

Etude de L'incidence de la Torrification Appliquée au Café Vert Sur la Réduction du Taux de L'ochratoxine a (OTA) dans le Produit Fini

Dano Djédjé. Sébastien

*Laboratoire de Toxicologie et Hygiène Agro-industrielle
Université de Cocody, BP V 34 Abidjan Côte d'Ivoire*

Manda Pierre

*Laboratoire de Toxicologie et Hygiène Agro-industrielle
Université de Cocody, BP V 34 Abidjan Côte d'Ivoire*

Kouadio James. Halbin

*Laboratoire de Toxicologie et Hygiène Agro-industrielle
Université de Cocody, BP V 34 Abidjan Côte d'Ivoire
E-mail: jameshalbink@yahoo.fr
Tel: 02 41 61 60*

Diakité Aissata

*Laboratoire de Toxicologie et Hygiène Agro-industrielle, Université de Cocody
BP V 34 Abidjan Côte d'Ivoire, Département de pharmacoépidémiologie
Faculté de Pharmacie, Université de Montréal, Québec
CP 6128 succursale Centre ville, Canada*

Droh Kouï Jérôme

*Laboratoire de Toxicologie et Hygiène Agro-industrielle
Université de Cocody, BP V 34 Abidjan Côte d'Ivoire*

Kouassi Kouakou Serge

*Laboratoire de Toxicologie et Hygiène Agro-industrielle
Université de Cocody, BP V 34 Abidjan Côte d'Ivoire*

Dembélé Adjourma

Laboratoire Central d'Agrochimie et d'Ecotoxicologie LCAE/ LANADA

Abstract

Ochratoxin A (OTA) is a mycotoxin produced by mould that mainly belongs to *Aspergillus* and *Penicillium* genera. OTA is a food contaminant generally found in cereals, oleaginous, coffee, cocoa, dried fruits, beans, beer, and its occurrence seems to be favoured by specific climatic conditions like and sub-tropical. Nephropathy, cancer and immunotoxicity are the major toxic effects caused by OTA.

Some industrial processes of food transformation, like roasting, can be very efficient for detoxication, especially regarding OTA. Roasting is an industrial process which consist on treating coffee with high temperature during a relatively short time.

The aim of our study was to assess the effect of heat on the reduction of OTA in roasted coffee. We thus, determined the level of OTA in green coffee from Côte d'Ivoire before and after roasting process.

The method we used for the determination of OTA was the one recommended by the Comité Européen de Standardisation (CEN, comité 275/WG5 technique « biotoxine ») for the analysis of coffee samples. After extraction with a mixed solution of methanol, acetonitrile and sodium bicarbonate, OTA was purified on an immunoaffinity column and quantified by High Performance Liquid Chromatography using a fluometric detector.

The analysis showed that the mean level of OTA was 22.87 ppb for coffee before roasting process and 6.17 ppb after roasting process. Our results indicated that a roasting at 200°C during 20 minutes can lead to a drop of 70,02% in the initial level of OTA. These findings suggest that roasting is an efficient method for the detoxication of coffee regarding OTA..

Keywords: Ochratoxin A, Coffee, HPLC, Roasting, Côte d'Ivoire.

