

Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) en relación a una solicitud de evaluación inicial para la comercialización de la microalga marina *Tetraselmis chuii* en el marco del Reglamento (CE) N° 258/97 sobre nuevos alimentos y nuevos ingredientes alimentarios

Miembros del Comité Científico

Manuel Barat Baviera, María Antonia Ferrús Pérez, Guillermina Font Pérez, Arturo Hardisson de la Torre, Antonio Herrera Marteache, Félix Lorente Toledano, Ascensión Marcos Sánchez, Amelia Martí del Moral, María Rosario Martín de Santos, M^o Rosa Martínez Larrañaga, Antonio Martínez López, Emilio Martínez de Victoria Muñoz, Cristina Nerín de la Puerta, Gaspar Pérez Martínez, Catalina Picó Segura, Rosa María Pintó Solé, Antonio Pla Martínez, José Luis Ríos Cañavate, Jordi Salas Salvadó, Jesús Simal Gándara

Secretario Técnico

Vicente Calderón Pascual

Número de referencia: AESAN-2013-001

Documento aprobado por el Comité Científico en su sesión plenaria de 24 de septiembre de 2013

Grupo de Trabajo

Catalina Picó Segura (Coordinadora)
Guillermina Font Pérez
Félix Lorente Toledano
Antonio Martínez López
Andreu Palou Oliver (Consultor externo)
Daniel Ramón Vidal (Consultor externo)
Concepción Becerril Moral (AESAN)

Resumen

La empresa Fitoplacton Marino S.L. ha solicitado la autorización para la comercialización en la Unión Europea de la microalga *Tetraselmis chuii* como condimento para dar sabor a marisco. Este alimento no cuenta con un historial de uso en cantidades significativas en la Unión Europea con anterioridad a 1997, por lo que entra dentro del ámbito de aplicación del Reglamento (CE) N° 258/97 sobre nuevos alimentos y nuevos ingredientes alimentarios.

El Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) considera que de la información aportada no se deduce que el consumo de la especie de microalga marina *Tetraselmis chuii* como condimento, en las condiciones propuestas por el solicitante, pueda producir efectos negativos para la salud. El Comité Científico concluye que el nuevo alimento presentado a evaluación cumple los criterios de aceptación establecidos por el Reglamento (CE) N° 258/97 sobre nuevos alimentos y nuevos ingredientes alimentarios.

Palabras clave

Microalgas, nuevos alimentos, *Tetraselmis chuii*.

Report of the Scientific Committee of the Spanish Agency for Food Safety and Nutrition (AESAN) on a request for initial assessment for marketing of the marine microalgae *Tetraselmis chuii* under Regulation (EC) No 258/97 on novel foods and novel food ingredients.

Abstract

The company Fitoplancton Marino S.L. requested authorisation to market the microalgae *Tetraselmis chuii* in the European Union as a seafood flavouring agent. This foodstuff has no history of use in any significant quantities in the European Union prior to 1997 and therefore comes within the scope of Regulation (EC) No 258/97 on novel foods and novel food ingredients.

The Scientific Committee of the Spanish Agency for Food Safety and Nutrition (AESAN) takes the view that, according to the information provided, there is no indication that consumption of the species of marine microalgae *Tetraselmis chuii* as a condiment, under the conditions proposed by the applicant, can produce adverse effects on health. The Committee concludes that the novel foodstuff presented for assessment meets the criteria for acceptance laid down by Regulation (EC) No 258/97 on novel foods and novel food ingredients.

Key Words

Microalgae, novel foods, *Tetraselmis chuii*.

1. Introducción

La empresa Fitoplacton Marino S.L. ha solicitado la autorización para la comercialización en la Unión Europea de la microalga *Tetraselmis chuii* como condimento para dar sabor a marisco.

Fitoplancton Marino S.L. desea comercializar en la Unión Europea un liofilizado de *Tetraselmis chuii* para condimentar diferentes platos cocinados, en forma de polvo, incorporado a la sal y como ingrediente de salsas.

De acuerdo con el solicitante, la microalga *Tetraselmis chuii* no cuenta con historial de uso en la Unión Europea con anterioridad a 1997, por lo que entra dentro del ámbito de aplicación del Reglamento (CE) Nº 258/97 de nuevos alimentos y nuevos ingredientes alimentarios. El producto se encuadra en la categoría 2 (d) recogida en el apartado 2 artículo 1 de dicho Reglamento: "alimentos o ingredientes alimentarios consistentes en microorganismos, hongos o algas u obtenidos a partir de estos" (UE, 1997a).

De acuerdo con la Recomendación de la Comisión 97/618/CE, de 29 de julio de 1997, el solicitante declara que el nuevo alimento corresponde a la Clase 2 "Nuevos alimentos complejos obtenidos a partir de fuentes no modificadas genéticamente" subclase 2 "la fuente del nuevo alimento no tiene historia de uso alimentario en la Comunidad". En consecuencia, el informe presentado por el solicitante sigue las directrices especificadas para la categoría 2.2 respondiendo a las secciones I, II, III, IX, XI, XII y XIII recogidas en la tabla II de dicha Recomendación (UE, 1997b).

Algunas microalgas, como *Chlorella* sp., se consumen en Europa como complemento alimenticio, principalmente debido a su contenido en proteínas, aminoácidos esenciales, minerales y elementos traza. El solicitante afirma que existen muchas similitudes entre *Chlorella* y la microalga *Tetraselmis chuii*, cuyo liofilizado desea comercializar.

