

Le directeur général

**EXTRAIT DE L'AVIS du 25 novembre 2020  
de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation,  
de l'environnement et du travail**

**relatif à une demande d'autorisation d'extension d'emploi de colophane comme agent  
de décontamination des produits d'origine végétale, pour emploi en sucrerie**

---

*L'Anses met en œuvre une expertise scientifique indépendante et pluraliste.*

*L'Anses contribue principalement à assurer la sécurité sanitaire dans les domaines de l'environnement, du travail et de l'alimentation et à évaluer les risques sanitaires qu'ils peuvent comporter.*

*Elle contribue également à assurer d'une part la protection de la santé et du bien-être des animaux et de la santé des végétaux et d'autre part à l'évaluation des propriétés nutritionnelles des aliments.*

*Elle fournit aux autorités compétentes toutes les informations sur ces risques ainsi que l'expertise et l'appui scientifique technique nécessaires à l'élaboration des dispositions législatives et réglementaires et à la mise en œuvre des mesures de gestion du risque (article L.1313-1 du code de la santé publique).*

*Ses avis sont publiés sur son site internet.*

---

Le présent document est un extrait de l'avis du 25 novembre 2020, après suppression des parties portant sur des informations identifiées comme étant couvertes par le secret des affaires.

L'Agence nationale de la sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (Anses) a été saisie le 05 mai 2020 par la Direction générale de la concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes (DGCCRF) d'une demande d'avis sur une demande d'autorisation d'extension d'emploi de colophane comme agent de décontamination des produits d'origine végétale, pour emploi en sucrerie.

## **1. CONTEXTE ET OBJET DE LA SAISINE**

En application du décret du 10 mai 2011<sup>1</sup> fixant les conditions d'autorisation et d'utilisation des auxiliaires technologiques pouvant être employés dans la fabrication des denrées destinées à l'alimentation humaine, l'Anses dispose de quatre mois à compter de la réception du dossier pour donner un avis.

La présente demande porte sur l'emploi de la colophane, plus précisément, des acides résiniques (N° CAS 8050-09-7), comme agent de décontamination des produits agricoles d'origine végétale<sup>2</sup>. Selon le dossier de demande, l'auxiliaire technologique sera utilisé à la dose maximale de 25 mg de colophane par kg de cossettes, appliquée en une seule dose à une fréquence de 6 heures en moyenne, pour améliorer la qualité microbiologique du jus sucré pendant l'étape de diffusion au cours du procédé de fabrication du sucre

---

<sup>1</sup> Décret n° 2011-509 du 10 mai 2011 fixant les conditions d'autorisation et d'utilisation des auxiliaires technologiques pouvant être employés dans la fabrication des denrées destinées à l'alimentation humaine. JORF du 12 mai 2011.

<sup>2</sup> Arrêté du 19 octobre 2006 relatif à l'emploi d'auxiliaires technologiques dans la fabrication de certaines denrées alimentaires.

conventionnel. Cet usage rentre donc dans les catégories d'auxiliaires technologiques soumis à autorisation préalable, de l'Annexe 2 du décret du 10 mai 2011 mentionné plus haut.

A la suite de l'avis du Comité EGTOP (Expert Group for Technical Advice on Organic Production) validant l'emploi de la colophane et des extraits de houblon<sup>3</sup>, l'emploi de colophane est autorisé au niveau européen pour les denrées alimentaires d'origine végétale uniquement à des fins antimicrobiennes, dans la production de sucre biologique<sup>4</sup>.

Néanmoins, le pétitionnaire précise dans sa demande : « *Au vu des échanges précédents avec la DGCCRF, l'autorisation dans le règlement « Bio » de l'utilisation de la colophane dans le procédé sucrier ne rentre pas dans le cadre de la reconnaissance mutuelle et il reste nécessaire de déposer un dossier de demande d'autorisation au titre du Décret 2011-509 pour pouvoir l'utiliser en production conventionnelle* ».

Les procédés de fabrication de sucre issu de l'agriculture conventionnelle ou biologique sont identiques. La différence entre ces deux procédés étant les conditions de culture des betteraves entrantes qui doivent, dans le deuxième cas, correspondre aux préconisations de la culture biologique<sup>4</sup>.

Le pétitionnaire envisage l'utilisation de la colophane en association avec d'autres agents antimicrobiens déjà autorisés, mais pas comme une alternative à ceux-ci. Cependant, les conditions d'application de la colophane en alternance avec d'autres auxiliaires technologiques autorisés ne sont pas présentées, précisions nécessaires concernant l'évaluation de l'efficacité antimicrobienne.

## **2. ORGANISATION DE L'EXPERTISE**

L'expertise a été réalisée dans le respect de la norme NF X 50-110 « Qualité en expertise – Prescriptions générales de compétence pour une expertise (Mai 2003) ».

L'expertise relève du domaine de compétences du groupe de travail « Evaluation des substances et procédés soumis à autorisation en alimentation humaine (GT ESPA) » et du Comité d'experts spécialisé « Evaluation des risques biologiques dans les aliments » (CES BIORISK). Les travaux ont été présentés au GT ESPA, tant sur les aspects technologiques que scientifiques, le 16 juillet 2020 et le 17 septembre 2020. Les conclusions finales du GT ESPA ont été validées le 15 octobre 2020.

Le CES BIORISK est chargé de l'évaluation des aspects relatifs à l'efficacité antimicrobienne de l'auxiliaire technologique. Les travaux d'expertise ont été discutés le 07 juillet 2020 sur la base d'un rapport initial rédigé par 2 rapporteurs, et la synthèse et les conclusions ont été adoptées le 18 septembre 2020.

L'Anses analyse les liens d'intérêts déclarés par les experts avant leur nomination et tout au long des travaux, afin d'éviter les risques de conflits d'intérêts au regard des points traités dans le cadre de l'expertise. Dans ce contexte, un expert du CES BIORISK et un expert du GT ESPA n'ont pas pris part aux travaux et délibérations sur cette saisine.

Les déclarations d'intérêts des experts sont rendues publiques *via* le site internet de l'Anses ([www.anses.fr](http://www.anses.fr)).