1. Introduction

L'ochratoxine A (OTA), mycotoxine produite par les moisissures des genres *Aspergillus* et *Penicillium*, est un contaminant alimentaire naturellement retrouvé dans divers produits agricoles tels que les céréales, les oléagineux, les fruits secs, le café et le cacao. L'OTA étant thermostable, elle peut être retrouvée dans les produits finis issus de les matières premières agricoles contaminées même après une transformation industrielle bien menée. Dès lors, la teneur en OTA devient un élément critique dans la qualité des denrées alimentaires. En effet, cela peut constituer une grande perte si une denrée alimentaire fortement contaminée par l'OTA est déclarée impropre à la consommation humaine et/ou animale. Concernant le café, on estime que 18% de café produit dans le monde sont contaminés par l'ochratoxine A soit une perte de plus de vingt (20) milliard par an (Sangaré et al., 2006), ce qui est considérable pour les pays producteurs de café. La Côte d'Ivoire, avec une production annuelle de 0.32 millions de tonnes, est huitième pays producteur mondial de café. Ainsi, dans ce pays comme dans d'autres pays producteurs de café, la garantie d'une absence ou d'une faible contamination du café par l'ochratoxine A est une préoccupation majeure. En effet, la parfaite connaissance des nombreuses pathologies telles que le cancer et la néphropathie provoquées par l'ochratoxine A chez l'homme et les animaux d'élevage a occasionné la mise en place d'une réglementation sur le taux maximal admissible d'OTA dans le café sur le marché international. Par conséquent, les études actuellement menées en Côte d'Ivoire sur l'OTA, sont essentiellement consacrées à la recherche des bonnes pratiques agricoles devant garantir un faible taux de contamination du café vert par l'OTA mais aussi à l'évaluation de l'efficacité des méthodes de détoxification de la mycotoxine dans le café.

Concernant la détoxification ou l'élimination des mycotoxines en général dans les denrées alimentaires, plusieurs méthodes sont proposées par divers auteurs. Ces méthodes de détoxification peuvent être physiques, chimiques ou biologiques et sont relativement efficaces. Parmi ces méthodes de détoxification, la torréfaction, peut conduire à une réduction du taux de l'OTA dans le café de l'ordre de 30 à 90% selon les conditions de torréfaction (Micco et al., 1989; Wilkens et al., 1999; Stegen et al., 2001). En effet, les deux facteurs variables et essentiels à la torréfaction sont la température et le temps d'incubation. Selon les auteurs, la température peut varier entre 140° et 210°C avec un temps d'incubation variant entre 20 min et 30 minutes (Micco et al., 1989; Chu et al., 1975; Wilkens et al., 1999; Stegen et al., 2001). Dans notre étude, nous avons réalisé la torréfaction du café

vert à 200°C pendant 20 minutes comme le préconise la Société Abidjanaise de Torréfaction pour l'obtention du café « mi-noir ».

L'objectif de la présente étude, est de contribuer à apporter les preuves de l'efficacité de la torréfaction comme moyen de détoxification de l'ochratoxine A dans le café. Ainsi, l'OTA est recherchée dans le café avant et après torréfaction.

2. Matériel et Méthodes

2.1. Matériel

La solution standard d'ochratoxine A à 100 ng/ml, le tampon PBS et la colonne d'immunoaffinité spécifique à l'OTA proviennent de R. BIOPHARM (France). Les solvants acétonitrile et méthanol, de qualité analytique, proviennent de SDS. Les réactifs acide acétique glacial et bicarbonate de sodium également de qualité analytique sont de SIGMA.

L'appareillage utilisé pour le dosage de l'OTA est une chaîne de chromatographie liquide haute performance (CLHP) de marque SHIMADZU munie d'un détecteur fluorimétrique (RF-10XL) et d'un intégrateur (C-R8A) également de marque SHIMADZU. La phase stationnaire de la chaîne de CLHP est une colonne analytique Spherisorb C 18 S5 ODS 2,5um (25 cm ×4,6 mm) munie d'une précolonne.

2.2. Méthodes

La torréfaction du café a été réalisée à 200 degré pendant 20 minutes en vue de l'obtention du café mi-noir.

2.2.1. Echantillonnage

Les différents échantillons de café ont été prélevés à la Société Abidjanaise de Torréfaction (SAT) sise à Treichville (ABIDJAN). Le plan d'échantillonnage adopté est celle de la directive 2005/5/CE appliqué au café vert. Dans cette directive, sont clairement définies les notions de lot (quantité identifiable d'une denrée alimentaire avec des caractéristiques communes), d'échantillon élémentaire (quantité de matière prélevée en un seul point sur le lot) et d'échantillon global (somme des échantillons élémentaires).

