

部分国家及国际组织食品用酶制剂管理现状

罗雪云

(中国疾控中心营养与食品安全所,北京 100021)

摘要:世界各国对食品用酶制剂的管理非常重视,特别是对微生物及转基因微生物生产的酶制剂的管理。为给我国的食品用酶制剂的管理提供借鉴,详细介绍了美国、欧盟和 FAO/WHO 食品添加剂联合专家委员会(JECFA)对食品用酶制剂的管理、安全评价,以及目前各国普遍认可并采用的安全评价转基因微生物生产食品用酶制剂的判断树。

关键词:食品;酶类;安全管理

Regulations of enzyme preparations used in foods in some countries and international organizations in the world

Luo Xueyun

(National institute for Nutrition and Food Safety, China CDC, Beijing 100021)

Abstract: The regulation of enzyme preparation used in foods has aroused great attention by governments worldwide, especially the microorganisms and genetically modified modified production strains. In order to strengthen the regulation of enzyme preparations in China, the article focuses on the recommendation of the regulations and safety evaluation of the United States, European Union and Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, the decision tree for evaluating the safety of microbially derived food enzymes as well.

Key Words: Food; Enzymes; Safety Management

酶是一类属于蛋白质结构、具有专一性生物催化功能的物质。酶参与生物体的代谢、分解、合成等过程,是促进生物体一切代谢反应的物质。酶作为生物催化剂普遍存在于动物、植物和微生物中。已知的酶有 2 000 多种,用于工业生产的酶约 50 ~ 60 种。酶制剂(enzyme preparations)广泛用于食品、发酵、制革、纺织、日用化工、医药等工业。在酶制剂发展的早期,大多数的酶是从动物或植物原料中提取的,例如从动物的胰脏、胃等组织,从植物中的木瓜、菠萝等中提取各种酶。但动物和植物生长周期长,成本高,又受地理、气候、季节等因素的影响而不适宜于大规模生产酶制剂。目前工业上应用的酶大多采用微生物发酵法生产。微生物生产酶比其他方法生产酶有更多的优点:微生物种类繁多,产酶的微生物多;一种微生物可产生好几种酶;微生物繁殖快、生产周期短、产量高、便于大规模生产;微生物方法便于选育菌株和改良发酵条件,易于提高产率等。

目前利用 DNA 重组技术改造微生物,可大大提高酶制剂的产量。但微生物如果筛选不当,可能会将致病菌或可能产生毒素及其他生理活性物质(抗菌素等)的微生物筛选为产酶菌株。利用基因重组技术改造生产菌株的同时,可能导致生产菌株发生遗传学或营养成分等的非预期的改变,而给消费者或生产者的健康带来潜在危害,因此世界各国对食品用酶制剂有严格的法规进行管理。现将部分国家及国际组织对酶制剂的管理和评价做一介绍,重点介绍美国、欧盟及 FAO/WHO 食品添加剂联合专家委员会(JECFA)的管理和评价。

1 有关食品酶制剂的描述^[1]

食品加工用的酶制剂来源于动物、植物和微生物。酶制剂可以由整个细胞、细胞碎片或不含细胞的提取物组成。一般情况下,酶制剂含有一种或若干种活性成分,即酶制剂通常是一种混合物,并可含有各种食品级的稀释剂、防腐剂、抗氧化剂等。

酶制剂的命名一般是按酶的使用目的命名,如

作者简介:罗雪云 女 研究员

蛋白酶、淀粉酶等;但也用传统名称如麦芽酶、胃蛋白酶、粗制凝乳酶等。国际上酶的命名和编码采用国际生物化学和分子生物学联合会(International Union of Biochemistry, IUB)的规定命名。^[2]

酶制剂有液体、半固体或固体等不同形态。颜色从无色透明至暗褐色不等。酶的活性成分是由具有生物活性的蛋白质组成的,有时与金属、糖类和/或脂肪结合,已知活性成分的分子量约 12 000 至几十万。

