

Table des matières

Résumé.....	i
Summary.....	ii
Resumen.....	iii
Remerciements.....	iv
Table des matières.....	v
Index des abréviations.....	viii
Introduction.....	1
A. Bibliographie.....	2
1. Déshydratation-Imprégnation par Immersion (DII).....	2
1.1 Principe de la DII.....	2
1.2 Intérêts de la DII.....	3
2. Fermentation lactique des produits carnés.....	3
3. Procédé de DII associée à la fermentation lactique.....	4
4. Qualité microbiologique des produits carnés.....	6
4.1 Contamination de la viande.....	6
4.2 Modes de contamination de la viande.....	7
4.3 Bactéries les plus impliquées dans les Toxi-infections alimentaires collectives (TIAC) associées aux produits carnés.....	7
5. <i>Listeria</i> spp.....	8
5.1 <i>Listeria innocua</i>	9
5.2 Physiologie de <i>Listeria</i> spp.....	10
6. Tests de croissance des bactéries pathogènes sur des produits carnés.....	11
B. Matériels et méthodes.....	13

1. Matière première.....	13
2. Préparation de la suspension d'inoculation de <i>Listeria innocua</i>	13
2.1 Souche bactérienne.....	13
2.2 Préparation des cryobilles	13
2.3 Mise en culture et suivi de la croissance de <i>Listeria innocua</i>	13
2.4 Préparation de la suspension d'inoculation et détermination de sa concentration en <i>Listeria innocua</i>	14
3. Mise au point de la méthode d'inoculation	14
3.1 Méthodes d'inoculation envisagées	14
3.2 Essais avec de l'eau pour déterminer la méthode et le volume d'inoculation ...	14
3.3 Évaluation de la répétabilité de la méthode d'inoculation par <i>Listeria innocua</i>	14
4. Application du protocole d'inoculation sur le procédé de DII associée à une fermentation lactique	15
4.1 Schéma de manipulation	15
4.2 Méthode d'inoculation	17
4.3 Procédé de DII associée à la fermentation	17
4.4 Analyses microbiologiques	19
4.5 Analyses physicochimiques	19
4.6 Calculs des transferts de matière au cours de la DII et de la fermentation	24
C. Résultats et discussion	25
1. Mise au point du protocole d'inoculation.....	25
1.1 Courbe de croissance de <i>L. innocua</i>	25
1.2 Essais d'inoculation des filets	26
2. Suivi de <i>L. innocua</i> et des paramètres physicochimiques au cours du procédé de DII associée à la fermentation lactique	27
2.1 Dénombrement de <i>L. innocua</i> sur la matière première	27
2.2 Transferts de matière.....	28
2.3 Résultats physico-chimiques.....	28

2.4	Résultats des dénombrements des bactéries lactiques.....	29
2.5	Suivi de l'acide lactique et de glucose au cours du procédé	29
2.6	Évolution de <i>L. innocua</i>	30
	Conclusion et perspectives.....	34
	Bibliographie.....	36
	Table des illustrations	41

Index des abréviations

A : absorbance

ADP : adénosine diphosphate

ATP : adénosine triphosphate

AT : acidité titrable

Aw : activité de l'eau

Cirad : Centre de coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement

DE 21 : dextrose équivalent 21

DII : déshydratation imprégnation par immersion

DLC : date limite de consommation

Gs : gain en sel

Gsuc : gain en sucre

HR : humidité relative

K₂HPO₄ : phosphate dipotassique

LDH : lactate déshydrogénase

MRS : Man Rogosa Sharpe

NaCl : chlorure de sodium

NAD : nicotinamide adénine dinucléotide

NADP : nicotinamide adénine phosphate

PP : perte en poids

Rpm : rotation par minute

Tac lac : teneur en acide lactique

Te : teneur en eau

Tg : teneur en glucose

TIAC : toxi-infection alimentaire collective

Ts : teneur en sel

UFC : unité formant colonie

UMR : unité mixte de recherche

Introduction

La conservation des aliments vise à préserver leurs propriétés gustatives et nutritives et à assurer leur salubrité. Dans le cas des produits carnés les techniques de conservation traditionnelles sont dans la plupart du temps le marinage, le salage, le séchage, la fermentation et le fumage. Ces opérations sont rarement exclusives et elles sont souvent couplées.

Les évolutions de la réglementation et la libre circulation des produits ainsi que les travaux sur la qualité des denrées alimentaires constituent un défi pour la maîtrise sanitaire des produits. Par ailleurs, les producteurs des pays du sud rencontrent d'avantage de difficultés techniques et financières pour répondre aux normes officielles.

Dans la perspective de permettre à ces producteurs, de fabriquer des produits répondant aux normes d'hygiène, adaptés au contexte tropical, en privilégiant économie d'énergie et facilité de mise en œuvre, l'UMR Qualisud travaille sur la mise au point d'un procédé innovant de salaison de produits carnés. Ce procédé consiste à la préstabilisation de la viande par déshydratation imprégnation par immersion (DII) dans une solution mixte (sel/sirop de glucose) suivie d'une fermentation lactique. Ces deux opérations unitaires sont conduites à température ambiante (25°C) afin d'être adaptées au contexte tropical. Selon le traitement de DII, la fermentation risque d'être perturbée par les modifications physicochimiques de la viande (baisse de l'activité de l'eau (A_w), gain en sel). Les études réalisées jusqu'à présent ont porté sur l'impact de la formulation par DII sur la cinétique de fermentation (Pegoraro, 2005 ; Quaranta, 2007 ; Verdy, 2008). L'aspect sanitaire de ce procédé et plus précisément sa capacité à assurer la stabilité microbiologique du produit n'a pas été étudiée auparavant.

L'objectif de mon stage consiste dans un premier temps à la mise en place d'un protocole permettant d'évaluer la réduction des bactéries pathogènes, notamment *Listeria*. Puis dans un deuxième temps, à appliquer ce protocole à des procédés qui se différencient selon les paramètres de DII afin de déterminer les conditions optimales pour assurer la qualité microbiologique des produits. Dans une première partie, je définirai le procédé de DII associée à la fermentation, et j'analyserai les aspects microbiologiques en relation avec la fermentation lactique et avec *Listeria* spp.

La deuxième partie présentera la méthodologie et le matériel employés.

Enfin, les résultats seront présentés dans une troisième partie puis discutés ce qui permettra d'identifier des perspectives de recherches pour ce projet.

A. Bibliographie

1. Déshydratation-Imprégnation par Immersion (DII)

1.1 Principe de la DII

La déshydratation est une technique physique de conservation des aliments. Elle consiste à éliminer, partiellement ou totalement, l'eau contenue dans l'aliment. Cette opération présente deux intérêts principaux : (i) diminuer l'activité de l'eau du produit pour atteindre des valeurs suffisamment basses permettant d'inhiber le développement des microorganismes et de stopper les réactions enzymatiques (ii) diminuer les masses et les volumes afin de faciliter le conditionnement, le transport et le stockage. La déshydratation peut se faire par plusieurs manières : séparation mécanique, entraînement, ébullition, ou par différence de pression osmotique.

La déshydratation osmotique ou DII consiste à immerger des aliments dans des solutions fortement concentrées en agents dépresseurs de l'activité de l'eau (A_w) (sel et/ou sucre). Ceci donne lieu essentiellement à deux transferts de matières simultanés à contre courant (figure 1).

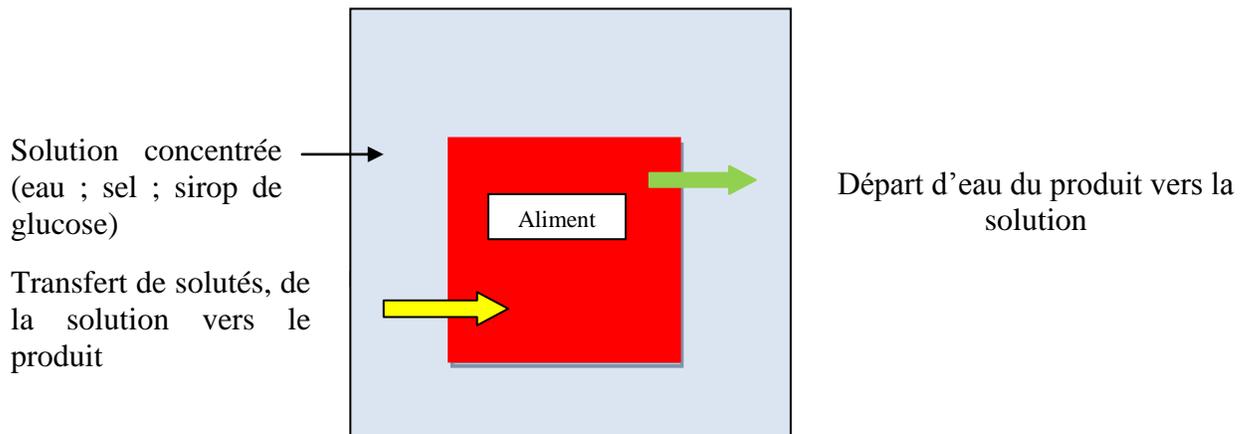


Figure 1 : Schéma des transferts de matière au cours de l'opération de déshydratation imprégnation par immersion

La DII dans des solutions concentrées (sel et/ou sucre) à basse température a été souvent utilisée pour la transformation des végétaux et notamment des fruits, et plus récemment pour les produits carnés.

La vitesse de déshydratation est fonction du prétraitement, de la concentration et de la température de la solution déshydratante, du temps d'immersion, du rapport

solution/produit et de la vitesse d'agitation. La connaissance des propriétés des solutions utilisées conjuguée à celle des transports de matières entre le produit et la solution ont permis de dégager un domaine d'application rationnelle du procédé de DII à la viande en fonction des caractéristiques finales du produit de salaison souhaité (Collignan *et al.*, 2001).

Les études ont montré que lors de la DII il s'opère un antagonisme entre le sucre (sirop de glucose) et le sel, ce qui limite la diffusion de sel ainsi que de sucre. Le poids moléculaire élevé des sucres fait que ces derniers diffusent lentement et forment un film autour du produit. Ce film joue le rôle d'une barrière à l'imprégnation en sel (Collignan *et al.*, 2001 ; Santchurn *et al.*, 2007 ; Santchurn, 2009).

1.2 Intérêts de la DII

Par rapport au séchage classique par entraînement, la DII présente plusieurs avantages :

- Faible perte des qualités organoleptiques et nutritionnelles vu qu'elle s'opère à basse température.
- Économie d'énergie puisque l'élimination d'eau s'opère sans aucun changement d'état physique.
- Rapidité avec l'optimisation des paramètres d'application comme la concentration et le temps d'immersion.

L'étude de la concentration de la solution de DII et le choix des agents dépresseurs de l' A_w permettent de limiter et de contrôler la pénétration de solutés, ainsi que de développer des nouveaux goûts et de nouvelles textures.

2. Fermentation lactique des produits carnés

La fermentation est l'opération unitaire de conservation biologique la plus exploitée dans le monde. L'application de cette opération à des produits carnés associée à d'autres opérations unitaires (salage, séchage) donne une grande variété de produits tels que le saucisson sec et le jambon sec (Durand, 1999).

La fermentation renforce d'une part la teneur en éléments nutritifs par la biosynthèse des vitamines, des acides aminés et des protéines, mais renforce également la salubrité du produit en réduisant le risque d'apparition de composés toxiques tels que les aflatoxines et les cyanogènes, et en produisant des molécules antimicrobiennes tel que l'acide lactique. Par ailleurs, cette opération unitaire permet également le développement d'arômes et d'une texture particulière (Jeantet *et al.*, 2007)

Lactobacillus sakei est la bactérie lactique la plus utilisée pour la fermentation des produits carnés. Elle est capable de fermenter des hexoses et des pentoses par la voie hétéro-fermentaire facultatif pour synthétiser de l'acide lactique (Guyot, 2008).