Le café vert utilisé dans cette étude est du genre Robusta sous grade « brisure », c'est-à-dire contenant 30 à 40% de grains noirs susceptible d'être fortement contaminé par l'OTA. Ainsi, avec ce café fortement contaminé, nous pouvons mieux apprécier l'action de la torréfaction sur le mycotoxine.

Nous avons défini 02 points de prélèvement dont l'un avant la torréfaction et l'autre après la torréfaction du café:

- Premier point: au niveau de la chambre d'alimentation (avant la torréfaction).

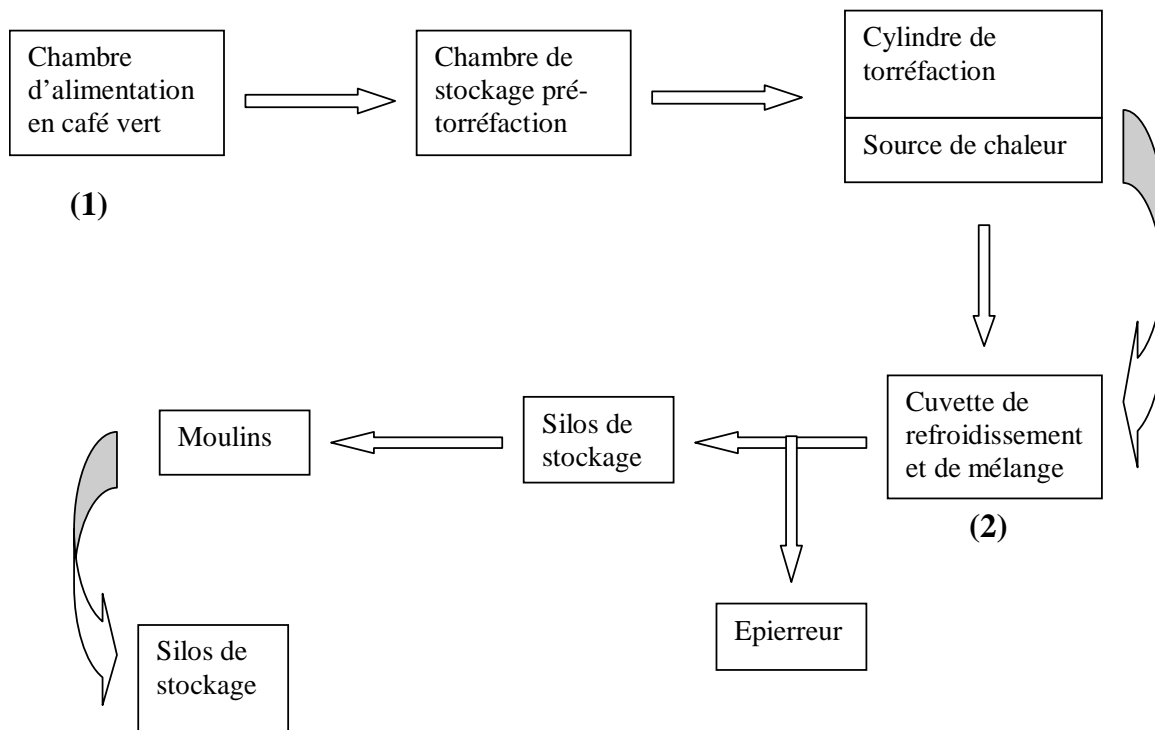
10 échantillons élémentaires de 100 g chacun soit 1kg d'échantillon global de café vert sont prélevés à divers endroits de 5 sacs de 40kg chacun de café représentant le lot. Ici, le lot de départ est une « broche », c'est-à-dire la masse totale de café vert (200kg) que peut contenir le torréfacteur.

- Deuxième point: au niveau de la cuvette de refroidissement et de mélange.

Après torréfaction, refroidissement et homogénéisation un échantillon global (1kg) de café torréfié est prélevé à divers endroits de la cuvette de refroidissement.