酶制剂的活性按每一种酶的催化反应进行测定,并以每一重量单位酶制剂的活性单位表示。在商业上酶产品的活性有时也可以以添加到食品中的酶制剂的量来表示。

2 酶制剂的应用

在食品工业中,酶制剂主要用于淀粉加工、乳品加工、果汁加工、烘烤食品、啤酒发酵等。在淀粉加工中使用 α-淀粉酶、β-淀粉酶、糖化酶、葡萄糖异构酶等。如将淀粉先用 α-淀粉酶液化,再通过各种酶的作用制成淀粉糖浆,如葡萄糖、果糖浆、饴糖等。葡萄糖和果糖浆加入到水果罐头中,可保持果实原有的色香味并使甜度适中。制作糕点和胶母糖时,加入淀粉糖浆可增加稠度,降低淀粉老化程度,保持糕点的柔软性。加工乳品时,加入凝乳酶可做成干酪。乳糖是一种甜度低且溶解度很低的双糖,有些人饮用牛奶后引起腹泻、腹痛等症状,是体内缺乏乳糖酶所致。乳糖酶可用于分解牛奶中的乳糖,美国、欧洲等许多国家用乳糖酶处理牛乳生产脱乳糖的牛奶。乳糖难溶于水,常在炼乳、冰淇淋中呈沙样结晶析出,影响风味和品质,加入乳糖酶后,这些问题就可以解决。脂肪酶用于黄油的增香。在缺乏巴氏消毒设备或冷藏的条件下,过氧化氢酶可用于牛奶消毒,优点是大量破坏牛奶中的酶和有益细菌。在水果加工中,半纤维素酶、果胶酶和纤维素酶的混合物可用于去除橘子的络。柚苷酶有脱苦作用。果胶酶处理碎的果实,可以加速果汁过滤,促进澄清。啤酒工业用糖化酶可增加发酵度、缩短糖化时间。木瓜蛋白酶、菠萝蛋白酶、真菌酸性蛋白酶主要用于啤酒澄清,防止混浊,延长保存期。酸性蛋白酶、淀粉酶、果胶酶等也用于果酒酿造,可消除混浊或改善压榨条件等。木瓜蛋白酶、菠萝蛋白酶、真菌蛋白酶等可分解肌肉结缔组织的纤维蛋白,这些酶用于嫩肉。谷氨酰胺转移酶用于增强面条的筋力、碎肉粘合等。总之酶制剂在食品工业的应用非常广泛,酶制剂的应用可提供新的食品品种、简化原有生产工艺、增加产品产量、改善产品质量、降低原材料

消耗、降低劳动强度并消除环境污染等。

3 一些国家及国际组织食品用酶制剂的管理现状

食品用酶制剂的管理和安全评价各国不尽相同且经常变化。有些国家需经批准,有些国家要求申报,而有些国家不需批准也不用申报。有些国家酶制剂按食品添加剂管理,还有一些国家按加工助剂管理,而食品添加剂和加工助剂的界定各国不尽相同。用转基因微生物生产的酶制剂在有些国家有专门的法规管理。

3.1 加拿大 食品用酶制剂由加拿大卫生与福利部根据食品与药品条例(Food and Drugs Act)和食品与药品法规(Food and Drug Regulations)按食品添加剂管理,酶制剂必须经批准才能生产销售。批准后的食品用酶制剂列入可使用的食品添加剂名单中,同时列出酶制剂的活性、来源、使用范围和使用量等。酶制剂从审批到批准使用一般须经过几年时间。加拿大卫生与福利部已批准了不少转基因微生物(GMO)生产的酶制剂,目前正在制定GMO管理办法。

3.2 澳大利亚/新西兰^[3] 食品用酶制剂根据食品标准法规(Food Standards Code)由澳大利亚/新西兰食品当局(Australia/New Zealand Food Authority, ANZFA)进行管理。在澳大利亚/新西兰,酶制剂属于加工助剂,ANZFA利用JECFA^[1]的安全评价程序评价酶制剂。经评审通过的酶制剂列入可使用的名单中,并列出其类别和来源。

3.3 日本 日本食品用酶制剂由日本厚生省按食品添加剂进行管理。不在食品添加剂名单的酶制剂必须经批准后方可生产销售。《食品添加剂指南》中提供批准的指导。目前已有76个酶制剂列入食品添加剂名单中。

3.4 美国 美国的酶制剂由食品药品监督管理局(FDA)根据联邦法规(Code of Federal Regulations, CFR)的第二十一条173款按间接食品添加剂(secondary direct food additives)管理,或根据CFR第二十一条184款按“一般认为是安全(GRAS)”的物质管理。FDA规定,作为GRAS的物质,其评价标准有二:一是该物质于1958年以前已在食品加工工业中使用;二是通过科学的评价程序。同评价食品添加剂一样,该程序要求必须提供充分和完整的科学证据以证明某物质的安全性。作为GRAS物质的酶制剂不要求经FDA批准,公司可自身证明(self-certify)为GRAS物质。美国FDA食品安全与应用营养中心,销售前批准办公室,化学评价部(U. S. Food and Drug Administration, Center for Food Safety and Applied

Nutrition, Office of Premarket Approval, Chemistry Review Branch) 1993年1月出版的《酶制剂:食品添加剂化学建议及GRAS物质认定申请(Enzyme Preparations: Chemistry Recommendations for Food Additive and GRAS Affirmation Petitions)》^[1]中对酶制剂提出以下要求:

(1)特性 应尽可能详尽地描述酶制剂的特性,包括:

来源 酶制剂的来源必须明确。

化学名称及EC分类 必须提供酶制剂的化学名称及根据国际生物化学联盟命名法联合会的建议(Recommendation of the Nomenclature Committee of International Union of Biochemistry)提供酶制剂的化学名称及酶学委员会(Enzyme Commission EC)的分类。

普通名称和/或商品名称 必须提供普通名称或商品名称。

CAS登记号 如有可能应提供化学摘要部(Chemical Abstract Service, CAS)的登记号。

性质 必须提供酶的功能、底物的特性以及作用方式等。还须提供的项目有分子量、等电点、动力学特性以及特异性活性等。必须测定酶制剂的活性并明确“以活性单位”表示。也应提供其他与酶制剂的应用有关的资料,如温度、pH以及无机离子等。

如果为了改变酶制剂的活性或稳定性、提高酶的纯度,或为了与某种载体结合,通过化学或基因技术有目的地将永久或暂时的结构修饰导入酶蛋白中,也必须描述,提供这方面的资料。通过分子克隆技术将一个微生物的酶转移到另一个微生物,则还应提供更多的资料。由于原核生物和真核生物不同的分子机制,利用DNA重组技术,可将DNA从哺乳动物细胞导入到细菌生产酶制剂,重组的真核酶不同于其来源的酶,因此,重组酶的物理-化学性质和功能特征还必须与对应的、原来的酶进行全面的比对,或至少对酶的活性、动力学参数、氨基酸和氨基糖的成分、全部或部分氨基酸序列、分子量、等电点以及凝胶迁移、色谱及其他特征进行比较,只要比较结果有显著差别就必须进行评价。

成分 食品用酶制剂通常是复杂的混合物,为了鉴定酶制剂的性质,必须提供以下资料:

至少要测定有代表性的5个批次商品级酶制剂的蛋白质含量、核酸含量或蛋白质加核酸的含量(即凯氏蛋白质)、糖类、脂肪、水分、总固体和灰分,并同时提供用于毒理学试验的酶制剂,还必须明确所用的稀释液、载体以及稳定剂等。

酶蛋白在产品中的百分比。

可能存在于酶制剂中的其他主要酶活性物

质的资料。

商品级以及用于毒理学试验的酶制剂的总有机固体(Total Organic Solids, TOS)含量。

TOS是来源于动物、植物或微生物基质的酶制剂中有机物的总和。TOS按下列公式计算:

$$TOS(\%) = 100\% - A - W - D$$

式中:A=灰分%,W=水%,D=稀释液或载体%。

(2)加工工艺

酶制剂的来源必须明确并经鉴定,必须符合食品用化学品法典(Food Chemicals Codex, FCC)^[4]对酶制剂的通用要求。用于生产酶来源的微生物,必须经分类鉴定和基因鉴定。经其他微生物的DNA修饰的微生物,如果可能也应详细描述改造微生物的所有步骤及措施,并提供引进的DNA、基因稳定性及生长特性等,及详细的发酵过程,包括生长条件、培养基纯度以及基因稳定性等所有步骤。必须明确发酵用的培养基的所有成分。从细胞或培养物中分离的酶,应提供所用的化学或物理处理步骤及质量控制等方面的内容。来源于动物或植物的材料,包括从组织培养得到的酶制剂必须经过鉴定,并提供详细的酶的分离和纯化方法。

(3)纯度及食品级规格

商品化酶制剂必须经过5个批次的检测,证明符合FCC规定的有关酶制剂最低要求的规格。

酶制剂的原料或在加工过程中产生的杂质及其特性必须经鉴定及测定。必须规定杂质的限量并符合食品级的规格。

来源于微生物的酶制剂不得含有抗菌素、毒素(肠毒素、真菌毒素等)。可能使治疗用的抗菌素失活的毒素及/或蛋白质不得转入微生物的DNA编码。如可能含有不确定的毒素或抗菌素,必须用适当的检测方法进行检测,并证明确实不存在具有生物学意义水平的毒素或抗菌素。

固定化酶制剂所用的固定剂必须是列入CFR第二十一条173,357(a)(2)名单上的或是GRAS物质。其他固定剂必须申请,通过评价并获得批准后方可使用。

(4)使用范围及使用量

一种酶制剂必须明确用于哪种食品或食品类别,以便计算酶制剂可能被消费者摄入的量。直接加入到食品中的酶制剂,必须提供加入到每一种食品或食品类别的使用量或使用量的范围,并以每千克或每克食品中的TOS(mg)数表示。来源于也用于生产其他酶制剂的物质(如黑曲霉变种*A. niger* var.可作为生产几种酶的来源)生产的酶制剂,如有可能,应尽量提供相同来源的其他酶制剂的使用情