El solicitante afirma que la empresa Fitoplancton Marino S.L. viene produciendo la microalga *Tetraselmis chuii* para la alimentación de larvas de peces, crustáceos y moluscos desde hace más de 8 años y que debido a las características organolépticas y de composición que presenta y a la falta de toxicidad es óptima para el consumo humano como ingrediente en una gran variedad de platos cocinados.

Comentarios

El Comité Científico está de acuerdo con la categorización del producto realizada por el solicitante y, por su parte, la AESAN ha verificado la ausencia de un historial de consumo en la Unión Europea anterior a 1997.

2. Identificación del producto como nuevo alimento

1. Especificaciones del nuevo alimento

Tetraselmis chuii es una microalga marina unicelular y móvil, de 10 a 15 µm de tamaño, con forma elipsoidal que se reproduce por fisión longitudinal.

La clasificación taxonómica de la microalga *Tetraselmis chuii* Butcher (1959) es la siguiente:

Reino	<i>Plantae</i>
Phylum	<i>Chlorophyta</i>
Clase	<i>Prasinophyceae</i>
Orden	<i>Chlorodendrales</i>

Familia *Chlorodendraceae*
Genero *Tetraselmis*

Tetraselmis chunii fue aislada por primera vez en los años 50 en las costas de Gran Bretaña (Butcher, 1959) y posteriormente ha sido aislada en diferentes partes del mundo, incluida la bahía de Cádiz. Está identificada con el número 8/6 en la *Culture Collection of Algae and Protozoa* (CCAP) del Reino Unido.

Según certifica el solicitante, la cepa a comercializar procede de la Colección de Cultivos de Microorganismos Marinos del Instituto de Ciencias Marinas de Andalucía, perteneciente al Consejo Superior de Investigaciones Científicas (ICMAN-CSIC), donde se mantiene en cultivo desde que se obtuvo de la colección de cultivos de algas y protozoos (CCAP).

El solicitante presenta estudios de identificación de la cepa utilizada, análisis de composición (físico-químicos, aminograma, contenido de minerales y ácidos grasos) y análisis de contaminantes (metales pesados, plaguicidas y microbiológico) de tres lotes del liofilizado de *Tetraselmis chunii* procedente de la producción industrial de la empresa Fitoplacton Marino S.L. La empresa solicitante está inscrita en el registro sanitario en el sector de condimentos y especias y aporta copia de la certificación de autorización para la realización de actividades analíticas de los distintos laboratorios que han realizado los análisis y de su acreditación conforme a la norma UNE/EN ISO/IEC 17025. En este sentido, afirma que las microalgas no están incluidas en sus alcances de acreditación por no ser una matriz de análisis habitual pero los laboratorios están acreditados para realizar las distintas determinaciones en productos alimentarios.

Estudios de identificación

La identificación de la cepa se ha realizado mediante técnicas moleculares utilizando dos marcadores moleculares. El marcador nuclear rDNA 18S, ampliamente manejado en estudios de identificación de especies de microalgas y, de forma complementaria, el marcador plastídico rbcL. Los resultados de ambos marcadores han sido comparados con los obtenidos, de igual forma, a partir de la cepa de *Tetraselmis chunii* perteneciente a la colección de microalgas del ICMAN-CSIC.

La metodología ha consistido en una amplificación por PCR y posterior secuenciación de los fragmentos obtenidos a partir de cinco cebadores (Euk1A, Euk516r, EuSSUF-1, EuSSUR-1 y Nsp4) pertenecientes al marcador nuclear rDNA 18S y de dos cebadores degenerados (Tetra_rbcL_F y Tetra_rbcL_R) pertenecientes al marcador plastídico rbcL (Tabla 1).

Tabla 1. Secuencia de los cebadores utilizados en cada uno de los marcadores moleculares empleados en la identificación de *T. chuii*

Cebador	Secuencia	Referencia	Marcador
Euk1A	CTGGTTGATCCTGCCAG	Díez et al., 2001	rDNA 18S
Euk516r	ACCAGACTTGCCCTCC	Díez et al., 2011	rDNA 18S
EuSSUF-1	AACCTGGTTGATYCTGCCAG	Sakata et al., 2000	rDNA 18S
EuSSUR-1	TGATCCTTCYGCAGGTTACCTAC	Sakata et al., 2000	rDNA 18S
Nspp4	ACTAAGAACGGCCATGCACCACCAC	IFAPA*	rDNA 18S
Tetra_rbcL_F	GKACTTGGACAACTGTATGGACKGATGGT	IFAPA*	rbcL
Tetra_rbcL_R	GRTCTTTTCWACRTAAGCATCACGCATTA	IFAPA*	rbcL

*Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera.

Los fragmentos secuenciados del marcador rDNA 18S presentaron una identidad del 100 % con la secuencia de referencia de la cepa de la colección del ICMAN y se obtuvieron valores iguales o del 99,9 % al compararla con otras secuencias de la misma especie depositada en la base de datos *National Center for Biotechnology Information* (NCBI).

Para mayor seguridad en la identificación de la cepa, los fragmentos secuenciados fueron comparados con los de otras especies del mismo género depositada en la base de datos del NCBI, comprobando que los porcentajes de identidad son significativamente menores.

El marcador rbcL presentó una identidad del 100 % con la secuencia de referencia de la cepa del ICMAN-CSIC. Cuando se comparó con otras especies del mismo género, los valores de identidad fueron del 98,7-84,6 %.