<sup>3</sup> Expert group for technical advice on organic production, EGTOP. Feed III/Food V Report. European commission. Directorate-General for Agriculture and Rural Development. Directorate B. Quality, Research and Innovation, Outreach. B4, Organic. EGTOP/2018.

<sup>4</sup> Règlement (UE) n° 2019-2164 du 17 décembre 2019 modifiant le règlement (CE) n° 889/2008 portant modalités du règlement (CE) n° 834/2007 du Conseil relatif à la production biologique et à l'étiquetage des produits biologiques en ce qui concerne la production biologique, l'étiquetage et les contrôles.

### 3. ANALYSE ET CONCLUSIONS DU GT ESPA ET DU CES BIORISK

#### 3.1. Concernant les aspects chimiques et technologiques

L'auxiliaire technologique est une formulation commerciale composée de colophane (ou acides résiniques), d'acides gras et huiles végétales et de sels de potassium et d'eau<sup>5</sup>. La colophane dans l'auxiliaire technologique est constituée en majorité de 7 acides résiniques représentant environ 96% de sa composition, les 4% restant ayant été identifiés dans le dossier de demande comme d'autres acides résiniques. Le composant minoritaire parmi les 7 acides résiniques est l'acide sandaracopimarique (1,4%), alors que le composant majoritaire est l'acide abiétique (36%).

Selon le dossier de demande, l'auxiliaire technologique est constitué d'un certain pourcentage de colophane au maximum<sup>5</sup>, par conséquent, la préparation commerciale de l'auxiliaire technologique contiendrait 0,02% d'acide sandaracopimarique et 0,54% d'acide abiétique, entre autres. La composition détaillée de l'auxiliaire technologique a été définie dans le dossier de demande mais n'est pas publiée dans cet avis pour des raisons de confidentialité.

Le dossier de demande indique que l'auxiliaire technologique est stable dans les conditions normales d'utilisation. Par ailleurs, le dossier mentionne que les acides résiniques ne présentent pas de réactivité chimique particulière et qu'aucune interaction avec la matrice alimentaire n'est attendue au vu des conditions d'emploi prévues : 45 – 60°C, pH 4,5 – 6,5.

Le GT ESPA note que la colophane est insoluble dans l'eau et que cela expliquerait la présence d'acides gras et huiles végétales (N° CAS 61788-65-6) dans la composition de l'auxiliaire technologique, ces derniers ayant une fonction d'émulsifiant.

Le CES BIORISK note par ailleurs que le pétitionnaire précise que l'acide myristique, contenu dans la préparation commerciale de l'auxiliaire technologique, présenterait une efficacité bactériostatique aux températures du procédé de diffusion du jus sucré (sans information supplémentaire fournie).

Le dossier de demande définit la dose d'emploi de l'auxiliaire technologique à 25 mg de colophane/kg de cossettes, appliquée en dose choc par plage horaire moyenne<sup>5</sup>. Cette dose représente la valeur maximale cumulée d'auxiliaire technologique par kg de cossettes pendant tout le procédé de fabrication de sucre. La dose de 25 mg de colophane (principe actif de la solution commerciale de l'auxiliaire technologique) par kg de cossettes correspond à une dose d'auxiliaire technologique de 167 mg/kg de cossettes, prenant en compte la composition maximale en colophane rapportée dans la préparation commerciale.

L'auxiliaire technologique sera utilisé très en amont dans le procédé, au niveau de l'opération unitaire (OU) de diffusion. Selon le dossier de demande, une partie de la colophane devrait donc être séparée et éliminée dans les pulpes de betteraves destinées à l'alimentation animale, alors que la partie restante de la colophane resterait en suspension dans les jus sucrés. Les OU de l'épuration et de cristallisation permettraient ensuite de retrouver l'auxiliaire technologique seulement à l'état de traces dans le sucre final.

Le GT ESPA conclut que, du point de vue technologique, les informations fournies dans le dossier de demande permettent d'estimer que l'utilisation de la colophane pour le traitement du jus sucré issu de la betterave lors de l'OU de diffusion est justifiée.

Cependant, l'absence de données aussi bien au niveau pilote qu'industriel doit conduire le pétitionnaire à mettre en place une démarche scientifique et technique permettant de définir précisément les conditions de la mise en œuvre de l'auxiliaire technologique (ex. ajouts précis par doses chocs cadencées), de conduire

<sup>5</sup> la composition/description exacte a été fournie dans le dossier de demande, or, elle a été considérée par le pétitionnaire comme étant couverte par le secret des affaires et n'est pas publiée dans cet extrait de l'avis.

les analyses de contrôle permettant de quantifier des quantités résiduelles maximales d'auxiliaire technologique dans le sucre cristallisé et de confirmer le degré de pureté et la nature et quantité des impuretés présentes dans la formulation commerciale employée. Cette collecte de données devra être conduite pour que les données acquises puissent être traitées statistiquement.

### **3.2. Concernant les aspects toxicologiques**

La colophane est la gomme restante de la résine de pin après distillation. Comme mentionné précédemment, la colophane utilisée comme auxiliaire technologique est constituée de 7 acides résiniques qui représentent 96% (m/m) de l'auxiliaire technologique, les 4% restant étant décrits comme autres acides résiniques.

La littérature consultée par le GT ESPA suggère, en résumé, que les acides résiniques sont peu absorbés et sont excrétés dans la bile et les fèces (Hercules Powder Company, 1965). Les données de toxicité examinées par le GT ESPA proviennent du dossier d'enregistrement REACH, disponibles sur le site de l'ECHA<sup>6</sup> (Annexe 1). Dans ce dossier, les données de toxicité aiguë pour un mélange d'acides résiniques montrent une DL<sub>50</sub> de 2000 mg/kg poids corporel/jour. Le site de l'ECHA rapporte aussi une étude de toxicité subchronique (90 jours) chez le rat Wistar (10/sexe/dose), réalisée en 2017 selon la ligne directrice OCDE 408 avec des acides résiniques qui correspondraient à ceux de la présente demande (N° CAS 8050-09-7). Le GT ESPA a identifié une dose sans effet indésirable observé (DSEIO) de 2500 mg acides résiniques/kg nourriture/jour. Cette DSEIO correspondrait à 174,1 mg colophane/kg poids corporel (p.c.)/jour pour les rats mâles et à 194,1 mg/kg p.c./jour pour les rats femelles de cette étude. Cette DSEIO a été établie sur des effets observés sur le gain de poids corporel et des changements microscopiques dans la glande surrénale des rats exposés à 5000 et 7500 mg acides résiniques par kg de nourriture/jour. Aucun autre effet en relation avec l'exposition aux acides résiniques n'a été rapporté à des doses inférieures dans cette étude.

