

Le directeur général

Maisons-Alfort, le 13 novembre 2020

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 issue d'une souche d'*Aspergillus oryzae* non génétiquement modifiée pour la production de galacto-oligosaccharides (GOS)

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 27 décembre 2019 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 issue d'une souche d'*Aspergillus oryzae* non génétiquement modifiée pour la production de galacto-oligosaccharides (GOS).

1. CONTEXTE ET OBJET DE LA SAISINE

Suite à l'expertise d'un dossier de demande d'avis relatif à une demande d'autorisation d'emploi d'une bêta-galactosidase issue d'une souche d'*Aspergillus oryzae* non génétiquement modifiée pour la production de galacto-oligosaccharides (GOS), l'Anses (2019) s'est prononcée défavorablement sur cette demande le 21 février 2019¹. La conclusion du GT « Biotechnologie » était : « *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 bêta-galactosidase issue de la souche d'*Aspergillus oryzae* non génétiquement modifiée GL 470 pour la production de galacto-oligosaccharides (GOS) n'est pas démontrée en raison de l'absence des informations suivantes :*

- *Caractérisation de l'activité de transgalactosylation de la bêta-galactosidase (méthode, activité, pH, température),*

¹ Avis de l'Anses du 21 février 2019 relatif à une demande d'autorisation d'emploi d'une bêta-galactosidase issue d'une souche d'*Aspergillus oryzae* non génétiquement modifiée pour la production de galacto-oligosaccharides (GOS) (saisine 2018-SA-0234).

- Identification des activités enzymatiques secondaires et des méthodes analytiques utilisées pour ces recherches,
- Vérification des critères de pureté manquants (cadmium, mercure, anaérobies sulfito-réducteurs, *Staphylococcus aureus*),
- Recherche des mycotoxines potentiellement produites par *Aspergillus oryzae* (acides kojique, cyclopiazonique et 3 nitro propionique),
- Identification moléculaire et phénotypique de la souche de production GL 470,
- Démonstration de l'inactivation irréversible ou de l'élimination de la bêta-galactosidase et des activités enzymatiques secondaires (si elles existent) dans plusieurs lots d'ingrédient alimentaire (sirop de GOS) en utilisant les conditions de production recommandées par le pétitionnaire,
- Calculs de marge de sécurité pour différentes classes d'âge de nourrissons,
- Confirmation de l'identité du matériel testé dans les tests de toxicité comme étant l'enzyme alimentaire, objet de cette demande,
- Résultats de deux tests de génotoxicité respectant les exigences des lignes directrices OCDE² en cours,
- Vérification de l'absence de protéines de blé dans l'enzyme alimentaire.

Le GT « Biotechnologie » rappelle qu'il existe une limite d'incorporation à 7,2 g de GOS/l de préparation pour nourrissons imposée par la réglementation (arrêté du 11 avril 2008 modifié). Il est important également 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. »

Le 27 décembre 2019, un dossier complété, rédigé par le pétitionnaire, a été transmis à l'Anses par la DGCCRF conduisant à l'ouverture de cette saisine liée.

L'enzyme alimentaire est une bêta-D-galactoside galactohydrolase (ou bêta-galactosidase, E.C. 3.2.1.23). Elle est destinée à être utilisée comme auxiliaire technologique pour la seule production d'un ingrédient alimentaire composé d'un mélange de galacto-oligosides ou galacto-oligosaccharides (GOS). Ce produit est un sirop de GOS destiné à être incorporé dans des préparations pour nourrissons³ et préparations de suite⁴ destinées spécifiquement à des nourrissons⁵.

Ce dossier entre dans le cadre du décret du 10 mai 2011⁶ 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 2011⁷, le dossier doit être

² Organisation de Coopération et de Développement Economiques.

³ Préparation pour nourrissons = Denrée alimentaire destinée à être utilisée par des nourrissons pendant les premiers mois de leur vie et qui répond elle seule aux besoins nutritionnels de ces nourrissons jusqu'à l'introduction d'une alimentation complémentaire appropriée [définition du Règlement (UE) n° 609/2013 du parlement européen et du conseil du 12 juin 2013 concernant les denrées alimentaires destinées aux nourrissons et aux enfants en bas âge, les denrées alimentaires destinées à des fins médicales spéciales et les substituts de la ration journalière totale pour contrôle du poids et abrogeant la directive 92/52/CEE du Conseil, les directives 96/8/CE, 1999/21/CE, 2006/125/CE et 2006/141/CE de la Commission, la directive 2009/39/CE du Parlement européen et du Conseil et les règlements (CE) n° 41/2009 et (CE) n° 953/2009 de la Commission].