Análisis de composición

La microalga *Tetraselmis chuii* presenta un alto contenido en proteínas, hidratos de carbono y minerales (Tabla 2). Las proteínas contienen ácido glutámico, ácido aspártico y leucina como aminoácidos más abundantes, y todos los aminoácidos esenciales. No se aportan datos de asparagina, glutamina, prolina y cisteína. El calcio es el elemento más abundante en el liofilizado dentro del grupo de los minerales, siendo también abundantes los cloruros y el sodio. Las grasas representan el 6,7 % del liofilizado, y aproximadamente el 50 % de los ácidos grasos son poliinsaturados (PUFA), siendo el ácido linolénico el más abundante.

Tabla 2. Resultados del análisis de composición de tres lotes del liofilizado de *Tetraselmis chuii* procedente de la producción industrial de la empresa Fitoplacton Marino S.L. (media de tres lotes \pm desviación estándar)

Determinación		Resultado
Humedad (%)		6,3 \pm 0,02
Proteínas (%)		37,6 \pm 0,40
Cenizas (%)		15,5 \pm 0,05
Hidratos de carbono (%)		31,6 \pm 0,38
Fibra alimentaria (%)		2,3 \pm 0,00
Grasas (%)		6,7 \pm 0,25
Kcal/100 g		337 \pm 1,35
Kjulios/100 g		1 408 \pm 5,66
Aminograma (% de proteína)	Valina	2,27 \pm 0,12
	Triptófano	0,61 \pm 0,01
	Treonina	1,81 \pm 0,13
	Tirosina	1,38 \pm 0,15
	Serina	1,63 \pm 0,09
	Metionina	0,87 \pm 0,12
	Lisina	2,03 \pm 0,15
	Leucina	3,08 \pm 0,09
	Isoleucina	1,57 \pm 0,11
	Histidina	0,65 \pm 0,13
	Glicina	2,25 \pm 0,14
	Fenilalanina	1,95 \pm 0,07
	Arginina	2,66 \pm 0,09
	Alanina	2,79 \pm 0,17
	Ac. Glutámico	4,67 \pm 0,12
Ac. Aspártico	3,71 \pm 0,25	
Minerales (mg/g)	Calcio	33,80 \pm 0,26
	Magnesio	5,06 \pm 0,09
	Hierro	2,01 \pm 0,04
	Fósforo	6,27 \pm 1,87
	Sodio	14,33 \pm 4,16
	Potasio	10,40 \pm 0,56
	Cloruros	17,77 \pm 0,25
	Cobre	0,006 \pm 0,00
	Yodo (mg/kg)	5,03 \pm 5,78*

Tabla 2. Resultados del análisis de composición de tres lotes del liofilizado de *Tetraselmis chuii* procedente de la producción industrial de la empresa Fitoplacton Marino S.L. (media de tres lotes \pm desviación estándar)

	Determinación	Resultado
Ácidos grasos (% grasa)	Saturados	30,27 \pm 0,50
	Monoinsaturados	22,97 \pm 0,90
	Poliinsaturados	46,77 \pm 1,36

Nota: el análisis de la concentración de yodo se ha realizado en cuatro lotes. La variabilidad entre los lotes se ha atribuido a cambios estacionales: los cultivos de verano ofrecieron resultados inferiores (0,45 y 0,47 mg/kg) a los dos lotes de cultivos de invierno (6,7 y 12,5 mg/kg).

Análisis de contaminantes

No se ha detectado la presencia de contaminantes en ninguno de los tres lotes analizados (Tabla 3).

El Reglamento (CE) N° 420/2011 establece límites máximos permitidos de cadmio y plomo de 0,05* y 0,1 mg/kg de peso fresco, respectivamente, en hortalizas* (UE, 2011). Los criterios respecto al contenido máximo de arsénico, mercurio y estaño en materia seca establecidos en Francia para algas son de 3, 0,1 y 5 mg/kg, respectivamente (CEVA, 2012). Los resultados de los análisis aportados por el solicitante muestran concentraciones de metales pesados inferiores a estos límites máximos.

En el análisis microbiológico no se han detectado microorganismos patógenos. El contenido de bacterias aerobias mesófilas será discutido en el apartado XII.

*Corrección de erratas (16-11-2015): se ha sustituido 0,5 por 0,05 y algas por hortalizas.

Tabla 3. Resultados del análisis de contaminantes del liofilizado de *Tetraselmis chuii* procedente de la producción industrial de la empresa Fitoplacton Marino S.L. (media de tres lotes \pm desviación estándar)

Determinación	Parámetro	Resultado
Metales pesados (mg/kg)	Cadmio	0,01 \pm 0,0
	Plomo	<0,05
	Mercurio	<0,04
	Arsénico	<0,03
	Estaño	<0,04
Plaguicidas (mg/kg)	No detectados	
Microbiológico (ufc/g)	Aerobios mesófilos	890 \pm 91,65
	<i>Bacillus cereus</i>	<10
	Coliformes fecales	<10
	Coliformes totales	<10
	<i>Escherichia coli</i>	<10
	Enterobacterias	<10
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<10
	<i>Listeria monocytogenes</i>	<10
	<i>Salmonella</i>	Ausencia en 25 g
	Mohos	<10
	Levaduras	<20

Comentarios

Existe reglamentación sobre límites máximos de residuos de plaguicidas (Reglamento (CE) N° 396/2005) donde se especifica el límite de residuos para algas marinas para un número mayor de residuos de los analizados en este caso (UE, 2005a). Sin embargo, teniendo en cuenta que la presencia de plaguicidas en el agua de mar es muy infrecuente debido, principalmente, a su gran dilución, los análisis de plaguicidas realizados se consideran suficientes.