Aucune étude de toxicité chronique ou de cancérogenèse n'est disponible sur la colophane. Cependant, le GT ESPA observe que la colophane n'a pas été évaluée comme agent cancérogène par le Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC) ni n'apparaît listée comme cancérogène dans la législation européenne des substances CLP<sup>7</sup>.

Une étude de toxicité sur la reproduction et le développement réalisée en 2015 selon la ligne directrice OCDE 422 chez le rat RccHan (12/sexe/dose), résumée sur le site de l'ECHA, identifie une DSEIO de 450 mg/kg p.c./jour pour la toxicité générale et de 900 mg/kg p.c./jour pour la toxicité sur la reproduction et le développement<sup>5</sup>.

En conclusion sur le fondement de données consultées sur la toxicité chronique et subchronique, le GT ESPA estime que la DSEIO de 174,1 mg colophane/kg p.c./jour identifiée dans l'étude subchronique chez le rat et résumée sur le site de l'ECHA peut être retenue pour l'évaluation de risque liée à l'exposition des consommateurs aux résidus de colophane susceptibles d'être présents dans le sucre.

Pour l'évaluation de la génotoxicité potentielle, le GT ESPA a entrepris une recherche exhaustive des bases de données, des articles et des rapports scientifiques disponibles sur la colophane de bois, sur l'additif alimentaire autorisé E 445 esters glycériques de la colophane (GEWR), sur les acides résiniques libres et sur les sels de la colophane.

#### **Pour la colophane de bois :**

<sup>6</sup> <https://echa.europa.eu/fr/registration-dossier/-/registered-dossier/15505/777/1>

<sup>7</sup> Règlement (CE) N° 1272/2008 du Parlement européen et du Conseil du 16 décembre 2008 relatif à la classification, à l'étiquetage et à l'emballage des substances et des mélanges, modifiant et abrogeant les directives 67/548/CEE et 1999/45/CE et modifiant le règlement (CE) n° 1907/2006. JO UE L 35 3/1. 31.12.2008

Le potentiel génotoxique et mutagène *in vitro* de la colophane (CAS N° 8050-09-7) a été évalué dans le cadre du dossier d'enregistrement REACH de la substance. Les résumés de ces études, fiables sans restriction et notées 1 dans la cotation de Klimisch (Klimisch et al. 1997), sont disponibles sur le site de l'ECHA<sup>5</sup>.

Ainsi, la colophane, étudiée dans une batterie de tests réalisés conformément à l'avis de l'EFSA de 2011 relatif à la stratégie des études de génotoxicité dans l'évaluation de la sécurité en alimentation humaine et animale (EFSA, 2011), conformément aux lignes directrices de l'OCDE et selon les principes des Bonnes Pratiques de Laboratoire (BPL), ne présente :

- pas de potentiel mutagène *in vitro* sur bactéries *Salmonella* Typhimurium,
- pas de potentiel mutagène *in vitro* sur cellules de mammifères (test MLA/TK sur cellules L5178Y),
- pas de potentiel génotoxique (clastogène ou aneugène) *in vitro* sur cellules de mammifères (test d'aberrations chromosomiques *in vitro* sur lymphocytes humains).

Le GT ESPA observe que le test d'aberrations chromosomiques *in vitro* réalisé ici avec la colophane peut remplacer, dans le cadre de l'avis de l'EFSA (EFSA, 2011), le test du micronoyau car il met aussi en évidence les aberrations chromosomiques structurales et numériques.

#### **Pour le GEWR (E445) :**

Le GEWR, utilisé comme additif alimentaire, a fait récemment l'objet d'une ré-évaluation par l'EFSA (EFSA, 2018).

De nombreuses études de génotoxicité/mutagenicité ont été réalisées *in vitro* et *in vivo*. La plupart d'entre elles sont anciennes et d'une fiabilité limitée, et il est donc difficile de prendre en compte ces résultats dans un cadre réglementaire. Néanmoins, les études *in vitro* réalisées conformément à l'avis de l'EFSA concernant la stratégie des études de génotoxicité dans l'évaluation de la sécurité en alimentation humaine et animale (EFSA, 2011), conformément aux lignes directrices de l'OCDE (ou dans des conditions expérimentales similaires) et dans le respect des BPL, montrent que le GEWR n'induit :

- pas d'effet mutagène sur bactéries *Salmonella* Typhimurium,
- pas d'effet génotoxique (clastogène ou aneugène) *in vitro* sur cellules de mammifères (test du micronoyau sur lymphocytes humains et test d'aberrations chromosomiques sur cellules CHO).

Les résultats des études d'aberrations chromosomiques *in vivo* sont équivoques et/ou d'une fiabilité limitée. Dans l'avis sur le GEWR, l'EFSA a également conclu à une absence de génotoxicité (EFSA, 2018).

#### **Pour les acides résiniques libres :**

Les études disponibles à ce jour sont, pour la quasi-totalité d'entre elles, anciennes, d'une fiabilité moyenne et/ou réalisées avec des systèmes d'essai peu sensibles et aujourd'hui considérés comme obsolètes (test Rec, test de mutations géniques sur levures). Les résultats sont donc considérés comme étant d'une pertinence limitée.

La seule étude réalisée dans des conditions expérimentales similaires à celles de la ligne directrice 471 de l'OCDE et dont le résultat peut être considéré comme fiable concerne le test de mutations géniques sur bactéries *Salmonella* Typhimurium effectué avec l'acide abiétique (Seifried et al. 2006). Dans cette étude, l'acide abiétique ne présente pas de potentiel mutagène. Les résultats de ces tests ne mettent pas en évidence de potentiel mutagène pour les autres acides résiniques.

