

Étude sur les conditions de production de patuline dans les saucissons secs

par Ch. LABIE* et Mme Sylviane TACHE*

RÉSUMÉ

Le saucisson sec est un substrat sur lequel la moisissure toxigène *Penicillium granulatum* se développe facilement. Les conditions les plus favorables à la croissance de *P. granulatum* sont : température 20-26° C ; humidité relative 80-86 p.100 ; teneur en eau du substrat délipidé supérieure à 60 p. 100.

Malgré un développement important de la moisissure à la surface des saucissons, la PATULINE n'est retrouvée qu'en faible quantité dans le produit (environ 120 ppb). Cela est dû à une inactivation rapide de la mycotoxine par le substrat.

SUMMARY

Dry sausage constitutes a substrate in which toxin producing fungus Penicillium granulatum may develop. The most favorable conditions for the growth of P. granulatum are: ambient temperature 20-26° C; relative humidity 80-86 p. 100; moisture content in defatted substrate, above 60 p. 100.

In spite of an important growth of the fungus, over the casing of the sausage, the PATULIN found in the product is never at concentrations above 120 ppb. That results from a rapid inactivation of the mycotoxin by the substrate.

Dans une précédente communication [11], nous avons présenté le problème de la production d'Ochratoxine A dans les saucissons secs, par des moisissures de type *Aspergillus ochraceus*, qui sont susceptibles de contaminer ces denrées au cours de leur fabrication.

D'autres espèces de moisissures sont également rencontrées fréquemment dans la « fleur » des saucissons secs, parmi lesquelles de nombreuses souches sont toxigènes (LEISTNER, AYRES, MINTZLAFF, SUTIC, FIEDLER...). Parmi les toxines dangereuses pour la santé du consommateur, élaborées par ces moisissures, outre l'aflatoxine bien

* Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse.

connue et l'ochratoxine A, CIEGLER d'une part, FIEDLER d'autre part ont identifié l'acide pénicillique, la trémortine, la citrinine, la stérigmatocystine et la PATULINE.

La PATULINE, encore appelée « clavacine », est un métabolite toxique produit par diverses espèces de *Penicillium*, d'*Aspergillus* et de *Byssochlamys* (STOTT et BULLERMAN) :

— *Penicillium expansum*, *P. granulatum*, *P. urticae*, *P. griseofulvum*, *P. claviforme*, *P. terrestre*, *P. melinii*, *P. novae zeelandiae*, *P. lonasum*, *P. divergens*, *P. cyclospium*... ;

— *Aspergillus clavatus*, *A. giganteus*, *A. terreus*;

— *Byssochlamys nivea* et *B. fulva*.

Les données bibliographiques relatives aux dangers de la PATULINE dans les denrées alimentaires sont assez contradictoires et justifient la poursuite de recherches :

— la toxicité de la PATULINE peut être facilement démontrée expérimentalement chez les animaux de laboratoire (la DL 50 chez le rat et la souris est de l'ordre de 15 à 50 mg/kg, par voie orale ou parentérale) ; il s'agit d'une neurotoxine, mais elle est capable de provoquer des œdèmes pulmonaires et des lésions vasculaires hépatiques, spléniques et rénales. L'effet toxique serait dû à la réactivité de la PATULINE avec des groupements sulfhydriles (cystéine, glutathion, thioglycolate, dimercaptopropanol), ce qui entraîne l'inhibition de nombreuses enzymes (succinique-déshydrogénase, cytochrome-oxydase, aldolase, ARN polymérase-ADN dépendante A, lactate-déshydrogénase...).

Mais c'est ce mécanisme d'action même qui permet à certains auteurs de supposer que la PATULINE peut perdre sa toxicité lorsqu'elle est en présence de composés sulfhydriles dans les denrées alimentaires : REISS a montré que la PATULINE est inactivée par des extraits aqueux de pain de blé, par réaction d'addition avec le glutathion et la cystéine ; la vitamine B1 a le même effet mais la PATULINE réagit également, en perdant sa toxicité, avec des composés des aliments ne contenant pas de groupements sulfhydriles (peptones, hydrolysats de caséine, asparagine, méthionine, sulfate de sodium. (STOTT et BULLERMAN) ;