Lactobacillus sakei représente la flore majoritaire de la viande conservée sous vide où elle joue un rôle antagoniste contre le développement de bactéries pathogènes ou d'altération.

Lors de la fermentation cette bactérie produit un certains nombre de bactériocines : sakacine A (Schillinger *et Lucke*, 1989), sakacine M (Sobrino *et al.*, 1992), sakacine P (Tichaczek *et al.*, 1994), sakacine 674 (Holck *et al.*, 1994), sakacine B (Samelis *et al.*, 1994), sakacine K (Hugas *et al.*, 1995), bavaricine MN (Kaiser et Montville, 1996), lactocine S (Skaugen *et al.*, 1997), sakacine T (Aymerich *et al.*, 2000), bavaricine A (Messens et De Vuyst, 2002), sakacine X (Vaughan *et al.*, 2003), sakacine Q (Mathiesen *et al.*, 2005) et sakacine G (Héquet *et al.*, 2007). Toutes ces bactériocines ont une activité anti-*listeria*, et donc confèrent à *Lactobacillus sakei* la propriété d'un bio-protecteur.

3. Procédé de DII associée à la fermentation lactique

La déshydratation osmotique toute seule ne permet pas d'assurer la stabilité du produit c'est pour cela qu'elle est couplée à d'autres opérations unitaires. L'UMR Qualisud propose de la coupler à une fermentation lactique (figure 2).

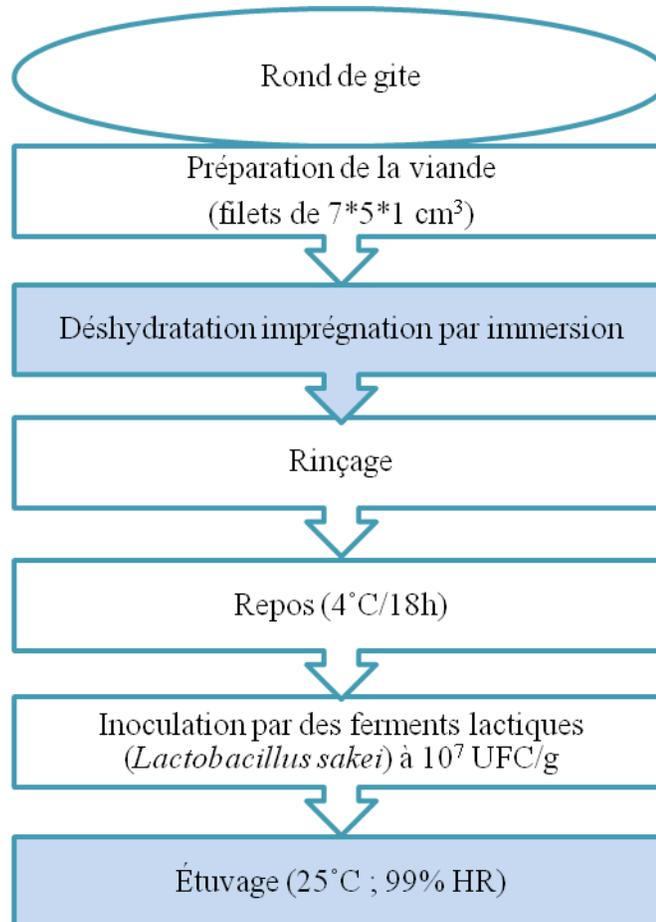


Figure 2 : Diagramme du procédé de DII associée à la fermentation lactique

Cette association de la fermentation lactique à la DII a pour but l'amélioration de la stabilité du produit et de ses caractéristiques organoleptiques et nutritionnelles.

L'emplacement de la fermentation lactique juste après la DII est bien réfléchi pour les raisons suivantes:

- Étant donné que l'Aw de la viande fraîche est proche de 1, une fermentation réalisée à une température ambiante (25°C) présente le risque de prolifération d'une flore pathogène et ou d'altération sur le produit.
- La DII permet de changer les paramètres physico-chimiques du produit en faisant augmenter la teneur en sel et abaisser l'Aw. Ce changement de caractéristiques physicochimiques du produit va favoriser la flore lactique au détriment d'une autre flore compétitive (pathogène et/ou d'altération).

- Le sucre gagné après le traitement de DII améliore la fermentation lactique et participe à l'acidification du produit.
- Un traitement de DII postérieur à la fermentation entraînerait une diffusion de l'acide lactique produit par la fermentation dans la solution de DII, présentant alors une perte d'un élément de conservation principal du produit.

4. Qualité microbiologique des produits carnés

4.1 Contamination de la viande

Malgré les efforts des industriels en matière de contrôle et d'hygiène alimentaire, les produits carnés demeurent une cause importante d'épidémies.

La viande est l'un des produits alimentaires les plus périssables. Quelle que soit l'espèce de l'animal, le muscle de la viande est un excellent milieu de culture pour les microorganismes. Ses propriétés physicochimiques favorisent la prolifération microbienne.

La composition moyenne générale de la viande est définie dans le Tableau 1.

tableau 1 : Composition moyenne de la viande

(d'après Noriega *et al.*, 2009)

paramètres	Valeurs
pH	5-7
Activité de l'eau	0,98-0,99
Composition moyenne en (%)	
Humidité	64-80
Protéines	16-20
Acides aminés libres	1,65
Lipides	6-10
Acide lactique	0,90
Glucose	0,25
Glycogène	0,10
Sels minéraux	0,65
Vitamines (groupe B)	0,10
Cendres	1

4.2 Modes de contamination de la viande

La distribution à longue distance, nationale ou internationale, est la cause de la dispersion des agents pathogènes. Des contaminations croisées peuvent se produire tout au long de la chaîne de transformation du produit carné et ultérieurement en cuisine.

Dans les produits de salaison, la flore majoritaire est une flore utile représentée par la flore lactique qui se développe au cours des étapes d'étuvage et de séchage. En revanche, les bactéries pathogènes proviennent essentiellement de la matière première, ou bien d'une contamination produite lors des diverses manipulations soit par le matériel employé, par le personnel ou encore par l'eau.

Concernant la matière première, la contamination peut être agonique (lors de l'abattage) et post mortem (lors de la préparation des carcasses). Ceci explique :

- Une contamination profonde des carcasses : peu importante pour les animaux sains, mais non négligeable pour les carcasses quand il s'agit de bactéries intestinales.
- Une contamination superficielle des carcasses : plus importante sur l'aire d'abattage, dans les ateliers de découpe ou les chambres de stockage.

4.3 Bactéries les plus impliquées dans les Toxi-infections alimentaires collectives (TIAC) associées aux produits carnés

Plusieurs bactéries sont impliquées dans les toxi-infections alimentaires associées aux produits carnés. Certaines de ces bactéries sont présentées dans le tableau 2.

Tableau 2 : Bactéries associées aux TIAC et liées aux viandes

(d'après Jeantet et *al.*, 2006)

Bactéries	Caractères biochimiques	Produits à risque
<i>Clostridium botulinum</i>	Gram+, sporulée, anaérobie stricte, mésophile, pH _{op} = 7	Conserves, jambons fumés préparés à la maison
<i>Clostridium perfringens</i>	Gram+, sporulée, anaérobie stricte, thermophile	Plats en sauce mal refroidis
<i>Bacillus cereus</i>	Gram+, anaérobie facultative, sporulée, développement possible entre 5 et 50°C	Viandes, plats cuisinés, pâtisseries, lait, riz notamment celui cuit à la vapeur
<i>Staphylococcus aureus</i>	Gram+, développement possible à aw = 0,83, T _{op} = 37°C, pH _{op} = 7	Produits manipulés par l'homme, produits laitiers
<i>Salmonella spp</i>	Gram-, aéro-anaérobie facultative, mésophile	Volailles, viandes, œufs et produits laitiers, fruits de mer
<i>Listeria monocytogenes</i>	Gram+, T _{op} = 37°C, pH = 7 Psychotrope, capable de former des bio films	Viande, lait, poisson
<i>Escherischia coli O157 :H7</i>	Gram-, développement possible entre 7 à 50°C et dans des aliments acides	Viande et tout produit d'origine animale

Listeria monocytogenes bien qu'elle ne sporule pas, présente une très grande résistance dans le milieu environnemental. Cette bactérie se trouve dans le sol et par la suite dans tous les aliments. Elle se multiplie dans les aliments conservés au froid, et forme des biofilms qui adhèrent au matériel et au plan du travail. Par conséquent elle est considérée comme un problème majeur pour la sécurité sanitaire des aliments (Héquet *et al.*, 2007).

5. *Listeria spp*

Les animaux peuvent être des porteurs sains de *Listeria spp*. Les carcasses et les viandes de découpe en hébergent fréquemment mais en quantité faible (moins de 100 germes/g ou cm²). Selon les pays, la viande est plus ou moins contaminée.

La présence de *Listeria monocytogenes* est en général associée à de fortes populations de bactéries aérobies, Gram négatif.

Cette espèce ne se développe pas dans la viande à pH inférieur à 5,8, emballée sous vide et stockée entre 2°C et 4°C, du fait de la présence des bactéries lactiques indigènes (Larpent, 2000).

Pour des températures de stockage de 7°C, et à pH supérieur à 6, *Listeria monocytogenes* est la flore dominante dans la viande avec les entérobactéries (Larpent, 2000).

La contamination humaine par *Listeria* spp est essentiellement alimentaire. Étant sensible à la chaleur, la bactérie est en principe absente dans les aliments cuits et dans les conserves, sauf si une contamination intervient après cuisson. Du fait de son aptitude à se multiplier à basse température, *Listeria* spp est souvent associée aux aliments réfrigérés à durée de conservation longue, et elle a pu être détectée dans de la viande de bœuf immergée dans une solution à 22 % (w/w) de chlorure de sodium (NaCl) et stockée 100 jours à 15°C-20°C (Sielaff, 1968).

Listeria monocytogenes est saprophyte à Gram positif, largement répandue dans la nature. Cette bactérie responsable d'infections sporadiques sévères chez l'homme et les animaux est invasive, capable de traverser le placenta et de pénétrer le système nerveux central (méningo-encéphalites). C'est une bactérie intracellulaire facultative, capable de survivre et de croître à l'intérieur de la plupart des cellules de l'hôte infecté. Chez l'homme, la majorité des patients sont fragilisés (immuno-déprimés, femmes enceintes, nouveau-nés).

Vu le caractère pathogène de *Listeria monocytogenes*, cette dernière sera remplacée dans cette étude par *Listeria innocua* afin d'éviter sa dissémination (Hugas *et al.*, 1995). *Listeria innocua* possède presque les mêmes propriétés physicochimiques que *Listeria monocytogenes*. Cependant elle n'est pas pathogène et l'incidence de cette bactérie dans la viande est plus élevée que celle de *Listeria monocytogenes* (Houtsma *et al.*, 1994).

5.1 *Listeria innocua*

Listeria innocua est une bactérie ubiquitaire non sporulée, à Gram positif.

Elle vit en saprophyte et elle résiste, comme les autres espèces de *Listeria* spp, à des valeurs élevées de pH, de température et de concentration en NaCl.

Elle est capable de former un biofilm qui lui permet de s'attacher aux surfaces solides où elle prolifère et devient extrêmement difficile à éliminer.

Les chercheurs pasteuriers ont démontré que 10 % des gènes de *Listeria monocytogenes* n'avaient pas d'équivalent chez *Listeria innocua*. Ces gènes (environ 270), sont certainement impliqués dans la virulence de la bactérie.

Listeria innocua présente un taux de croissance plus rapide que *Listeria monocytogenes* dans un bouillon non sélectif (Evanson *et al.*, 1991 ; Dush et Schaffner, 1993 ; Curiale et Lewis, 1994). *Listeria monocytogenes* serait plus sensible à l'acriflavine, molécule présente dans un bouillon d'enrichissement Fraser (Beumer *et al.*, 1996). L'étude de

Curiale et Lewis (1994) indique que *Listeria innocua* a une croissance plus rapide que *Listeria monocytogenes* au cours des phases d'enrichissement.

