

UNIVERSITE DE NANTES  
FACULTE DES SCIENCES ET DES TECHNIQUES

ECOLE DOCTORALE • CHIMIE BIOLOGIE

N° attribué par la bibliothèque

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

Année 2005

Sélection et caractérisation de souches  
de *Carnobacterium* pour la biopréservation  
du saumon fumé

THESE DE DOCTORAT

Discipline : Biotechnologies Agroalimentaires, Sciences de l'Aliment

Spécialité : Microbiologie

*Présentée et soutenue publiquement par*

**Anne BRILLET**

*Le 28 avril 2005, devant le jury :*

*Président*

M. FLEURENCE Joël, *Professeur • Université de Nantes*

*Rapporteurs*

Mme LONVAUD Aline, *Professeur • Université de Bordeaux*

M. DALGAARD Paw, *Chercheur • Danish Institute for Fisheries Research, Danemark*

*Directeur de thèse*

M. PREVOST Hervé, *Professeur • ENITIAA, Nantes*

*Examineurs*

Mme PILET Marie-France, *Maître de Conférences • ENITIAA, ENV, Nantes*

Mme LEROI Françoise, *Chercheur • IFREMER, Nantes*

Travaux de recherche effectués au Laboratoire de Microbiologie Alimentaire et Industrielle de l'ENITIAA  
et au Département Sciences et Techniques Alimentaires Marines de l'IFREMER à Nantes

*A ma mère et à mon père*  
*A ma famille et à mes amis*  
*A Serge, mon mari*

## REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier tous les membres de mon jury d'avoir accepté d'évaluer ce travail de recherche. Plus particulièrement, je remercie Madame Aline LONVAUD, professeur à la Faculté d'Oenologie de Bordeaux, et Monsieur Paw DALGAARD, chercheur au Danish Institute for Fisheries Research au Danemark, qui ont accepté d'être rapporteurs de thèse.

Je remercie infiniment Monsieur Hervé PREVOST, professeur à l'ENITIAA à Nantes, de m'avoir accueillie au sein du Laboratoire de Microbiologie Alimentaire et Industrielle (LMAI) pour y effectuer mon travail de recherche, et pour m'avoir confié cette thèse. Je lui adresse également ma vive reconnaissance pour avoir trouvé les moyens de financer cette étude.

Je remercie aussi Monsieur Jean-Luc VALLET, responsable du Département Sciences et Techniques Alimentaires Marines (STAM) à l'IFREMER de Nantes, de m'avoir accueillie au sein de son unité pour réaliser mes travaux sur le saumon fumé.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à Madame Marie-France PILET, maître de conférences à l'ENITIAA et à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes, ainsi qu'à Madame Françoise LEROI, cadre de recherche au département STAM de l'IFREMER, pour leur encadrement scientifique tout au long de ma thèse. Je les remercie pour leur constante disponibilité, leurs précieux conseils et leur aide, particulièrement lors de la rédaction des articles scientifiques. Leur soutien moral et leur bonne humeur m'ont permis de travailler à leurs côtés dans d'excellentes conditions.

Je remercie également Monsieur François FALCONNET, secrétaire général de la CITPPM, pour avoir participé au financement de ma thèse au travers du projet Aliment Qualité Sécurité\* auquel j'ai participé dans le cadre de cette thèse. J'adresse aussi mes remerciements aux membres de l'ASEPT partenaires de ce projet, Madame Anne BOUTTEFROY, Monsieur Fabrice BOURRION et Madame Corinne JABY, pour leur fructueuse collaboration.

J'exprime également ma reconnaissance à Madame Martine LEBOIS pour le temps qu'elle m'a consacré lors des analyses par HPLC, ainsi que Zina, Isabelle, Maguy, Angélique, Estelle et Béatrice de l'équipe du LMAI, pour leur appui technique et leur grande qualité d'écoute. Je remercie également Madame Frédérique GIGOUT, technicienne à l'IFREMER, pour son aide et son accueil chaleureux au laboratoire, ainsi que Madame Josiane CORNET et Madame Mireille CARDINAL pour leur sympathie et leur participation au bon déroulement des analyses sensorielles menées au département STAM de l'IFREMER. Merci aussi à l'ensemble du personnel technique de l'IFREMER qui m'a aidé à la fabrication du saumon fumé.

Je tiens également à remercier les enseignants-chercheurs du LMAI de l'ENITIAA, Madame Bénédicte SORIN, Monsieur Bernard ONNO, Monsieur Jean-François MESCLE, Monsieur Xavier DOUSSET, Monsieur Djamel DRIDER et encore une fois Madame Marie-France PILET pour leur collaboration lors de ma participation aux enseignements de travaux pratiques de Microbiologie Alimentaire destinés aux élèves ingénieurs de l'ENITIAA. Leurs conseils et leur gentillesse m'ont permis de m'initier à la pédagogie et de conforter mon goût pour l'enseignement.

Enfin, je remercie très chaleureusement les étudiants en thèse et en DEA, et notamment Cinta, Nathalie, Ségolène, Morgan, Rossi, Daphné, Sébastien et Christine qui a participé à mon travail de thèse, ainsi que les post-doctorants dont Sergio et Mounir, et tous les stagiaires du LMAI pour tous les bons moments que nous avons partagés ensemble.

\* Projet Aliment Qualité Sécurité n°R 01/05 cofinancé par le Ministère de l'Agriculture, de l'Alimentation, de la Pêche et des Affaires Rurales (MAAPAR), l'Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer (IFREMER, Nantes), l'Ecole Nationale d'Ingénieurs des Techniques des Industries Agricoles et Alimentaires (ENITIAA, Nantes), la Confédération des Industries de Traitement des Produits des Pêches Maritimes (CITPPM, Paris), et l'Association pour l'Aseptie (ASEPT, Laval).

## VALORISATION DU TRAVAIL DE THESE

### Publications dans des revues internationales à comité de lecture :

1. BRILLET A., PILET M-F., PREVOST H., BOUTTEFROY A. and LEROI F. (2004) **Biodiversity of *Listeria monocytogenes* sensitivity to bacteriocin-producing *Carnobacterium* strains and application in sterile cold-smoked salmon.** *Journal of Applied Microbiology*, **97** : 1029-1037.
2. BRILLET A., PILET M-F., PREVOST H., CARDINAL M. and LEROI F. **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*, article in press.
3. BRILLET A., PILET M-F., PREVOST H., HORAKOVA S., COURCOUX P. and LEROI F. **Optimization of growth of *Carnobacterium divergens* V41, an interesting bacteriocin-producing strain for the biopreservation of cold-smoked fish, by batch fermentation in a culture medium deprived of protein of animal origin.** Article soumis à *Applied and Environmental Microbiology*.
4. BRILLET A., BLANCHET-CHEVROLLIER C., PREVOST H., LEROI F. and PILET M-F. **Characterization of a tyrosine decarboxylase negative mutant of a bacteriocin-producing *Carnobacterium divergens* strain used in the biopreservation of cold-smoked salmon.** Article en préparation.
5. RICHARD C., BRILLET A., PILET M-F., H. PREVOST H. and DRIDER D. (2003) **Evidence on inhibition of *Listeria monocytogenes* by divercin V41 action.** *Letters in Applied Microbiology*, **36** : 288-292.
6. BRILLET A., PILET M-F., DRIDER D., et PREVOST H. (2005) **La biopréservation : une technologie innovante de conservation des aliments.** *Revue Générale du Froid*, mai 2005, **1053** : 32-35.
7. RICHARD C., LEROI F., BRILLET A., RACHMAN C., CONNIL N., DRIDER D., PILET M-F., ONNO B., DOUSSET X., et PREVOST H. (2004) **Maîtrise du développement de *Listeria monocytogenes* dans le saumon fumé : intérêt de la biopréservation par des bactéries lactiques.** *Le Lait, Dairy Science and Technology*, **84** : 135-144.

Communications affichées :

1. BRILLET A., PILET M-F., PREVOST H. et LEROI F. **Biodiversité des interactions entre *Carnobacterium* et *Listeria monocytogenes* dans le saumon fumé.** 12<sup>e</sup> Colloque du Club des Bactéries Lactiques, Aurillac, du 19 au 21 mai 2003.
2. BRILLET A., PILET M-F., PREVOST H. et LEROI F. **Effet de l'ensemencement de souches de *Carnobacterium* sur les caractéristiques organoleptiques et les flores endogènes du saumon fumé.** 12<sup>e</sup> Colloque du Club des Bactéries Lactiques, Aurillac, du 19 au 21 mai 2003.
3. BRILLET A., PILET M-F., PREVOST H., CORNET J. et LEROI F. **Quality of cold-smoked salmon inoculated by *Carnobacterium* spp. selected for the inhibition of *Listeria monocytogenes*.** Food Factory, 2<sup>e</sup> colloque international de l'usine agro-alimentaire du futur, Laval, du 6 au 8 octobre 2004.

Communications orales :

1. BRILLET A., PILET M-F., PREVOST H. et LEROI F. **Effet de l'ensemencement de différentes souches de *Carnobacterium* sur les caractéristiques organoleptiques et les flores endogènes du saumon fumé.** VI<sup>e</sup> Congrès National de la Société Française de Microbiologie, Bordeaux, du 10 au 12 mai 2004.
2. BRILLET A., MATAMOROS S., BLANCHET-CHEVROLLIER C., LEROI F., PREVOST H. et PILET M-F. **Sélection de souches de *Carnobacterium* non productrices de tyramine en vue de leur utilisation pour la biopréservation du saumon fumé.** 13<sup>e</sup> Colloque du Club des Bactéries Lactiques, Nantes, du 8 au 10 septembre 2004.
3. PREVOST H., BRILLET A. et PILET M-F. **La biopréservation des aliments, intérêts et enjeux.** AGORAL, 16<sup>e</sup> Rencontres scientifiques et technologiques des Industries Alimentaires, Nantes, 30 novembre et 1<sup>er</sup> décembre 2004.
4. LEROI F., BRILLET A., JOFFRAUD J-J., PREVOST H. et PILET M-F. **Biopreservation of cold-smoked salmon by the use of selected *Carnobacterium* strains.** 1st Joint Trans-Atlantic Fisheries Technology Conference (33rd WEFTA meeting, and AFTC\*), Reykjavik, Islande, du 10 au 14 juin 2003.

\* WEFTA : Western European Fish Technologists Association ; AFTC : Atlantic Fisheries Technology Conference.

# SOMMAIRE

<b>INTRODUCTION GENERALE .....</b>	<b>1</b>
<b>ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE .....</b>	<b>4</b>
<b>1. Le saumon fumé.....</b>	<b>4</b>
1.1. Production et consommation de saumon fumé .....	4
1.2. La fabrication du saumon fumé .....	6
1.2.1. Le salage .....	8
1.2.2. Le séchage.....	9
1.2.3. Le fumage .....	9
1.2.4. Le conditionnement .....	10
1.2.5. Caractéristiques des produits .....	11
<b>2. Microbiologie du saumon fumé .....</b>	<b>12</b>
2.1. Flore d'altération.....	13
2.1.1. Composition et évolution de la flore microbienne des poissons fumés.....	13
2.1.2. Critères d'évaluation de l'altération microbiologique .....	17
2.1.3. Rôles spécifiques des microorganismes dans l'altération.....	18
2.1.4. Aspects réglementaires de la microbiologie du saumon fumé.....	20
2.2. Flores pathogènes rencontrées dans le saumon fumé .....	21
2.2.1. Contamination par <i>Clostridium botulinum</i> .....	22
2.2.2. Contamination par <i>Listeria monocytogenes</i> .....	23
<b>3. Les amines biogènes.....</b>	<b>27</b>
3.1. Définition des amines biogènes .....	27
3.2. Les concentrations en amines biogènes dans les produits alimentaires.....	28
3.3. Toxicité des amines biogènes et réglementation .....	31
3.3.1. L'histamine .....	32
3.3.2. La tyramine .....	33
3.4. Utilisation des amines biogènes comme indicateurs d'altération .....	34
3.5. Production microbienne d'amines biogènes .....	35
3.5.1. Les bactéries productrices d'amines biogènes.....	35
3.5.2. Les décarboxylases d'origine microbienne.....	38
3.5.3. Catabolisme des amines biogènes par les microorganismes.....	44
<b>4. La biopréservation des produits de la mer par les bactéries lactiques.....</b>	<b>45</b>
4.1. Propriétés inhibitrices des bactéries lactiques.....	45
4.1.1. Les métabolites .....	46
4.1.2. Les bactériocines.....	47
4.2. Utilisation de <i>Carnobacterium</i> pour la biopréservation des produits de la mer .....	49
4.2.1. Les <i>Carnobacteria</i> .....	49
4.2.2. Les bactériocines produites par le genre <i>Carnobacterium</i> .....	51
4.2.3. Utilisation de <i>Carnobacterium</i> comme agent de biopréservation .....	53
4.3. Réglementation concernant l'utilisation de bactéries productrices de bactériocine dans les aliments .....	54

## RESULTATS

### Chapitre I.....57

Étude des capacités d'inhibition de souches de *Carnobacterium* productrices de bactériocine, vis-à-vis d'une collection de souches de *Listeria monocytogenes* isolées de l'industrie du saumon fumé

