

Étude sur les conditions de production d'ochratoxine A dans les saucissons secs

par Ch. LABIE* et Mme Sylviane TACHE*

RÉSUMÉ

Le saucisson sec constitue un substrat sur lequel peuvent se développer des moisissures toxigènes de type *Aspergillus ochraceus*. Celles-ci sont capables d'élaborer de l'ochratoxine A (80 à 120 ppb) pendant les premiers jours de la fabrication du saucisson, quand la teneur en eau du substrat est élevée et quand les conditions d'environnement sont favorables (température supérieure à 20° C ; hygrométrie de 80 p 100 au moins). L'ochratoxine ainsi formée dans la pâte du saucisson reste stable pendant plusieurs semaines.

SUMMARY

Dry sausage constitutes a substrate in which toxin producing fungi, type Aspergillus ochraceus, may develop. During the first days of sausage fabrication, when the substrate moisture level is high and if the environmental conditions are favorable (ambient temperature above 20° C; relative humidity at least 80 p.100), the fungi are able to produce ochratoxin A, at concentrations of 80-120 ppb. The ochratoxin A thus elaborated in the sausage remains stable for several weeks.

Au cours de la maturation et du séchage des saucissons secs, on voit fréquemment se développer à la surface de leur enveloppe un enduit plus ou moins uniforme de colonies de micro-organismes (bactéries, levures, moisissures) constituant ce que les professionnels appellent la « fleur du saucisson ». Ce revêtement est généralement considéré comme un caractère de « bonne qualité » du produit car les micro-organismes qui le constituent, d'une part favorisent un séchage progressif du saucisson (PALLU), d'autre part amélioreraient

* Laboratoire d'Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'origine animale.
Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, chemin des Capelles - 31076 Toulouse
cedex.

la texture et l'arôme par leur action protéolytique et lipolytique (JIRKOVSKI et GALGOCSY ; MINTZLAFF et LEISTNER ; RACOVITA et RACOVITA). C'est pourquoi, dans certaines fabrications comme le salami hongrois, on procède souvent à l'ensemencement artificiel de la surface des enveloppes par des spores de moisissures « favorables » (*Penicillium commune*, *P. nalgoviensis*, *Scopulariopsis brevicaulis* var. *alba*) pour obtenir une couverture régulière et uniforme du produit (LIEPE ; RACOVITA et RACOVITA).

Les hygiénistes ne sont cependant pas tous convaincus de l'intérêt du développement de cette « fleur » à la surface des saucissons secs car, parmi les micro-organismes qui la constituent, il n'est pas exceptionnel d'identifier des moisissures productrices de toxines. LEISTNER, AYRES, MINTZLAFF, SUTIC, FIEDLER ont en effet pu isoler des souches appartenant aux genres *Penicillium*, *Scopulariopsis*, *Aspergillus*, dont près de 50 p. 100 se sont révélées capables d'élaborer des mycotoxines : *Aspergillus flavus* (aflatoxine) ; *A. versicolor* (stérigmatocystine) ; *A. ochraceus* (ochratoxine) ; *Penicillium expansum* (patuline, citrinine, acide pénicillique) ; *P. janthinellum* (ac. pénicillique) ; *P. viridicatum* (ochratoxine, trémortine, ac. pénicillique) ; *P. palitans* (trémortine, ac. pénicillique) ; *P. commune* (ochratoxine, trémortine, ac. pénicillique).

Le développement de souches mycotoxinogènes à la surface des saucissons n'est cependant pas une condition suffisante pour que les denrées risquent d'être dangereuses pour le consommateur. En effet, la production des mycotoxines n'est pas seulement liée à une bonne croissance de la moisissure ; elle dépend aussi des caractéristiques du substrat (teneur en eau ; pH ; taux de glucides) et de l'environnement (température ; teneur en oxygène ; durée de culture ; antagonisme avec d'autres micro-organismes). Dans les salaisons de viandes sèches (jambons, saucissons), il faut une humidité relative supérieure à 80 p. 100, une température élevée (de 20 à 30° C) et une forte teneur en eau du substrat pour obtenir des quantités notables de mycotoxines dans les produits (ALPERDEN *et al.* ; BURMEISTER et LEISTNER) et, même dans ces conditions, CIEGLER *et al.* ne retrouvent pas d'ochratoxine, de citrinine, de patuline, de trémortine malgré un développement abondant des moisissures productrices à la surface de salamis, ce qui les amène à supposer l'existence de « phénomènes de détoxification ».