况及使用量。

(5) 其他方面的规定

必须提供固定化酶的残留量、工艺影响、分析方法、暴露水平等资料。

美国《食品化学品法典,第四版,1996》^[41] (Food Chemical Codex, 4th ed.; FCC- ,1996)对各种食品用酶制剂商品的基本要求、分类、作用等作了新的规定。如酶制剂的制备应符合良好的生产工艺(GMP),使用的原料不得导致被酶处理的食品含有的菌落总数超过该食品的允许量。用于生产酶制剂的动物组织必须符合美国肉类检验的各项要求,必须按GMP进行管理。用于生产酶制剂的植物原料或微生物的培养基成分,在正常使用的情况下,它们转入食品的量不得超过有碍健康的水平。利用微生物生产酶制剂时其生产方法和培养条件都应保证是在受控条件下发酵,以保证所用的微生物不致成为有毒物质和其他有害物质的来源。生产酶制剂所用的载体、稀释剂和加工助剂,必须是食品级的,包括水和不溶于水的物质,在加工后都应从食品中除掉。虽然未规定真菌毒素的允许限量,但应采取适当的措施保证成品中不含这类污染物。

各种酶制剂应符合通用质量标准 含量:酶活力应为所标单位的85.0%~115.0%;重金属(以Pb计):<30 mg/kg;铅(Pb):<5 mg/kg;大肠菌群:<30/g;沙门氏菌:阴性/25 g。

美国FDA对来源于GMO的酶制剂与非GMO来源的酶制剂采用相同的安全性评价方案。FDA接受Pariza和Foster(1983)^[5]及Pariza和Johnson(2001)^[6]提出的安全性评价判断(decision tree safety assessments)的方案。大部分北美国家酶制剂公司利用Pariza和Johnson的判断树进行生产菌株的安全性评价。

3.5 欧盟^[7] 在欧盟,酶制剂是作为食品添加剂还是加工助剂取决于其使用目的,各国的法规要求不同。有些国家按欧盟食品科学委员会(The Scientific Committee for Food, SCF)1991年4月提出的《有关食品酶制剂要求提供的资料导则 Guidelines for the presentation of data on food enzymes》对酶制剂进行评价。该《导则》包括所有用于食品加工用的酶制剂。为了管理的需要,有些酶制剂作为加工助剂,而有一些是真正的食品添加剂。

3.5.1 关于酶制剂的安全性问题

3.5.1.1 酶制剂的毒理学特征(即有活性的酶、副产物和污染物) 为保证酶制剂是不含有有毒污染物(如来源于微生物酶中的真菌毒素和抗菌素)的稳定的、安全的产品,要求有加工工艺规范,包括适当

的质量保证检测,保证原料或有机体稳定,不会随时间而变化。

3.5.1.2 酶消费的量 酶制剂加入食品中的量、食品在消费时酶在食品中的浓度,以及在不同食品中酶制剂的使用量和这些食品消费的频率等。

3.5.1.3 食品终产品中的酶制剂引起的过敏和刺激 主要是工人在操作时接触高浓度的酶制剂的职业健康问题,到目前为止,未见经确认的通过摄食酶处理的食品诱发的过敏。

3.5.1.4 食品终产品中酶反应的非目的产物(unintended reaction products) 如组氨酸转变成组胺。所有由非目的产物引起的可能对健康的不良作用都应在提交的报告中提出。

3.5.1.5 来源于有机物(微生物)的安全性 当商品化酶制剂终产品中不含来源于有机物活细胞时,使用致病菌生产酶制剂主要考虑的是工作人员的职业健康问题,但一般的原则是不用致病微生物生产食品用酶制剂。

考虑酶制剂的毒理学特性时,一般认为由植物或动物的可食部分生产的酶制剂没有健康方面的问题。如预期的使用量不超过该来源的正常使用量,并能建立足够的、符合要求的化学和微生物指标,则不需提供安全性方面的附加资料。

来源于微生物的酶制剂,必须保证微生物不产生会在终产品中存留的毒性物质。但对于微生物而言,由于属于同一种菌种的不同菌株具有不同的特性,同一种菌种的一些菌株是无害的,而另一些可能属于产毒菌株。有些真菌的属,特别是青霉属(*Penicillium*)和曲霉属(*Aspergillus*),鉴定这些属的菌种时,常常会发生错误。例如,有时米曲霉(*A. oryzae*)很难和具有产毒能力的黄曲霉(*A. flavus*)区分。有发生微生物的菌株鉴定错误的可能时,必须对其进行仔细的鉴定,在有怀疑的情况下,需经独立的、被认可的实验室进行验证。微生物的产毒能力(质量和数量)取决于环境因素,如培养基的成分、pH、温度及发酵时间等,因此,有这种危险,即一种微生物在一些条件下不产生毒素,而在另一些条件下可能产生毒素。为了提高和优化产酶能力,对生产用的微生物连续不断筛选,可能导致菌种的自发性突变,从而使非产毒菌株变成产毒株。将基因修饰技术应用用于生产食品酶制剂时,在引入需要的特性的同时,也可能引入了产生毒素的特性,因需要对宿主、载体和插入子作出明确的鉴定和评价,综合以上因素,对所有用于生产特定酶制剂的微生物菌株进行毒理学试验是十分重要的。

