccharides, glucose, dextrines). L'alpha-amylase est inactivée au cours d'étapes de fabrication des denrées alimentaires revendiquées, dans les conditions recommandées par le pétitionnaire.

3.4 Utilité technologique et conditions d'utilisation proposées

L'enzyme alimentaire serait un auxiliaire technologique destiné à la brasserie, l'amidonnerie, la production de sirops de glucose et l'industrie de l'alcool potable.

⁸ Good manufacturing practice in microbial food enzyme production.

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 Budget⁹, en considérant qu'un pourcentage des denrées solides et liquides consommées quotidiennement par la population générale¹⁰ est traité par l'enzyme à la dose maximale recommandée et que l'activité enzymatique est conservée intégralement dans les denrées. Le pétitionnaire présente un calcul de marge de sécurité en utilisant des hypothèses initiales de consommation et des pourcentages de correction qu'il est nécessaire d'argumenter.

3.6 Données toxicologiques

Toutes les études de toxicité ont été réalisées selon les lignes directrices internationales de l'OCDE¹¹ et en conformité avec les Bonnes Pratiques de Laboratoire.

Le test de toxicité orale aiguë par gavage (administration unique) à la dose maximale de 1700 mg TOS/kg de poids corporel chez le Rat n'a révélé aucun effet néfaste.

L'étude de toxicité orale sub-chronique pendant 90 jours chez le Rat conclut à une NOAEL¹² de 7685 AAU/kg de poids corporel/jour soit 66,81 mg TOS/kg de poids corporel/jour, correspondant à la dose la plus forte testée. Le pétitionnaire n'apporte pas d'argument sur le choix des doses d'enzyme alimentaire testées, gamme de doses basses pour ce type d'étude et conduisant à une NOAEL faible.

Les doses d'enzyme alimentaire utilisées pour réaliser les tests de génotoxicité sont faibles par rapport aux doses classiquement recommandées. L'étude de mutagénicité *in vitro* (test d'Ames sur cinq souches de *Salmonella typhimurium* histidine dépendante) révèle une augmentation significative du nombre de révertants en présence de l'enzyme alimentaire dans une partie des échantillons. Cet effet mutagène ne semble pas dose-dépendant et l'augmentation du nombre de révertants n'est pas biologiquement révélatrice.

Le test d'aberrations chromosomiques sur des lymphocytes périphériques humains, en culture, met en évidence une augmentation significative des métaphases avec aberrations chromosomiques dans une partie des échantillons ainsi que quelques métaphases polyploïdes.

En conclusion sur la génotoxicité, les effets mutagènes et clastogènes observés dans ces deux tests sont de faible amplitude mais statistiquement significatifs. Ils sont à considérer au regard des faibles doses d'enzyme testées, sensiblement éloignées des doses maximales recommandées. La cytotoxicité inhabituelle et les anomalies des tests de génotoxicité observées dans la présente demande ne permettent pas de se prononcer sur

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 Les niveaux de consommation alimentaire utilisés sont les niveaux de consommation physiologiques maximaux, 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. Pour une personne de 60 kg, ces niveaux correspondent à une consommation quotidienne de 6 l de boissons (en dehors du lait) et de 3 kg de denrées alimentaires solides.

¹¹ Organisation de Coopération et de Développement Economiques

¹² No Observed Adverse Effect Level

l'innocuité de cette enzyme alimentaire, d'autant plus que ces effets sont observés à des doses d'essais plus faibles que les doses recommandées par l'OCDE. La démarche à suivre dans le cas de résultats positifs observés dans les tests *in vitro* est présentée dans le guide de l'EFSA³.

3.7 Allergénicité

La comparaison de séquences de l'alpha-amylase de *Geobacillus stearothermophilus* avec les séquences d'allergènes et de toxines connus par une recherche d'identité supérieure à 35 % sur les différents blocs de 80 acides aminés révèle une homologie de 37,5 % avec l'alpha-amylase TAKA qui est un allergène respiratoire et non par voie orale.

3.8 Conclusion du CES

Le Comité d'experts spécialisé « Biotechnologie » estime que l'emploi de l'alpha-amylase issue de la souche de *Bacillus licheniformis* génétiquement modifiée H03305bQ contenant le gène codant une alpha-amylase de *Geobacillus stearothermophilus*, pour la brasserie, l'amidonnerie, la production de sirops de glucose et l'industrie de l'alcool potable ne peut être garantie dans les conditions d'emploi présentées par le pétitionnaire, en raison d'interrogations sur la génotoxicité de l'enzyme alimentaire nécessitant une réponse selon les recommandations du guide de l'EFSA³. Le calcul d'une marge de sécurité en justifiant l'ensemble des hypothèses utilisées doit également être présenté.

4. CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS DE L'AGENCE

L'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (Anses) estime que l'emploi de l'alpha-amylase issue de la souche de *Bacillus licheniformis* génétiquement modifiée H03305bQ contenant le gène codant une alpha-amylase de *Geobacillus stearothermophilus*, pour la brasserie, l'amidonnerie, la production de sirops de glucose et l'industrie de l'alcool potable ne peut être garantie dans les conditions d'emploi présentées par le pétitionnaire, en raison d'interrogations sur la génotoxicité de l'enzyme alimentaire nécessitant une réponse selon les recommandations du guide de l'EFSA³. Le calcul d'une marge de sécurité en justifiant l'ensemble des hypothèses utilisées doit également être présenté.

L'Anses rend donc un avis défavorable à cette demande.

Le directeur général

Marc Mortureux

MOTS-CLES

Enzyme, auxiliaire technologique, alpha-amylase, *Bacillus licheniformis*, *Geobacillus stearothermophilus*, amidonnerie, brasserie, production de sirop, alcool potable.