⁴ Préparation de suite = Denrée alimentaire destinée à être utilisée par des nourrissons lorsqu'une alimentation complémentaire appropriée est introduite et qui constitue le principal élément liquide d'une alimentation progressivement diversifiée de ces nourrissons (définition du Règlement (UE) n° 609/2013).

⁵ Enfant âgé de moins de 12 mois (définition du Règlement (UE) n° 609/2013).

⁶ 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.

⁷ 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.

établi selon le guide⁸ de l'Autorité européenne de sécurité des aliments/European Food Safety Authority (EFSA) pour la soumission d'un dossier sur les enzymes alimentaires.

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 18 février 2020, l'Anses a effectué une demande de compléments d'information auprès de la DGCCRF, le 7 avril 2020. Le 2 septembre 2020, l'Anses a reçu des éléments de réponse permettant de poursuivre l'expertise.

L'expertise collective a été menée par le GT « Biotechnologie » les 18 février et 29 octobre 2020, 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).

3. ANALYSE ET CONCLUSIONS DU GT

L'ensemble des éléments présents dans l'avis de Anses du 21 février 2019 (saisine 2018-SA-0234) n'est pas repris ci-dessous. Ce nouvel avis contient seulement des expertises actualisées ainsi que des éléments du 1^{er} avis dont la présence est jugée importante par le GT « Biotechnologie ».

3.1 Identité de l'enzyme alimentaire⁹

L'enzyme alimentaire est une bêta-D-galactoside galactohydrolase (ou bêta-galactosidase, E.C. 3.2.1.23). 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 dénommés galacto-oligosides ou galacto-oligosaccharides (GOS) par ajout d'un ou plusieurs résidus D-galactosyle sur le galactose du lactose.

Le pétitionnaire présente les méthodes d'analyse utilisées pour la recherche de l'activité hydrolase de la bêta-galactosidase et pour la recherche de l'activité de transgalactosylation qui est l'activité enzymatique revendiquée. La méthode de détection de l'activité de transgalactosylation utilisée est décrite dans Vera *et al.* (2011). Les définitions des deux activités enzymatiques de la bêta-galactosidase fournies par le pétitionnaire sont les suivantes :

- Une unité de l'activité hydrolase de la bêta-galactosidase est définie comme la quantité d'enzyme nécessaire pour libérer à partir d'o-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside, 1 µg d'o-nitrophénol par minute, à 37 °C et à pH 4,5.

⁸ 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.

⁹ 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.*

- Une unité de l'activité de transgalactosylation de la bêta-galactosidase est définie comme la quantité d'enzyme nécessaire pour transgalactosyler 1 μ mole de galactose dans le lactose à l'autre saccharide par minute, dans les conditions de l'étude.

Le pétitionnaire présente des données expérimentales d'identification en tant que bêta-galactosidase d'*Aspergillus oryzae* pour les 9 fractions peptidiques principales présentes sur le profil électrophorétique de l'enzyme alimentaire. Toutefois, ces données doivent être complétées par la recherche d'activités enzymatiques secondaires accompagnée de la présentation des méthodes analytiques utilisées comme cela a été mentionné dans la demande de compléments d'information du 7 avril 2020 ainsi que dans l'avis du 21 février 2019.

Les critères de pureté chimique et biologique de l'enzyme alimentaire répondent aux exigences de l'arrêté du 19 octobre 2006 modifié¹⁰.

Les mycotoxines potentiellement produites par *Aspergillus oryzae* et *Aspergillus flavus* (acides kojique, cyclopiazonique et 3 nitro propionique) et les principales mycotoxines connues ont été recherchées dans plusieurs lots d'enzyme alimentaire et non détectées par les différentes méthodes analytiques utilisées et jugées recevables par le GT « Biotechnologie ». Le pétitionnaire montre également que 24 métabolites secondaires recherchés ne sont pas détectables lorsque la souche de production est cultivée dans des conditions optimales pour la synthèse de ces métabolites.

La recherche de la souche de production effectuée dans différents lots d'enzyme alimentaire selon les recommandations de l'EFSA (2019) permet de conclure à l'absence de cellules viables de cette souche.