### Chapitre II.....70

Effet de l'ensemencement de *Carnobacterium* sur les caractéristiques organoleptiques et les flores endogènes du saumon fumé

### Chapitre III.....107

Mise en évidence de l'inhibition de *Listeria monocytogenes* par la divercine V41, la bactériocine produite par *Carnobacterium divergens* V41

### Chapitre IV.....117

Optimisation de la croissance de *Carnobacterium divergens* V41 et de la production de divercine V41 dans un milieu de culture dépourvu de protéine d'origine animale

### Chapitre V.....147

Sélection et caractérisation d'un mutant tyrosine décarboxylase négatif d'une souche de *Carnobacterium divergens* productrice d'une bactériocine active contre *Listeria monocytogenes*

## DISCUSSION GENERALE.....174

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....185

## ANNEXES

Article :

**BRILLET A., PILET M-F., DRIDER D., et PREVOST H. (2005) La biopréservation : une technologie innovante de conservation des aliments. *Revue Générale du Froid*, mai 2005, **1053** : 32-35.....208**

Article :

**RICHARD C., LEROI F., BRILLET A., RACHMAN C., CONNIL N., DRIDER D., PILET M-F., ONNO B., DOUSSET X., PREVOST H. (2004) Maîtrise du développement de *Listeria monocytogenes* dans le saumon fumé : intérêt de la biopréservation par des bactéries lactiques. *Le Lait, Dairy Science and Technology*, **84** : 135-144 .....212**

Article :

**PREVOST H., BRILLET A. et PILET M-F. La biopréservation des aliments, intérêts et enjeux. AGORAL, 16<sup>e</sup> Rencontres scientifiques et technologiques des Industries Alimentaires, Nantes, 30 novembre et 1<sup>er</sup> décembre 2004 .....222**



# TABLE DES ILLUSTRATIONS

## Figures

Figure 1 : Saumon fumé présenté en tranches .....	5
Figure 2 : Transport des saumons dans la glace .....	6
Figure 3 : Préparation des filets .....	6
Figure 4 : Diagramme de fabrication du saumon fumé .....	7
Figure 5 : Salage au sel sec .....	8
Figure 6 : Séchage des filets .....	9
Figure 7 : Fumage des filets.....	10
Figure 8 : Tranchage à la main .....	11
Figure 9 : Tranchage mécanique.....	11
Figure 10 : L’histamine.....	32
Figure 11 : La tyramine.....	33
Figure 12 : Réaction de décarboxylation de la tyrosine.....	39
Figure 13 : Alignement des séquences protéiques de la tyrosine décarboxylase de quatre bactéries lactiques .....	41
Figure 14 : Organisation génétique de l’opéron TDC chez <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Lactobacillus brevis</i> et <i>Lactococcus lactis</i> .....	43
Figure 15 : Arbre décisionnel pour l’évaluation de l’innocuité d’une souche microbienne utilisée dans le secteur agro-alimentaire .....	55

## Tableaux

Tableau 1 : Les bactéries à Gram négatif isolées du saumon fumé.....	14
Tableau 2 : Les bactéries à Gram positif isolées du saumon fumé.....	16
Tableau 3 : Extrait des critères microbiologiques appliqués aux produits de la pêche . .....	20
Tableau 4 : Amines biogènes et acides aminés précurseurs .....	28
Tableau 5 : Les amines biogènes retrouvées dans les aliments .....	30
Tableau 6 : Bactéries à Gram négatif productrices d’amines biogènes dans les aliments.....	36
Tableau 7 : Bactéries à Gram positif productrices d’amines biogènes dans les aliments.....	37
Tableau 8 : Les décarboxylases identifiées chez les bactéries.....	38
Tableau 9 : Bactériocines produites par <i>Carnobacterium</i> isolés de produits alimentaires.....	52

## ABREVIATIONS

ABVT : Azote Basique Volatile Total  
AFNOR : Association Française de Normalisation  
AFSSA : Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments  
CNERNA : Centre National d'Etudes et de Recommandations sur la Nutrition et l'Alimentation  
DAO : Diamine Oxydase  
DGAL : Direction Générale de l'Alimentation  
DGCCRF : Direction Générale de la Concurrence, de la Consommation et de la Répression des Fraudes  
DLC : Date Limite de Consommation  
DSV : Direction des Services Vétérinaires  
EMS : Ethylméthanesulfonate  
FAO : Food and Agriculture Organization  
FDA : Food and Drug Administration  
GMS : Grandes et Moyennes Surfaces  
GRAS : Generally Recognized As Safe  
HPLC : Chromatographie Liquide Haute Performance  
L-DOPA : L-3,4-dihydroxyphénylalanine  
MAO : Monoamine Oxydase  
MNNG : N'-méthyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine  
NADH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide  
OAS : Organisme d'Altération Spécifique  
OFIMER : Office National Interprofessionnel des Produits de la Mer et de l'Aquaculture  
OGM : Organisme Génétiquement Modifié  
pb : paires de bases  
PLP : Phosphate de Pyridoxal  
QPS : Qualified Presumption of Safety  
SDHA : Sous-Direction Hygiène des Aliments  
SDSSA : Sous-Direction de la Sécurité Sanitaire des Aliments  
SVHA : Service Vétérinaire d'Hygiène Alimentaire  
TDC : Tyrosine Décarboxylase  
TMA : Triméthylamine  
UFC : Unité Formant Colonie  
USDA : United States Department of Agriculture  
WHO : World Health Organization

# INTRODUCTION GENERALE

La France est le premier producteur mondial de saumon fumé avec une production annuelle stabilisée à environ 19000 tonnes pour un chiffre d'affaire supérieur à 300 millions d'euros. Elle est également un grand consommateur de saumon fumé puisque sa consommation a été multipliée par six ces dernières années et équivaut aujourd'hui à sa production. La tradition de salage-fumage du saumon est particulièrement forte en France et concerne une quarantaine de petites, moyennes et grandes entreprises réparties sur tout le territoire.

Cependant, l'industrie fait face à un problème majeur lié à la contamination fréquente du produit par une bactérie pathogène, *Listeria monocytogenes* (10 à 30% des lots selon les entreprises). Traditionnellement utilisé pour la conservation, le procédé de salage-fumage du saumon est désormais surtout appliqué à des fins organoleptiques et met en œuvre des traitements de plus en plus allégés, avec un taux de sel généralement compris entre 2,5 et 3,5% et un taux de phénols inférieur à 1 mg/100 g. Cette tendance, associée à une conservation réfrigérée sous vide assez longue (généralement 4 semaines) et au fait que le produit est consommé cru, engendre un risque en terme de santé publique lié à la présence et la croissance possible de *Listeria monocytogenes*. Cependant, aucun cas de toxi-infection alimentaire dûe à cette bactérie pathogène n'a été imputé au saumon fumé en France. Pour l'industrie, les conséquences sont des retraits de lots (comme par exemple en septembre 2002 chez Labeyrie et en avril 2003 chez Friamer ; Déniel *et al.*, 2004), des procédures coûteuses de nettoyage-désinfection, et une publicité négative qui pourrait être fatale à la filière saumon fumé.

La maîtrise du risque *Listeria monocytogenes* dans le saumon fumé doit s'effectuer à deux niveaux : dans l'entreprise, en améliorant les procédures de nettoyage et de désinfection, et dans le produit fini, en limitant la croissance de cette bactérie à moins de 100 UFC/g jusqu'à sa date limite de consommation (DGAL, 1998 ; AFSSA, 2000), puisqu'il est impossible de garantir une élimination totale de *Listeria monocytogenes* étant donné que le procédé de fabrication ne comprend aucun traitement listéricide. Dans cet objectif, l'utilisation de bactéries lactiques du genre *Carnobacterium* naturellement présentes dans les produits de la mer et sélectionnées pour leur capacité à inhiber *Listeria monocytogenes* dans le saumon fumé lors de la conservation réfrigérée semble être une voie très prometteuse.

Ce projet de thèse consiste à développer au stade pré-industriel une stratégie de biopréservation du saumon fumé vis à vis du risque *Listeria monocytogenes*, tout en garantissant la qualité organoleptique des produits. Le LMAI à l'ENITIAA et le département STAM à L'IFREMER de Nantes disposent de trois souches de *Carnobacterium* isolées de produits marins et productrices de bactériocines et dont la capacité à inhiber la croissance d'une souche de *Listeria monocytogenes* dans du saumon fumé a déjà été montrée dans ces laboratoires.

1- Dans un premier temps, les capacités d'inhibition de trois souches productrices de bactériocine, *Carnobacterium piscicola* SF668 et V1 et *Carnobacterium divergens* V41 vis-à-vis d'une large gamme de souches de *Listeria monocytogenes* isolées du saumon fumé et des ateliers de production ont été étudiées (chapitre I).

2 - Ensuite, le potentiel d'altération de ces trois souches a été testé sur saumon fumé stérile. A l'issue de ces études, la souche la moins altérante montrant le profil d'inhibition de *Listeria monocytogenes* le plus intéressant a été sélectionnée pour êtreensemencée sur des lots de saumon fumé du commerce. La capacité éventuelle de la souche à inhiber les flores endogènes présentes naturellement sur les produits et ses potentialités d'altération ont été testées (chapitre II).

3 - Il est important d'évaluer aussi le niveau d'inhibition lié à la compétition écologique essentiellement de type nutritionnelle de celle obtenue grâce à l'activité de la bactériocine : pour cela un mutant non producteur de bactériocine a été produit et son activité anti-listeria a été comparée avec celle de la souche sauvage sélectionnée auparavant. Cette étude a permis d'évaluer la part de la production de la bactériocine sur l'efficacité de l'action bioprotectrice de *Carnobacterium* sur *Listeria* dans le produit (chapitre III).

4- Parallèlement, l'optimisation des conditions de production de la souche de *Carnobacterium* sélectionnée a été effectuée en fermenteur dans un milieu de culture dépourvu de protéine d'origine animale en vue de son utilisation potentielle dans les poissons fumés (chapitre IV).

5- Le dernier objectif était d'approfondir les connaissances sur les activités de décarboxylation d'acides aminés par les souches de *Carnobacterium*, pouvant conduire à la production d'amines biogènes indésirables. La tyramine, issue de la décarboxylation de la tyrosine, est la principale amine produite par les *Carnobacterium* dans le saumon fumé. Cette amine peut être à l'origine de troubles sévères chez certains consommateurs. Un mutant tyramine négatif de la souche sélectionnée dans la première partie des travaux, a été obtenu par mutagenèse chimique afin qu'il soit utilisable dans le saumon fumé d'un point de vue réglementaire. Le gène de la tyrosine décarboxylase (TDC) a été mis en évidence et séquencé chez la souche sauvage et chez le mutant afin de voir si la mutation était présente sur le gène de structure de la TDC et si cette mutation pouvait être stable dans le temps (chapitre V). De plus, la souche mutante a été comparée à la souche sauvage afin de s'assurer que ses caractéristiques d'inhibition et d'altération n'étaient pas modifiées. Parallèlement, le séquençage du gène TDC est destiné d'une part à fournir des outils moléculaires de détection de souches tyramine négative, et d'autre part à approfondir les connaissances scientifiques sur la structure et l'activité de cette enzyme peu étudiée chez les microorganismes.

Avant d'aborder ces différents chapitres, une étude bibliographique est présentée afin de mieux cerner le contexte dans lequel s'inscrit ce sujet de thèse. A plus long terme, si la biopréservation du saumon fumé apparaît comme une stratégie intéressante pour améliorer la sécurité et la conservation du produit, elle pourra être envisagée pour d'autres produits de la mer, comme par exemple le poisson frais emballé sous atmosphère modifiée.

# ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

## 1. LE SAUMON FUME

### 1.1. Production et consommation de saumon fumé

Jusqu'au milieu du XIXe siècle, les produits de la mer ne représentaient qu'une faible part de l'alimentation des Français. À la fin du XVIIIe siècle, la consommation annuelle n'était que de 2,4 kilogrammes par personne. Selon l'Office National Interprofessionnel des Produits de la Mer et de l'Aquaculture (OFIMER), elle a atteint 34,0 kilogrammes en 2003 (23,7 kg de poissons ; 10,3 kg de coquillages et crustacés). Cette augmentation est essentiellement liée au développement des transports, qui a permis aux Français habitant loin du littoral de manger du poisson frais, et non plus seulement du poisson salé, séché ou fumé.

**La production** mondiale de saumon d'élevage a atteint près de 1 200 000 tonnes en 2002, dont la plus grosse partie porte sur le saumon Atlantique (*Salmo salar*), contre 800 000 tonnes de saumon de pêche et 600 000 tonnes de truite d'élevage (FAO Globefish/OFIMER, 2003). La France, qui ne pratique pas l'élevage, importe 110 à 120 000 tonnes de saumon d'élevage par an. A lui seul, le saumon frais représente les trois quarts du volume des importations de poisson : il est destiné à la vente au détail et au fumage. On peut évaluer la production de saumon fumé dans les pays de l'Union Européenne à 85 000 tonnes de produits finis en 2003, ce qui correspond à plus de 150 000 tonnes de matière première mise en œuvre (UBIFRANCE/OFIMER, 2004). La France est, depuis longtemps, le premier producteur de saumon fumé de l'Union (22 900 tonnes en 2003 contre 22 000 en 2002), devant l'Allemagne (18 600 tonnes, +20% par rapport à 2002) puis le Danemark (13 900 tonnes) et le Royaume-Uni (12 500 tonnes). Il existe un grand nombre de sociétés en Europe qui produisent du poisson fumé (en particulier saumon, truite et anguille). En ce qui concerne le saumon, une dizaine de firmes occupent une position leader avec des volumes annuels de production qui dépassent nettement les 2 000 tonnes. En France, sur plus de 20 sociétés fabriquant du saumon fumé, 8 produisent plus de 1 000 tonnes par an et cinq au moins réalisent des volumes de production beaucoup plus importants. Environ 15% de la production française de saumon fumé est exportée, principalement vers l'Italie et la Belgique.



