



# Guide pour la constitution d'un dossier relatif à l'emploi de préparations enzymatiques en alimentation humaine

26 septembre 2003

## **Champ d'application**

Ce guide s'applique aux préparations enzymatiques destinées à être utilisées au cours de la fabrication des denrées alimentaires pour l'alimentation humaine. Il a pour objectif de préciser les données nécessaires pour l'emploi de ces préparations enzymatiques dans des conditions garantissant la sécurité du consommateur. Il vise à définir une démarche d'évaluation selon les diverses situations rencontrées, et s'appuie, dans le contexte des connaissances scientifiques actuelles, sur les lignes directrices élaborées par le SCF (Reports of the Scientific Committee for Food « Guidelines for the presentation of data on food enzymes » (Opinion expressed 11 April 1991, EUR 14181 EN, 1992), actuellement suivies pour l'élaboration des dossiers.

Il présente les informations nécessaires à l'expertise scientifique dans le cas d'une demande de mise sur le marché d'une préparation enzymatique. Il couvre également la démarche scientifique à suivre dans les situations relevant de la déclaration de commercialisation, sans préjudice des données à produire auprès de la DGCCRF en application de l'arrêté du 5 septembre 1989 relatif à l'emploi des préparations enzymatiques dans la fabrication des denrées et boissons destinées à l'alimentation humaine. Si, pour une préparation enzymatique spécifique, certaines de ces données ne s'avèrent pas nécessaires ou pertinentes, elles peuvent ne pas être fournies dès lors que le pétitionnaire présente des arguments justificatifs à l'appui. Ce guide est évolutif et pourra être révisé en tant que de besoin compte tenu de l'évolution des connaissances scientifiques.

## **Validation du document**

La présentation et le contenu du dossier tel que décrit ci-dessous pour une demande d'évaluation de préparations enzymatiques en alimentation humaine ont été proposés par le comité d'experts spécialisé « Biotechnologie » placé auprès de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments. Ce comité a pour mission l'évaluation des risques pour la santé humaine et animale liés à l'utilisation de préparations enzymatiques et des nouveaux aliments composés ou issus d'Organismes Génétiquement Modifiés (OGM).

## **Contexte réglementaire national et communautaire**

Il n'existe pas de réglementation européenne concernant l'emploi d'enzymes en tant qu'auxiliaires technologiques dans les industries alimentaires. Toutefois, les dossiers soumis par les industriels et évalués par les instances scientifiques sont élaborés selon les lignes directrices établies par le CSAH<sup>1</sup>, datant de 1992.

L'emploi d'enzymes dans les industries alimentaires relève en France d'une réglementation reposant sur le principe d'une liste positive, soit en tant qu'additifs alimentaires, soit en tant qu'auxiliaires technologiques. Ainsi, peuvent être utilisées dans certaines conditions les préparations enzymatiques qui auront été expertisées et expressément autorisées. Cette liste évolutive est donc susceptible d'être actualisée et additionnée de nouvelles enzymes, de nouvelles préparations ou de nouveaux domaines d'application.

L'arrêté relatif à l'emploi des préparations enzymatiques dans la fabrication des denrées et boissons destinées à l'alimentation humaine du 5 septembre 1989 définit leur cadre général d'utilisation et donne une liste d'enzymes autorisées.

D'autres textes légaux concernent l'utilisation d'enzymes en alimentation humaine :

- l'arrêté du 2 octobre 1997 relatif aux additifs pouvant être employés dans la fabrication des denrées destinées à l'alimentation humaine,
- l'arrêté du 20 juin 1985 autorisant l'emploi de lactase pour l'hydrolyse du lactose,
- l'arrêté du 21 décembre 1988 donnant une liste de protéases végétales, animales et microbiennes autorisées pour la préparation d'hydrolysats protéiques destinés à une alimentation particulière,
- l'arrêté du 24 mars 1993 sur l'emploi des beta-cyclodextrines et qui autorise la cyclodextrine-glycosyl-transferase de *Bacillus macerans* et de *Bacillus circulans*,
- une série d'arrêtés, datés des 16 juin 1993, 27 août 1993, 1<sup>er</sup> février 1994, 18 août 1994, 29 mai 1997, 12 janvier 1998, 28 avril 1998, 28 juillet 1999, et du 14 novembre 2001, qui viennent compléter l'arrêté du 5 septembre 1989 en autorisant de nouvelles enzymes.

Il est à noter que, à ce jour :

- les enzymes d'origine animale (pepsine, présure...) utilisées en fromagerie font l'objet d'une réglementation particulière française : circulaire du 20 janvier 1981 relative à la présure, pepsine bovine et protéases acides utilisées en fromagerie.
- les enzymes utilisées en œnologie relèvent d'une réglementation européenne : Règlement de la Commission n° 3220-90 du 7 novembre 1990 déterminant les conditions d'emploi de certaines pratiques œnologiques prévues par le règlement CEE n° 822-87 du Conseil (remplacé par le Règlement 1493/1999 du 17 mai 1999).
- la directive 93/77/CE permet l'utilisation des enzymes pectinolytiques, protéolytiques et amylolytiques dans la production de jus de fruits.

## **Application du document**

Le présent document indique les informations relatives aux préparations enzymatiques nécessaires à la constitution des dossiers de demande d'autorisation, demande d'extension et déclaration de commercialisation et définissent les critères d'évaluation du risque pour le consommateur.

---

<sup>1</sup> Guidelines for the presentation of data on food enzymes, 1991. Reports of the Scientific Committee for Food, EUR 14181 EN, Commission des Communautés Européennes, Bruxelles, Luxembourg

2 Les dossiers relatifs aux préparations enzymatiques doivent comporter tous les points énumérés sous  
4 l'intitulé « données requises ». Les réponses doivent être étayées scientifiquement. Les données  
6 requises pour le dossier doivent être adaptées à l'évolution technologique. Si certaines données ne  
8 s'avèrent pas nécessaires ou pertinentes, elles peuvent ne pas être fournies dans la mesure où le  
10 pétitionnaire présente des arguments justificatifs pour un allègement partiel du dossier. Inversement,  
si un doute persiste dans l'évaluation de la sécurité d'emploi, l'Afssa peut demander des essais  
complémentaires. Enfin, dans les cas où une situation particulière ou exceptionnelle l'exigerait, il reste  
possible de provoquer à la demande des parties – le demandeur ou le comité d'experts spécialisé  
chargé de l'évaluation scientifique – une audition du demandeur pour éclairer certains aspects  
scientifiques ou techniques.