### Pour les sels de la colophane :

Des études de mutations géniques sur bactéries ont été réalisées avec plusieurs sels de la colophane et ont été déposées à l'ECHA dans le cadre du dossier d'enregistrement REACH de la substance<sup>5</sup>. Ces études, considérées comme fiables sans restriction dans la cotation de Klimisch, ont été réalisées sur le plan expérimental et méthodologique conformément à la ligne directrice 471 de l'OCDE et selon les principes des BPL.

Les résultats ne montrent pas de potentiel mutagène sur bactéries avec ou sans activation métabolique des sels de calcium, de manganèse, d'aluminium, de magnésium et de calcium-zinc de la colophane non modifiée, et des sels de potassium et de calcium de la colophane hydrogénée.

En conclusion, sur la totalité des études expertisées et considérées comme fiables, aucun potentiel génotoxique/mutagène de la colophane et de ses dérivées n'a été démontré.

### 3.3. Calculs d'exposition à l'auxiliaire technologique

Le dossier de demande ne présente pas de résultats de recherche de résidus dans le sucre par des méthodes analytiques. Le dossier de demande propose une estimation de l'exposition aux acides résiniques, sous l'hypothèse d'une quantité de résidus à hauteur de 0,1 mg/kg de sucre identifiée à partir d'une publication technique (Hein et al. 2006). Néanmoins, le GT ESPA estime que le choix de cette valeur résiduelle n'est pas justifié et ne peut pas être généralisé à toutes les conditions de production de sucre, y incluses celles concernées par cette demande. En conséquence, en l'absence de données analytiques, il convient d'utiliser la dose maximale d'emploi définie par le pétitionnaire (25 mg de colophane) comme dose résiduelle par kg de sucre, comme préconisé par l'Anses (ANSES, 2018).

Le sucre peut être ajouté en tant qu'ingrédient dans de nombreuses denrées manufacturées et, de ce fait, les catégories alimentaires qui seraient concernées par l'ajout du sucre ne peuvent pas toutes être identifiées avec certitude. Afin de palier ce manque de données, l'arbre de décision proposé dans les lignes directrices élaborées par l'Anses pour la constitution d'un dossier de demande d'autorisation d'auxiliaires technologiques permet de s'affranchir du choix des catégories alimentaires par l'application de la méthode du budget (AJMT1) (ANSES, 2018).

Des estimations de l'exposition ont donc été réalisées par le GT ESPA en appliquant l'outil de calcul pour la méthode AJMT1. Dans ces conditions et sur le fondement d'un taux résiduel de 25 mg de colophane par kg de sucre, les expositions obtenues correspondraient chez les adultes à environ 0,8 mg de colophane/kg p.c./jour et chez les enfants à 2,7 mg de colophane/kg p.c./jour.

D'autres estimations des expositions ont également été faites par le GT ESPA sur la base de données de consommation disponibles en ligne sur le site de l'Autorité européenne de sécurité des aliments (Efsa), base FAIM<sup>8</sup>, et prenant en compte les catégories alimentaires suivantes : 05.2.1 *Other confectionery with added sugar*, 05.2.2 *Other confectionery without added sugar*, 05.3.1 *Chewing gum with added sugar*, 11.1 *Sugars and syrups as defined by Directive 2001/110/EC*, 11.2 *Others sugars and syrups*, 14.1.4.1 *Flavoured drinks with sugar*.

<sup>8</sup> <https://www.efsa.europa.eu/fr/food-consumption/comprehensive-database>

En utilisant la base de données FAIM, les expositions au 95<sup>ème</sup> centile des consommateurs, minimales et maximales, seraient respectivement d'environ 0,04 et 0,4 mg d'acides résiniques/kg p.c./jour (petits enfants), 0,14 et 0,9 mg d'acides résiniques/kg p.c./jour (autres enfants), 0,2 et 0,6 mg d'acides résiniques/kg p.c./jour (adolescents), 0,07 et 0,4 mg d'acides résiniques/kg p.c./jour (adultes) et 0,02 et 0,12 mg d'acides résiniques/kg p.c./jour (personnes âgées).

### **3.3.1. Exposition par rapport à la DSEIO**

Les marges de sécurité (MOS) qui peuvent être calculées en appliquant la méthode du budget (AJMT1) seraient d'environ 222 pour les adultes et d'environ 67 pour les enfants, par rapport à la DSEIO de 174,1 mg acides résiniques/kg p.c./jour retenue par le GT ESPA.

Les MOS restent acceptables lorsque les expositions à la colophane sont calculées à partir des certaines catégories alimentaires de la base de données FAIM, ces MOS iraient d'environ 1 200 à 8 700. Toutefois, le GT ESPA rappelle que ces expositions sont probablement sous-estimées compte tenu que les emplois de sucre en tant qu'ingrédient dans des nombreuses denrées ne sont pas répertoriés dans les catégories d'aliments mentionnées plus haut.

## **3.4. Concernant les aspects microbiologiques**

Le rôle technologique revendiqué pour l'utilisation de la solution aqueuse de colophane dans le procédé d'obtention de sucre, à l'étape de diffusion, est d'améliorer la qualité microbiologique du jus sucré, c'est-à-dire un contrôle de la croissance microbienne. Selon le pétitionnaire, la colophane viendrait ainsi s'ajouter aux autres auxiliaires technologiques autorisés tels que les extraits de houblon, cherchant à réduire la résilience des micro-organismes tout en élargissant le spectre d'action antimicrobien de ces auxiliaires. L'activité biologique de la colophane est multiple (antifongique, antibactérienne, antivirale) du fait de la complexité de sa composition tout comme des différents modes d'extraction ou d'utilisation des extraits (Savluchinske-Feio et al. 2006).