En Europe, 70% du saumon fumé est d'origine norvégienne. La part du saumon écossais dans la production de saumon fumé est de l'ordre de 24% (transformation principalement en Grande-Bretagne et en France) alors que le saumon sauvage d'Alaska représente seulement 2%.

**La consommation** de saumon frais a été multipliée par treize en dix ans, celle de saumon fumé par six, portant la consommation totale de saumon à 1,9 kg par habitant et par an (Déniel *et al.*, 2004). Cette augmentation s'explique par le développement de l'élevage de cette espèce à partir des années 80. Néanmoins, ces chiffres témoignent sans conteste que les Français sont des amateurs de saumon.

Dans l'Union Européenne, la consommation totale apparente de saumon fumé a été évaluée à près de 88 000 tonnes en 2003. Récemment, l'Allemagne est devenue le premier marché européen du saumon fumé, avec environ 25 000 tonnes par an. La consommation y est en forte progression et la part des produits importés (Danemark et maintenant Pologne) est de l'ordre de 40 %. La France a un niveau de consommation très proche (24 000 tonnes) mais plus de 85% du saumon fumé consommé est produit en France. Ces dernières années, la progression du marché français de saumon fumé s'est stabilisée aux alentours de 2 à 3% par an.

Les distributeurs de saumon fumé sont principalement les Grandes et Moyennes Surfaces (GMS) et les discounters. En 2003, 12 806 tonnes de saumon fumé ont été achetées par les ménages ce qui représente 288 millions d'euros (SECODIP/OFIMER, 2003).



**Figure 1 : Saumon fumé présenté en tranches**

Le saumon fumé, avec toutes ses déclinaisons (marinés, produits snacks...), s'inscrit tout à fait dans les nouvelles tendances de consommation en raison de sa facilité d'emploi et de la bonne image dont il bénéficie (produit sain et naturel, riche en acides gras oméga 3). Un

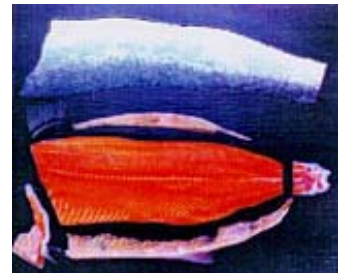
exemple de présentation de saumon fumé est donné sur la figure 1. Ce produit est maintenant consommé toute l'année, bien que le maximum des ventes (35%) se fasse en fin d'année (Taillefer, 2003).

## 1.2. La fabrication du saumon fumé

Le procédé de fumage remonte probablement à la préhistoire et constitue l'une des plus anciennes méthodes de conservation des produits carnés, avec le séchage et le salage. En ce qui concerne le poisson, le fumage à froid est une technique de conservation traditionnelle dans de nombreux pays nordiques et de l'Europe (Knockaert, 2002). Le traitement complet comprend trois phases qui ont chacune leur importance dans la conservation du produit : le salage, le séchage et le fumage. Plusieurs espèces de saumon peuvent être utilisées pour la fabrication (Knockaert, 2002) : le saumon de l'Atlantique (*Salmo salar*) qui est le plus travaillé en France, mais aussi le saumon du Pacifique (*Oncorhynchus tshawytscha* appelé aussi « King » ou saumon royal, et *Oncorhynchus kisutch* appelé « Coho » ou saumon argenté). L'état de fraîcheur des poissons destinés au fumage doit être de qualité irréprochable, par exemple abattage de moins d'une semaine et stockage dans la glace en paillette entre 0 et 3°C (figure 2). Les poissons sont abattus, saignés et éviscérés sur le lieu d'élevage (Leroi, 2002). Après le transport sur le lieu de transformation, les poissons sont rincés à l'eau claire pour éliminer les souillures puis étêtés, filetés, parés, désarêtés et parfois pelés (figure 3). Ces opérations sont effectuées en salle climatisée à +12°C. Elles sont une source de contamination par le fait que les bactéries présentes dans le mucus de la peau, sur les ouies et dans le tractus gastro-intestinal peuvent se répandre sur les parties fraîchement découpées. Un diagramme de préparation du saumon fumé est présenté sur la figure 4.



**Figure 2 : Transport des saumons dans la glace**



**Figure 3 : Préparation des filets**

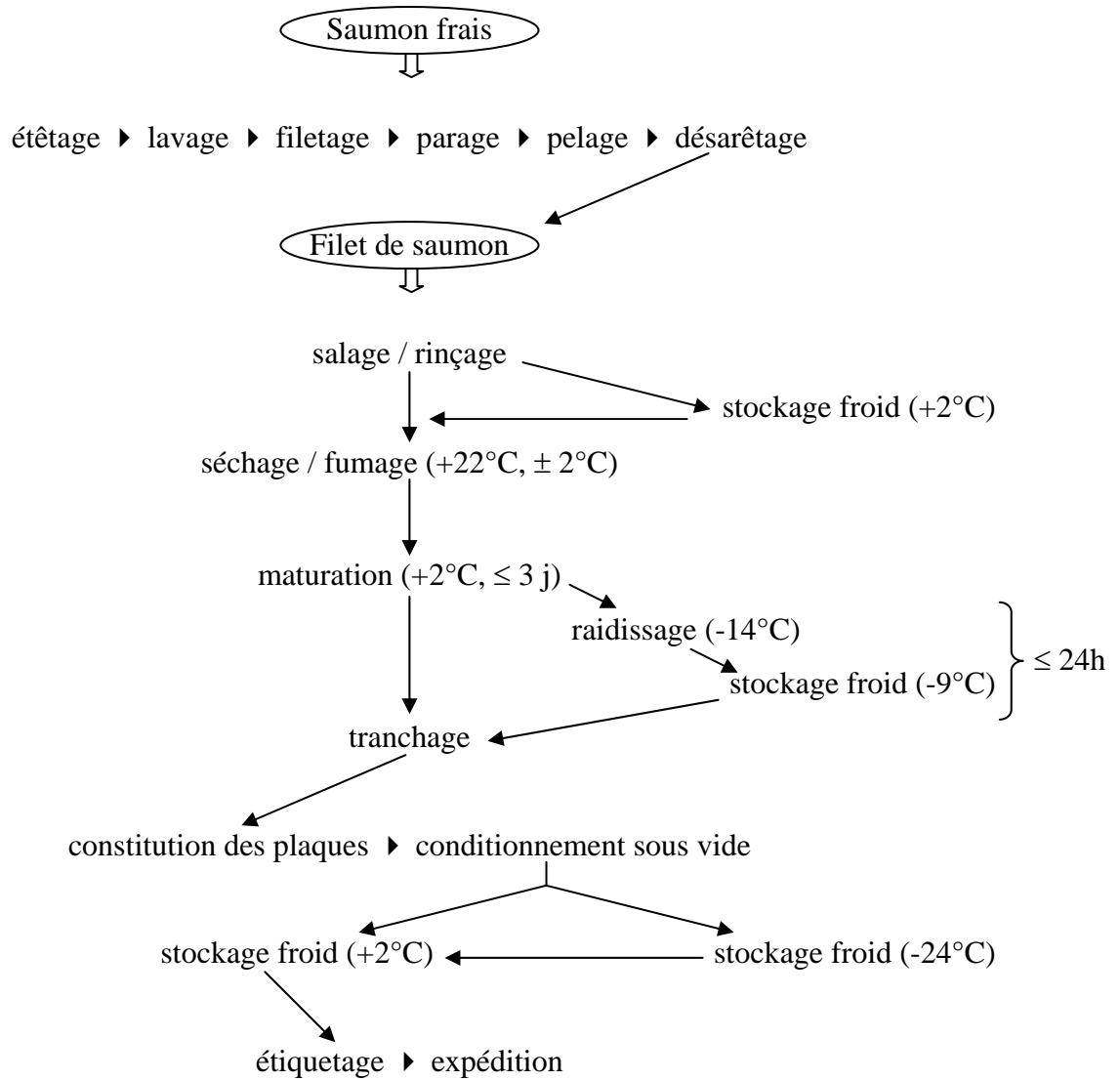


Figure 4 : Diagramme de fabrication du saumon fumé (d'après Bergis, 2002)

### 1.2.1. Le salage

Cette opération, très importante pour la conservation du produit, contribue à éliminer une partie de l'eau de constitution, rendant ainsi l'eau moins disponible pour la croissance des germes. Le salage provoque aussi un raffermissement des chairs, empêche la décoloration et confère un certain goût au poisson. Sur le plan purement organoleptique, on considère que 2,5 à 3,5% de sel et environ 60 à 65% d'eau sont des teneurs acceptables dans le cas de poissons moyennement gras (lipides totaux inférieurs à 10%) pour correspondre au goût des consommateurs français (Knockaert, 2002). Le procédé traditionnel de salage se fait au sel sec (figure 5) en recouvrant les filets posés à plat sur un chariot de séchage/fumage par une fine couche de sel fin (NaCl) et en les laissant à 12-15°C pendant 2 à 10h selon le calibre, la teneur en matière grasse et le taux de sel désiré. Parfois, un mélange de sel (80%) et de sucre (20%) est utilisé pour optimiser la déshydratation par échange osmotique. Après le salage, les filets doivent être rincés uniformément le plus souvent par aspersion d'eau. L'eau résiduelle peut ensuite être chassée à l'aide d'air comprimé ou un cycle de préséchage en chambre froide à +2°C peut être envisagé afin de limiter le temps de séchage. Il existe aussi la méthode de salage par injection de saumure (260 g/L) dans les filets au moyen de fines aiguilles. Environ 50% des produits français sont traités de cette manière. Cette méthode, bien qu'elle permette un gain de poids de 4 à 8%, peut poser des problèmes dus à la contamination croisée des produits par le biais des aiguilles et à une teneur en eau plus élevée que dans le cas du salage au sel sec. Il existe enfin le salage par saumurage (trempage des filets dans la saumure de sel), pratiqué dans certains pays d'Europe. En France, le saumurage est essentiellement pratiqué pour le hareng.



**Figure 5 : Salage au sel sec**

### 1.2.2. Le séchage

Cette étape s'effectue uniquement avant le fumage à froid (figure 6). Elle permet de réduire la teneur en eau libre afin d'atteindre une valeur inférieure à 65%, et ce dans le but de favoriser la conservation du produit qui a préalablement subi un salage. Le séchage dépend de la température, de l'hygrométrie et de la ventilation dans le fumoir. Afin de limiter l'altération du poisson à ce niveau de transformation, il ne faut pas dépasser une température de 22 à 26°C, avec une humidité relative de 60% à 65% et une vitesse d'air au niveau du produit de l'ordre de 2 m/s. Sans respect de ces consignes, le produit se dessèche trop vite et forme une croûte en surface qui limitera la migration future d'eau ou de composants de la fumée. Si l'humidité relative de l'atmosphère ambiante est trop proche de celle de la surface du produit, l'évaporation n'est pas suffisante. En industries, les séchoirs sont climatisés afin de contrôler les différents paramètres de séchage et assurer ainsi une qualité constante des produits tout au long de l'année. Un séchage suffisant dure jusqu'à 4 h et permet de retirer des filets environ 1 à 1,5% d'eau par heure (Knockaert, 2002).



**Figure 6 : Séchage des filets**

### 1.2.3. Le fumage

Le saumon précédemment salé et séché est soumis un certain temps à l'action de la fumée entre 20 et 26°C provenant de la combustion de bois durs tel que le hêtre et le chêne (pas de résineux). En France, le saumon est fumé à froid (25°C) par opposition au fumage à chaud (70°C) pratiqué pour d'autres espèces ou dans d'autres pays. Pendant la phase de fumage, qui est pratiqué dans une enceinte thermostatée où l'humidité relative est de l'ordre

de 60%, le poisson continue à se déshydrater en même temps qu'il s'imprègne des composés volatils de la fumée (figure 7). La fumée est constituée d'une suspension de particules solides et liquides en milieu gazeux. Les substances contenues dans ces phases sont les mêmes mais diffèrent en concentrations. Les substances chimiques les plus volatiles, et qui sont absorbées par le poisson, se trouvent principalement dans la phase vapeur. Elles se dissolvent dans l'eau superficielle du poisson. La composition chimique de la fumée est très variable et dépend de la température et de la quantité d'air présente lors de la pyrolyse. Plus de 100 composés volatils ont été identifiés (Cardinal *et al.*, 1997). Il y a notamment des phénols, des alcools, des acides organiques, des composés carbonylés et des hydrocarbures. Ce sont principalement les phénols, mais aussi les carbonyles et les acides qui donnent au produit des arômes typiques et des nuances dans les saveurs (Knockaert, 2002). La durée du traitement peut varier de 2 à 12 h selon le type d'installation et le produit désiré. La chair du poisson reste crue.



