



Maisons-Alfort, le 31 mai 2007

## AVIS

**de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments  
relatif à la demande d'autorisation d'emploi d'une asparaginase  
d'*Aspergillus niger* autoclonée dans la préparation d'aliments  
contenant de la L-asparagine et des hydrates de carbone  
qui sont cuits à des températures supérieures à 120 °C, tels que le pain  
et les autres produits céréaliers (y compris les céréales pour petits déjeuners),  
les produits frits à base de pommes de terre et certains extraits de levures**

LA DIRECTRICE GÉNÉRALE

### Rappel de la saisine

Par courrier reçu le 2 février 2007, l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments (Afssa) a été saisie le 30 janvier 2007 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 asparaginase d'*Aspergillus niger* autoclonée dans la préparation d'aliments contenant de la L-asparagine et des hydrates de carbone qui sont cuits à des températures supérieures à 120 °C, tels que le pain et les autres produits céréaliers (y compris les céréales pour petits déjeuners), les produits frits à base de pommes de terre et certains extraits de levures, adressée par le bureau C2.

### 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 », réunis le 19 avril et le 24 mai 2007, l'Afssa rend l'avis suivant :

### Argumentaire

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

##### Activité enzymatique principale

Considérant que l'enzyme est une L-asparaginase amidohydrolase (ou asparaginase, EC 3.5.1.1.) ;

Considérant qu'en présence d'eau, l'enzyme hydrolyse la L-asparagine en L-aspartate et en ammonium ;

##### Activités enzymatiques secondaires

Considérant que des activités amyloglucosidasique, protéasique et amylasique sont présentes en quantité résiduelle ;

##### Applications technologiques

Considérant que la préparation enzymatique est un auxiliaire technologique destiné à diminuer les niveaux de L-asparagine dans la préparation de denrées alimentaires subissant une cuisson à des températures supérieures à 120 °C ;

Considérant que les denrées alimentaires revendiquées par le pétitionnaire sont le pain et les autres produits céréaliers (y compris les céréales pour petits déjeuner), les produits frits à base de pommes de terre et certains extraits de levures utilisés comme précurseur azoté pour la production d'arômes de transformation ou d'arômes obtenus par voie thermique ;

Considérant que par réaction de Maillard, à une température supérieure à 120 °C et en présence de sucres réducteurs libres, la L-asparagine présente dans les aliments se transforme en acrylamide et qu'elle est le précurseur principal de la formation d'acrylamide ;

Considérant qu'expérimentalement, une réduction très sensible de la formation d'acrylamide liée à l'hydrolyse de la L-asparagine par l'asparaginase avant l'étape de chauffage des denrées alimentaires est mise en évidence ;

### **Souche de production**

#### Sécurité du micro-organisme producteur

Considérant qu'*Aspergillus niger* est utilisé depuis de nombreuses années pour la production de préparations enzymatiques destinées à l'alimentation humaine ;

Considérant que la souche initiale d'*Aspergillus niger* utilisée est non-pathogène et non-toxinogène ;

#### Obtention de la souche de production

Considérant que la souche de production de la préparation enzymatique est la souche d'*Aspergillus niger* ASP-72 obtenue par autoclonage<sup>1</sup> ;

### **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 submergée contrôlée, suivie d'étapes de filtration, ultrafiltration et standardisation de l'enzyme ;

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 19 octobre 2006 relatif à l'emploi d'auxiliaires technologiques dans la fabrication de certaines denrées alimentaires ;

#### 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 ;

<sup>1</sup> Classement de la Commission du Génie Génétique

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

Considérant que le test de toxicité orale subaiguë à 14 jours chez le rat n'a pas montré de signes cliniques de toxicité jusqu'à la dose maximale testée ;

Considérant que le test de toxicité orale sub-chronique à 90 jours chez le rat a permis de fixer la valeur NOAEL<sup>3</sup> à 1157 mg/kg de poids corporel/jour (1038 TOS/kg de poids corporel/jour) pour les mâles et à 1331 mg/kg de poids corporel/jour (1194 TOS/kg de poids corporel/jour) pour les femelles ;

Considérant que le test de toxicité pour le développement prénatal n'a révélé aucune anomalie du développement maternel ou prénatal ;

Considérant que l'étude de mutagénicité *in vitro* (test d'Ames sur quatre souches de *Salmonella typhimurium* 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 ;

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 le facteur de sécurité calculé [rapport de la dose sans effet observé, établie par l'étude de toxicité à 90 jours, sur l'estimation de la consommation maximale de l'enzyme susceptible de se trouver dans l'alimentation] est de 648 ;

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

Considérant que l'asparaginase est inactivée de façon irréversible par la cuisson des aliments à des températures de plus de 120 °C ;

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

#### **Conclusion**

L'Agence française de sécurité sanitaire des aliments estime que l'emploi d'une asparaginase d'*Aspergillus niger* autoclonée (ASP-72) dans la préparation d'aliments contenant de la L-asparagine et des hydrates de carbone, qui sont cuits à des températures supérieures à 120 °C, tels que le pain et les autres produits céréaliers (y compris les céréales pour petits déjeuners), les produits frits à base de pommes de terre et certains extraits de levures, ne présente pas de risque sanitaire pour le consommateur, dans les conditions d'emploi présentées par le pétitionnaire. L'Afssa rend un avis favorable à cette demande.

**Mots clé :** autoclonage, *Aspergillus niger*, asparaginase, panification, produits céréaliers, produits cuits, pomme de terre, extraits de levures, asparagine, acrylamide.

La Directrice générale de l'Agence française  
de sécurité sanitaire des aliments

**Pascale BRIAND**

---

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