

« PROCÉDES DE BIO-PRESERVATION »
----------------------------------

**GARRY P.<sup>1</sup>, CHRISTIEANS S.<sup>2</sup>, CARTIER P.<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>**IFIP – Institut du porc, 7 avenue du Général de Gaulle 94700 Maisons-Alfort.**

<sup>2</sup>**ADIV, ZAC Parc Industriel des Gravanches 10, rue Jacqueline Auriol 63000 Clermont-Ferrand**

<sup>3</sup>**Institut de l'élevage, Route d'Epinay 14310 Villers-Bocage**

### **Introduction**

La biopréservation ou bioprotection est une méthode de conservation des aliments faisant appel à des microorganismes ou des à «composés naturels» en opposition à l'utilisation de conservateurs dits « chimiques » classiquement utilisés dans les IAA. Cette thématique a fait l'objet de nombreux travaux ces deux dernières décennies.

La bioconservation, comme toute autre méthode de conservation doit permettre non seulement de maîtriser la croissance de flores pathogènes ou d'altération, mais également de préserver les qualités organoleptiques et nutritionnelles du produit tout au long de sa durée de vie.

Il existe différentes voies permettant la biopréservation. Ainsi, il est possible d'utiliser des micro-organismes tels que les bactéries lactiques. Ce procédé est connu depuis longtemps puisqu'il est traditionnellement utilisé pour la conservation des aliments au travers de la fabrication des produits fermentés (saucissons, fromages, végétaux...). Des substances issues du métabolisme de microorganismes peuvent également être utilisées afin de maîtriser le développement de bactéries indésirables. Ces molécules appelées bactériocines sont de petits peptides. Pour le moment, seule la nisine fait l'objet d'une autorisation d'utilisation limitée. Il est également possible d'utiliser des systèmes enzymatiques naturels tels que le système lactoperoxydase. A ce jour seule une application sur les salades IV<sup>ème</sup> gamme a reçu un avis favorable de l'AFSSA. Par ailleurs, des études semblent montrer l'intérêt dans la biopréservation de molécules issues de végétaux telles que les huiles essentielles.

Enfin, l'utilisation de bactériophages semble être également prometteuse dans la biopréservation.

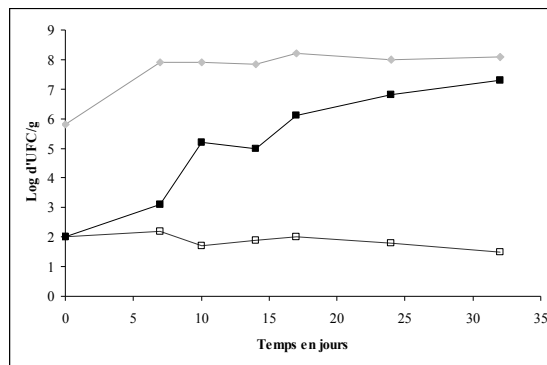
### **Les bactéries lactiques**

Les bactéries lactiques représentent la flore majoritaire des produits carnés conditionnés sous vide ou sous atmosphère modifiée. Si certaines peuvent entraîner une altération du produit (production de gaz, goûts et odeurs acides, acidification...), d'autres n'auront pas d'impact sur la qualité de celui-ci. C'est ce type de bactéries qui pourra être sélectionné pour la biopréservation. Les bactéries sélectionnées pour être utilisées dans le cadre de la biopréservation doivent satisfaire aux quatre critères suivants : les souches doivent préférentiellement être isolées d'un produit similaire, elles doivent présenter une bonne aptitude à se développer au froid, ne doivent pas apporter de modifications des qualités organoleptiques du produit et bien sûr inhiber la croissance des microorganismes pathogènes et/ou d'altération. Parmi les différents genres bactériens pouvant être cités pour leur action de bioprotection, il y a les *Lactococcus*, *Lactobacillus* et *Pediococcus*.

Les modes d'action de cette flore sont variés :

- acidification de l'aliment par production d'acides organiques comme l'acide lactique ou l'acide acétique,
- production de bactériocines comme la pédiocine, la nisine, et divers autres métabolites,
- compétition vis à vis des nutriments,
- production de dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>),
- production de peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

De nombreux essais ont été réalisés dans les produits à base de viande (produits cuits et produits crus). A titre d'exemple la Figure 1 présente les résultats obtenus par Vermeiren et al., (2006).