— la production de PATULINE dans diverses denrées alimentaires a été démontrée fréquemment ; les substrats les plus favorables sont les fruits et les jus de fruits (cidres) mais les souches patulino-gènes sont également retrouvées dans les farines, le pain, les saucisses sèches (TAUCHMAN *et al.*) et les fourrages ensilés (ESCOULA). Il faut cependant signaler les résultats contraires de CIEGLER *et al.* qui considère que le saucisson sec est un substrat qui ne convient pas à la formation de PATULINE, et ceux de ALPERDEN *et al.* qui, après avoir

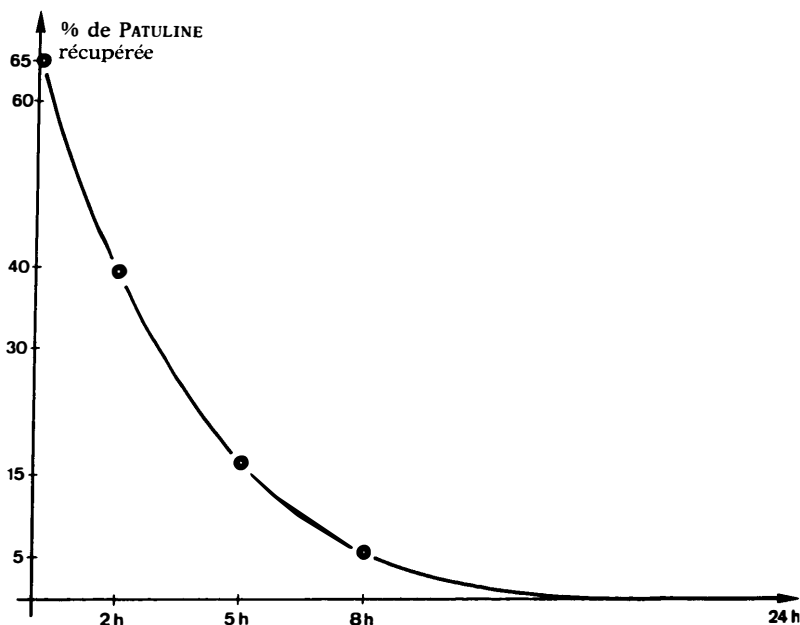


Fig. 1

Stabilité de la PATULINE dans la m \acute{e} lée d'un saucisson.

inoculé des souches de *Penicillium expansum* sur des saucissons fraîchement embossés, ne retrouve la PATULINE qu'entre le 10 $^{\text{e}}$ et le 18 $^{\text{e}}$ jour de séchage (à 15 $^{\circ}$ C, humidité relative 75 p. 100).

Cette situation explique que la Commission spécialisée « Qualité des aliments de l'homme » de l'I.N.R.A. ait inscrit parmi les objectifs de recherche des laboratoires de la recherche agronomique la poursuite des travaux sur les mycotoxines, en particulier la PATULINE. L'expérimentation que nous avons effectuée, sur les conditions de production de cette mycotoxine dans les saucissons secs, peut également apporter quelques informations utiles.

I. SOUCHE PRODUCTRICE DE PATULINE

La PATULINE utilisée au cours de l'expérimentation est obtenue à partir d'une souche de *Penicillium granulatum*, cultivée sur milieu

de Czapek, additionné d'extrait de levure (2 g/l) et de glucose (8 g/l), et incubée à 26° C pendant 15 jours.

La mycotoxine est extraite du milieu de culture par l'acétate d'éthyle. Le mélange est récupéré sur filtre séparateur de phases et le filtrat est concentré par évaporation (concentration de vingt parties à une partie). Cet extrait concentré est traité par chromatographie en couche mince, à l'échelle préparative, sur gel de silice fluorescent à 254 nm. La bande caractéristique de la PATULINE est repérée sous lumière ultra-violette, séparée puis éluee sur colonne par l'acétate d'éthyle ; après évaporation du solvant et solubilisation du résidu dans le benzène, la mycotoxine est cristallisée par évaporation et les cristaux sont conservés à + 4° C, à l'obscurité.

La souche utilisée produit en moyenne 1,5 g de toxine par litre de milieu de culture.

II. EXTRACTION DE LA PATULINE DANS LES SAUCISSONS

La richesse des saucissons en matières grasses et en pigments est source de difficultés de séparation et d'identification de la PATULINE ; les méthodes mises au point par STOLOFF, par POHLAND et TAUCHMAN ne nous ont pas permis de récupérer des taux satisfaisants de la PATULINE introduite expérimentalement dans la pâte de saucissons secs.