En définitive, nous obtenons d'une part un échantillon global (1kg) de café non torréfié et d'autre part un échantillon global (1kg) de café torréfié. L'opération de constitution des échantillons globaux a été répétée 47 fois. Ainsi, notre étude a porté sur 47 échantillons globaux pour le café non torréfié et 47 échantillons globaux pour le café torréfié.

Figure 1: Schéma du circuit du process industriel (1) et (2) représentent les deux points de prélèvement de café.



2.2.2. Préparation des Échantillons Pour Analyse

Après un broyage fin du café vert, l'échantillon global (1kg) est homogénéisé dans un mixer (type Waring Blender) avant l'analyse. De cet échantillon global bien mélangé, nous en prélevons 5g pour le dosage de l'OTA par CLHP.

De même pour le café torréfié, de l'échantillon global (1kg), après mouture, nous en prélevons 5g pour le dosage de l'OTA par CLHP.

Au total, 47 échantillons de 5g de café vert et 47 échantillons de 5g de café torréfié ont été préparés pour le dosage de l'ochratoxine A.

2.2.3. Extraction et Purification

Une quantité de 5g de café (vert ou torréfié) finement broyé est introduit dans le mixer (type Waring Blender) auquel on ajoute 100 ml de bicarbonate de sodium aqueux à 1%. Ce mélange est mixé pendant 2 minutes. Après décantation, le mélange est filtré sur papier Whatman N° 4. 5ml de ce filtrat est dilué avec 5 ml de tampon PBS, on obtient ainsi 10 ml d'un mélange que l'on passe au travers de la colonne d'immunoaffinité à un débit de 1 à 2 gouttes par seconde. Ainsi, les molécules d'OTA présentes dans le filtrat de 10ml se trouvent piégées par les anticorps fixés sur la matrice de la colonne.

Après rinçage de la colonne d'immunoaffinité avec 20 ml de tampon PBS afin d'éliminer les impuretés, l'OTA est éluée lentement par 1,5 ml d'un mélange acide acétique -méthanol (2: 98, v/v) à un débit de 1 à 2 gouttes par seconde. La colonne est ensuite rincée avec 1,5 ml d'eau distillée pour obtenir un volume final de 3 ml. Cet éluât de 3ml, après agitation au vortex est prêt pour le dosage de l'OTA par CLHP.

2.2.4. Analyse Chromatographique

La détection et la quantification de l'OTA sont effectués par chromatographie liquide haute performance munie d'un détecteur fluorimétrique. Avec un débit de 1ml/min, la phase mobile constituée du mélange Acétonitrile-Eau-Acide acétique glacial (55: 43: 2, v/v/v), véhicule la molécule

d'OTA dans toute la chaîne chromatographique dont la phase stationnaire est une colonne Spherisorb C 18 S5 ODS 2,5 μ m (25 cm \times 4,6 mm) munie d'une precolonne. La détection de l'OTA est effectuée aux longueurs d'onde d'excitation (333nm) et d'émission (460nm). La quantification de l'OTA est réalisée à partir de la surface du pic d'absorption et les taux d'OTA sont déterminés dans les échantillons selon la courbe d'étalonnage.

Une qualification de la méthode analytique par CLHP proposée par le Comité Européen de Standardisation (CEN, comité 275/WG5 technique « biotoxine ») a été effectuée dans notre laboratoire selon les critères de validation notamment la linéarité, la répétabilité, l'exactitude, la limite de détection avant le dosage de l'OTA dans le café. Le dosage a été effectué par étalonnage externe.

3. Résultats

3.1. Résultat de la Qualification à Partir des Tests de Validation

La linéarité de la surface des pics en fonction de la concentration a été établie pour des concentrations comprises entre 0ng /ml et 40ng/ml. Le coefficient de détermination r^2 est égal à 0.9998. L'ordonnée à l'origine n'est pas significativement différente de zéro ($p=0.03$).

