



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 *Trichoderma reesei* génétiquement modifiée porteuse du gène codant une alpha-amylase d'*Aspergillus kawachii* pour la brasserie, l'amidonnerie, la production de sirops de glucose et l'industrie de l'alcool potable

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 *Trichoderma reesei* génétiquement modifiée porteuse du gène codant une alpha-amylase d'*Aspergillus kawachii* 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 et le 15 mars 2012, l'Anses a effectué deux demandes de compléments d'information auprès de la DGCCRF, le 22 décembre 2011 et le 13 avril 2012. Le 11 juillet 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 par le Comité d'experts spécialisé (CES) « Biotechnologie », réuni les 15 décembre 2011 et 15 mars et 21 août 2012, sur la base de 6 rapports d'expertise.

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 (SSU⁵) d'activité de l'alpha-amylase est définie comme la quantité d'enzyme nécessaire pour libérer 1 mg d'équivalents glucose à partir d'amidon de pomme de terre, par minute à pH 4,5 et à 50 °C.

Les caractéristiques de l'enzyme alimentaire sont décrites. Les solides organiques totaux (TOS⁶) sont calculés selon la formule $TOS = 100 \% - \text{humidité} - \text{cendres} - \text{diluants} - \text{stabilisants}$. La formulation finale de l'alpha-amylase présente une activité minimale garantie de 10000 SSU/g d'enzyme alimentaire avec un TOS de 19 % (p/p).

Aucune activité enzymatique secondaire en quantité significative n'est indiquée par le pétitionnaire en dehors d'une activité alpha-amylase endogène à la souche de *Trichoderma reesei*, activité minoritaire comparée à l'activité alpha-amylase exogène d'*Aspergillus kawachii*.

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 Soluble Starch Unit

⁶ Total Organic Solids

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.

3.2 Organisme de production et procédé de fabrication

3.2.1 Organisme de production

Sécurité du micro-organisme hôte

La souche initiale de *Trichoderma reesei* est la souche RL-P37, souche non-pathogène et non-toxinogène. Elle a un historique d'utilisation pour la production d'enzymes.

Sécurité des micro-organismes donneurs

La séquence codante de l'alpha-amylase a été isolée d'une souche d'*Aspergillus niger* var. *awamori* var. *kawachii*. La séquence codante d'un gène de sélection a été isolée d'une souche d'*Aspergillus nidulans*.

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 des transformations de la souche de production. L'absence d'ADN exogène en dehors des transgènes d'intérêt et des séquences nécessaires au clonage est démontrée par hybridation pour une partie des étapes réalisées.

La souche de production de la préparation enzymatique est la souche de *Trichoderma reesei* LOH4 AkAApaA (GICC 3387). La sélection de la souche de production se fait sans recours à un gène de résistance à des antibiotiques, sur une auxotrophie.

3.2.2 Procédé de fabrication

Le procédé de production de la préparation enzymatique est un procédé de fermentation aérobie confiné, suivie d'étapes de séparation 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 aux normes ISO 9001 : 2008, ISO 14001 : 2004, OHSAS 18001 : 2007 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, dextrans). L'alpha-amylase est inactivée au cours d'étapes de fabrication des denrées alimentaires revendiquées, dans les conditions recommandées par le pétitionnaire.

⁷Arrêté du 19 octobre 2006 modifié relatif à l'emploi d'auxiliaires technologiques dans la fabrication de certaines denrées alimentaires

⁸ Good manufacturing practice in microbial food enzyme production.

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.

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 calculée est de 171 selon la méthode du Budget, en considérant qu'un pourcentage des denrées solides et liquides consommées quotidiennement par la population générale est traité par l'enzyme à la dose maximale recommandée et que l'activité enzymatique est conservée intégralement dans les denrées.

3.6 Données toxicologiques

Toutes les études de toxicité ont été réalisées selon les lignes directrices internationales de l'OCDE⁹ et en conformité avec les Bonnes Pratiques de Laboratoire.

Le test de toxicité orale aiguë par gavage (administration unique) à la dose maximale de 920 mg de protéines totales/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 NOAEL¹⁰ de 11945 SSU/kg de poids corporel/jour soit 229,6 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 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 lymphocytes périphériques humains, en culture, n'a pas mis en évidence d'effet clastogène de l'enzyme alimentaire. Selon ces deux tests, l'enzyme alimentaire ne présente pas de caractère génotoxique.

3.7 Allergénicité

La comparaison de séquences de l'alpha-amylase d'*Aspergillus kawachii* 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 67,7 % avec l'alpha-amylase TAKA qui est allergène par voie respiratoire et non par voie orale.

3.8 Conclusion du CES

Au vu des résultats fournis et dans les conditions d'utilisation proposées par le pétitionnaire, le Comité d'experts spécialisé « Biotechnologie » n'a mis en évidence aucun facteur de risque sanitaire pour le consommateur avec l'emploi de l'alpha-amylase issue d'une souche de *Trichoderma reesei* génétiquement modifiée (LOH4 AkAApaA) porteuse

⁹ Organisation de Coopération et de Développement Economiques

¹⁰ No Observed Adverse Effect Level

du gène codant une alpha-amylase d'*Aspergillus kawachii* pour la brasserie, l'amidonnerie, la production de sirops de glucose et l'industrie de l'alcool potable.

4. CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS DE L'AGENCE

Au vu des résultats fournis et dans les conditions d'utilisation proposées 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 avec l'emploi de l'alpha-amylase issue d'une souche de *Trichoderma reesei* génétiquement modifiée (LOH4 AkAaPaA) porteuse du gène codant une alpha-amylase d'*Aspergillus kawachii* pour la brasserie, l'amidonnerie, la production de sirops de glucose et l'industrie de l'alcool potable. L'Anses rend donc un avis favorable à cette demande.

Le directeur général

Marc Mortureux

MOTS-CLES

Enzyme, auxiliaire technologique, alpha-amylase, *Trichoderma reesei*, *Aspergillus kawachii*, amidonnerie, brasserie, production de sirop, alcool potable.