



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 thermolysine
issue d'une souche de *Geobacillus stearothermophilus* non génétiquement modifiée
pour la production d'extraits de levures et de viande**

*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 26 mars 2012 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 thermolysine issue d'une souche de *Geobacillus stearothermophilus* non génétiquement modifiée pour la production d'extraits de levures et de viande.

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'EFSA pour la soumission d'un dossier sur les enzymes alimentaires.

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 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) ».

L'expertise collective a été réalisée sur la base de 3 rapports d'expertise, par le Comité d'experts spécialisé (CES) « Biotechnologie », réuni le 24 mai et le 21 juin 2012.

3. ANALYSE ET CONCLUSIONS DU CES

3.1 Identité de l'enzyme alimentaire⁴

L'enzyme alimentaire est une thermolysine (E.C. 3.4.24.27, CAS 9073-78-3). Elle hydrolyse les liaisons peptidiques contenant des acides aminés hydrophobes en petits peptides. Son activité nécessite un ion zinc et sa stabilité structurale, 4 ions calcium. Cette enzyme appartient à la famille des métalloendopeptidases.

Une unité d'activité de thermolysine est définie par la méthode colorimétrique de Folin, comme la quantité d'enzyme nécessaire pour produire à partir de caséine de lait, l'équivalent d'1 µg de tyrosine par minute à 37°C.

Les caractéristiques de l'enzyme alimentaire sont décrites. La séquence protéique et la structure de la protéine cristallisée sont disponibles. Les solides organiques totaux (TOS⁵) sont calculés selon la formule TOS = 100 % - humidité - cendres - diluants. La formulation finale de la thermolysine présente une activité minimale garantie de 90000 U/g avec un TOS de 2,17 % (p/p).

Aucune activité enzymatique secondaire en quantité significative n'est indiquée par le pétitionnaire.

Les critères de pureté chimique et biologique de l'enzyme alimentaire répondent aux exigences de l'arrêté du 19 octobre 2006 modifié⁶. La recherche de la souche de production et d'une activité antibactérienne est négative dans l'enzyme alimentaire.

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

3.2 Organisme de production et procédé de fabrication

3.2.1 Organisme de production

La souche de production de la préparation enzymatique est la souche de *Geobacillus stearothermophilus* TP7 non génétiquement modifiée, sélectionnée après mutagenèse chimique classique.

Une revue de la littérature sur *Geobacillus stearothermophilus* conclut que cette espèce est non-pathogène.

L'EFSA a classé cette espèce « qualified presumption of safety » (QPS) depuis 2007. Elle figure dans la liste actualisée en 2011⁷.

La liste QPS (2011) indique pour *Geobacillus stearothermophilus* la nécessité de prouver l'absence d'activité toxigène. La souche TP7 est connue pour ne pas présenter d'activité toxigène ; toutefois, il aurait été préférable que le pétitionnaire documente ce sujet comme le recommande l'EFSA.

3.2.2 Procédé de fabrication

Le procédé de production de la préparation enzymatique est un procédé de fermentation aérobie confinée, suivie d'étapes de filtrations, de concentration par ultrafiltration, de cristallisation, de séchage et de 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 à la norme ISO 9001 : 2008. Les matières premières utilisées sont de qualité alimentaire.

3.3 Réaction et devenir dans les denrées alimentaires

Les produits de la réaction de la thermolysine sont des acides aminés et des peptides courts. La thermolysine est inactivée par les étapes de stérilisation des extraits de levures et de viande, intervenant dans les procédés de fabrication de ces denrées, dans les conditions recommandées par le pétitionnaire.

3.4 Utilité technologique et conditions d'utilisation proposées

L'enzyme alimentaire serait un auxiliaire technologique destiné à la production d'extraits de levures et de viande. 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 est calculée 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. La marge de sécurité calculée est alors de 1906. Le pétitionnaire présente également un calcul de

⁷ Scientific Opinion on the maintenance of the list of QPS biological agents intentionally added to food and feed (2011 update). EFSA Journal 2011 ; 9(12):2497.

⁸ Good manufacturing practice in microbial food enzyme production.

marge de sécurité en utilisant des données de consommation alimentaire conduisant à un résultat plus élevé.

3.6 Données toxicologiques

Une étude de toxicité orale sub-chronique pendant 90 jours chez le Rat, réalisée selon les lignes directrices internationales de l'OCDE⁹ et en conformité avec les Bonnes Pratiques de Laboratoire, est présentée par le pétitionnaire. Elle permet de conclure à une NOAEL¹⁰ de 1 g/kg de poids corporel/jour soit 323,3 mg TOS/kg de poids corporel/jour, correspondant à la dose la plus forte testée.

Le pétitionnaire s'appuie sur la présence de l'espèce *Geobacillus stearothermophilus* dans la liste QPS de l'EFSA actualisée en 2011⁷ pour ne pas réaliser de tests de génotoxicité sur l'enzyme alimentaire produite. Cette espèce n'étant pas pathogène et ne produisant pas de toxines, le procédé de production et de purification de l'enzyme alimentaire ainsi que les spécifications de l'enzyme alimentaire n'alertant pas sur la présence de résidus ou de produits de dégradation susceptibles d'impacter sur la sécurité de l'enzyme alimentaire, des études toxicologiques spécifiques ne sont pas requises pour cette demande.

3.7 Allergénicité

La comparaison de séquences de la thermolysine de *Geobacillus stearothermophilus* avec les séquences d'allergènes et de toxines connus par une recherche d'identité selon les deux protocoles (recherche d'une identité supérieure à 35 % sur les différents blocs de 80 acides aminés ou une identité sur 8 acides aminés contigus) révèle une homologie avec 8 acides aminés consécutifs correspondant à Sola t 2 (aspartic protease inhibitor 11) provenant de la pomme de terre mais pas d'homologie avec l'allergène entier. Cette homologie ne permet pas de suspecter un risque allergique de l'enzyme alimentaire.

3.8 Conclusion du CES

Au vu des résultats fournis et dans les conditions d'emploi présentées par le pétitionnaire, le Comité d'experts spécialisé « Biotechnologie » n'a mis en évidence aucun facteur de risque sanitaire pour le consommateur vis-à-vis de l'emploi de cette thermolysine issue de la souche de *Geobacillus stearothermophilus* non génétiquement modifiée (souche TP7) pour la production d'extraits de levures et de viande.

⁹ Organisation de Coopération et de Développement Economiques

¹⁰ No Observed Adverse Effect Level

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) n'a mis en évidence aucun facteur de risque sanitaire pour le consommateur vis-à-vis de l'emploi de cette thermolysine issue de la souche de *Geobacillus stearothermophilus* non génétiquement modifiée (souche TP7) pour la production d'extraits de levures et de viande. L'Anses rend donc un avis favorable à cette demande.

Le directeur général

Marc Mortureux

MOTS-CLES

Auxiliaire technologique, enzyme, thermolysine, *Geobacillus stearothermophilus*, extraits de levures, extraits de viande.