



Présentation du projet BLacHP (2015-2019)

Présentation du projet ANR BLacHP : « Bactéries Lactiques combinées avec Hautes Pressions pour un procédé durable de stabilisation des produits carnés réfrigérés »

Mots-clés : Spores bactériennes, Jambon, Nitrites

Auteur : Jean-Marie Perrier-Cornet et Hélène Simonin*

¹ Université de Bourgogne Franche-Comté, AgroSup Dijon, PAM UMR A 02.102, F-21000 Dijon, France

* E-mail de l'auteur correspondant : helene.simonin@agrosupdijon.fr

Le projet BlacHP a permis d'étudier une nouvelle stratégie pour contrôler la qualité microbiologique des produits carnés prêts à consommer, avec une approche pluridisciplinaire, autour du fil rouge du développement de dés de jambon à teneur réduite en nitrites.

Résumé :

Les produits carnés réfrigérés sont des produits périssables avec une durée de vie réduite. De plus, le stockage sous vide ou sous atmosphère modifiée à température réfrigérée peut donner un avantage sélectif au développement de bactéries sporulantes psychrotrophes des genres *Bacillus* et *Clostridium*. Ainsi, des conservateurs, tels que les nitrites, sont souvent nécessaires pour assurer la sûreté des produits réfrigérés faiblement acides pendant leur durée de vie. Etant donnée la forte pression sociétale pour la réduction des intrants chimiques dans les produits alimentaires prêts à consommer, l'objectif du projet BLac HP a été de développer une nouvelle stratégie pour la stabilisation des produits carnés réfrigérés transformés en combinant haute pression (HP) et biopréservation par des bactéries lactiques. Grâce à une approche pluridisciplinaire, les travaux ont permis l'étude de la combinaison de procédés à la fois à l'échelle cellulaire, sur des espèces de spores psychrophiles des genres *Bacillus* et *Clostridium* sélectionnées pour le projet et à l'échelle de l'écosystème. Ainsi, la réponse dynamique des écosystèmes microbiens aux procédés a été explorée par des méthodes de biologie moléculaire. En parallèle, l'effet des procédés a été examiné sur les propriétés nutritionnelles, technologiques et organoleptiques de dés de jambon. De plus, l'impact environnemental et sociétal de la combinaison de procédés a été évalué en comparaison avec un procédé conventionnel de jambon cuit. Enfin, le passage à l'échelle pilote et la transposition à d'autres produits ont été envisagés.

Abstract: Presentation of the project BLacHP (2015-2019)

Refrigerated meat products are perishables with a reduced storage life. In addition, vacuum-packed storage or with a modified atmosphere at refrigerated temperatures may provide a selective advantage to the development of psychrotrophic sporulating bacteria from the *Bacillus* and *Clostridium* genera. Thus, preservatives, such as nitrites, are often necessary to ensure the safety of refrigerated products with low acidity during their storage life. Pressure by society to reduce chemical inputs in ready-to-eat food products is behind the BLac HP project whose aim is to develop a new strategy for the stabilization of refrigerated transformed meat products by combining high pressure (HP) and biopreservation with lactic bacteria. Using a multidisciplinary approach, our work has allowed the study of a combination of processes on several levels: cell, psychrophilic spore species from *Bacillus* and *Clostridium* genera selected for a project and on the ecosystem scale. The dynamic response of microbial ecosystems to the processes was explored using molecular biology methods. At the same time, the effect of the processes on nutritional, technological and organoleptic properties of ham cubes was also evaluated. In addition, the environmental and societal impacts of the combination of the processes were evaluated in comparison with a conventional process for cooked ham. Finally, scaling up and transposition to other products have been considered.