Les données apparaissent donc encore fragmentaires dans ce domaine, quelquefois contradictoires, et souvent elles ont été obtenues dans des conditions expérimentales éloignées des conditions habituelles de la fabrication des saucissons secs dans notre pays. L'expérimentation que nous avons effectuée, sur les conditions de production de l'ochratoxine A dans des saucissons secs type ménage, apporte quelques informations complémentaires sur ce sujet.

I. ENTRETIEN DE LA SOUCHE PRODUCTRICE D'OCRATOXINE A

Les divers essais de contamination des saucissons sont réalisés avec une souche d'*Aspergillus ochraceus* dont le pouvoir toxigène a été vérifié par culture dans un milieu liquide de Ferreira, à 26° C pendant 12 j.

La toxine est extraite du milieu de culture par solubilisation dans le chloroforme, après acidification du milieu à pH 2,0 par addition d'acide sulfurique. Elle est ensuite purifiée par chromatographie sur colonne (silicagel), mise en solution dans le benzène et cristallisée par évaporation du solvant.

La souche d'*A. ochraceus* produit en moyenne 300 mg d'ochratoxine A par litre de milieu. L'emploi de spores conservées par lyophilisation, pour l'ensemencement du milieu de culture, permet d'obtenir les taux les plus élevés de mycotoxine.

2. EXTRACTION DE L'OCRATOXINE A DANS LES SAUCISSONS

L'ochratoxine A présente dans des saucissons ne peut pas être extraite de façon satisfaisante par la méthode ci-dessus, ni par la méthode de Chu et Butz au chloroforme-méthanol, utilisée pour la mise en évidence d'ochratoxine A dans les céréales. La richesse des saucissons en matières grasses (30 à 45 p. 100 selon le type) gêne en effet la séparation, la purification et l'identification de la mycotoxine, la fluorescence propre des lipides venant masquer celle de l'ochratoxine A sur les chromatogrammes examinés en lumière ultraviolette (fluorescence verte en UV à 340 nm).

La méthode mise au point par LAFONT pour extraire l'ochratoxine A des fromages, par traitement à l'aide du mélange méthanol-eau (155/45) suivi d'une délipidation par 3 lavages à l'hexane et d'un entraînement dans le chloroforme, permet également une récupération satisfaisante de la toxine à partir des saucissons. Celle-ci est ensuite séparée des autres composés par chromatographie sur couche mince de gel de silice 60 et le chromatogramme est développé en présence du système benzène-acide acétique (9/1).

Les « taches » correspondant à l'ochratoxine A sont séparées par grattage, éluées dans une solution de bicarbonate de sodium (14g/l) et analysées à l'aide d'un spectrophotofluorimètre (excitation à 340 nm) pour comparer l'intensité de la fluorescence à celle de préparations témoins.

Avec cette méthode, le taux de récupération de l'ochratoxine A ajoutée expérimentalement à des mêlées de saucissons est de 65 p. 100 en moyenne, et le seuil de détection de la toxine est voisin de 10 ppb.

PRODUCTION D'OCHRATOXINE A
en fonction du SUBSTRAT et des conditions de MILIEU

| ECHANTILLON | température | humidité relative | durée incubation après ensemencement | RÉSULTAT |
|--|-----------------|-------------------|--------------------------------------|---|
| saucisson sec - ensemencement à la surface de l'enveloppe | 17°C | 75% | 30 jours | pas de développement mycélien |
| | 21°C | 75% | " | |
| | 26°C | 75% | " | |
| | 26°C | 80% | " | |
| saucisson sec - ensemencement de la surface débarrassée de l'enveloppe | 17°C | 75% | 46 jours | pas de développement mycélien |
| | 26°C | 75% | " | |
| | 26°C | 80% | " | |
| saucisson en cours de séchage (12 jours) | 22°C | 86% | 20 jours | 14 ppb } d'OCHRATOXINE 100 ppb } |
| | 26°C | 80% | " | |
| saucisson en fin de séchage (30 jours) | 22°C | 86% | 20 jours | pas de développement mycélien |
| | 26°C | 80% | " | |
| saucisson venant d'être embossé | 15°C | 75% | 15 jours | pas de développement mycélien 56 ppb } d'OCHRATOXINE 97 ppb } |
| | 22°C | 75% | " | |
| | 22°C | 80% | " | |
| | 26°C | 80% | " | |
| saucisson sec réhydraté par trempage dans l'eau | 22°C | 86% | 20 jours | pas de développement mycélien |
| | 26°C | 80% | " | |