La méthode retenue dans nos essais comprend les opérations suivantes :

— traitement d'un broyat homogène de saucisson par l'acétate d'éthyle, dans lequel la PATULINE passe en solution ;

— après évaporation du solvant, le résidu sec est délipidé par l'éther de pétrole, dans lequel la mycotoxine est insoluble ;

— le résidu délipidé est mis en suspension dans de l'eau distillée à pH 4,0 et la toxine est séparée de la phase aqueuse par partition contre l'acétate d'éthyle (la phase aqueuse retient la majeure partie des pigments) ;

— une dernière purification sur colonne de gel de silice, éluee par le mélange benzène-acétate d'éthyle, peut être nécessaire si le résidu est encore trop riche en lipides ;

— la PATULINE est finalement isolée par chromatographie bi-dimensionnelle, développée dans deux systèmes de solvants (toluène/acétone/chloroforme = 45/35/25 ; toluène/acétate d'éthyle/acide formique = 6/3/1) ; la présence de la mycotoxine est confirmée par pulvérisation d'une solution à 0,5 p.100 de méthyl-3-benzo-2-thiazolone hydrazone hydrochlorate (MBTH) qui transforme la molécule en

un dérivé jaune, nettement visible sur le chromatogramme examiné en lumière ultra-violette à 360 nm.

Ce protocole permet de récupérer 60 à 70 p.100 de la PATULINE ajoutée dans la pâte d'un saucisson sec et le seuil de détection de la toxine est voisin de 120 ppb.

III. CONDITIONS DE PRODUCTION DE LA PATULINE DANS LES SAUCISSONS SECS

Lorsque la surface de saucissons fraîchement embossés est ensemencée par une suspension riche de spores de *Penicillium granulatum* (10^4 - 10^5 spores/cm²), la moisissure se développe abondamment et, après 5-6 jours, on observe des colonies étendues dont les spores ont une teinte bleu clair ; dans les jours suivants, l'enduit mycélien prend une couleur bleu grisâtre.

Divers essais, associant des températures et une humidité relative variables, permettent de constater que les conditions de développement les plus favorables pour *P. granulatum* sont : température = 26° C, humidité relative = 80-86 p.100. La moisissure se développe encore à 15° C, à condition que l'humidité de l'ambiance atteigne 86 p. 100.

Comme dans le cas de la production de l'ochratoxine, il se révèle que la teneur en eau du substrat joue un rôle essentiel dans les possibilités de développement de *P. granulatum* : quand l'H.P.D. (humidité du produit dégraissé) du saucisson atteint 60 p.100, la croissance fongique devient impossible. Si le saucisson a été contaminé au début de sa fabrication, même si les conditions de milieu sont favorables (26° C ; H.R. 86 p.100), il y a un arrêt de croissance des colonies de *P. granulatum* vers le 8^e-10^e jour, quand l'H.P.D. du substrat atteint 60 p.100.

Dans tous les échantillons de saucissons sur lesquels *P. granulatum* s'est développé de façon abondante, la PATULINE n'a jamais été trouvée qu'à l'état de traces (100 à 120 ppb, à la limite du seuil de détection de la méthode utilisée), malgré le haut pouvoir toxigène de la souche utilisée. Les essais d'extraction ayant été réalisés du 1^{er} au 15^e jour de maturation des saucissons, cela semble démontrer que, s'il y a production de PATULINE par *P. granulatum* dans les saucissons, la toxine est rapidement inactivée par le substrat.

CIEGLER a déjà signalé ce phénomène ; il ne retrouve plus de PATULINE dans le saucisson après un délai de 24 h. Cela serait dû à une « inactivation » de la mycotoxine par les groupements sulfhydryles de divers acides aminés et la molécule, modifiée par une réaction d'addition entre les groupements —SH et sa fonction lactone insaturée, ne peut plus être mise en évidence.

IV. INACTIVATION DE LA PATULINE DANS LE SAUCISSON

Des quantités connues de PATULINE sont incorporées, à un taux élevé (6250 ppb), dans une mée de saucisson et des essais d'extraction de la toxine sont réalisés à intervalles réguliers, dans les heures suivantes : la figure 1 démontre que rapidement la PATULINE n'est plus retrouvée dans l'échantillon (environ 300 ppb après 8 h).