3.2 Organisme de production et procédé de fabrication

3.2.1 Organisme de production

Le pétitionnaire indique que la souche de production de l'enzyme alimentaire est une souche d'*Aspergillus oryzae* non génétiquement modifiée, obtenue par une série de mutations conventionnelles. Des éléments d'identification moléculaire et phénotypique sont apportés pour conforter l'identité de la souche de production GL 470 comme souche d'*Aspergillus oryzae*.

3.2.2 Procédé de fabrication

Les éléments sur le procédé de fabrication figurent dans l'avis de l'Anses du 21 février 2019.

Compte tenu de l'origine fongique de l'organisme de production et donc de sa capacité potentielle à produire des métabolites secondaires toxiques, le GT « Biotechnologie » réitère son conseil de mettre en place une surveillance de ces substances lors de la production de l'enzyme alimentaire en actualisant les contrôles des nouveaux métabolites identifiés en fonction de la disponibilité des standards.

3.3 Réaction et devenir dans les denrées alimentaires

Les produits de réaction de la bêta-galactosidase 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 sont des molécules fortement hyperosmotiques et très fermentescibles.

¹⁰Arrêté du 19 octobre 2006 modifié relatif à l'emploi d'auxiliaires technologiques dans la fabrication de certaines denrées alimentaires.

Le pétitionnaire informe que l'activité hydrolase de la bêta-galactosidase est inférieure à la limite de détection dans 5 lots d'ingrédient alimentaire (sirop de GOS) mais la méthode analytique est peu détaillée. L'inactivation de potentielles activités enzymatiques secondaires (si elles existent) n'est pas discutée.

3.4 Utilité technologique de l'enzyme et conditions d'utilisation proposées du produit

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 de GOS destiné à être incorporé dans des préparations pour nourrissons³ et préparations de suite⁴ destinées spécifiquement à des nourrissons⁵

3.5 Exposition alimentaire

Le pétitionnaire présente des hypothèses pour des calculs d'exposition alimentaire des nourrissons, seule population consommant les préparations pour nourrissons et préparations de suite. Il considère que le sirop de GOS incorporé a été synthétisé en utilisant l'enzyme à la dose maximale recommandée avec une activité enzymatique conservée intégralement dans le sirop de GOS puis que le sirop de GOS est incorporé dans les denrées revendiquées à la limite d'incorporation réglementaire. Le pétitionnaire fait référence à la directive 2006/141/EC. En France, cette directive est transposée par l'arrêté du 11 avril 2008 modifié¹¹ qui fixe une limite d'incorporation à 7,2 g de GOS/l de préparation pour nourrissons. La population des nourrissons est répartie en 3 classes d'âge : moins de 16 semaines, 4-6 mois, 6-12 mois. Les marges de sécurité ne sont pas présentées dans le dossier.

En utilisant les hypothèses d'incorporation potentielle d'enzyme *via* l'ajout du sirop de GOS dans les denrées revendiquées par le pétitionnaire, la limite d'incorporation à 7,2 g de GOS/l de préparation pour nourrissons, la méthode de calcul des expositions alimentaires pour les trois classes d'âge formulée par le pétitionnaire et en prenant la NOAEL¹² retenue par le GT « Biotechnologie » de 100 mg TOS/kg de poids corporel/jour, le GT « Biotechnologie » a calculé des marges de sécurité de 80 pour les nourrissons de moins de 16 semaines, de 122 pour les nourrissons de 4 à 6 mois et de 94 pour les nourrissons de 6 à 12 mois. Ces marges de sécurité calculées sont faibles et ne permettent pas au GT « Biotechnologie » de conclure sur la sécurité de l'exposition alimentaire.

Ces marges de sécurité sont toutefois calculées avec des hypothèses maximalistes d'exposition alimentaire. Le pétitionnaire informe en effet que l'activité hydrolase de la bêta-galactosidase est inférieure à la limite de détection dans 5 lots d'ingrédient alimentaire (sirop de GOS). Des données sur le procédé de production des sirops de GOS, en particulier sur les étapes suivant la synthèse enzymatique, permettraient de documenter l'élimination de la bêta-galactosidase. La recherche de l'enzyme alimentaire (et non uniquement de l'activité enzymatique bêta-galactosidase) devra être renseignée dans plusieurs lots d'ingrédient alimentaire produits dans les conditions recommandées par le pétitionnaire.

