



Le directeur général

Maisons-Alfort, le 29 juillet 2014

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 BbgIV
issue d'une souche d'*Escherichia coli* modifiée génétiquement porteuse du gène
codant une bêta-galactosidase de *Bifidobacterium bifidum*,
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 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 12 mars 2014 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 BbgIV issue d'une souche d'*Escherichia coli* modifiée génétiquement porteuse du gène codant une bêta-galactosidase de *Bifidobacterium bifidum*, 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'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 le 19 juin 2014, l'Anses a effectué une demande de compléments d'information auprès de la DGCCRF, le 30 juin 2014. Le 9 juillet 2014, 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 15 mai, 19 juin et 17 juillet 2014, sur la base de rapports initiaux rédigés par six rapporteurs dont deux rapporteurs apportant des compétences complémentaires, membres d'autres collectifs d'experts 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 rendues publiques *via* 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) et plus précisément la bêta-galactosidase BbgIV. 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 (di- à hexa-saccharides) 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 BbgIV est définie comme la quantité d'enzyme nécessaire pour catalyser la formation d'une micromole d'O-nitrophénol à partir d'O-nitrophényl β-D-galactopyranoside par minute, à 40 °C et à pH 6,8.

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 BbgIV se présente sous forme poudre avec une activité minimale garantie de 19000 U/g et un TOS d'environ 91 % (p/p).

Aucune activité enzymatique secondaire de type protéase, amylase et lipase n'est détectée par le pétitionnaire avec les méthodes utilisées.

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

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 cellules bactériennes provenant de la souche de production et d'une activité antibactérienne de la famille des bêta-lactamines est négative dans l'enzyme alimentaire.

3.2 Organisme de production et procédé de fabrication

3.2.1 Organisme de production

Sécurité du micro-organisme hôte

La souche hôte d'*Escherichia coli* utilisée est la souche BL21. La souche BL21 (DE3) est un dérivé lysogène de la souche classique *E. coli* B. Elle est déficiente pour la production des protéases lon ompT et permet de produire plus de protéines recombinantes.

Le potentiel pathogène de la souche BL21 a été étudié par Chart *et al.* (2000) en recherchant par hybridation moléculaire, de nombreux gènes liés à la pathogénicité (adhésion, agrégation, verotoxines, entérotoxines etc.) sur le chromosome de la souche BL21. Aucun de ces gènes n'a été détecté. La souche BL21 est dépourvue des facteurs de virulence classiquement retrouvés dans les différents pathovars d'*E. coli*.

Le séquençage complet et la caractérisation du chromosome de la souche BL21 par Jeong *et al.* (2009) n'ont révélé aucun gène codant des toxines connues ou des déterminants liés à la pathogénicité connus sur ce chromosome.

Selon Chart *et al.* (2000), des études de gavage chez des souris avec des doses bactériennes de 10⁶ cfu n'ont montré, au bout de 7 jours, aucune détérioration de la santé des animaux. De plus, aucune colonie viable d'*E. coli* n'a pu être obtenue à partir des tissus étudiés après euthanasie (rate, foie, rein). Des études similaires ont été effectuées sur des poussins et des moutons et conduisent à la conclusion de non-pathogénicité de la souche d'*E. coli* BL21.

La souche BL21 est non pathogène pour un hôte immunocompétent et non toxigène.

Identité des micro-organismes donneurs

La séquence codante de la bêta-galactosidase a été synthétisée à partir de la séquence codante du gène de la bêta-galactosidase BbgIV d'une souche de *Bifidobacterium bifidum* et modifiée afin d'optimiser la séquence nucléique permettant une expression optimale dans *E. coli*. L'identité de séquences entre la protéine obtenue et la protéine native est démontrée.

Dans sa liste actualisée en 2013⁷, l'EFSA conserve le classement « qualified presumption of safety » (QPS) de *Bifidobacterium bifidum*.

Obtention de la souche de production

Le transgène est présent sur un plasmide multicopie. Ce plasmide n'est pas conjugatif. Des informations sont présentées sur les différentes étapes de l'obtention de la souche de production. La sélection de la souche transformée se fait sur une résistance à des antibiotiques de la famille des bêta-lactamines.