La répétabilité de l'analyse chromatographique a été vérifiée sur:

- la solution de référence à deux niveaux de concentration (10 et 25 ng/ml) pour $n = 10$.
- un extrait de café ($n = 10$)

La répétabilité de l'ensemble de la procédure a été déterminée en réalisant six extractions différentes d'un même échantillon de café. Chaque extrait est analysé 3 fois. Dans chaque cas, le coefficient de variation (CV) qui est l'expression mathématique de la répétabilité a été calculé. Les coefficients de variation (CV) pour les concentrations de 10ng/ml et de 25ng/ml respectivement de 0,71% et 0,65% sont inférieurs à 2%, valeurs généralement admises en analyse quantitative des solutions de références. Le CV pour l'extrait de café vert est de 2,83 et celle du café moulu est de 3,74

L'exactitude de la procédure d'analyse a été déterminée par la méthode des ajouts dosés. Nous avons effectué trois ajouts de différentes concentrations 25ng, 50ng et 100ng à des échantillons de café non contaminés. Chacun des échantillons ayant été dosé trois fois. Le recouvrement moyen était de 95,22%.

La limite de détection a été évaluée à partir des mesures de surfaces de pics de dilution successives d'une solution de référence d'OTA. Elle a été évaluée à 0,1ng/mg.

Figure 2: Pics de l'ochratoxine A (1) standard et (2) dans un échantillon de café

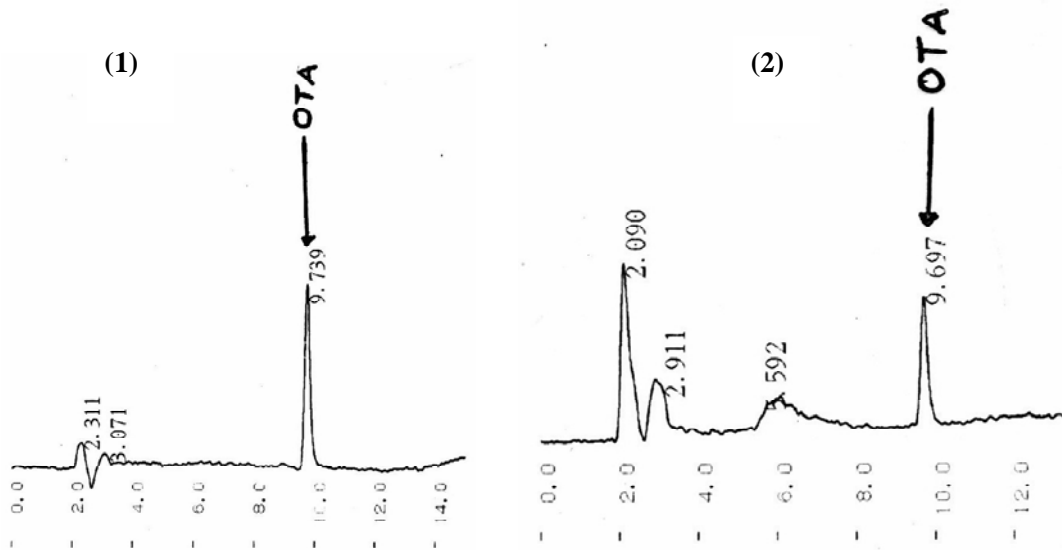
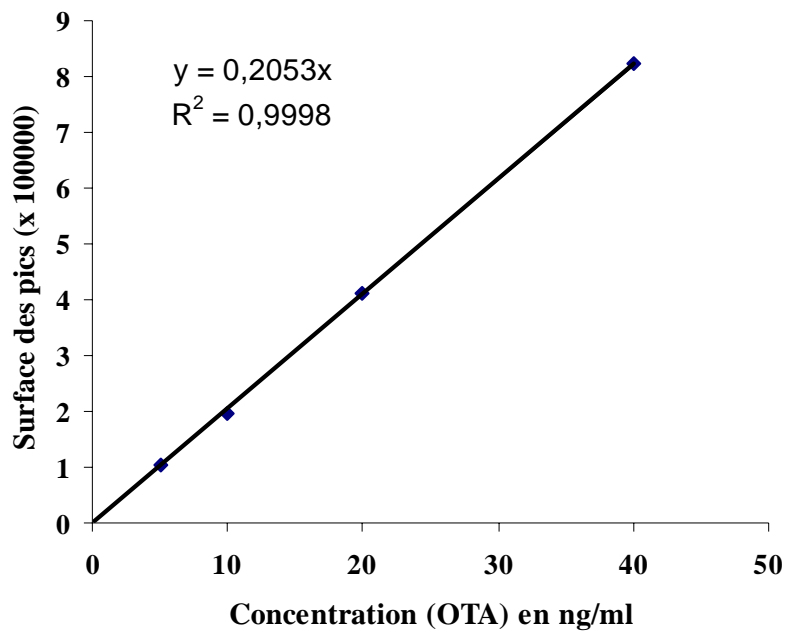