INTRODUCTION

En Europe, le marché des aliments prêts à consommer cuits et réfrigérés contenant de la viande est en constante augmentation (FMI, 2016). Ces aliments ont souvent subi des traitements thermiques doux avec des températures maximales atteignant 65 à 95 °C avant d'être conditionnés sous vide ou sous atmosphère modifiée, puis réfrigérés. Ces conditions de traitement, conçues pour maîtriser les flores végétatives indésirables, peuvent cependant donner un avantage sélectif au développement de bactéries sporulantes psychrotrophes potentiellement pathogènes des genres *Bacillus* et *Clostridium* (Notermans *et al.*, 1990). Le contrôle de ces bactéries, en particulier les espèces des groupes des *Bacillus cereus* et des *Clostridium botulinum* non protéolytiques, devient donc un enjeu important pour la sécurité alimentaire (Rowswell, 2017). Dans les produits contenant de la viande, en particulier les produits à teneur en sel réduite et ayant une durée de conservation supérieure à 10 jours, l'addition de sels de nitrites à une concentration comprise entre 50 et 150 mg/kg est nécessaire pour inhiber la germination et la croissance de *C. botulinum* (EFSA, 2003). L'utilisation de conservateurs, tels que les nitrites dans les aliments, est cependant pointée du doigt par les consommateurs et les médias du fait de leur potentiel effet cancérigène (EFSA, 2017). Les professionnels des produits carnés sont donc incités à rechercher des alternatives à l'utilisation d'additifs, et en particulier des nitrites. La diminution des nitrites peut s'avérer problématique en raison de leurs propriétés technologiques (développement de la couleur rose et flaveur) et antibactériennes, et certains ajustements sont nécessaires pour maintenir la sécurité et la qualité des produits. Pour résoudre ce problème, des technologies alternatives doivent être investiguées.

La biopréservation est une méthode de conservation des aliments consistant à inoculer sur un produit des souches de bactéries sélectionnées pour leur innocuité et leur effet inhibiteur sur la flore indésirable qui pourrait s'y trouver. Les bactéries lactiques sont très utilisées pour la biopréservation du fait de leurs activités antagonistes vis-à-vis de bactéries pathogènes ou d'altération. Les principaux mécanismes qui permettent l'inhibition des flores indésirables par les bactéries lactiques sont la compétition microbienne et la production

d'antimicrobiens, d'acides organiques, de peroxyde d'hydrogène et/ou de bactériocines (Zagorec and Christeans, 2013). La sélection de bactéries actives contre *Listeria monocytogenes* a été largement documentée pour des applications dans différents aliments (Brillet *et al.*, 2005). Cependant, il existe très peu d'études sur le potentiel des bactéries bioprotectrices contre les bactéries sporulantes des genres *Bacillus* et *Clostridium*, même si certaines bactéries bioprotectrices peuvent produire des bactériocines, telles que la nisine (Gálvez *et al.*, 2007), susceptible d'inhiber la reprise de croissance des spores bactériennes.

Le procédé HP est de plus en plus utilisé à travers le monde sur la viande et les produits carnés comme alternative à la pasteurisation thermique ou comme étape supplémentaire de décontamination des produits emballés (Simonin *et al.*, 2012). Il y a aujourd'hui environ 470 enceintes HP en production dans le monde, dont 120 en Europe et 12 en France. Un quart des machines hautes Pressions (HP) traite des produits carnés et/ou des plats cuisinés à base de viande (Jung et Tonello-Samson, 2018). Les produits sont principalement traités par HP pour accroître leur sécurité par l'inactivation des microorganismes végétatifs pathogènes (principalement *L. monocytogenes*) sans altérer la qualité sensorielle. Cependant, comme de nombreuses technologies d'inactivation, les HP ne sont pas efficaces pour la destruction des spores bactériennes, et l'ajout de conservateurs alimentaires (nitrites) est toujours nécessaire dans les produits carnés pour contrôler la croissance des bactéries sporulées.

Les HP peuvent agir en synergie avec les bactériocines, en particulier la nisine, pour inactiver les bactéries végétatives et les spores bactériennes (Aouadhi *et al.*, 2013). Le projet BLac HP avait pour objectif d'étudier dans une approche pluridisciplinaire le potentiel d'un traitement associant l'inoculation d'une bactérie bioprotectrice (Protective Culture [PC]) productrice de bactériocine active contre les spores bactériennes et un traitement HP pour stabiliser les produits carnés réfrigérés faiblement acides. Le projet a été construit dans une approche pluridisciplinaire afin de fournir une base solide pour la compréhension et le développement industriel de la technologie.