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

La souche de production de l'enzyme alimentaire est la souche d'*Escherichia coli* génétiquement modifiée BglA MCB3.

⁶ Arrêté du 19 octobre 2006 modifié relatif à l'emploi d'auxiliaires technologiques dans la fabrication de certaines denrées alimentaires

⁷ 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.

3.2.2 Procédé de fabrication

L'enzyme alimentaire est obtenue par fermentation suivie d'étapes de séparation du micro-organisme, de concentrations, de purifications 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). L'usine de production est certifiée aux normes ISO 9001 : 2008 et ISO 22000 : 2011. Les matières premières utilisées sont de qualité alimentaire.

La pression de sélection est exercée par l'ajout d'ampicilline dans le milieu de fermentation afin de maintenir le plasmide recombinant dans la souche de production et de garantir le niveau de production de bêta-galactosidase BbgIV. Dans différents lots d'enzyme alimentaire, le pétitionnaire souligne l'absence de cellules bactériennes provenant de la souche de production. La recherche du transgène codant la résistance aux bêta-lactamines révèle des quantités très faibles d'ADN dans l'enzyme alimentaire et l'enzyme codée par ce transgène n'est pas détectée dans l'enzyme alimentaire par électrophorèse en gel SDS-PAGE. La recherche d'activité antibiotique dans l'enzyme alimentaire est négative.

3.3 Réaction et devenir dans les denrées alimentaires

Les produits de réaction de la bêta-galactosidase Bbg IV 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 mélange de GOS est formé selon le pétitionnaire, de diosides, triosides, tétraosides et pentaosides constitués d'unités galactose et dans la moitié des formes présentes, d'une unité glucose terminale. Ce sont des molécules fortement hyperosmotiques et très fermentescibles.

La β -galactosidase BbgIV est inactivée de façon irréversible dans l'ingrédient alimentaire (sirop de GOS) par chauffage et éliminée par filtration, étapes présentes dans le procédé de fabrication de cet ingrédient.

La recherche de l'enzyme est négative dans différents lots d'ingrédient alimentaire (mélange de GOS) et dans des produits finis mettant en œuvre cet ingrédient (denrées alimentaires).

3.4 Utilité technologique et conditions d'utilisation proposées

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 conditions d'utilisation de l'enzyme alimentaire pour produire cet ingrédient alimentaire (sirop de GOS) sont présentées par le pétitionnaire et l'utilisation potentielle de cet ingrédient dans la fabrication de différentes denrées alimentaires est décrite et correspondrait à une teneur de 0,7 à 2,75 g par portion.

3.5 Exposition alimentaire

La marge de sécurité est calculée selon la méthode du Budget⁸ 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. de denrées alimentaires solides. Le calcul de la marge de sécurité est fait en considérant que 25 % des denrées solides et 25 % des boissons consommées quotidiennement par la population générale contiennent le sirop de GOS à la concentration maximale pour chaque type de denrées (solides et liquides) 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 NOAEL⁹ obtenue avec l'étude de toxicité orale sub-chronique pendant 90 jours chez le Rat est de 900 mg TOS/kg p.c./jour. La marge de sécurité calculée en utilisant cette NOAEL et la consommation quotidienne de bêta-galactosidase BbgIV estimée est alors de 1636.

Le guide¹⁰ de l'EFSA pour la soumission d'un dossier sur les enzymes alimentaires indique « *In case the use of the food enzyme is proposed for products specifically designed for infants (0-12 months) or young children (12-36 months) as defined in the Commission Directive 2006/141/EC¹¹, ad hoc conservative exposure estimates must be produced taking specifically into account these population groups* ».