3. INFLUENCE DU SUBSTRAT ET DES CONDITIONS DE CULTURE SUR LA PRODUCTION D'OCHRATOXINE A

Le saucisson arrivé à un degré de séchage suffisant ne permet pas le développement d'*Aspergillus ochraceus*, quelles que soient les conditions de température et d'humidité du milieu ambiant. Seul l'ensemencement de saucissons fraîchement embossés, avec une suspension épaisse de spores (10^3 - 10^7 /cm²), aboutit à un développement abondant de la moisissure et à la production de quantités notables de toxine, si la température et l'humidité relative sont suffisamment élevées (respectivement 22-26° C ; 80-86 p. 100).

Ces divers résultats expérimentaux laissent penser que la teneur en eau du substrat joue un aussi grand rôle dans la mycotoxinogénèse que la température et l'humidité du milieu ambiant. Cette hypothèse est vérifiée en suivant la production d'ochratoxine A en fonction de la teneur en eau (H.P.D. = Humidité du Produit Dégraissé) de la mûlée de saucissons séchés à une température de 15° C et à une humidité relative de 75 p. 100 et ensemencés à divers stades de leur séchage, puis placés dans des conditions favorables à la toxino-génèse (26° C ; hygrométrie 80 p. 100).

Le développement d'*Aspergillus ochraceus* et, corrélativement, la toxino-génèse décroît rapidement jusqu'à une valeur d'H.P.D. voisine de 58 p. 100, puis la diminution est plus lente mais la toxine n'est plus décelable quand l'H.P.D. devient inférieure à 50 p. 100. La moisissure *A. ochraceus* ne se développe plus quand elle est ensemencée sur des produits ayant plus de 3 semaines de séchage.

4. STABILITÉ DE L'OCHRATOXINE A DANS LE SAUCISSON

L'expérience précédente ayant été réalisée dans des normes de température et d'hygrométrie correspondant à « une bonne technique » industrielle de séchage, il apparaît que, dans les conditions habituelles de fabrication des saucissons secs, la « période critique » se situe au cours des premiers jours : *pendant l'étuvage*, d'une durée moyenne de 24-36 h, à une température de 22-26° C, avec une hygrométrie de 80-90 p. 100 ; *pendant les premiers jours de séchage*, à 14-17° C et 78-82 p. 100 d'humidité relative. Pendant ces délais, l'H.P.D. du produit reste élevée et les facteurs d'ambiance sont favorables à la culture de la moisissure et à la toxino-génèse.

Cela peut d'ailleurs être aggravé si le saucisson est fortement contaminé dès sa fabrication (épices souillées ; pollution de l'atmosphère des locaux de fabrication), si l'étuvage est prolongé (jusqu'à 3-4 j dans le cas des saucissons de grand diamètre) et si le professionnel utilise la technique du « préséchage » dans les « étuves à sudation » (3 j à 22-24° C et 78-85 p. 100 d'humidité). Dans de telles

