

Maisons-Alfort, le 26 octobre 2005

## AVIS

**de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments  
relatif à la demande d'avis relatif à une demande d'autorisation d'emploi  
d'une phospholipase d'une souche d'*Aspergillus oryzae* porteuse du gène de  
*Fusarium venenatum* codant une phospholipase dans les fromages  
à l'exception de ceux bénéficiant d'une appellation d'origine**

LA DIRECTRICE GENERALE

Par courrier reçu le 6 juillet 2005, l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments (Afssa) a été saisie le 4 juillet 2005 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 phospholipase d'une souche d'*Aspergillus oryzae* porteuse du gène de *Fusarium venenatum* codant une phospholipase dans les fromages à l'exception de ceux bénéficiant d'une appellation d'origine, adressée par le bureau C2.

Après consultation du Comité d'experts spécialisé « Biotechnologie », réuni le 7 octobre 2005, l'Afssa rend l'avis suivant :

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

#### Activité enzymatique principale

Considérant que l'enzyme est une phospholipase A1 (ou phosphatidylcholine 1-acylhydrolase, E.C. 3.1.1.32) ;

Considérant que l'enzyme hydrolyse des liaisons esters sn-1 de diacylphospholipides en libérant des acides gras et du 2-acyl-1-lysophospholipide ;

Considérant que l'enzyme a une grande spécificité pour les phosphatidylcholines, que la mesure de l'activité enzymatique a été réalisée avec un unique substrat composé de phospholipides à base de choline et que le rendement enzymatique a été estimé par hydrolyse de ce substrat et donc calculé par extrapolation ;

Considérant que les phospholipides du lait sont composés d'environ 34,5 % de phosphatidylcholines et de 65,5 % d'autres phospholipides (phosphatidylinositols, phosphatidylethanolamines, phosphatidylsérines, sphingomyélines, céramides et cérébrosides) ;

Considérant, en conséquence, que l'argument de 95 % de phospholipides hydrolysés en 20 minutes par la préparation enzymatique doit être démontré scientifiquement ;

#### Activités enzymatiques secondaires

Considérant qu'aucune activité enzymatique secondaire en quantité significative n'est indiquée ;

#### Applications technologiques

Considérant que la préparation enzymatique est un auxiliaire technologique destiné à l'industrie fromagère, utilisée pour modifier les phospholipides du lait avant l'étape de coagulation ;

### **Souche de production**

#### Sécurité du micro-organisme producteur

Considérant qu'*Aspergillus oryzae* est utilisé depuis plusieurs dizaines d'années pour la fabrication de préparations enzymatiques destinées à l'alimentation humaine ;

Considérant que les souches d'*Aspergillus oryzae* utilisées pour la production d'enzymes sont non-pathogènes et non-toxinogènes ;

#### Obtention de la souche de production

Considérant que la souche de production de la préparation enzymatique est la souche d'*Aspergillus oryzae* PFJo142 génétiquement modifiée ;

Considérant que la souche de production a été classée dans le Groupe I, classe 1, confinement L1 par la CGG<sup>1</sup> pour la production de phospholipase envisagée ;

Considérant que le pétitionnaire indique que la séquence codante du gène d'intérêt est isolée de la souche de *Fusarium venenatum* CC1-3 sans faire de références ni à des publications, ni à des banques de données, et sans fournir de preuves expérimentales du séquençage du gène isolé ;

Considérant qu'après comparaison, la séquence codante du gène d'intérêt fournie possède 90 % d'identités avec une séquence unique de *Fusarium graminearum*, séquence présente dans les banques de données et annotée « hypothetical protein » et non pas séquence codant une phospholipase ;

Considérant qu'aucune donnée n'est fournie ni sur le nombre de copies du gène d'intérêt, intégré dans le génome de la souche d'*Aspergillus oryzae*, ni sur la localisation de ces insertions ;

### **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 fermentation immergée, suivie d'étapes de purification, concentration, filtration et standardisation de l'enzyme ;

Considérant que les étapes de purification de la préparation enzymatique sont décrites de façon imprécise (caractéristiques des filtres) ;

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 5 septembre 1989 relatif à l'emploi de préparations enzymatiques dans la fabrication de certaines denrées et boissons destinées à l'alimentation humaine ;

---

<sup>1</sup> Commission de Génie Génétique

### Données de sécurité

Considérant que 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 ;

Considérant que le test de toxicité orale sub-chronique à 90 jours chez le rat n'a pas mis en évidence d'effet délétère et a permis de fixer la valeur NOAEL<sup>3</sup> à 575,1 mg TOS<sup>4</sup>/kg de poids corporel/jour ;

Considérant que l'étude de mutagénicité *in vitro* (test d'Ames sur des souches de *Salmonella typhimurium* et *Escherichia coli* auxotrophes) 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 lymphocytes périphériques humains en culture n'a pas mis en évidence d'effet clastogène de la préparation enzymatique ;

Considérant que la dose maximale de préparation enzymatique recommandée par le pétitionnaire est indiquée à 5 g / kg de lait puis à 5 g / kg de matière grasse du lait dans le dossier, l'estimation de la consommation maximale de l'enzyme susceptible de se trouver dans la denrée alimentaire et par conséquent, le facteur de sécurité sont impossibles à calculer ;

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

Considérant que les preuves d'inactivation de la préparation enzymatique dans le produit final ne sont pas clairement apportées en absence des conditions d'inactivation (température, temps ...) ;

Considérant que la présence de l'enzyme dans le produit final n'est pas argumentée ;

Considérant que le risque allergique n'a pas été documenté,

### **Conclusion :**

L'Agence française de sécurité sanitaire des aliments estime que, au vu des éléments manquants et imprécisions du dossier, et notamment en l'absence de :

- Précisions sur la définition de l'activité enzymatique revendiquée,
- Caractérisation génétique de la souche de production, notamment preuves expérimentales du séquençage du gène isolé,
- Description de la méthode de purification de la préparation enzymatique,
- Définition d'une dose maximale journalière recommandée,
- Précisions sur le devenir de la préparation enzymatique dans le produit final (présence et mode d'inactivation de l'enzyme),

l'absence de risque sanitaire pour le consommateur lié à l'emploi d'une phospholipase d'une souche d'*Aspergillus oryzae* porteuse du gène de *Fusarium venenatum* codant une phospholipase dans les fromages à l'exception de ceux bénéficiant d'une appellation d'origine, ne peut être garantie dans les conditions d'emploi présentées par le pétitionnaire. L'Afssa rend donc un avis défavorable à cette demande.

Pascale BRIAND

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

<sup>3</sup> No Observed Adverse Effect Level

<sup>4</sup> Total Organic Solids