



Maisons-Alfort, le 18 janvier 2008

AVIS

de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments relatif à une demande d'autorisation d'emploi d'une glutaminase produite par une souche de *Bacillus amyloliquefaciens* pour la production d'hydrolysats de protéines et d'extraits de levures

LA DIRECTRICE GÉNÉRALE

Rappel de la saisine

Par courrier reçu le 27 septembre 2007, l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments (Afssa) a été saisie le 24 septembre 2007 par la Direction générale de la concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes (DGCCRF) d'une demande d'avis relatif à une demande d'autorisation d'emploi d'une glutaminase produite par une souche de *Bacillus amyloliquefaciens* pour la production d'hydrolysats de protéines et d'extraits de levures, adressée par le bureau C2.

Méthode d'expertise

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).

Après consultation du Comité d'experts spécialisé « Biotechnologie », réuni le 20 décembre 2007, l'Afssa rend l'avis suivant :

Argumentaire

Applications technologiques envisagées – mécanisme d'action

Activité enzymatique principale

Considérant que l'enzyme revendiquée comme principale est une glutaminase (L-glutamine aminohydrolase EC 3.5.1.2) ;

Considérant que cette enzyme convertit la L-glutamine en L-glutamate et ammoniac ;

Activités enzymatiques secondaires

Considérant que des activités α -amylasique et endo-protéasique sont présentes dans la préparation enzymatique à des niveaux non négligeables ;

Considérant que l'intervention de ces activités enzymatiques dans les applications technologiques revendiquées n'est pas renseignée ;

Applications technologiques

Considérant que la préparation enzymatique est revendiquée comme un auxiliaire technologique destiné aux traitements des hydrolysats de protéines d'origines animale, végétale ou de levures ;

Considérant que ces hydrolysats sont destinés à être utilisés comme exhausteurs de goût ;

Souche de production

Considérant que la souche de production de la préparation enzymatique est la souche de *Bacillus amyloliquefaciens* GT2, non génétiquement modifiée ;

Procédé de fabrication de la préparation enzymatique

Considérant que la préparation enzymatique est produite selon les Bonnes Pratiques de Fabrication pour l'alimentation et que 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 : 2000 ;

Considérant que le procédé de production de la préparation enzymatique est un procédé de culture suivie d'étapes de filtrations, concentration, séchage et standardisation de l'enzyme ;

Considérant que les matières premières et auxiliaires technologiques utilisés sont de qualité alimentaire ;

Préparation enzymatique

Critères de pureté

Considérant que les critères de pureté chimique et biologique répondent aux exigences de l'arrêté du 19 octobre 2006 relatif à l'emploi d'auxiliaires technologiques dans la fabrication de certaines denrées alimentaires ;

Données de sécurité

Considérant que toutes les études de toxicité ont été réalisées selon les lignes directrices internationales de l'OCDE¹ et en conformité avec les Bonnes Pratiques de Laboratoire ;

Considérant que le test de toxicité orale subaiguë à 14 jours consécutifs chez le rat n'a pas montré de signes cliniques de toxicité jusqu'à la dose maximale testée ;

Considérant que le test de toxicité orale sub-chronique à 90 jours chez le rat a permis de fixer la valeur NOAEL² à 388 mg/kg de poids corporel/jour ;

Considérant que l'étude de mutagénicité *in vitro* (test d'Ames sur quatre souches de *Salmonella typhimurium* 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 ;

Considérant que le test d'aberrations chromosomiques sur des cellules ovariennes de hamster chinois en culture n'a pas mis en évidence d'effet clastogène de la préparation enzymatique ;

Considérant que le facteur de sécurité calculé (rapport de la dose sans effet observé, établie par l'étude de toxicité à 90 jours, sur l'estimation de la consommation maximale de l'enzyme susceptible de se trouver dans la denrée alimentaire) est de $1,6 \times 10^4$ pour les enfants et de $2,7 \times 10^4$ pour les adultes ;

Devenir de la préparation enzymatique dans le produit final

Considérant que la glutaminase est inactivée de façon irréversible après 30 s à 130 °C ;

¹ Organisation de Coopération et de Développement Economiques

² No Observed Adverse Effect Level

Considérant que la glutaminase n'est pas inactivée dans des produits non chauffés ;

Considérant que l'inactivation des activités enzymatiques secondaires n'a pas été renseignée ;

Produits de la réaction

Considérant que le glutamate produit par la réaction, augmente la teneur en glutamate des hydrolysats de protéines et d'extraits de levures ;

Considérant qu'en Europe, le glutamate est un additif alimentaire qui doit répondre aux exigences de la Directive 95/2/CE³ ;

Considérant que les quantités maximales d'emploi du glutamate en tant qu'additif alimentaire sont réglementées en Europe : *quantum satis* dans les assaisonnements et au maximum à 10 g/ kg seul ou en mélange dans les denrées alimentaires en général (à l'exception de celles mentionnées à l'article 2 paragraphe 3 de la Directive 95/2/CE),

Conclusion

L'Agence française de sécurité sanitaire des aliments estime qu'en l'absence de :

- données sur l'interférence des activités enzymatiques secondaires dans les applications technologiques revendiquées,
- preuves de l'inactivation irréversible des enzymes principale et secondaires après traitement des hydrolysats de protéines et des extraits de levures,

l'absence de risque sanitaire pour le consommateur lié à l'emploi d'une glutaminase produite par une souche de *Bacillus amyloliquefaciens* pour la production d'hydrolysats de protéines et d'extraits de levures, ne peut être garantie dans les conditions d'emploi présentées par le pétitionnaire. L'Afssa rend donc un avis défavorable à cette demande.

Mots clé : glutaminase, glutamate, *Bacillus amyloliquefaciens*, hydrolysats de protéines, extraits de levures.

La Directrice Générale

Pascale BRIAND

³ Directive 95/2/CE du Parlement européen et du Conseil du 20 février 1995 concernant les additifs alimentaires autres que les colorants et les édulcorants