**Figure 7 : Fumage des filets**

#### 1.2.4. Le conditionnement

Les filets sont ensuite entreposés pendant 16 à 24 h à 2-3°C pour que les composés de la fumée finissent de pénétrer dans la chair. Le saumon fumé peut être commercialisé en filet mais il est le plus souvent tranché à la main (figure 8) ou avec des trancheurs mécaniques (figure 9). Dans le deuxième cas, les filets sont souvent raidis, c'est à dire partiellement congelés à -7°C à cœur, pour faciliter le tranchage. Notons que l'étape de tranchage est la principale source de contamination du saumon fumé après traitement. Les trancheurs nécessitent un nettoyage régulier et soigneux qui est souvent difficile à réaliser, ce qui explique qu'ils soient une source de contamination des produits. La reconstitution des plaques et le conditionnement peuvent aussi être une source de contamination du fait de la

manipulation des tranches et des bandes. Les produits peuvent ensuite être distribués en l'état (rayon traiteur) ou conditionnés sous vide. La conservation se fait à +2°C avant l'expédition. La commercialisation sous forme congelée est assez rare en France.



**Figure 8 : Tranchage à la main**



**Figure 9 : Tranchage mécanique**

#### 1.2.5. Caractéristiques des produits

Aujourd'hui dans les pays industrialisés, le but du fumage n'est plus seulement d'assurer la conservation du produit, mais aussi de lui donner des caractéristiques sensorielles particulières correspondant à l'évolution du goût des consommateurs. Ces dernières années, la tendance s'est orientée vers des produits de moins en moins salés et fumés. D'après une étude portant sur 120 produits de divers pays européens, le taux de sel moyen est de  $3,1 \pm 0,6\%$ , le taux de composés phénoliques de  $0,6 \pm 0,4$  mg/100 g, la teneur en eau de  $62,9 \pm 2,8\%$  et en graisse de  $10,4 \pm 3,3\%$  (Cardinal *et al.*, 2004). La teneur en lipides totaux du saumon d'élevage peut varier de 10 à 20%.

En France, il existe une norme AFNOR sur les poissons transformés et notamment le saumon fumé (NF V 45-065, 1997). Elle précise les spécifications relatives aux poissons (espèces, fraîcheur), les ingrédients autorisés (NaCl, sucres), les présentations des produits (filet entier, tranchés) et l'étiquetage du produit fini au stade de la commercialisation. Le poids moyen des tranches est de 10 à 40 g avec une épaisseur maximale de 3,5 mm. L'humidité du produit délipidé est inférieure à 74% et la teneur en matières grasses libres est inférieure à 18%. Le taux de sel dans le saumon fumé doit être de 2,5 à 3,5%. Les sucres doivent être inférieurs à 1%. Cette norme de 1997 (actualisation de celle de 1995) ne précise plus le taux de phénol mais auparavant, il devait être supérieur ou égal à 1 mg de phénols pour 100 g de chair.

Généralement, la date limite de consommation (DLC) courante est de trois semaines. Toutefois, la DLC relève de la responsabilité du fabricant qui peut étendre cette date jusqu'à 6 semaines à condition qu'elle ait été validée par des tests de vieillissement selon la norme expérimentale NF V 01-003 (2004) publiée par l'AFNOR.

Une étude a montré que plus le saumon est salé et fumé et plus les flores naturellement présentes sont inhibées (Leroi *et al.*, 2000). Cependant, les teneurs en NaCl retrouvées classiquement dans les poissons fumés ont un effet limité sur les bactéries. Aux teneurs choisies, le sel ralentit seulement la croissance bactérienne, sans empêcher l'altération de se produire. En conséquence, la durée de conservation est réduite. Ensuite, le fumage, tel qu'il est pratiqué actuellement en France, est très léger. Le saumon fumé contient souvent moins de 1 mg de phénols pour 100 g de chair, et n'assure que faiblement une action antioxydante et une action bactériostatique. C'est avant tout un goût et une couleur qu'on donne au produit, la conservation étant principalement assurée par le salage, le séchage et le maintien du produit fini à +2°C, emballé sous vide. En effet, la conservation sous vide à température réfrigérée permet de ralentir la croissance des microorganismes encore présents à la fin du procédé de transformation, puisque aucune étape bactéricide n'est présente.

## **2. MICROBIOLOGIE DU SAUMON FUME**

Le saumon fumé est un produit microbiologiquement fragile pour plusieurs raisons :

- il est fréquemment manipulé lors de sa fabrication donc fréquemment exposé aux contaminations (manipulateurs, environnement proche...);
- le procédé n'inclut pas d'étape bactéricide, et les taux de sel (2,5 à 3,5%) et de phénols (<1 mg/100 g) ne sont pas suffisamment élevés pour garantir l'inhibition totale des flores naturellement présentes ;
- le produit a une durée de conservation relativement longue (de 3 à 6 semaines à 4°C) au cours de laquelle la croissance de bactéries psychrotrophes est possible ;
- il est généralement consommé cru, sans étape de cuisson chez le consommateur.



## 2.1. Flore d'altération

Bien que le muscle des poissons soit initialement stérile, nous avons vu précédemment que les sources de contaminations étaient fréquentes et multiples : tout d'abord la peau, le mucus et le tractus gastro-intestinal contiennent une flore bactérienne importante dont la composition et la quantité dépendent de l'origine des poissons (élevage), de la température de l'eau, de l'alimentation, etc... (Leroi, 2002). Ensuite interviennent les flores présentes sur le lieu de transformation : la contamination peut venir de l'environnement qui est directement au contact du produit (trancheur, tapis de convoyage, couteaux, manipulateurs...) mais aussi de l'environnement indirect (sol, machinerie proche, air...). Hormis dans le cas de *Listeria*, peu d'études ont été entreprises pour tracer avec précision l'origine des flores contaminant le saumon fumé.

### 2.1.1. Composition et évolution de la flore microbienne des poissons fumés

Plusieurs études ont été menées pour essayer de caractériser la flore microbienne de la truite et du saumon fumés, mais toutes montrent qu'elle est très variable selon la matière première, les conditions environnementales, le traitement appliqué au produit, et l'usine de production (Paludan-Muller *et al.*, 1998 ; Truelstrup Hansen and Huss, 1998 ; Truelstrup Hansen *et al.*, 1998 ; Lyhs *et al.*, 2001 ; Gonzalez-Rodriguez *et al.*, 2002 ; Leroi, 2002 ; Cardinal *et al.*, 2004).

Le taux initial de contamination dépend plus de l'usine de transformation que de l'origine de la matière première (Leroi *et al.*, 1998). En sortie d'usine, la contamination des produits peut aller de  $10^2$  à  $10^5$  germes/g (Truelstrup Hansen and Huss, 1998 ; Cardinal *et al.*, 2004). Seul le respect des bonnes pratiques de transformation (rinçages fréquents, pelage des filets en début de transformation, salage au sel sec, température inférieure à 12°C dans l'usine...) et des règles d'hygiène (lavages fréquents des mains, des couteaux..., nettoyages réguliers des machines) permet d'obtenir un produit fini de bonne qualité microbiologique.

Immédiatement après le fumage, des bactéries à Gram négatif typiques du poisson, telles que *Shewanella*, *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Photobacterium*, *Vibrio*, et *Moraxella*, sont souvent prédominantes (Paludan-Muller *et al.*, 1998 ; Gonzalez-Rodriguez *et al.*, 2002), et ce

pendant les deux premières semaines de conservation sous vide à basse température (Leroi *et al.*, 1998). Des entérobactéries peuvent aussi être retrouvées, comme *Serratia*, *Hafnia*, *Proteus*..., provenant probablement de l'environnement de l'usine de fabrication. Le tableau 1 résume les différentes espèces de bactéries à Gram négatif retrouvées dans le saumon fumé.

**Tableau 1 : Les bactéries à Gram négatif isolées du saumon fumé.**

BACTERIES A GRAM NEGATIF	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES
<i>Enterobacter agglomerans</i>	Paludan-Muller <i>et al.</i> , 1998, Truelstrup Hansen and Huss, 1998 Jorgensen <i>et al.</i> , 2000b
<i>Hafnia alvei</i>	Truelstrup Hansen and Huss, 1998 Jorgensen <i>et al.</i> , 2000b
<i>Proteus mirabilis</i>	Gonzalez-Rodriguez <i>et al.</i> , 2002
<i>Proteus vulgaris</i>	Gonzalez-Rodriguez <i>et al.</i> , 2002
<i>Rahnella aquatilis</i>	Paludan-Muller <i>et al.</i> , 1998
<i>Serratia liquefaciens</i>	Paludan-Muller <i>et al.</i> , 1998 Truelstrup Hansen and Huss, 1998 Jorgensen <i>et al.</i> , 2000b Gonzalez-Rodriguez <i>et al.</i> , 2002
<i>Serratia marcescens</i>	Truelstrup Hansen and Huss, 1998
<i>Acinetobacter</i> sp.	Gonzalez-Rodriguez <i>et al.</i> , 2002
<i>Moraxella</i> sp.	Gonzalez-Rodriguez <i>et al.</i> , 2002
<i>Pseudomonas</i> sp.	Gonzalez-Rodriguez <i>et al.</i> , 2002
<i>Shewanella putrefaciens</i>	Leroi <i>et al.</i> , 1998
<i>Aeromonas</i> spp.	Leroi <i>et al.</i> , 1998 Paludan-Muller <i>et al.</i> , 1998 Jorgensen <i>et al.</i> , 2000b Gonzalez-Rodriguez <i>et al.</i> , 2002
<i>Photobacterium phosphoreum</i>	Gram and Huss, 1996 Leroi <i>et al.</i> , 1998 Paludan-Muller <i>et al.</i> , 1998 Jorgensen <i>et al.</i> , 2000b
<i>Vibrio</i> spp.	Truelstrup Hansen and Huss, 1998 Paludan-Muller <i>et al.</i> , 1998 Gonzalez-Rodriguez <i>et al.</i> , 2002

Au cours de la conservation à basse température, les bactéries psychrotrophes aérobies ou anaérobies facultatives et halotrophes peuvent se développer à 4°C sur le produit stocké sous vide avec une concentration en sel (NaCl) de l'ordre de 3 à 6% (en phase aqueuse). Des concentrations de l'ordre de 10<sup>7</sup>-10<sup>8</sup> UFC/g peuvent alors être observées après trois semaines de stockage à température réfrigérée. Dans ces conditions, des bactéries lactiques (bactéries à

gram positif, tableau 2) appartenant aux genres *Carnobacterium* et *Lactobacillus* ainsi que des entérobactéries, bien que minoritaires au début, peuvent devenir majoritaires en fin de conservation (Truelstrup Hansen *et al.*, 1995 ; Leroi *et al.*, 1998 ; Paludan-Muller *et al.*, 1998 ; Gonzalez-Rodriguez *et al.*, 2002). Par exemple, à proximité de la DLC, Paludan-Müller *et al.* (1998) ont démontré que la microflore du saumon fumé était dominée par des bactéries lactiques à des niveaux de  $10^6$  à  $10^7$  UFC/g et que 90% environ de cette flore lactique totale était constituée de souches de *Carnobacterium* (*C. piscicola* en majorité) après un stockage de quatre semaines à 5°C. Notons que l'origine des genres *Carnobacterium* et *Lactobacillus* n'est pas clairement établie, bien que certaines espèces aient été isolées du tube digestif des poissons (Pilet *et al.*, 1995 ; Ringo and Gatesoupe, 1998).

La présence de certaines bactéries marines aérobies comme *Shewanella putrefaciens* et *Photobacterium phosphoreum* sur un produit sous vide peut s'expliquer par le fait que ces bactéries peuvent utiliser l'oxyde de triméthylamine présent dans la chair des poissons marins comme accepteur final d'électrons et ainsi se développer. Ils sont d'ailleurs responsables de la production de triméthylamine (TMA) qui fait partie des caractéristiques d'altération d'un produit (Dalgaard, 1995 ; Gram and Huss, 1996).

Dans certains lots de poissons fumés, des auteurs ont également isolé des *Brochothrix thermosphacta*, bactérie d'altération de la viande emballée sous vide, ainsi que des levures et moisissures (Gram and Huss, 1996 ; Leroi *et al.*, 1998 ; Truelstrup Hansen and Huss, 1998 ; Leroi *et al.*, 2001). Le tableau 2 présente les différentes espèces de bactéries à Gram positif retrouvées dans le saumon fumé.

Tableau 2 : Les bactéries à Gram positif isolées du saumon fumé\*.