Les calculs réalisés se basent sur les données de consommation de la base FoodEx¹². La catégorie « nourrissons » regroupent les enfants âgés de moins de douze mois et la catégorie « enfants en bas âge », les enfants âgés de un à trois ans. Les calculs de marge de sécurité pour les nourrissons et les enfants en bas âge sont faits en utilisant les données de consommation moyenne et de consommation au 97,5^{ème} percentile des différentes denrées susceptibles de contenir le sirop de GOS et en considérant que le sirop de GOS a été ajouté à la concentration maximale préconisée par le pétitionnaire et que pour la fabrication du sirop de GOS, l'enzyme a été employée à la dose maximale recommandée et que son activité enzymatique a été conservée intégralement dans le sirop de GOS puis dans les denrées alimentaires. Le rapport de la dose sans effet observé, établie par l'étude de toxicité subchronique pendant 90 jours chez le Rat (900 mg TOS/kg de poids corporel/jour) divisée par l'apport journalier individuel total en bêta-galactosidase BbgIV *via* les denrées alimentaires revendiquées susceptibles de contenir le sirop de GOS, permet de calculer des marges de sécurité :

- En considérant la consommation moyenne, les marges de sécurité calculées sont de 2647 pour les nourrissons et de 2195 pour les enfants en bas âge,
- En considérant une consommation au 97,5^{ème} percentile, les marges de sécurité calculées sont de 456 pour les nourrissons et de 434 pour les enfants en bas âge.

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 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

¹¹ Directive 2006/141/CE de la Commission du 22 décembre 2006 concernant les préparations pour nourrissons et les préparations de suite et modifiant la directive 1999/21/CE

¹² Food Consumption Database in Exposure Assessment. The main objective of FoodEx was to facilitate the assessment of dietary exposure to potentially hazardous chemicals by allowing accurate matching of the datasets on chemical occurrence and food consumption. Available on the EFSA website.

3.6 Données toxicologiques

Toutes les études de toxicité ont été réalisées selon les lignes directrices internationales de l'OCDE¹³ et en conformité avec les Bonnes Pratiques de Laboratoire.

Le test de toxicité orale aiguë par gavage (administration quotidienne) à la dose maximale de 1000 mg d'enzyme alimentaire/kg de poids corporel/jour 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 NOAEL¹⁴ de 1000 mg d'enzyme alimentaire/kg de poids corporel/jour soit 900 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 cinq souches de *Salmonella typhimurium* histidine dépendante) n'a pas révélé d'augmentation du nombre de révertants en présence de l'enzyme alimentaire et donc pas d'effet mutagène. Le test des micronoyaux dans les lymphocytes périphériques humains, 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

Une recherche bioinformatique ne met pas en évidence de potentiel allergique de l'activité enzymatique principale, la bêta-galactosidase BbgIV.

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 mis en évidence aucun facteur de risque sanitaire pour le consommateur vis-à-vis de l'emploi de cette bêta-galactosidase BbgIV issue d'une souche d'*Escherichia coli* modifiée génétiquement porteuse du gène codant une bêta-galactosidase BbgIV de *Bifidobacterium bifidum* (souche BglA MCB3), pour la production de sirop de galacto-oligosides (ou 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.*, 2007). 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). 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.

¹³ Organisation de Coopération et de Développement Economiques

¹⁴ No Observed Adverse Effect Level

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 bêta-galactosidase BbgIV issue d'une souche d'*Escherichia coli* modifiée génétiquement porteuse du gène codant une bêta-galactosidase BbgIV de *Bifidobacterium bifidum* (souche BglA MCB3), pour la production de sirop de galacto-oligosides (ou galacto-oligosaccharides). L'Anses rend donc un avis favorable à cette demande.

Marc Mortureux

MOTS-CLES

Enzyme, auxiliaire technologique, bêta-galactosidase Bbg IV, *Escherichia coli*, *Bifidobacterium bifidum*, sirop de galacto-oligosides, galacto-oligosaccharides, GOS

BIBLIOGRAPHIE

Chart H., Smith H.R., La Ragione R.M., Woodward M.J. (2000). An investigation into the pathogenic properties of *Escherichia coli* strains BLR, BL21, DH5alpha and EQ1. *J. Appl. Microbiol.* 89 (6):1048-1058.

Jeong H., Barbe V., Lee C.H., Vallenet D., Yu D.S., Choi S.H *et al.* (2009). Genome sequences of *Escherichia coli* B strains REL606 and BL21 (DE3). *J. Mol. Biol.* 394 (4):644-652.

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

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.

<http://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000018685743>