**Figure 1 : Impact de *Lactobacillus sakei* (LAB) sur la croissance à 7°C de *Listeria monocytogenes* (Lm) dans du pâté. (□) Croissance de Lm en présence de LAB, (■) Croissance de Lm en absence de LAB, (♦) croissance de LAB d'après Vermeiren et al., 2006.**

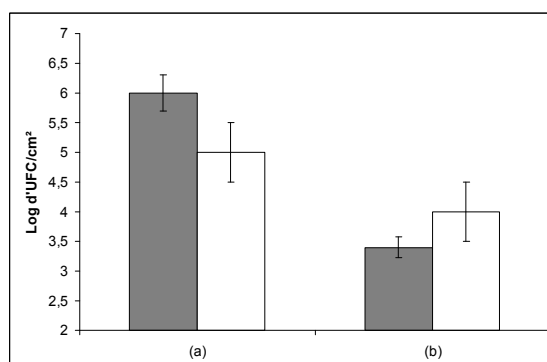
Pour pouvoir utiliser ces bactéries il faut démontrer leur innocuité pour le consommateur. Cependant certains de ces germes sont utilisés depuis longtemps dans des produits alimentaires comme ferment. Pour ce type de germe les autorités européennes ont défini le concept QPS (Qualified Presumption of Safety) qui confère à ces micro-organismes un statut de qualification de présomption conditionnelle d'innocuité ou QPS. Ce statut est l'équivalent du statut GRAS (Generally Recognised As Safe) aux Etats unis avec quelques spécificités européennes.

Le statut QPS d'une souche sera déterminé en fonction du groupement taxonomique de la souche, des connaissances sur le groupement taxonomique considéré permettant de tirer des conclusions sur son innocuité, de l'existence ou non de pathogènes connus dans le groupe taxonomique considéré et enfin de l'usage final prévu pour le produit. Les microorganismes considérés comme inadaptés à l'approche QPS devront être soumis à une évaluation complète pour s'assurer de leur innocuité.

### Les biofilms positifs

Les bactéries lactiques peuvent être utilisées comme d'autres flores pour coloniser les surfaces en contact avec les aliments et empêcher ainsi l'implantation des germes pathogènes. Cette voie de maîtrise de la biocontamination, dite des « biofilms positifs », a fait l'objet de nombreuses études depuis une dizaine d'années. Leriche *et al.* (2000) Briandet (1999). Ainsi, des travaux réalisés dans le projet national UNIR ont montré qu'un biofilm plurimicrobien était capable, dans des conditions expérimentales, de réduire jusqu'à 95% la contamination des supports par *Listeria monocytogenes* Briandet (1999). Des travaux (Habimana cité par Moreau 2008) ont montrés que des biofilms positifs composés de certaines souches de *Lactococcus lactis*, ferments classiquement utilisés dans l'industrie laitière, inhibent fortement l'adhésion de *Listeria monocytogenes*.

De même Leriche *et al.* (2000) ont montré que la présence d'un biofilm de *Staphylococcus sciuri* réduisait l'adhésion de *Listeria monocytogenes* à des surfaces inox (cf. Figure 2). Si certains de ces travaux sont prometteurs, il convient de s'assurer non seulement qu'une implantation dans un atelier est réalisable mais également que celle-ci est durable et que l'effet de bioprotection observé lors d'essais réalisés en laboratoire existe également en entreprise.



**Figure 2 : Pourcentage de *Listeria monocytogenes* adhérentes à des surfaces Inox en absence (a) ou en présence (b) d'un biofilm de *Staphylococcus sciuri*. Essais avec des cellules de *Listeria* en phase exponentielle (■) et en phase stationnaire (□) de croissance d'après Leriche 2000.**

## Les bactériocines

Les bactériocines sont de petits peptides bactériens ayant une activité bactériostatique ou bactéricide. La plupart d'entre elles sont produites par les bactéries lactiques comme les *Lactococcus* ou les *Pediococcus*. L'intérêt de ces molécules réside dans le fait qu'elles présentent un large spectre d'action. Elles peuvent être utilisées pour maîtriser aussi bien sur la flore pathogène que la flore d'altération.

Par ailleurs, Galvez et al. (2007) indique que l'utilisation de bactériocine n'entraîne pas de résistance croisée aux antibiotiques. En ce qui concerne l'innocuité de ces molécules ces mêmes auteurs précisent qu'elles sont spécifiques des cellules eucaryotes et qu'elles sont détruites par les protéases digestives

