



Maisons-Alfort, le 2 avril 2009

## AVIS

**de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments  
relatif à l'évaluation du rapport d'évaluation initial établi par les autorités  
britanniques concernant la mise sur le marché d'un nouvel ingrédient  
alimentaire : un extrait de *haricots noirs fermentés (Glycine max)*, dans le  
cadre du règlement 258/97/CE**

LA DIRECTRICE GÉNÉRALE

L'Agence française de sécurité sanitaire des aliments (Afssa) a été saisie le 13 février 2009 par la Direction générale de la concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes d'une demande d'avis relatif à « une demande d'autorisation de mise sur le marché d'un nouvel ingrédient qui est un extrait de haricots noirs fermentés ». Le rapport d'évaluation initial a été rédigé et transmis aux services de la Commission européenne par l'autorité compétente britannique.

Après consultation du Comité d'experts spécialisé « Additifs, Arômes et Auxiliaires Technologiques » par correspondance le 23 mars 2009 et du Comité d'experts spécialisé « Nutrition Humaine », le 26 mars 2009, l'Afssa rend l'avis suivant :

### **Contexte réglementaire**

Cet avis s'inscrit dans le cadre du règlement 258/97/CE relatif aux nouveaux aliments et nouveaux ingrédients alimentaires. Ce nouvel ingrédient est classé sous la catégorie E qui regroupe les aliments et ingrédients alimentaires composés de végétaux ou isolés à partir de ceux-ci, sous l'article 1, paragraphe 2. Le pétitionnaire et les autorités britanniques considèrent que l'objet de cette demande appartient à la classe 2.1. Cette classe comprend les nouveaux ingrédients (NI) complexes qui n'ont pas été génétiquement modifiés et dont la source a déjà été utilisée comme aliment dans la Communauté européenne.

### **Concernant la spécification du nouvel ingrédient**

La source du NI est une variété de soja (*Glycine max*), non génétiquement modifiée, dite *soja jaune à petites graines* qui est largement utilisée dans la province du Sichuan en Chine.

*L'Afssa souhaite des précisions sur la variété de soja utilisée, considérant que la spécification « petit et jaune » est insuffisante pour l'identifier et pourrait permettre l'utilisation de plusieurs variétés.*

Le NI est une poudre brun clair obtenue après extraction aqueuse de soja à petites graines fermenté par *Aspergillus oryzae*, moisissure utilisée depuis de nombreuses années pour la production de la sauce de soja, du miso ou encore du saké. Les principales caractéristiques du NI sont présentées dans le tableau suivant :

Paramètres	Qualification
Apparence	Poudre brun clair
Goût	« Plaisant »
Lipides	Max. 1%
Protéines	Min. 55%
Eau	Max. 7%
Activité inhibitrice de l' $\alpha$ -glucosidase	IC <sub>50</sub> <sup>1</sup> min. 0.025mg/mL
<b>Contaminants</b>	
Arsenic	Max. 10 $\mu$ g/kg
Aflatoxines	Max. 5 $\mu$ g/kg

<sup>1</sup> IC : concentration produisant une inhibition de 50%

3-MCPD (3-monochloropropane-1,2-diol)	Max. 50 µg/kg
Métaux lourds (plomb)	Max. 20 µ/kg
<b>Données microbiologiques</b>	
Bactéries	≤ 1000 ufc <sup>2</sup> /g
Levures et moisissures	≤ 300 ufc/g
<i>Escherichia coli</i>	0/g

Le NI est destiné à être incorporé dans des compléments alimentaires (sous forme de poudre, tablettes...) et dans des préparations de type thé ou soupe. Des analyses de stabilité ont montré que le produit (sous forme de poudre, tablette ou encore en solution aqueuse) est stable à température ambiante pendant une durée de 36 mois. Le principal critère pour évaluer cette stabilité est le maintien de l'activité inhibitrice de l' $\alpha$ -glucosidase.