Il conviendrait également qu'en conservant les hypothèses d'incorporation potentielle d'enzyme *via* l'ajout du sirop de GOS dans les denrées revendiquées par le pétitionnaire et en prenant la NOAEL retenue par le GT « Biotechnologie » de 100 mg TOS/kg de poids corporel/jour, des calculs de marge de sécurité plus réalistes soient fournis pour les différentes classes d'âge en utilisant les données de consommation moyenne de l'annexe de la publication de Hulin *et al.* (2014) qui s'appuie sur les résultats de l'enquête BEBE-SFAE¹³.

¹¹ 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.

¹² NOAEL : No Observed Adverse Effect Level/dose sans effet néfaste observé.

¹³ Fantino M. et Gourmet E., 2008. Apports nutritionnels en France en 2005 chez les enfants non allaités âgés de moins de 36 mois. Archives de pédiatrie, 15, 446-455. Cette enquête a été réalisée sur le terrain du 12 janvier au 10 mars 2005 par la TNS-SOFRES pour le compte du Syndicat Français des Aliments de l'Enfance, membre de l'Alliance 7. Le recueil

3.6 Données toxicologiques

Le pétitionnaire confirme que l'ensemble des études de toxicité ont été conduites avec l'enzyme alimentaire produite avec la souche de production GL 470.

Dans l'avis de l'Anses du 21 février 2019, le GT « Biotechnologie » avait identifié une NOAEL de 100 mg TOS/kg p.c./jour sur la base de deux études de toxicité orale subchronique par administration répétée pendant 90 jours chez le rat réalisées en 1995 et 2015, suivant la ligne directrice 408 de l'OCDE.

Une troisième étude de toxicité orale subchronique par administration répétée pendant 90 jours chez le rat a été réalisée en 2017 suivant la ligne directrice 408 de l'OCDE aux doses de 778, 2333 et 7000 mg TOS/kg de poids corporel/jour sur 10 rats/sexe de souche Sprague Dawley. Le lot d'enzyme alimentaire testé était le lot concentré d'enzyme alimentaire utilisé pour les 3 études de génotoxicité réalisées en 2017. Les lignes directrices OCDE proposent une concentration maximale à tester de 1000 mg/kg p.c./j pour les études de toxicité subchronique et de 5000 mg/kg p.c./j pour les études de toxicité aiguë. La mise en œuvre d'une dose de 7000 mg TOS/kg p.c./j a été considérée éthiquement et scientifiquement non justifiable par le GT « Biotechnologie » et les données obtenues avec cette dose ont été en conséquence exclues de l'expertise. Les résultats conduisant à suspecter un effet toxique sur la fonction rénale dès la plus faible dose testée chez les rats mâles ne permettent pas de fixer une NOAEL à partir de cette troisième étude.

En conclusion, sur les 3 études de toxicité orale subchronique par administration répétée pendant 90 jours chez le rat, seule la deuxième étude de toxicité subchronique réalisée en 2015 permet d'identifier une NOAEL de 100 mg TOS/kg de poids corporel/jour, correspondant à la dose la plus forte testée dans cette étude.

Cinq études de génotoxicité sont présentées.

Comme indiqué dans l'avis de l'Anses du 21 février 2019, les études de génotoxicité réalisées en 1995 ne répondent pas aux lignes directrices OCDE 471 et 473 en vigueur. Elles présentent un manque de sensibilité au regard des exigences actuelles. Elles ne sont pas prises en compte pour l'expertise dans cet avis.

Trois autres études ont été réalisées en 2017 sur un même lot concentré d'enzyme alimentaire. 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) a été réalisée selon les lignes directrices OCDE 471 d'abord sans étape de lavage puis avec lavage des bactéries préalablement à l'étalement sur boîtes afin d'éliminer les acides aminés résiduels potentiellement présents dans l'enzyme testée. Cette étude n'a pas révélé d'augmentation du nombre de révertants jusqu'à 35 mg TOS d'enzyme alimentaire/boîte et donc pas d'effet mutagène. Seul le contrôle positif avec le 2-aminoanthracène a été réalisé en présence de système d'activation métabolique S9 ce qui est une déviation par rapport aux lignes directrices OCDE 471.

des données de consommation a été effectué au domicile de 713 enfants (âgés de 15 jours à 36 mois), selon la technique du carnet alimentaire sur trois jours consécutifs (incluant un jour de week-end), repas par repas, noté par les personnes prenant soin des enfants (le plus souvent la mère, et/ou la nourrice, avec la participation des pères).

