

AVIS **de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation,** **de l'environnement et du travail**

relatif à l'utilisation des bêta-galactosidases (lactases) dans les produits laitiers

1. RAPPEL DE LA SAISINE

L'Agence française de sécurité sanitaire des aliments (Afssa) a été saisie le 16 avril 2010 par la Direction Générale de la Concurrence, de la Consommation et de la Répression des Fraudes (DGCCRF) d'une demande d'avis relatif à l'utilisation des bêta-galactosidases (lactases) dans les produits laitiers.

2. CONTEXTE

Les préparations enzymatiques présentant une activité principale bêta-galactosidase issues de *Kluyveromyces lactis*, souche LCT114 (avis de l'Afssa du 1^{er} octobre 2001 sur la saisine 2000-SA-0315) et souche n° 013-2 (FERM P-3513) (avis de l'Afssa du 22 mars 2007 sur la saisine 2006-SA-0326) ont été inscrites à l'annexe IC de l'arrêté du 19 octobre 2006 modifié¹ suite aux avis de l'Afssa. D'autres préparations enzymatiques présentant une activité bêta-galactosidase étaient déjà inscrites à l'annexe IC de l'arrêté du 5 septembre 1989 modifié, abrogé par l'arrêté du 19 octobre 2006 modifié. Elles sont produites par des souches de *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces fragilis*, *Bacillus circulans*, *Aspergillus oryzae* et *Aspergillus niger*. Les différentes applications revendiquées pour ces auxiliaires technologiques sont l'hydrolyse du lactose à partir de lait, de lactosérum ou de lactose, la formation de galacto-oligosaccharides, ainsi que l'utilisation dans la production de produits laitiers fermentés et de fromages (à l'exception de ceux bénéficiant d'une appellation d'origine contrôlée).

La préparation enzymatique à base de bêta-galactosidase acide issue de la souche ACL-1C d'*Aspergillus oryzae* a également fait l'objet d'un avis de l'Afssa le 21 décembre 2009 (saisine 2009-SA-0186).

Dans le cadre de son rapport « Effets des probiotiques et prébiotiques sur la flore et l'immunité de l'Homme adulte » (2005), l'Afssa avait évalué l'intérêt nutritionnel des produits

¹ Arrêté du 19 octobre 2006 modifié relatif à l'emploi d'auxiliaires technologiques dans la fabrication de certaines denrées alimentaires

contenant des micro-organismes vivants, notamment la lactase des bactéries lactiques du yaourt.

Le présent avis de l'Anses porte uniquement sur des conséquences technologiques et nutritionnelles relatives à l'usage de cette enzyme dans les produits laitiers, à l'exclusion des aspects réglementaires concernant la définition de ces produits et des éventuelles allégations nutritionnelles.

3. METHODE D'EXPERTISE

L'expertise collective a été réalisée par le Comité d'experts spécialisé (CES) «Biotechnologie», réuni les 14 juin et 7 juillet 2010 et par le Comité d'experts spécialisé (CES) «Nutrition humaine », réuni le 24 juin 2010.

4. ARGUMENTAIRE

L'argumentaire de l'Anses est fondé sur l'avis des Comités d'experts spécialisés « Biotechnologie » et « Nutrition humaine » dont les éléments sont présentés ci-dessous :

4.1 Mode d'action des bêta-galactosidases

Les bêta-galactosidases ont pour nom systématique « β -D-galactoside galactohydrolase » et sont classées E.C. 3.2.1.23 par l'IUBMB² et CAS 9031-11-2. Elles sont aussi nommées, entre autres, lactase, β -lactosidase, β -D-lactosidase trilactase et β -D-galactanase. Les bêta-galactosidases sont des enzymes tétramériques avec quatre sous-unités identiques, inactives séparément.

