



Maisons-Alfort, le 22 décembre 2008

AVIS

**de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments
relatif à la demande d'autorisation d'emploi d'une carboxypeptidase
de type sérine issue d'une souche d'*Aspergillus niger* modifiée génétiquement
destinée à l'industrie laitière (fromages, arômes « fromages »)
et à la fabrication de produits à base de viande fermentée**

LA DIRECTRICE GÉNÉRALE

Rappel de la saisine

L'Agence française de sécurité sanitaire des aliments (Afssa) a été saisie le lundi 1^{er} septembre 2008 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 carboxypeptidase de type sérine issue d'une souche d'*Aspergillus niger* modifiée génétiquement destinée à l'industrie laitière (fromages, arômes « fromages ») et à la fabrication de produits à base de viande fermentée.

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).

Contexte

Après consultation du Comité d'experts spécialisé « Biotechnologie », réuni le 20 novembre 2008, l'Afssa a effectué auprès de la DGCCRF, le 1^{er} décembre 2008, une demande de compléments d'information. Le 12 décembre 2008, l'Afssa a reçu des éléments de réponse.

Après consultation du Comité d'experts spécialisé « Biotechnologie », réuni le 18 décembre 2008, l'Afssa rend l'avis suivant :

Argumentaire

Applications technologiques envisagées – mécanisme d'action

Activité enzymatique principale

L'activité enzymatique principale consiste en une carboxypeptidase de type sérine (E.C. 3.4.16.x). Elle libère les acides aminés C-terminaux à partir des protéines et des peptides avec une activité élevée pour les phénylalanine, isoleucine, leucine, méthionine et valine mais sans exclusivité. Cette activité conduit à la libération avec une certaine préférence d'acides aminés hydrophobes et aromatiques ce qui conduit à diminuer l'amertume des produits laitiers, et dans une moindre mesure, des autres acides aminés.

Activités enzymatiques secondaires

Aucune activité enzymatique secondaire en quantité significative n'est présente dans la préparation enzymatique.

Applications technologiques

La préparation enzymatique est un auxiliaire technologique destiné à la fabrication de fromages (à l'exception des fromages à appellation d'origine), d'arômes « fromages » type EMC (Enzyme Modified Cheese) à partir de matières premières laitières, et de produits à base de viande fermentée. L'activité carboxypeptidase libère des acides aminés libres ou de petits peptides, précurseurs d'arômes dans les fromages et dans les saucisses.

Souche de production

Sécurité du micro-organisme producteur

Aspergillus niger est un micro-organisme non pathogène, utilisé depuis plusieurs dizaines d'années pour la fabrication de préparations enzymatiques destinées à l'alimentation humaine.

Obtention de la souche de production

La souche de production de la préparation enzymatique est la souche d'*Aspergillus niger* génétiquement modifiée PEG-1A. Elle a été classée, le 1^{er} décembre 2005, dans le groupe I, classe 1, confinement L1 par la CGG¹ pour la production de l'enzyme carboxypeptidase.

La séquence codante du gène d'intérêt est isolée à partir d'une souche d'*Aspergillus niger* (non-pathogène et non-toxinogène). Un nombre connu de copies du transgène est intégré de façon stable dans le génome hôte dans des sites identifiés et en absence de gène de résistance à des antibiotiques.

Procédé de fabrication de la préparation enzymatique

La préparation enzymatique est produite selon les Bonnes Pratiques de Fabrication pour l'alimentation et 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.

Le procédé de production de la préparation enzymatique est un procédé classique de fermentation submergée contrôlée suivie d'étapes d'inactivation de la souche de production, de clarification, de purification, d'ultrafiltration, de chromatographie, de stabilisation et de formulation de l'enzyme.

Préparation enzymatique

Critères de pureté

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

Toutes les études de toxicité ont été réalisées selon les lignes directrices internationales de l'OCDE² et en conformité avec les Bonnes Pratiques de Laboratoire.

Le test de toxicité orale subaiguë à 14 jours consécutifs chez le rat n'a pas montré de signe clinique de toxicité jusqu'à la dose maximale testée de 11 000 mg/ kg de poids corporel/ jour et

¹ Commission de Génie Génétique

² Organisation de Coopération et de Développement Economique

le test de toxicité orale subchronique à 90 jours chez le rat a permis de fixer les valeurs NOAEL³ à la dose la plus forte testée soit 11000 mg/kg de poids corporel/jour.

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 lymphocytes humains en culture n'a pas mis en évidence d'effet clastogène de la préparation enzymatique. Le test du micronoyau *in vivo* chez la souris ne montre pas d'effet génotoxique lié à la préparation enzymatique. On peut conclure de ces trois tests que la préparation enzymatique n'est pas génotoxique.

Le facteur de sécurité calculé est de 977 par la méthode du budget (rapport de la dose sans effet observé, établie par l'étude de toxicité à 90 jours chez le Rat, sur l'estimation de la consommation maximale théorique de l'enzyme susceptible de se trouver dans la denrée alimentaire) et de 8723 en considérant la dose journalière estimée (rapport de la dose sans effet observé, établie par l'étude de toxicité à 90 jours chez le Rat, sur l'estimation de la consommation maximale de l'enzyme susceptible de se trouver dans la denrée alimentaire en utilisant des données de consommation).

Devenir de la préparation enzymatique dans le produit final

La carboxypeptidase est inactivée thermiquement lors de la production à partir de matières premières laitières d'arômes « fromages » type EMC (Enzyme Modified Cheese). Dans les fromages et les produits à base de viande fermentée, elle est immobilisée dans un environnement solide et son activité disparaît progressivement.

L'évaluation de l'allergénicité de la carboxypeptidase a été réalisée en utilisant l'arbre de décision de la FAO/WHO⁴. La recherche d'homologies de séquences entre la carboxypeptidase et les allergènes connus a permis d'identifier une homologie de 6 acides aminés contigus avec une protéine de choc thermique d'*Aspergillus fumigatus* connue comme sensibilisateur d'allergie broncho-pulmonaire mais aucune homologie avec des allergènes sensibilisant par voie alimentaire.

Conclusion

L'Agence française de sécurité sanitaire des aliments estime que l'emploi d'une carboxypeptidase de type sérine issue de la souche d'*Aspergillus niger* modifiée génétiquement PEG-1A destinée à l'industrie laitière [fromages (à l'exception des fromages à appellation d'origine), arômes «fromages»] et à la fabrication de produits à base de viande fermentée ne présente pas de risque sanitaire pour le consommateur, dans les conditions d'emploi présentées par le pétitionnaire. L'Afssa rend donc un avis favorable à cette demande.

Mots clé : auxiliaire technologique, *Aspergillus niger*, carboxypeptidase, fromages, arômes, viande fermentée.

**La Directrice Générale
Pascale BRIAND**

³ No Observed Adverse Effect Level

⁴ Evaluation of allergenicity of genetically modified foods. Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on Allergenicity of Foods Derived from Biotechnology, 22-25 January 2001, Rome Italy