

TRUEFOOD — "Traditional United Europe Food" est un projet intégré financé par la Commission européenne dans le cadre du 6^e Programme de la Recherche et du Développement Technologique (RDT)
Contrat n° FOOD-CT-2006-016264.

Les informations contenues dans ce document reflètent uniquement l'opinion de l'auteur et la Communauté se décharge de tout usage qui puisse être fait des informations qui y figurent.

Les épidémies de listériose de 1992 et 1993 ont révélé la nécessité de compléter et d'améliorer les connaissances sur l'épidémiologie de *Listeria monocytogenes* dans la filière porcine. En raison de son écologie, de sa capacité à se multiplier jusqu'à 0 °C et de survivre jusqu'à des températures avoisinant 64 °C, *L. monocytogenes* peut se développer dans tous les environnements des industries de la filière viande.

Les différentes variétés de produits à base de viande de porc, notamment les produits fermentés, sont souvent contaminés par *Listeria spp* (Johnson et al. (1), 1990; Farber et Peterkin (2), 1991, Thevenot et al. (3), 2005). Malgré les effets barrières tels qu'un pH acide, une faible activité de l'eau ou une teneur en sel assez élevée, *Listeria spp* peut survivre et même croître dans les saucissons secs (Colak et al. (4), 2007).

Le devenir de l'agent pathogène au cours de la maturation des saucissons secs est conditionné par un certain nombre de facteurs comme la contamination initiale, l'adaptation de la souche à la matrice carnée, le procédé de fermentation,... En outre, dans ce type de produit, la prédominance des bactéries lactiques joue un rôle important dans l'inhibition de *L. monocytogenes* due à la production de métabolites comme les acides organiques ou les bactériocines (peptides à activités antibactériennes) (Zdolec et al. (5), 2007). L'étude de cette capacité des bactéries lactiques à produire des métabolites actifs contre les bactéries pathogènes et/ou d'altération est en pleine évolution ces dernières années pour leur utilisation comme cultures bio-protectrices (Rodgers (6), 2008). La biopréservation est une technologie émergente à fort potentiel d'applications dans diverses matrices carnées (porc, volaille, bœuf,...) qui permet de combiner le caractère 'naturel' des viandes et les règles de sécurité des aliments sans influencer sur les qualités organoleptiques.

Dans le cadre du programme de recherche (TRUEFOOD), une précédente étape avait permis de sélectionner trois souches de *Lactobacillus sakei* pour leur capacité à produire in vitro des bactériocines actives contre *L. monocytogenes*. Ici, l'objectif consistait à évaluer l'effet anti-*Listeria* de ces bactéries lactiques lors de fabrications pilotes de saucissons secs réalisées selon une technologie et une formulation standard.

La biopréservation a été pratiquée en amont par ajout des souches « bio-protectrices » sur la matière première (viande de porc). Il est à noter que l'espèce *L. sakei*, naturellement présente dans la viande, ne présente pas de danger pour la santé de l'homme.

Biopréservation du saucisson sec

Inhibition de la croissance de *Listeria monocytogenes* dans le saucisson sec par des bactéries lactiques

Dans le cadre du programme européen TRUEFOOD (Traditional United Europe Food — Contrat FOOD-CT-2006-016264), l'Adiv a étudié l'effet anti-*Listeria* de trois souches de *Lactobacillus sakei* ensemencées sur des viandes fraîches de porc destinées à la fabrication de saucissons secs. Ces trois bactéries lactiques, isolées de saucissons secs, avaient auparavant été sélectionnées pour :

- leur capacité à produire in vitro des bactériocines actives contre *Listeria monocytogenes*
- leur action anti-*Listeria* lors d'essais menés sur des muscles de porc conditionnés sous vide.