## 12 **Présentation des dossiers**

14 Le présent document propose trois types de dossiers dont les exigences sont adaptées au cas par  
cas pour chacun d'entre eux (voir arbre de décision).

16 Dans le cas d'enzymes obtenues à l'aide d'OGM, il devra s'accompagner de l'avis de classement de  
18 la Commission de Génie Génétique. Les séquences devant être exploitées (construction génétique)  
devront également être fournies sur support informatique.

## 20 **Justification du guide**

22 La réglementation définit comme « préparation enzymatique » un extrait plus ou moins purifié obtenu  
24 à partir d'un animal, d'un végétal ou d'un micro-organisme.

26 Une préparation enzymatique industrielle contient donc :

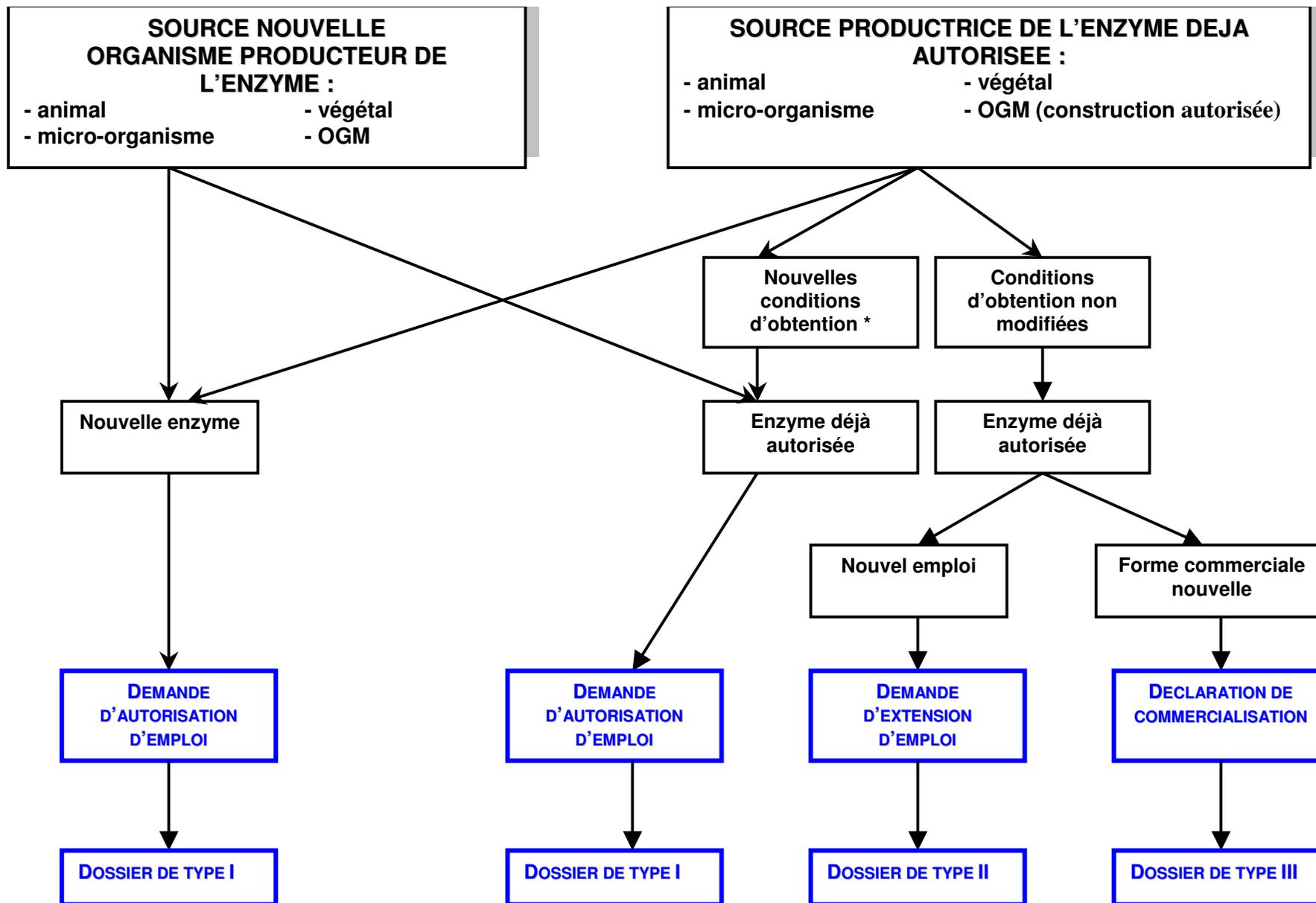
- 28 - une masse importante de protéines, dont une partie seulement est définie, et dont certaines à  
activité enzymatique, en particulier celle(s) revendiquée(s),
- 30 - des substances provenant de la fermentation dans le cas d'enzymes microbiennes,
- des substances ajoutées en vue de la standardisation et de la stabilisation.

32 De plus, les préparations industrielles sont standardisées par rapport à une ou plusieurs activités  
enzymatique(s) revendiquée(s).

34 D'où la nécessité de :

- 36 1- définir de façon précise l'activité enzymatique revendiquée, y compris l'activité spécifique,
- 38 2- indiquer les activités enzymatiques secondaires,
- 40 3- démontrer la sécurité d'emploi, généralement par des tests toxicologiques, compte tenu de  
l'hétérogénéité de composition des préparations,
- 42 4- définir le devenir, au cours du process industriel, de la préparation enzymatique en présence  
de la matrice alimentaire : activité principale, activités secondaires, produits de la réaction ; et  
argumenter l'absence de tout effet néfaste sur la santé de l'homme,
- 44 5- s'assurer de la stabilité des sources et de la reproductibilité des procédés mis en œuvre ainsi  
que des caractéristiques de la préparation enzymatique, incluant des vérifications d'assurance-  
46 qualité.