I. UNE APPROCHE PLURIDISCIPLINAIRE ET APPLIQUEE

Le projet BLacHP est un projet de recherche industrielle coordonné par l'UMR PAM (Dijon). Il a associé aussi 4 partenaires industriels, CHR HANSEN, HIPERBARIC, 5 DEGROUEST et SOCIETE BIOVALEUR, 2 centres techniques CTCPA et IFIP ainsi que 3 autres laboratoires GEPEA, MICALIS et SECALIM. Le projet a commencé en janvier 2015 et a duré 48 mois. Les travaux ont été financés par l'ANR (ANR-14-CE20-0004).

Le projet BLacHP a été structuré en 6 tâches (Figure 1). Des dés de jambon cuits à teneur réduite en nitrites conditionnés sous vide ont été choisis comme modèle d'étude. Dans un premier temps, les mécanismes de stabilisation microbiologique des flores sporulées psychrophiles ont été étudiés de manière approfondie à l'échelle des cellules et de l'écosystème microbien du produit (Tâches 1 et 3). Parallèlement, l'impact des traitements sur les qualités nutritionnelles, technologiques et sensorielles du produit a été évalué tout au long de sa durée de vie (Tâche 2). De plus, l'analyse du cycle de vie du procédé a permis de

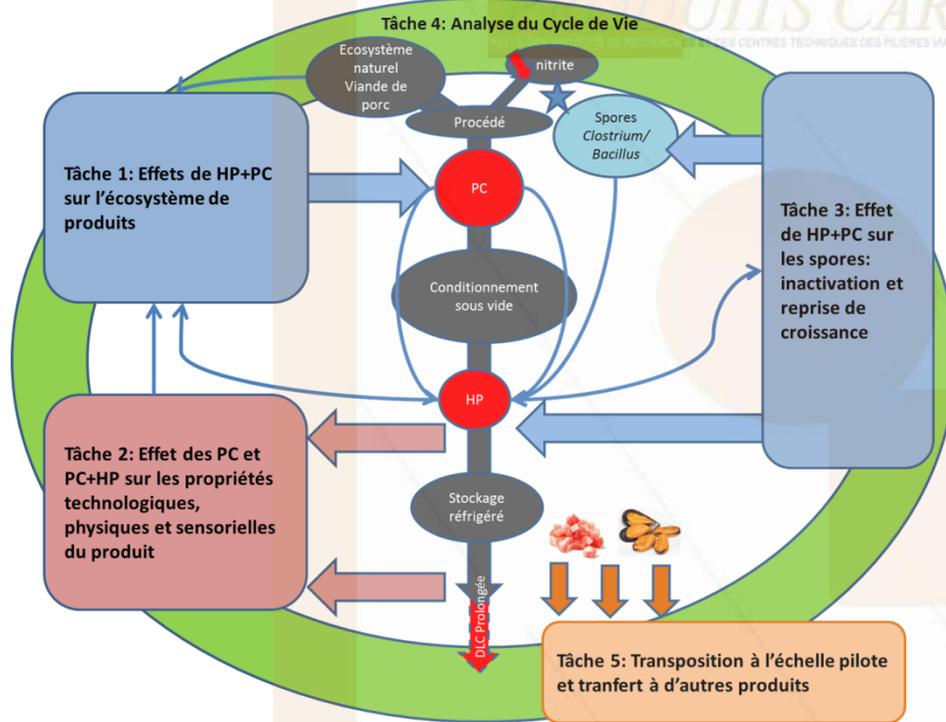
comparer son impact environnemental avec le procédé conventionnel de fabrication de dés de jambon cuits et de nouveaux facteurs de caractérisation d'impact sur la santé humaine ont pu être proposés (Tâche 4). Enfin, le procédé a été testé à l'échelle pilote et des essais de transposition à d'autres produits carnés ont été réalisés grâce au concours des partenaires industriels du projet (Tâche 5).