Elles hydrolysent en présence d'eau, les résidus terminaux non-réducteurs β -D-galactose des β -D-galactosides. A partir du lactose, la réaction libère de façon équimolaire, du β -D-galactose et du β -D-glucose. Le produit obtenu devient alors partiellement délactosé. Ces enzymes présentent également une activité enzymatique secondaire de transgalactosylation conduisant à la formation de galacto-oligosaccharides (GOS).

Les bêta-galactosidases sont présentes naturellement chez les bactéries lactiques dont celles décrites comme probiotiques, ce qui leur confèrent l'aptitude de croissance dans le lait et par conséquent, un avantage écologique dans cette matrice. Ces enzymes sont également produites industriellement pour être utilisées en tant qu'auxiliaire technologique dans l'alimentation humaine. Les préparations enzymatiques de bêta-galactosidase autorisées sont listées dans l'annexe IC de l'arrêté du 19 octobre 2006¹ modifié.

Le spectre d'activité des bêta-galactosidases utilisées en tant qu'auxiliaire technologique, est variable selon le micro-organisme d'origine. On distingue deux types de bêta-galactosidases, les « acides » et les « neutres ».

Les bêta-galactosidases « acides » sont isolées de champignons du genre *Aspergillus*, espèces *niger* et *oryzae*. Leur activité enzymatique est optimale pour des pH situés entre 3 et 5, une température comprise entre 30 et 60 °C et une constante d'affinité (Km) pouvant atteindre 125 mM pour le lactose.

² International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB)

Les bêta-galactosidases « neutres » sont isolées de bactéries (*Bacillus circulans*) ou de levures du genre *Kluyveromyces*, espèces *lactis* et *fragilis*. L'activité enzymatique pour des enzymes issues de levures du genre *Kluyveromyces* est optimale pour des pH entre 6,5 et 7,5, une température entre 25 et 50 °C et une constante d'affinité (Km) de 8 à 21 mM pour le lactose. Pour la préparation enzymatique issue de *Bacillus circulans*, un pH entre 6 et 6,5, une température entre 60 et 65 °C et un Km de 41,7 mM pour le lactose.

Toutefois, dans les procédés industriels, les paramètres température, temps et pH utilisés ne sont pas choisis prioritairement par rapport aux activités enzymatiques maximales mais plutôt par rapport au danger de contamination microbienne. Les bêta-galactosidases sont utilisées à basse température pendant des durées très prolongées pour obtenir le niveau de dé lactosage souhaité par le fabricant.

Ces différentes préparations enzymatiques sont inactivées de façon irréversible par une pasteurisation suffisante, déterminée selon la protéine.

4.2 Caractéristiques technologiques et nutritionnelles du lactose, du glucose, du galactose et des oligo-saccharides

Le dé lactosage obtenu par l'action des bêta-galactosidases correspond à une conversion du lactose en glucose et galactose et en activité secondaire, à une transgalactosylation conduisant à la formation de galacto-oligosaccharides (GOS). Ce dé lactosage peut être complet ou partiel par adaptation des conditions d'utilisation des préparations enzymatiques selon le but recherché.

4.2.1 D'un point de vue technologique

Le lactose se caractérise par une solubilité relativement faible (182 g/l de solution à 20 °C) conduisant en milieu concentré, à la formation de petits cristaux d'hydrate de lactose, durs et sablonneux, en forme d'aiguille, désagréables en bouche lorsque leur taille dépasse 10 µm. Cette propriété du lactose conduit à un certain nombre d'accidents de fabrication. Le galactose et le glucose présentent quant à eux, des solubilités plus élevées que le lactose ; elles sont respectivement de 683 et 710 g/l de solution à 20 °C.

Le pouvoir sucrant du lactose, déterminé par rapport à la référence saccharose (valeur de 1) est d'environ 0,16, celui du galactose est de 0,3 et celui du glucose de 0,7 à 0,75. Le pouvoir sucrant d'un mélange équimolaire glucose-galactose est donc environ 4 fois supérieur à celui d'une solution de lactose, sans augmentation calorique.