RIVOLLIER M., CHRISTIEANS S.
Adiv

Pôle Hygiène & Sécurité des Aliments
10, rue Jacqueline Auriol
ZAC Parc Industriel des Gravanches
63039 CLERMONT-FERRAND Cedex 2

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Les souches bactériennes

Les trois bactéries lactiques sélectionnées proviennent d'une collection de 106 souches de l'Adiv et appartiennent à l'espèce *L. sakei* : IM8, DM2 et DM3.

La souche cible *L. monocytogenes* B23.1 (sérotype 1/2) a été isolée de viande fraîche de porc (naturellement contaminée) et appartient également à la collection de l'Adiv.

Préparation des cultures bactériennes

Après une phase de revivification, chaque espèce bactérienne a été cultivée dans le milieu de culture approprié et incubée à la température optimale : milieu BHI (brain heart infusion) à 30 °C pour *L. monocytogenes* et MRS (Man Rogosa et Sharpe) à 30 °C pour les bactéries lactiques. Dans un second temps, les cultures pures (contrôlées par une coloration de Gram) ont été centrifugées, le culot obtenu a été lavé dans de l'eau peptonnée tamponnée (EPT) et la densité optique mesurée à 620 nm. Les dilutions ont ensuite été effectuées de façon à obtenir la concentration définie.

Taux et mode d'ensemencement

Les cultures ont été préparées de façon à inoculer les souches de bactéries lactiques à hauteur de 106-107 ufc/cm² et *L. monocytogenes* autour de 102-103 ufc/cm². Les viandes ont été ensemencées en surface par pulvérisation.

Conditions expérimentales de la fabrication pilote

En se basant sur un procédé industriel standard de fabrication de saucisson sec, la matière première était composée de 80% de maigre de porc et de 20% de gras (bardière). Le maigre a été inoculé artificiellement (challenge-test) par *L. monocytogenes* B23.1. Après une heure de contact à 4 °C, la viande de porc a été répartie en quatre lots dont trois ont été ensemencés avec les bactéries lactiques sélectionnées. Soit les quatre essais suivants :

- un lot ensemencé avec *L. monocytogenes* seule,
- un lot ensemencé avec *L. monocytogenes* + *L. sakei* DM2,
- un lot ensemencé avec *L. monocytogenes* + *L. sakei* DM3,
- un lot ensemencé avec *L. monocytogenes* + *L. sakei* IM8.

Parallèlement, quatre essais complémentaires ont été réalisés sans contamination en *L. monocytogenes* pour évaluer l'impact de la biopréservation sur la qualité organoleptique des produits comparés à des saucissons témoins. Soit les quatre essais suivants :

- un lot non ensemencé en *L. sakei*,
- un lot ensemencé avec *L. sakei* DM2,
- un lot ensemencé avec *L. sakei* DM3,
- un lot ensemencé avec *L. sakei* IM8.

Les différents lots ont été mis en conservation pendant 24 h à 4 °C.

Pour chaque lot, le gras a été ajouté au maigre, l'ensemble a été haché puis les différents ingrédients (sel, poivre, dextrose, nitrate de potassium) et un ferment commercial composé d'un *L. sakei* (rôle acidifiant), d'un *Staphylococcus xylosus* et d'un *Staphylococcus carnosus* (rôles aromatiques) ont été incorporés à raison de 10⁶ ufc/g. Après embossage dans des boyaux naturels (chaudins), les saucissons ont été trempés dans une solution de fleur de surface composée de *Penicillium nalgiovense* à hauteur de 10⁹ ufc/mL.

Pour l'ensemble des essais, trois répétitions correspondant à trois lots de matières premières ont été réalisées. Pour éviter les contaminations croisées, une phase de nettoyage et de désinfection des surfaces de travail et du matériel a été menée entre chaque inoculation.

Les produits embossés ont ensuite été soumis au procédé technologique industriel qui comprend trois étapes principales :

- la fermentation pendant six jours (T ° C : 22 °C - 24 °C, humidité relative : 85% -90%),
- le séchage jusqu'au trentième jour (T ° C : 13 °C, humidité relative : 72% -80%),
- la conservation à une température ambiante durant trente jours environ.