BACTERIES A GRAM POSITIF	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES
<i>Bacillus</i> spp.	Gonzalez-Rodriguez <i>et al.</i> , 2002
<i>Brochothrix thermosphacta</i>	Leroi <i>et al.</i> , 1998 Paludan-Muller <i>et al.</i> , 1998 Truelstrup Hansen and Huss, 1998 Gonzalez-Rodriguez <i>et al.</i> , 2002
<i>Carnobacterium divergens</i>	Leroi <i>et al.</i> , 1998 Paludan-Muller <i>et al.</i> , 1998 Jorgensen <i>et al.</i> , 2000b
<i>Carnobacterium piscicola</i>	Leroi <i>et al.</i> , 1998 Paludan-Muller <i>et al.</i> , 1998 Gonzalez-Rodriguez <i>et al.</i> , 2002
<i>Enterococcus faecalis</i>	Gonzalez-Rodriguez <i>et al.</i> , 2002
<i>Lactobacillus alimentarius</i>	Leroi <i>et al.</i> , 1998 Gonzalez-Rodriguez <i>et al.</i> , 2002
<i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>tolerans</i>	Gonzalez-Rodriguez <i>et al.</i> , 2002
<i>Lactobacillus coryneformis</i>	Gonzalez-Rodriguez <i>et al.</i> , 2002
<i>Lactobacillus curvatus</i>	Gonzalez-Rodriguez <i>et al.</i> , 2002 Truelstrup Hansen and Huss, 1998 Jorgensen <i>et al.</i> , 2000b
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i>	Gonzalez-Rodriguez <i>et al.</i> , 2002
<i>Lactobacillus farciminis</i>	Leroi <i>et al.</i> , 1998
<i>Lactobacillus homohiochii</i>	Gonzalez-Rodriguez <i>et al.</i> , 2002
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Truelstrup Hansen and Huss, 1998 Gonzalez-Rodriguez <i>et al.</i> , 2002
<i>Lactobacillus sakei</i>	Leroi <i>et al.</i> , 1998 Truelstrup Hansen and Huss, 1998 Jorgensen <i>et al.</i> , 2000b Gonzalez-Rodriguez <i>et al.</i> , 2002
<i>Lactococcus</i> sp.	Paludan-Muller <i>et al.</i> , 1998
<i>Leuconostoc carnosum</i>	Truelstrup Hansen and Huss, 1998
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Truelstrup Hansen and Huss, 1998 Jorgensen <i>et al.</i> , 2000b
<i>Leuconostoc gelidum</i>	Truelstrup Hansen and Huss, 1998
<i>Weisella kandleri</i>	Gonzalez-Rodriguez <i>et al.</i> , 2002
<i>Listeria innocua</i>	Gonzalez-Rodriguez <i>et al.</i> , 2002
<i>Listeria welshimeri</i>	Gonzalez-Rodriguez <i>et al.</i> , 2002
<i>Listeria seeligeri</i>	Gonzalez-Rodriguez <i>et al.</i> , 2002

\* Certaines bactéries pathogènes sont également isolées du saumon fumé et seront développées dans la partie 2.2.

### 2.1.2. Critères d'évaluation de l'altération microbiologique

Au cours du stockage des lots de saumon fumé, on peut observer une perte des qualités gustatives, par exemple l'apparition de mauvaises odeurs et saveurs, d'une couleur hétérogène à la surface des tranches ou encore d'une texture pâteuse. Il a été clairement montré que cette altération organoleptique est principalement liée à l'activité des microorganismes, les réactions autolytiques ou chimiques d'oxydation des lipides jouant un rôle plus modéré (Gram and Huss, 1996 ; Leroi *et al.*, 1998 ; Truelstrup Hansen *et al.*, 1998 ; Stohr *et al.*, 2001 ; Cardinal *et al.*, 2004).

**Les flores** indicatrices de cette altération qui sont recherchées sont principalement, la flore totale, la flore lactique totale, les entérobactéries, et les levures et moisissures. Peuvent s'ajouter ensuite le dénombrement de genre tel que *Lactobacillus* et d'espèces telles que *Brochothrix thermosphacta* et *Photobacterium phosphoreum*.

**Le pH** fait également partie des critères d'évaluation, l'activité métaboliques des flores d'altération pouvant augmenter ou diminuer le pH initial de la matrice alimentaire.

De même, la mesure de **l'azote basique volatil total** ou ABVT (comprenant l'ammoniaque, **la triméthylamine**, la diméthylamine et la monoéthylamine, ces deux dernières étant en quantité très faible) apporte également de l'information sur le niveau d'altération du saumon fumé. La mesure de la TMA seule, qui est souvent utilisée comme un indicateur de la fraîcheur des poissons non transformés (Dalgaard, 1995 ; Ruiz-Capillas and Moral, 2001), ne semble pas être un bon indicateur du niveau d'altération du saumon fumé du fait de la faible teneur en oxyde de triméthylamine dans le produit.

**L'analyse sensorielle** est également un outil performant pour décrire le goût, l'odeur, la texture et l'aspect d'un produit alimentaire. Les descripteurs utilisés caractérisent le produit (odeur poisson, hareng, fumée, goût salé...) mais aussi l'altération en rapport avec le produit (odeur rance, fromage, fécale, goût acide, aigre...). L'analyse sensorielle peut être pratiquée par un jury entraîné à reconnaître précisément chaque descripteur et qui décrit ces descripteurs sur une échelle selon leur intensité. Le nombre de personnes dans le jury doit être suffisant pour permettre une analyse sensorielle fiable (au moins 12 personnes).

Le dosage d'**autres composés** issus du métabolisme des microorganismes peuvent aussi témoigner du niveau d'altération du produit. Plusieurs études montrent que le dosage de molécules telles que les **composés volatils** (Jorgensen *et al.*, 2001) comme les alcools (éthanol...) et les acides (acide acétique...), mais aussi **l'hypoxanthine** issu de la dégradation

des acides nucléiques (Truelstrup Hansen *et al.*, 1995), ainsi que **les amines biogènes** (Jorgensen *et al.*, 2000a) peuvent devenir des indicateurs de qualité sanitaire (Cf. chapitre 3 sur les amines biogènes).

Un modèle mathématique associant le nombre de *Lactobacillus* et la production d'ABVT a été proposé pour prédire la date (Remaining Shelf-Life) à laquelle un lot de saumon fumé sera considéré comme altéré (Leroi *et al.*, 2001).

$$RSL_{\text{(en semaine)}} = 4,78 - 0,34 * \log_{10}(\text{Lactobacillus}_{\text{en CFU/g}}) - 0,06 * (\text{ABVT}_{\text{en mg N/100 g}})$$

Cet outil, en combinant plusieurs critères d'évaluation de l'altération par les microorganismes, est plus précis, mais de part la forte complexité des mécanismes d'altération de chaque lot de saumon fumé provenant de différents fabricants, ce type de modèle n'est souvent applicable qu'aux produits d'une seule usine de fabrication. D'autres modèles tenant compte des taux d'amines biogènes seront abordés dans le chapitre 3.

### 2.1.3. Rôle spécifiques des microorganismes dans l'altération

Le rôle des microorganismes sur **les caractéristiques organoleptiques** du saumon fumé a été étudié. Certains auteurs ontensemencé en culture pure sur du saumon fumé stérile des microorganismes rencontrés dans le saumon fumé et ont analysé les odeurs et les composés volatils sécrétés :

- parmi les bactéries à Gram négatif, la présence d'*Aeromonas* spp. se traduit par une odeur aminée (Joffraud *et al.*, 2001). La formation d'odeurs putrides et de H<sub>2</sub>S en jus de saumon a été reliée à *Shewanella putrefaciens* et à *Aeromonas* spp. (Leroi *et al.*, 1998). Cependant, *Shewanella putrefaciens*, bactérie d'altération typique du poisson frais, peut ne pas avoir d'effet altérant sur saumon fumé du fait de sa moins bonne croissance sur le produit (Stohr *et al.*, 2001). Par ailleurs, comme nous l'avons vu précédemment, *Shewanella putrefaciens* ainsi que *Photobacterium phosphoreum* participent à la formation de la TMA qui est responsable de l'odeur caractéristique de poisson pourri. Certaines souches de *Photobacterium phosphoreum* peuvent produire des odeurs acides, mais il est souvent difficile d'attribuer des descripteurs sensoriels propres à cette espèce. Néanmoins sur le poisson frais

(cabillaud) emballé sous atmosphère modifiée, *Photobacterium phosphoreum* a été montré comme germe altérant (Dalgaard, 1995). Les entérobactéries sont également très altérantes du point de vue des odeurs (Truelstrup Hansen and Huss, 1998 ; Stohr *et al.*, 2001).

- parmi les bactéries à Gram positif, la présence de *Brochothrix thermosphacta* a également été associée à une odeur aigre et de fromage bleu (Leroi *et al.*, 1998) ou une odeur plastique et rance (Stohr *et al.*, 2001), mais leur concentration dans des lots naturellement contaminés est souvent faible (inférieure à  $10^4$  UFC/g) et n'explique pas toujours leur lien avec l'altération du produit (Truelstrup Hansen and Huss, 1998). Bien que *Lactobacillus farciminis*, *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus alimentarius* n'aient pas produit d'odeur caractéristique au cours de l'étude menée par Leroi *et al.* (1998), il semble que les *Lactobacillus* spp. participeraient au processus d'altération en produisant des odeurs acides et soufrées, aigres et piquantes (Stohr *et al.*, 2001 ; Joffraud *et al.*, 2001). Il semble que ce phénomène dépende des souches à l'intérieur d'une même espèce (Dalgaard, 1995 ; Stohr *et al.*, 2001) ainsi que des conditions de culture, de la matrice (ex. jus de saumon ou dés de saumon) et de la présence éventuelle d'autres bactéries. Par contre, les *Carnobacterium* spp. ne semblent pas avoir d'effet altérant important (Paludan-Muller *et al.*, 1998 ; Leroi *et al.*, 1998 ; Duffes *et al.*, 1999a ; Stohr *et al.*, 2001), ils sont souvent associés à une odeur beurre/caramel, qui n'est pas caractéristique des odeurs d'altération pouvant conduire un échantillon à être jugé comme altéré.

Le rôle des microorganismes sur **les paramètres physico-chimiques** du saumon fumé a aussi été étudié. Le pH moyen du saumon fumé est légèrement acide et se situe entre 6,0 et 6,2. Au cours de la conservation, le pH varie très peu sans doute en raison du pouvoir tampon de la matrice et du fait que l'activité de certains germes contrebalance l'acidification provoquée par d'autres. En effet, une étude a montré qu'un saumon fumé inoculé individuellement par certaines bactéries pouvait voir son pH varier (Stohr *et al.*, 2001) : la présence d'espèces de *Lactobacillus* (*farciminis*, *sakei*, *alimentarius*) par exemple diminue le pH vers 5,6 à 5,7 après 5 semaines de stockage à 6°C (environ  $10^8$  UFC/g), la présence de *Carnobacterium piscicola* ou *Brochothrix thermosphacta* entraîne une acidification modérée (pH de 5,9 à 6,0). En revanche, *Shewanella putrefaciens* provoque une très légère augmentation du pH (6,3). *Serratia liquefaciens*, *Aeromonas* spp. et *Photobacterium phosphoreum* n'entraînent par contre aucune modification du pH.

Stohr *et al.* (2001) ont aussi montré que les bactéries citées ci-dessus inoculées seules sur saumon fumé n'augmentaient pas la production de TMA, alors que l'ABVT pouvait

augmenter de façon significative en présence des souches de *Photobacterium phosphoreum*, *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus farciminis*, *Serratia liquefaciens* et *Aeromonas* spp. (augmentation de 32 à 38 mg N/100 g en moyenne). Par ailleurs, il semble que des souches ne produisant pas ou peu d'ABVT lorsqu'elles sont inoculées individuellement peuvent participer à l'augmentation de l'ABVT lorsqu'elles sont inoculées avec d'autres espèces (métabolisme associatif, Gram *et al.*, 2002 ; Joffraud, communication personnelle).

#### 2.1.4. Aspects réglementaires de la microbiologie du saumon fumé

Les critères microbiologiques applicables au saumon fumé sont ceux qui furent établis par l'arrêté du 21 décembre 1979 modifié intitulé « Critères microbiologiques auxquels doivent satisfaire certaines denrées animales ou d'origine animale ». Ils s'appliquent en principe à des échantillons composés de 5 unités prélevées au même moment dans un même lot. Une note de service du 27 juin 2001 (DGAL, 2001) constitue un recueil actualisé des critères microbiologiques applicables aux denrées alimentaires existants à ce jour. Le saumon fumé n'est plus classé dans « les semi-conserves à base de denrées animales ou d'origine animale », mais dans « les produits de la pêche » (tableau 3).

**Tableau 3 : Extrait des critères microbiologiques appliqués aux produits de la pêche (DGAL, 2001).**

DESIGNATION	MICROORGANISMES aérobies 30°C (par gramme)	COLIFORMES (par gramme)	STAPHYLOCOCCUS aureus (par gramme)	ANAEROBIES SUL. réducteurs 46°C (par gramme)	SALMONELLA
<b>Saumon fumé</b> , haddock et autres poissons légèrement salés et fumés (a)...	10 <sup>6</sup>	1	5 (a)	1 (a)	Absence (dans 25 grammes)

(a) Circulaire n°7385 SVHA du 06/12/89 (recommandations du CNERNA) seules les tolérances de caractère analytique sont acceptées (plan à 2 classes)

Le respect des critères microbiologiques concernant les microorganismes aérobies totaux et les coliformes doivent pouvoir assurer la qualité marchande des produits. On remarquera que ces critères ne prennent pas en compte l'ensemble des entérobactéries, mais



seulement les coliformes et *Salmonella* spp., et ne tiennent pas compte non plus des indicateurs plus spécifiques de l'altération évoqués précédemment. En règle générale, les denrées alimentaires ne doivent pas contenir de microorganismes ou leurs toxines ou métabolites en quantités qui présenteraient un risque inacceptable pour la santé du consommateur. De fait, le respect de l'ensemble des critères microbiologiques ne peut jamais garantir qu'un aliment est microbiologiquement sain puisque ces critères ne prennent pas tous en compte la présence de certains pathogènes tels que *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter*, *Bacillus cereus*, certains virus, etc. Bien que les conditions de conservation du saumon fumé ne favorisent pas la présence ou le développement de certains d'entre eux, il n'en est pas de même pour *Listeria monocytogenes*. Actuellement, un projet de règlement européen (SANCO/4198/2001 Rev. 14, 2004) tend à harmoniser les critères microbiologiques pour les denrées alimentaires et prend en compte la teneur en *Listeria monocytogenes* dans certaines catégories d'aliments, tels que les produits prêts-à-consommer supportant la croissance de cette bactérie pathogène (maintien d'un seuil inférieur à 100 UFC/g jusqu'à la DLC).