Les partenaires ont initialement et tout au long du projet uniformisé leurs méthodes de travail dans un souci de coordination. Des bactéries sporulantes modèles, ainsi que leurs méthodes de production, de conservation et d'utilisation, ont été sélectionnées et définies au début du projet. Six souches caractéristiques des produits carnés réfrigérés, dont 3 espèces aérobies (*B. weihenstephanensis* KBAB4, *Paenibacillus sp* CTCPA3230 030, *B. cereus* BC 120) et 3 espèces anaérobies (*C. algidicarnis* CTCPA 3227 034 - 3227 013, *C. frigidicarnis* CTCPA 3230 030 et *C. botulinum* type E-like non toxique DSMZ 1985) ont été retenues. De plus, la souche *B. subtilis* 168 a été ajoutée au

panel de souches pour la recherche des mécanismes d'action. Ces souches sont toutes capables de germer et de croître dans les milieux modèles et du jambon utilisé dans le cadre du projet. Les matrices d'étude ont également été uniformisées tout au long du projet, allant d'un milieu liquide synthétique dont la composition modélise un jambon supérieur à teneur réduite en nitrite pour les tâches de microbiologie fondamentale, à un jambon modèle fabriqué selon un

protocole standardisé et appliqué chez les différents partenaires (Rakotondramavo *et al.*, 2019), jusqu'à des produits fabriqués sur ligne par le partenaire industriel SBV. En début de projet, les partenaires ont choisi de travailler sur des milieux additionnés de 25 ppm de nitrites, concentration permettant d'obtenir un jambon rose sans exercer d'effet bactériostatique (données internes IFIP).

Figure 1 : Démarche et structure du projet de recherche BlacHP



HP : High pression ; PC : Protective Culture

II. RESULTATS OBTENUS

Les principaux résultats du projet qui s'est achevé au premier trimestre 2019 ont été présentés lors du colloque de restitution « Les nouvelles technologies de conservation des aliments “ Biopréservation et Hautes Pressions ”, colloque co-organisé par le Réseau Mixte Technologique (RMT) FLOREPRO et le consortium du projet BLacHP le 20 novembre 2018.

Dans une première étape du projet, une sélection de souches bactériennes a été réalisée à partir de 63 souches de bactéries lactiques fournies par différents partenaires sur la base de leur capacité à produire des bactériocines actives contre les espèces sporulantes citées ci-dessus et de leur innocuité (sensibilité aux antibiotiques, non-production d'amines biogènes) (Ramaroson *et al.*, 2018). La démarche de sélection des souches a permis de retenir trois souches d'intérêt dont la barorésistance a été évaluée. La souche *Lactococcus lactis* CH-HP15, productrice de nisine et seule capable de se redévelopper après les traitements HP, a été sélectionnée pour la suite du projet.

Afin de choisir les conditions de traitement permettant une synergie sur l'inactivation des spores bactériennes, l'effet de la combinaison HP et nisine a été testé sur 3 espèces bactériennes parmi les espèces sélectionnées pour le projet, dans un milieu synthétique mimant les propriétés physico-chimiques du jambon cuit supérieur. *L. lactis* CH-HP15 produit de la nisine dans ce milieu à une concentration qui

atteint 100 UI/mL en début de phase stationnaire de croissance. Des concentrations faibles en nisine (≤ 50 IU/mL) ont donc été testées, ce qui nous permet de mettre en évidence une synergie plus nettement. Les résultats montrent que la nisine agit en synergie avec le traitement HP sur les spores de *Bacillus* en particulier lorsqu'elle est présente à la fois pendant le traitement et dans le milieu de recouvrement après le traitement. Ces observations ont permis de définir les conditions de traitements à tester sur des dés de jambon ensemencés avec la bactérie *L. lactis* CH-HP15. De plus, nous avons démontré pour la première fois que les HP à 20°C induisaient une sensibilisation réversible des spores de *Bacillus sp.* à la nisine (Modugno *et al.*, 2019). Nous avons recherché la nature biochimique de ces modifications en microscopie Infra-Rouge (IR) hautement résolue au synchrotron Soleil. La signature biochimique de spores traitées a pu être enregistrée et analysée spore par spore. Les résultats montrent que les spores traitées par HP à 20°C ont des spectres dans la zone des lipides et des amides spécifiques qui pourraient être la signature de l'activation réversible des spores par HP à 20°C (Modugno *et al.*, 2019). Ces résultats nous permettent d'établir des hypothèses sur les mécanismes d'action de la combinaison des HP et de la biopréservation sur les spores bactériennes (Figure 2).