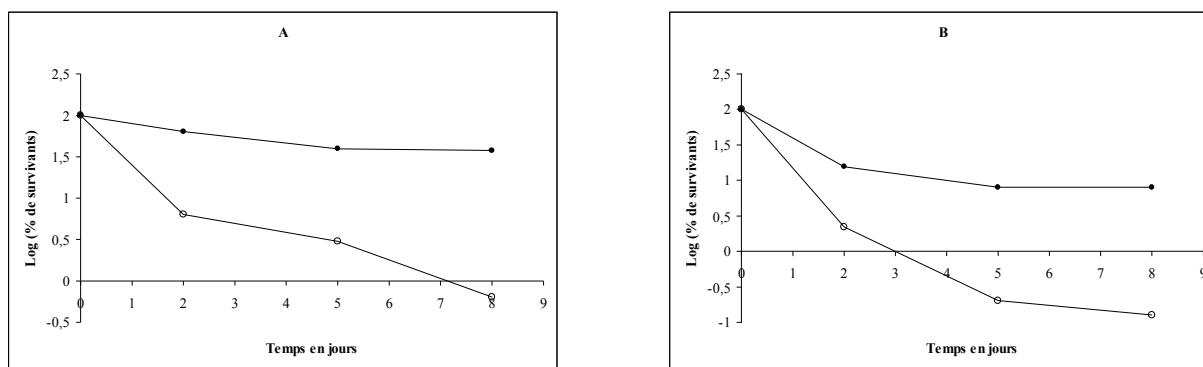
Les bactériocines sont obtenues par culture de souches productrices en fermenteur puis sont plus ou moins purifiées. Elles peuvent être ensuite incorporées au produit comme tout autre additif. L'utilisation de bactériocine pour la biopréservation peut également se faire par ensemencement des aliments par des bactéries productrices qui produiront la bactériocine. Dans ce cas la synthèse et donc la quantité de bactériocine présente dans le produit ainsi que l'effet souhaité peuvent être difficiles à maîtriser.

La nisine produite par *Lactococcus lactis* est la bactériocine qui a fait l'objet du plus grand nombre d'étude. Elle a, par ailleurs, obtenu le statut de GRAS (Generally Recognized As Safe) aux Etats unis. Au sein de l'Union Européenne, par la directive 95/2/CE relative aux additifs alimentaires autres que les colorants et les édulcorants, la nisine (E234) est autorisée comme agent de conservation dans certains aliments. La nisine est autorisée dans les fromages affinés et les fromages fondus, dans certains puddings, ainsi que dans certains autres produits laitiers.

## Les phages

Les bactériophages sont des virus qui colonisent les bactéries. Chaque phage est spécifique d'une espèce bactérienne donnée (exemple phage spécifique de *Listeria monocytogenes*) Par ailleurs, certains sont virulents, c'est-à-dire que dès qu'ils infectent une cellule, le phage utilise la machinerie cellulaire, de la bactérie qu'il infecte, pour se reproduire. Et rapidement fait exploser la cellule disséminant alors de nombreux autres phages. Ce sont ces deux propriétés (spécificité de l'hôte et lyse de la cellule) qui sont utilisées pour éliminer spécifiquement des bactéries indésirables dans des matrices alimentaires.

A titre d'exemple, les travaux de Bigwood *et al*; (2008) montrent l'efficacité du système sur *Salmonella* et *Campylobacter* dans des produits carnés conservés à 5°C (cf. Figure 3).



**Figure 3 : Evolution de *Salmonella* (A) et *Campylobacter* (B) sur de la viande de bœuf fraîche en présence (○) ou absence (●) de phages d'après Bigwood *et al* 2008.**

La FDA et le département américain de l'agriculture ont autorisé l'utilisation du LISTEX™ P100, un produit à base de bactériophages naturels contre les *Listeria* pour l'ensemble des produits alimentaires. Ce produit est considéré comme substance GRAS. En France des demandes d'utilisation de ce produit sont en cours.

## Les extraits de plantes

Certains antimicrobiens naturels comme le thymol, le carvacrol et eugénol respectivement extrait du thym et du clou de girofle) ont démontré leur intérêt pour la conservation des aliments (Nazer *et al*, 2005, Guillier *et al* 2007). Les principaux composés connus pour leur activité antimicrobienne sont présentés dans le Tableau I. Certains de ces composés ont par ailleurs fait l'objet d'essais pour la désinfection de surface (Dubois-Brissonnet *et al*, 2008). Ainsi,

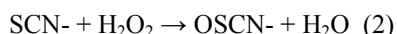
selon cette étude des doses de 5 à 10 mM de ces molécules permettraient d'obtenir 5 réductions décimales en 10 min de la population microbienne présentes sur les surfaces.

**Tableau I - Principaux composés antimicrobiens présents dans les épices d'après Fine et Gervais P. (2007).**

Épices	Composés antimicrobiens
Ail	Allicine
Moutarde	Allylisothiocyanate
Anis	Anéthol
Paprika	Capsicidine
Piment de Cayenne, paprika	Capsaïcine
Romarin	Carnosol
Origan, sarriette, thym	Carvacrol
Écorce de cannelle	Aldéhyde cinnamique
Cannelle, graines de cumin	Cuminaldéhyde
Allspice, clou de girofle	Eugénol
Gingembre, thym	Géranol
Menthe	Composés dérivés du p-menthane
Origan, thym	Thymol
Romarin	Acide ursolique