## **2.2. Flores pathogènes rencontrées dans le saumon fumé**

D'après des études sur les risques microbiologiques associés au saumon fumé (Huss, 1997), les principaux germes pathogènes posant problème sont les bactéries à Gram positif psychrotrophes : *Listeria monocytogenes* (Notermans and Hoornstra, 2000) et *Clostridium botulinum*. En effet, comme nous l'avons vu précédemment, les conditions de conservation du saumon (poisson salé et fumé conservé sous vide à basse température) favorisent la prédominance des germes psychrotrophes aérobies ou anaérobies facultatifs capables de croître en milieu salé. Les salmonelles et les coliformes sont des bactéries mésophiles dont la croissance est inhibée par la conservation à basse température. *Staphylococcus aureus* (Gram positif) a déjà été retrouvé dans le saumon et la truite fumés (Gonzalez-Rodriguez *et al.*, 2002), cependant sa croissance est également inhibée par le froid. Par ailleurs, aucune étude n'a montré la présence des espèces pathogènes de *Vibrio*, telles que *Vibrio cholerae*, *Vibrio vulnificus* et *Vibrio parahaemolyticus* dans le saumon fumé. Ces bactéries mésophiles se sont pas contaminantes des poissons de mer froide, on les retrouve plus facilement dans des eaux tropicales ou tempérées si l'été a été très chaud.

La présence de bactéries pathogènes, telles que *Listeria monocytogenes* ou *Clostridium botulinum* dans le saumon fumé est souvent liée à des contaminations (manipulateur, nettoyage-désinfection négligé...) au cours de l'abattage, de l'éviscération et du stockage mais peut aussi avoir pour origine la matière première (Rorvik *et al.*, 1995 ; Autio *et al.*, 1999 ; Huss *et al.*, 2000).

### 2.2.1. Contamination par *Clostridium botulinum*

Parmi les espèces de *Clostridium* (généralement mésophiles), seules les souches de *Clostridium botulinum* de type E sont psychrotrophes. *Clostridium botulinum* de type E (souches du groupe II) produit une neurotoxine à partir de 3,3°C qui peut être retrouvée dans les produits de la pêche, et c'est cette neurotoxine préformée qui est responsable des cas de botulisme (intoxication). Les spores des souches produisant de la toxine E peuvent germer à partir de 3,3°C, mais à température réfrigérée, la production de toxine est très lente et nécessite plusieurs semaines ce qui fait que, généralement, le produit est altéré bien avant qu'il ne devienne toxique.

La concentration en NaCl est l'un des facteurs les plus importants pour limiter la croissance de *Clostridium botulinum* dans les aliments. Selon Huss (1997), un taux de sel supérieur à 3% (phase aqueuse) associé à la conservation à basse température (inférieure à 5°C) est suffisant pour inhiber la croissance de *Clostridium botulinum* de type E. Selon le procédé de transformation utilisé lors de la fabrication du saumon fumé, l'action combinée du salage et du séchage peut conduire à une teneur en sel de 3 à 12,6% (phase aqueuse) et une activité de l'eau ( $a_w$ ) de 0,92 à 0,98 dans les produits (Jorgensen *et al.*, 2000a). Ce dernier paramètre influence également fortement la croissance des souches du groupe II de *Clostridium botulinum* qui ne se multiplient plus pour des valeurs d' $a_w$  inférieures à 0,97.

Aucun des cas de botulisme de type E répertoriés par Heinitz *et al.* (1998) et liés à la consommation de produit de la mer n'a eu lieu en France. Les cas recensés ont eu lieu en 1985 et 1987 aux Etats-Unis et en Israël après consommation de Kapchunka (poisson blanc salé, séché et non éviscéré), et en Belgique après consommation de saumon d'Alaska en boîte, provoquant un décès en 1982. Par ailleurs, dans cette étude américaine, aucune spore de *Clostridium botulinum* n'a pu être mise en évidence sur 201 échantillons de poissons, mollusques et crustacés fumés et emballés sous vide provenant de différents pays et analysés entre 1991 et 1995.

### 2.2.2. Contamination par *Listeria monocytogenes*

*Listeria monocytogenes* est la bactérie pathogène responsable de la listériose humaine, maladie rare mais à létalité élevée (30%) (Hof, 2003). Selon l'Institut Pasteur, en 2003, 192 cas sporadiques de listériose humaine dus à tous types d'aliments ont été recensés en France métropolitaine. La dernière épidémie de listériose en France a eu lieu en 2000 et a été attribuée à la consommation de langue de porc en gelée contaminée. Les personnes les plus exposées sont les personnes âgées, les personnes immuno-déprimées (personnes transfusées, ou atteintes d'un cancer, ou du sida...), les femmes enceintes et les nouveaux-nés.

*Listeria monocytogenes* est la principale bactérie pathogène pouvant représenter un risque pour les consommateurs de produits de la mer comme le saumon fumé. La tendance vers des traitements de salage-fumage de plus en plus allégés avec des teneurs en sel (2,5 à 3,5%) et en phénols (moins de 1 mg/100 g) peu élevées, associée à une conservation réfrigérée sous vide assez longue (généralement 4 semaines) et au fait que le produit est principalement consommé cru, engendre un risque sanitaire lié à la présence et à la croissance possible de *Listeria monocytogenes* à 4-6°C dans le saumon fumé (Guyer and Jemmi, 1991).

**La fréquence de contamination** du saumon fumé par *Listeria monocytogenes* varie entre 10 et 80% selon certaines études (Ben Embarek, 1994 ; Heinitz and Johnson, 1998 ; Jorgensen and Huss, 1998 ; Dauphin *et al.*, 2001). En France, selon une étude récente, le poisson fumé arrive en 6<sup>ème</sup> position du classement des produits à risque (Christen, 2004), il apparaît même comme le produit présentant le taux de contamination par *Listeria monocytogenes* le plus important (14 %). Une étude semi-quantitative d'analyse de risque menée sur différents produits de la mer en Australie a permis également de classer les produits de la mer fumés comme des denrées à haut risque vis-à-vis de cette bactérie pathogène (Sumner and Ross, 2002). Cependant, les résultats actuels des autocontrôles des entreprises françaises sont compris entre 10 et 30%, compte-tenu des mesures déjà mises en place par les entreprises (Rorvik *et al.*, 1995 ; Heinitz and Johnson, 1998). Le taux de *Listeria monocytogenes* est généralement inférieur à 10 UFC/g dans les produits en sortie usine (Jorgensen and Huss, 1998 ; Nilsson *et al.*, 1999). Selon la Food and Drug Administration, 94% des portions de produits de la mer fumés contiendraient moins de une UFC de *L. monocytogenes* (FDA/USDA, 2003).

Si la matière première est fréquemment contaminée par des souches différentes, plusieurs études indiquent que **la source principale de contamination** du produit fini a lieu pendant le procédé de transformation, par contact avec des surfaces ou équipements souillés (Autio *et al.*, 1999 ; Huss *et al.*, 2000 ; Vogel *et al.*, 2001a ; Dauphin *et al.*, 2001 ; De Roin *et al.*, 2003 ; Hoffman *et al.*, 2003), notamment lors des rotations du personnel sur les postes (Rorvik *et al.*, 1997), le poisson frais n'étant pas une source de contamination importante (Rorvik, 2000). Seules certaines souches, spécifiques de chaque entreprise, se retrouveraient dans le produit fini (Rorvik *et al.*, 1995 ; Vogel *et al.*, 2001b ; Dauphin *et al.*, 2001 ; Thimothe *et al.*, 2004).

Par ailleurs, tous les travaux montrent que **la croissance de *Listeria monocytogenes*** est possible dans les conditions de conservation des poissons fumés, avec une augmentation pouvant atteindre 3 à 5 log en 10 jours à 5°C (Nilsson *et al.*, 1997 ; Duffes *et al.*, 1999a). En milieu liquide, il a été montré qu'à 8°C, température souvent observée dans les réfrigérateurs des particuliers, les taux de phénols (1 mg/100 g) et de sel (2 à 4%) les plus fréquemment retrouvés dans le saumon fumé, notamment en France, n'avaient aucun effet sur le développement de la bactérie pathogène dans ce produit (Thurette *et al.*, 1998). Une autre étude sur le produit a démontré qu'un taux de sel de 6% et un fumage à froid de 26-30 h n'éliminait pas totalement la croissance de la bactérie inoculée sur saumon (Guyer and Jemmi, 1991). Néanmoins, la croissance est ralentie (Ribeiro Neunlist *et al.*, 2005).

Bien que des études aient montré que la croissance de *Listeria monocytogenes* sur des lots de saumon naturellement contaminés était lente et que le nombre final ne dépassait pas 10<sup>2</sup> UFC/g à 5°C (Dalgaard and Jorgensen, 1998), et bien que le potentiel pathogène de souches de *Listeria monocytogenes* isolées de saumon fumé semblait faible (Norton *et al.*, 2001), les produits de la mer ont depuis été incriminés dans plusieurs **épidémies de listériose** dont deux seraient liées à la consommation de saumon ou de truite fumée : l'une en Suède touchant 9 personnes et provoquant 2 décès (Ericsson *et al.*, 1997) et l'autre en Finlande entraînant 5 cas de gastroentérites fébriles (Miettinen *et al.*, 1999). Par ailleurs, 23 cas de listériose ont été recensés en Finlande entre juin 1999 et février 2000, probablement dus à l'ingestion de poisson fumé ou salé à froid (Eurosurveillance Weekly, 2000). Une étude suggère également que les produits de la mer sont responsables de cas de listériose déclarés en Norvège (Rorvik *et al.*, 2000).

Concernant **la réglementation**, certains pays ont une politique de "zéro tolérance" (absence dans 25 ou 50 g) vis-à-vis du germe *Listeria monocytogenes* dans les produits prêts à consommer. C'est le cas aux Etats Unis, Canada, Amérique du Sud et en Italie (FDA). D'autres pays (notamment le Canada, le Danemark, la France, la Hollande et l'Allemagne) ont conclu que bien que l'absence de *Listeria monocytogenes* puisse représenter un objectif idéal, celui-ci est considéré pour certains aliments comme peu réaliste et difficile à satisfaire. De plus, un tel objectif contribuerait à limiter le commerce sans avoir un impact positif sur la santé publique.

En France, le rapport de la commission *Listeria* de l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments propose un classement des aliments au regard du risque représenté par *Listeria monocytogenes* et des seuils critiques applicables à la production et à la distribution. Selon les catégories, les critères préconisent une absence de la bactérie pathogène dans 25 g d'aliment ou une tolérance de 100 UFC/g (AFSSA, 2000). Ensuite, la classification des aliments a été reconsidérée en trois catégories : aliments sûrs, sensibles ou à risque maîtrisé (AFSSA, 2001). Ce classement est à nouveau en cours de révision (Rap1/MIC/2003-SA-0362, communication personnelle) et définit les catégories de la façon suivante :

- Catégorie 1 : les aliments appartenant à cette catégorie nécessitent au stade de leur consommation, soit une cuisson, soit une autre transformation efficace pour éliminer ou ramener à un niveau acceptable les microorganismes dangereux. Les habitudes alimentaires diffèrent d'un individu à l'autre et d'un pays à l'autre et les instructions de conservation et de préparation de ces aliments, communiquées aux consommateurs, sont essentielles. Cela concerne notamment les viandes hachées, les saucisses crues...
- Catégorie 2 : au moment de leur mise sur le marché, ces aliments prêts à être consommés ne contiennent pas *Listeria monocytogenes* à un niveau supérieur à celui fixé par un critère microbiologique réglementaire et ne permettent pas la multiplication de la bactérie pathogène (pH<4,2 ou 4,5 si acidification par l'acide lactique ou acétique, ou  $a_w < 0,90-0,93$ , ou produit sous forme congelée ou surgelée, ou apport de la preuve de non-croissance de la bactérie pathogène dans le produit).
- Catégorie 3 (ex : saumon fumé) : ce sont les denrées alimentaires prêtes à être consommées dans lesquelles *Listeria monocytogenes* peut se multiplier et dont la sécurité sanitaire et la conformité aux critères microbiologiques dépend du respect à la fois des bonnes pratiques d'hygiène jusqu'à la consommation, de la fixation appropriée de la durée de conservation et des informations destinées aux consommateurs.

