

Le directeur général

Maisons-Alfort, le 8 août 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 glucose-oxydase  
issue d'une souche génétiquement modifiée d'*Aspergillus niger* porteuse d'un gène  
codant une glucose-oxydase d'*Aspergillus niger* pour la panification (à l'exception du pain  
de tradition française), la panification spéciale, la viennoiserie, la pâtisserie, la biscuiterie,  
la biscotterie, la production de pâtes et de nouilles et le traitement des œufs**

---

*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 glucose-oxydase issue d'une souche génétiquement modifiée d'*Aspergillus niger* porteuse d'un gène codant une glucose-oxydase d'*Aspergillus niger* pour la panification (à l'exception du pain de tradition française), la panification spéciale, la viennoiserie, la pâtisserie, la biscuiterie, la biscotterie, la production de pâtes et de nouilles et le traitement des œufs.

#### **1. CONTEXTE ET OBJET DE LA SAISINE**

Ce dossier entre dans le cadre du décret du 10 mai 2011<sup>1</sup> 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 2011<sup>2</sup>, le dossier doit être établi selon le guide<sup>3</sup> de l'Autorité européenne de sécurité des aliments/European Food Safety Authority (EFSA) pour la soumission d'un dossier sur les enzymes alimentaires.

---

<sup>1</sup> 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.

<sup>2</sup> 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

<sup>3</sup> 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 mars 2017, l'Anses a effectué une demande de compléments d'information auprès de la DGCCRF, le 20 mars 2017. Depuis cette date, les différents échanges ayant eu lieu avec la DGCCRF ont permis à l'Anses de recevoir quelques éléments de réponse le 12 mars 2018. N'ayant pu obtenir l'ensemble des informations complémentaires demandées le 20 mars 2017, l'Anses a décidé de reprendre l'examen du dossier avec les pièces dont elle dispose, le dossier déposé initialement et les éléments reçus le 12 mars 2018.

L'expertise collective a été menée par le GT « Biotechnologie » réuni le 16 mars 2017, le 15 mars 2018, le 21 juin 2018 et le 12 juillet 2018, sur la base de rapports initiaux rédigés par cinq 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](http://www.anses.fr)).

## **3. ANALYSE ET CONCLUSIONS DU GT**

### **3.1 Identité de l'enzyme alimentaire<sup>4</sup>**

L'enzyme alimentaire est une glucose-oxydase (Nom systématique  $\beta$ -D-glucose : oxygène 1-oxydoréductase, E.C. 1.1.3.4). En présence d'oxygène, cette enzyme principale hydrolyse le  $\beta$ -D-glucose en D-glucono-1,5-lactone et en peroxyde d'hydrogène. Le D-glucono-1,5-lactone s'hydrolyse spontanément en acide gluconique.

Une unité d'activité de la glucose-oxydase est définie comme la quantité d'enzyme nécessaire pour transformer 3 mg de glucose en acide gluconique à 35 °C et pH 5,1.

Les caractéristiques de l'enzyme alimentaire sont décrites. La formulation finale de la glucose-oxydase se présente sous forme de poudre ou sous forme liquide dont les activités minimales garanties sont exprimées en pourcentage. Les valeurs calculées de solides organiques totaux (TOS<sup>5</sup>) représentatives des lots commerciaux de ces deux formulations ne sont pas communiquées. La stabilité de l'enzyme alimentaire est documentée uniquement pour la forme liquide.

Le pétitionnaire présente les méthodes d'analyse utilisées pour la recherche des activités enzymatiques principale et secondaires ainsi que les résultats obtenus. La mesure des activités amylase, xylanase, protéase, catalase et cellulase réalisées sur 3 lots différents montre qu'elles

<sup>4</sup> 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.

<sup>5</sup> Total Organic Solids

sont soit absentes soit présentes en quantité limitée pour les activités amylase, catalase et cellulase. Le pétitionnaire revendique l'activité secondaire catalase pour la dégradation du peroxyde d'hydrogène généré par l'activité glucose-oxydase.

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 modifié<sup>6</sup>. Les principales mycotoxines ainsi que des métabolites secondaires potentiellement produits par *Aspergillus niger* ont été recherchés et non détectés par les différentes méthodes analytiques utilisées et jugées recevables.

Les microorganismes viables ainsi que l'ADN issus de la souche de production ont été recherchés dans plusieurs lots d'enzyme alimentaire et n'ont pas été mis en évidence.