Il est important de noter qu'à aucun moment dans sa demande, le pétitionnaire ne revendique un quelconque effet d'amélioration de la sécurité microbiologique du produit final (le sucre). D'après le pétitionnaire, le développement microbien, s'il n'est pas maîtrisé, aboutit à une consommation de sucres (et donc à une perte de production), à la formation de sucre inverti qui réduit le rendement d'extraction, ainsi que la production de dextrans qui dégradent le fonctionnement des équipements en colmatant les filtres. Ainsi, l'objectif du pétitionnaire est de maintenir la quantité en microorganismes à des niveaux n'affectant pas son rendement de production, seuils qu'il évalue traditionnellement de manière indirecte à travers les indicateurs suivants : le pH et les concentrations en acide lactique, en acide acétique et en mannitol dans les jus de diffusion. Le CES BIORISK regrette que le lien entre ces indicateurs et l'activité des microorganismes cibles dans les jus de diffusion n'ait pas été explicité. L'objectif quantitatif (valeurs seuils ou cibles) de ces indicateurs dans les jus de diffusion n'est pas indiqué.

### **3.4.1. Caractéristiques microbiologiques des produits en sucrerie**

Le dossier ne mentionne aucun résultat d'analyses dédiées à la recherche, au dénombrement et/ou à l'identification de microorganismes présents dans les jus de diffusion. En revanche, l'objectif étant de « *maîtriser l'état sanitaire du jus sucré, lors de l'étape de diffusion* », le pétitionnaire identifie d'après la littérature les principaux genres bactériens thermophiles en milieu sucrier, comme par exemple les genres *Clostridium*, *Bacillus* et *Geobacillus*. Cette liste, non exhaustive, paraît pertinente par rapport à la matière traitée (jus de diffusion extraits de betteraves traités à des températures entre 60 à 75°C et des pH entre 4,5 à 6,5). Le pétitionnaire n'identifie ni moisissures, ni levures qui pourraient proliférer dans les jus de diffusion.

D'après la littérature, les betteraves, les cossettes et les jus de diffusion sont les matrices les plus contaminées lors de l'extraction du sucre de betterave. Dans les jus de diffusion, les microorganismes aérobies mésophiles sont à des concentrations entre 4,8 et 8,7 log CFU/g ; les bactéries lactiques entre 3,9 et 7,8 log CFU/g ; les bactéries formant des exo-polymères entre 5,4 et 7,6 log CFU/g. Des microorganismes thermophiles, aérobies ou anaérobies, des moisissures ainsi que des levures peuvent être également retrouvés, à des niveaux moyens d'environ 4 log CFU/g (Robles-Gancedo et al. 2009).

### 3.4.2. Examen des données sur l'efficacité antimicrobienne

Les données relatives à l'efficacité antimicrobienne sont issues uniquement de la littérature<sup>9</sup>. L'analyse bibliographique sur l'efficacité antimicrobienne est résumée en une page, une seule figure y est présentée. Le pétitionnaire s'appuie sur des retours d'expérience d'industriels autrichiens (Hein et al. 2006), sans fournir ni les publications, ni les données associées détaillées. De plus, les références bibliographiques citées sont insuffisamment analysées. Par exemple, des propriétés antivirales ou antifongiques des acides résiniques sont présentées, ainsi que des liens entre motifs biochimiques des différents acides résiniques et propriétés antimicrobiennes sur de nombreux microorganismes, telles que les bactéries pathogènes *Staphylococcus aureus* ou *Bacillus cereus*. Cependant, le pétitionnaire ne précise pas si de telles propriétés sont désirées, ou même pertinentes, au regard des bactéries listées comme étant ciblées dans les jus de diffusion.

En l'absence d'analyse de la littérature par le pétitionnaire, les rapporteurs ont effectué l'analyse bibliographique des publications citées et l'ont complétée de manière non exhaustive. Ils ont également pris en compte le rapport de l'Anses, disponible en consultation publique en juin 2020, relatif à l'étude des alternatives potentielles au formaldéhyde en alimentation humaine dans le secteur sucrier (Anses, 2020, saisine n°2014-SA-0236). Cette analyse est présentée dans les paragraphes ci-après :

- Concernant les propriétés antimicrobiennes de la colophane, la présence des fonctions hydroxyle, aldéhyde et cétoniques dans les molécules d'acides résiniques est essentielle pour leurs activités antimicrobiennes (Savluchinske-Feio et al. 2007). Les mécanismes d'action ne sont pas bien connus : par analogie entre les structures des acides résiniques et celles des extraits de houblon, la réduction du potentiel membranaire qui entraîne une réduction des capacités métaboliques pourrait être une explication de l'inhibition des microorganismes (Kohout et al. 2020).
- En condition de laboratoire, ces acides empêchent la croissance de *Geobacillus stearothermophilus*. Des concentrations minimales inhibitrices (CMI) comprises entre 6 et 12 mg/kg selon l'acide résinique ont été mesurées pour *G. stearothermophilus* (Pollach et al. 2002). Les acides résiniques ou le mélange d'acides résiniques et myristique ont des CMI entre 20 et 35 mg/kg sur des bactéries à Gram positif (lactobacilles, lactocoques, entérocoques, pédiocoques, *Listeria*, *Bacillus*), et une CMI entre 10 et 15 mg/kg contre les *Clostridia* (Emerstorfer et al. 2009). Les acides résiniques inhibent la croissance des *Clostridia* dans des ensilages de pulpes de betteraves (Emerstorfer et al. 2011). Les acides résiniques inhibent la croissance de bactéries lactiques mésophiles responsables de production d'exo-polysaccharides (*Leuconostoc mesenteroides* et *L. dextranicum*), à des concentrations de 10 à 15 mg/L d'acides résiniques appliquées pendant 24 h ou 20 à 40 mg/L pendant 72h ; l'acide myristique à une concentration de 100 à 200 mg/L pendant 24 h, et jusqu'à 300 mg/L pour une durée de 72 h (Heinet al. 2006). *Clostridium perfringens* est inhibé avec des concentrations en acides résiniques dès 0,01% (environ 10 mg/l), *Staphylococcus aureus* dès 0,1% (100 mg/l) alors qu'*Escherichia coli* O149 n'est pas inhibé jusqu'à la concentration de 0,5% testée (500 mg/l) (Roy et al. 2018). L'acide déhydroabiétique, un acide résinique, a montré des effets bactériostatiques et bactéricides contre *Staphylococcus* et *Enterococcus* avec une CMI et une concentration bactéricide minimale (CBM) respectivement de 6,25–50 µg/mL et 6,25–100 µg/mL.