Le pétitionnaire fait remarquer qu'une portion de plat assaisonné avec de la sauce traditionnelle de « haricots noirs » correspond à environ 15 g de « haricots noirs fermentés », ce qui équivaut avec le présent procédé d'extraction à 4,5 g de NI. Pendant l'extraction aqueuse, la fraction non soluble est éliminée, ce qui conduit à un produit riche en protéines et pauvre en lipides. Le NI contient par ailleurs 25 à 30% de glucides dont la nature n'est pas précisée. Le procédé de fabrication ne modifie pas la nature des constituants mais concentre les fractions solubles dans le NI.

Le pétitionnaire affirme que le NI présente une activité inhibitrice de l' $\alpha$ -glucosidase. Le NI semble inhiber le complexe enzymatique « sucrase-isomaltase » de la bordure en brosse. Son activité a été testée en utilisant du saccharose comme substrat de l'enzyme. Le NI semble ne présenter ni d'activité amylolytique ni protéolytique. D'après le pétitionnaire, cette activité n'aurait été mise en évidence que dans le NI et pas dans les graines crues de soja. L'IC<sub>50</sub>, concentration produisant une inhibition de 50%, varie de 0,047 mg/mL à 0,055 mg/mL. Le tableau de synthèse, repris par les autorités britanniques, est apparemment erroné car l'IC présenté est de 0.54 mg/mL.

Le Comité britannique est satisfait des caractéristiques et des analyses de stabilité du produit fournies par le pétitionnaire. Il note cependant que les résultats de tests d'activité inhibitrice de l' $\alpha$ -glucosidase varient selon les lots considérés, ce qui peut ainsi affecter l'efficacité du produit sans pour autant modifier sa sécurité d'emploi.

*La remarque des autorités britanniques n'est pas justifiée si les valeurs de l'IC à prendre en compte sont celles du rapport d'analyse et non celle du tableau de synthèse fourni par le pétitionnaire. Néanmoins, il paraît essentiel de mieux caractériser cette activité inhibitrice. En effet, il ne semble pas démontré que cette activité inhibitrice concerne toutes les  $\alpha$ -glucosidases. La nature chimique de l'inhibiteur devrait en outre être précisée. Plus largement, la composition du NI manque de précision.*

La recherche d'aflatoxines sur plusieurs lots de NI n'a pas mis en évidence la présence d'aflatoxines B1, B2, G1 et G2. Le pétitionnaire affirme par ailleurs, que *Aspergillus oryzae* n'est pas productrice d'aflatoxine.

*Dans les conditions présentées, si le traitement thermique (15 secondes à 135°C) est suffisant pour éliminer les contaminations bactériennes, elle ne réduit pas les éventuelles molécules produites par les microorganismes contaminants.*

Le pétitionnaire affirme que les pesticides ne sont pas utilisés dans la production du NI. Les résultats d'analyses de résidus de pesticides montrent qu'aucun ne dépassait le seuil de détection. Le pétitionnaire a fourni les résultats d'analyse des composants intrinsèques potentiellement toxiques, tels des contaminants liés au procédé de fabrication, pour trois lots non consécutifs de NI destinés à être commercialisés dans l'Union européenne. Les analyses de métaux lourds révèlent des niveaux de plomb et de cadmium acceptables d'un point de vue réglementaire. Les niveaux d'arsenic, de mercure et d'hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) sont en dessous du seuil de détection.

Au niveau de consommation prévue du NI, les teneurs en dioxines et furanes (comprises entre 45 et 48 pg/g) et en PCB de type dioxine (comprises entre 28 et 29 pg/g), mesurés sur trois lots sont considérées comme acceptables.

<sup>2</sup> ufc : unités formant colonies

Les cultivateurs n'emploient pas de produits chimiques pour leur culture et s'assurent de l'absence de source de pollution à proximité de leurs champs. Les mesures prises pour le stockage sont bien documentées d'après les autorités britanniques.