### **3.2 Organisme de production et procédé de fabrication**

#### **3.2.1 Organisme de production**

##### Sécurité du micro-organisme hôte

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

##### Obtention de la souche de production

La séquence codante de la glucose-oxydase est isolée d'une autre souche d'*Aspergillus niger*.

Des informations sont présentées sur la généalogie et la transformation de la souche de production. La sélection de la souche de production se fait sur une auxotrophie. Le pétitionnaire fournit une méthode d'identification de la souche (incluant des caractérisations morphologique, phénotypique et moléculaire) ainsi que des données suggérant une bonne stabilité de la souche de production.

Le transgène est intégré dans le génome fongique mais le nombre de copies du transgène et leurs sites d'insertion ne sont pas renseignés. Les sites d'insertion des différentes copies pouvant influencer l'expression de mycotoxines et de métabolites secondaires toxiques potentiellement produits par *Aspergillus niger*, le GT aurait apprécié de disposer de ces informations. Cependant, il considère que ces éléments ne sont pas essentiels à l'évaluation de l'organisme de production dans la mesure où la recherche de mycotoxines a été correctement menée par le pétitionnaire.

Par ailleurs, le pétitionnaire a attesté que les souches de production de l'enzyme alimentaire dénommées DP-Aze23 et AGME9#J39 dans le dossier sont bien une seule et même souche d'*Aspergillus niger*, souche utilisée pour la production de glucose-oxydase dans le cadre de cette demande.

En conséquence, la souche de production ne semble pas présenter de danger potentiel pour la santé humaine sur la base des éléments présentés par le pétitionnaire.

Dans l'hypothèse d'un nouvel examen de cette demande, le certificat de dépôt de la souche de production dans une collection de souches de micro-organismes devra être fourni.

#### **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 et sont de qualité alimentaire.

---

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

L'enzyme alimentaire est produite selon les Bonnes Pratiques de Fabrication pour l'alimentation humaine (cGMP) et les principes de l'HACCP<sup>7</sup>. La production de l'enzyme semble répondre aux normes ISO 22000, ISO 22002, ISO 9001/2008, ISO 9001/2015 et ISO 14001/2004. 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 lors de 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**

La présence éventuelle et les conséquences pour la santé de produits d'oxydation dans les denrées traitées, générés par l'utilisation de cette glucose-oxydase et de l'activité enzymatique secondaire catalase dans les conditions d'emploi recommandées devraient être argumentées.

Les conditions d'emploi indiquées dans l'arrêté du 19 octobre 2006 pour les glucose-oxydases sont à respecter pour cette nouvelle préparation enzymatique : *L'activité glucose-oxydase doit être associée à une activité catalase, en quantité suffisante pour dégrader le peroxyde d'hydrogène au fur et à mesure de sa formation.* La démonstration que l'activité catalase secondaire est suffisante pour éviter l'accumulation de peroxyde d'hydrogène pour les différentes applications revendiquées devrait être faite.

Dans les conditions recommandées par le pétitionnaire, la glucose-oxydase est inactivée de façon irréversible par des étapes de chauffage intervenant en panification, panification spéciale, viennoiserie, pâtisserie, biscuiterie, biscotterie et en production de pâtes et de nouilles. Les preuves de l'inactivation de la glucose-oxydase sont manquantes pour son usage dans le traitement des œufs. Les preuves d'inactivation des enzymes secondaires ne sont pas présentées quelle que soit l'application revendiquée.

### **3.4 Utilité technologique et conditions d'utilisation proposées**

L'enzyme alimentaire serait un auxiliaire technologique destiné à la panification (à l'exception du pain de tradition française), la panification spéciale, la viennoiserie, la pâtisserie, la biscuiterie, la biscotterie, la production de pâtes et de nouilles et le traitement des œufs.

### **3.5 Exposition alimentaire**

La marge de sécurité est calculée selon la méthode du Budget<sup>8</sup> pour la population générale. Les niveaux de consommation alimentaire utilisés sont basés sur la consommation physiologique maximale, c'est-à-dire une consommation quotidienne hors boissons (sauf pour le lait) de 50 g de denrées alimentaires/kg de poids corporel. L'exposition alimentaire est calculée en considérant que 25 % des denrées alimentaires 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 denrées.

<sup>7</sup> Hazard Analysis and Critical Control Points

<sup>8</sup> 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](http://whqlibdoc.who.int/ehc/WHO_EHC_240_9_eng_chapter6.pdf)

La marge de sécurité calculée présentée par le pétitionnaire ne peut être considérée en l'absence de la confirmation de la valeur en mg TOS/kg p.c./jour de la dose sans effet néfaste observé (NOAEL<sup>9</sup>), établie par l'étude de toxicité subchronique pendant 90 jours.