Figure 3: Courbe d'étalonnage avec une gamme de concentrations comprise entre 5 et 40ng/ml.



3.2. Résultats du Dosage de l'OTA dans les Echantillons de Café

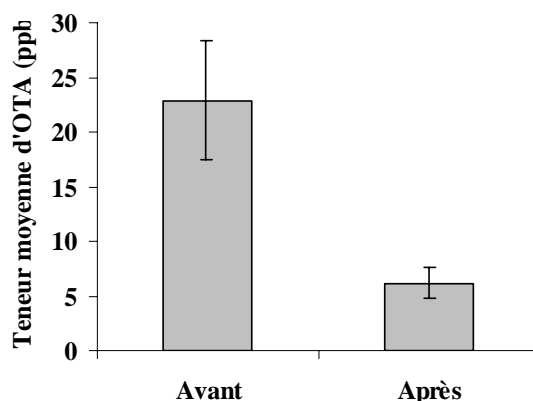
Tableau 1: Teneur en ppb d'OTA dans les différents échantillons avant et après torréfaction et pourcentage de réduction

N°	OTA avant Torréfaction (ppb)	OTA Après Torréfaction (ppb)	% de Réduction de l'OTA
1	15,29	5,58	63,50
2	17,56	6,89	60,76
3	28,92	5,67	80,39
4	29,21	8,08	72,33
5	18,17	6,03	66,81
6	21,93	7,71	64,84
7	30,59	5,78	81,10
8	26,10	8,40	67,80
9	25,62	6,56	74,39
10	23,28	6,86	70,53
11	22,90	7,33	67,99
12	31,29	3,61	88,46
13	17,03	5,95	65,06
14	25,41	5,05	80,12
15	16,08	4,70	70,77
16	20,19	6,18	69,39
17	30,34	4,83	84,08
18	15,68	5,75	63,32
19	12,08	3,66	69,70
20	19,19	6,82	64,46
21	20,38	4,85	76,20
22	30,69	10,68	65,20
23	20,53	3,81	81,44
24	24,82	6,43	74,09
25	17,20	6,45	62,50
26	28,70	7,06	75,40
27	23,46	5,07	78,38
28	30,55	6,86	77,54
29	17,27	6,00	65,25
30	18,74	6,10	67,45
31	27,16	8,61	68,29
32	20,51	6,07	70,40
33	26,25	4,09	84,42
34	27,25	5,49	79,85
35	19,82	5,32	73,15
36	21,60	6,40	70,37
37	17,74	4,70	73,50
38	23,69	7,29	69,22
39	31,04	8,04	74,10
40	26,58	5,44	79,53
41	27,66	7,18	74,04
42	28,90	8,31	71,24
43	30,73	8,05	73,80
44	19,25	5,85	69,61
45	17,20	4,99	70,99
46	15,77	5,55	64,80
47	14,57	3,99	72,61