El Comité Científico estima que el nuevo alimento a comercializar está bien identificado mediante los estudios moleculares y de composición presentados. Asimismo considera que el solicitante aporta suficiente documentación que demuestra la ausencia de contaminantes.

II. Efectos del proceso de producción aplicado al nuevo alimento

El solicitante describe de forma pormenorizada el proceso de producción del nuevo ingrediente alimentario y afirma que es similar al utilizado para la obtención de *Chlorella* y *Odontella aurita*, microalgas autorizadas para el consumo humano. También describe los controles que se realizan en el producto terminado y aporta datos para demostrar la estabilidad del producto.

Descripción del proceso de producción

El proceso de producción descrito por el solicitante consta de cuatro etapas: cultivo, cosechado, liofilizado y envasado.

1. Cultivo

- Obtención del inóculo. La cepa procedente de la colección de algas del ICMAN-CSIC se cultiva a temperatura, atmosfera de CO₂ y horas de luz controladas. Cuando el volumen del cultivo se ha incrementado convenientemente se incorpora a los fotobiorreactores para su obtención a escala industrial.
- Producción industrial. Se utilizan dos tipos de fotobiorreactores, de inoculación y de producción, situados ambos en el exterior. Son sistemas cerrados, aislados del ambiente exterior para evitar contaminaciones. Están formados por tanques y tubos transparentes en cuyo interior el cultivo se desarrolla a la temperatura y luz ambiental. Cuando en los fotobiorreactores de inóculo se ha conseguido un cultivo denso de microalgas, se trasvasa, de forma automatizada y a través de tuberías cerradas, a los fotobiorreactores de producción en los cuales, una vez alcanzada la densidad celular deseada, se realiza el cosechado de la microalga.

Para el cultivo se utiliza agua de mar estéril. El solicitante aporta análisis fisicoquímico, microbiológico, de metales pesados y de plaguicidas del agua de mar utilizada en el cultivo. Los análisis corresponden a tres muestras de agua recogidas a lo largo de 1 año. En todos los casos, los valores obtenidos para estos parámetros son inferiores a los niveles máximos permitidos en la Directiva 98/83/CE relativa a la calidad de aguas destinadas al consumo humano (UE, 1998).

El solicitante afirma que, para mantener el cultivo en condiciones óptimas la cepa es renovada cada 15 días y dos veces al año se renueva a partir de la colección de algas del ICMAN-CSIC. De igual forma, asegura que para mantener constantes las características nutricionales de la cepa se controla diariamente la concentración de nutrientes en el cultivo así como todos los parámetros críticos para garantizar la reproducibilidad del proceso.

2. Cosechado. El cosechado se realiza centrifugando el cultivo a 4 °C. La pasta obtenida es recogida en bolsas de plástico para su posterior liofilización.

3. Liofilizado. El proceso del liofilizado se realiza a una temperatura no superior a 30 °C, obteniéndose unas tortas de algas deshidratadas.

4. Envasado. Cada lote de tortas de algas deshidratadas es triturado a temperatura controlada y envasado al vacío en volúmenes de 250 g/bolsa. Las bolsas se guardan en los almacenes de la empresa a una temperatura constante de 20 °C.

Control de la producción

De acuerdo con el solicitante, el producto terminado es sometido a controles microbiológicos: aerobios mesófilos, Enterobacteriaceas, *Salmonella* y *Listeria monocytogenes*. El solicitante aporta el Plan de

Análisis de Peligros y Puntos de Control Críticos (APPCC) donde se recogen, además de los parámetros microbiológicos citados, controles anuales de ausencia de *Clostridium botulinum* y toxina botulínica.

El solicitante declara que dispone de un sistema de autocontrol de la producción de microalgas, el cual consta de un Plan General de Higiene, además del APPCC ya citado. Todo ello, según declara, permite el control de la producción (materias primas, limpieza y desinfección de la maquinaria utilizada, etc.) y el registro de todas las incidencias que se puedan producir a lo largo del proceso. Cuenta con certificaciones ISO 22000:2005 y FSSC 22000:2011.

Estabilidad del producto terminado

El solicitante aporta un estudio de la estabilidad del liofilizado en polvo y de una salsa elaborada con dicho liofilizado.

- Liofilizado en polvo. Para demostrar su estabilidad, el solicitante presenta análisis fisicoquímicos y microbiológicos, realizados durante 2 años consecutivos, de tres lotes almacenados a una temperatura entre 23 y 25 °C durante todo el estudio. (Tabla 4).

Tabla 4. Estabilidad del liofilizado en polvo almacenado a temperatura ambiente (media de tres lotes \pm desviación estándar)

	Tiempo	0 meses	12 meses	24 meses
Parámetros fisicoquímicos	pH	8,16 \pm 0,017	8,16 \pm 0,036	8,18 \pm 0,020
	Humedad (%)	6,11 \pm 0,067	6,13 \pm 0,064	6,14 \pm 0,061
	Actividad de agua (aw)	0,2 \pm 0,001	0,2 \pm 0,001	0,2 \pm 0,002
	Color/olor	Correcto	Correcto	Correcto
	Clorofila a (μ g/mg)	11,45 \pm 0,112	11,29 \pm 0,051	11,22 \pm 0,020
Parámetros microbiológicos (ufc/g)	Aerobios mesófilos (30 °C)	840 \pm 81,85	840 \pm 75,49	740 \pm 40,00
	<i>Enterobacteriaceae</i> lactosa positivo (30 °C)	<10	<10	<10
	<i>Listeria monocytogenes</i> (37 °C)	Ausente	Ausente	Ausente
	<i>Salmonella</i> (37 °C)	Ausente	Ausente	Ausente

- Salsa elaborada con el liofilizado. El solicitante presenta un estudio de estabilidad de una salsa preparada con sorbato potásico, sal, ácido cítrico, goma xantana y liofilizado de *Tetraselmis chunii* al 20 % de concentración. En los análisis microbiológicos de un lote de salsa previamente esterilizada, llevados a cabo mensualmente durante 1 año, no se detecta la presencia de ninguno de los parámetros estudiados (recuento de aerobios mesófilos, coliformes, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella*).

