



AGENCE FRANÇAISE
DE SÉCURITÉ SANITAIRE
DES ALIMENTS

Maisons-Alfort, le 22 mai 2009,

AVIS

**de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments
relatif à la demande d'autorisation d'emploi d'une chymosine
d'une souche d'*Aspergillus niger* variété *Awamori* porteuse d'un gène
de ruminant, dans les fromages (à l'exception de ceux bénéficiant d'une
appellation d'origine) et autres produits laitiers coagulés**

Version pour publication

LA DIRECTRICE GÉNÉRALE

Rappel de la saisine

L'Agence française de sécurité sanitaire des aliments (Afssa) a été saisie le 20 janvier 2009 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 chymosine d'une souche d'*Aspergillus niger* variété *Awamori* porteuse d'un gène de ruminant, dans les fromages (à l'exception de ceux bénéficiant d'une appellation d'origine) et autres produits laitiers coagulés.

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 16 avril et le 14 mai 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 chymosine, enzyme coagulante (E.C. 3.4.23.4). Cette enzyme hydrolyse la molécule de caséine kappa entraînant sa précipitation et la coagulation des micelles de caséines. Cette réaction enzymatique est à la base de la production des fromages et autres produits laitiers coagulés.

Activités enzymatiques secondaires

Aucune activité enzymatique secondaire en quantité significative n'est retrouvée.

Applications technologiques

La préparation enzymatique est un auxiliaire technologique destiné à la fabrication de fromages et d'autres produits laitiers coagulés.

Souche de production

Sécurité du micro-organisme producteur

Aspergillus niger var awamori est un micro-organisme non pathogène, utilisé depuis longtemps pour la fabrication de préparations enzymatiques destinées à l'alimentation humaine.

La souche initiale d'*Aspergillus niger var awamori* utilisée est non-pathogène et non-toxinogène.

Obtention de la souche de production

La séquence codante de la pro-chymosine est isolée d'une banque d'expression de tissu stomacal de ruminant. Le transgène est intégré dans le génome de l'hôte. La sélection de souche transformée se fait sans recours à un gène de résistance à des antibiotiques.

La souche de production de la préparation enzymatique est la souche d'*Aspergillus niger var. awamori* génétiquement modifiée CHCC10311. Il conviendrait que des résultats d'analyses permettant d'identifier le(s) site(s) d'intégration, le nombre de copies du transgène et la séquence d'ADN intégrée soient fournis afin de caractériser 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.

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 de certains critères de pureté chimique et biologique ont été réalisées sur un seul lot de préparation enzymatique. 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 doivent être réalisées sur plusieurs lots distincts de préparation enzymatique et l'ensemble des critères de pureté chimique et biologique doit être recherché. Les bulletins d'analyse doivent être fournis.

Données de sécurité

Toutes les études de toxicité ont été réalisées selon les lignes directrices internationales de l'OCDE¹ et en conformité avec les Bonnes Pratiques de Laboratoire.

Le test de toxicité orale subchronique à 90 jours chez le Rat a permis de fixer la valeur NOAEL² à la dose la plus forte testée, soit 24,2 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

¹ Organisation de Coopération et de Développement Economique

² No Observed Adverse Effect Level

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

La marge de sécurité calculée est de 34500 pour les hommes adultes 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 fromages (hors AOC) et dans les fromages frais]. Les données de consommation journalière de fromages (hors AOC) et de fromages frais utilisées dans ce calcul sont issues des données INCA2³ et correspondent à la moyenne de consommation des sujets consommateurs de ces denrées alimentaires en France métropolitaine.

Devenir de la préparation enzymatique dans le produit final

La chymosine est utilisée à la dose strictement nécessaire pour obtenir l'effet recherché et l'enzyme non inactivée est présente aux doses techniquement inévitables.

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 chymosine d'une souche d'*Aspergillus niger* variété *Awamori* CHCC10311 porteuse d'un gène de ruminant, dans les fromages (à l'exception de ceux bénéficiant d'une appellation d'origine) et autres produits laitiers coagulés 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 :

- présentation d'un procédé de production précis (milieux, procédé...),
- généalogie d'une unique souche de production,
- analyses des critères de pureté chimique et biologique des exigences de l'arrêté du 19 octobre 2006 sur plusieurs lots distincts de préparation enzymatique,
- 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, chymosine, *Aspergillus niger*, fromages, produits laitiers.

³ Etude individuelle et nationale sur les consommations alimentaires (2006)