Suivis au cours du procédé

Au cours de la maturation, des analyses microbiologiques et physico-chimiques ont été réalisées en prélevant un saucisson entier aux temps suivants : J0 (jour de la fabrication), J3 (mi-fermentation), J6 (fin de la phase de fermentation), J10 (début de séchage), J15 et J20 (milieu de séchage), J30 (fin de séchage) et J60 (en cours de conservation).

Pour les analyses microbiologiques, les flores recherchées ont concerné : la flore lactique sur MRS (incubation à 30 °C pendant 72 h) et *L. monocytogenes* sur le milieu sélectif ALOA (Agar *Listeria* selon Ottaviani et Agosti) (incubation à 37 °C pendant 48 h).

Pour les analyses physico-chimiques, les suivis ont porté sur deux paramètres clés : le pH et l'activité de l'eau (Aw).

Tests organoleptiques

Au cours de la conservation des saucissons secs, une dégustation a été conduite par un jury interne à l'Adiv pour évaluer les propriétés sensorielles des produits ensemencés avec chacune des souches de *L. sakei* comparées aux produits témoins (sans ajout de bactéries lactiques dans la viande).

RÉSULTATS

Résultats physico-chimiques

Concernant l'évolution du pH, les essais avec ou sans biopréservation de la viande de départ étant additionnés avec un ferment commercial (additif classique des saucissons secs industriels), tous les produits ont montré une évolution normale du pH qui diminue rapidement au cours de la fermentation, passant de 5,83 à 5,1 (figure 1). Au cours du séchage, le pH des produits a progressivement augmenté pour atteindre une valeur de 5,7 en fin de conservation. Cette remontée est habituelle et est attribuée à la consommation de l'acide lactique par les levures et les moisissures qui se développent à la surface des boyaux au cours du procédé. Tout comme pour le pH, quel que

soit l'essai, l'activité de l'eau est passée en moyenne de 0,96 à 0,87 en fin de séchage (figure 2), valeurs représentatives d'un saucisson sec industriel.

Les données obtenues pour ces deux paramètres technologiques soulignent le bon déroulement du procédé de fabrication pour les différentes répétitions.

Résultats des suivis microbiologiques : Évaluation de l'effet bioprotecteur des souches de *Lactobacillus sakei* contre *Listeria monocytogenes*

Parmi les quatre essais ensemencés artificiellement en *L. monocytogenes*, l'essai mené sans addition de *L. sakei* sur la viande de départ montre une croissance en *L. monocytogenes* qui passe de 2 log₁₀/g à

2,5 log₁₀/g lors de la phase de fermentation. Au cours du séchage et de la conservation, cette concentration a peu évolué (2,25 log₁₀/g; figure 3). Dans cet essai, la bactérie lactique apportée par le ferment n'a pas eu d'influence sur la concentration initiale de *L. monocytogenes*.

Pour les trois essais qui ont fait l'objet de biopréservation des matières premières, l'addition du *L. sakei* IM8 a permis une réduction significative de 1 log₁₀/g du germe pathogène cible dès J20, diminution qui s'est maintenue au cours de la conservation. Pour les deux autres bactéries lactiques (DM2 et DM3), la réduction a été de 0,5 log₁₀/g à J20 et elle s'est également maintenue au cours du procédé (figure 3).