Lors d'un traitement thermique, le lactose, en tant que sucre réducteur, peut réagir avec des acides aminés conduisant à un brunissement non enzymatique (réaction de Maillard) et donc à une coloration des denrées alimentaires. Toutefois, le lactose est moins réactif que les monosaccharides tels que le galactose et le glucose qui conduisent à un brunissement plus intense.

4.2.2 D'un point de vue nutritionnel

Le lactose des aliments n'est pas absorbable tel quel et doit d'abord être digéré dans l'intestin grêle par une lactase. Le pourcentage de digestion du lactose dans l'intestin grêle dépend de facteurs liés à l'hôte (surface de digestion, situations pathologiques...) et de la nature des aliments ingérés.

Le glucose et le galactose sont absorbés au niveau de l'intestin grêle.

L'absorption du glucose est rapide et s'accompagne d'une sécrétion d'insuline presque simultanée à l'élévation de la glycémie. La majeure partie d'une charge orale de glucose est directement métabolisée dans les tissus périphériques.

La principale source de galactose est le lactose contenu dans les produits lactés et le lait. L'hydrolyse du lactose est assurée par la bêta-galactosidase fixée sur la membrane externe des cellules de la muqueuse intestinale. Le galactose peut aussi provenir de la dégradation

lysosomale des glycoprotéines et des glycolipides, constituants des membranes, et du renouvellement des constituants cellulaires de l'organisme.

Le galactose est métabolisé au niveau du foie. Il est tout d'abord phosphorylé par une galactokinase hépatique en galactose 1-P. L'ATP est le donneur du phosphate.

Pour entrer dans la voie glycolytique, le galactose 1-P est converti en glucose 1-P. Ce dernier peut alimenter directement la synthèse du glycogène, être isomérisé en glucose 6-P pour approvisionner la glycolyse ou être hydrolysé dans le foie en glucose, excrété dans le flux sanguin.

4.3 Conséquences technologiques de l'utilisation des bêta-galactosidases

Selon les matrices alimentaires, les conséquences technologiques du dé lactosage enzymatique sont différentes.

4.3.1. Dans le lait

Le lait de vache contient de 45 à 50 g de lactose/ l et le pH du lait se situe entre 6,4 et 6,8. Le lait partiellement dé lactosé liquide ne présente pas de différence technologique avec le lait non traité avec la bêta-galactosidase. L'intérêt du traitement est uniquement nutritionnel dans cette matrice pour une consommation en l'état. Le lait partiellement dé lactosé peut également entrer dans la composition de nombreux produits transformés et être alors choisi pour ses propriétés technologiques similaires à celles décrites ci-dessous dans l'utilisation de lactosérum dé lactosé pour la production de denrées alimentaires.

4.3.2 Dans les produits laitiers fermentés

Les bactéries lactiques utilisent la transformation d'un sucre en acide lactique pour générer de l'énergie, soit par la voie de la glycolyse, soit par celle des pentoses phosphates. Les oses fermentescibles par les bactéries lactiques peuvent être des monosaccharides tels que des hexoses (glucose, galactose), des pentoses (xylose, ribose, arabinose), des hexitols et pentitols (mannitol, sorbitol, xylitol) ou des disaccharides (lactose, saccharose, cellobiose, maltose, tréhalose).

Dans le lait de vache, le lactose, sucre majoritaire, est présent à la teneur de 45 à 50 g/ l. Les yaourts classiques ont un pH entre 4,2 et 4,6 et contiennent environ 32 g de lactose/ l.

Le fait d'hydrolyser le lactose avec une bêta-galactosidase, préalablement à la fermentation lactique, ne modifie pas de façon significative les concentrations en produits de fermentation. Toutefois, l'utilisation de lait partiellement dé lactosé (conversion de 70 à 75 % du lactose) permettrait de réduire le temps de fermentation pour l'obtention de yaourts (O'Leary et Woychik, 1976). Pour fabriquer des yaourts présentant un même pH, un gain d'environ 1 h serait obtenu avec du lait traité, sur les 6 h nécessaires avec du lait non dé lactosé.