Tableau 2: Incidence de la torréfaction sur la réduction de la teneur en OTA

	Avant Torréfaction	Après Torréfaction	Pourcentage de Réduction (OTA)
Moyenne ± Ecart type	22,87 ± 5,47	6,17 ± 1,46	72,11 ± 6,46
Médiane	22,9	6,03	70,99
Etendue	12,08 – 31,29	3,61 – 10,68	60,76 – 88,46

Figure 4: Teneur moyenne en ppb d'OTA dans le café avant torréfaction (22.87ppb) et après torréfaction (6.17ppb) avec un pourcentage de réduction de **73%**. $p < 0.001$ par le test de Student.



4. Discussion

Dans le but de mieux apprécier l'action de la torréfaction, nous avons travaillé sur du café de sous grade (qualité inférieure), c'est à dire du café susceptible d'être contaminé par l'OTA en lieu et place du café destiné à l'exportation, le café de meilleure qualité. Les taux observés lors de cette étude ne représentent donc pas le niveau de contamination en Côte d'Ivoire. La teneur moyenne en OTA du café analysé est très élevée (22,87ppb) avec un maximum de pic de 31,29ppb. Ces valeurs indiquent que les opérations de classification en différents grades du café (grades 1, 2, ou sous-grade) constituent un facteur important permettant déjà d'identifier le café susceptible d'être fortement contaminé par l'OTA. En effet, sur les 47 échantillons de café analysés, plus de 63% ont un taux d'OTA supérieur à 20ppb. Cependant, le dosage de l'OTA par des méthodes fines telle que la chromatographie liquide haute performance (CLHP) apportent plus de précision quant à l'identification du café fortement contaminé par l'OTA.

Notre étude, effectuée sur du café fortement contaminé par l'OTA (22,87ppb en moyenne), a consisté à évaluer l'effet de la chaleur sur la détoxification de la mycotoxine. Certes, l'ochratoxine A est thermostable, mais elle peut être détruite en partie à des températures allant de 200 à 300°C (Chu et al., 1975; Harwig et al., 1974). Ainsi, nos conditions de torréfaction du café (température: 200°C pendant 20minutes) telle que proposée par la Société Abidjanaise de Torréfaction (SAT), ont permis d'estimer le réel niveau de destruction de la molécule d'OTA quand la torréfaction est faite en vue de l'obtention du café « mi-noir ». Avec 22,87ppb d'OTA dans le café vert, nous retrouvons seulement 6.17ppb dans le café torréfié soit plus de 73% de diminution du taux d'OTA. Ce résultat corrobore avec les résultats des travaux antérieurs qui rapportent une réduction du taux de l'OTA dans le café de l'ordre de 30 à 90% selon les conditions de torréfaction (Micco et al., 1989; Wilkens et al., 1999; Stegen et al., 2001). Cependant, au cours du processus de torréfaction en industrie, la pellicule enveloppant le grain de café se détache sous l'effet de la chaleur et est ensuite éliminée par ventilation avant la mouture en café moulu. Or de récents travaux effectués dans notre laboratoire sur les fèves de cacao (Dano et al., 2007), ont montré que la coque des fèves de cacao contenait plus de 92% de la teneur totale de l'OTA dans la fève. Ainsi, le décorticage c'est à dire l'élimination de la coque est l'opération industrielle la plus intéressante dans la diminution de la teneur en OTA dans le chocolat, un

des produit fini du cacao. La torréfaction de la fève de cacao à 140°C pendant 30min n'entraînait que 30% de réduction du taux d'OTA (Dano et al., 2007). Par conséquent, les 73% de réduction de la teneur en OTA après la torréfaction du café, nous autorisent à penser qu'il pourrait s'agir de la résultante de l'effet de la forte chaleur (200°C) et de la conséquence de l'élimination de la pellicule enveloppant le grain café. Cela reste à vérifier. Par ailleurs, il n'est pas aussi exclu que les autres opérations industrielles telles que la décaféination, le tri colorimétrique, le lavage à l'eau et la déshydratation à chaud ou la lyophilisation puissent être capables de réduire le taux d'OTA (Landell, 2003). Dans ce cas, évaluer l'impact de l'ensemble des opérations industrielles sur la teneur de l'OTA depuis le café vert jusqu'au produit fini, est donc une perspective d'étude à explorer.