*L'Afssa souligne l'incohérence des teneurs en arsenic et métaux lourds mesurées avec les spécifications proposées. De même, l'unité utilisée pour exprimer les teneurs en dioxines, furanes et PCBs n'est pas clairement renseignée (pg/g de NI ou pg/g de lipides du NI) ni les causes possibles de la présence de tels contaminants dans cette préparation. Dans l'attente de précisions à ce sujet, l'Afssa ne peut se prononcer sur ces données de contamination. Enfin, considérant la teneur protéique élevée caractérisant cette préparation, le risque de fraude à la mélamine est à envisager.*

#### **Concernant les effets du procédé de production appliqué au nouvel ingrédient**

L'autorité britannique rappelle les différentes étapes du procédé de production de l'extrait : les graines sont lavées et triées pour éliminer les corps étrangers, puis elles sont cuites à la vapeur et fermentées en milieu aérobie à l'aide d'*Aspergillus oryzae*. Le produit ainsi obtenu est lavé, séché, trié et conditionné sous vide en attendant l'étape d'extraction.

La fermentation par cette souche est un procédé connu dans la production de la sauce de soja, du miso et du saké. Les graines fermentées sont broyées et dispersées dans de l'eau bouillante. La phase aqueuse est séparée de la phase non soluble par centrifugation et filtration, puis purifiée, concentrée et séchée par atomisation pour former le produit final. Les procédures de fabrication suivent les principes HACCP et la réglementation européenne n°852/2004.

L'autorité britannique indique que, selon le pétitionnaire, il n'y a pas de risque associé au processus de production et pas de formation de produits présentant un risque.

Néanmoins, l'équivalence substantielle du NI avec la « sauce de soja » a fait l'objet de demande de compléments d'information par les autorités britanniques. Le pétitionnaire a répondu que la production du NI implique certes 2 étapes de traitement thermique mais que le second traitement correspond selon lui, à une phase de stérilisation, courte et bien contrôlée (135°C, 15 secondes). En outre, le pétitionnaire a fourni des analyses HPLC pour montrer l'effet de la fermentation et du traitement aqueux à chaud sur la composition en protéines du NI. Les chromatogrammes obtenus pour le NI et la pâte de haricots fermentés sont très proches amenant le pétitionnaire à conclure à l'absence de différences qualitatives entre le profil protéique des 2 produits. Le pétitionnaire conclut que les différents traitements ont des effets similaires sur les protéines, que ce soit pour la sauce de soja ou pour le NI.

Par ailleurs, suite à une demande de précision sur les conditions de fermentation de l'autorité britannique, le pétitionnaire précise que la fermentation est réalisée en aérobiose, à 30°C, pendant 7 jours avec le champignon *Aspergillus oryzae*. La fermentation est interrompue par refroidissement avant lavage et séchage du soja fermenté. Le pétitionnaire confirme que le procédé de fermentation utilisé dans la production de la sauce ou de la pâte de soja fermenté est identique à celui utilisé pour la préparation du NI. Le Comité britannique ajoute que, comme les graines de soja sont utilisées lentement par la souche, il est improbable que les conditions de culture conduisent à des métabolites secondaires de fermentation.

*L'Afssa considère que les réponses du pétitionnaire au Comité britannique ne sont pas totalement satisfaisantes. Le procédé utilisé traditionnellement consiste à fermenter du soja et des proportions variables de céréales, par *Aspergillus oryzae* à 25-30°C pendant 2-3 jours. Ensuite, une deuxième étape intervient. Elle consiste à mélanger le produit obtenu au cours de la première étape, appelé koji, avec un volume égal de saumure (eau salée à 22-23%). La teneur en sel de la pâte doit être de 17 à 19 % pour éviter les contaminations microbiennes. Ce mélange est à son tour inoculé par la bactérie *Pediococcus halophilus* et la levure *Saccharomyces rouxii*. La fermentation est conduite en cuve pendant 6 à 8 mois. Enfin, la pâte est filtrée pour extraire la sauce de soja. Le procédé décrit par le pétitionnaire semble différent du procédé traditionnel rapporté ici. En conséquence, l'Afssa considère qu'il n'est pas pertinent de comparer le NI avec les produits traditionnels et de considérer le NI comme substantiellement équivalent à la sauce de soja traditionnelle.*

**Concernant l'utilisation antérieure de l'organisme utilisé comme nouvel ingrédient**

La source du NI est une variété non génétiquement modifiée de soja (*Glycine max*) cultivée notamment dans la province du Sichuan et qui produit des graines plus petites que celles du soja cultivé habituellement. Le Comité britannique reconnaît que la fermentation des petites graines de soja avec *Aspergillus oryzae* est utilisée depuis de nombreuses années, notamment pour la production de sauce soja, de miso et de saké.