### Le système lactoperoxydase

La lactoperoxydase est l'enzyme la plus abondante dans le lait. Elle peut produire, en présence d'ion thiocyanate et de peroxyde d'hydrogène des ions hypothiocyanite (OSNC-) qui par leur pouvoir oxydatif sont de bon anti-microbiens. Dans son utilisation pour la biopréservation cette enzyme est souvent associée à la glucose oxydase qui permet d'apporter à la lactoperoxydase le peroxyde d'hydrogène (cf. Figure 4)



**Figure 4 : Actions de la glucose oxydase (1) et de la lactoperoxydase (2)**

Si l'efficacité du système lactoperoxydase a pu être démontrée sur différentes matrices alimentaire comme les produits laitiers ou le saumon, à ce jour, seule une application sur les salades IV<sup>ème</sup> gamme a reçu un avis favorable de l'AFSSA.

### Conclusion

L'utilisation de techniques de biopréservation semble être une bonne alternative aux méthodes faisant appel aux molécules « chimiques » et devrait permettre de répondre aux attentes des consommateurs qui souhaitent des produits « plus naturels ».

La biopréservation peut également présenter un avantage intéressant pour réduire l'intensité de traitements thermiques ou encore de sécuriser les produits à consommés en l'état (nommés Ready to Eat dans le règlement CE 2073/2005). Cela devrait également permettre de développer de nouveaux produits comme des viandes crues ou marinées.

Un professionnel qui envisage d'appliquer une technique de biopréservation devra vérifier, à l'aide de fabrications pilotes, que la solution envisagée est efficace sur son produit. En effet, une méthodologie n'est pas toujours transposable d'une matrice à une autre. Ainsi des essais réalisés avec une flore donnée peuvent être concluants sur une matrice donnée et ne pas l'être sur une autre même proche ou, même, si l'efficacité n'est pas modifiée, les qualités organoleptiques peuvent l'être. Il conviendra également de vérifier lors de ces essais que les qualités organoleptiques du produit sont préservées. Il est également possible d'associer plusieurs de ces techniques qui agiront en synergie. Ainsi

des essais ont été menés pour tester l'action conjointe de la nisine et de phages contre *Listeria monocytogenes* dans de la viande de bœuf (Dykes et Moorhead, 2002).

Il faut également noter que l'utilisation de ces procédés peut nécessiter une demande d'autorisation auprès de la DGAL et de DGCCRF.

### Références bibliographiques

Briandet R. 1999, Maîtrise de l'hygiène des surfaces par la création de biofilms – aspects physicochimiques ; thèse de doctorat. 170 p

Bigwood, T., Hudson J.A., Billington C., Carey-smith G.V. Heinemann J.A., 2008, Phage inactivation of foodborne pathogens on cooked and raw meat. *Food microbiology* 25, 400-406

Dubois-Brissonnet, F., Dietrich, C., Nicolas A., Bellon-Fontaine M.-N., 2008, inactivation de *Salmonella* Typhimurium à l'état planctonique, adhérent ou en biofilm par des composés phénoliques extraits de plantes aromatiques. 3ème s Journées Thématiques Biofilms : approches expérimentales et moléculaires – 24-25 juin – Dourdan

Dykes G.A. Moorhead S.M. , 2002, Combined antimicrobial effect of nisin and a listeriophage against *Listeria monocytogenes* in broth but not in buffer or raw beef *International journal of Microbiology* 73 : 71-81

Fine F., Gervais P. 2007 Décontamination des produits déshydratés à usage alimentaire *Techniques de l'ingénieur* F1136

Galvez A., Abriouel H., Lopez R. L., Omar N. B., 2007, Bacteriocin-based strategies for food preservation. *J. of Food Microbiology* 120 : 51-70

Guillier L. Nazer A I, Dubois-Brissonnet F., 2007 Growth response of *Salmonella* typhimurium in the presence of natural and synthetic antimicrobials: estimation of MICs from three different models. *J Food Prot* 70 (10):2243-2250

Lerliche V, Carpentier B, 2000, Limitation of adhesion and growth of *Listeria monocytogenes* on stainless steel surfaces by *Staphylococcus sciuri* biofilms. *J Appl Microbiol*, 88:594-605.

Moreau J., 2008, Les biofilms inhibent l'adhésion de *Listeria monocytogenes* *Process* 1250:71

Nazer, A.I. Kobilinsky, Andre A.Tholozan, J.-L. J.-L. Dubois-Brissonnet, Florence F., 2005, Combinations of food antimicrobials at low levels to inhibit the growth of *Salmonella* sv. Typhimurium: a synergistic effect ? *Food Microbiology*, 22 (5)

Vermeiren L., Devlieghere F., Vandekinderen I., Rajtak U., Debevere J., 2006, The sensory acceptability of cooked meat products treated with a protective culture depends on glucose content and buffering capacity : A case study with *Lactobacillus sakei* 10A, *Meat science* 74 :532-545