En conclusion, nos résultats apportent une preuve supplémentaire de l'importance de la chaleur dans les processus de détoxification de l'OTA. Ainsi, la torréfaction en combinaison avec d'autres opérations industrielles peuvent constituer des moyens efficaces de détoxification de l'OTA dans le café. Cependant, le niveau de contamination des échantillons analysés est assez élevé. Même après torréfaction, seulement le quart des ces échantillons analysés donnent des résultats inférieurs à 5ppb, le taux maximum acceptable au niveau européen pour le café torréfié. Or, ce café Robusta sous grade « brisure », c'est-à-dire contenant 30 à 40% de grains noirs qui a servi à notre étude, est celui utilisé pour la consommation locale. Cela pourrait expliquer l'émergence toujours de plus en plus grandissante de l'insuffisance rénale en Côte d'Ivoire. Ainsi, une voie de recherche est ouverte pour apporter la preuve d'une telle hypothèse. Par ailleurs, les acteurs de la filière café cacao en Côte d'Ivoire sont interpellés sur la nécessité de prendre des mesures de prévention contre la contamination des produits agricoles notamment le café par l'OTA.

References

- [1] Chaminade P., Ferau DS., Baillet A., Ferrier D. (1995). Validation d'une méthode analytique de dosage par CLHP: test de robustesse et validation de la méthode. SFSTP Pharma. 5 (1): 17-35
- [2] Charmley L.L., Trenholn H.L. (2004). Les mycotoxines. Agence canadienne d'inspection des aliments/ section des de bétails: fiche de renseignement, 9: 1-9
- [3] Dano SD., Manda P., Kouadio JH. (2007). Impact des traitements industriels sur la teneur de l'ochratoxine A (OTA) dans le cacao. Communication affichée, Congrès de la SFT, 25 &26 Octobre, Montpellier (France).
- [4] Jorgensen K (1998). Survey of pork, poultry, coffee, beer and pulses for ochratoxin A. Food Addit., 15:550 -554
- [5] Laboratoire De La DGCCR (1999). Ochratoxine A dans les cafés, les produits céréaliers et les céréales. Bilan 1999; 2:1-4.
- [6] Landell Mill (2003). Etude de stratégies de prévention de la contamination du café et du cacao par l'ochratoxine en Côte d' Ivoire. Rapport provisoire, Août 2003.
- [7] Micco C., Grossi M., Miraglia M., Brera C. (1989). Study of the contamination of ochratoxin A of green and roasted coffee beans. Food Addit. Contam., 1989; 6; 333 – 339.
- [8] Organisation Internationale Du Caf (OIC). Rapport d' activité 1996.
- [9] Sangare-Tigori B.; Dem A. A.; Kouadio J. H.; Betbeder A.; Baudrimont I.; Dano D. S.; Moukha S.; Creppy E. E (2006). Preliminary survey of ochratoxin A in millet, maize, rice, and peanuts in Côte d'Ivoire from 1998 to 2002. Human and Experimental Toxicology, 25, 4
- [10] Steden G., Essens P., Van Der Lijn J (2001). Effect of roasted condition on ochratoxin A in coffee. Unpublishd manuscript.
- [11] Studer – Rohr I., Dietrich D R., Schlatter J. (1995). The occurrence of ochratoxin A in coffee. Food Chem. Toxicol.,; 33; 341 – 355.
- [12] Wilkens J.; Jorissen U. Degradation of ochratoxin A during manufacture of roasted coffee. In: 21 st Mycotoxin Workshop, Jena (Bg V V), June, 1999;7-9.