<sup>9</sup> 12 références bibliographiques sont listées, d'autres sources apparaissent dans le texte ou tableaux mais ne sont pas référencées.

Cet acide a aussi un effet inhibiteur sur les *Aspergillus* avec une CMI de 39,7 µg/mL mais aucune activité contre *Candida* (Neto et al. 2015).

- A l'échelle industrielle, les acides résiniques ajoutés à raison de 12 à 20 mg/kg diminuent la production d'acide lactique, empêchent la chute du pH et le stabilisent au cours du temps (Pollach et al. 2002). L'addition sous forme d'injection choc à raison de 20 mg/kg d'acides résiniques toutes les 4 h sur une durée de trois jours inhibe des bactéries lactiques (réduction logarithmique) mais pas des bactéries sporulées, et diminue la concentration en acides lactique, acétique et butyrique (Kohout et al. 2020). Dans les usines de sucrerie en Autriche, les concentrations des acides myristique et résiniques utilisées sont comprises entre 10 à 15 g/tonne, appliquées par chocs successifs avec un intervalle de 3 à 5 h, dépendant du pH (Hein et al. 2006).

Dans sa demande, le pétitionnaire propose l'utilisation d'une dose maximale de 25 mg de colophane par kg de cossettes, qui serait appliquée en dose choc par plage horaire moyenne de 6 h, afin de garantir une efficacité antimicrobienne. Cette revendication se base uniquement sur les données bibliographiques et des conditions d'utilisation en industries sucrières autrichiennes. L'analyse de la littérature faite par les rapporteurs montre que les acides résiniques pourraient présenter des efficacités antimicrobiennes sur différents microorganismes, notamment à la dose revendiquée (< 25 mg/kg). Les doses d'emploi proposées par le pétitionnaire sont similaires à celles identifiées dans le rapport de l'Anses (saisine 2014-SA-0236), à savoir de 15 à 25 mg de colophane par kg de cossettes, analyse basée uniquement sur des données de la littérature.

Cependant, le dossier du pétitionnaire ne présente pas suffisamment de données relatives aux cibles microbiennes ni leur réduction souhaitée, ni sur les conditions réelles d'application ou même une comparaison d'efficacité par rapport à un autre auxiliaire technologique déjà autorisé. Les données présentées par le pétitionnaire ne permettent pas de démontrer l'efficacité de l'utilisation de la solution aqueuse de colophane pour le maintien des indicateurs de pH, de concentration en acide lactique, en acide acétique et en mannitol dans les jus de diffusion à des valeurs seuils correspondantes à des quantités en microorganismes qui n'affecteraient pas son rendement de production.

En l'absence 1) d'informations détaillées sur les cibles microbiennes et les conditions d'utilisation ; 2) de résultats d'essais permettant de relier les valeurs des indicateurs choisis par le pétitionnaire (pH, concentrations en acide lactique, en acide acétique et en mannitol) à une concentration de la population microbienne cible ; et 3) de données témoins permettant une comparaison (c'est-à-dire les valeurs initiales des indicateurs choisis ainsi que la population microbienne avant ajout de la solution de colophane, ou des données avec l'utilisation d'un autre auxiliaire autorisé dans la filière), le dossier ne permet pas de démontrer une efficacité de la solution aqueuse de colophane sur les populations microbiennes présentes dans les jus de diffusion.

### **3.5. Conclusions du GT ESPA et du CES BIORISK**

Le GT ESPA estime que du point de vue toxicologique, les expositions potentielles obtenues en appliquant la méthode du budget (AJMT1) et en considérant un taux résiduel de 25 mg colophane/kg de sucre sont suffisamment faibles pour écarter un risque sanitaire associé à l'emploi de colophane, comme agent de décontamination des produits d'origine végétale, en sucrerie.

En effet, la méthode dite du « budget » (Hansen, 1979)<sup>10</sup> est maximaliste dans la mesure où elle conduit à considérer qu'une part maximale de l'alimentation contient des auxiliaires technologiques au niveau maximum utilisé. Dans le cas présent, le niveau maximum utilisé a été considéré être égal à la dose d'emploi

---

<sup>10</sup> Hansen S., 1979. Conditions of use of food additives based on a budget for an acceptable daily intake. Journal of Food Protection, 42(5), 429-434.

initiale, sans prendre en compte des éventuelles pertes au cours du procédé de fabrication du sucre. De même, dans cette méthode, la consommation est fixée sur la base des besoins énergétiques et des limites physiologiques d'ingestion journalière d'aliments et de boissons pour un individu en fonction de son poids. Enfin, il est fait l'hypothèse qu'une large proportion de la diète totale contient des auxiliaires technologiques (25% dans l'alimentation des adultes ; 25% pour les aliments solides et 100% pour les boissons chez les enfants)<sup>11</sup>.

Le CES BIORISK ne peut pas se prononcer sur la pertinence des indicateurs choisis pour évaluer l'évolution de la population microbienne dans les jus de diffusion. Le CES BIORISK ne peut pas conclure sur l'efficacité antimicrobienne de la colophane dans le procédé sucrier du fait de l'absence des éléments suivants : cibles microbiennes de la substance, conditions d'applications réelles envisagées (possible alternance avec un auxiliaire technologique autorisé), essais avec dénombrements microbiens, pertinence et suivi des indicateurs choisis par le pétitionnaire, analyse statistique robuste et données témoins (par exemple comparaison avec un autre auxiliaire technologique autorisé) dans les jus de diffusion.

Le pétitionnaire propose, en conclusion de son dossier de demande « *afin d'ajuster les conditions d'emploi et valider les teneurs résiduelles dans le sucre (mi-)blanc, et sous réserve d'un avis positif des autorités sur cet usage, des analyses seront conduites au cours de la campagne 2020. Cette campagne permettra en effet l'industrialisation du procédé sous forme de tests industriels d'une semaine. Les résultats issus de ces analyses pourront être transmis aux autorités de tutelle en charge des auxiliaires technologiques : doses de colophane réellement employées, fréquence d'injection des doses choc, teneurs résiduelles dans le sucre blanc* ». Le CES BIORISK recommande également l'acquisition de données microbiologiques au cours d'un essai industriel. L'ensemble de ces données, telles que détaillées ci-dessus, devraient être utilisées afin de s'assurer de l'efficacité antimicrobienne de cet auxiliaire technologique dans les conditions réelles d'utilisation. Sans ces données, le CES BIORISK ne peut donner son avis sur l'efficacité antimicrobienne de la colophane dans le procédé sucrier.

