



Maisons-Alfort, le 2 février 2009

## AVIS

### de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments relatif à une demande d'autorisation d'emploi d'une endo-inulinase issue d'une souche génétiquement modifiée d'*Aspergillus oryzae* porteuse d'un gène d'*Aspergillus ficuum*, pour la production de sirops d'oligofructose

LA DIRECTRICE GÉNÉRALE

#### Rappel de la saisine

L'Agence française de sécurité sanitaire des aliments (Afssa) a été saisie le 10 octobre 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 une demande d'autorisation d'emploi d'une endo-inulinase issue d'une souche génétiquement modifiée d'*Aspergillus oryzae* porteuse d'un gène d'*Aspergillus ficuum*, pour la production de sirops d'oligofructose.

#### 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 15 janvier 2009, l'Afssa rend l'avis suivant :

#### Argumentaire

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

##### Activité enzymatique principale

L'enzyme principale revendiquée par le pétitionnaire est une endo-inulinase (E.C. 3.2.1.7). Cette enzyme hydrolyse les liaisons (2→1)-β-D-fructosidiques dans l'inuline. L'inuline est alors dégradée en fructose ou oligo-fructose.

L'activité inulinasique de la préparation enzymatique est évaluée indirectement par la mesure des sucres réducteurs formés lors de la réaction enzymatique par la méthode au DNS (acide dinitrosalicylique).

##### Activités enzymatiques secondaires

Les activités enzymatiques secondaires ne sont pas documentées.

##### Applications technologiques

La préparation enzymatique est un auxiliaire technologique pour la production de fructooligosaccharide (FOS), sirop d'hydrolyse de l'inuline qui peut être utilisé dans diverses applications alimentaires non précisées dans le dossier.

Le manque de données sur les conditions d'utilisation de l'enzyme, sur les denrées alimentaires susceptibles d'être traitées et l'intérêt de l'emploi de cette enzyme dans ces denrées ne permet pas d'évaluer l'exposition des consommateurs et donc de calculer une marge de sécurité.

### **Souche de production**

#### **Sécurité du micro-organisme producteur**

*Aspergillus oryzae* est utilisé depuis de nombreuses années pour la fabrication de préparations enzymatiques destinées à l'alimentation humaine. La souche initiale d'*Aspergillus oryzae* utilisée est non-pathogène et non-toxinogène.

#### **Obtention de la souche de production**

La séquence codante de l'endo-inulinase est isolée d'une souche d'*Aspergillus ficuum*, organisme non pathogène. Le transgène est intégré dans le génome de l'hôte et la sélection de transformant se fait sans recours à un gène de résistance à des antibiotiques.

Le dossier contient de nombreuses données annexes qui ne portent pas sur l'autorisation d'emploi, objet de cette demande, et nuisent à la lisibilité du dossier. Les données du dossier sont imprécises et ne permettent pas d'identifier une souche de production unique. L'évaluation des caractéristiques de cette souche et de sa stabilité n'est donc pas possible.

### **Procédé de fabrication de la préparation enzymatique**

Une préparation enzymatique doit être issue d'un unique procédé précis : conditions de fermentation et procédé de purification jusqu'à la standardisation de la préparation enzymatique. Le procédé utilisé n'est pas décrit de façon suffisamment complète pour être identifié et donc évalué.

### **Préparation enzymatique**

#### **Critères de pureté**

Les analyses des critères de pureté chimique et biologique ont été réalisées sur un seul lot de préparation enzymatique dont l'activité enzymatique n'est pas indiquée. Afin de respecter l'ensemble des exigences de l'arrêté du 19 octobre 2006 relatif à l'emploi d'auxiliaires technologiques dans la fabrication de certaines denrées alimentaires, des analyses auraient dû être réalisées sur plusieurs lots distincts de préparation enzymatique, caractérisés précisément et les bulletins d'analyse auraient dû être fournis. L'absence d'ADN recombinant n'est pas démontrée.

#### **Données de sécurité**

La dose d'administration employée dans le test de toxicité orale par administration unique chez le Rat est différente selon les parties du dossier.

Le test de toxicité orale subchronique chez le Rat a été conduit sur 14 jours au lieu des 90 jours nécessaires pour répondre aux lignes directrices de l'OCDE n° 408 auxquelles se réfère le pétitionnaire. La justification du choix de la matrice et du véhicule n'est pas clairement exposée.

L'étude de mutagénicité *in vitro* (test d'Ames sur cinq souches de *Salmonella typhimurium* histidine dépendante) n'a révélé aucune augmentation du nombre de révertants en présence de la préparation enzymatique et donc aucun effet mutagène. Un second test permettant d'évaluer le potentiel clastogène (test d'aberrations chromosomiques sur des lymphocytes humains en culture et/ou test du micronoyau *in vivo*) reste à réaliser pour confirmer la non-génotoxicité de la préparation enzymatique.

La marge de sécurité ne peut être calculée faute d'une évaluation complète de l'exposition des consommateurs et de la réalisation d'une étude de toxicité à 90 jours chez le Rat.

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

L'inactivation de l'enzyme dans les produits finis n'est pas démontrée.  
Le potentiel allergique n'est pas renseigné.

## **Conclusion**

L'Agence française de sécurité sanitaire des aliments estime que l'absence de risque sanitaire pour le consommateur lié à l'emploi d'une endo-inulinase issue d'une souche génétiquement modifiée d'*Aspergillus oryzae* porteuse d'un gène d'*Aspergillus ficuum*, pour la production de sirops d'oligofructose ne peut être garantie dans les conditions d'emploi présentées par le pétitionnaire, en raison de données insuffisantes ou d'imprécisions sur les points suivants :

- recherche des activités enzymatiques secondaires,
- présentation d'un procédé de production précis,
- identification des applications technologiques, des denrées alimentaires traitables par la préparation enzymatique pour évaluer l'exposition des consommateurs,
- généalogie d'une unique souche de production et dénomination utilisable dans une future autorisation d'emploi,
- analyses des critères de pureté chimique et biologique sur plusieurs lots distincts de préparation enzymatique,
- vérification de l'absence de la souche de production et d'ADN recombinant dans la préparation enzymatique,
- réalisation d'un test de toxicité orale subchronique selon les lignes directrices de l'OCDE<sup>1</sup> et en conformité avec les Bonnes Pratiques de Laboratoire, permettant de fixer une NOAEL,
- calcul d'une marge de sécurité,
- réalisation d'un test de génotoxicité permettant d'évaluer le potentiel clastogène,
- démonstration de l'inactivation irréversible de l'enzyme dans les produits finis,
- recherche d'homologies de séquences entre celle de l'enzyme principale et celles des allergènes et toxines connus.

L'Afssa rend donc un avis défavorable à cette demande.

**Mots clé** : auxiliaire technologique, enzyme, inulinase, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus ficuum*, oligofructose.

**La Directrice Générale  
Pascale BRIAND**

---

<sup>1</sup> Organisation de Coopération et de Développement Economiques