3.5.2 关于用于评价食品用酶制剂需要提交的技

术资料

3.5.2.1 活性成分(Active components) 主要的酶活性以系统的名称和 EC 编码表示其特性。根据每一个酶的催化反应测定酶制剂的活性,并以每重量单位或体积单位的活性单位表示(U/g 或 U/mL)。商业上有时按一定量的酶制剂添加到一定量的食品中,以达到预期的效果。同时还需列出次要的酶活性名称,不管次要的酶活性是有用还是无用。

3.5.2.2 原料(source materials)

任何原材料如果含有可能对健康有害的物质,都必须提供酶制剂中不含该物质的证据。

动物来源 必须标明使用的动物或动物部分。用于酶制剂的动物组织必须符合肉品检验要求,操作时必须符合良好的卫生规范。

植物来源 必须标明用于酶制剂的植物和植物部分。

用于生产酶制剂的微生物可以来自天然菌株,也可以是微生物的变种,或是通过选择性连续培养或基因修饰的天然菌株及其变种。这些菌种必须是纯的、稳定的菌株或变种,并按照公认的鉴定关键点(Identification keys)经过充分的、详细的鉴定。生产酶制剂所用的微生物的模式培养物,必须在能保证菌株不产生变异的条件下保存。生产酶制剂时,所用的方法和培养条件,必须能保证批批产品的稳定性和重复性,在这些步骤下生产酶制剂的菌株不会产生毒素,并能防止引入能在酶的终产品中产生毒性物质及其他不符合要求的物质的外来微生物。

基因修饰的有机物 必须提供宿主、载体(质粒)和整合到载体或染色体的 DNA 序列。不管是植物、动物还是微生物,供体有机物也必须经过鉴定。必须详细了解有关基因结构的资料,以便预见宿主的原基因物质和插入的新基因物质之间的任何不期望存在的相互作用。这方面的资料包括,存在外来 DNA(质粒或整合到宿主染色体的外来 DNA)、特有的基因特征(标记物)、休眠基因的存在(突变时表达)、基因稳定性(突变率和影响突变率的因素、内-外分子重组和限制屏障)、基因转移(可动/结合能力)以及抵抗力(抗菌素、重金属)等有助于预见对人类健康、动物、植物和生态有影响的资料也应提供。确切了解载体的特征和生物学特征是评价载体导入是增加还是减少宿主微生物的安全水平的基础。必须在 DNA 水平上(大小、限制性图、或全 DNA 系列)鉴定一种载体以及载体上可能用于基因标记的部分。载体必须不含有害序列,同时应是非结合性及非移动性的。插入宿主有机物的 DNA 序列必须充分描述其分子水平、插入基因数量、调节类型(启动

子活性)以及实际的基因产物。来源于微生物、植物和动物的 DNA 系列,都必须提供其基因结构的确切来源及谱系以便进行适当的安全评价。

3.5.2.3 加工工艺(Manufacturing process)

必须提供充分的有关加工方法的资料,微生物来源的酶制剂,必须提供培养基和培养条件。所用的成分必须是食品级的。

必须提供充分的纯化过程的资料,如果酶制剂的加工过程或纯化过程发生了变化,则视为是新的加工和纯化方法,除非能证明终产品与用原生产方法生产的产品没有区别。

3.5.2.4 载体、其他添加剂和成分(Carriers, other additives and Ingredients)

必须提供生产、销售及使用酶制剂时所用的载体、稀释剂、赋形剂、支持剂及其他添加剂和成分(包括加工助剂)等方面的资料。这些物质必须在与相关酶制剂使用时,适合于使用,或者在食品中不溶,并能在加工后及食用前从食品中去除。

用作固定化酶制剂的载体和固定剂必须是经批准使用的。使用新的材料时,必须经试验证明没有有害残留物质残留在食品中。并必须经试验证明,任何固定剂或酶的残留量都在每一个产品规格规定的限量内。

与美国一样,也规定了用总有机固体(TOS)的百分比,以区分从原料来源的酶制剂和稀释剂及其他添加剂成分的量。

3.5.2.5 使用(Usage)

在酶制剂的使用方面,必须提供以下资料:酶的技术效应;拟使用的食物类别;在每一种食物类别中酶制剂的最大使用量。

3.5.2.6 稳定性及在食品中的转归(Stability and fate in the food)

在这方面必须提供的资料有:食品终产品中酶制剂的量(即活性酶及其他成分);主要的反应产物及经酶处理的食物在生产 and 储存过程中,可能形成的不是正常膳食成分的反应产物;可能对营养素的影响。

