



Maisons-Alfort, le 6 mars 2009

AVIS

de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments relatif à la demande d'autorisation d'emploi d'une polygalacturonase d'une souche d'*Aspergillus niger* génétiquement modifiée destinée à l'extraction et à la clarification de jus de fruits

LA DIRECTRICE GÉNÉRALE

Rappel de la saisine

L'Agence française de sécurité sanitaire des aliments (Afssa) a été saisie le 25 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 polygalacturonase d'une souche d'*Aspergillus niger* génétiquement modifiée destinée à l'extraction et à la clarification de jus de fruits.

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 18 décembre 2008, l'Afssa a effectué auprès de la DGCCRF, le 19 décembre 2008, une demande de compléments d'information. Le 19 janvier 2009, l'Afssa a reçu des éléments de réponse.

Après consultation du Comité d'experts spécialisé « Biotechnologie », réuni le 19 février 2009, l'Afssa rend l'avis suivant :

Argumentaire

Applications technologiques envisagées – mécanisme d'action

Activité enzymatique principale

L'activité enzymatique principale consiste en une polygalacturonase (E.C. 3.2.1.15). Elle hydrolyse les liaisons 1,4 α D galacturoniques des pectates et autres galacturonanes.

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 faciliter l'extraction des jus de fruits et leur clarification. Dans le procédé d'extraction des jus de fruits (en particulier de pommes), la polygalacturonase peut être utilisée en association avec une préparation de

pectine méthylestérase. En réponse à une demande de précision, de l'Afssa, il est indiqué que cette utilisation conjointe pourrait conduire à une production de méthanol estimée sur le plan théorique sans étape de chauffage, au maximum à 1,1 g/l.

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 EPG-102. Elle a été classée, le 10 mai 2005, dans le groupe I, classe 1, confinement L1 par la CGG¹ pour la production de l'enzyme endo-polygalacturonase.

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. Aucun gène de résistance à des antibiotiques n'est présent dans la souche de production.

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 purification, d'ultrafiltration, 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 4545 mg/ kg de poids corporel/ jour et 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 4545 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

¹ Commission de Génie Génétique

² Organisation de Coopération et de Développement Economique

³ No Observed Adverse Effect Level

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. On peut conclure de ces deux tests que la préparation enzymatique n'est pas génotoxique.

La marge de sécurité calculée est de 67504 pour les hommes adultes et de 34433 pour les enfants de 3 à 10 ans par la méthode de la dose journalière estimée (rapport de la dose sans effet observé, établie par l'étude de toxicité à 90 jours chez le Rat, sur la consommation maximale de l'enzyme susceptible de se trouver dans les jus de fruits). Les données de consommation journalière de jus de fruits utilisées dans ce calcul sont issues des données INCA2⁴ et correspondent aux populations de forts consommateurs parmi les sujets consommateurs de jus de fruits (P95 des consommateurs de jus de fruits) en France métropolitaine.

Devenir de la préparation enzymatique dans le produit final

La polygalacturonase est inactivée par la pasteurisation des jus de fruits. Dans les jus de fruits non pasteurisés, la polygalacturonase non inactivée est présente aux doses techniquement inévitables.

L'évaluation de l'allergénicité de la polygalacturonase a été réalisée en utilisant l'arbre de décision de la FAO/WHO⁵. Aucune homologie de séquences suffisantes entre la polygalacturonase et les allergènes et toxines connus n'a été identifiée.

Conclusion

L'Agence française de sécurité sanitaire des aliments estime que l'emploi d'une polygalacturonase d'une souche d'*Aspergillus niger* génétiquement modifiée (EPG-102) destinée à l'extraction et à la clarification de jus de fruits 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, enzyme, polygalacturonase, *Aspergillus niger*, extraction, clarification, jus de fruits, pectine méthylestérase.

**La Directrice Générale
Pascale BRIAND**

⁴ Etude individuelle et nationale sur les consommations alimentaires (2006)

⁵ 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