5.2 Physiologie de *Listeria* spp

Influence de la température

Au laboratoire, *Listeria* spp se développe entre 3°C et 45°C, avec un optimum de croissance entre 30°C et 37°C. Sur milieu tryptone 1 %, extrait de levure 1 %, K₂HPO₄ 0,3 % et glucose 0,1 %, la bactérie possède un maximum, un optimum et un minimum de croissance respectivement entre 40°C et 45°C, 38°C et 3°C. Cependant, 1°C est donné comme température minimale de croissance (Baltimore, 1996).

Listeria monocytogenes est capable de modifier la composition lipidique de sa membrane en augmentant le degré d'insaturation des lipides, ce qui induit la baisse de leur point de fusion et assure la fluidité de sa membrane à des basses températures (Boyer *et al.*, 2009).

Influence du sel

Sur un bouillon nutritif, *Listeria* se développe en présence de 10 % (w/w) de NaCl. Cependant, certaines souches peuvent se développer sur "bouillon cœur-cerveille" avec 12 % (w/w) de NaCl à pH 5 et entre 8°C et 30°C (Larpent, 2000).

Le stress osmotique chez cette espèce induit la production de 12 protéines qui la protègent contre le choc halophylique et les changements de température. Cette propriété n'est cependant pas encore prouvée chez *Listeria innocua*, qui est moins résistante aux fortes concentrations en sel (Boyer *et al.*, 2009).

À une température de 5°C, la résistance de *Listeria monocytogenes* augmente vis à vis de la concentration en sel (Houtsma *et al.*, 1994).

Influence du pH

Listeria monocytogenes peut se développer de pH 5,6 à pH 9,6, avec un optimum à pH neutre ou légèrement alcalin. Après un temps de latence de 2 jours à pH 5 et de 0,5 jour à pH 5,6 le pathogène atteint respectivement des populations de 1,5 10⁸ et de 4 10⁸ UFC/ml.

Sur milieu "Bouillon trypticase de soja", 16 souches de *Listeria monocytogenes* débutent leur croissance à pH entre 4,39 et 4,63, à 20°C -30°C (George *et al.*, 1988 ; Borovian, 1989 ; Parish et Higgins, 1989 ; Sorrels *et al.*, 1989).

Listeria monocytogenes est plus tolérante aux pH alcalins qu'aux pH acides. Elle peut cependant survivre à pH 3,26.

Influence de l'Aw

L'activité de l'eau optimale pour la croissance de *Listeria monocytogenes* est de 0,97 mais elle peut se développer à 0,943 (Fenlon *et al.*, 1996), et sa croissance s'arrête à une Aw de 0,932 (Skovgaard et Norrung, 1989) alors que la croissance de *Listeria innocua* s'arrête à une Aw entre 0,929 et 0,924 (Nolan *et al.*, 1992).

Listeria innocua tolère mieux les faibles Aw que *Listeria monocytogenes* (Nolan *et al.*, 1992).

6. Tests de croissance des bactéries pathogènes sur des produits carnés

Les tests de croissance visent l'étude des interactions entre des souches bactériennes au sein d'une matrice alimentaire ou la validation d'un procédé du point de vue sanitaire ou d'une date limite de consommation (DLC). Ils se basent sur l'inoculation artificielle de la matrice concernée par une souche bactérienne ou un mélange de souches, selon l'objectif de l'étude, à une concentration bien déterminée avec le suivi de l'évolution de celle-ci par des dénombrements.

L'inoculation des produits alimentaires se fait selon différentes techniques en fonction du type de produits. Cette inoculation peut se faire soit en profondeur si l'étude vise à modéliser une contamination profonde du produit, soit en surface dans le cas d'une contamination externe.

L'inoculation peut se faire par :

- malaxage de la souche bactérienne avec la pâte, par exemple dans le cas des saucissons (Hugas *et al.*, 1995),
- immersion dans une suspension bactérienne, par exemple pour des muscles de viande (Duffy *et al.*, 2001)
- pulvérisation de la suspension bactérienne sur le produit (Héquet *et al.*, 2007)
- étalement avec un râteau d'un volume donné, d'une suspension bactérienne sur la surface de l'aliment (Hart *et al.*, 1991 ; Calicioglu *et al.*, 2002 ; Kouakou *et al.*, 2009), cette technique étant la plus fréquemment utilisée.

Le taux d'inoculation initial doit être moyennement élevé afin de limiter les effets de la variabilité de la croissance dus à un faible niveau d'inoculation. En revanche, un nombre très élevé en certaines bactéries comme *Listeria monocytogenes* n'est pas non plus recommandé car peu réaliste au regard des niveaux de contamination rencontrés dans les échantillons naturellement contaminés.

Dans la littérature, le taux d'inoculation utilisé pour *Listeria* spp est de 10^3 UFC/g (Hart *et al.*, 1991 ; Duffy *et al.*, 2001 ; Héquet *et al.*, 2007).

Plusieurs études ont porté sur l'évaluation de la diminution des pathogènes au cours des procédés de transformation des produits carnés tel que le salage, le séchage et la fermentation :

Un saucisson séché fermenté inoculé avec $9,13 \cdot 10^3$ UFC/g de *Listeria monocytogenes* et 10^6 UFC/g de *Lactobacillus sakei* avec une maturation de 3 jours, montre une réduction de 3,21 log de *Listeria monocytogenes* grâce à la production d'une bactériocine par *Lactobacillus sakei*. Dans la même étude *Listeria monocytogenes* a été remplacée par *Listeria innocua* avec un taux d'inoculation de $8,1 \cdot 10^3$ UFC/g. Cependant après 3 jours de maturation *Listeria innocua* est sous le seuil de détection (< 10 UFC/g), (Hugas *et al.*, 1995).

Afin de valider un procédé de fabrication de soudjouk turque semi-séché (saucisson fermenté semi-séché épicé), la pâte a été inoculée avec 7,65 log UFC/g de *Escherichia coli* H15707. Après fermentation et séchage (3 jours, 24°C, 90-95% d'humidité relative) et une cuisson (54,4 °C, 60 min) *Escherichia coli* H15707 a été sous le seuil de détection (Calicioglu *et al.*, 2001).

Calicioglu *et al.*, 2002 ont montré que la fabrication de jerky (viande de bœuf séchée) avec de la matière première inoculée avec *Listeria monocytogenes* à un taux de 6,2 log UFC/cm², incluant un marinage à pH 4,3, stockage à 4°C pendant 24h avant un séchage à 60°C pendant 10h entraîne une réduction de 5,9-6,3 log UFC/cm² de *Listeria monocytogenes*.

Smith *et al.*, 1975 ont évalué l'impact du procédé de fabrication de pepperoni (salami épicé) sur la survie de *Salmonella dublin* et *Salmonella thyphimurium* et ils ont montré que l'utilisation des cultures starter (*Pediococcus cerevisiae* et *Lactobacillus plantarum*) favorisent significativement la destruction des souches de *Salmonella* spp.

L'évaluation de l'impact du procédé de DII associée à la fermentation sur *Listeria* est basée sur le même principe que les exemples cités précédemment, avec une inoculation artificielle de la viande par *Listeria innocua* et le suivi de son évolution par des dénombrements.

B. Matériels et méthodes

1. Matière première

La matière première utilisée est un rond de gîte de bœuf. Le gras ainsi que l'épimysium sont éliminés, puis le muscle est mis en surgélation durant 5 min afin de faciliter la découpe par une trancheuse à jambon. La découpe se fait dans un premier temps dans le sens des fibres pour donner des tranches de 1 cm d'épaisseur. Ces tranches sont remises dans le surgélateur durant 3min puis découpées à l'aide d'un gabarit de 7x5 cm afin d'obtenir des filets de viande de 7x5x1 cm³ de volume. Les filets de viande ainsi obtenus sont conditionnés dans des sacs plastiques. Après un passage de 10 min au surgélateur, ils sont stockés dans un congélateur standard à -18°C.

Enfin, avant utilisation, les filets de viande sont mis à décongeler une nuit au réfrigérateur (+ 6°C) et l'excédent d'eau est éliminé par absorption sur du papier. La découpe de viande se fait dans une chambre froide à 4°C. Le plan de travail et le matériel sont préalablement désinfectés avec de l'alcool éthylique à 99,9°. Les filets utilisés pour chaque essai sont issus d'un même rond de gîte.

Une vérification systématique de l'absence de *Listeria innocua* sur la matière première est faite afin de bien maîtriser le taux d'inoculation initial.

2. Préparation de la suspension d'inoculation de *Listeria innocua*

2.1 Souche bactérienne

La bactérie utilisée est *Listeria innocua* (*Listeria innocua* CIP 20-595).

2.2 Préparation des cryobilles

La préparation des cryobilles est faite à partir des cryobilles datées de 2005 et stockées à -20°C. 10 mL de bouillon nutritif (Oxoïd, Angleterre) est versé dans des tubes stériles avec 3 billes de *Listeria innocua*. La culture est agitée à 37°C durant 24h.

A partir de cette culture un isolement est fait sur agar Oxford (Merck, Allemagne). Les boîtes Oxford sont incubées à 37°C /24h. À partir de ces boîtes 5 colonies sont rajoutées dans un tube contenant 10 mL de bouillon nutritif (Oxoïd, Angleterre). Le tube est incubé à 37°C/24h sous agitation (100 rpm). 1mL de la culture est rajouté à un tube de cryobilles, l'ensemble est mélangé soigneusement. Finalement tout le surnageant est aspiré et les tubes sont gardés à -20°C

2.3 Mise en culture et suivi de la croissance de *Listeria innocua*

300 mL de bouillon nutritif (Oxoïd, Angleterre) est mis dans un erlenmyer de 500 mL avec 5 cryobilles de *Listeria innocua*. La culture est incubée à 37°C en agitation

(100rpm). L'absorbance (A) est suivie à 600 nm afin d'établir la courbe de croissance et de déterminer le temps nécessaire pour atteindre la phase stationnaire.

2.4 Préparation de la suspension d'inoculation et détermination de sa concentration en *Listeria innocua*

Après avoir atteint la phase stationnaire de croissance, la culture est transvasée dans des tubes stériles pour être centrifugée (5000 g durant 20 min), le culot est dilué dans de l'eau physiologique (9g de NaCl par litre) afin d'avoir une A de 1,7.

3. Mise au point de la méthode d'inoculation

3.1 Méthodes d'inoculation envisagées

L'inoculation est peut être induite selon trois méthodes :

- Un volume donné est mis directement sur chaque face de filet de viande et étalé avec un râteau ou avec une oese sur les surfaces et les cotés.
- Un volume donné est mis dans une boîte de Pétri dans laquelle le filet de viande est mis à tremper.
- Une pulvérisation d'une suspension de *Listeria innocua* sur le filet de viande a été envisagée. Faute d'un pulvérisateur autoclavable avec un volume gradué, cette méthode a été exclue.

3.2 Essais avec de l'eau pour déterminer la méthode et le volume d'inoculation

Dans un premier temps, l'inoculation est faite avec différents volumes d'eau afin de déterminer la quantité qui pourrait être déposée d'une manière homogène sur le filet de viande sans que ce dernier égoutte.

3.3 Évaluation de la répétabilité de la méthode d'inoculation par *Listeria innocua*

Pour évaluer la répétabilité de la méthode d'inoculation ainsi que le volume choisi, des essais préliminaires d'inoculation sont faits sur des filets de viande fraîche en utilisant les deux méthodes (étalement par râteau et trempage dans une boîte de Pétri).

Les échantillons inoculés sont dénombrés à T₀ sur milieu Oxford.

4. Application du protocole d'inoculation sur le procédé de DII associée à une fermentation lactique

4.1 Schéma de manipulation

Les manipulations réalisées ont suivi le schéma présenté par la figure 3.