3.5.2.7 通用要求和规格(General requirement and specifications)

酶制剂的生产必须按照食品的良好生产规范进行。必须定期检验用于生产酶制剂的微生物的保藏菌种,以保证其纯度。添加到食品中的酶制剂不得造成食品中的总菌落数增加。污染物:(a) 重金属,酶制剂中不得含有具有毒理学意义水平的重金属,如铅、镉、砷和汞,必须标明每一种酶制剂中重金属的实际含量;(b) 微生物,不得检出沙门氏菌、志贺氏

菌、埃希氏大肠杆菌、李斯特氏菌、弯曲菌和产气荚膜梭菌等致病微生物;大肠菌群不得超过 30/g;总活菌数不超过 $10^2 \sim 10^4$ /g;通过试验保证终产品中不含微生物来源的活细胞。酶制剂不应含有任何抗菌的活性物质。酶制剂不应含有可检测到的毒素。如已知某一微生物产毒,必须有适当的方法证明产品中不含有这些毒素。

3.5.2.8 基本的毒理学要求 (Basic toxicological requirements)

来源于动物和植物可食部分的酶制剂一般不需要做毒理学试验。如果利用一般不作为膳食的正常食用部分,除非能提供充分的安全性资料,否则还需要做一些毒理学试验。

来源于微生物的酶制剂需要进行以下试验:(a)啮齿类动物的 90 d 经口毒理学试验。(b) 2 个短期试验,细菌的基因突变试验和染色体畸变试验(推荐体外试验)。

如有可能,应在添加载体、稀释剂等之前,对纯化的酶终产品进行毒理学试验。一般来说,试验应按照有关导则(EC/OECD)进行。因某些酶制剂是蛋白质性质和/或酶的活性在细胞水平上发挥作用,因此有时可能对标准方法要进行一些修改,特别是体外试验,如果有足够的理由,一般有一些修改是可以接受的。

从毒理学的观点来看,对微生物产生的每一个特定的酶制剂进行毒理学试验是很重要的。但是,如果已对一个特定菌株生产的酶制剂进行了全面的试验,同时该酶制剂的生产程序与该菌株生产的其它酶制剂的程序没有明显的区别,可视具体情况减免一些试验。

如果用于生产酶制剂的微生物在食品中有很长的安全使用历史,并且有文献证明该菌种不属于产毒菌种,同时实际应用的菌株有充分的资料证明来源没有问题,对符合以上条件的菌种生产的酶制剂,即使没有进行特殊的毒理学试验,接受该酶制剂也是合理的。在这种情况下,对菌株进行正确的验证试验非常重要。

用突变菌株代替以往进行过试验并批准过用于生产酶制剂的菌株时,应进行较简单的验证试验。根据不同情况减少试验程序。

关于固定化酶制剂,在有足够的毒理学试验的基础上,固定化技术需经评价并获得批准后方可使用。

用特征明确、非产毒的遗传工程来源的微生物生产食品用酶制剂,可得到纯度非常高,特异性非常强的产品。如果能够证明产品纯度高和特异性强,

可不需要做全部的毒理学试验。虽然以上列举了可以被接受的试验程序,但为了解决基础研究中出现的问题,在这种情况下,可能需要进行多于和高于基本要求的试验。

3.5.2.9 安全性评价

根据提交的技术和毒理学资料,委员会将确定酶制剂使用的安全性。通过确定可使用的条件,可能的话,根据啮齿类动物的亚慢性毒性试验中未观察到有作用的剂量水平(no-observed-effect-level, NOEL),确定特定酶制剂可接受的每日摄入量。评价仅限于提交申请的产品,而不能自行推广到其他来源或其他加工工艺的同一品种的酶制剂。

3.6 FAO/WHO 食品添加剂联合专家委员会(JECFA)^[8,9]

JECFA 评价一种新的酶制剂的申请时,该酶制剂必须至少已在两个国家登记。环境卫生基准 Environmental Health Criteria (EHC) 70 (1987) - 评价食品用酶制剂“指南”中根据酶的来源将酶制剂分成 5 大类:

- (1) 来源于可食的动物组织生产的酶制剂;
- (2) 来源于植物的可食部分生产的酶制剂;
- (3) 来源于一般作为食品的组成部分或在食品加工过程使用的微生物生产的酶制剂;
- (4) 由通常污染食品的非致病性微生物生产的酶制剂;
- (5) 由目前较少认识的微生物生产的酶制剂。

(1)~(3)类酶制剂不管是直接添加还是以其他形式添加到食品中,其安全性评价要求是一样的。(4)和(5)类的安全性评价取决于酶直接添加到食品中后:a 去除;b 不去除或 c 固定不变。对于 a 的情况,不用具体制定 ADI 值;对于 b,必须制定 ADI 值以保证食品中酶制剂的水平是安全的;而 c 的情况,不需要制定 ADI 值。

