



Maisons-Alfort, le 4 avril 2011

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

**relatif à la demande d'autorisation d'emploi d'une phospholipase A2**  
**issue d'une souche de *Streptomyces violaceoruber* autoclonée**  
**pour la production d'ingrédients (hydrolysats de lécithine et jaunes d'œuf modifiés)**  
**et pour le traitement de farines de céréales et d'huiles végétales**

**1. RAPPEL DE LA SAISINE**

L'Agence française de sécurité sanitaire des aliments (Afssa) a été saisie le 20 octobre 2009 par la Direction Générale de la Concurrence, de la Consommation et de la Répression des Fraudes (DGCCRF) d'une demande d'avis relatif à la demande d'autorisation d'emploi d'une phospholipase A2 issue d'une souche autoclonée de *Streptomyces violaceoruber* pour la production d'ingrédients (hydrolysats de lécithine et jaunes d'œuf modifiés) et pour le traitement de farines de céréales et d'huiles végétales. Des compléments d'information ont été transmis par la DGCCRF le 23 septembre 2010.

**2. METHODE D'EXPERTISE**

L'expertise collective a été réalisée par le Comité d'experts spécialisé (CES) « Biotechnologie » réuni le 21 janvier 2010. Des éléments complémentaires ont fait l'objet d'une expertise interne par l'UERBA.

Ce dossier entre dans le cadre du décret du 31 juillet 2001 relatif aux auxiliaires technologiques pouvant être employés dans la fabrication des denrées destinées à l'alimentation humaine et doit être établi selon le guide pour la constitution d'un dossier relatif à l'emploi de préparations enzymatiques en alimentation humaine (Afssa, 26 septembre 2003).

### 3. ARGUMENTAIRE

L'argumentaire de l'Agence nationale de la sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail est fondé sur l'avis du Comité d'experts spécialisé « Biotechnologie » et l'expertise interne de l'UERBA dont les éléments sont présentés ci-dessous :

#### **3.1 Applications technologiques envisagées – mécanisme d'action**

##### 3.1.1 Activité enzymatique principale

L'enzyme est une phospholipase A2 (phosphatidylcholine 2- acylhydrolase ; EC 3.1.1.4). Elle hydrolyse des liaisons ester des diacylphospholipides pour former des 1-acyl-3-lysophospholipides en libérant les acides gras liés en position 2.

##### 3.1.2 Activités enzymatiques secondaires

Le pétitionnaire présente des activités enzymatiques secondaires résiduelles qui ne sont plus détectables après pasteurisation.

##### 3.1.3 Applications technologiques

La préparation enzymatique est un auxiliaire technologique destiné à la production d'ingrédients (hydrolysats de lécithine et jaunes d'œuf modifiés) et au traitement de farines de céréales et d'huiles végétales. Les ingrédients produits seraient susceptibles d'être présents dans le chocolat, les sauces, la mayonnaise, les produits de boulangerie et de pâtisserie...

#### **3.2 Souche de production**

##### 3.2.1 Sécurité du micro-organisme hôte

La souche initiale de *Streptomyces violaceoruber* utilisée est caractérisée non-pathogène et non-toxinogène.

##### 3.2.2 Obtention de la souche de production

La séquence codante de la phospholipase A2 est isolée d'une souche de *Streptomyces violaceoruber*.

La séquence du plasmide multicopie, porteur du gène d'intérêt, ainsi que les différentes étapes à l'origine de la souche de production sont décrites. La stabilité de ce plasmide dans la souche de production est démontrée. Le plasmide est porteur du gène de résistance à l'antibiotique thiostrepton, gène indigène à *Streptomyces azureus*.

La souche de production de la préparation enzymatique est la souche de *Streptomyces violaceoruber* AS-10. Le HCB<sup>1</sup> a confirmé le statut d'autoclone de la souche AS-10 et l'a classé dans la classe 1, groupe I, confinement L1, pour la production de phospholipase A2 envisagée.