#### **4. CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS DE L'AGENCE**

L'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail adopte les conclusions du GT ESPA et du CES BIORISK.

L'Agence rappelle que le pétitionnaire du dossier de demande propose, au cours d'une prochaine campagne sucrière, d'ajuster les conditions d'emploi industrielles (exemple : doses de colophane réellement employées, fréquence d'injection des doses choc, etc.) et de réaliser des analyses de teneurs résiduelles de l'auxiliaire technologique dans le sucre (mi-)blanc. Cette étape doit également inclure l'acquisition de données microbiologiques telles que détaillées dans cet avis afin de permettre à l'Anses de finaliser son expertise dans les conditions industrielles d'emploi de la colophane comme agent de décontamination en sucrerie.

---

<sup>11</sup> Note AST de l'Anses relative aux règles de constitution des dossiers de demande d'autorisation d'auxiliaires technologiques et l'acceptation des calculs théoriques en lien avec l'évaluation de l'exposition. Anses 5 octobre 2018.

## MOTS CLES

COLOPHANE, ACIDES RESINIQUES, ANTIMICROBIEN, AUXILIAIRE TECHNOLOGIQUE, SUCRE

ROSIN, RESINIC ACIDS, ANTIMICROBIAL, PROCESSING AID, SUGAR

## BIBLIOGRAPHIE

- Afssa. 2005. « Recommandations pour la présentation des données permettant d'évaluer l'efficacité des antimicrobiens appliqués sur et dans les aliments ». (saisine 2003-SA-0363). Maisons-Alfort: Anses.
- ANSES, 2018. Note AST de l'Anses relative aux règles de constitution des dossiers de demande d'autorisation d'auxiliaires technologiques et l'acceptation des calculs théoriques en lien avec l'évaluation de l'exposition. 5 octobre 2018.
- Anses. 2020. « Rapport d'expertise collective "Études des alternatives potentielles au formaldéhyde en alimentation humaine dans le secteur sucrier" version pour consultation publique ». Saisine n°2014-SA-0236.
- Emerstorfer, F, Walter Hein, Reinhard Resch, Erich M Poetsch, Ulrike Zitz, et Wolfgang Kneifel. 2011. « Application of plant-based antimicrobials for the growth inhibition of clostridia in pressed beet pulp silage ». *Journal of the Science of Food and Agriculture* 91 (11). Wiley Online Library: 2038–2044.
- EFSA, 2011. « Scientific opinion on genotoxicity testing strategies applicable to food and feed safety assessment. » *EFSA Journal* 2011 ;9(9) :2379.
- EFSA, 2018. « Scientific Opinion. Re-evaluation of glycerol esters of wood rosin (E 445) as a food additive. » *EFSA Journal* 2018;16(7):5370
- Emerstorfer, F, W Kneifel, et W Hein. 2009. « The role of plant-based antimicrobials in food and feed production with special regard to silage fermentation ». *Die Bodenkultur* 55 (60): 3.
- Hein, Walter, Guenter Pollach, et Florian Emerstorfer. 2006. « 10 years' experience with natural antibacterials within Agrana ». *Zuckerindustrie* 131 (7). Verlag Dr Albert Bartens Luckhoffstrasse 16, D-14129 Berlin 38, Germany: 477–491.
- Hercules Powder Company, 1965. « The absorption, fate and excretion of dehydroabietic acid, isopimaric acid and tetrahydroabietic acid in rats. Hercules Powder Company. » University of Miami, School of Medicine, Department of Pharmacology, Coral Gables, Florida, Mar. 1, 1961 - Jul. 31, 1965. Submitted by Cantox on behalf of Pinova and Mars Chocolate UK in October 2010. (document n°16 reçu par l'EFSA dans le cadre de la re-évaluation du GEWR)
- Klimisch H, Andreae M et Tillmann U. 1997. « A Systematic Approach for Evaluating the Quality of Experimental Toxicological and Ecotoxicological Data. » *Regulatory Toxicology and Pharmacology* Vol 25 (1)
- Kohout, Cordula K, Christina Ukowitz, Dominik Reiter, Ulrike Zitz, Karl Moder, Florian Emerstorfer, Walter Hein, Wolfgang Kneifel, et Konrad J Domig. 2020. « Bacterial growth dynamics and corresponding metabolite levels in the extraction area of an Austrian sugar beet factory using antimicrobial treatment ». *Journal of the Science of Food and Agriculture* 100 (6). Wiley Online Library: 2713–2721.
- Kugler, Szymon, Paula Ossowicz, Kornelia Malarczyk-Matusiak, et Ewa Wierzbicka. 2019. « Advances in Rosin-Based chemicals: The latest recipes, applications and future trends ». *Molecules* 24 (9). Multidisciplinary Digital Publishing Institute: 1651.
- Neto, I, C Faustino, et P Rijo. 2015. « Antimicrobial abietane diterpenoids against resistant bacteria and biofilms ». *The battle against microbial pathogens: basic science, technological advances and educational programs, Microbiology book series. Formatex Research Center, Badajoz.*
- Pollach, Günter, Walter Hein, et David Beddie. 2002. « Application of hop beta-acids and rosin acids in the sugar industry ». *ZUCKERINDUSTRIE-BERLIN-* 127 (12): 921–930.
- Robles-Gancedo, S., T. M. López-Díaz, et A. Otero. 2009. « Microbiological Counts during Beet Sugar Extraction ». *Journal of Food Protection* 72 (6): 1332-37. doi:10.4315/0362-028X-72.6.1332.
- Roy, Krisna, Ulrike Lyhs, Juhani Vuorenmaa, et Karl Pedersen. 2018. « In vitro inhibition studies of natural resin acids to *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* O149 ». *Journal of Applied Animal Nutrition* 6. Cambridge University Press.
- Savluchinske-Feio, Sonia, Maria João Marcelo Curto, Bárbara Gigante, et J Carlos Roseiro. 2006. « Antimicrobial activity of resin acid derivatives ». *Applied microbiology and Biotechnology* 72 (3). Springer: 430–436.
- Savluchinske-Feio, Sonia, Lina Nunes, Pablo Tavares Pereira, Ana M Silva, José C Roseiro, Bárbara Gigante, et Maria João Marcelo Curto. 2007. « Activity of dehydroabietic acid derivatives against wood contaminant fungi ». *Journal of microbiological methods* 70 (3). Elsevier: 465–470.