Comentarios

El Comité Científico está conforme con la descripción que se aporta del proceso de producción. Al tratarse de un cultivo en fotobiorreactores aislados del exterior se evitan contaminaciones externas y se considera que los sistemas de control de la producción y de higiene (APPCC y Plan de higiene), establecidos por la empresa, son adecuados.

Los estudios de estabilidad del liofilizado, en las modalidades en que el solicitante pretende comercializar el nuevo alimento, no detectan variaciones apreciables en el periodo estudiado. No se aportan datos de estabilidad en relación con la composición de macronutrientes, si bien no se consideran imprescindibles debido a que el valor nutricional del producto es limitado. Se recomienda que en la etiqueta figure como fecha de consumo preferente o de caducidad periodos no superiores a los presentados en este estudio para cada tipo de producto.

III. Historial del organismo utilizado como fuente del alimento

La clasificación taxonómica de la microalga *Tetraselmis chunii* Butcher se ha descrito en el apartado I. El solicitante afirma que la microalga *Tetraselmis chunii* tiene un uso extenso en el cultivo de crustáceos, moluscos y como eslabón primario en la cadena alimentaria de larvas de peces que, como la dorada, son criados en piscifactorías. Por todo ello, el solicitante considera que, aunque no existen referencias sobre su consumo directo en humanos, la especie *Tetraselmis chunii* está introducida de forma indirecta en la cadena alimentaria humana.

La empresa Fitoplacton Marino S.L. produce de forma industrial la microalga liofilizada desde el año 2005 para el cultivo larvario de peces y diferentes tipos de moluscos.

Comentarios

El Comité ha revisado la información aportada y no tiene comentarios en relación a este apartado.

IX. Ingesta/nivel de usos previstos del nuevo alimento

Las microalgas de distintas especies se comercializan actualmente en algunos países como complementos alimenticios y como ingredientes de diferentes alimentos (pasta, sopa, pan, arroz, bebidas, cereales y condimentos).

El consumo de microalgas, fundamentalmente de *Chlorella* sp., es una práctica extendida en Norteamérica y, para demostrarlo, el solicitante aporta direcciones de puntos de venta en Internet y las dosis recomendadas. El solicitante presenta, de forma comparativa, el perfil de aminoácidos que contienen las especies de microalgas *Tetraselmis chunii* y *Chlorella pyrenoidosa*, mostrando un contenido de aminoácidos similar.

La empresa Fitoplacton Marino S.L. pretende comercializar la biomasa liofilizada de *Tetraselmis chunii* como condimento para dar sabor a marisco a los alimentos, añadiéndolo directamente en forma de polvo o incorporado a la sal como aromatizante y a las salsas como potenciador del sabor. Por sus características organolépticas el solicitante ha establecido una ingesta diaria del liofilizado de *Tetraselmis chunii* de 250 mg/día.

- Salsas. La ingesta por persona/día de salsa con un 20 % del liofilizado sería de una porción de 1,25 g. Dicha porción contendría 250 mg de la microalga. El solicitante afirma que la salsa se envasará en recipientes en los que se indicará el número de raciones.
- Sal. Preparada con 1 % del liofilizado de *T. chunii*. La ingesta máxima recomendada de sal por la Organización Mundial de la Salud (OMS) es de 5 g/día por lo que el consumo previsto de liofilizado de microalga sería de 50 mg/día (OMS, 2002).

- Polvo. Utilización directa del polvo de liofilizado como condimento. La ingesta prevista sería de 250 mg/día. El solicitante afirma que se envasará en recipientes monodosis o en recipientes de mayor tamaño dirigidos a la industria alimentaria.

Comentarios

El Comité Científico considera apropiadas las estimaciones de ingesta realizadas por el solicitante.

XI. Información nutricional sobre el nuevo alimento

El solicitante declara que el liofilizado de *Tetraselmis chunii* está formado por las células enteras, sin fracturar y sin extraer ningún componente, por lo que el liofilizado de *Tetraselmis chunii* es nutricionalmente equivalente a la fuente. El nuevo alimento se utilizará para dar sabor a marisco como ingrediente de la sal, de salsas, o bien en polvo añadido a diferentes platos elaborados como, por ejemplo, pastas o arroces.

El solicitante presenta análisis del perfil nutricional del liofilizado de tres lotes, en el que muestra que está formado mayoritariamente por proteínas y carbohidratos y, en menor medida, por grasas. Los nutrientes que aporta la ingesta del liofilizado de *Tetraselmis chunii*, a la concentración propuesta por el solicitante, son escasos.

Se ha descrito que las algas marinas son capaces de sintetizar los PUFA (ácidos grasos poliinsaturados) de cadena larga, algunos de los cuales no pueden ser sintetizados por plantas ni animales. Según los análisis que aporta el solicitante, las grasas mayoritarias en el liofilizado son los PUFA y, dentro de ellos, los más abundantes son el ácido linolénico (C18:3) y ácido eicosapentanoico (EPA, también denominado timnodónico) (C20:5). Conforme a la ingesta estimada por el solicitante, el consumo del liofilizado supone un aporte de 7,8 mg/día de PUFA, de los cuales 4,17 mg son de ácido linolénico, lo que representa un 0,21 % de la ingesta diaria recomendada (CDR) por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA, 2009, 2010). Únicamente el aporte de yodo podría ser relevante.