Quelques paramètres physico-chimiques sont étudiés au cours de manipulation afin de caractériser la fermentation.

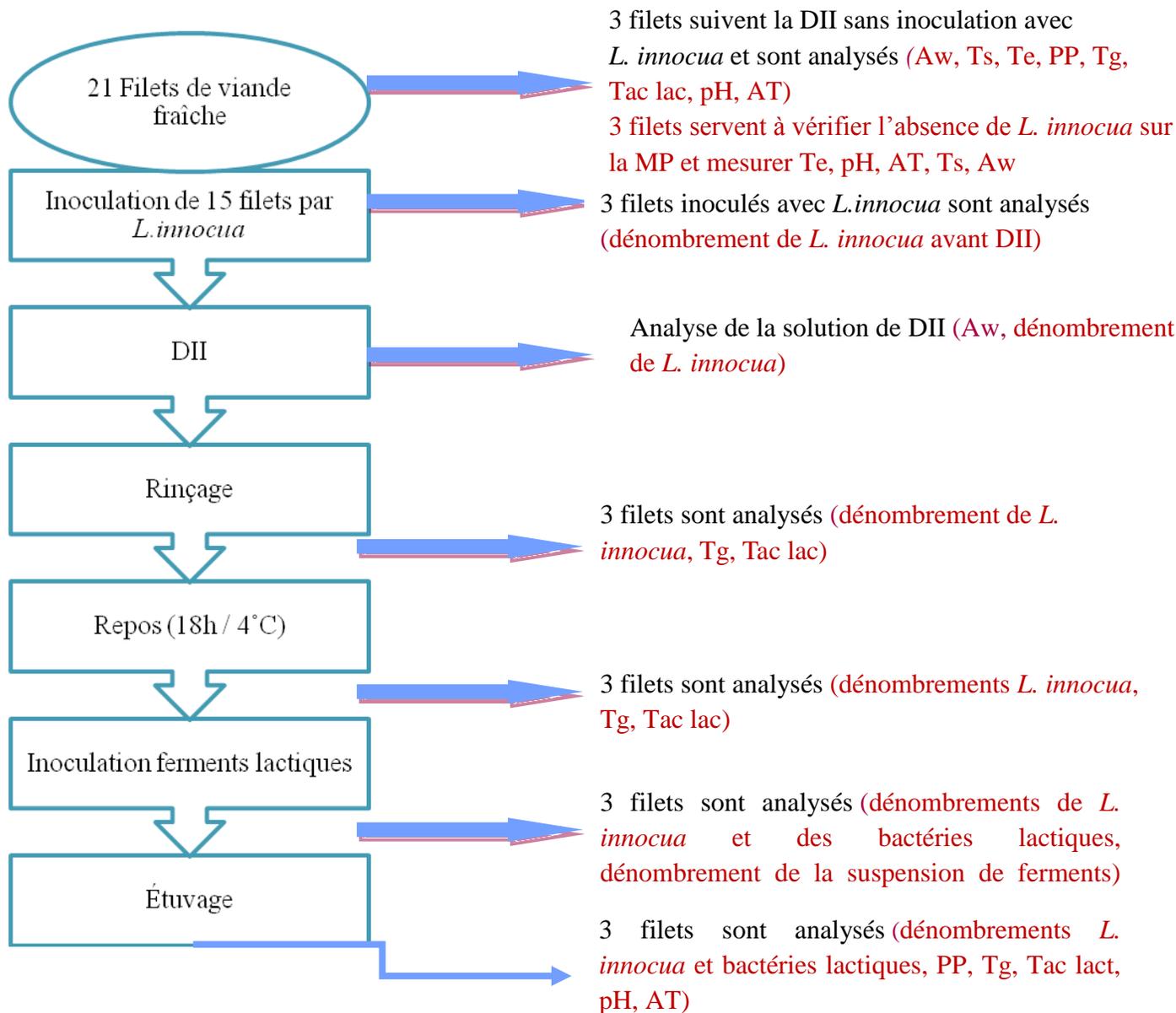


Figure 3 : Schéma des manipulations réalisées

Avec :

PP : perte en poids, *Te* : teneur en eau, *Ts* : teneur en sel, *Tg* : teneur en glucose,

Tac lac : teneur en acide lactique,

L'*Aw* et la teneur en eau ne peuvent pas être réalisées sur la viande inoculée par *listeria innocua* (risque de contamination de l'étuve et de l'*Aw*-mètre).

Ces paramètres ne seront pas influencés par la présence de *L. innocua*. Ainsi un procédé de DII est fait en parallèle sur 3 filets non inoculés afin d’effectuer ces analyses.

Les teneurs en glucose, et acides lactiques ainsi que le pH et l’acidité titrable peuvent être réalisés sur des filets inoculés avec *Listéria* spp. Il n’est pas évident de savoir si ces paramètres sont influencés ou non par *listéria* spp. Aussi, ces mesures ont été réalisées à la fois sur des filets inoculés et non inoculés pour étudier l’influence de *Listeria* spp.

Une vérification de l’absence de *L. innocua* sur 3 filets de viande fraîche est réalisée afin de ne pas confondre les contaminations naturelles et artificielles des filets.

15 filets sont inoculés parmi eux, trois filets sont analysés avant DII, trois filets après DII, trois filets après inoculation, trois filets après l’ajout des ferments lactiques, trois filets après étuvage.

4.2 Méthode d’inoculation

L’inoculation des filets de viande se fait par l’ajout de 0,5 mL d’une suspension de *Listeria innocua* à 10^4 UFC/mL sur chaque surface du filet, à l’aide d’une pipette automatique avec un étalement au râteau.

Afin d’avoir un taux d’inoculation de 10^3 UFC/g pour un morceau de viande qui pèse environ 38 g, l’inoculation doit se faire par une suspension d’environ $3,8 \cdot 10^4$ UFC/mL.

4.3 Procédé de DII associée à la fermentation

DII

Les conditions de la manipulation de DII réalisée sont présentées dans le tableau 3.

Tableau 3 : Conditions de réalisation de la DII

[DE21] (g/l d’eau stérilisée)	[Sel] (g NaCl/ l d’eau stérilisée)	Temps d’immersion (h)
950	100	5

La préparation de la solution se fait dans un récipient hermétique stérilisé et sous la hotte afin d’éviter toute contamination. Le sel puis la poudre de DE21 sont ajoutés à un litre d’eau stérile, l’ensemble est mis en agitation pendant 18h.

Les filets de viande sont disposés sur un portoir stérile et l’ensemble est immergé dans la solution de DII à température ambiante (25°C) et mis en agitation durant 5h (figure 4).

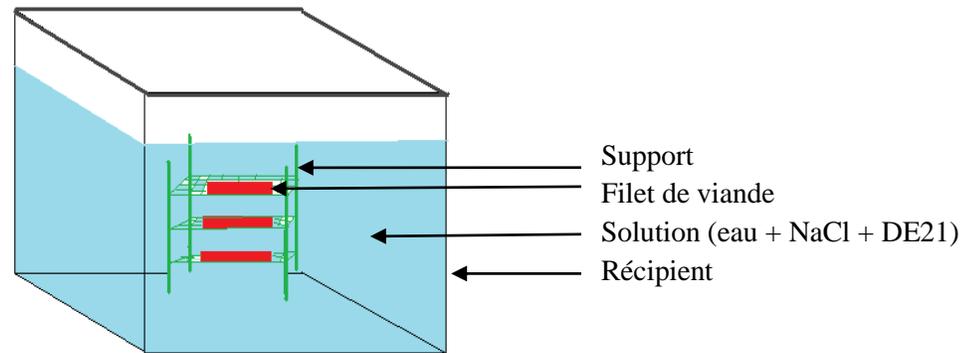


Figure 4 : Dispositif d'immersion des filets de viande

Rinçage

Après la DII, les filets de viande sont rincés avec de l'eau stérile et avec un changement d'eau pour chaque filet. Finalement les filets sont essuyés avec du papier absorbant stérile puis stockés dans des boîtes de Pétri.

Repos

Les filets de viande sont mis en frigo à 4°C pendant 18h. Ce repos permet d'homogénéiser la concentration en soluté dans le produit après la DII. L'historique de la température est enregistré.

Inoculation par *Lactobacillus sakei*

La suspension de *Lactobacillus sakei* se prépare avec l'ajout de 40 g de ferments lactiques commerciaux de *Lactobacillus sakei* Texel L110 (Biovitec Lissieux, France) à 400 ml d'eau physiologique (9 g NaCl/l) et à 2 g de Delvocid (antifongique). La préparation se fait dans des conditions aseptiques sous la hotte et avec un matériel stérile. La suspension d'inoculation est systématiquement dénombrée.

Étuvage

Les filets sont suspendus à l'aide des crochets stérilisés sur un support stérilisé et introduits dans un pot avec couvercle, ces deux derniers sont désinfectés à l'éthanol (99,99 %) et mis dans une enceinte climatique (BIA Climatic, Conflans, France) préalablement désinfectée à l'éthanol. Cette enceinte est réglée sur les consignes de température et d'humidité relative : T= 25°C, HR =99 % (afin d'éviter le séchage des filets lors de l'étuvage).

Les historiques de la température et de l'humidité est enregistré.



Figure 5 : Dispositif d'étuvage des filets de viande

4.4 Analyses microbiologiques

Préparation de l'échantillon

10 g sont découpés, à l'aide d'un scalpel, sous forme d'un parallélépipède au centre géométrique du filet de viande.

Les 10 g sont mis dans un sac de stomacher avec 90 mL (dilution de 1:10) d'eau peptonnée (AES laboratoire, France) et portés en broyage pendant 5 min.

Des dilutions décimales sont faites à partir de la solution mère avec de l'eau physiologique.

Dénombrement

Le dénombrement de *Listeria innocua* est réalisé en surface sur milieu Oxford (Merck, Allemagne). L'incubation est faite à 37°C/ 24h. Les seuils de détection des dénombrements de la solution d'inoculation et des viandes sur oxford sont respectivement de 10 UFC/ml et 100 UFC/g.

Le dénombrement des bactéries lactiques est fait en masse sur un milieu MRS (Merck, Allemagne). L'incubation est faite dans des jarres d'anaérobioses à 30°C/72h. Les seuils de détection des dénombrements de la solution de ferments lactiques et des viandes sur MRS sont respectivement de 1 UFC/ml et 10 UFC/g.

4.5 Analyses physicochimiques

Broyage

Les échantillons inoculés par *Listeria innocua* sont broyés dans un broyeur autoclavable au laboratoire P2, alors que les échantillons non inoculés par cette bactérie sont broyés avec un broyeur ménager au laboratoire de physicochimie.

Dosages enzymatiques

Préparation de l'échantillon (extraction de Carrez)

Le protocole d'extraction est présenté par la figure 6.