# DETERMINATION DU TYPE DE DOSSIER A CONSTITUER



\* Il s'agit de toute modification significative du procédé fermentaire (pour les enzymes microbiennes), ou des étapes d'extraction, de purification et de standardisation.

**DONNEES A FOURNIR POUR LES 3 TYPES DE DOSSIERS**  
**(Cf. arbre de décision)**

**Dossier type I<sup>2</sup> : Demande d'autorisation d'emploi** : nouvelle préparation enzymatique issue d'un organisme producteur nouveau ou déjà autorisé

**Dossier type II<sup>2</sup> : Demande d'extension d'emploi** : préparation enzymatique déjà autorisée, issue d'un organisme producteur déjà autorisé.

**Dossier type III<sup>3</sup> : Déclaration de commercialisation** : la préparation enzymatique est déjà autorisée pour la même utilisation.

Toute « déclaration de commercialisation » pour une préparation enzymatique donnée, déjà autorisée pour une utilisation définie, doit porter sur une préparation obtenue selon le protocole ayant donné lieu à autorisation (organisme producteur<sup>4</sup>, procédé, etc.) et présentant strictement les mêmes propriétés.

Données	Eléments à fournir	Dossier type I	Dossier type II	Dossier type III
<b>Données administratives</b>	- Nom du demandeur	X	X	X
	- Fabricant	X	X	X
	- Personne responsable du dossier	X	X	X
<b>Données techniques</b>	I. Composés actifs de la préparation enzymatique	X	X*	X*
	II. L'organisme de production	X	X*	X*
	III. Procédé de production	X	X*	
	IV. Supports et autres additifs et ingrédients	X	X*	X*
	V. Application de l'enzyme	X	X	X*
	VI. Stabilité et devenir de la préparation enzymatique dans l'aliment	X	X	
<b>Exigences générales et spécifications</b>	I. Hygiène	X		
	II. Contaminants	X	X*	X
<b>Données sur la sécurité d'emploi</b>	I. Données toxicologiques nécessaires	X	X**	
	II. Exceptions pour les données toxicologiques nécessaires	X (si pertinent)		

\* référence à l'autorisation en vigueur et données résumées

\*\* calcul du nouveau facteur de sécurité

<sup>2</sup> Ce type de dossier relève de l'expertise de l'Afssa

<sup>3</sup> Déclaration auprès de la DGCCRF en application avec l'arrêté du 5 septembre 1989 relatif à l'emploi des préparations enzymatiques dans la fabrication des denrées et boissons destinées à l'alimentation humaine

<sup>4</sup> Souche répertoriée par exemple

SOMMAIRE DU DOSSIER « TYPE »

2		
4		
	<b>A. DONNEES ADMINISTRATIVES</b>	<b>8</b>
6	<b>B. DONNEES TECHNIQUES</b>	<b>8</b>
	<b>I. COMPOSES ACTIFS DE LA PREPARATION ENZYMATIQUE</b>	<b>8</b>
8	I.1. ACTIVITE ENZYMATIQUE PRINCIPALE	8
	I.2. ACTIVITE DE LA PREPARATION ENZYMATIQUE	8
10	I.3. ACTIVITES ENZYMATIQUES SECONDAIRES	8
	<b>II. L'ORGANISME DE PRODUCTION</b>	<b>9</b>
12	II.1. SOURCE	9
	II.1.1. Animal	9
14	II.1.2. Plante	9
	II.1.3. Micro-organisme	9
16	II.2. TAXONOMIE	9
	II.3. GENEALOGIE ET MODIFICATION GENETIQUE	9
18	II.3.1. OGM entrant dans le champ d'application de la directive 90/219	9
	II.3.2. Micro-organismes autoclonés	11
20	II.4. SUIVI DE LA SOUCHE	11
	II.5. SECURITE PRESENTEE PAR L'ORGANISME DE PRODUCTION	11
22	<b>III. PROCEDE DE PRODUCTION</b>	<b>11</b>
	III.1. INFORMATIONS SUR LA METHODE DE FABRICATION OU SUR LA FERMENTATION	11
24	III.2. PROCEDE DE PURIFICATION	11
	<b>IV. SUPPORTS ET AUTRES ADDITIFS ET INGREDIENTS</b>	<b>12</b>
26	IV.1. SUPPORTS, DILUANTS, STABILISANTS ET AUTRES ADDITIFS ET INGREDIENTS	12
	IV.2. ENZYMES IMMOBILISEES	12
28	IV.3. TOTAL ORGANIC SOLIDS (TOS)	12
	<b>V. APPLICATION DE L'ENZYME</b>	<b>12</b>
30	V.1. FONCTION TECHNOLOGIQUE DE L'ENZYME	12
	V.2. TYPES D'ALIMENTS DANS LESQUELS L'ENZYME SERA UTILISEE	12
32	V.3. QUANTITES PRECONISEES ET MAXIMALES UTILISABLES DANS CHAQUE ALIMENT	12
	<b>VI. STABILITE ET DEVENIR DE LA PREPARATION ENZYMATIQUE DANS L'ALIMENT</b>	<b>13</b>