El solicitante presenta un estudio comparativo del perfil nutricional de platos cocinados de pasta y arroz con/sin condimentar con 250 mg del liofilizado de *Tetraselmis chunii* en forma de polvo o salsa. Considerando raciones de arroz y pasta de, aproximadamente, 60-80 g/día, el liofilizado de *Tetraselmis chunii* supone únicamente un 0,3 % del total ingerido.

También se presenta un estudio comparativo del perfil nutricional de la sal, la sal yodada y la sal con liofilizado de *Tetraselmis chunii*.

Comentarios

El solicitante aportó análisis mediante espectrometría de masas con fuente de plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS) realizados en dos laboratorios diferentes. En uno de ellos no se detectó yodo en ninguna de las tres muestras de distintos lotes analizadas con un límite de detección de 54 mg/kg y en el otro laboratorio, con un límite de detección de 0,01 mg/kg y un límite de cuantificación de 0,019 mg/kg se determinaron valores entre 12,5 y 0,45 mg/kg en los cuatro lotes analizados.

Considerando el valor más alto obtenido en los análisis realizados por este último laboratorio (12,5 mg/kg) y el consumo estimado por el solicitante (250 mg), la cantidad de yodo ingerida sería de 3,1 µg/día, lo cual aportaría un 2,1 % de la CDR de yodo para adultos (EFSA, 2006). Considerando una población

que ingiriese al día una ración de salsa con 250 mg de microalga, 5 gramos de sal y un plato condimentado con 250 mg del liofilizado, el aporte de yodo de este nuevo alimento sería el 4,6 % de la CDR de yodo.

En relación al aporte de ácidos grasos PUFA, teniendo en cuenta el escenario anteriormente descrito puede ser considerado insignificante.

Como se ha citado, de acuerdo con el solicitante, en la Unión Europea, la microalga *Chlorella* se consume como complemento alimenticio, principalmente en base a su contenido en proteínas, aminoácidos esenciales, minerales y elementos traza y el solicitante afirma que existen muchas similitudes entre ella y la microalga *Tetraselmis chuii*, cuyo liofilizado desea comercializar.

El Comité considera que el nuevo alimento no aporta valor nutricional añadido a los alimentos, pero tampoco supone una desventaja nutricional que esta microalga sustituya a otras microalgas de composición similar.

XII. Información microbiológica sobre el nuevo alimento

En los análisis presentados por el solicitante de tres lotes del liofilizado no se detecta la presencia de microorganismos patógenos (Tabla 5). El recuento de bacterias mesófilas muestra valores elevados, cercanos a 10^3 ufc/g. Según la documentación bibliográfica presentada por el solicitante, estos valores se consideran habituales en muchas especies de microalgas ya que, según se cita, existe una relación simbiótica, a nivel de nutrientes, entre las microalgas y determinadas especies de bacterias.

En España no existe reglamentación específica para el contenido microbiológico en algas, sin embargo, criterios microbiológicos establecidos en Francia contemplan un límite para mesófilos de $\leq 10^5$ ufc/g en producto seco (CEVA, 2012). El Reglamento (CE) N° 2073/2005 relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios (UE, 2005b) establece un límite de 100 ufc/g para *Listeria monocytogenes* que sería aplicable si consideramos el nuevo producto como un alimento listo para consumo.

Como se ha citado en el apartado II, el solicitante aporta documentación según la cual el liofilizado de *Tetraselmis chuii* es fabricado siguiendo un sistema de autocontrol. Dicho sistema consta de un Plan General de Higiene y un sistema APPCC, ambos revisados por la Consejería de Salud de la Junta de Andalucía. El Control de Higiene se realiza a través de una empresa externa que, periódicamente, toma muestras de las superficies y utensilios utilizados en el proceso de producción. La empresa cuenta con certificaciones ISO 22000:2005 y FSSC 22000:2011.

Tabla 5. Análisis microbiológico del liofilizado de *Tetraselmis chuii* (media de tres lotes \pm desviación estándar)

Parámetro	Liofilizado <i>T. chuii</i> (ufc/g)
Aerobios mesófilos	890 \pm 91,65
Mohos	<10
Levaduras	<20
Coliformes fecales	<10
Coliformes totales	<10
Enterobacterias	<10
<i>Escherichia coli</i>	<10
<i>Staphylococcus aureus</i>	<10
<i>Bacillus cereus</i>	<10
<i>Listeria monocytogenes</i>	<10
<i>Salmonella</i>	Ausencia/25 g
<i>Clostridium perfringens</i>	<1
<i>Clostridium sulfitorreductores</i>	<1

Comentarios

El Comité Científico considera adecuada la documentación presentada ya que los análisis microbiológicos no muestran la presencia de organismos patógenos y la empresa aporta su sistema de APPCC y su Plan de higiene.

XIII. Información toxicológica sobre el nuevo alimento

La microalga a comercializar se utiliza en la acuicultura para el cultivo industrial de crustáceos, moluscos y larvas de peces sin que se conozca ningún efecto tóxico. El solicitante declara que las especies de algas susceptibles de producir toxinas están localizadas en 7 de los 76 órdenes de microorganismos algales, ninguno de los cuales pertenece al reino *Plantae*, reino donde no se ha descrito ninguna alga productora de toxinas.

