

Maisons-Alfort, le 18 décembre 2001

LE DIRECTEUR GÉNÉRAL

AVIS

Saisine n° 2000-SA-0293

de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments relatif à une demande d'autorisation d'emploi de pullulanase exprimée par une souche de *Bacillus subtilis* porteuse du gène de *Bacillus deramificans* codant pour la pullulanase en amidonnerie

L'Agence française de sécurité sanitaire des aliments (Afssa) a été saisie le 13 novembre 2000 d'une demande d'avis relative à une demande d'autorisation d'emploi de pullulanase exprimée par une souche de *Bacillus subtilis* porteuse du gène de *Bacillus deramificans* codant pour la pullulanase en amidonnerie.

Après consultation du Comité d'experts spécialisé « Biotechnologie », réuni le 20 septembre 2001, l'Afssa a rendu l'avis suivant :

Considérant que la pullulanase catalyse l'hydrolyse des liaisons 1,6 α -glucosidiques de l'amylopectine et des dextrines utilisées en amidonnerie ; considérant que son utilisation en amidonnerie réduit le degré de ramification des oligosaccharides résistants, ce qui améliore le rendement de saccharification de l'amidon liquéfié ;

Considérant que l'obtention de la souche de production fait appel à différentes espèces de *Bacillus* (souche hôte : *Bacillus subtilis*, gènes insérés issus de *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus thuringiensis* et *Bacillus deramificans*) ; considérant que la souche de production a été classée groupe 1, classe 1, confinement L1 par la CGG¹ pour la production de pullulanase envisagée ;

Considérant que le procédé de fabrication de la préparation enzymatique répond aux bonnes pratiques d'hygiène et que les matières premières et auxiliaires technologiques utilisés sont de qualité alimentaire ;

Considérant qu'un procédé de filtration permet l'élimination des bactéries productrices de l'enzyme du produit final ;

Considérant que les critères de pureté chimique et biologique de la préparation enzymatique 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 ;

Considérant que la souche hôte est considérée comme non pathogène et non toxigène sur la base de données bibliographiques ;

23, avenue du
Général de Gaulle
BP 19, 94701
Maisons-Alfort cedex
Tel 01 49 77 13 00
Fax 01 49 77 90 05
www.afssa.fr

Considérant qu'aucun gène de résistance aux antibiotiques n'est retrouvé dans la préparation enzymatique finale ;

Considérant que :

- les tests de toxicité orale subchronique à 13 semaines chez le rat n'ont pas mis en évidence d'effet toxique ;
- les tests de mutagenèse *in vitro* (tests d'Ames sur *Salmonella typhimurium* et sur *Escherichia coli*) n'ont pas mis en évidence d'effet mutagène ;
- les tests d'aberrations chromosomiques *in vitro* sur cellules de lymphocytes humains n'ont pas mis en évidence d'effet clastogène ;
- la marge de sécurité déterminée est satisfaisante (rapport de la dose sans effet observé établie par l'étude de toxicité à 13 semaines et de l'estimation de la consommation maximale de l'enzyme susceptible de se trouver dans la denrée alimentaire) ;

Considérant que l'enzyme est inactivée et éliminée pendant les étapes de purification en amidonnerie ;

Considérant toutefois que :

- des traces d'ADN recombinant, à une concentration proche de la limite de sensibilité de la méthode, ont été détectées expérimentalement dans la préparation enzymatique finale ;
- mais surtout qu'aucune recherche, par des techniques analytiques appropriées, de toxines bactériennes dans la préparation enzymatique n'a été effectuée ; considérant de plus que, dans le cadre des connaissances scientifiques actuelles, l'application intégrale des recommandations du SCAN² aurait été un argument permettant d'exclure la production de toxines par la souche,

L'Afssa estime que la démonstration, par des techniques analytiques appropriées, du caractère non toxigène de la souche de production n'est pas apportée dans le dossier, que par conséquent l'innocuité de la souche de production de la préparation enzymatique ne peut pas être garantie. En conséquence, en l'état actuel du dossier, l'Afssa rend un avis défavorable à la demande d'utilisation de pullulanase exprimée par une souche de *Bacillus subtilis* porteuse du gène de *Bacillus deramificans* codant pour la pullulanase en amidonnerie.

Martin HIRSCH

² Scientific Committee on Animal Nutrition