	VI.1. INACTIVATION DE LA PREPARATION ENZYMATIQUE DANS LE PRODUIT FINAL	13
2	VI.1.1. Inactivation	13
	VI.1.2. Devenir de la préparation enzymatique dans le produit traité (Cf. I.1. et I.2.)	13
4	VI.2. PRODUITS DE LA REACTION	13
6	VI.3. EFFETS POSSIBLES SUR LES AUTRES CONSTITUANTS DE L'ALIMENT, NOTAMMENT LES NUTRIMENTS	13
	VI.4. ALLERGENICITE	13
8	<b><u>C. EXIGENCES GENERALES ET SPECIFICATIONS</u></b>	<b>14</b>
	<b><u>I. HYGIENE</u></b>	<b>14</b>
10	I.1. BONNES PRATIQUES DE FABRICATION	14
	I.2. BONNES PRATIQUES D'UTILISATION	14
12	<b><u>II. CONTAMINANTS</u></b>	<b>14</b>
	II.1. METAUX LOURDS	14
14	II.2. CONTAMINANTS MICROBIOLOGIQUES	14
	II.3. ABSENCE DU MICRO-ORGANISME DE PRODUCTION	14
16	II.4. ABSENCE D'ACTIVITE ANTIBIOTIQUE	14
	II.5. ABSENCE DE METABOLITES SECONDAIRES TOXIQUES	14
18	<b><u>D. DONNEES SUR LA SECURITE D'EMPLOI</u></b>	<b>15</b>
	<b><u>I. DONNEES TOXICOLOGIQUES NECESSAIRES</u></b>	<b>15</b>
20	I.1. ENZYMES DERIVANT DE PLANTES OU ANIMAUX	15
	I.2. ENZYMES DERIVANT DE MICRO-ORGANISMES	15
22	I.2.1. Test de toxicité orale	15
	I.2.2. Tests de génotoxicité	15
24	I.2.3. Facteur de sécurité pour la consommation	15
	<b><u>II. EXCEPTIONS POUR LES DONNEES TOXICOLOGIQUES NECESSAIRES</u></b>	<b>16</b>
26	<b><u>E. LISTE DES ANNEXES</u></b>	<b>16</b>
28		
30		
32		

2  
4  
6  
8  
10  
12  
14  
16  
18  
20  
22  
24  
26  
28  
30  
32  
34  
36  
38  
40  
42  
44  
46  
48

**PRESENTATION DU DOSSIER « TYPE »**

**A. DONNEES ADMINISTRATIVES**

- Nom du demandeur
- Fabricant
- Personne responsable du dossier

**B. DONNEES TECHNIQUES**

**I. COMPOSES ACTIFS DE LA PREPARATION ENZYMATIQUE**

**I.1. ACTIVITE ENZYMATIQUE PRINCIPALE**

Classement de l'enzyme selon la nomenclature internationale lorsqu'elle y figure ainsi que ses caractéristiques de référence.

**I.2. ACTIVITE DE LA PREPARATION ENZYMATIQUE**

Caractérisation aussi complète que le permet l'état des données scientifiques concernant la préparation enzymatique : mode de fonctionnement de l'enzyme avec un substrat de référence et dans les conditions d'emploi revendiquées, influence des conditions de milieu, pH et température.

La mesure de l'activité enzymatique sera déterminée si possible selon une méthode de référence utilisant un substrat de référence. Lorsque le substrat industriel est complexe, le demandeur doit présenter un protocole défini, reproductible et validé. Les activités seront exprimées si possible en Unités Internationales (UI) ; dans le cas contraire et lorsque cela est techniquement possible, les équivalences en UI seront fournies.

**I.3. ACTIVITES ENZYMATIQUES SECONDAIRES**

Le pétitionnaire doit répertorier les activités secondaires, en précisant celles susceptibles de générer un risque sanitaire, par exemple les activités protéasiques et phospholipasiques (en raison de leur action sur les muqueuses) et celles interférentes du point de vue technologique.

Les activités secondaires doivent être si possible quantifiées et leur proportion reproductible. Elles doivent donner lieu à des contrôles réguliers.

Il est souhaitable de disposer d'une analyse électrophorétique 2D de la préparation enzymatique après le processus de purification et avant l'ajout d'adjuvants, permettant de visualiser le niveau de complexité de la préparation enzymatique, en présence de marqueurs de poids moléculaires.

## II. L'ORGANISME DE PRODUCTION

### II.1. SOURCE

#### II.1.1. ANIMAL

L'animal et/ou la partie de l'animal utilisés doivent être identifiés. Les tissus animaux utilisés pour la préparation des enzymes doivent être propres à la consommation humaine, et leur utilisation doit être menée selon les bonnes pratiques d'hygiène. Ils doivent être dépourvus de tout risque d'infectiosité (par exemple : agent de l'encéphalopathie spongiforme bovine (ESB) et conformes au dispositif réglementaire de prévention des encéphalopathies spongiforme sub-transmissibles (ESST) en France.

#### II.1.2. PLANTE

La plante et la partie de la plante utilisées pour l'obtention de la préparation enzymatique doivent être précisément identifiés et la toxicité éventuelle discutée.

#### II.1.3. MICRO-ORGANISME

Les souches de micro-organismes utilisées pour l'obtention de la préparation enzymatique peuvent être des souches répertoriées, ou des variants, ou dériver de souches répertoriées ou de variants par des séries de cultures successives ou par modification génétique (elles sont alors considérées comme souches nouvelles). Ces souches d'origine ou celles qui en dérivent ne doivent être ni pathogènes ni toxigènes. Elles doivent être stables, caractérisées et leur filiation établie (description disponible dans un registre tenu par l'industriel). Le numéro de la souche de production utilisée doit être fourni.

Les conditions de maintien des souches, de préculture et culture industrielles doivent garantir l'absence de dérive de cette souche et assurer la reproductibilité entre les différents lots de préparation enzymatique. Ces procédures doivent assurer l'absence d'une éventuelle production de toxines par l'organisme de production et empêcher l'introduction de micro-organismes contaminants qui pourraient être à l'origine de substances indésirables dans les produits enzymatiques finaux.

### II.2. TAXONOMIE

Il est recommandé de se référer au guide OCDE<sup>5</sup> (en projet).

### II.3. GENEALOGIE ET MODIFICATION GENETIQUE

La plupart, sinon la totalité, des préparations enzymatiques produites par des organismes recombinants et sur lesquelles un avis de l'Afssa est requis, sont issues de micro-organismes classés dans le groupe 1 : MGM non susceptible de causer une pathologie chez l'homme, les animaux ou les végétaux ou de causer des effets négatifs sur l'environnement.