Se adjunta certificado del CSIC en el que se menciona que esta especie "no produce ni acumula toxinas". La colección de microalgas de Australia, perteneciente a la *Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization* (CSIRO), indica que la especie *Tetraselmis chuii* no es tóxica (CSIRO, 2013).

No obstante el solicitante ha llevado a cabo análisis de toxinas, así como estudios de toxicidad, genotoxicidad y alergenicidad en el liofilizado de *Tetraselmis chuii*.

Determinación de toxinas

El solicitante ha efectuado análisis en tres lotes diferentes mediante el método de bioensayo en ratón de las toxinas marinas PSP, DSP y análisis por cromatografía líquida de la toxina amnésica (ASP). Los

resultados fueron negativos para todas las toxinas y lotes ensayados. Los ensayos fueron realizados en laboratorios acreditados conforme a la norma UNE/EN ISO/IEC 17025 para el análisis de productos agroalimentarios.

Estudio de toxicidad y genotoxicidad

El solicitante presenta estudios de toxicidad aguda (OCDE N° 423) y toxicidad a 90 días (OCDE N° 408) del liofilizado de *Tetraselmis chuii* realizados mediante los principios de Buenas Prácticas de Laboratorio. Asimismo, el solicitante presenta los resultados de un test de mutagenicidad reversa en bacterias o test de Ames (OCDE N° 471).

El valor de la DL_{50} obtenido en el ensayo de toxicidad aguda fue superior a 2 500 mg/kg peso corporal y no se observó ningún signo de toxicidad en animales tratados.

Del estudio a 90 días en ratas se concluye un NOAEL de 2 500 mg del liofilizado/kg peso corporal/día. Las condiciones del ensayo fueron las siguientes: dosis orales de 625, 1 667 y 2 500 mg de liofilizado/kg/día vehiculizado en gelatina fueron suministradas a ratas de ambos sexos durante un periodo de 13 semanas. Los niveles de dosis fueron fijados a partir de un estudio previo de palatabilidad oral de 14 días realizado con el liofilizado. A lo largo del ensayo se controló el consumo de comida y agua, el peso corporal, los cambios de comportamiento y se realizaron exámenes oftalmológicos, análisis bioquímicos y hematológicos, según marca el protocolo del ensayo, en animales controles y tratados, sin que se observaran cambios significativos a ninguna de las dosis ensayadas. Al finalizar el estudio, los animales fueron sacrificados, realizándose exámenes histopatológicos de órganos y tejidos en todos los animales, tanto controles como tratados. El estudio *post mortem* únicamente reveló, en las hembras tratadas con 625 mg/kg/día, un aumento significativo en el peso del corazón en comparación con los tratadas a la dosis más alta. Sin embargo, esta diferencia significativa se valora como un hecho aislado sin que se observe una tendencia relacionada con las dosis suministradas.

El test de Ames se realizó en las cepas TA98, TA100, TA1535, y TA1537 de *Salmonella typhimurium* y en la cepa WP2 (pKM101) de *Escherichia coli*, con y sin activación metabólica, utilizando cinco concentraciones en el rango de 4,00 a 0,05 mg/placa. Para fijar las dosis de ensayo se llevó a cabo un estudio previo de citotoxicidad en una de las cepas con resultados negativos para todas las dosis utilizadas.

El resultado fue negativo en todas las cepas y a todas las concentraciones utilizadas, lo que indica que el liofilizado de *Tetraselmis chuii* no induce mutaciones pudiendo ser considerado como no mutagénico de acuerdo con estos ensayos.

Estudios de alergenidad

Respecto a la ausencia de alergenidad el solicitante alega:

- Que la especie *Tetraselmis chuii* presenta similitudes con las especies de *Chlorella* que tienen historia de consumo en la Unión Europea, sin que estén referenciados episodios de alergia tras su consumo.
- Que los resultados a los análisis de alérgenos presentes en crustáceos, salmónidos, engraulidos e histamina han sido negativos. Estos alérgenos fueron elegidos por el solicitante en función del origen marino del nuevo alimento.
- Que los resultados a los análisis de alérgenos presentes en la soja y el gluten han sido negativos.

Estos alérgenos fueron elegidos por el solicitante en función de que el nuevo alimento puede ser considerado vegetal.

Presenta análisis del contenido de sulfitos -15 mg/kg- en el liofilizado de *Tetraselmis chuii*. Los sulfitos aparecen de forma natural y el solicitante señala que incluirá en el etiquetado la leyenda "Contiene sulfitos" según se establece en la Directiva 2000/13/CE relativa a la aproximación de las legislaciones de los Estados miembros en materia de etiquetado, presentación y publicidad de los productos alimenticios (UE, 2000).

De forma adicional, el solicitante presenta dos estudios de la capacidad sensibilizante del liofilizado en humanos (*prick test* y *patch test*). Ambos estudios fueron realizados siguiendo las directrices del Grupo Español de Investigación en Dermatitis de Contacto y Alergia Cutánea (GEIDAC) y de la *European Society for Contact Dermatitis* (ESCD).

