

Le directeur général

Maisons-Alfort, le 23 février 2018

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 endo-1,4 bêta-mannanase
issue d'une souche non génétiquement modifiée d'*Aspergillus niger*
pour la production de café et de boissons à base de café**

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 à 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 publiés sur son site internet.

L'Anses a été saisie le 21 décembre 2016 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 endo-1,4 bêta-mannanase issue d'une souche non génétiquement modifiée d'*Aspergillus niger* pour la production de café et de boissons à base de café.

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'Autorité européenne de sécurité des aliments/European Food Safety Authority (EFSA) pour la soumission d'un dossier sur les enzymes alimentaires.

¹ Décret n° 2011-509 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 Groupe de travail (GT) « Biotechnologie », réuni le 16 février 2017, l'Anses a effectué une demande de compléments d'information auprès de la DGCCRF, le 22 février 2017. Le 27 décembre 2017, l'Anses a reçu des éléments de réponse permettant de poursuivre l'expertise.

L'expertise collective a été menée par le GT « Biotechnologie » le 16 février 2017 et le 18 janvier 2018, sur la base de rapports initiaux rédigés par quatre rapporteurs.

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 publiées sur 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 endo-1,4 bêta-mannanase (mannane endo-1,4-bêta-mannosidase, E.C. 3.2.1.78). L'enzyme hydrolyse les liaisons D mannosidiques des mannanes, des galactomannanes et des glucomannanes.

Une unité d'activité de l'endo-1,4 bêta-mannanase est définie comme la quantité d'enzyme nécessaire pour libérer à partir de gomme de caroube, une micromole de sucres réducteurs équivalents mannose en une minute, à 40 °C et pH 5,0.

Les caractéristiques de l'enzyme alimentaire sont décrites. Les solides organiques totaux (TOS⁵) sont calculés selon la formule $TOS = 100 \% - \text{humidité} - \text{cendres} - \text{diluants}$. La formulation finale de l'endo-1,4 bêta-mannanase se présente sous forme de poudre avec une activité minimale garantie de 10000 U/g et un TOS d'environ 10,92 % (p/p). La stabilité de l'enzyme alimentaire est documentée.

Le pétitionnaire présente les méthodes d'analyse utilisées pour la recherche des activités enzymatiques principale et secondaires ainsi que les résultats obtenus. Des activités bêta-glucosidase et bêta-mannosidase sont présentes en quantité limitée.

Le résultat de la recherche d'une activité antibactérienne est négatif dans l'enzyme alimentaire. Les critères de pureté chimique et biologique de l'enzyme alimentaire répondent aux exigences de l'arrêté du 19 octobre 2006 modifié⁶. Les principales mycotoxines des moisissures ainsi que des métabolites secondaires potentiellement produits par *Aspergillus niger* ont été recherchés et non détectés par les différentes méthodes analytiques 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

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

Le pétitionnaire indique que les filtrations et micro-filtration réalisées lors de la production de l'enzyme alimentaire permettent d'éliminer les formes mycéliennes et sporulées de la souche de production de l'enzyme alimentaire. La recherche de la souche de production dans différents lots d'enzyme alimentaire qui permettrait de vérifier cette déclaration n'a toutefois pas été réalisée.

3.2 Organisme de production et procédé de fabrication

3.2.1 Organisme de production

La souche initiale d'*Aspergillus niger* utilisée est un micro-organisme non pathogène, utilisé pour la fabrication d'enzymes destinées à l'alimentation humaine.

La souche de production de l'enzyme alimentaire est la souche d'*Aspergillus niger* AE-HCM non génétiquement modifiée, obtenue par une série de mutations conventionnelles. Des éléments sur la stabilité de cette souche sont apportés dans le dossier.

Le certificat de dépôt dans une collection de souches de micro-organismes n'est pas fourni pour la souche de production.

3.2.2 Procédé de fabrication

L'enzyme alimentaire est obtenue en culture submergée, suivie d'étapes de filtrations, de purifications, de séchage et de formulation de l'enzyme alimentaire. Les additifs et auxiliaires technologiques utilisés sont indiqués.

L'enzyme alimentaire est produite selon les Bonnes Pratiques de Fabrication pour l'alimentation humaine (cGMP) et les principes de l'HACCP⁷. La production de l'enzyme répond à la norme FSSC ISO 22000. Les matières premières utilisées sont de qualité alimentaire.

Compte tenu que l'organisme de production est une souche d'*Aspergillus niger*, espèce potentiellement productrice de mycotoxines et d'autres métabolites secondaires toxiques, le GT « Biotechnologie » conseille de mettre en place une surveillance de ces substances dans la production de l'enzyme alimentaire en actualisant les contrôles en fonction de la disponibilité des standards.

3.3 Réaction et devenir dans les denrées alimentaires

Les produits de réaction de l'endo-1,4 bêta-mannanase sont des mannanes, des galactomannanes et des glucomannanes.

Dans les conditions recommandées par le pétitionnaire, l'endo-1,4 bêta-mannanase et les activités enzymatiques secondaires sont inactivées de façon irréversible par une étape de chauffage intervenant dans la production de café soluble et de boissons à base de café.

3.4 Utilité technologique et conditions d'utilisation proposées

L'enzyme alimentaire serait un auxiliaire technologique destiné à la production de café soluble et de boissons à base de café.