Pour déterminer si cette disparition de la PATULINE dans le substrat saucisson sec correspond en même temps à une perte de sa toxicité, des souris de souche IFFA CREDO, d'un poids moyen de 30 g, reçoivent chaque jour pendant 30 jours comme aliment exclusif du saucisson auquel vient d'être ajoutée la PATULINE, au taux de 6250 ppb.

Cet aliment est très bien accepté et les animaux d'expérience en consomment environ 10 g par jour. Compte tenu de la toxicité per os de la PATULINE chez la souris (DL 50 = 40 mg/kg de poids corporel environ, selon ESCOULA), la quantité théorique de toxine absorbée par les sujets représente environ 1/20 de la dose toxique aiguë.

La courbe pondérale des animaux soumis à ce traitement n'a pas été modifiée par rapport à celle de sujets témoins ; l'analyse histologique des organes sensibles (encéphale, poumon, foie, rein, rate, tube digestif) n'a révélé aucune anomalie.

Il est peut-être hasardé de conclure que la PATULINE subit une véritable « détoxification » dans les saucissons, mais il apparaît qu'elle est dépourvue de toxicité, chez la souris, lors de consommation prolongée d'aliments contenant des taux beaucoup plus élevés que ceux qu'on peut retrouver dans des saucissons dont la surface est envahie par des colonies de *P. granulatum*.

CONCLUSION

La moisissure *P. granulatum* peut se développer abondamment à la surface des saucissons, au cours de la maturation, quand les conditions de milieu sont favorables (température de 20-25° C ; humidité relative de 80-86 p. 100 ; teneur en eau du substrat élevée, avec une H.P.D. supérieure à 60 p. 100).

Malgré la présence de colonies étendues du champignon, la PATULINE n'est jamais retrouvée à un taux élevé. Avec une méthode d'extraction permettant de mettre en évidence des taux de l'ordre de 120 ppb, les quantités de mycotoxine identifiées dans les saucissons secs sont toujours à la limite du seuil de détection.

Cette faible contamination du saucisson sec par la PATULINE peut s'expliquer par les phénomènes d'inactivation de la molécule par les groupements sulfhydryles des constituants du substrat. Cette inactivation semble s'accompagner d'une perte du pouvoir pathogène de la mycotoxine.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] ALPERDEN (I.), MINTZLAFF (H. J.), TAUCHMAN (F.) und LEISTNER (L.). — Untersuchungen über die Bildung des Mykotoxins Patulin in Rohwurst. *Fleischwirtschaft*, 1973, 53, 566-568.
- [2] BECHET (J.) et THONART (P.). — Les principales mycotoxines et leur importance dans les produits alimentaires. Centre de Documentation Internationale des Industries Utilisatrices de Produits Agricoles. Série Synthèses bibliographiques, 1978, 20.
- [3] BENARD (G.) et LABIE (C.). — Moisissures et mycotoxines dans les salaisons de viandes sèches. *Rev. Méd. Vét.*, 1977, 128, 975-995.
- [4] CIEGLER (A.), MINTZLAFF (H. J.), MACHNICK (W.) und LEISTNER (L.). — Untersuchungen über das Toxinbildungvermögen von Rohwürsten isolierter Schimmelpilze der Gattung *Penicillium*. *Fleischwirtschaft*, 1972, 52, 1311-1314.
- [5] CIEGLER (A.), BECKWITH (A. C.) and JACKSON (L. K.). — Teratogenicity of patulin adducts formed with cysteine. *Appl. and Environmental Microbiol.*, 1976, 31, (5), 664-667.
- [6] ESCOULA (L.). — Moisissures toxigènes des fourrages ensilés : présence de patuline dans les fronts de coupe d'ensilages. *Ann. Rech. Vét.*, 1974, 5, (4), 423-432.
- [7] ESCOULA (L.). — Moisissures toxigènes des fourrages ensilés. II. Cinétique « in vitro » de la biosynthèse de patuline et d'acide byssoclamique par *Byssoclamis nivea*, en milieu liquide. *Ann. Rech. Vét.*, 1975, 6, (2) 155-163.
- [8] ESCOULA (L.). — Moisissures toxigènes des fourrages ensilés. IV. Production de patuline en milieu liquide par des espèces fongiques isolées des ensilages. *Ann. Rech. Vét.*, 1975, 6, 303-310.
- [9] FIEDLER (Von H.). — Schimmelpilzdiagnostik und Mycotoxinnachweis an Fleischprodukten. *Archiv. Lebensmittelhygiene*, 1973, 24, 180-184.
- [10] HOFFMAN (K.), MINTZLAFF (H. J.), ALPERDEN (L.) und LEISTNER (L.). — Untersuchungen über die Inaktivierung des Mykotoxins Patulin durch sulfhydrylgruppen. *Fleischwirtschaft*, 1971, 51, 1534-1536.
- [11] LABIE (Ch.) et TACHE (Mme S.). — Etude sur les conditions de production d'ochratoxine A dans les saucissons secs. *Bull. Acad. Vét. de France*, 1979, 52, 553-559.
- [12] LEISTNER (L.) and AYRES (J. C.). — Molds and meats. *Fleischwirtschaft*, 1968, 48, 62-65.
- [13] MOREAU (Cl.). — Moisissures toxiques dans l'alimentation. Masson et Cie éd., Paris, 1971, t. 1, 471 p. (2^e éd.).
- [14] MOREAU (Cl.). — Moisissures et mycotoxines dans les viandes et produits de charcuterie. Faculté de Sciences et Techniques, Brest, 1978.
- [15] POHLAND (A. E.) and ALLEN (A.). — Analysis and chemical confirmation of patuline in grains. *J. Assoc. Offic. Anal. Chemists*, 1970, 53, (4), 686-687.
- [16] POHLAND (A. E.) and ALLEN (R.). — Stability, studies with patuline. *J. Assoc. Offic. Anal. Chemists*, 1970, 53, (4), 688-691.
- [17] REISS (J.). — Detection of patuline by thin layer chromatography. *Chromatographia*, 1971, 4, 576-577.