Les bactéries probiotiques peuvent être stimulées par la présence de galacto-oligosaccharides (GOS) formés à partir du lactose. En effet, à partir d'une certaine concentration de lactose, parallèlement à l'hydrolyse du lactose aboutissant à la formation de glucose et de galactose, les bêta-galactosidases catalysent une réaction de transgalactosylation qui aboutit à la production d'une famille d'oligosaccharides (di- à hexa-saccharides) dénommés galacto-oligosaccharides (GOS) (Smart, 1991), potentiel facteur stimulant de la croissance des bifidobactéries. Ils permettraient donc un enrichissement de la flore intestinale en bifidobactéries aux dépens d'autres micro-organismes, en particulier des bactéries pathogènes (Tanaka *et al.*, 1983). Ce phénomène, bien que n'ayant pas été démontré dans les denrées alimentaires, pourrait potentiellement s'observer dans les produits laitiers fermentés.

Les ferments fromagers sont également des bactéries lactiques. Le fait de modifier la composition en oses par dé lactosage enzymatique pourrait avoir un impact sur l'équilibre de l'écosystème microbien dans le cas des fromages à pâte molle. En effet, lors de leur fabrication, le lactose restant après l'égouttage peut favoriser le développement de certaines souches. En revanche, le dé lactosage n'aurait pas d'effet sur des fromages à pâte pressée cuite ou non cuite dans lesquels le lactose est absent à la fin de l'égouttage.

4.3.3 Dans les produits laitiers non fermentés

Le délactosage du lait permet de limiter le problème de cristallisation du lactose (McSweeney et Fox, 2009). Cette cristallisation conduit à une texture sableuse liée aux teneurs en lactose dépassant le point de solubilité (182 g/l pour le lactose à 20 °C). La solubilité du mélange glucose-galactose obtenu par l'action des bêta-galactosidases est beaucoup plus élevée que celle du lactose (683 g de galactose/l et 710 g de glucose/l à 20 °C) et permet donc d'obtenir une texture plus agréable.

La texture sableuse du lactose peut également être problématique dans des laits concentrés. Le lactose peut également augmenter l'hygroscopicité des poudres de lait et de sérum.

Les crèmes glacées ont un pH entre 5,4 et 7 et contiennent de 51 à 69 g de lactose/l. Cependant, bien que la teneur en lactose dans les crèmes glacées soit en-deçà du point de solubilité, une texture sableuse peut être observée à cause de l'accumulation du lactose dans la fraction non congelée en cours de fabrication. Une autre conséquence intéressante du délactosage du lait employé pour la fabrication de crèmes glacées est la diminution du point de congélation par augmentation de la concentration en solutés. La présence de lactose peut, en effet, abaisser le point de congélation d'environ 30 % par rapport à un lait délactosé.

4.3.4 Dans le lactosérum et les denrées alimentaires en contenant

Le lactosérum présente de nombreuses applications industrielles (confiserie, biscuiterie, crèmes glacées, préparations de plats à base de viande, soupes et sauces). Ses propriétés fonctionnelles sont principalement liées à ses composés protéiques mais les sucres qu'il apporte participent au brunissement des produits cuits. Le lactosérum délactosé participe davantage à ce brunissement par la présence de monosaccharides (sucres réducteurs) et présente un pouvoir sucrant supérieur, intéressant pour les applications en confiserie et biscuiterie.

Il existe deux types de lactosérum selon que son acidité est inférieure ou supérieure à 1,8 g d'acide lactique/l : les lactosérums acide et doux. Le lactosérum acide, issu des fabrications de fromages obtenus par coagulation mixte (présure et acide lactique) ou lactique, fromages à pâtes molles et fraîches, contient de 40 à 57 g de lactose/l et le pH du lactosérum est entre 4,5 et 6,5. Le lactosérum doux, issu des fabrications de fromages de type « pâtes pressées, cuites ou non cuites, à coagulation par présure » est plus riche en lactose et possède un pH plus élevé. Les préparations de bêta-galactosidases utilisées pour traiter chacun de ces lactosérums sont choisies selon leur pH optimal d'activité enzymatique : lactase acide ou lactase neutre.