Ont été inclus dans cette enquête, des nourrissons ou jeunes enfants non allaités au sein (ni exclusivement, ni partiellement) et ne fréquentant pas une crèche collective ou une école durant les trois jours suivant le recrutement. En effet, la quantité de lait consommée par un bébé allaité au sein étant difficile à évaluer, elle aurait nécessité un protocole spécifique et une analyse du lait maternel pour chaque nourrice, voir à chaque prise, compte tenu des variations de la teneur du lait de femme. Les enfants nourris au sein ont donc été exclus par la TNS-SOFRES.

Le test d'aberrations chromosomiques sur des fibroblastes pulmonaires de hamster chinois *in vitro* (OCDE 473) n'a pas mis en évidence d'effet clastogène ou aneugène de l'enzyme alimentaire jusqu'à 35 mg d'enzyme alimentaire/ml en l'absence ou en présence de système d'activation métabolique S9 pour le temps court (6 h). Pour le temps long de traitement sans activation métabolique (24 h), une augmentation significative d'aberrations chromosomiques est mise en évidence aux doses les plus élevées testées, 8,75 et 17,5 mg d'enzyme alimentaire/ml. Ces augmentations restent toutefois dans la plage de variation des contrôles historiques du laboratoire. Une répétition de cet essai pour le temps long a confirmé une augmentation significative d'aberrations chromosomiques à la dose de 17,5 mg d'enzyme alimentaire/ml.

L'étude d'aberrations chromosomiques ne permettant pas de conclure totalement sur l'effet clastogène ou aneugène de l'enzyme alimentaire, le pétitionnaire a réalisé un troisième test selon la ligne directrice OCDE 489 : un test des comètes en milieu alcalin *in vivo* chez le rat mâle souche Sprague Dawley aux doses de 1,75, 3,5 et 7 g TOS d'enzyme alimentaire/kg de poids corporel administrées par gavage. Les deux tissus sélectionnés pour l'étude des cellules ont été l'estomac et le duodénum. Ces deux organes sont pertinents mais le GT « Biotechnologie » estime qu'il aurait été souhaitable d'inclure les cellules de foie et de rein en raison des effets néphrotoxiques observés dans l'étude de toxicité subchronique (1995). Cette étude n'a pas mis en évidence une fréquence supérieure de comètes dans les cellules issues de rats ayant reçu l'enzyme par rapport à celles issues de rats du groupe témoin, quelle que soit la dose d'enzyme testée. Cette étude permet de conclure à l'absence de cassures d'ADN imputables à l'enzyme alimentaire.

Ces résultats montrent que l'enzyme alimentaire n'est ni mutagène ni génotoxique *in vivo* dans les conditions testées.

3.7 Allergénicité

En raison de l'utilisation de matières premières issues du blé dans le procédé de production et du fait que le blé est un allergène à déclaration obligatoire, le pétitionnaire a recherché les protéines du gluten dans l'enzyme alimentaire en utilisant 2 kits basés sur la technique ELISA. Ces 2 kits sont complémentaires vis-à-vis des protéines ciblées. Les résultats obtenus pour six lots d'enzyme alimentaire se situent en-dessous des limites de détection et ne conduisent donc pas à suspecter la présence de protéines de blé dans l'enzyme alimentaire.

Une recherche bioinformatique actualisée par le GT « Biotechnologie » n'a pas mis pas en évidence d'identités de séquences entre la séquence de l'enzyme et des allergènes connus (AllergenOnline version 2019) et donc ne conduit pas à suspecter un potentiel allergique de l'activité enzymatique principale, la bêta-galactosidase. Sur la base des données fournies et des données de la littérature (Binkley, 1996 ; Voisin et Borici-Mazi, 2016), le risque d'allergie alimentaire associée à cette enzyme apparaît faible.

Des réactions allergiques suite à des expositions par voie aéroportée ont été signalées dans la littérature en tant que maladies professionnelles observées dans l'industrie de production et de conditionnement de bêta-galactosidases. Sur le site de production et lors de la mise en œuvre de l'enzyme, il conviendra de prévenir par des mesures spécifiques de protection des personnels le risque de sensibilisation par inhalation et par contact cutané d'aérosols ou de particules de cette enzyme alimentaire.