- Valoración de la capacidad de sensibilización tipo I de la clasificación Gell-Coombs (medida de inmunoglobulinas). Para ello, el solicitante presenta un *prick test* en 100 individuos sanos, 50 de los cuales presentan antecedentes de alergia. En todos ellos se aplicó histamina como control positivo, suero salino como control negativo y una solución saturada en suero del liofilizado. Asimismo, esta misma prueba se realizó en todos los trabajadores de la empresa Fitoplancton Marino, dos de los cuales poseían antecedentes alérgicos. En ningún individuo se observó una reacción positiva a la solución saturada del liofilizado de *Tetraselmis chuii*.
- Valoración de la capacidad irritante y sensibilización tipo IV de la clasificación Gell-Coombs. Para ello el solicitante presentó un *patch test* en 30 voluntarios sanos a los que se les aplicó una solución saturada del liofilizado sobre soportes estándar. En ninguno de los individuos se observó ninguna reacción positiva al liofilizado.

Comentarios

El Comité Científico considera suficientemente probada la inocuidad del nuevo alimento.

Conclusiones del Comité Científico

El Comité Científico de la AESAN considera que de la información aportada no se deduce que el consumo de la especie de microalga marina *Tetraselmis chuii* como condimento, en las condiciones propuestas por el solicitante, pueda producir efectos negativos para la salud. El Comité Científico concluye que el nuevo alimento presentado a evaluación por Fitoplancton marino S.L. cumple los criterios de aceptación establecidos por el Reglamento (CE) Nº 258/97 sobre nuevos alimentos y nuevos ingredientes alimentarios.

Referencias

- Butcher, E.W. (1959). Microalgae for human and animal consumption. En libro: *Microalgal technology*. Borowitzka, M.A. and Borowitzka, L.J., (Eds), Cambridge, Cambridge University Press, pp: 226-256.
- CEVA (2012). Centre d'Étude et de Valorisation des Algues. Réglementation algues alimentaires. Disponible en: <http://www.ceva.fr/index.php/eng/INFORMATION/ALGUESALIMENTAIRES/Documents-Syntheses/France-Synthese-au-18-09-2012> [acceso: 22-04-13].

- CSIRO (2013). Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization. Australian National Algae Culture Collection (ANACC), the CSIRO Collection of Living Microalgae. Disponible en: <http://www.csiro.au/Organisation-Structure/National-Facilities/Australian-National-Algae-Culture-Collection.aspx> [acceso: 22-04-13].
- Diez, B., Pedros-Alio, C., Marsh, T.L. y Massana, R. (2001). Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) to study the diversity of marine picoeukaryotic assemblages and comparison of DGGE with other molecular techniques. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, pp: 2.942-2.951.
- EFSA (2006). European Food Safety Authority. Tolerable upper intake levels for vitamins and minerals. <http://www.efsa.europa.eu/en/ndatopics/docs/ndatolerableuil.pdf> [acceso: 22-04-13]
- EFSA (2009). European Food Safety Authority. Labelling reference intake values for n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids. *The EFSA Journal*, 1.176, pp: 1-11.
- EFSA (2010). European Food Safety Authority. Scientific Opinion on Dietary Reference Values for fats, including saturated fatty acids, polyunsaturated fatty acids, monounsaturated fatty acids, trans fatty acids, and cholesterol. *The EFSA Journal*, 8 (3), pp: 1.461.
- OMS (2002). Organización Mundial de la Salud. Dieta, nutrición y prevención de enfermedades crónicas. *Informe Técnico 916 de la OMS*. (Ginebra). Consulta Mixta de Expertos. OMS/FAO. Organización Mundial de la Salud.
- Sakata, T., Fujisawa, T. y Yoshikawa, T. (2000). Colony formation and fatty acid composition of marine labyrinthulid isolates Brown on agar media. *Fish Science*, 66, pp: 84-90.
- UE (1997a). Reglamento (CE) N° 258/97 del Parlamento Europeo y del Consejo de 27 de enero de 1997 sobre nuevos alimentos y nuevos ingredientes alimentarios. DO L 43 de 14 de febrero de 1997, pp: 0001-0006.
- UE (1997b). Recomendación de la Comisión 97/618/CE, de 29 de julio de 1997, relativa a los aspectos científicos y a la presentación de la información necesaria para secundar las solicitudes de puesta en el mercado de nuevos alimentos y nuevos ingredientes alimentarios, la presentación de dicha información y la elaboración de los informes de evaluación inicial de conformidad con el Reglamento (CE) N° 258/97 del Parlamento Europeo y del Consejo. DO L 253 de 16 de septiembre de 1997, pp: 0001-0036.
- UE (1998). Directiva 98/83/CE del Consejo, de 3 de noviembre de 1998, relativa a la calidad de las aguas destinadas al consumo humano. DO L 330 de 5 de diciembre de 1998, pp: 32-54.
- UE (2000). Directiva 2000/13/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 20 de marzo de 2000 relativa a la aproximación de las legislaciones de los Estados miembros en materia de etiquetado, presentación y publicidad de los productos alimenticios. DO L 109 de 6 de mayo de 2000, p: 29-42.
- UE (2005a). Reglamento (CE) N° 396/2005 del Parlamento Europeo y del Consejo de 23 de febrero de 2005 relativo a los límites máximos de residuos de plaguicidas en alimentos y piensos de origen vegetal y animal y que modifica la Directiva 91/414/CEE del Consejo. DO L 70 de 16 de marzo de 2005, pp: 1-16.
- UE (2005b). Reglamento (CE) N° 2073/2005 de la Comisión de 15 de noviembre de 2005 relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios. DO L 338 de 22 de diciembre de 2005, pp: 1-26.
- UE (2011). Reglamento (CE) N° 420/2011 de la Comisión de 29 de abril de 2011 que modifica el Reglamento (CE) N° 1881/2006, por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios. DO L 111 de 30 de abril de 2011, pp: 3-6.