- [18] REISS (J.), — N-methylbenthiazolone(2)-hydrazone as a sensitive spray reagent for patuline. *Chromatographia*, 1973, 86, 190.
- [19] REISS (J.). — Mycotoxins in foodstuffs. VII. Inactivation of patulin in whole wheat by sulphhydryl compounds. *Ann. Assoc. Cereal Chemists*, 1976, 53, (2), 150-152.
- [20] SCOTT (P. M.) and SUMMER (E.). — Stability of patulin and penicillic acid in fruit juices and flour. *J. Agr. Food Chem.*, 1968, 16, (3), 483-485.
- [21] SCOTT (P. M.), MILES (W. F.), TOFT (P.) and DUBE (J. G.). — Occurrence of patuline in apple juice. *J. Agr. Food Chem.*, 1972, 20, 450-451.
- [22] SCOTT (P. M.), LAWRENCE (J. W.) and VAN WALBEEK (W.). — Detection of mycotoxins by thin layer chromatography. Application to screening of fungal extracts. *Appl. Microbiol.*, 1970, 20, 839-842.
- [23] SCOTT (P. M.) and KENNEDY (B. P. C.). — Improved method for the thin layer chromatographic determination of patulin in apple juice. *J. Assoc. Offic. Anal. Chemists*, 1973, 56, (4), 813-816.
- [24] SCOTT (P. M.). — La patuline. *I.N.S.E.R.M.*, 1975, 46, 79-88.
- [25] SCOTT (P. M.). — Penicillium mycotoxins. Mycotoxic fungi, mycotoxins, mycotoxicoses. Willie & Morehouse-Dekker ed., New York, 1977, 283-356.
- [26] STOLOFF (L.), NESHEIM (S.), YIN (L.), RODRICKS (J. V.), STACK (M.) and CAMPBELL (A. D.). — A multimycotoxin detection method for aflatoxins, ochratoxins, zearalenone, sterigmatocystin and patulin. *J. Ass. Off. Anal. Chem.*, 1971, 54, (1), 91-97.
- [27] STOTT (W. T.) and BULLERMAN (L. B.). — Patulin: A mycotoxin of potential concern in foods. *J. Milk Food Technol.*, 1975, 38, (11), 695-705.
- [28] TAUCHMAN (F.), TOTH (L.) und LEISTNER (L.). — Eine halbquantitative methode für die Bestimmung von Patulin in Fleisch und Fleischwaren. *Fleischwirtschaft*, 1971, 7, 1079-1080.



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



M. ROUSSEAU intervient.

L'ordre du jour étant épuisé, la séance est levée à 18 h.