#### II.3.1. OGM ENTRANT DANS LE CHAMP D'APPLICATION DE LA DIRECTIVE 90/219<sup>6</sup>

Le dossier doit fournir des informations précises sur l'organisme hôte, le système vecteur (par exemple : plasmide) et la séquence d'ADN incorporée dans le vecteur mis en œuvre comme système d'expression, ou dans le chromosome. Que ce soit pour une plante, un animal ou un micro-organisme, l'organisme donneur doit aussi être identifié.

Il est important d'avoir une connaissance détaillée des structures génétiques mises en jeu, pour que toute interaction indésirable entre le matériel génétique original de l'hôte et le nouveau matériel génétique devant être inséré puisse être anticipée.

<sup>5</sup> OCDE - draft Guidance Document on the use of Taxonomy in Risk Assessment of Micro-Organisms: Bacteria

<sup>6</sup> Directive 90/219 CEE relative à l'utilisation confinée de micro-organismes génétiquement modifiés

Des données sur :

- 2 - la présence d'ADN exogène (plasmides ou ADN étranger incorporé dans le chromosome hôte),
- 4 - les caractéristiques génétiques spécifiques (« marqueurs »),
- 6 - la stabilité génétique (taux de mutations et facteurs influençant le taux de mutation, recombinaisons intra et intermoléculaires, barrières de restriction),
- 8 - le transfert de gènes (possibilité de mobilisation/conjugaison) et
- 8 - les résistances (aux antibiotiques, métaux lourds)

10 vont servir à la prédiction d'effets indésirables sur la santé humaine, les animaux, les plantes et le comportement écologique.

12 Une connaissance exacte de l'identité et des propriétés des vecteurs constitue la base de l'évaluation  
14 permettant de déterminer si leur introduction augmente ou réduit le niveau de sécurité du micro-  
16 organisme hôte. Un vecteur devra être caractérisé au niveau de l'ADN (taille, carte de restriction et  
18 séquence complète) et notamment des gènes qui pourraient être utilisés comme marqueurs, ainsi que  
des éléments fonctionnels pouvant être présentés sous forme de disquette. Un vecteur doit être  
dépourvu de séquences pouvant conduire à la synthèse d'éléments nocifs, ainsi que non conjugatif et  
non mobilisable.

20 Une séquence complète de l'ADN inséré dans l'organisme hôte et une caractérisation moléculaire  
22 doivent être fournies : nombre de gènes insérés, localisation chromosomique, type de régulation  
(propriétés des promoteurs), produits des gènes fonctionnels. La caractérisation des séquences de  
24 bordures de l'insertion est nécessaire. Si les séquences d'ADN proviennent d'un micro-organisme,  
d'une plante ou d'un animal, l'origine exacte de l'ADN inséré et les caractéristiques de la construction  
26 génétique et des modifications éventuelles doivent être données pour permettre une évaluation de la  
sécurité sanitaire.

28 Chaque recombinant doit être évalué au cas par cas en considérant l'hôte, le vecteur et l'insert, du fait  
30 que les dangers potentiels du produit final recombiné peuvent être supérieurs à la somme des  
dangers de chacun de ces événements pris individuellement.

32 ADN biologiquement actif<sup>7</sup> :

34 Les préparations enzymatiques font l'objet de tests toxicologiques.

36 1) Dans la mesure où ces tests ne mettent pas en évidence d'effet toxique, la présence d'ADN de  
38 l'organisme génétiquement modifié dans la préparation enzymatique ne présente pas plus de risque  
que celle de l'ADN de l'organisme non transformé lui-même. Il n'y a donc pas lieu de prendre des  
40 précautions particulières dans ce cas.

42 2) Si ces tests mettent en évidence un effet toxique ou si le micro-organisme n'est pas classé C1 L1,  
44 une étude particulière sur la quantité d'ADN résiduel de ce micro-organisme devra être réalisée et ses  
risques éventuels évalués.

---

<sup>7</sup> ADN d'une taille et d'une structure telle qu'il pourrait conduire à l'expression d'une protéine dans un organisme » - glossaire OGM du site <http://www.finances.gouv.fr/ogm/>

2 **II.3.2. MICRO-ORGANISMES AUTOCLONES**

4 Les micro-organismes autoclonés, reconnus comme tels par la CGG, n'entrent pas dans le champ  
6 d'application de la directive 90/219. Ils sont considérés comme des souches nouvelles.

8 **II.4. SUIVI DE LA SOUCHE**

10 Le suivi des souches doit être garanti à plusieurs niveaux :

- 12 1. présenter une caractérisation régulière des souches, un numéro de souche correspondant à  
14 une souche de référence, ainsi que le contrôle de la non dérive des souches,  
2. attester de l'existence d'un contrôle qualité interne à l'entreprise avec suivi des souches :  
registre faisant figurer toutes les modifications subies par la souche (cahier de laboratoire).

16 **II.5. SECURITE PRESENTEE PAR L'ORGANISME DE PRODUCTION**

18 Les recommandations de l'Afssa de novembre 2002 relatives aux données permettant l'évaluation de  
20 l'innocuité des micro-organismes utilisés dans le secteur agro-alimentaire peuvent être prises comme  
référence.

22 En référence à l'avis<sup>8</sup> du Scientific Committee on Animal Nutrition (SCAN) de février 2000, la  
24 recherche de toxines peut s'avérer nécessaire pour certains micro-organismes producteurs,  
notamment *Bacillus* sp.

26

**III. PROCEDE DE PRODUCTION**

28

30 Equipement, descriptif des différentes étapes du procédé, respect des bonnes pratiques industrielles,  
32 description des modes de contrôle et de leur régularité, choix des matières premières, suivi des  
paramètres (température, pH...), etc.

34 Il est de la responsabilité de l'industriel de s'assurer que toute éventuelle adaptation ou modification  
36 des procédés de fabrication et de purification n'altère nullement les propriétés et la qualité du produit  
et que celui-ci reste identique. Dans le cas contraire, la préparation enzymatique doit être considérée  
comme nouvelle.