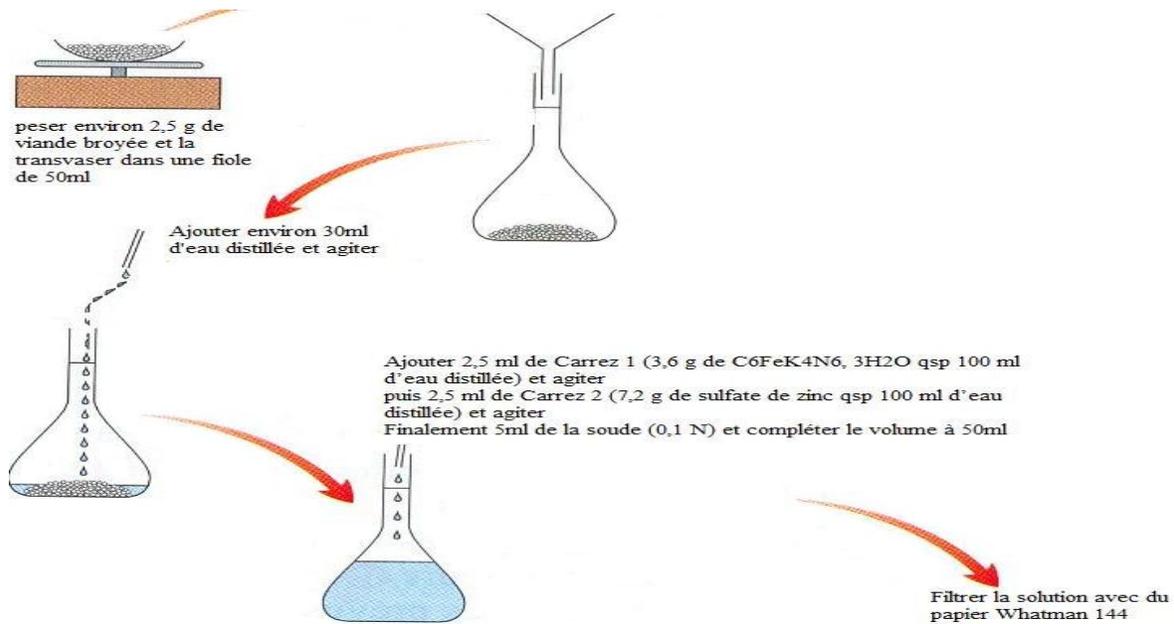


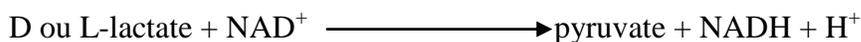
Figure 6 : Schéma d'extraction par la méthode Carrez

Pour les échantillons inoculés avec *Listeria innocua*, la solution d'extraction est stérilisée par filtration (0,22 µm).

Teneur en acide lactique

Le dosage des acides D et L lactique est réalisé respectivement avec le kit ENZYTEC™ D-Lactic Acid (Scil Diagnostics, Viernheim, Allemagne) (Id-N° 5240) et L-Lactic Acid (Scil Diagnostics, Viernheim, Allemagne) (Id-N°5260).

Ce dosage enzymatique consiste à évaluer par spectrophotométrie à 340 nm (Spectrophotomètre Helios α, Thermo Spectronic, Cambridge, Royaume Uni) le NADH produit selon la réaction :



La teneur en D- ou L-acide lactique est calculée selon la formule :

$$T_{ac\ lac} = \frac{\Delta A \times V_{cuve} \times M_{acide\ lactique} \times V_{ext} \times 100}{\varepsilon \times l \times 1000 \times V_{éch} \times m_{viande}}$$

Avec :

$T_{ac\ lac}$: teneur en acide D ou L lactique (g/100g de viande)

ΔA : différence d'absorbance entre l'échantillon et un blanc

ε : coefficient d'extinction du NADH à 340nm

$V_{éch}$: volume d'échantillon dosé (mL)

V_{cuve} : volume de la cuve (mL)

V_{ext} : volume utilisé pour l'extraction (= $50 \cdot 10^{-3}$ l)

$M_{acide\ lactique}$: masse molaire de l'acide lactique (= 90g/mol)

m_{viande} : masse de viande utilisée pour l'extraction (g).

l : trajet optique (1cm)

Teneur en glucose

Le dosage de D-glucose est réalisé avec le kit ENZYTECTM D-Glucose (Scil Diagnostics, Viernheim, Allemagne) (Id. N° 1210- 1002781). Le dosage consiste à évaluer par spectrométrie (à 340nm) le NADPH produit selon les réactions :



Le calcul de la teneur en D-glucose de la viande se fait selon la formule :

$$T_g = \frac{\Delta A \times v(50 \cdot 10^{-3}) \times v_{cuve} \times M_{D\ glucose}}{\varepsilon \times l \times 1000 \times V_{éch} \times m_{viande}} \times 100$$

Avec :

T_g : teneur en D glucose (g/100g de viande)

ΔA : différence d'absorbance entre l'échantillon et un blanc

ε : coefficient d'extinction du NADH à 340nm ($6,3 \text{ l}\cdot\text{mmol}^{-1}\cdot\text{cm}$)

$V_{éch}$: volume d'échantillon dosé (mL)

l : trajet optique (= 1cm)

V_{cuve} : volume de la cuve (3,02 mL)

V_{ext} : volume utilisé pour l'extraction ($50 \cdot 10^{-3}$ l)

$M_{D\ glucose}$: masse molaire du glucose (180,16 g/mol)

m_{viande} : masse de viande utilisée pour l'extraction (g).

Teneur en sel

La teneur en sel est calculée à partir de la détermination de la concentration des ions chlorures libres par un chloruremètre (Sherwood, France) après extraction de ces ions par une solution d'acide nitrique (figure 7).

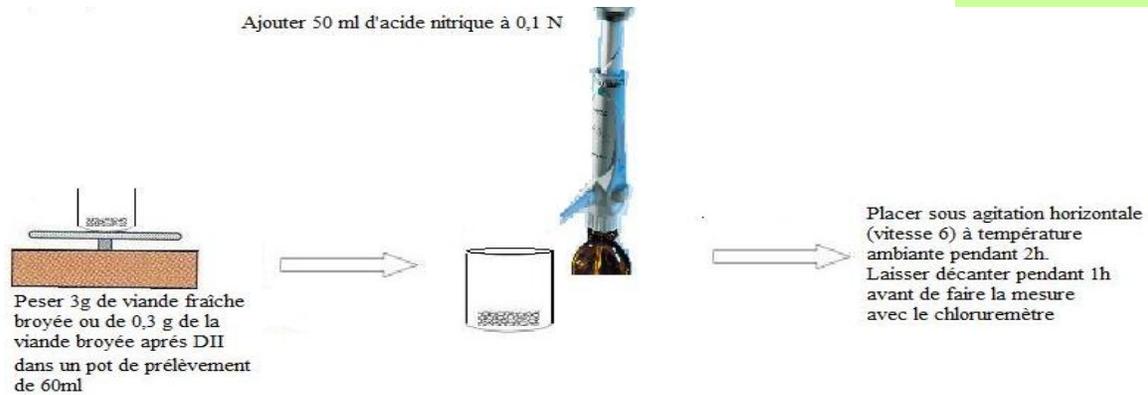


Figure 7 : Schéma de préparation de l'échantillon avant la mesure de la teneur en sel avec le chloruremètre

Le calcul de la teneur en sel se fait selon la formule :

$$T_s = \frac{1,648 \times V \times X \times 10^{-4}}{m_{viande}}$$

Avec :

T_s : teneur de sel en g/100 de viande

x : valeur affichée par le chloruremètre (mg Cl/l)

V : volume de la solution d'acide nitrique utilisée pour l'extraction (50×10^{-3} l)

m : masse de l'échantillon (g)

pH et acidité titrable

La préparation de l'échantillon à analyser est schématisée par la figure 8.

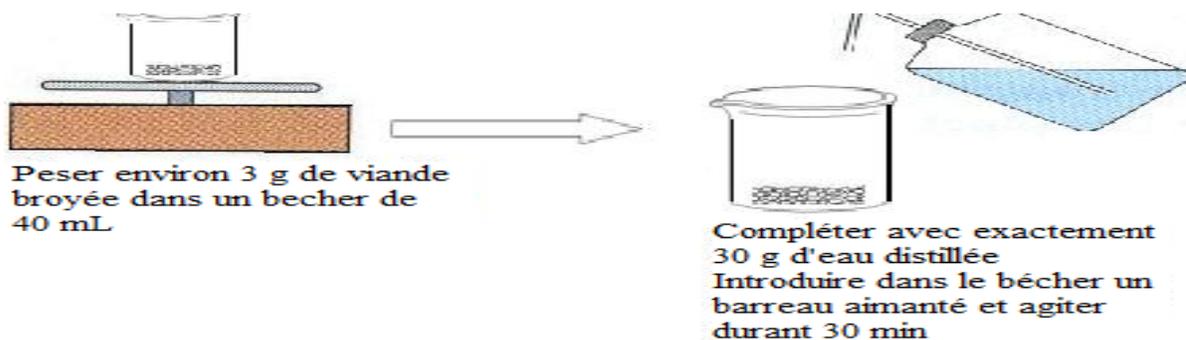


Figure 8 : Schéma résumant la préparation de l'échantillon avant la mesure avec le titrateur automatique

Pour les échantillons inoculés avec *Listeria innocua*, la solution est stérilisée par filtration (0,22 µm).

Un titrateur automatique (SCHOTT Instruments, Mainz, Allemagne) est utilisé pour la mesure de pH et de l'acidité titrable.

Le pH est lu juste après le démarrage du titrateur automatique, alors que pour l'acidité titrable une titration est faite par l'hydroxyde de sodium (NaOH) à 0,05 N jusqu'à un pH de 8,3.

Le calcul de l'acidité titrable se fait selon la formule :

$$AT = (v_{NaOH} \times c_{NaOH} \times 100) / m_{viande}$$

Avec

AT : acidité tirable (meq/100g)

V_{NaOH} : volume de soude versé (mL)

C_{NaOH} : concentration de la solution de soude utilisée (0,05 mol/l)

m_{viande} : masse de viande (g)

Activité de l'eau

L'activité en eau est mesurée à 25°C avec un Awmètre FAST/1 (GBX, Romans, France).

Teneur en eau

Environ 5g de viande broyés sont mis dans une étuve (Mettler, Schwabach, Allemagne) à 103°C durant 24h. À la fin de l'étuvage la teneur en eau est calculée selon la formule :

$$Te = \frac{m_{viande \text{ avant étuvage}} - m_{viande \text{ après étuvage}}}{m_{viande \text{ avant étuvage}}} \times 100$$

Avec :

Te : teneur en eau (g/100g de viande)

m_{viande avant étuvage} : masse de viande avant étuvage (g)

m_{viande après étuvage} : masse de viande après étuvage (g)

4.6 Calculs des transferts de matière au cours de la DII et de la fermentation

Perte en poids

i. Au cours de la DII :

$$PP = \frac{m_{avDII} - m_{apDII}}{m_{avDII}} \times 100$$

Avec :

PP : perte en poids (g/100g de matière avant DII)

m_{avDII} : masse du filet de viande avant DII (g)

m_{apDII} : masse du filet de viande après DII et avant la fermentation (g).

ii. Au cours de la fermentation :

$$PP = \frac{m_{avferm} - m_{apferm}}{m_{avferm}} \times 100$$

Avec :

PP : perte en poids (g/100g de matière avant fermentation).

m_{avferm} : masse du filet de viande après DII et avant la fermentation (g)

m_{apferm} : masse du filet de viande à la fin de la fermentation (g)

Perte en eau au cours de la DII

Elle est calculée à partir des teneurs en eau des échantillons selon la formule :

$$PE = T_{eavDII} - \frac{T_{eapDII} \times m_{apDII}}{m_{avDII}}$$

Avec :

PE : perte en eau (g/100g de matière avant DII)

T_{eavDII} : teneur en eau du filet de viande avant DII (g/100g)

T_{eapDII} : teneur en eau du filet de viande après DII (g/100)

m_{avDII} : masse du filet de viande avant DII (g)

m_{apDII} : masse du filet de viande après DII (g)

Gain en sel au cours de la DII

Il est calculé à partir des mesures de teneurs en sel des échantillons selon la formule :

$$G_s = \frac{T_{sapDII} \times m_{apDII}}{m_{avDII}} - T_{savDII}$$

Avec :

G_s : gain en sel (g/100 g de matière avant DII)

T_{savDII} : teneur en sel du filet de viande avant DII (g/100g)

T_{sapDII} : teneur en sel d'un filet de viande après DII (g/100g)

m_{avDII} : masse d'un filet de viande avant DII (g)

m_{apDII} : masse d'un filet de viande après DII (g)

Gain en sucre au cours de la DII

Un bilan matière est établi pour déduire le gain en sucre :

$$G_{suc} = PE - G_s - PP + P_{\text{solutés propres}}$$

G_{suc} : gain en sucres en % base humide.