*L'Afssa considère que les traitements appliqués au NI et à la sauce de soja ne sont pas identiques et sont susceptibles d'affecter différemment la composition et la biodisponibilité des constituants.*

En outre, selon le pétitionnaire le produit objet de la demande est autorisé au Japon. La surveillance post-commercialisation menée par le fabricant en 2005 n'a révélé aucun effet indésirable. L'autorité britannique est satisfaite de ces données et note que le pétitionnaire doit proposer un mécanisme permettant de rapporter tout effet indésirable observé du NI par le consommateur. Elle demande que le suivi post-commercialisation soit rapporté au bout de 18 mois.

*L'Afssa estime que la mise en place d'un suivi de post-commercialisation est important mais ne dispense pas d'une évaluation préalable satisfaisante.*

**Concernant la consommation/niveau d'utilisation prévu du nouvel ingrédient**

Le NI sera commercialisé sous forme de compléments alimentaires ou sera destiné à enrichir certaines denrées (thé ou soupe), à une dose journalière de 4,5 g. Le pétitionnaire précise que des précautions d'utilisation seront indiquées sur le NI telle que la dose à utiliser, le fait que le NI ne doit pas être consommé seul et qu'il doit être dilué dans de l'eau chaude pour les produits comme le thé ou la soupe.

Le pétitionnaire, sur la base des données de consommation britannique, selon un scénario extrême, propose des données de consommation du NI. La consommation moyenne de soupe et de thé conduit respectivement à l'ingestion de 4,5 g et 13,5 g de NI. Les plus forts consommateurs ingèrent jusqu'à 4,5 g (pour la soupe) et 36 g (pour le thé). Une dose sans effet indésirable observé (NOAEL) de 2500 mg/kg de poids corporel/jour de NI a été établie, à ce qui équivaut à une consommation quotidienne de 150 g de NI pour un adulte de 60 kg.

Le Comité britannique considère que la consommation de NI à la dose d'incorporation proposée ne présente pas de risque sanitaire sur la base du recul et de l'historique de consommation. L'autorité britannique a demandé également que soit précisé le sens du terme « support nutritionnel » utilisé par le pétitionnaire et qui semble faire référence à l'utilisation même du NI. En effet, le NI ne peut être utilisé que pendant un repas et non *per se*.

*L'Afssa considère que le terme « support nutritionnel » est trompeur et pourrait laisser croire que le NI est vecteur de nutriments essentiels. L'Afssa souligne une certaine ambiguïté sur les préparations envisagées et la posologie recommandée (forme et utilisation de compléments alimentaires : dose présentée comme dose journalière ou par portion selon les cas).*

**Concernant les informations d'ordre nutritionnel sur le nouvel ingrédient**

Les autorités britanniques rappellent que les allégations de santé attribuables à la consommation de NI ne sont pas considérées dans le cadre de cette demande. Les allégations nutritionnelles ou de santé pour cette substance doivent faire l'objet d'une procédure d'autorisation en vertu du règlement (CE) 1924/2006.

*L'Afssa confirme la position du Comité britannique.*

**Concernant les informations d'ordre microbiologique sur le nouvel ingrédient**

Selon le pétitionnaire, le procédé de production du NI inclut une stérilisation ainsi qu'une filtration de la solution aqueuse pour minimiser les risques de contamination microbienne. Le taux d'humidité du

produit sous sa forme poudre est inférieur à 7% ce qui, d'après le pétitionnaire, limite le risque de prolifération microbienne. Le site de production respecte les normes HACCP<sup>3</sup> et les GMP<sup>4</sup>. Le pétitionnaire fournit les résultats de recherche de contamination microbienne, considérés comme satisfaisants par les autorités britanniques.