38

**III.1. INFORMATIONS SUR LA METHODE DE FABRICATION OU SUR LA FERMENTATION**

40

42 Dans le cas de sources d'enzymes animales ou végétales, on précisera le choix des organes ou  
44 tissus et le procédé d'extraction. Dans le cas de sources microbiennes, il est essentiel de fournir des  
informations complètes sur les conditions de fermentation : composition des milieux, paramètres de  
culture. Tous les composants utilisés doivent être de qualité appropriée pour une utilisation  
alimentaire.

46

**III.2. PROCEDE DE PURIFICATION**

48

50 Le pétitionnaire doit fournir des informations complètes (matériels, auxiliaires utilisés, etc.) sur les  
procédés de purification.

52

---

<sup>8</sup> Opinion of the Scientific Committee on Animal Nutrition on the safety of use of *Bacillus* species in animal nutrition (expressed on 17 february 2000) – European commisssion – Health & consumer protection directorate-general

## IV. SUPPORTS ET AUTRES ADDITIFS ET INGREDIENTS

### IV.1. SUPPORTS, DILUANTS, STABILISANTS ET AUTRES ADDITIFS ET INGREDIENTS

L'article 5 de l'arrêté du 5 septembre 1989 présente une liste positive de supports et conservateurs pouvant être utilisés. L'emploi de toute nouvelle substance appartenant à ces catégories doit faire l'objet d'une demande d'autorisation d'emploi spécifique. Des informations sur les supports, diluants, stabilisants et autres additifs ainsi que les auxiliaires technologiques et ingrédients utilisés dans la production, la formulation et le conditionnement selon les applications des préparations enzymatiques doivent être fournis. Ces substances doivent être compatibles avec les utilisations alimentaires prévues des préparations enzymatiques concernées ou être totalement éliminées des produits alimentaires traités.

### IV.2. ENZYMES IMMOBILISEES

Pour les enzymes immobilisées, les supports et agents d'immobilisation utilisés doivent être conformes à la réglementation<sup>10</sup> pour l'utilisation qui en sera faite. Quand des nouveaux matériaux sont envisagés, ils doivent être testés dans le but de prouver qu'aucun résidu nocif ne peut migrer dans l'aliment.

On pourra se référer aux précisions apportées par la directive 89/109/CEE du Conseil du 21 décembre 1988 relative au rapprochement des législations des États membres concernant les matériaux et objets destinés à entrer en contact avec des denrées alimentaires<sup>11</sup>. Des tests appropriés doivent permettre de contrôler que des migrations éventuelles d'agents immobilisés restent dans des limites ne posant pas de problèmes de sécurité.

### IV.3. TOTAL ORGANIC SOLIDS (TOS)

Les SOT (Solides Organiques Totaux) ou TOS (Total Organic Solids) sont définis comme la somme des composés organiques en excluant les diluants et ingrédients présents dans la préparation finale.

SOT en % = 100 - (% cendres + % eau + % diluants et/ou autres additifs et ingrédients)

Le SOT permet de comparer le pourcentage d'éléments actifs d'une préparation à l'autre.

## V. APPLICATION DE L'ENZYME

### V.1. FONCTION TECHNOLOGIQUE DE L'ENZYME

Intérêt de l'enzyme.

Le cas échéant, avantages par rapport à d'autres procédés déjà utilisés.

### V.2. TYPES D'ALIMENTS DANS LESQUELS L'ENZYME SERA UTILISEE

### V.3. QUANTITES PRECONISEES ET MAXIMALES UTILISABLES DANS CHAQUE ALIMENT

<sup>10</sup> Arrêté du 5 septembre 1989 relatif à l'emploi des préparations enzymatiques dans la fabrication des denrées et boissons destinées à l'alimentation humaine.

<sup>11</sup> Directive 89/109/CEE du Conseil du 21 décembre 1988 relative au rapprochement des législations des États membres concernant les matériaux et objets destinés à entrer en contact avec des denrées alimentaires - Journal officiel n° L 040 du 11/02/1989 p. 0038 - 0044

## **VI. STABILITE ET DEVENIR DE LA PREPARATION ENZYMATIQUE DANS L'ALIMENT**

2

### **VI.1. INACTIVATION DE LA PREPARATION ENZYMATIQUE DANS LE PRODUIT FINAL**

#### **VI.1.1. INACTIVATION**

8 Données scientifiques sur la stabilité de l'enzyme et ses conditions d'inactivation. Cela permettra  
d'évaluer l'inactivation au cours du process si celle-ci est nécessaire.

10

#### **VI.1.2. DEVENIR DE LA PREPARATION ENZYMATIQUE DANS LE PRODUIT TRAITE (CF. I.1. ET I.2.)**

12

14 Le pétitionnaire doit fournir des données sur le comportement de la préparation enzymatique en  
présence du substrat alimentaire et dans les conditions du processus industriel défini pour obtenir le  
produit alimentaire final. Si pour des raisons de sécurité il s'avère que certaines enzymes doivent être  
16 inactivées (protéases, phospholipases, transglutaminases, peroxydases, etc.) des études  
expérimentales doivent être menées pour démontrer l'inactivation de la préparation tant au niveau des  
18 activités principales que secondaires dans le produit fini à consommer.

### **VI.2. PRODUITS DE LA REACTION**

22 Le dossier doit présenter des éléments permettant de garantir l'innocuité des principaux produits de la  
réaction et des produits possibles de la réaction non considérés comme des constituants normaux du  
24 régime alimentaire.

### **VI.3. EFFETS POSSIBLES SUR LES AUTRES CONSTITUANTS DE L'ALIMENT, NOTAMMENT LES NUTRIMENTS**

28

#### **VI.4. ALLERGENICITE**

30

32 La protéine, même inactivée, reste présente dans le produit final, et peut conserver son pouvoir  
allergène éventuel. La dénaturation thermique peut maintenir un potentiel allergénique ou démasquer  
des épitopes allergènes.