P_{solutés propres} : perte en solutés propres au cours de la DII en % base humide (sont considérés négligeables)

C. Résultats et discussion

1. Mise au point du protocole d'inoculation

1.1 Courbe de croissance de *L. innocua*

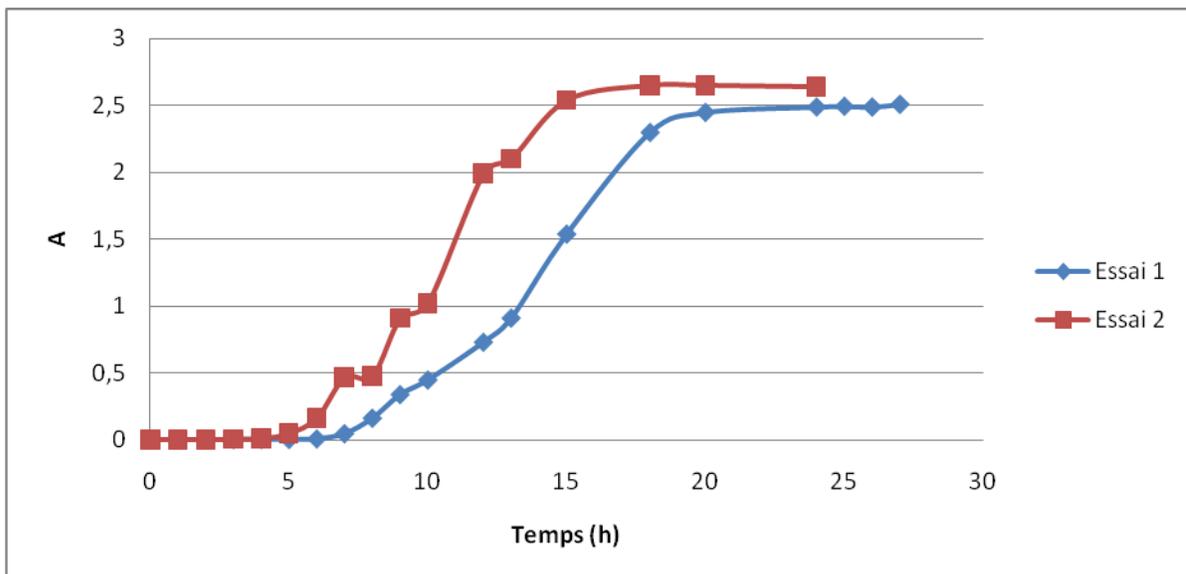


Figure 9 : Mesure de l'absorbance de la culture de *L. innocua* au cours du temps incubée à 37°C avec agitation (n = 2)

Les deux courbes (figure 9) montrent que la croissance de *Listeria innocua* passe par trois phases :

Une phase de latence qui dure 5 à 7h. Pour cette étape il n'y a pas de division cellulaire. Il s'agit d'une période au cours de laquelle les cellules synthétisent les enzymes qui vont leur être nécessaires pour utiliser les substrats du milieu.

Une phase exponentielle ou d'accélération au cours de laquelle les cellules se divisent pour arriver à une phase stationnaire qui commence après 18h à 24h de culture. Au cours de la phase stationnaire la multiplication cellulaire apparaît nulle et la turbidité cellulaire est constante.

Les différents essais réalisés montrent que l'A à la phase stationnaire diffère d'une culture à une autre. Cette différence pourrait être expliquée par la variation des cryobilles qui ne renferment pas forcément le même nombre de bactéries lors de la mise en culture. Cependant il est indispensable de fixer une A dont la concentration en UFC/mL est bien connue afin de bien maîtriser le taux d'inoculation initial des filets de viande. Pour ce faire, il est nécessaire de centrifuger et diluer le culot dans de l'eau physiologique jusqu'à obtenir une A fixée à 1,7.

1.2 Essais d'inoculation des filets

Détermination du volume de la suspension d'inoculation

Les essais préliminaires avec de l'eau ont permis de dégager, pour chaque méthode, des intervalles d'application pour la quantité adéquate qui pourrait être étalée sur un filet de viande :

- Étalement par râteau : $0,15 \text{ mL} \leq V \leq 0,5 \text{ mL}$ et à partir de 0,75 mL par surface, le filet commence à égoutter.
- Trempage dans une boîte de Pétri : $0,75 \text{ mL} \leq V \leq 1 \text{ mL}$, le filet n'est pas capable d'absorber plus de 1ml de solution.

L'étalement à l'aide d'une oese ne pourra pas être utilisé car elle abîme la surface du filet de viande.

Finalement les volumes retenus pour chaque méthode sont :

0,5 mL par surface dans le cas d'étalement par râteau, et 1 mL pour le trempage dans une boîte de Pétri.

Concentration de la suspension d'inoculation de *L. innocua*

La concentration de la suspension bactérienne à une A= 1,7 est présentée dans le tableau 4.

Tableau 4 : Concentration en *L. innocua* à une A de 1,7

Dénombrement sur Oxford	
Suspension d'inoculation de <i>Listeria innocua</i> à A= 1,7	8,14 ± 2,03 10 ⁷ UFC/mL n = 5

(Valeur après ± est l'écart type; n est le nombre de répétitions)

L'A de la suspension bactérienne de *Listeria innocua* est fixée à 1,7 (±0,02). Le dénombrement de cette suspension donne une concentration de 8,14 (± 2,03) 10⁸ UFC/mL.

Les essais montrent que le dénombrement de la suspension bactérienne à cette A est reproductible (n = 5). Cependant il faut rappeler que cette méthode de corrélation entre la concentration bactérienne et la mesure de la turbidité ne fait pas la distinction entre les bactéries viables et non viables. Il est donc indispensable de faire un dénombrement systématique de la suspension bactérienne lors de chaque manipulation afin de vérifier la concentration.

Inoculation des filets avec *L. innocua*

Les résultats de dénombrement de *L. innocua* à t₀ sont présentés dans le tableau 5.

Tableau 5 : Dénombrement des filets de viande inoculés à t₀ selon deux techniques

Dénombrement sur Oxford		
Inoculation des filets de viande avec une suspension de <i>Listeria innocua</i> à 10⁵ UFC/mL	Étalement par râteau (0,5 mL / surface de filet)	Trempe dans une boîte de Pétri (1 mL)
	3,6 ± 1,63 10 ³ UFC/g n = 3	3,6 ± 2,33 10 ³ UFC/g n = 3

(Valeur après ± est l'écart type; n est le nombre de répétitions)

Les deux méthodes d'inoculation utilisées (étalement par râteau et trempage dans une boîte de pétri) donnent la même concentration d'inoculation à t₀. Vu que l'étalement avec le râteau est le plus utilisé dans la littérature, il a été retenu pour la réalisation des essais.

2. Suivi de *L. innocua* et des paramètres physicochimiques au cours du procédé de DII associée à la fermentation lactique

2.1 Dénombrement de *L. innocua* sur la matière première

Pour chaque essai un dénombrement de *L. innocua* est réalisé sur la matière première.

Les résultats de ces dénombrements montrent que cette espèce bactérienne est en dessous du seuil de détection dans les viandes fraîches utilisées.

2.2 Transferts de matière

Des analyses sur les filets de viande avant et après DII ont permis d'évaluer l'effet de cette dernière sur certains paramètres physiques (tableau 6).

Tableau 6 : Transferts de matière au cours de la DII et de la fermentation (n = 9)

	Perte en poids (g/100g)	Perte en eau (g/100g)	Gain en sel (g/100g)	Gain en sucre (g/100g)
Au cours de la DII	16,45 ± 0,13 n = 9	20,11 ± 0,9 n = 9	1,5 ± 0,51 n = 9	2,16 ± 1,32 n = 9
Au cours de la fermentation	0,86 ± 0,04 n = 9			

(Valeur après ± est l'écart type; n est le nombre de répétitions)

Les résultats montrent que la DII entraîne une perte en eau de 20% et un gain en sel et en sucre respectivement 1,5% et 2,16%. Le gain en sel obtenu est légèrement inférieur à celui obtenu dans des études antérieures (2%) pour les mêmes conditions de DII (Quaranta, 2007 ; Verdy, 2008).

Au cours de la fermentation la perte en poids est négligeable ce qui montre que l'étuvage n'entraîne pas un séchage supplémentaire pour le produit.

2.3 Résultats physico-chimiques

Les paramètres physicochimiques (activité en eau, teneur en eau et en sel, pH) des viandes aux différentes étapes du procédé sont présentés dans le tableau 7

Tableau 7 : Paramètres physicochimiques de la viande inoculée et non inoculée avec *L. innocua* (n=6)

		Aw	Te (%)	pH	Ts (g/100g)
Viande non inoculée avec <i>L. innocua</i>	Viande fraîche	0,998	74,33	5,59	0,064
		±0,012	±0,25	±0,27	±0,009
	après DII	0,972	64,81	5,42	1,87
		±0,003	±1,25	±0,04	±0,62
Viande inoculée avec <i>L. innocua</i>	Après			5,24	
	étuvage			±0,15	

(La valeur après (±) présente l'écartype)

2.4 Résultats des dénombrements des bactéries lactiques

Le tableau 8 présente les dénombrements des bactéries lactiques après inoculation par les ferments et 24h d'étuvage.

Tableau 8 : Dénombrements des bactéries lactiques (n = 6)

Après inoculation avec <i>L. sakei</i> À t_0	Après 24h d'étuvage
$6,3 \pm 3,04 \cdot 10^7$ UFC/g	$1,15 \pm 0,21 \cdot 10^9$ UFC/g
n = 6	n = 6

Les résultats montrent que l'inoculation préalable par *Listeria innocua* ne modifie pas la quantité de ferments initiale puisque Verdy (2009) obtenait également 7 log UFC/g de bactéries lactiques après trempage dans la solution de ferments. Après étuvage, on a une croissance des bactéries lactiques (de 2 log UFC/g) telle que l'avait observé Verdy (2009) sur des filets non inoculés par *listéria innocua*.

2.5 Suivi de l'acide lactique et de glucose au cours du procédé

Les teneurs en acide lactique et en glucose des viandes aux différentes étapes du procédé sont présentées sur la figure 10.

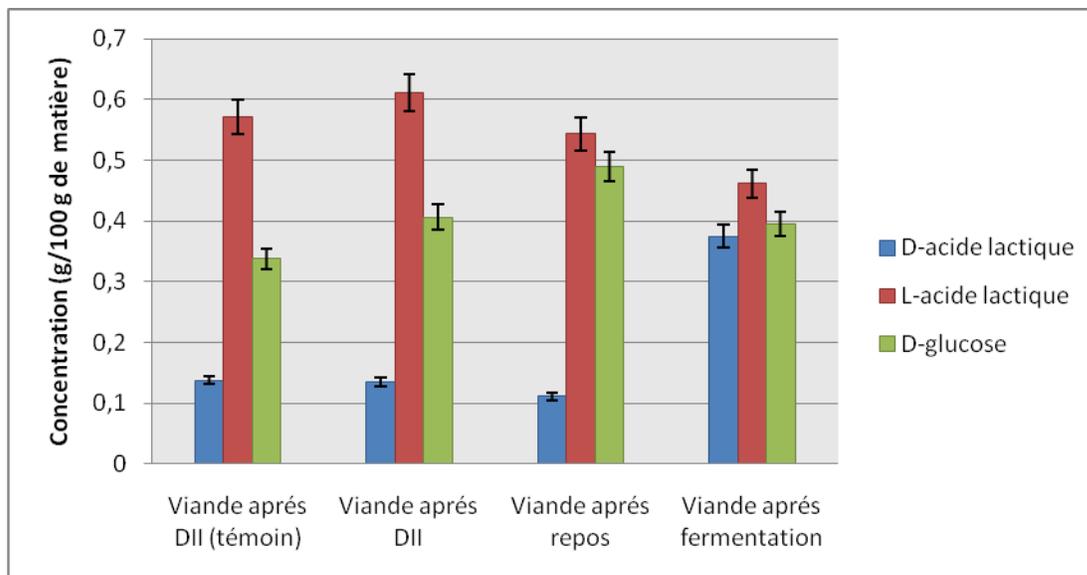


Figure 10 : teneurs en acide lactique et en glucose au cours du procédé
 (n=6, barres= intervalles de confiance à 95%)

Les résultats montrent que les teneurs en acides D et L lactique après DII sont identiques que les filets aient été inoculés ou non par *Listeria innocua*. Par contre, la teneur en

glucose des filets inoculés est supérieure à celle des filets non inoculés. Cela laisse supposer que *Listeria innocua* participerait à la dégradation des sucres complexes présents dans la solution de DII en sucre simple tel que le glucose et améliore la diffusion de ce dernier dans les filets de viande.