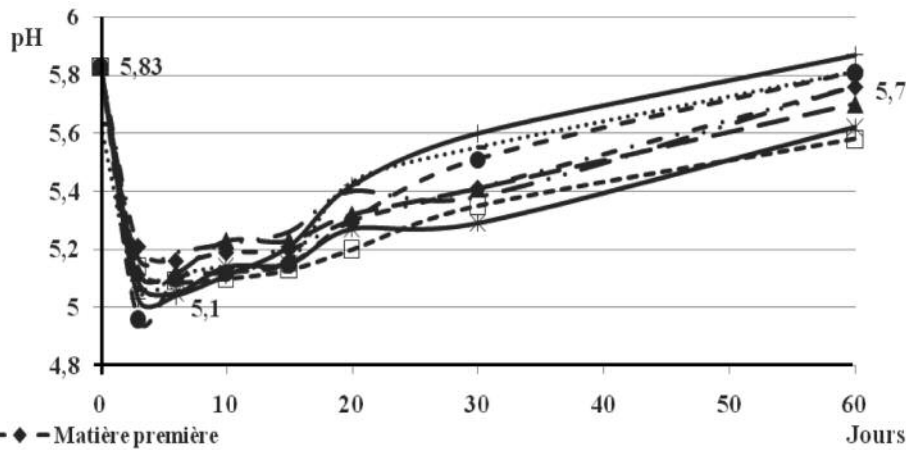


Figure 1
ÉVOLUTION DU pH AU COURS DU
PROCÉDÉ DE FABRICATION DE
SAUCISSONS SECS POUR LES
DIFFÉRENTS ESSAIS
(moyenne de trois répétitions)

Figure 2
ÉVOLUTION DE L'ACTIVITÉ DE L'EAU (A_w) AU COURS DU
PROCÉDÉ DE FABRICATION DE SAUCISSONS SECS POUR
LES ESSAIS MENÉS SANS *LISTERIA MONOCYTOGENES*
(moyenne de trois répétitions)

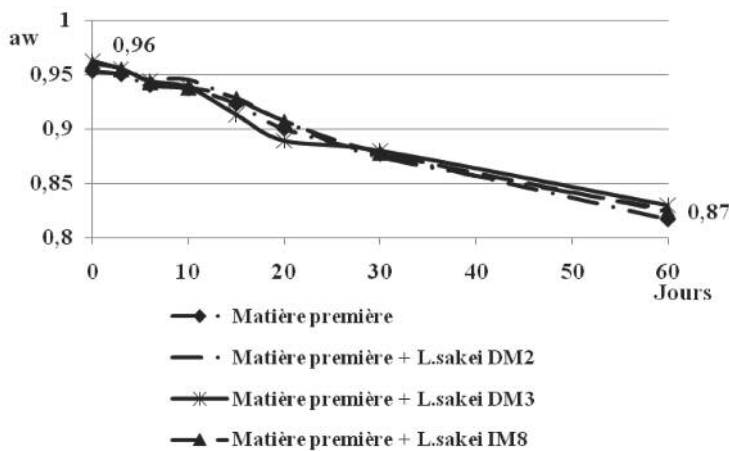
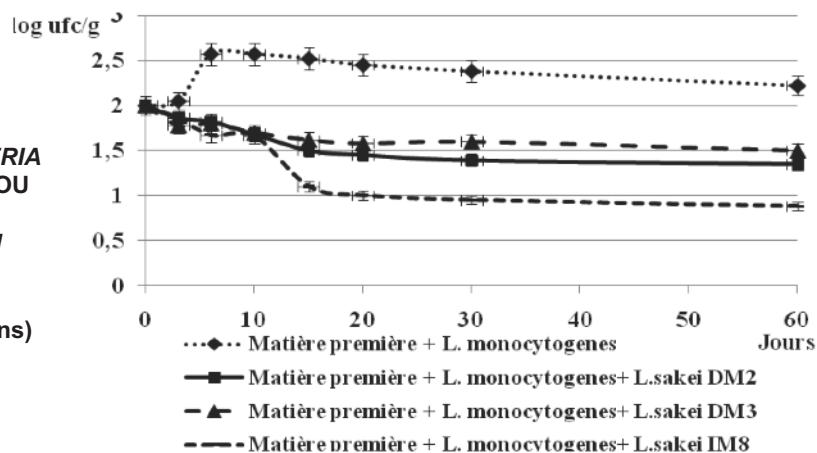
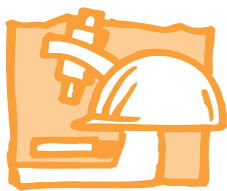