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 bêta-galactosidase issue de la souche d'*Aspergillus oryzae* non génétiquement modifiée GL 470 pour la production de galacto-oligosaccharides (GOS) n'est pas démontrée en raison de l'absence des éléments ou informations suivantes :

- Recherche des activités enzymatiques secondaires avec description des méthodes analytiques utilisées ; démonstration de leur inactivation irréversible ou de leur élimination dans plusieurs lots d'ingrédient alimentaire (sirop de GOS) en utilisant les conditions de production recommandées par le pétitionnaire,
- Données détaillées sur le procédé de production des sirops de GOS afin de documenter l'élimination de l'enzyme alimentaire dans plusieurs lots d'ingrédient alimentaire en utilisant les conditions de production recommandées par le pétitionnaire,
- Calculs de marges de sécurité pour différentes classes d'âge de nourrissons en utilisant des données de consommation alimentaire françaises.

Le GT « Biotechnologie » rappelle qu'il existe une limite d'incorporation à 7,2 g de GOS/l de préparation pour nourrissons imposée par la réglementation (arrêté du 11 avril 2008 modifié). Il est important également 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.

4. CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS DE L'AGENCE

L'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (Anses) endosse les conclusions du GT « Biotechnologie ». L'absence de risque sanitaire pour le consommateur n'étant pas démontrée pour les raisons précisées dans cette conclusion, l'Anses ne propose pas à la DGCCRF de donner, en l'état, une suite favorable à cette demande d'autorisation. L'Agence souligne que les éléments et informations soulignés par les experts comme faisant défaut pour conclure, sont soit précisés dans le référentiel applicable (textes réglementaires, guide EFSA, ...) soit dans les demandes transmises par l'Anses au cours de la procédure. S'agissant en particulier de la question des marges de sécurité, l'Agence indique que la population cible (nourrissons) requiert une démonstration robuste qui documente à la fois l'élimination ou l'inactivation de l'enzyme dans les conditions de production et l'existence de marges conséquentes pour les concentrations résiduelles qu'il est prudent de postuler malgré ces conditions.

Dr Roger Genet

MOTS-CLES

Enzyme, auxiliaire technologique, bêta-galactosidase, *Aspergillus oryzae*, sirop de galacto-oligosides, galacto-oligosaccharides, GOS, nourrissons

Enzyme, processing aid, beta-galactosidase, Aspergillus oryzae, galacto-oligosaccharides, GOS, infants

BIBLIOGRAPHIE

Anses. 2019. Avis de l'Anses du 21 février 2019 relatif à une demande d'autorisation d'emploi d'une bêta-galactosidase issue d'une souche d'*Aspergillus oryzae* non génétiquement modifiée pour la production de galacto-oligosaccharides (GOS) (saisine 2018-SA-0234). Maisons-Alfort : Anses, 7 p.

Binkley KE. 1996. Allergy to supplemental lactase enzyme. J. Allergy Clin. Immunol. Vol 97 n° 6:1414-1416.

EFSA CEP Panel. 2019. Statement on the characterisation of microorganisms used for the production of food enzymes. EFSA Journal 2019;17(6):5741, 13 pp.
<https://doi.org/10.2903/j.efsa.2019.5741>

Hulin M, Bemrah N, Nougadère A, Volatier JL, Sirot V and Leblanc JC. 2014. Assessment of infant exposure to food chemicals: the French Total Diet Study design. Food Additives & Contaminants: Part A, 31:7, 1226-1239 and online supplemental material.

Vera C, Guerrero C, Illanes A. 2011. Determination of the transgalactosylation activity of *Aspergillus oryzae* bêta-galactosidase: effect of pH, temperature, and galactose and glucose concentrations. Carbohydrate research 346, 745-752.

Voisin MR and Borici-Mazi R. 2016. Anaphylaxis to supplemental oral lactase enzyme. Allergy, Asthma Clin. Immunol. 12 66:1-4.

CITATION SUGGEREE

Anses. (2020). Avis relatif à une demande d'autorisation d'emploi d'une bêta-galactosidase issue d'une souche d'*Aspergillus oryzae* non génétiquement modifiée pour la production de galacto-oligosaccharides (GOS) (saisine 2020-SA-0002). Maisons-Alfort : Anses, 9 p.