L'acide L lactique, qui existe naturellement dans la viande, diminue au cours du repos (de $0,611 \pm 0,11$ après DII à $0,543 \pm 0,15$ g/100g) et de la fermentation (à $0,461 \pm 0,04$ g/100g). Cette diminution pourrait être expliquée par la possibilité de sa conversion en D-acide lactique sous l'effet des bactéries telle que *Listeria innocua* et les bactéries lactiques qui existent naturellement dans la viande.

Au cours de l'étuvage, il y a production d'acide D lactique (de 0,1 à 0,3 g/100g soit une production de 0,2 g/100g) et consommation du glucose de 0,4 à 0,3 soit une consommation de 0,1 g/100g. Comparés aux résultats de Verdy (2009), sur des filets non inoculés, on a la même production d'acide D lactique mais une plus faible consommation du glucose (0,2 g/100g dans son cas).

Il semble donc au vu de ses résultats que la fermentation se soit déroulée de la même façon que sur des filets non inoculés.

2.6 Évolution de *L. innocua*

Les résultats des dénombrements de *Listeria innocua* au cours du procédé de DII associée à la fermentation sont présentés sur la figure 9.

Les filets de viande sont inoculés initialement avec $1,6 (\pm 0,43) 10^3$ UFC /g de *Listeria innocua*.

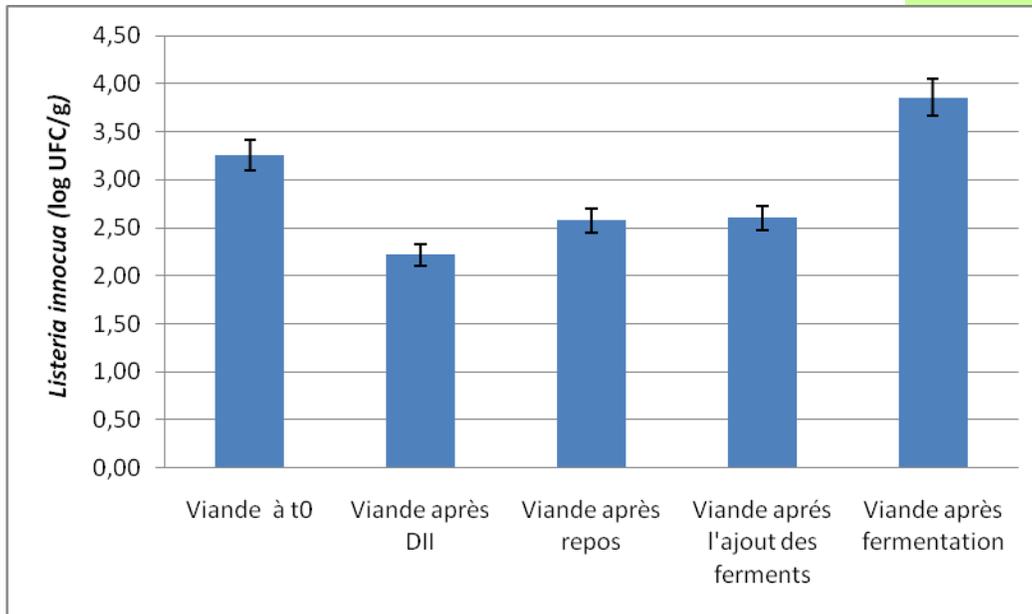


Figure 11 : Évolution de la concentration de *L. innocua* au cours du procédé de DII associée à la fermentation (n= 6, barres = intervalles de confiance à 95%)

Au cours de la DII

Après la DII, la concentration bactérienne en *L. innocua* a diminué à $1,65 (\pm 0,91)10^2$ UFC/g. Cette réduction serait à priori due l'effet mécanique de l'agitation lors de l'immersion et du rinçage ce qui entraîne un passage d'une partie de *L. innocua* dans la solution de DII et dans l'eau.

En effet, *Listeria innocua* peut survivre à une A_w de 0,92 et à un taux de NaCl de 12 % (w/w). Or la solution de DII a une A_w d'environ 0,97 avec un taux en NaCl de 4,8 % (w/w). Aussi *L. innocua* avait la capacité de se multiplier dans la solution de DII.

Pour vérifier l'hypothèse qu'une partie de *L. innocua* est passée dans la solution de DII, des dénombrements de la solution de DII à la fin de l'immersion ont été réalisés (tableau 9).

Tableau 9 : Dénombrement de *L. innocua* dans la solution de DII

	Essai 1	Essai 2	Essai 3
Dénombrement de <i>L. innocua</i> dans la solution de DII	$2 (\pm 2) 10^3$ UFC/mL	$88 (\pm 0,6)$ UFC/mL	Sous le seuil de détection

(Valeur après \pm est l'écart type; n = 3)

Les résultats donnent des taux de contamination (tableau 9) non reproductibles. Cette variation pourrait être expliquée par le fait que le faible volume de solution de DII prélevé (0,1mL) n'est pas représentatif en termes de concentration en *Listéria innocua* de la solution. En effet, la solution de DII est très visqueuse ce qui explique que la concentration en listéria n'était probablement pas homogène.

Au cours du repos

Les filets sont stockés à une température de 4°C en aérobiose. Ces paramètres ne gênent pas la prolifération de *L. innocua* qui a comme température limite de multiplication 1°C ce qui explique la tendance de cette espèce bactérienne à évoluer dans les filets de viande lors du repos (passe de 1,65 ($\pm 0,9$) 10^2 UFC/g à 3,75 ($\pm 1,9$) 10^2 UFC/g).

Lors de l'inoculation par les ferments lactiques

Le trempage des filets de viande dans une suspension de *L. sakei* ne montre pas d'effet ni sur *L. sakei* ni sur *L. innocua*. Le dénombrement sur MRS donne une concentration en bactéries lactiques de 6,3 ($\pm 3,04$) 10^7 UFC/g (mêmes résultats trouvés par Verdy, 2009) (tableau 8).

L. innocua a la capacité de former un biofilm pour adhérer aux surfaces solides, peut être que c'est cette propriété qui a réduit l'effet mécanique du trempage sur cette bactérie.

Lors de la fermentation

Le dénombrement après fermentation montre que la concentration de *L. innocua* passe de 10^2 UFC/g à 3,6 ($\pm 2,68$) 10^3 UFC/g à la fin de la fermentation.

L. sakei est dotée d'une propriété anti-*Listeria* grâce à la production de bactériocines. Dans la littérature l'effet d'inhibition de *L. innocua* par *L. sakei* est constaté après 72h de contact entre les deux bactéries (Héquet *et al.*, 2007). La production de bactériocines est favorisée à 20°C et à un pH entre 5 et 6 (Héquet *et al.*, 2007). Ces paramètres sont bien représentés dans les conditions expérimentales. Ceci laisse supposer que la durée de fermentation est insuffisante pour que *Lactobacillus sakei* produise une dose efficace de bactériocines permettant l'inhibition de *L. innocua*.

La production de bactériocines par *Lactobacillus sakei* exige des bonnes conditions de croissance de cette espèce bactérienne (Héquet *et al.*, 2007), cela met en cause la façon dont *Lactobacillus sakei* est préparée pour l'inoculation de la viande. En effet *Lactobacillus sakei* dans les essais est utilisée sous une forme lyophilisée ce qui représente un stress majeur pour la bactérie, et elle est suspendue dans de l'eau physiologique pour être utilisée pour l'inoculation des filets. Vu que l'eau physiologique ne représente aucun élément nutritif pour la bactérie, *Lactobacillus sakei* n'a pas les moyens pour surmonter le stress et se réactiver. Aussi, il faudrait que la bactérie passe par

une étape d'enrichissement permettant de la remettre dans des bonnes conditions de croissance avant l'inoculation.

Rapport-Gratuit.com

Conclusion et perspectives

Les résultats des dénombrements des filets inoculés avec *L. innocua* ont bien montré que le protocole mis en place est reproductible, permettant de bien évaluer la robustesse d'un point de vue microbiologique du procédé de DII associée à la fermentation lactique.

Le procédé de DII entraînant une perte en eau de 20% associée à la fermentation a permis une réduction bactérienne de *L. innocua* juste après le traitement de DII de l'ordre de 1 log UFC/g. Cependant, une augmentation équivalente est observée après fermentation, avec une tendance à évoluer aussi au cours du repos. Sachant que la contamination par *L. innocua* n'a pas gêné la fermentation, il serait intéressant de prolonger la durée d'étuvage pour étudier l'effet de *L. sakei* sur la croissance de *L. innocua*.

Cette étude a permis de détecter deux points critiques dans ce type de procédé à savoir le repos et la fermentation.

Il est recommandé de réduire le temps de repos afin de limiter le temps de prolifération bactérienne et d'augmenter le temps de fermentation pour que *Lactobacillus sakei* produise une dose efficace de bactériocines permettant l'inhibition de *Listeria innocua*.

La survie de *Listeria innocua* dans la solution de DII exclut la possibilité de recyclage de cette solution pour la réutilisation. Il serait intéressant de réaliser un test de croissance sur la solution de DII afin de déterminer le taux de croissance maximale de *Listeria innocua* dans cette solution.

Le dénombrement des bactéries sur milieu MRS donne la concentration de toutes les bactéries lactiques et pas seulement de *Lactobacillus sakei*. Afin de trouver une corrélation entre la concentration d'inoculation en *Lactobacillus sakei* et le taux d'inhibition de *Listeria innocua* il est préférable d'adopter une technique permettant de dénombrer *Lactobacillus sakei* indépendamment des autres bactéries lactiques. Il serait aussi intéressant de faire le dosage des bactériocines produites par *Lactobacillus sakei* afin de déterminer les meilleures conditions permettant leur production en fonction de type de DII appliquée.

Finalement un test de croissance pourrait se faire sur le produit après fermentation afin d'évaluer sa stabilité dans le cas d'une contamination et s'il permet de respecter la norme de inférieur à 100 UFC/g de *Listeria monocytogenes* à la fin de la DLC.

Des études sur la composition de la membrane de *Listeria innocua* et *Listeria monocytogenes* montrent que la membrane de *Listeria innocua* est plus électronégative

que celle de *Listeria monocytogenes* (Boyer *et al.*, 2009). L'électronégativité des membranes cellulaires intervient principalement dans leur réponse vis à vis du stress environnemental tel que le pH, le sel et Aw. Si *Listeria innocua* diffère de *Listeria monocytogenes* au point de vue des fonctions membranaires il est imaginable que les capacités de survie de *Listeria innocua* différeraient aussi.

Bibliographie

Aymerich, T., Garriga, M., Monfort, J.M., Nes, I.F., Hugas, M. (2000). Bacteriocin-producing lactobacilli in spanish-style fermented sausages: characterization of bacteriocins. International Journal of Food Microbiology, 33-45.

Baltimore, W., Baltimore, W. (1986). Bergery's Manual of Systematic Bacteriology. (Vol 2).