Le lactosérum est souvent concentré et même transformé en poudre pour plus de praticité dans son transport et sa mise en œuvre. Le délactosage du lactosérum (McSweeney et Fox, 2009) préalablement à sa concentration, permet alors de limiter les problèmes de cristallisation du lactose.

4.4 Conséquences métaboliques et nutritionnelles du délactosage

Pour évaluer les conséquences métaboliques et nutritionnelles de l'hydrolyse du lactose en glucose et en galactose, il est nécessaire de disposer de données de comparaison entre les produits lactés délactosés et les produits lactés standards. Il s'agit notamment de disposer de données relatives aux composants nutritionnels des produits délactosés. En conséquence, il n'est pas possible de conclure sur les conséquences métaboliques et nutritionnelles du délactosage sur la base de ce dossier.

4.5 Intérêt nutritionnel

Chez l'Homme, la lactase est produite au niveau de l'intestin grêle et ancrée dans la bordure en brosse entérocytaire. Son activité est maximale chez le nouveau-né et diminue chez

l'adulte. En France, 20 à 50 % des adultes sont hypolactasiques et présentent alors une malabsorption du lactose (Marteau et Marteau, 2005).

Le lactose non digéré dans l'intestin grêle atteint le côlon et entraîne, par un effet osmotique, une augmentation des productions gazeuses pouvant provoquer une diarrhée dose-dépendante. Ces symptômes, observés chez une partie des sujets hypolactasiques, définissent l'intolérance au lactose. Plus la quantité de lactose ingérée est élevée, plus le risque d'intolérance est grand : les symptômes pourraient apparaître à la suite de l'ingestion d'une quantité minimale de lactose, estimée à 7 g (Vesa *et al.*, 1996), et pour une charge de 20 g de lactose (l'équivalent de 400 ml de lait), des symptômes d'intolérance sont observés chez environ 20 % des sujets hypolactasiques.

La digestion et la tolérance digestive du lactose contenu dans des produits laitiers fermentés semi-solides, tels les yaourts, est bonne chez les sujets hypolactasiques, quelle que soit la nature des bactéries contenues dans le produit (Vesa *et al.*, 1996). Cette bonne tolérance est due au ralentissement de la vidange gastrique liée à la forme semi-solide des produits. Par ailleurs, chez les sujets hypolactasiques, l'absorption intestinale du lactose contenu dans les yaourts est supérieure à celle du lactose contenu dans le lait. En effet, de nombreux travaux ont montré que la lactase de certaines bactéries lactiques, participait *in situ* dans l'intestin à l'hydrolyse du lactose. Ainsi, la digestibilité du lactose du yaourt peut atteindre 90 % de la charge (Marteau *et al.*, 1990).

Cette meilleure absorption et tolérance du lactose dans le yaourt par rapport au lait est liée au fait que la paroi cellulaire bactérienne des deux ferments du yaourt (*Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus*) offre une protection mécanique à la bêta-galactosidase bactérienne contre l'acidité de l'estomac. Ces parois cellulaires sont dégradées par les sels biliaires dans l'intestin grêle permettant d'augmenter l'hydrolyse enzymatique du lactose présent dans la lumière intestinale (de Vrese *et al.*, 2001). Ce facteur « paroi cellulaire de la bactérie » est essentiel dans la digestibilité du lactose de l'aliment, et explique pourquoi d'autres bactéries, telles que *Lactobacillus acidophilus*, ne sont pas aussi efficaces que celles du yaourt (Savaino *et al.*, 1984). Ces autres bactéries lactiques dont les parois cellulaires sont tolérantes aux sels biliaires, permettent toutefois d'atténuer plus ou moins les symptômes de l'intolérance (de Vrese *et al.*, 2001).