2001 年, JECFA 修订了酶制剂的通用规格和要求。修订后的“原则”要求所有新研制的酶必须对以下几方面进行安全性评价,包括:生产菌、酶的组成、次要活性(side activities)、加工工艺、膳食暴露。

“原则”列出了 Pariza 和 Foster (1983)、^[5] 国际食品生物技术委员会(International Food Biotechnology Council, IFBC) (1990)、^[10] 食品科学委员会(Scientific Committee for Food, SCF) (1992)^[7] 以及 Pariza 和 Johnson (2001)^[6] 等若干个可接受的安全性评价方案。

“原则”指出,由 GMO 生产的酶制剂必须强调以下几点:

- (1) 必须描述引入并仍存留在生产用的微生物中的基因物质的特性并评价其功能和安全性。通过

提供最终引入的基因物质序列和/或在最终的生产菌株中分析引入序列的分子,证明没有意外的基因物质(unexpected genetic material)引入宿主微生物中。其中包括需证明基因物质中不含有毒力因子的基因编码、蛋白毒素,或与合成真菌毒素、其他有毒物质或不需要的物质有关的酶。

(2) 如果生产用的微生物具有产生可灭活临床上有用的抗菌素的蛋白质的能力,在这种情况下,必须提供酶制剂的终产品中既不含可干扰抗菌素治疗效果的蛋白质也不含可转入微生物中的、可导致耐受抗菌素的 DNA。

(3) 必须考虑评价通过 DNA 插入到生产用微生物中的基因物质产生的潜在的致敏性问题。

目前工业上应用的酶大多采用微生物发酵法生产,因此加强对酶制剂生产菌株的安全性评价,保证酶制剂的食用安全,保障消费者的健康具有重要意义。1983年 Pariza 和 Foster^[5]讨论了通过传统方法改进生产食品加工用酶的生产菌株的安全性问题,考虑的问题有以下几个方面:生产菌株的安全性,特别是毒性及致病性、致敏性及刺激性、致癌性及致突变性、致畸性及对繁殖的影响;抗菌素,酶反应物质,酶与其他食品成分的相互作用,以及食品用酶对消费者的直接影响等。结论是:生产菌株的安全性是评价酶的安全性时必须首先考虑的。评价一种生产菌株的安全性,主要是其产毒能力,特别是生产菌株可能合成可以经口产生毒性作用的能力。因酶制剂很少含有活的微生物,故一般不考虑生产菌株致病性对消费者安全的影响。但致病性对工人的安全非常重要。

对人有明显致病性的菌种绝对不能用于生产加工食品的酶制剂。通过全面非致病性、非产毒性鉴定的菌株、历史上已安全使用于食品酶制剂生产的微生物应作为首选菌株。此外,食品用酶制剂中很少含活的生产用微生物,因此有关食品用酶制剂生产菌株的致病性是应主要考虑的问题。以往工业上一般用动物模型评价未评价过的宿主微生物的致病性,目前可以通过各种途径,如基因修饰、蛋白质育种(protein "breeding")、化学修饰或新从外环境分离的菌株等,生产经改造特性的、新的酶制剂。因此,必须更新以往酶制剂的安全性评价机制,以适应这些现代生物学的发展。Pariza 和 Johnson 建立的判断树(Decision tree)^[6]可以完成这一目标。只有通过判断树的各项指标,严格进行安全性评价,一种新的酶制剂才能进入市场。除了必须符合判断树的各项指标外,酶制剂还必须按照良好生产规范(GMP)生产,并符合或严于 FCC^[4]和/或 JECFA^[9]规定的酶制剂

规格。

通过基因修饰技术或用传统/经典或 rDNA 进行改造生产的菌株,其安全性需经评价。确定一个安全菌株需要的基本要素包括:对宿主微生物全面的鉴定;检测所有引入宿主微生物中的新 DNA 的安全性;并保证用于基因修饰的步骤也适用于食品。

以下为 Pariza 和 Johnson 的判断树^[6]

(1) 生产菌株是否经基因修饰?

"是"进入(2), "否"进入(6)。

(2) 生产菌株是否采用 rDNA 技术修饰?

"是"进入(3), "否"进入(5)。

(3) 引入 DNA 的菌株,须回答 3a - 3e 中的问题:

(3a) 引入 DNA 编码表达的酶产物,在食品中是否有安全使用的历史?

"是"进入(3c), "否"进入(3b)。

(3b) 测试物经口短期试验未观察到有害作用的剂量水平(NOAEI),是否足以保证其安全性?

"是"进入(3c), "否"进入(12)。

(3c) 测试物是否不含有可转移的抗菌素耐受 DNA 基因?