D'autres résultats marquants du projet BLac HP sont synthétisés dans ce numéro sous forme de 4 articles.

Un premier article traite des connaissances acquises des écosystèmes de jambon cuit et de l'impact des HP et de la biopréservation sur l'évolution de ces écosystèmes pendant leur durée de vie.

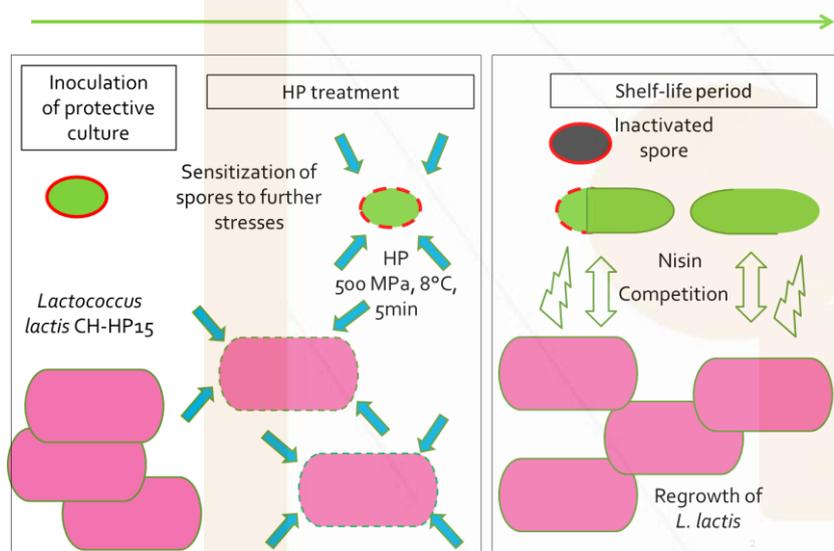
Puis, dans un deuxième article, sera traitée la question des impacts d'un traitement tel que la combinaison HP et biopréservation sur les propriétés fonctionnelles du jambon cuit.

L'analyse du cycle de vie (ACV) détaillée du jambon traité fera l'objet d'un troisième article, ainsi que la

proposition de nouvelles méthodes de caractérisation permettant d'évaluer l'impact sur la santé humaine de l'utilisation de technologies innovantes de stabilisation microbiologique par rapport à l'utilisation d'additifs chimiques.

Enfin, un dernier article synthétisera les résultats obtenus en termes de durée de vie sur l'utilisation combinée de la biopréservation et des HP sur différents produits carnés.

Figure 2 : Schéma hypothétique du mécanisme de stabilisation des spores par la combinaison des HP et de la biopréservation



CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Le projet BLacHP a été conçu autour du fil rouge de l'application de la combinaison de traitements à des dés de jambon cuit à teneur réduite en nitrites (25 ppm versus 150 ppm autorisé par la réglementation). Ce projet a permis la sélection d'une souche de biopréservation qui répondait à toutes les conditions de sélection et qui montrait une certaine barorésistance, lui permettant de dominer l'écosystème du jambon pendant son stockage après traitement aux HP. Nous avons trouvé des conditions optimales de traitement appliquées au jambon et montré qu'il était possible de transposer la technologie à d'autres produits carnés en mettant en place les adaptations nécessaires à la spécificité de chaque produit. Enfin, nous avons pu collecter suffisamment de données pour réaliser une ACV détaillée du jambon traité par la combinaison de traitements. Des études complémentaires restent à mener afin d'accélérer la reprise de croissance de la

bactérie de biopréservation après HP et sa capacité à exprimer son activité antimicrobienne. Enfin, nous avons fait le choix de travailler sur du jambon additionné d'une teneur minimale en nitrites pour conserver un produit similaire au conventionnel en terme de goût et de couleur. Des vérifications sont donc nécessaires pour étendre nos conclusions au jambon sans nitrite.