**La lutte contre *Listeria monocytogenes*** dans le saumon fumé doit s'effectuer à deux niveaux. Tout d'abord dans l'entreprise, en améliorant les procédures de nettoyage et de désinfection pour minimiser la contamination initiale (Rorvik *et al.*, 1997 ; Autio *et al.*, 1999). Cela passe entre autre par le respect des bonnes pratiques de transformation (taux de sel et de fumée suffisants) et par le respect de la chaîne du froid (4°C) jusque chez le consommateur. Cependant, malgré les procédures d'hygiène optimisées, il est impossible de garantir une élimination totale de *Listeria monocytogenes* puisque le procédé de transformation, rappelons-le, ne comprend aucun traitement assainissant vis-à-vis de cette bactérie (Huss *et al.*, 2000). Il faut donc aussi essayer de limiter la croissance de cette bactérie dans le produit fini.

Par ailleurs, différentes méthodes ont été testées pour éliminer ou empêcher la croissance de *Listeria monocytogenes* dans différents produits alimentaires : l'ionisation (Savvaïdis *et al.*, 2002), les hautes pressions (Ritz *et al.*, 2000 ; Lakshmanan *et al.*, 2003 ; Lakshmanan and Dalgaard, 2004), les agents antimicrobiens (Antunes *et al.*, 2002), le lactate et le diacétate de sodium (Glass *et al.*, 2002), le chlorure de sodium (Peterson *et al.*, 1993), le nitrite de sodium (Lyhs *et al.*, 1998), la lactoperoxydase (Boussouel *et al.*, 1999) et la nisine ou préparations commerciales antimicrobiennes comme ALTA ou FARGO (Szabo and Cahill, 1999). Ces méthodes sont soit peu efficaces, soit entraînent des modifications organoleptiques du produit. La nisine, associée au CO<sub>2</sub>, inhibe la croissance de *Listeria monocytogenes* (Nilsson *et al.*, 1997), mais l'emballage sous atmosphère modifiée de fines tranches de saumon fumé semble techniquement difficile (communications personnelles des industriels français). En revanche, la biopréservation par l'utilisation de bactéries lactiques isolées de produits de la mer et sélectionnées pour leurs capacités à inhiber *Listeria monocytogenes* dans le produit lors de la conservation réfrigérée (Duffes *et al.*, 1999a) semble être une voie très prometteuse. En effet, l'utilisation de bactéries lactiques bioprotectrices dans les produits prêts à consommer (Kelly *et al.*, 1996 ; Rodgers, 2001), les viandes réfrigérées (Schillinger *et al.*, 1991 ; McMullen and Stiles, 1996 ; Hugas, 1998 ; Bredholt *et al.*, 1999 ; Liserre *et al.*, 2002 ; Katla *et al.*, 2002 ; Budde *et al.*, 2003 ; Jacobsen *et al.*, 2003), les légumes et produits végétaux (Vescovo *et al.*, 1996 ; Schillinger *et al.*, 2001 ; Wilderdyke *et al.*, 2004), les produits laitiers (Eppert *et al.*, 1997 ; Benkerroum *et al.*, 2002 ; Foulquié Moreno *et al.*, 2003 ; Leroy *et al.*, 2003) et les produits de la mer (Wessels and Huss, 1996 ; Nilsson *et al.*, 1999 ; Katla *et al.*, 2001 ; Yamazaki *et al.*, 2003) a déjà été proposée dans la littérature. Les potentialités d'utilisation de cette technologie pour le saumon fumé seront présentées dans le chapitre 4.

### **3. LES AMINES BIOGENES**

Certains métabolites issus de l'activité bactérienne peuvent être corrélés à l'altération d'un produit alimentaire, sans qu'ils soient eux-mêmes détectables au niveau sensoriel. Les amines biogènes en sont des exemples, certaines sont fréquemment retrouvées dans les produits de la mer.

#### **3.1. Définition des amines biogènes**

Les amines biogènes sont des bases organiques, de faible poids moléculaire, et qui sont formées ou dégradées par le métabolisme des animaux, des plantes et des microorganismes. C'est la raison pour laquelle on peut les retrouver dans les aliments : elles sont générées à partir des acides aminés libres du produit, soit par des décarboxylases tissulaires, soit par des décarboxylases microbiennes (ten Brink *et al.*, 1990) à partir de leur acide aminé précurseur (tableau 4). Le terme d'amines biogènes regroupe des molécules de différentes structures chimiques possédant un groupement aminé et qui ont une origine biologique. Cette structure chimique peut être aliphatique (putrescine, cadavérine), aromatique (tyramine,  $\beta$ -phényléthylamine) ou hétérocyclique (histamine, tryptamine). Les amines biogènes peuvent aussi être classées en fonction du nombre de groupements aminés ( $\text{NH}_2$ ) en monoamines ( $\beta$ -phényléthylamine, tyramine, tryptamine), en diamines (histamine, putrescine, cadavérine) ainsi qu'une polyamine (agmatine).

**Tableau 4 : Amines biogènes et acides aminés précurseurs (selon ten Brink *et al.*, 1990)**

ACIDES AMINES	DECARBOXYLASES	AMINES BIOGENES
<i>Hétérocycliques</i> Histidine Tryptophane	Histidine décarboxylase Tryptophane décarboxylase	<i>Hétérocycliques</i> Histamine Tryptamine / Sérotonine
<i>Aromatiques</i> Tyrosine Phénylalanine	Tyrosine décarboxylase Phénylalanine décarboxylase	<i>Aromatiques</i> Tyramine $\beta$ -Phényléthylamine
<i>Basiques</i> Ornithine <sup>1</sup> Lysine Arginine	Ornithine décarboxylase Lysine décarboxylase Arginine décarboxylase	<i>Aliphatiques</i> Putrescine <sup>2</sup> Cadavérine Agmatine <sup>3</sup>

<sup>1</sup> La glutamine et l'arginine sont les précurseurs de l'ornithine.

<sup>2</sup> La putrescine est le précurseur de la spermidine et de la spermine

<sup>3</sup> L'agmatine peut être aussi le précurseur de la putrescine et de la cadavérine

Certaines amines biogènes jouent un rôle physiologique important chez l'homme et les animaux, elles interviennent notamment dans la régulation de la température corporelle, du volume et du pH de l'estomac, ainsi que dans la régulation du système nerveux central et de la pression sanguine. Elles servent également de précurseurs à la synthèse des hormones. La putrescine, la spermine et la spermidine sont impliquées dans de multiples réactions biologiques telles que la synthèse des acides nucléiques (ADN / ARN) et des protéines (Tabor and Tabor, 1985).

### **3.2. Les concentrations en amines biogènes dans les produits alimentaires**

Théoriquement, tous les aliments contenant des protéines et des acides aminés libres qui sont soumis à des conditions favorisant une activité biochimique ou microbienne de décarboxylation sont susceptibles de contenir des amines biogènes. La quantité d'amines



biogènes d'un produit dépend de la teneur en acides aminés libres, de la concentration en flores microbiennes productrices d'amines, de la durée de vie du produit et de ses conditions de stockage (permettant notamment la croissance et les activités de décarboxylation des microorganismes). Différentes études ont porté sur la détection des amines biogènes dans divers produits alimentaires et notamment dans les produits laitiers, carnés et marins (tableau 5). A titre d'exemple, des études ont permis de mettre en évidence lors de la fermentation de saucissons, des concentrations en histamine de 10 à 100 mg/kg et en tyramine de 50 à 550 mg/kg (Rice and Koehler, 1976 ; Parente *et al.*, 2001 ; Ansorena *et al.*, 2002 ; González-Fernández, 2003). Le fromage peut contenir des taux de tyramine allant de 100 à 200 mg/kg selon les souches utilisées (Joosten, 1995). Dans le porc frais stocké à  $-1,5^{\circ}\text{C}$  et emballé sous vide ou sous atmosphère modifiée pendant 5 et 13 semaines respectivement, des quantités de tyramine (40 mg/kg) ainsi que d'autres amines biogènes ont été mesurées (Nadon *et al.*, 2001). Dans divers lots de saumon fumé contaminés individuellement par différentes bactéries et stockés pendant 21 jours à  $5^{\circ}\text{C}$  sous atmosphère azotée (100%), les teneurs et les concentrations en amines biogènes peuvent varier selon les souches inoculées (Jorgensen *et al.*, 2000b) : histamine (100-220 mg/kg), tyramine (2-220 mg/kg), cadavérine (4-470 mg/kg), putrescine (3-15 mg/kg) et agmatine (10-220 mg/kg). Une autre étude a montré que sur 12 lots de saumon fumé naturellement contaminés, provenant de 3 usines différentes et stockés pendant plusieurs semaines à  $5^{\circ}\text{C}$ , les concentrations d'amines biogènes pouvaient varier de 3 à 240 mg/kg pour l'histamine, de 82 à 335 mg/kg pour la tyramine, de 36 à 345 mg/kg pour la cadavérine, de 3 à 383 mg/kg pour la putrescine et de 2 à 270 mg/kg pour l'agmatine (Jorgensen *et al.*, 2000a).

Tableau 5 : Les amines biogènes retrouvées dans les aliments

PRODUITS ALIMENTAIRES	AMINES BIOGENES	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES
<b>Produits laitiers</b> lait, yaourt	spermine, spermidine	Novella-Rodriguez <i>et al.</i> , 2000
fromage	tyramine, histamine, putrescine, cadavérine, tryptamine, $\beta$ -phényléthylamine	Novella-Rodriguez <i>et al.</i> , 2004 Innocente and D'Agostin, 2002 Halasz <i>et al.</i> , 1994 Stratton <i>et al.</i> , 1991
<b>Produits carnés</b> porc frais	tyramine, $\beta$ -phényléthylamine, cadavérine, putrescine, histamine, spermine, spermidine	Suzzi and Gardini, 2003 Nadon <i>et al.</i> , 2001
saucisson	putrescine, tyramine, tryptamine, histamine, cadavérine, $\beta$ -phényléthylamine, spermine, spermidine	González-Fernández, 2003 Suzzi and Gardini, 2003 Ansorena <i>et al.</i> , 2002 Bover-Cid <i>et al.</i> , 2001 Pereira <i>et al.</i> , 2001 Parente <i>et al.</i> , 2001 Rice and Koehler, 1976
bœuf frais ou haché	tyramine, putrescine, histamine, cadavérine, tryptamine	Kaniou <i>et al.</i> , 2001 Durlu-Özkaya, 2001 Edwards <i>et al.</i> , 1987
<b>Produits marins</b> Poissons : saumon frais et fumé, truite, bar, thon, cabillaud, dorade, merlu, sardine ...	histamine, tyramine, putrescine, cadavérine, agmatine, tryptamine, $\beta$ -phényléthylamine, spermidine, spermine, triméthylamine	Chytiri <i>et al.</i> , 2004 Paleologos <i>et al.</i> , 2004 Tsai <i>et al.</i> , 2004 Periago <i>et al.</i> , 2003 Hernandez-Herrero <i>et al.</i> , 2002 da Silva <i>et al.</i> , 2002 Emborg <i>et al.</i> , 2002 Connil <i>et al.</i> , 2002c Ruiz-Capillas and Moral, 2001 Jorgensen <i>et al.</i> , 2000b Koutsoumanis <i>et al.</i> , 1999 Gingerich <i>et al.</i> , 1999 Lopez-Sabater <i>et al.</i> , 1996
calmar	agmatine, putrescine, cadavérine, tyramine, histamine	Paarup <i>et al.</i> , 2002
crevettes	putrescine, cadavérine	Benner <i>et al.</i> , 2004
<b>Autres produits alimentaires</b> vin	tyramine, $\beta$ -phényléthylamine, putrescine, histamine	Moreno-Arribas <i>et al.</i> , 2003 Moreno-Arribas <i>et al.</i> , 2000 Lonvaud-Funel, 2001 Stratton <i>et al.</i> , 1991
bière	tyramine, tryptamine	Izquierdo-Pulido <i>et al.</i> , 1996
jus de fruits	putrescine, tryptamine, tyramine	Halasz <i>et al.</i> , 1994
chocolat	$\beta$ -phényléthylamine	Santos, 1996 Smith, 1981
olives saumurées	putrescine, cadavérine, histamine, tyramine, tryptamine	Garcia-Garcia <i>et al.</i> , 2000
miso (pâte de soja) et sauce au soja	tyramine, histamine	Stratton <i>et al.</i> , 1991 Henry Chin and Koehler, 1986

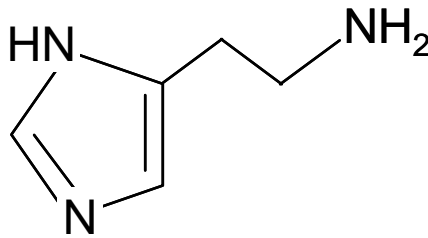
### **3.3. Toxicité des amines biogènes et réglementation**

Les mammifères possèdent un système de détoxification dans la paroi intestinale permettant de réguler la quantité d'amines biogènes dans l'organisme. Ainsi, une teneur en amines biogènes trop élevée dans l'organisme pourra être diminuée sous l'action de plusieurs enzymes : la monoamine oxydase (MAO) et la diamine oxydase (DAO). Dans certains cas, la sensibilité d'un individu aux amines biogènes augmente avec la consommation d'alcool (ten Brink *et al.*, 1990) et la prise de médicaments tels que des inhibiteurs de monoamine oxydase prescrits dans le cadre de certains traitements cardiaques, de traitements anti-dépresseurs et des traitements contre les maladies d'Alzheimer et de Parkinson (McCabe, 1986). Dans le cas où un individu absorberait des aliments contenant une trop grande quantité d'amines biogènes, le système de détoxification peut vite devenir inefficace et les amines peuvent induire des effets toxiques dans l'organisme (Rice and Koehler, 1976 ; ten Brink *et al.*, 1990 ; Halasz *et al.*, 1994 ; Santos, 1996).