Beumer, R.R., Giffel, M.C., Spoorenberg, E., Rombouts, F.M. (1996). *Listeria* species in domestic environments. Journal of Epidemiology and Infection, 437-442.

Borovian G.E. (1989). Control of *Listeria monocytogenes* in comparison to other food pathogens using food preservatives. Proceedings of annual meeting of American Society for Microbiology. New Orleans, 14-18.

Boyer, R.R., Matak, K., Sumner, S.S., Meadows, B., Williams, R.C., Eifert, J.D., Birbari, W. (2009). Survival of *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua*, and lactic acid bacteria in chill brines. Journal of Food Science, 219-223.

Calicioglu, M., Sofos, J.N., Salemis, J., Kendall, P.A., Smith, G.C. (2002). Destruction of acid-and non-adapted *Listeria monocytogenes* during drying and storage of beef jerky. International Journal of Food Microbiology, 545-559.

Calicioglu, M., Faith, N.G., Buege, D.R., Luchnsky, J.B. (2001). Validation of manufacturing process for fermented, semidry Turkish Soudjouk to control *Escherichia coli* O157H7. Journal of Food Protection, 115-1161.

Collignan, A., Bohuon, P., Deumier, F., Poligné, I. (2001). Osmotic treatment of fish and meat products. Journal of Food Engineering, 153-162.

Curiale, M.S., Lewis, C. (1994). Detection of *Listeria monocytogenes* in samples containing *Listeria innocua*. Journal of Food Protection, 1048-1051

Dush, Y.H., Schaffner, D.W. (1993). Modelling the effect of temperature on the growth rate and lag times of *Listeria innocua* and *Listeria monocytogenes*. Journal of Food Protection, 56-64.

Duffy, G., Walsh, D., Sheridan, J.J., Logue, C.M. (2001). Comparison of selective and non selective enrichment media in the detection of *Listeria monocytogenes* from meat containing *Listeria innocua*. Journal of Applied Microbiology, 994-999.

Durand, P. (1999). Technologies des produits de charcuterie et des salaisons. Technique et Documentation, Paris, p.280-324.

Evanson, D.J., Klatt, M.J., Donlevy, T.P., Flowers, R.S. (1991). Agar based 24-H method for presumptive identification of *Listeria monocytogenes*. International Journal of Food Protection, 370-371.

Fenlon, D.R., Wilson, J., Donachie, W., (1996). The incidence and level of *Listeria monocytogenes* contamination of food sources at primary production and initial processing. Journal of Applied Bacteriology, 641-650.

George, S.M., Lund, B.M., Brocklehurst, T.F. (1988). The effect of pH and temperature on initiation of growth of *Listeria monocytogenes*. Letters in Applied Microbiology, 6, 153-156.

Guyot, J.P. (2008). Les bactéries lactiques en alimentation et nutrition. Cours de 2^e année IAARC, Montpellier SupAgro Institut des Régions Chaudes.

Hart, C.D., Mead, G.C., Nourris, A.P. (1991). Effets of gaseous environment and temperature on the storage behaviour of *Listeria monocytogenes* on chicken breast meat. Journal of Applied Bacteriology, 40-46.

Héquet, A., Laffitte, V., Simon, L., De Sousa-Caetano, D., Thomas, C., Fermaux, C., Berjeaud, J.M. (2007). Characterization of new bacteriocinogenic lactic acid bacteria isolated using a medium designed to simulate inhibition of *Listeria* by *Lactobacillus sakei* 2512 on meat. International Journal of Food Microbiology, 67-74.

Holck, A.L., Axelsson, L., Huhne, K., Krockel, L. (1994). Purification and cloning of sakacin 674, a bacteriocin from *Lactobacillus sakei* Lb674. FEMS Microbiology Letters, 143-149

Houtsma, P.C., Kusters, B.J.M., Wit, J.C., Rombouts, F.M., Zweitering, M.H. (1994). Modelling growth rates of *Listeria innocua* as a function of lactate concentration. International Journal of Food Microbiology, 113-123.

Hugas, M., Garriga, M., Americh, M.T., Monfort, J.M. (1995). Inhibition of *Listeria* in dry fermented sausage by the bacteriocinogenic *Lactobacillus sakei* CTC494. Journal of Applied Microbiology, 332-330.

Jeantet, R., Croguennec, T., Schuck, P., Brulé, G. (2006). Science des aliments (Vol.1). Lavoisier, Paris.

Jeantet, R., Croguennec, T., Schuck, P., Brulé, G. (2007). Science des aliments (Vol.2). Lavoisier, Paris.

Kaiser, A.L., Montville, T.J. (1996). Purification of the bacteriocin bavaricin MN and characterization of its mode of action against *Listeria monocytogenes* Scott A cells and lipid vesicles. Applied and Environmental Microbiology 62, 4529–4535.

Kouakou, P., Ghalfi, H., Destain, J., Dubois-Dauphin, R., Evrard, P., Thonart, P. (2009). Effects of curing sodium nitrite additive and natural meat fat on growth control of *Listeria monocytogenes* by the bacteriocin-producing *Lactobacillus curvatus* strain CWBI-B28. International Journal of Food Microbiology, 623-628.

Larpent, J.P. (2000). *Listeria*. Technique et Documentation, Paris, p. 19-24.

Mathiesen, G., Huehne, K., Kroeckel, L., Axelsson, L., Eijsink, V.G. (2005). Characterization of a new bacteriocin operon in sakacin P-producing *Lactobacillus sakei*, showing strong translational coupling between the bacteriocin and immunity genes. Applied and Environmental Microbiology, 3565-3574.

Messens, W., De Vuyst, L. (2002). Inhibitory substances produced by *Lactobacilli* isolated from sourdoughs—a review. International Journal of Food Microbiology, 31-34.

Nolan, D.A., Chamblin, D.C., Troller, J.A. (1992). Minimal water activity levels for growth and survival of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua*. International Journal of Food Microbiology, 323-335.

Noriega, E., Laca, A., Diaz, M. (2009). *Listeria* growth under diffusional limitations in synthetic meats. International Journal of Food science and Technology, 44 (4), 725-734.

Parisch, M.E., Higgins, D.P. (1989). Survival of *Listeria monocytogenes* in low pH model broth systems. Journal of Food Protection, 52, 144-147.

Pegoraro, S. (2005). Étude de la fermentation d'une viande après un traitement de la déshydratation-imprégnation par immersion. Rapport de stage fin d'étude Ingénieur Industrie Agroalimentaire, INSFA Rennes.

Quaranta, J. (2007). Étude de la fermentation d'une viande maigre après un traitement de déshydratation imprégnation par immersion. Rapport de stage fin d'étude Ingénieur Industrie Agroalimentaire, INSFA Rennes.

Samelis, J., Roller, S., Metaxopoulos, J. (1994). Sakacin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus sakei* isolated from Greek dry fermented sausage. Journal of Applied Bacteriology, 475-486.

Santchurn, S.J., Collignan, A., Trystram, G. (2007). Impact of solute molecular mass and molarity, and solution viscosity on mass transfer during immersion of meat in a complex solution. Journal of Food Engineering, 1188-1201.

Santchurn, S.J. (2009). Analyses et compréhension des mécanismes de transferts de matière lors de l'immersion d'une pièce de viande dans une solution complexe : étude expérimentale et modélisation. Thèse pour obtenir le grade de Docteur de l'Université de la Réunion en Génie des Procédés Alimentaires.

Schillinger, U., Lucke, F.K. (1989). Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. Applied and Environmental Microbiology, 1901-1906.

Sielaff, H. Von. (1968). Die lebensmittelhygienische Bedeutung der Listeriose. Monatsch. Veterinärmed, 21, 750-758

Skovgaard, N., Norrung, B. (1989). The incidence of *Listeria spp* in feces of Danish pigs and in minced pork meat. International Journal of Food Microbiology, 59-63.

Skaugen, M., Abildgaard, C.I., Nes, I.F. (1997). Organization and expression of a gene cluster involved in the biosynthesis of the lantibiotic lactocin S. Molecular and General Genetics, 674-686.

Smith, J. L., Huhtanen, C. N., Kissinger, J. C., Palumbo, S. A. (1975). Survival of salmonella during pepperoni manufacture. Applied Microbiology, 30(5), 759-763.

Sobrinho, O.J., Rodriguez, J.M., Moriera, W.L., Cintas, L.M., Fernandez, M.F., Sanz, B., Hernandez, P.E. (1992). Sakacin M, a bacteriocin-like substance from *Lactobacillus sake*. International Journal of Food Microbiology, 215-225.

Sorrells, K.M., Enigl, D.C., Hatfield, J.R. (1989). Effect of pH, acidulant, time, and temperature on the growth and survival of *Listeria monocytogenes*. Journal of Food Protection. 52, 571-573.

Tichaczek, P.S., Volgel, R.F., Hammes, W.P. (1994). Cloning and sequencing of sakP encoding sakacin P, the bacteriocin produced by *Lactobacillus sakei* LTH 673. International Journal of Food Microbiology, 361-367.

Vaughan, A., Eijsink, V.G., Van Sinderen, D. (2003). Functional characterization of a composite bacteriocin locus from malt isolate *Lactobacillus sakei* 5. Applied and Environmental Microbiology, 7194-7203.

Verdy, R. (2008). Étude de la fermentation de filets de viande de bœuf après immersion dans une solution concentrée. Rapport de stage Mater Nutrition, Agrovalorisation en Santé Public, ENSIA SIARC, Montpellier.

Table des illustrations

TABLEAU 1 : COMPOSITION MOYENNE DE LA VIANDE	6
TABLEAU 2 : BACTÉRIES ASSOCIÉES AUX TIAC ET LIÉES AUX VIANDES.....	8
TABLEAU 3 : CONDITIONS DE RÉALISATION DE LA DII	17
TABLEAU 4 : CONCENTRATION EN <i>L. INNOCUA</i> À UNE A DE 1,7	27
TABLEAU 5 : DÉNOMBREMENT DES FILETS DE VIANDE INOCULÉS À T ₀ SELON DEUX TECHNIQUES	27
TABLEAU 6 : TRANSFERTS DE MATIÈRE AU COURS DE LA DII ET DE LA FERMENTATION (N = 9)	28
TABLEAU 7 : PRAMÉTRIS PHYSICOCHIMIQUES DE LA VIANDE INOCULÉE	28
TABLEAU 8 : DÉNOMBREMENTS DES BACTÉRIES LACTIQUES (N = 6)	29
TABLEAU 9 : DÉNOMBREMENT DE <i>L. INNOCUA</i> DANS LA SOLUTION DE DII31	
FIGURE 1 : SCHÉMA DES TRANSFERTS DE MATIÈRE.....	2
FIGURE 2 : DIAGRAMME DU PROCÉDÉ DE DII ASSOCIÉE À LA FERMENTATION LACTIQUE	5
FIGURE 3 : SCHÉMA DES MANIPULATIONS RÉALISÉES	16
FIGURE 4 : DISPOSITIF D'IMMERSION DES FILETS DE VIANDE	18
FIGURE 5 : DISPOSITIF D'ÉTUVAGE DES FILETS DE VIANDE	19
FIGURE 6 : SCHÉMA D'EXTRACTION PAR LA MÉTHODE CARREZ.....	20
FIGURE 7 : SCHÉMA DE PRÉPARATION DE L'ÉCHANTILLON.....	22
FIGURE 8 : SCHÉMA RÉSUMANT LA PRÉPARATION DE L'ÉCHANTILLON.....	22
FIGURE 9 : MESURE DE L'ABSORBANCE DE LA CULTURE DE <i>L. INNOCUA</i> ..	25
FIGURE 10 : TENEURS EN ACIDE LACTIQUE ET EN GLUCOSE AU COURS DU PROCÉDÉ.....	29
FIGURE 11 : ÉVOLUTION DE LA CONCENTRATION DE <i>L. INNOCUA</i> AU COURS DU PROCÉDÉ	31