34 Il n'existe pas actuellement de méthode d'expérimentation animale reconnue permettant d'évaluer le  
pouvoir d'une substance biochimique à provoquer des réactions d'allergie et/ou d'intolérance chez des  
36 individus sensibles à la suite d'une exposition orale. Toute information disponible permettant d'évaluer  
le risque allergique ou d'intolérance alimentaire liée à la préparation enzymatique doit être fournie (par  
38 exemple l'étude de l'analogie de structure chimique avec un allergène connu...).

40

## C. EXIGENCES GENERALES ET SPECIFICATIONS

### I. HYGIENE

#### I.1. BONNES PRATIQUES DE FABRICATION

Les préparations enzymatiques doivent être produites selon les bonnes pratiques de fabrication. Les stocks de cultures de micro-organismes utilisés comme sources de préparations enzymatiques doivent être périodiquement testés pour assurer leur pureté.

#### I.2. BONNES PRATIQUES D'UTILISATION

Le mode de mise en œuvre de la préparation enzymatique ne doit pas générer d'altération du produit traité ni de contamination microbienne.

### II. CONTAMINANTS

Ces spécifications doivent être fournies expérimentalement au travers des analyses de plusieurs lots de fabrication.

#### II.1. METAUX LOURDS

Les préparations enzymatiques ne doivent pas contenir de quantités toxicologiquement significatives de métaux lourds tels que le plomb, le cadmium, l'arsenic et le mercure. Les teneurs en métaux lourds doivent être inférieures aux seuils fixés par l'arrêté du 5 septembre 1989, rappelés en Annexe I.

#### II.2. CONTAMINANTS MICROBIOLOGIQUES

Les teneurs en contaminants microbiologiques doivent être inférieures aux seuils fixés par l'arrêté du 5 septembre 1989, rappelés en Annexe I.

#### II.3. ABSENCE DU MICRO-ORGANISME DE PRODUCTION

Des tests doivent être réalisés afin d'assurer que des cellules viables du micro-organisme source ne sont pas présentes dans la préparation enzymatique finale.

#### II.4. ABSENCE D'ACTIVITE ANTIBIOTIQUE

Les préparations enzymatiques ne doivent pas contenir d'activité antibiotique. On mentionnera la méthode d'analyse utilisée.

#### II.5. ABSENCE DE METABOLITES SECONDAIRES TOXIQUES

Les préparations enzymatiques ne doivent pas contenir de niveaux de métabolites secondaires toxiques détectables conformément à l'arrêté du 5 septembre 1989 (cf. Annexe I). Quand une source donnée est connue comme susceptible de produire des toxines, l'absence de ces métabolites doit être démontrée en suivant une méthode adéquate (se reporter aux recommandations du JECFA<sup>12</sup> et du SCAN<sup>13</sup>).

<sup>12</sup> General considerations and specifications for enzyme preparations from genetically modified microorganisms. Joint FAO/WHO Expert Committee of Food Additives (JECFA) FAO Food and Nutrition Paper 52, Addendum 6, pages 215-218; Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, 51<sup>st</sup> session, Geneva, 9-18 June 1998.

<sup>13</sup> Opinion of the Scientific Committee on Animal Nutrition on the safety of use of Bacillus species in animal nutrition (expressed on 17 february 2000) – European commission – Health & consumer protection directorate-general

## D. DONNEES SUR LA SECURITE D'EMPLOI

En préambule, on pourra mentionner, lorsque ces données existent, le statut GRAS » (Generally Recognized As Safe) des préparations enzymatiques attribué par la FDA, et/ou le statut « QPS » (Qualified Presumption of Safety) des souches attribué par la CE.

### I. DONNEES TOXICOLOGIQUES NECESSAIRES

#### I.1. ENZYMES DERIVANT DE PLANTES OU ANIMAUX

Des tests toxicologiques ne sont pas habituellement requis. Des données de non-infectiosité doivent être fournies selon la classification des tissus en fonction de leur titre infectieux dans les maladies naturelles établie par l'OMS<sup>14</sup> (1992). Lorsque des parties de plantes ou d'animaux, qui ne sont pas habituellement considérées comme faisant normalement partie du régime alimentaire, sont utilisées, des tests toxicologiques peuvent être requis à moins que de la documentation satisfaisante pour la sécurité d'utilisation soit fournie.

#### I.2. ENZYMES DERIVANT DE MICRO-ORGANISMES

Les tests toxicologiques doivent, lorsque cela est possible, être réalisés sur un lot issu du produit final purifié de la fermentation, avant tout ajout (supports, diluants, etc.). Ils doivent être réalisés selon les lignes directrices établies (CE/OCDE<sup>15</sup>). A cause des effets qu'exercent certaines préparations enzymatiques au niveau cellulaire du fait de leur nature protéique, des modifications des protocoles de tests standards, particulièrement dans le cas de tests *in vitro*, peuvent être nécessaires, compte tenu de la nature ou de l'activité de certaines préparations enzymatiques. De telles modifications sont acceptables si elles sont accompagnées d'arguments pertinents.

##### I.2.1. TEST DE TOXICITE ORALE

Le test de toxicité par administration unique ne s'avère pas justifié par rapport à l'information apportée. Un test de toxicité orale subchronique à 13 semaines est préconisé. Il doit être effectué chez un jeune rongeur.

##### I.2.2. TESTS DE GENOTOXICITE

###### I.2.2.1. Test de mutagenèse

L'on peut estimer que dans la plupart des cas, l'effet mutagène direct des macromolécules est peu probable. Mais on ne peut exclure celui de leurs produits de dégradation ou des impuretés de la préparation enzymatique. Ceci rend nécessaire un test de mutagenèse, type test de Ames.

###### I.2.2.2. Test de clastogénicité

Test d'aberration chromosomique sur lymphocytes humains *in vitro* et/ou du micronoyau *in vivo*.

