

Le directeur général

Maisons-Alfort, le 13 avril 2015

AVIS

de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail

relatif à des résultats d'essais industriels pour tester l'efficacité d'une solution de chlorite de sodium en tant qu'auxiliaire technologique pour la fabrication d'alcool de bouche

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 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 rendus publics.

L'Anses a été saisie le 7 octobre 2014 par la Direction Générale de la Concurrence, de la Consommation et de la Répression des Fraudes (DGCCRF) d'une demande d'avis relatif à des résultats d'essais industriels pour tester l'efficacité d'une solution de chlorite de sodium en tant qu'auxiliaire technologique pour la fabrication d'alcool de bouche ».

1. CONTEXTE ET OBJET DE LA SAISINE

La demande concerne l'utilisation en tant qu'auxiliaire technologique d'une solution à base de chlorite de sodium pour la production d'éthanol. La solution est utilisée pour contrôler la croissance des populations bactériennes durant la fermentation sans altérer les populations de levure. L'objectif est d'améliorer les rendements de production d'alcools de bouche (Alcool éthylique obtenu par fermentation et distillation de matières végétales contenant du sucre ou saccharifiées).

Cette demande a fait l'objet d'un premier avis de l'Anses (2012-SA 0014). Le dossier initial comportait des résultats d'essais montrant l'efficacité antimicrobienne de la solution de chlorite de sodium en conditions pilotes. Cette efficacité devait être toutefois confirmée par la réalisation d'essais à l'échelle industrielle. Les résultats de ces essais font l'objet de la présente demande.

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 collective a été réalisée par le Comité d'experts spécialisé (CES) « Evaluation des risques biologiques liés aux aliments » (BIORISK) le 17 mars 2014 sur la base d'un rapport initial rédigé par deux rapporteurs.

En plus du dossier technique, les sources de données exploitées pour établir le rapport initial sont citées à la fin du rapport. Après examen du dossier, des compléments d'information ont été demandés au pétitionnaire et reçus le 15 janvier 2015.

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.

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

3. ANALYSE ET CONCLUSIONS DU CES

3.1.Principe et intérêt du procédé industriel

Le procédé consiste à produire de l'éthanol à partir de la fermentation des moûts par *Saccharomyces cerevisiae*. Après la fermentation, les levures sont centrifugées avant d'être recyclées et le milieu de culture est distillé pour récupérer l'éthanol.

La production d'éthanol s'effectue en discontinu dans des fermenteurs de 150 m³, au nombre de 20. De manière successive, les fermenteurs sont alimentés en continu d'une part par un pré-fermenteur qui amène l'inoculum constitué de levures recyclées (ou fraîches) et de sirop de basse pureté, et par un bac de dilution qui amène le substrat constitué d'un mélange de sirop de haute pureté, d'eau et de vinasses (milieu de culture après fermentation, exempt de levures et d'éthanol). Après fermentation, les fermenteurs sont vidés, les levures centrifugées, acidifiées et recyclées. L'éthanol est obtenu par distillation du milieu de culture exempt de levures, et une partie des vinasses recyclées.

La solution de chlorite de sodium est ajoutée au niveau du pré-fermenteur et/ou au niveau du bac de dilution. Les analyses d'acide lactique, d'acide acétique et microbiologiques sont réalisées respectivement au niveau du pré-fermenteur, et au niveau du bac de dilution et légèrement en aval de ce bac de dilution, au niveau d'un produit appelé moût lourd.

D'après le pétitionnaire, il existe une compétition entre les flores lactiques et acétiques d'une part, et les levures d'autre part. Une augmentation de la concentration en acides lactique et acétique est selon le pétitionnaire un indice de contamination par ces flores indésirables et entraîne le traitement par l'auxiliaire de fabrication aux endroits indiqués. Une vague d'essais est constituée de plusieurs ajouts de produit espacés d'une durée au moins égale à 12h au niveau du pré-fermenteur et/ou du bac de dilution.

Dans le cas où les traitements s'avèrent inefficaces, le pétitionnaire est contraint de nettoyer les installations et dans certains cas de renouveler les levures.

Contrairement aux expériences réalisées en laboratoire en batch, la solution de chlorite de sodium est ajoutée dans le bac de dilution, et dans le pré-fermenteur qui fonctionnent en continu. Pour ce mode de fermentation, la compétition pour le substrat entre les différentes flores microbiennes conduit à la sélection des microorganismes dont le taux de croissance est le plus élevé. La principale cause de l'augmentation de la flore lactique est fort probablement la diminution du taux de croissance des levures recyclées qui accumulent dans leur cytoplasme toute une palette de métabolites secondaires inhibiteurs de la croissance dont l'acide acétique (Dantigny et coll, 1989). C'est pourquoi l'effet du chlorite de sodium ne peut être que temporaire, expliquant que ces ajouts doivent être de plus en plus rapprochés (voir 5^e vague d'essais), et que la seule solution consiste finalement à remplacer les levures recyclées par des levures fraîches.