*L'Afssa indique que si l'extraction aqueuse à 125°C des graines fermentées et le second traitement thermique à 135°C permet d'éliminer les moisissures de A. oryzae, ni les spores ni les mycotoxines éventuellement produites pendant la fermentation ne seront éliminées.*

*Par ailleurs, l'Afssa souligne qu'un traitement thermique de 135°C pendant 15 seconde ne peut être présenté comme une stérilisation.*

*L'Afssa rappelle que A.oryzae est considérée par les experts en microbiologie comme étant un variant domestiqué de A. flavus. A. oryzae a été sélectionnée afin de produire moins de spores et ne pas produire d'aflatoxines. Les souches d'A. oryzae utilisées pour des applications industrielles proviennent généralement de collections. L'Afssa remarque que le pétitionnaire ne précise pas l'origine de la souche utilisée et recommande de s'assurer que la souche ne se reconvertisse pas en A. flavus au cours du temps en suivant la production d'aflatoxines.*

### **Concernant les informations d'ordre toxicologique sur le nouvel ingrédient**

L'autorité britannique rapporte les études toxicologiques in vivo et in vitro effectuées par le pétitionnaire. La toxicité orale aiguë chez la souris (Dose létale pour 50% des animaux, DL50) est supérieure à 5000 mg/kg de poids corporel (pc). Une étude de toxicité subaiguë (28 jours) a été réalisée chez le rat, à des doses de NI de 250, 1000, et 2500 mg/kg pc administrées par sonde gastrique. Les seuls effets observés ont été une diminution significative de la teneur corpusculaire en hémoglobine moyenne et du volume corpusculaire moyen chez les rats mâles à la dose de 1000 mg/kg pc, une diminution faible mais significative de la teneur en chlorures sanguins aux doses de 1000 et 2500 mg/kg pc chez les mâles, une diminution significative de l'activité  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase sanguine chez les femelles à la dose de 250 mg/kg pc. Ces variations ont été estimées sans relation avec la substance testée du fait de l'absence d'effet dose-dépendant ou considérées comme relativement proches des données de base. En conclusion, la NOAEL<sup>5</sup> a été estimée supérieure à 2500 mg/kg pc.

Aucune étude relative aux effets du NI sur la reproduction et le développement, et sur son potentiel mutagène ou génotoxique n'a été trouvée dans la littérature scientifique. Le pétitionnaire a cependant fourni un travail sur les aspects mutagène et génotoxique : le produit a été évalué au cours de tests in vivo du micronucleus de rats qui ont reçu par gavage, pendant 2 jours consécutifs, des doses de 10 ml/kg pc. Aucun effet dose n'a été constaté dans l'apparition d'érythrocytes polychromatiques avec micronucleus parmi les rats recevant le NI, tandis qu'une augmentation significative dans l'apparition de ces érythrocytes polychromatiques avec micronuclei (de 4,92%) était observée dans le groupe témoin positif.

L'activité du produit a également été évaluée au cours de divers essais pharmacologiques (sur tissus et animaux, rats et souris). Aux doses et aux concentrations utilisées, aucun effet n'a été observé, ni sur le système nerveux central, ni sur le système cardiaque, ni sur le système gastro-intestinal, ou sur le métabolisme. Aucune manifestation allergique ou inflammatoire n'a été observée. Aucun microorganisme pathogène n'a été détecté.

Des études sur l'effet du NI sur le métabolisme des glucides chez l'homme sain, diabétique ou hyperlipémique ont aussi été rapportées. Les patients faisaient l'objet d'un suivi des paramètres hématologiques, biochimiques, du poids, et des éventuels effets secondaires. Le pétitionnaire a fait remarquer l'absence d'effet indésirable majeur, notamment sur le plan digestif. Bien que le soja puisse inhiber les protéases gastro-intestinales et provoquer des diarrhées et des douleurs abdominales, le NI ne montre pas ces effets.

L' autorité britannique s'est montrée d'accord avec les conclusions de l'évaluation toxicologique du pétitionnaire.