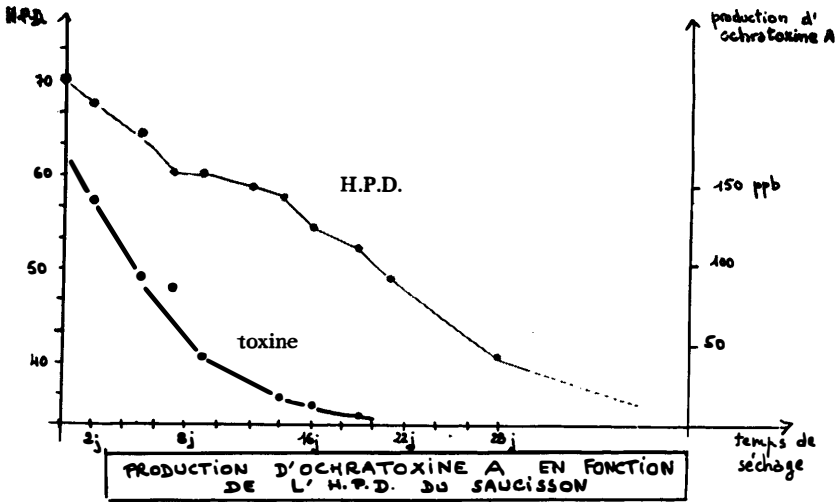


Figure 1

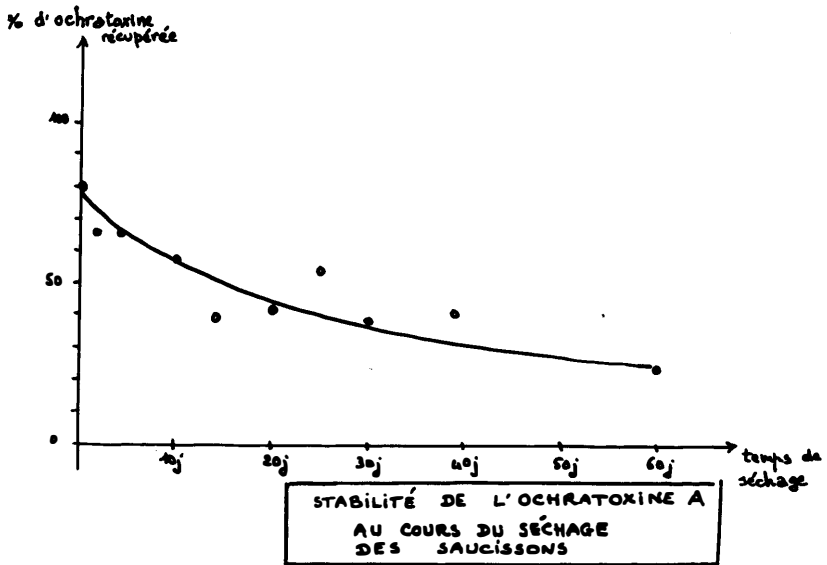


Figure 2

conditions, des quantités importantes d'ochratoxine A pourront être produites par la moisissure (80 à 120 ppb).

Les essais, dont les résultats sont reproduits dans la figure 2, démontrent que l'ochratoxine ainsi formée dans la pâte d'un saucisson peut être retrouvée dans la denrée pendant plusieurs semaines, ce qui laisse supposer une bonne stabilité de la toxine dans le saucisson au cours du séchage et l'absence de phénomènes de détoxification semblables à ceux signalés pour d'autres mycotoxines (patuline, citrinine).

CONCLUSION

Le développement de colonies de moisissures du type *Aspergillus ochraceus* peut devenir particulièrement abondant à la surface des saucissons secs, si les conditions suivantes sont réunies : ensemencement initial important (10^3 - 10^5 spores/cm²) ; contamination de la denrée pendant les premières phases de la fabrication (embossage, étuvage, préséchage) ; environnement favorable (température supérieure à 20° C ; humidité relative de 80 à 86 p. 100).

Dans ces circonstances, *Aspergillus ochraceus* est susceptible d'élaborer de l'ochratoxine A à des taux non négligeables (80 à 120 ppb) et, même si le saucisson est débarrassé des moisissures par brossage et séché dans de bonnes conditions (15° C-75 p. 100 d'humidité relative) qui ne permettent pas le développement de nouvelles colonies, la toxine préformée persistera dans le produit pendant plusieurs semaines.

Il faut donc recommander, d'une part un contrôle de l'absence de souches toxigènes dans les préparations de moisissures sélectionnées pour l'ensemencement artificiel des saucissons, d'autre part une surveillance des normes de température et d'hygrométrie dans la fabrication de ces denrées.



Ce travail de recherche a été réalisé grâce aux fonds de la Convention de recherche n° 7709, subventionnée par le Ministère de l'Environnement et du Cadre de vie.

MM. JACQUET et ROUSSEAU prennent la parole.

L'insertion de cette communication est votée à l'unanimité.