3.5 Exposition alimentaire

La marge de sécurité est calculée selon la méthode du Budget⁸ pour la population générale. En raison des principales applications revendiquées par le pétitionnaire, l'exposition alimentaire à l'enzyme par les boissons est la seule considérée. Les niveaux de consommation alimentaire utilisés sont basés sur la consommation physiologique maximale, c'est-à-dire une consommation quotidienne de 100 ml de boissons/kg de poids corporel. Elle est calculée en considérant que 25 %

⁷ Hazard Analysis and Critical Control Points

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

des boissons consommées quotidiennement par la population générale sont traitées par l'enzyme à la dose maximale recommandée pour les usages revendiqués avec une activité enzymatique conservée intégralement dans les boissons.

Le rapport de la dose sans effet néfaste observé (NOAEL⁹), établie par l'étude de toxicité subchronique pendant 90 jours chez le Rat (639,60 mg TOS/kg de poids corporel/jour) divisée par la consommation maximale de l'enzyme *via* les boissons permet de calculer une marge de sécurité de 1982.

Le pétitionnaire présente également des calculs d'exposition alimentaire, moyenne et au 95^{ème} percentile, pour différentes classes d'âge de la population en utilisant des données de consommation alimentaire françaises présentes dans la base de données européenne Datex¹⁰ pour toutes les catégories de denrées correspondantes à la demande d'autorisation d'emploi de l'enzyme. Plusieurs hypothèses sont retenues afin de maximiser l'exposition :

- les données de consommation moyenne sont calculées uniquement sur l'échantillon des « individus consommateurs » (exclusion des individus non consommateurs de ces denrées),
- Toutes ces denrées consommées sont traitées par l'enzyme à la dose maximale recommandée par le pétitionnaire,
- l'activité enzymatique est conservée intégralement dans les denrées.

Dans ces conditions, les marges de sécurité calculées à partir de ces données de consommation et de la NOAEL de l'enzyme sont supérieures à la marge de sécurité obtenue par la méthode du Budget sauf pour les forts consommateurs « 95^{ème} percentile » de deux classes d'âge : 1188 pour les adultes¹¹ et 1217 pour les séniors¹².

3.6 Données toxicologiques

Toutes les études de toxicité ont été réalisées en conformité avec les Bonnes Pratiques de Laboratoire.

L'étude de toxicité subchronique par administration orale réitérée pendant 90 jours chez le Rat conclut à une NOAEL de 2000 mg d'enzyme/kg de poids corporel/jour soit 639,60 mg TOS/kg poids corporel/jour, correspondant à la dose la plus forte testée.

L'étude de mutagénicité *in vitro* (test d'Ames sur quatre souches de *Salmonella* Typhimurium histidine dépendante et une souche d'*Escherichia coli* tryptophane dépendante) n'a pas révélé d'augmentation du nombre de révertants en présence de l'enzyme alimentaire jusqu'à 1600 µg TOS/boîte et donc pas d'effet mutagène. Le test d'aberrations chromosomiques sur des fibroblastes pulmonaires de hamster chinois, *in vitro*, n'a pas mis en évidence d'effet clastogène ou aneugène de l'enzyme alimentaire jusqu'à 960 µg TOS/ml en l'absence de S9 et jusqu'à 1600 µg TOS/ml en présence de S9 pour le temps court (4 h) et jusqu'à 576 µg TOS /ml pour le temps long (24 h). Ces deux tests indiquent que l'enzyme alimentaire n'est pas génotoxique dans ces conditions.

3.7 Allergénicité

Une recherche bioinformatique n'a pas mis en évidence d'homologies de séquence avec des allergènes connus et donc ne conduit pas à suspecter un potentiel allergique de l'activité enzymatique principale, l'endo-1,4 bêta-mannanase.

⁹ No observed adverse effect level

¹⁰ <http://www.efsa.europa.eu/en/datexfoodcdb/datexfooddb.htm>

¹¹ De 18 à 64 ans

¹² De 65 à 74 ans

3.8 Conclusion du GT

Au vu des résultats fournis et dans les conditions de production et d'emploi présentées par le pétitionnaire, le Groupe de travail (GT) « Biotechnologie » n'a pas mis en évidence de risque sanitaire pour le consommateur vis-à-vis de l'emploi de cette endo-1,4 bêta-mannanase issue d'une souche non génétiquement modifiée d'*Aspergillus niger* (AE-HCM) pour la production de café et de boissons à base de café.

4. CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS DE L'AGENCE

Au vu des résultats fournis et dans les conditions de production et d'emploi présentées par le pétitionnaire, l'expertise ne met pas en évidence de risque sanitaire pour le consommateur vis-à-vis de l'emploi de cette endo-1,4 bêta-mannanase issue d'une souche non génétiquement modifiée d'*Aspergillus niger* (AE-HCM) pour la production de café et de boissons à base de café. L'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (Anses) rend donc un avis favorable à cette demande.

Dr Roger Genet

MOTS-CLES

Enzyme, auxiliaire technologique, mannanase, *Aspergillus niger*, café soluble, boissons à base de café

Enzyme, processing aid, mannanase, *Aspergillus niger*, instant coffee, coffee beverages