Le pétitionnaire ne présente pas de calcul d'exposition alimentaire en utilisant des données françaises de consommation alimentaire.

### 3.6 Données toxicologiques

Toutes les études de toxicité ont été réalisées selon les Bonnes Pratiques de Laboratoire et les lignes directrices de l'OCDE<sup>10</sup>.

Les doses de produit testées dans les différentes études de toxicité sont exprimées en mg de protéines totales/ml de produit. Afin de pouvoir évaluer la sécurité de l'enzyme, il est indispensable pour le GT « Biotechnologie » de disposer des calculs détaillés permettant de convertir les doses mises en œuvre en mg TOS d'enzyme/ml ou en mg TOS d'enzyme/kg de poids corporel/jour.

L'étude de toxicité subchronique par administration orale réitérée pendant 90 jours chez le Rat conclut à une NOAEL de 10,87 mg de protéines totales/kg de poids corporel/jour, dose la plus forte testée.

L'étude de mutagenicité *in vitro* (test d'Ames sur cinq souches de *Salmonella* Typhimurium histidine dépendante) n'a pas révélé d'augmentation du nombre de révertants jusqu'à 500 µg de protéines totales/boîte et donc pas d'effet mutagène.

Le test d'aberrations chromosomiques sur des lymphocytes humains en culture primaire, *in vitro*, a été réalisé à des concentrations pouvant atteindre jusqu'à 1250 µg de protéines totales/ml en présence de système d'activation métabolique S9 et 625 µg de protéines totales/ml sans système d'activation métabolique S9 pour le temps court (3 h), et jusqu'à 78,1 µg de protéines totales/ml pour le temps 20 h sans système d'activation métabolique S9. L'activité de la glucose-oxydase générant du peroxyde d'hydrogène, les tests ont aussi été réalisés en présence et en absence de catalase. Ce test a mis en évidence une augmentation significative de la fréquence des aberrations chromosomiques en présence de système d'activation métabolique S9, à la dose de 625 µg de protéines totales/ml avec ou sans catalase et en absence de système d'activation métabolique S9, aux doses de 313 et 625 µg de protéines totales/ml en présence de catalase et à la dose de 625 µg de protéines totales/ml en absence de catalase. Ces résultats laissent supposer une activité clastogène de l'enzyme alimentaire.

Compte tenu de ce résultat, le pétitionnaire a réalisé un troisième test : une étude *in vivo* du micronoyau sur érythrocytes de rat mâle jusqu'à la dose maximale de 725 mg de protéines totales/kg de poids corporel/jour. Elle n'a pas mis en évidence d'effet génotoxique de l'enzyme alimentaire, sans toutefois que la démonstration de l'exposition systémique ait été faite. De plus, il est fortement recommandé par l'OCDE que cette étude soit réalisée sur des animaux des deux sexes.

Le GT « Biotechnologie » considère que les données présentées ne lui permettent pas de conclure sur le potentiel génotoxique de l'enzyme alimentaire. En absence de démonstration de l'exposition effective de la moelle osseuse dans le test de micronoyau *in vivo*, la réalisation d'une autre étude permettant d'identifier les effets clastogène et aneugène de l'enzyme alimentaire est nécessaire pour renseigner le potentiel génotoxique de l'enzyme alimentaire en complément du test d'Ames.

<sup>9</sup> No Observed Adverse Effect Level

<sup>10</sup> Organisation de Coopération et de Développement Economiques

Ce pourrait être soit un test du micronoyau *in vitro* sur cellules humaines (OCDE 487), soit un second test d'aberrations chromosomiques *in vitro* sur cellules humaines en utilisant une lignée de cellules humaines génétiquement stable (OCDE 473).

### 3.7 Allergénicité

La comparaison de séquences de la glucose-oxydase d'*Aspergillus niger* avec la séquence d'un aéroallergène (Mala s 12) de *Malassezia sympodialis* identifiée comme allergène respiratoire potentiel (Allergome.org) montre une identité globale de 45 %. Ces homologies laissent supposer un potentiel allergique respiratoire de la glucose-oxydase, objet de la demande.