3.2.Constitution du dossier

Ce dossier recense les résultats de 5 vagues d'essais réalisés entre le 24 mars 2014 et le 11 juin 2014. Les doses de chlorite de sodium utilisées, comprises entre 500 et 1000 ppm, sont conformes aux doses qui font l'objet de la demande d'autorisation. Des analyses d'acide lactique et acétique concernent les 5 essais, mais les analyses microbiologiques n'ont été réalisées que sur le dernier essai. Un complément d'information a été obtenu concernant notamment les données brutes pour la partie analyse microbiologique. Dans le dossier initial soumis en 2012 (2012-SA-0014) des essais en laboratoire ont montré en batch que des concentrations de ce produit comprises entre 100 et 1000 ppm entraînaient plusieurs réductions décimales de bactéries lactiques en quelques heures.

3.3. Examen des données sur l'efficacité antimicrobienne

Pour évaluer l'efficacité antimicrobienne, le pétitionnaire s'appuie dans un premier temps sur des analyses d'acide lactique et acétique, avant et après addition de la solution de chlorite de sodium. L'argumentaire est que la diminution des concentrations en acides est liée à la destruction des bactéries lactiques et acétiques.

L'addition de la solution de chlorite de sodium n'a aucun effet sur la concentration d'acide acétique, ni au niveau du pré-fermenteur, ni du bac de dilution, ni dans le moût lourd. La présence de flore acétique, aérobique stricte, pour ce procédé n'a pas été démontrée. Le pétitionnaire indique que l'acide acétique produit provient plus probablement des levures ce qui est conforme à la littérature qui indique que chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, la production d'éthanol s'accompagne de la production d'acide acétique (Dantigny et coll, 1989).

Les analyses qui comparent les concentrations d'acide lactique avant et après traitement donnent des valeurs de $p=0.062$ pour le pré-fermenteur, $p=0.042$ pour le bac de dilution, et $p=0.090$ pour le moût lourd. Les concentrations d'acide lactique dépendent également de la concentration d'acide lactique dans le pré-fermenteur et le bac de dilution ainsi que du débit des entrants dans ces deux opérations unitaires (débits non précisés).

Enfin, le pétitionnaire indique que l'efficacité antimicrobienne de la solution de chlorite de sodium doit surtout être évaluée à partir de comptages de la charge microbienne avant et après traitement. Les analyses microbiennes sur la flore lactique ont été réalisées lors de la cinquième vague d'essais uniquement. Les tests statistiques menés donnent une valeur de $p=0,120$ sur le pré-fermenteur et $p=0,084$ le bac de dilution. L'étude attentive des données brutes montre que beaucoup de dénombrements utilisés par le pétitionnaire donnaient des valeurs nulles, en fait inférieures au seuil de détection de la méthode qui est de 102 UFC/ml. De plus, il convient de retirer les valeurs aberrantes avant de faire le traitement statistique. Par exemple, pour la figure 21 relative à la réduction de la flore lactique dans le bac de dilution, le retrait d'une valeur aberrante modifie le risque d'erreur qui passe de $p=0,087$ à un $p=0,127$. Ces approximations entraînent des biais dans les tests statistiques. Dans le moût lourd, aucune diminution significative de la flore lactique n'a été montrée.

En se fondant sur des seuils statistiques $p<0,10$, alors que plus couramment la valeur de $p<0,05$ est retenue, seuls les effets de la solution de chlorite de sodium sur les concentrations d'acide lactique sont probants. Ces résultats doivent de plus être relativisés par l'absence de données sur les concentrations en acide lactique, ainsi que les débits qui entrent dans les bacs de dilution et dans le pré-fermenteur. Aucune diminution significative de la flore lactique après traitement n'est observée.

En conclusion du dossier, le pétitionnaire indique que l'intervalle de temps moyen entre deux nettoyages et l'utilisation de levures fraîches augmente de 19 jours sans utilisation du produit, à 30 jours pendant cette campagne d'essais. Ce constat pourrait laisser supposer que l'ajout du produit permettrait de prolonger temporairement l'utilisation de levures recyclées avant ajout de levures fraîches à croissance plus rapide. Il est regrettable que le pétitionnaire n'ait pas réalisé une analyse critique de ces résultats afin d'enrichir son argumentaire au regard de l'utilisation de la solution de chlorite de sodium.

CONCLUSION DU CES BIORISK

Cette demande a fait l'objet d'un premier avis de l'Anses (2012-SA 0014) concluant à l'efficacité de la solution de chlorite de sodium en conditions pilotes. Avant de statuer définitivement sur l'efficacité antimicrobienne du produit, le CES « Microbiologie » souhaitait disposer de résultats d'essais à l'échelle industrielle.

Si les nouvelles données fournies ne permettent pas de conclure à une efficacité antimicrobienne de la solution de chlorite de sodium aux concentrations utilisées sur la flore lactique dans les conditions industrielles, son utilisation permet d'espacer les nettoyages de l'installation et le renouvellement des levures.

4. CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS DE L'AGENCE

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

Marc Mortureux

MOTS-CLES

Auxiliaire technologique ; Chlorite de sodium ; alcool de bouche

BIBLIOGRAPHIE

Dantigny, P., Ninow, J.L., Marc, I., Engasser, J.M., 1989. Representation of changes in the metabolic pattern of baker's yeast from measurements of extracellular pyruvate, acetate, acetaldehyde and ethanol. *Biotechnol. Letters* 11, 515-520.