"是"进入(3e), "否"进入(3d)。

(3d) 耐药基因是否会编码到某一种用于治疗人或动物疾病的药物中,而产生耐药性?

"是"进入(12), "否"进入(3e)。

(3e) 其他所有引入的 DNA 的特性是否已十分清楚,并且用于生产食品级产品的微生物是否含有不安全的特性?

"是"进入(4), "否"进入(12)。

(4) 引入的 DNA 是否偶尔与染色体结合?

"是"进入(5), "否"进入(6)。

(5) 是否已充分了解生产菌株,并可得出所使用的基因修饰方法不会合成毒素或其他不安全的代谢产物的结论?

"是"进入(6), "否"进入(7)。

(6) 生产菌株先前是否经安全性评价程序反复进行过评价,证明其是从安全的菌系分离得到的菌株?

"是",认可该测试物, "否"进入(7)。

(7) 该菌种是否是非致病菌?

"是"进入(8), "否"进入(12)。

(8) 测试物是否不含抗菌素?

"是"进入(9), "否"进入(12)。

(9) 测试物是否不含已知由同一种菌种的其他成员产生的经口毒素?

"是"进入(11), "否"进入(12)。

(10) 测试物中这种毒素的含量是否低于受关注的水平?

“是”进入(11), “否”进入(12)。

(11) 在适当的经口试验中,测试物的 NOAEL 是否十分高,足以保证其安全性?

“是”,认可该测试物, “否”进入(12)。

(12) 受试物可能含有某种不良的品质或物质因而不能用作食品。如果产生不良品质或物质的基因可能永久失去活性或被去除,那么受试物可再次通过判断树。

4 我国食品用酶制剂的管理现状

在我国食品工业用酶制剂按食品添加剂进行管理。目前规定,使用生产酶制剂的微生物,必须提供权威机构出具的菌种鉴定报告、毒力试验报告等安全性评价资料。截止到 2002 年,已列入《食品添加剂使用卫生标准》中的酶制剂有 19 种。除少部分酶制剂,如木瓜蛋白酶、胰蛋白酶、胃蛋白酶等是由动、植物生产的外,大部分酶制剂都是利用微生物生产的。其中有少数是经基因修饰的微生物生产的。随着生物技术在我国的发展,将有越来越多的经基因工程改造的微生物用于生产酶制剂。目前的当务之急是应根据酶制剂生产的特点,尽快制定有针对性的,特别是针对生产菌株的安全性评价程序和管理办法,以保证其使用安全,保障消费者健康。

参考文献:

[1] FDA. Enzyme Preparations: Chemistry recommendations for food additive and GRAS affirmation petitions[M]. Version 1.1; 1993.

[2] International Union of Biochemistry (IUB). Enzyme nomenclature: Recommendations of the nomenclature committee of the international Union of biochemistry and molecular biology on the nomenclature and classification of enzymes[M]. Academic Press, San Diego. 1992.

[3] National Food Authority. Food Standards Code[M]. Commonwealth of Australia, 1996.

[4] Food Chemical Codex[M]. 4th ed. Monograph Specifications, 1996.

[5] Pariza M W, Foster E M. Determining the safety of enzymes used in food processing[J]. J Food Protect. 1983, 46: 453—463.

[6] Pariza M W, Johnson E A. Evaluating the safety of microbial enzyme preparations used in food Processing: Update for a new century[J]. Regulatory Toxicology and Pharmacology. 2001, 33:173—186.

[7] Scientific Committee for Food. Guidelines for the presentation of Data on food enzymes 27th report series[R]. EUR 14181 EN, 1992, 13—22.

[8] Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). Environmental Health Criteria (EHC) 70 (1987)-Guidelines for assessing food enzyme preparations [R]. 1987.

[9] Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). Compendium of food additive specifications[J]. General Specifications for Enzyme Preparations Used Food Processing, 1992, 1:1—3.

[10] International food Biotechnology Council (IFBC). Safety evaluation of foods and food ingredients derived from microorganisms in biotechnologies and food: Assuring the safety of foods produced by genetic modification[J]. Regul Toxicol Pharmacol. 1990, 12: S1—S196.

[收稿日期:2003-03-05]

中图分类号:R15;TS202.3 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2003)03-0194-08

卫生部法监司关于食品卫生检验方法问题的复函

卫法监食便函[2003]39号

甘肃省卫生厅:

你厅关于食品卫生检验方法问题的请示(甘卫法监函字[2002]76号)收悉,经研究,现函复如下:

《食品添加剂使用卫生标准》(GB 2760—1996)规定了食品添加剂的使用范围和最大使用量。因此,应按照国家标准规定的使用范围进行采样检测,例如,使用范围规定的是瓜子则将壳和籽仁碾碎混合检测,使用范围规定的是花生米则检测花生米。

此复

卫生部卫生法制与监督司
二 三年一月二十四日