La souche de production de la préparation enzymatique est donc la souche de *Streptomyces violaceoruber* autoclonée AS-10.

<sup>1</sup> Haut Conseil des Biotechnologies

### **3.3 Procédé de fabrication de la préparation enzymatique**

Le procédé de production de la préparation enzymatique est une fermentation en culture submergée, suivie d'étapes de filtrations et formulation.

Le système de gestion de la qualité appliqué au processus de production de la préparation enzymatique est conforme aux exigences de la norme ISO 9001. Les matières premières et auxiliaires technologiques utilisés sont de qualité alimentaire.

### **3.4 Préparation enzymatique**

#### **3.4.1 Critères de pureté**

Les critères de pureté chimique et biologique répondent aux exigences de l'arrêté du 19 octobre 2006 modifié, relatif à l'emploi d'auxiliaires technologiques dans la fabrication de certaines denrées alimentaires.

#### **3.4.2 Données de sécurité**

Toutes les études de toxicité ont été réalisées selon les lignes directrices internationales de l'OCDE<sup>2</sup> et en conformité avec les Bonnes Pratiques de Laboratoire.

Le test de toxicité orale aiguë par gavage à la dose unique de 2000 mg de préparation enzymatique/kg de poids corporel chez le Rat n'a révélé aucun effet néfaste conduisant à fixer une DL50<sup>3</sup> per os supérieure à 2000 mg/kg pc.

L'étude de toxicité orale sub-chronique pendant 90 jours chez le Rat conclut à une NOAEL<sup>4</sup> de 40 mg/kg de poids corporel/jour chez les femelles et de 200 mg/kg de poids corporel/jour chez les mâles.

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 révélé aucune augmentation du nombre de révertants en présence de la préparation enzymatique et donc aucun effet mutagène. Le test d'aberrations chromosomiques sur des fibroblastes de poumon de hamster chinois, en culture, n'a pas mis en évidence d'effet clastogène de la préparation enzymatique. On peut donc conclure de ces deux tests que la préparation enzymatique n'est pas génotoxique.

La marge de sécurité calculée en retenant la NOAEL la plus faible de 40 mg/kg de poids corporel/jour est au minimum de 531 par la méthode de l'ingestion journalière estimée (EDI) à partir des données de consommation INCA<sup>5</sup>.

### **3.5 Devenir de la préparation enzymatique dans le produit final**

La phospholipase A2 est inactivée de façon irréversible dans les conditions présentées. Le pétitionnaire indique que toutes les denrées alimentaires susceptibles de contenir l'enzyme sont traitées thermiquement au minimum dans ces conditions ou à un barème équivalent.

Une recherche bibliographique de cas documentés de réactions allergiques aux phospholipases et un suivi par la médecine du travail sur le site de production de la préparation enzymatique ne permet pas de suspecter un potentiel allergique de la phospholipase A2.

<sup>2</sup> Organisation de Coopération et de Développement Economiques

<sup>3</sup> Dose létale 50

<sup>4</sup> No Observed Adverse Effect Level

<sup>5</sup> Etude individuelle et nationale sur les consommations alimentaires (2006)

#### 4. CONCLUSION

L'Agence nationale de la sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (Anses) estime que l'emploi d'une phospholipase A2 issue d'une souche autoclonée de *Streptomyces violaceoruber* (souche AS-10) pour la production d'ingrédients (hydrolysats de lécithine et jaunes d'œuf modifiés) et pour le traitement de farines de céréales et d'huiles végétales ne présente pas de risque sanitaire pour le consommateur, dans les conditions d'emploi présentées par le pétitionnaire. L'Anses rend donc un avis favorable à cette demande.

**Le directeur général**

**Marc MORTUREUX**

#### MOTS-CLES

auxiliaire technologique, enzyme, phospholipase, *Streptomyces violaceoruber*, jaunes d'œuf, lécithine, farines, céréales, huiles végétales.