Figure 3
COMPORTEMENT DE *LISTERIA*
MONOCYTOGENES AVEC OU
SANS INOCULATION DE
LACTOBACILLUS SAKEI
(CULTURES
BIOPROTECTRICES)
(moyenne de trois répétitions)





Résultats de l'analyse sensorielle

La séance de dégustation réalisée par le jury expert interne à l'Adiv a permis de dégager les observations suivantes :

- Les saucissons ensemencés avec *L. sakei* IM8 ont été jugés comme étant satisfaisants pour les descripteurs sensoriels : goût, texture, flaveur, odeur, aspect... une couleur rouge moins caractéristique a cependant été mentionnée.
- Les saucissons ensemencés avec *L. sakei* DM2 ont été jugés moins satisfaisants pour les descripteurs sensoriels. Des essais complémentaires permettant d'optimiser la qualité organoleptique des produits sont envisagés pour 2009.
- Les saucissons ensemencés avec *L. sakei* DM3 ont été jugés satisfaisants et similaires aux produits témoins pour l'ensemble des descripteurs sensoriels. Son arôme a d'ailleurs été qualifié de « traditionnel ».

POUR CONCLURE

L'effet antagoniste des trois bactéries lactiques préalablement retenues pour leur production in vitro de bactériocines actives contre *L. monocytogenes* est validé in situ (via la viande de départ) avec une meilleure réduction ($1 \log_{10}/g$) pour *L. sakei* IM8, contre $0,5 \log_{10}/g$ pour les deux autres souches. Ce résultat montre qu'une action bioprotectrice en amont de la fabrication du saucisson sec, apporte une sécurité sanitaire, en complément du ferment, sans pour autant impacter sur les paramètres technologiques des produits. Néanmoins, les tests organoleptiques ont souligné que deux souches engendraient des différences comparées à des saucissons témoins non biopréservés : *L. sakei* IM8 (léger impact sur la couleur) et *L. sakei* DM2 (globalement moins satisfaisant que le témoin). Suite à ces travaux, les *L. sakei* IM8 (meilleure réduction en *L. monocytogenes*) et DM3 (bon retour sur le plan organoleptique

malgré une réduction moindre en pathogène) ont été retenus pour des essais ultérieurs qui seront également conduits dans le cadre du programme TRUEFOOD. Ces fabrications pilotes consisteront à optimiser les conditions d'ensemencement (taux et mode d'ensemencement) de ces deux bactéries lactiques préalablement lyophilisées pour se rapprocher des conditions industrielles.

Pour valoriser ces recherches et transférer la méthode de biopréservation auprès des industriels intéressés, des sessions de démonstration sont programmées courant 2009.

B I B L I O G R A P H I E

- (1) JOHNSON J.L., DOYLE M.P., CASSENS R.G. (1990). *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* spp. in meat and meat products. A review. *J. Food Protect.* 53, 81-91.
- (2) FARBER J.M., PETERKIN P.I. (1991). *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiol. Rev.* 55 : 476-511.
- (3) THEVENOT D., DELINGETTE MULLER M.L., CHRISTIEANS S., VERNOZY-ROSAND C. (2005). *Int. J. Food Microbiol.* 102, 85-94.
- (4) COLAK H., HAMPIKYAN H., ULUSOY B., BARIS BIGNOL E. (2007) : Presence of *Listeria monocytogenes* in Turkish style fermented sausage (sucuk). *Food Control* 18, 30-32.

- (5) ZDOLEC N., KOZAČIN SKI L., HADŽI OSMANOVIĆ M., CVRTIL Z. A., FILI POVIĆ I (2007). Inhibition of *Listeria monocytogenes* growth in dry fermented sausages. *Vet. arhiv* 77, 507-514.
- (6) RODGERS S., (2008). Novel applications of live bacteria in food services : probiotics and protective cultures. *Trends Food Sci. Technol.* 1-10.