La consommation orale de la glucose-oxydase d'*Aspergillus niger* via les denrées traitées n'est pas une voie à risque pour ce potentiel allergique. Mais sur le site de production et lors de la mise en œuvre de l'enzyme, il conviendra de prévenir chez les opérateurs, le risque de sensibilisation par inhalation et par contact cutané d'aérosols ou de particules de cette enzyme alimentaire. Le port de masque et de vêtements de protection devra être recommandé pour prévenir les sensibilisations des opérateurs.

### 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 » estime que l'absence de risque sanitaire pour le consommateur lié à l'emploi de la glucose-oxydase issue de la souche génétiquement modifiée d'*Aspergillus niger* porteuse d'un gène codant une glucose-oxydase d'*Aspergillus niger* (souche DP-Aze23 ou AGME9#J39) pour la panification (à l'exception du pain de tradition française), la panification spéciale, la viennoiserie, la pâtisserie, la biscuiterie, la biscotterie, la production de pâtes et de nouilles et le traitement des œufs n'est pas démontrée en raison de l'absence des informations suivantes :

- valeurs précises (ou intervalles de valeurs) des activités minimales garanties de glucose-oxydase et des TOS calculés des deux formulations commerciales de l'enzyme ;
- démonstration de la stabilité de l'enzyme alimentaire sous forme de poudre ;
- certificat de dépôt de la souche de production dans une collection de souches de micro-organismes ;
- argumentation sur les produits d'oxydation générés par l'action de la glucose-oxydase et du peroxyde d'hydrogène dans les denrées traitées ;
- démonstration pour les différentes applications revendiquées que l'activité secondaire catalase est suffisante pour dégrader le peroxyde d'hydrogène au fur et à mesure de sa production par l'action de la glucose-oxydase ;
- preuves de l'inactivation de la glucose-oxydase lors du traitement des œufs ;
- preuves de l'inactivation des enzymes secondaires pour les différents usages revendiqués ;
- calculs détaillés permettant d'exprimer les doses testées formulées en mg de protéines totales/ml de produit en mg TOS d'enzyme mises en œuvre dans les études de toxicologie. Cette conversion permettant de connaître les doses d'enzyme testées, de fixer une NOAEL en mg TOS/kg p.c./jour et de calculer une marge de sécurité,
- étude de génotoxicité permettant d'identifier des effets clastogène et aneugène de l'enzyme alimentaire.

#### 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) estime que l'absence de risque sanitaire pour le consommateur lié à l'emploi de la glucose-oxydase issue de la souche génétiquement modifiée d'*Aspergillus niger* porteuse d'un gène codant une glucose-oxydase d'*Aspergillus niger* (souche DP-Aze23 ou AGME9#J39) pour la panification (à l'exception du pain de tradition française), la panification spéciale, la viennoiserie, la pâtisserie, la biscuiterie, la biscotterie, la production de pâtes et de nouilles et le traitement des œufs n'est pas démontrée en raison de l'absence des informations suivantes :

- valeurs précises (ou intervalles de valeurs) des activités minimales garanties de glucose-oxydase et des TOS calculés des deux formulations commerciales de l'enzyme ;
- démonstration de la stabilité de l'enzyme alimentaire sous forme de poudre ;
- certificat de dépôt de la souche de production dans une collection de souches de micro-organismes ;
- argumentation sur les produits d'oxydation générés par l'action de la glucose-oxydase et du peroxyde d'hydrogène dans les denrées traitées ;
- démonstration pour les différentes applications revendiquées que l'activité secondaire catalase est suffisante pour dégrader le peroxyde d'hydrogène au fur et à mesure de sa production par l'action de la glucose-oxydase ;
- preuves de l'inactivation de la glucose-oxydase lors du traitement des œufs ;
- preuves de l'inactivation des enzymes secondaires pour les différents usages revendiqués ;
- calculs détaillés permettant d'exprimer les doses testées formulées en mg de protéines totales/ml de produit en mg TOS d'enzyme mises en œuvre dans les études de toxicologie. Cette conversion permettant de connaître les doses d'enzyme testées, de fixer une NOAEL en mg TOS/kg p.c./jour et de calculer une marge de sécurité,
- étude de génotoxicité permettant d'identifier des effets clastogène et aneugène de l'enzyme alimentaire.

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

Dr Roger Genet

#### MOTS-CLES

Enzyme, auxiliaire technologique, glucose-oxydase, *Aspergillus niger*, panification, viennoiserie, pâtisserie, biscotterie, pâtes, nouilles, traitement des œufs

Enzyme, processing aid, glucose-oxidase, *Aspergillus niger*, baking process, bakery, cookie, pastry, viennese pastry, noodles, egg processing