Derrière le fil rouge de la preuve de concept sur les dés de jambon, le projet ouvre de nombreuses perspectives de recherche notamment sur la sélection de souches de biopréservation pour leur association à d'autres technologies athermiques et la combinaison de technologies athermiques en général pour stabiliser les spores bactériennes.

Références :

Aouadhi C., Simonin H., Mejri S., Maaroufi A. (2013). The combined effect of nisin, moderate heating and high hydrostatic pressure on the inactivation of *Bacillus sporothermodurans* spores. *Journal of Applied Microbiology*, 115, 147–155. doi:10.1111/jam.12220.

Brillet A., Pilet M., Prevost H., Cardinal M., Leroi F. (2005). Effect of inoculation of *Carnobacterium divergens* V41, a biopreservative strain against *Listeria monocytogenes* risk, on the microbiological, chemical and sensory quality of cold-smoked salmon. *International Journal of Food Microbiology*, 104, 309–324.

European Food Safety Authority (EFSA) (2003). Opinion of the Scientific Panel on Biological Hazards on the effects of Nitrites/Nitrates on the Microbiological Safety of Meat Products. *EFSA Journal*, 14, 1–31.

FMI (2016). Future Market Insight, Ready-to-Eat Food Market: Meat/Poultry Segment Expected to Dominate Market from 2016 to 2026: Global Industry Analysis and Opportunity Assessment, 2016-2026.

Gálvez A., Abriouel H., López R.L., Omar N.B. (2007). Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *International Journal of Food Microbiology*, 120, 51–70. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2007.06.001.

Jung S., Tonello-Samson C. (2018). “High Hydrostatic Pressure Food Processing : Potential and Limitations”. In: *Green Chemistry Series No. 53 Alternatives to Conventional Food Processing: 2nd Edition*, ed. A. Proctor (the Royal Society of Chemistry), 251–315.

Modugno C., Kmiha S., Simonin H., Aouadhi C., Diosdado Cañizares E., Lang E., André S., Mejri S., Maaroufi A., Perrier-Cornet J.M. (2019). High pressure sensitization of heat-resistant and pathogenic foodborne spores to nisin. *Food Microbiology*, 84, 103244, <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.103244>.

EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food (ANS) (2017). Re-evaluation of potassium nitrite (E 249) and sodium nitrite (E 250) as food additives. *EFSA Journal*, 15. doi:10.2903/j.efsa.2017.4786.

Notermans S., Dufrenne J., Lund B.M. (1990). Botulism Risk of Refrigerated, Processed Foods of Extended Durability. *Journal of Food Protection*, 53, 1020–1024.

Rakotondramavo A., Brou C., de Lamballerie M., Pottier L. (2019). Ham processing: effects of tumbling, cooking and high pressure on proteins. *European Food Research and Technology*, 245, 273–284. doi:10.1007/s00217-018-3159-4.

Ramaroson M., Guillou S., Rossero A., Rezé S., Anthoine V., Moriceau N., Martin J.C., Duranton F., Zagorec M. (2018). Selection procedure of bioprotective cultures for their combined use with High Pressure Processing to control spore-forming bacteria in cooked ham. *International Journal of Food Microbiology*, 276, 28–38. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2018.04.010.

Rowswell C. (2017). *Vacuum Packaging Technical Guidance The safety and shelf-life of vacuum and modified atmosphere packed chilled foods with respect to non- proteolytic Clostridium botulinum*. Food Standards Agency, guidance available at <https://www.food.gov.uk/business-guidance/vacuum-packaging>, 29 p.

Simonin H., Duranton F., De Lamballerie M. (2012). New Insights into the High-Pressure Processing of Meat and Meat Products. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 11, 285–306. doi:10.1111/j.1541-4337.2012.00184.x.

Zagorec M., Christeans S. (2013). *Flores protectrices pour la conservation des aliments*. QAE ed.