<sup>3</sup> Hazard Analysis Critical Control Point (Analyse des dangers - points critiques pour leur maîtrise)

<sup>4</sup> Good Manufacturing Practices (Bonnes pratiques de fabrication)

<sup>5</sup> No observed adverse effect level (dose sans effet néfaste observé)

L'Afssa estime qu'une étude de 28 jours pourrait suffire si le NI était équivalent aux produits traditionnels comme la sauce de soja, mais le procédé de fabrication n'utilise que la fermentation par *Aspergillus oryzae*, alors que traditionnellement, cette fermentation n'est qu'une première étape. Elle est normalement suivie par une autre, plus longue, en milieu salin, avec une bactérie et une levure. Le résultat final est un soja ayant subi une hydrolyse maximale des macronutriments et des facteurs antinutritionnels. Par conséquent, il semble nécessaire, soit de connaître la composition détaillée en micronutriments du NI (acides aminés, glucides, acides organiques, vitamines, minéraux, etc... par rapport à celle d'une sauce de soja traditionnelle), soit de disposer d'études toxicologiques complémentaires, comme le prévoit la réglementation.

En effet, l'arbre de décision de la recommandation européenne 97/618 prévoit soit la comparaison à un produit traditionnel homologue pour faciliter l'évaluation toxicologique ainsi que la remise d'informations sur la présence ou non de nouveaux toxiques ou sur les variations des taux de toxiques existants, soit des informations à partir d'une gamme d'études toxicologiques appropriées (étude de 90 jours notamment) pour s'assurer de la sécurité du NI dans les conditions d'utilisation prévues et l'étude de l'éventualité d'allergies.

### **Conclusions**

L'autorité britannique reconnaît que les produits fermentés issus du soja sont largement disponibles sur le marché et ont été consommés depuis longtemps sous forme de sauce de soja, de miso et de saké. Comme l'Autorité britannique considère que le NI est obtenu à partir de soja fermenté en utilisant le même procédé de production que celui utilisé pour la production de sauce de soja, elle estime, en accord avec le pétitionnaire, que la consommation du NI ne produit aucun effet indésirable. En outre, elle est rassurée par le fait que les conditions de fermentation ne puissent pas donner lieu à la production de métabolites secondaires.

En conclusion, l'Autorité britannique accepte les utilisations proposées pour le nouvel ingrédient ainsi que ses spécifications et les paramètres de production présentés. Elle souhaite que l'étiquetage des aliments contenant le nouvel ingrédient soit fait en accord avec la législation existante et ne comporte pas d'allégations trompeuses pour le consommateur.

### **L'Afssa considère que**

- **le procédé de production du NI n'est pas strictement identique à celui utilisé traditionnellement. Par conséquent, il n'est pas pertinent d'argumenter en faisant référence à la sécurité présentée par les produits traditionnels sans s'assurer au préalable de la similarité de leur composition avec le NI. Il est donc nécessaire soit de connaître la composition détaillée en micronutriments du NI soit de réaliser une étude de toxicité subchronique complémentaire.**
- **la substance active inhibitrice de l' $\alpha$ -glucosidase doit être identifiée et décrite afin qu'elle puisse éventuellement être dosée spécifiquement dans des aliments ;**
- **le pétitionnaire doit définir botaniquement plus précisément la variété de soja utilisée pour produire ce NI ;**
- **le pétitionnaire doit surveiller la production d'aflatoxines au cours des années de production afin d'éviter leur présence ainsi qu'une éventuelle réversion *A. oryzae* vers la souche *A. flavus* et préciser les conditions de fermentation;**
- **les teneurs maximales du NI en métaux lourds et en dioxines et PCB du produit doivent être précisées et la présence de ces contaminants explicitée ;**
- **la présence de substances dérivées du soja doit être obligatoirement signalée sur l'étiquetage des aliments ou ingrédients contenant le produit ;**
- **le terme « support nutritionnel » utilisé pour indiquer que le NI ne doit être consommé qu'au cours d'un repas -et non isolément- est de nature à induire le consommateur en erreur suggérant qu'il est vecteur de**

*nutriments essentiels. Par ailleurs, les présentations et conditions d'utilisation devraient être mieux précisées ;*  
*Sur la base de ces considérations, l'Afssa ne peut rendre un avis favorable à la commercialisation du NI.*

**Mots clés** : *Glycine max*, soja,  $\alpha$ -glucosidase, novel food

La Directrice Générale  
Pascale BRIAND