Seifried HE, Seifried RM, Clarke JJ, Junghans TB et San RH, 2006. « A compilation of two decades of mutagenicity test results with the Ames *Salmonella typhimurium* and L5178Y mouse lymphoma cell mutation assays. » *Chemical Research in Toxicology*, 19, 627-644.

## Annexe1.

Résumé des données sélectionnées par le GT ESPA concernant la colophane, à partir des informations disponibles sur le site de l'ECHA\*.

	DL <sub>50</sub>	Toxicité sub-chronique (90 jours)	Toxicité sur la reproduction et le développement
Espèce / sexe (♂♀) / numéro d'animaux par dose/ souche	Rat / ♀ / 2x3 / Sprague-Dawley	Rat / ♂♀ / 10 / RccHan	Rat / ♂♀ / 12 / RccHan
Exposition orale (diète/gavage)	gavage	orale	orale
Doses testées	2000 mg/kg p.c.	0, 2500, 5000, 7500 mg/kg nourriture	0, 2500, 5000, 10000 mg/kg nourriture
Dose critique (NOAEL)	>2 000 mg/kg p.c.	2500 (174,1mg/kg p.c./jour♂ ; 196,4 mg/kg p.c./jour♀)	5000 toxicité générale (450 mg/kg p.c./jour#); 10000 toxicité sur le reproduction et le développement (900 mg/kg p.c./jour)
Effets observés et effet critique	Aucune mortalité n'a été observée. Aucun signe clinique lié à l'administration de la substance d'essai n'a été observé. Le gain de poids corporel était plus faible 48 heures après l'administration dans le groupe traité (10 g versus 25 g dans le groupe témoin historique). Par la suite, le gain de poids corporel était normal. L'examen macroscopique n'a révélé aucun changement lié au traitement.	Aucune mortalité n'a été observée. Aucun signe clinique lié à l'administration de la substance d'essai n'a été observé. Dans les glandes surrénales, une légère hypertrophie de la zone gloméruleuse était présente chez quatre mâles et quatre femelles nourris avec des régimes contenant 7500 ppm de l'item d'essai, et chez deux mâles et une femelle nourris avec des régimes contenant 5000 ppm. Ces effets ont été considérés comme liés au traitement.  Aucun autre signe n'était présent à l'histopathologie n'a été identifié en rapport avec le traitement.	À l'exception d'une femelle du groupe 4, tous les animaux ont survécu jusqu'à l'autopsie prévue. Aucun signe clinique lié à l'administration de la substance n'a été observé. Chez les mâles, le traitement a entraîné une réduction dose-dépendante du poids corporel et du gain de poids corporel dans les groupes 3 et 4. Chez les femelles, le traitement a entraîné une réduction du poids corporel et du gain de poids corporel dans le groupe 4. Cette réduction était statistiquement significative pendant toute la période de pré-appariement et aux jours 14 et 20 de la période de gestation. Aucun effet sur les paramètres hématologiques ou comportementaux n'a été noté chez les mâles ou les femelles à quelque dose que ce soit. Le seul effet rapporté en pathologie était une hypertrophie / vacuolisation minimale de la zone gloméruleuse dans les glandes surrénales à la dose la plus élevée de 10000 ppm. Le nombre moyen de corps jaunes à la dose la plus élevée était statistiquement significativement plus faible par

			<p>rapport à la valeur témoin. Cela a été considéré comme lié au traitement. La durée de la gestation, le nombre moyen d'implantations par mère et les pertes post-implantations n'ont pas été affectés. L'indice de fertilité (nombre de femelles réalisant une gestation en pourcentage de femelles appariées), le taux de conception (nombre de femelles réalisant une grossesse en pourcentage de femelles accouplées) et l'indice de gestation (nombre de femelles avec des petits vivants en pourcentage de femelles gestantes) étaient de 100 % dans tous les groupes.</p> <p>P0 :</p> <p>Le nombre de petits par mère a été considéré comme n'étant pas affectés par le traitement. Une NOAEL de 5 000 mg/kg nourriture a été identifiée sur le fondement d'une perte de poids et de gain de poids à la dose de 10 000 mg/kg nourriture.</p> <p>F1 :</p> <p>Aucun effet anormal lié au traitement n'a été observé chez les petits lors du premier contrôle de portée ou pendant la lactation dans aucun des groupes. Le nombre total de petits perdus n'a pas été considéré comme étant lié au traitement. La réduction du poids corporel des petits à la dose élevée a été considérée comme liée au traitement. Aucun effet macroscopique n'a été noté lors de l'autopsie des petits dans aucun des groupes. Les « sex ratios » n'ont pas été affectés par le traitement. Aucun effet n'a été observé sur les batteries de tests comportementaux dans les F1.</p> <p>Le NOEL (No Observed Effect Level) a été établi au niveau de concentration de 2500 ppm (225 mg/kg p.c./jour<sup>#</sup>) et le NOAEL (No Observed Adverse Effect Level) a été établi à 5000 ppm (450 mg/kg p.c./jour<sup>#</sup>) pour la toxicité générale. Pour la toxicité sur la reproduction et le développement, le NOEL a été établi à 5000 ppm (450 mg/kg p.c./jour) alors que le NOAEL a été établi au niveau de concentration de 10000 ppm (900 mg/kg p.c./jour), la concentration la plus élevée testée dans l'étude.</p>
Lignes directrices	OECD 423	OECD 408	OECD 422

\* le GT ESPA n'a pas eu accès aux études sources,

# conversion selon les valeurs indiquées par l'Efsa (Guidance on selected default values to be used by the EFSA Scientific Committee, Scientific Panels and Units in the absence of actual measured data. EFSA Journal 2012;10(3):2579).