##### I.2.3. FACTEUR DE SECURITE POUR LA CONSOMMATION

Son calcul doit prendre en compte :

- la dose sans effet établie d'après les résultats du test de toxicité subchronique mis en œuvre et présenté dans le dossier,
- la détermination des quantités résiduelles d'enzyme (ou de préparation enzymatique) dans les aliments, compte tenu de la dose maximale envisagée,
- le niveau de consommation des denrées traitées. Pour cela, les utilisations déjà autorisées dans les mêmes conditions doivent être prises en compte dans le calcul du facteur de sécurité.

<sup>14</sup> Report of the WHO consultation on public health issues related to animal and human spongiform encephalopathies - Geneva. 12-14 November 1991 (WHO/CDS/VPH/92.104).

<sup>15</sup> Organisation de Coopération et de Développement Economique 1981. Lignes directrices pour les essais de produits chimiques

2 **II. EXCEPTIONS POUR LES DONNEES TOXICOLOGIQUES NECESSAIRES**

4 Il est important de réaliser des tests toxicologiques sur chaque préparation enzymatique spécifique  
6 produite à partir d'une source microbienne productrice. Des circonstances particulières peuvent  
8 permettre au pétitionnaire de se dispenser de la batterie complète de tests. Ces situations devront  
être étudiées et argumentées au cas par cas.

10 De plus, il peut exister des circonstances pour lesquelles des tests supplémentaires au-delà des  
requis de base sont nécessaires pour répondre à des questions relatives à des cas particuliers.

12

14 **E. LISTE DES ANNEXES**

16

18

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Circulaire du 20 janvier 1981 relative à la présure, pepsine bovine et protéases acides utilisées en fromagerie.
2. Organisation de Coopération et de Développement Economique. 1981. Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques.
3. Arrêté du 20 juin 1985 relatif à l'emploi de lactose hydrolysé dans certaines denrées alimentaires. JORF, 13.07.85 modifié par l'arrêté du 14.10.91 (JO du 10.12.91).
4. Arrêté du 21 décembre 1988 relatif aux hydrolysats de protéines dans la fabrication des aliments destinés à une alimentation particulière. JORF du 07.01.89.
5. Directive 89/109/CEE du Conseil du 21 décembre 1988 relative au rapprochement des législations des États membres concernant les matériaux et objets destinés à entrer en contact avec des denrées alimentaires - Journal officiel n° L 040 du 11/02/1989 p. 0038 – 0044.
6. Arrêté du 5 septembre 1989 relatif à l'emploi des préparations enzymatiques dans la fabrication des denrées et boissons destinées à l'alimentation humaine. JORF, 01.10.89 modifié par les arrêtés du 15.06.93 (JO du 10.07.93), du 27.08.93 (JO du 04.09.93), du 01.02.94 (JO du 25.02.94), du 18.08.94 (JO du 11.09.94), du 29.05.97 (JO du 03.06.97), du 12.01.98 (JO du 08.11.97), du 12.01.98 (JO du 04.02.98), du 28.04.98 (JO du 19.05.98), du 28.07.99 (JO du 22.08.99), du 14.11.01 (JO du 07.12.01).
7. Directive 90/219/CEE du Conseil du 23 avril 1990 relative à l'utilisation confinée de micro-organismes génétiquement modifiés
8. Guidelines for the presentation of data on food enzymes, 1991. Reports of the Scientific Committee for Food, EUR 14181 EN, Commission des Communautés Européennes, Bruxelles, Luxembourg.
9. Report of the WHO consultation on public health issues related to animal and human spongiform encephalopathies - Geneva. 12-14 November 1991 (WHO/CDS/VPH/92.104).
10. Arrêté du 24 mars 1993 relatif à l'emploi de beta-cyclodextrine comme auxiliaire technologique. JORF, 27.03.93, modifié par l'arrêté du 18 avril 1994 (JO du 26.04.94).
11. V. Larreta-Garde, Enzymes en agroalimentaires, Tec & Doc 1997.
12. Arrêté du 2 octobre 1997 relatif aux additifs pouvant être employés dans la fabrication des denrées destinées à l'alimentation humaine. (JO n°260 du 08.11.97).
13. General considerations and specifications for enzyme preparations from genetically modified micro-organisms. Joint FAO/WHO Expert Committee of Food Additives (JECFA) FAO Food and Nutrition Paper 52, Addendum 6, pages 215-218; Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, 51st session, Geneva, 9-18 June 1998.
14. Opinion of the Scientific Committee on Animal Nutrition on the safety of use of Bacillus species in animal nutrition (expressed on 17 february 2000) – European commission – Health & consumer protection directorate-general.
15. Reports on tasks for scientific cooperation. Study of the enzymes used in foodstuffs and collation of data on their safety. Directorate-General Health and Consumer Protection. December 2000.
16. Règlement CE n° 1622/2000 en ce qui concerne l'utilisation du lysozyme dans les produits vitivicoles, modifié par le règlement CE n° 2066/2001 de la commission du 22 octobre 2001.

17. Recommandations de l'Afssa relatives à la présentation des données permettant l'évaluation de l'innocuité des micro-organismes utilisés dans le secteur agro-alimentaire - novembre 2002.
18. OCDE – 2003- draft Guidance Document on the use of Taxonomy in Risk Assessment of Micro-Organisms: Bacteria.
19. On a generic approach to the safety assessment of micro-organisms used in feed/food production. European commission 2003. Working paper open for comment.

**ANNEXE I :**  
**Spécifications de l'Arrêté du 5 septembre 1989 relatif à l'emploi des préparations enzymatiques dans la fabrication des denrées et boissons destinées à l'alimentation humaine**

**Spécifications relatives aux métaux lourds :**

Cadmium	< 0,5 mg/kg
Mercuré	< 0,5 mg/kg
Arsenic	< 3 mg/kg
Plomb	< 10 mg/kg

**Spécifications relatives aux contaminants microbiologiques :**

Flore aérobie mésophile revivifiable	< 50 000 / g
Salmonelles	absence dans 25 g de produit
Coliformes	< 30 / g de produit
Anaérobies sulfito-réducteurs	< 30 / g de produit
<i>Staphylococcus aureus</i>	absence dans 1 g de produit
Mycotoxines et autres métabolites toxiques	pas de quantité détectable