5. CONCLUSION

L'Agence nationale de la sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (Anses) estime que les bêta-galactosidases présentent des intérêts technologiques non négligeables dans les produits laitiers fermentés, dans les crèmes glacées, dans la production de lactosérum ainsi que dans la production de denrées alimentaires contenant du lait ou du lactosérum partiellement dé lactosés.

Cependant, l'Anses considère qu'il n'est pas possible d'évaluer précisément les conséquences technologiques et métaboliques du dé lactosage en l'absence de données analytiques obtenues sur un produit déterminé.

L'Anses estime qu'il ne paraît pas y avoir d'intérêt nutritionnel à diminuer la teneur en lactose des yaourts pour des sujets hypolactasiques en raison d'études montrant une bonne tolérance digestive du lactose dans cette denrée.

Le directeur général

Marc MORTUREUX

MOTS-CLES

bêta-galactosidase, lactase, lait partiellement dé lactosé, glaces alimentaires, fromages, laits et produits laitiers, lactosérum, galactose, glucose, lactose

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Afssa (2001). Avis du 1^{er} octobre 2011 relatif à la demande d'autorisation d'emploi d'une lactase de *Kluyveromyces lactis* autocloné dans le lait, les produits laitiers fermentés, les fromages (à l'exception des AOC) et les produits à base de lait ou de lactosérum.

Afssa (2005). Effets des probiotiques et prébiotiques sur la flore et l'immunité de l'homme adulte, février 2005.

Afssa (2007). Avis du 22 mars 2007 relatif à la demande d'autorisation d'emploi d'une bêta-galactosidase de *Kluyveromyces lactis* pour la fabrication de lait partiellement dé lactosé et de produits laitiers.

Afssa (2009). Avis du 21 décembre 2009 relatif à la demande d'autorisation d'emploi d'une bêta-galactosidase (lactase acide) issue d'une souche d'*Aspergillus oryzae* génétiquement modifiée pour la fabrication de lait partiellement délactosé et de produits à base de lait ou de lactosérum.

O'Leary V. S. et Woychik J. H. (1976). Utilization of lactose, glucose, and galactose by a mixed culture of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus* in milk treated with lactase Enzyme. Applied and environmental microbiology, Vol32 (1), 89-94.

Marteau, P., Flourié, B., Pochart, P., Chastang, C., Desjeux, J. F. et Rambaud, J. C. (1990). Effect of the microbial lactase (EC 3.2.1.23) activity in yoghurt on the intestinal absorption of lactose : an *in vivo* study in lactase-deficient humans. British Journal of Nutrition 64, 71-79.

Marteau A et Marteau P (2005) Entre intolérance au lactose et maldigestion. Cahiers. Nutrition et Diététique. 40 (1) : 1S20-1S23.

McSweeney P. L. H. et Fox P. F. (2009). Advanced dairy chemistry : volume 3 : Lactose, water, salts and minor constituents – 3rd Edition- Springer- 778 pages.

Savaiano, D. A., AbouElAnouar, A., Smith, D. E. et Levitt, M. D. (1984). Lactose malabsorption from yogurt, pasteurized yogurt, sweet acidophilus milk, and cultured milk in lactase-deficient individuals. American Journal of Clinical Nutrition 40, 1219-1223.

Smart J.B. (1991). Transferase reactions of the beta-galactosidase from *Streptococcus thermophilus*. Applied Microbiology and Biotechnology, 34, 495-501.

Tanaka R, Takayama H et Morotomi M. (1983). Effects of administration of TOS and bifidobacterium breve 4006 on the human fecal flora. Bifidobacteria Microflora 1983; Vol. 2 (1),:17–24.

Vesa TH, Korpela RA et Sahi T (1996). Tolerance to small amounts of lactose. American Journal of Clinical Nutrition 64:197-201.

de Vrese M, Stegelmann A, Richter B, Fenselau S, Laue C et Schrezenmzir J (2001). Probiotics – compensation for lactase insufficiency. American Journal of Clinical Nutrition 73 (suppl 2):421S-9.