Les taux à partir desquels les amines deviennent toxiques sont difficiles à établir car ils dépendent des caractéristiques de chacun mais aussi de la présence d'autres amines. Par exemple, la putrescine, la cadavérine et l'agmatine peuvent augmenter l'effet toxique de l'histamine en inhibant le système de détoxification présent chez l'homme. D'autres données comme un taux de 1000 mg/kg d'amines biogènes totales dans les aliments est rapporté comme dangereux pour la santé (Santos, 1996). De plus, la putrescine, la cadavérine, la spermine et la spermidine sont des précurseurs potentiels pour la formation de nitrosamines, composés nitreux carcinogènes (Halasz *et al.*, 1994) et leur formation est favorisée dans les produits où des nitrates et des nitrites sont ajoutés (comme dans le saucisson).

Nous allons nous intéresser plus précisément à l'histamine (l'amine biogène la plus étudiée) et à la tyramine.

### 3.3.1. L'histamine



**Figure 10 : L'histamine**

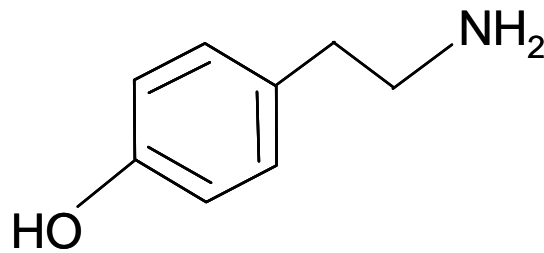
L'histamine est la plus toxique des amines biogènes (figure 10). L'histamine est un composé vasoactif intervenant sur le système nerveux central et le système vasculaire. Elle intervient dans certains mécanismes de réactions immunitaires. Les symptômes d'une intoxication histaminique apparaissent entre plusieurs minutes et 3 heures après l'ingestion de l'aliment toxique. Cependant les symptômes dépendent de la dose ingérée : les premiers signes d'intoxication apparaissent lorsque 8 à 40 mg d'histamine sont ingérés. Ils se traduisent au niveau de la peau par de l'urticaire, des œdèmes et des inflammations locales (visage, cou). Ces manifestations sont liées à l'action de vasodilatation de l'histamine sur les petits vaisseaux sanguins, capillaires et veinules. L'ingestion de 100 mg d'histamine induit des maux de tête, de l'hypotension, des palpitations cardiaques. Des manifestations secondaires, de nature gastro-intestinale (nausée, vomissement) peuvent également apparaître chez certaines personnes. Au delà de 1000 mg, des troubles plus sévères d'ordre cardiaque et respiratoire peuvent survenir (Taylor, 1986).

Historiquement, cette intoxication a été associée à la consommation de poisson de la famille des Scrombidés (thon, maquereau...) dont les muscles sont particulièrement riches en histidine (Taylor, 1986). Un cas d'intoxication alimentaire par *Photobacterium phosphoreum* dû à une production importante d'histamine dans de la sardine séchée (1700 mg/kg) a été signalé au Japon en mars 2002 (Kanki *et al.*, 2004).

Cependant, dans la réglementation européenne (Directive 91/493/CEE, 1991), seule la teneur en histamine est limitée. La norme pour les poissons frais appartenant aux familles des Engraulidés, Clupéidés, Scombridés (couvrant les thonidés) et Coryphénidés, auxquelles s'ajoutent maintenant les espèces des familles Xiphiidés et Istiophoridés (espadon,

makaire...) et Pomatoïdés (DGAL, 2005), impose une teneur en histamine inférieure ou égale à 100 mg/kg en moyenne sur 9 échantillons, avec une tolérance comprise entre 100 et 200 mg/kg pour deux échantillons, et aucun échantillon ne doit contenir plus de 200 mg/kg (ces valeurs étant doublées dans le cas des anchois fermentés).

### 3.3.2. La tyramine



**Figure 11 : La tyramine**

La tyramine est une amine vasoactive qui intervient sur les neurones transmetteurs du système nerveux central (figure 11). Elle induit des crises d'hypertension en libérant de la norépinéphrine, un vasoconstricteur qui augmente la pression sanguine (Rice and Koehler, 1976 ; Santos, 1996). Les symptômes de la crise hypertensive se caractérisent par des gonflements cutanés si 10 à 80 mg de tyramine sont ingérés. Au delà de 100 mg, elle provoque des migraines. Des taux de 100-800 mg/kg de tyramine dans les aliments ont été considérés comme pouvant être toxiques pour certains consommateurs (ten Brink *et al.*, 1990 ; Halasz *et al.*, 1994). Par ailleurs, la tyramine fait partie des substances capables d'inhiber les enzymes de détoxification de l'organisme tout en potentialisant l'effet de l'histamine (Stratton *et al.*, 1991 ; Santos, 1996).

Concernant les personnes reconnues sensibles aux amines biogènes (sous traitement à base d'inhibiteurs de MAO), des teneurs toxiques en tyramine ont pu être établies : par exemple, la consommation de seulement 6 mg de tyramine peut induire une légère crise tandis que 10 à 25 mg peut provoquer chez ces personnes de sévères maux de tête avec une possible hémorragie intracrânienne. La consommation d'aliments fermentés (surtout les fromages), ou non fermentés mais pouvant contenir des microorganismes producteurs d'amines biogènes, leur est souvent interdite afin de ne pas dépasser un risque d'absorption de tyramine supérieur à 5 mg/100 g (McCabe, 1986).

Enfin, bien que la toxicité de la tyramine soit connue, aucun épisode d'intoxication alimentaire dû à la tyramine n'a été déclaré. Contrairement à l'histamine, aucune norme à ce jour n'a été établie concernant la tyramine dans les produits de la mer, ni pour les autres amines biogènes.

### **3.4. Utilisation des amines biogènes comme indicateurs d'altération**

En parallèle des préoccupations sanitaires, l'intérêt du dosage des amines biogènes est de mettre en évidence la présence de contaminants microbiens dans les aliments, les amines biogènes pouvant être utilisées comme des indicateurs de la qualité organoleptique des produits alimentaires et en particulier des produits de la mer (Halasz *et al.*, 1994 ; Veciana-Nogués *et al.*, 1997 ; Jorgensen *et al.*, 2000a). En effet l'histamine et la tyramine ne sont produites à partir des acides aminés libres précurseurs que par le système enzymatique des microorganismes présents alors que la putrescine et la cadavérine sont produites à la fois par les enzymes endogènes de l'aliment (viande, poisson...) et celles des microorganismes. Les amines biogènes n'ont pas d'odeur, mais sont indicatrices de la présence de bactéries altérantes qui produisent d'autres métabolites comme l'H<sub>2</sub>S, la TMA, l'ammoniac... Certaines études proposent des modèles mathématiques permettant de corréliser la qualité du produit au dosage des amines biogènes. Ainsi deux modèles appliqués au poisson (thon) associent l'altération aux concentrations de quatre à cinq amines biogènes (mg/kg) :

$$\text{Indice d'altération (thon en boîte)} = \frac{\text{histamine} + \text{cadavérine} + \text{putrescine}}{(1 + \text{spermine} + \text{spermidine})}$$

(Mietz et Karmas, 1977)

$$\text{Indice d'altération (thon frais)} = \text{Histamine} + \text{cadavérine} + \text{tyramine} + \text{putrescine}$$

(Veciana-Nogués *et al.*, 1997)

Un autre modèle relie l'altération sensorielle du saumon fumé au pH et aux concentrations de quatre amines biogènes, l'histamine, la tyramine, la cadavérine et la

putrescine (Jorgensen *et al.*, 2000a). Ce modèle (Multiple Compound Quality Index ou MCQI) est le suivant :

$$\text{MCQI} = 200 - (31 \times \text{pH}) + (0,06 \times \text{Tyramine}) + (0,06 \times \text{Cadavérine}) \\ + (0,04 \times \text{Putrescine}) + (0,15 \times \text{Histamine})$$

Ce modèle mathématique permet de décrire plus précisément le niveau d'altération du produit à un moment donné puisqu'il tient compte aussi du pH. Cependant, chaque modèle semble n'être applicable qu'à un seul type de produit, la matière première, les flores microbiennes et les procédés de transformation étant différents et les mécanismes d'altération très complexes.

### **3.5. Production microbienne d'amines biogènes**

#### *3.5.1. Les bactéries productrices d'amines biogènes*

Toutes les bactéries possédant une activité décarboxylase sont susceptibles de produire des amines biogènes dans un aliment où les conditions physico-chimiques sont favorables. Comme nous l'avons vu précédemment, les amines biogènes sont fréquemment retrouvées dans les produits alimentaires fermentés ainsi que dans les produits alimentaires non fermentés tels que les produits de la mer (tableau 5).

Les bactéries rencontrées sur ces produits sont capables de produire une ou plusieurs amines biogènes (ten Brink *et al.*, 1990 ; Santos, 1996) : *Carnobacterium* (*divergens*, *piscicola*, *gallinarum*...), *Lactobacillus* (*brevis*, *curvatus*, *sakei*, *plantarum*...), des espèces d'*Enterococcus*, de *Pediococcus*, de *Staphylococcus*, de *Pseudomonas*, de *Photobacterium*, des entérobactéries (*Escherichia coli*, *Salmonella*...). Plusieurs études ont essayé d'identifier précisément les flores produisant les différentes amines biogènes (tableaux 6 et 7).

Parmi les bactéries à Gram négatif (tableau 6), les entérobactéries possèdent des activités tyrosine et histidine décarboxylase et sont reconnues comme étant impliquées dans la production d'histamine dans les poissons (Lopez-Sabater *et al.*, 1994 ; Gingerich *et al.*, 1999),

la viande (Durlu-Özkaya, 2001 ; Suzzi and Gardini, 2003) et le fromage (Marino *et al.*, 2000). *Photobacterium phosphoreum* et *Morganella morganii* sont néanmoins les principales bactéries à Gram négatif productrices d’histamine et de tyramine dans les produits de la mer conservés sous vide ou sous atmosphère modifiée.

**Tableau 6 : Bactéries à Gram négatif productrices d’amines biogènes dans les aliments**

BACTERIES A GRAM NEGATIF	AMINES BIOGENES	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES
<b>Entérobactéries</b> <i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella oxytoca</i> <i>Salmonella spp.</i> , <i>Hafnia alvei</i> <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>aerogenes</i> <i>Serratia liquefaciens</i> , <i>marcescens</i> <i>Morganella morganii</i>	cadavérine, putrescine, <u>histamine</u> , tyramine	Produits carnés fermentés (Suzzi and Gardini, 2003) Saumon fumé (Jorgensen <i>et al.</i> , 2000b) Poisson frais (Lopez-Sabater <i>et al.</i> , 1996 ; Gingerich <i>et al.</i> , 1999 ; Kim <i>et al.</i> , 2000) Fromages (Marino <i>et al.</i> , 2000)
<b><u>Photobacterium phosphoreum</u></b>	cadavérine, putrescine, <u>histamine</u> , tyramine, agmatine	Saumon frais (Emborg <i>et al.</i> , 2002) Saumon fumé (Jorgensen <i>et al.</i> , 2000b) Fromage (Kanki <i>et al.</i> , 2004)
<b><i>Pseudomonas spp.</i></b>	cadavérine, putrescine	Viande de volaille (Geornaras <i>et al.</i> , 1995)
<b><i>Shewanella putrefaciens</i></b>	putrescine	Crevettes (Benner <i>et al.</i> , 2004)

Parmi les bactéries à Gram positif (tableau 7), les bactéries lactiques comme *Leuconostoc mesenteroides* (Moreno-Arribas *et al.*, 2003) et *Lactobacillus brevis* et *hilgardii* dans le vin (Moreno-Arribas *et al.*, 2000 ; Lonvaud-Funel, 2001) sont essentiellement productrices de tyramine. Le genre *Carnobacterium* comporte également des producteurs de tyramine : ils ont été identifiés dans la viande (Masson *et al.*, 1996), dans le saumon frais emballé sous atmosphère modifiée où *Carnobacterium piscicola* produit jusqu’à 40 mg/kg de tyramine (Emborg *et al.*, 2002), et dans le saumon fumé aux côtés de *Lactobacillus curvatus* (Jorgensen *et al.*, 2000b).

Les bactéries à Gram positif productrices d’histamine sont plus rares. En effet, une souche de *Oenococcus oeni* a été identifiée comme productrice d’histamine dans le vin, bien que cette espèce ne soit pas souvent incriminée dans la production d’amines biogènes (Coton *et al.*, 1998 ; Lonvaud-Funel, 2001). Enfin, une souche de *Lactobacillus buchneri* productrice d’histamine a été identifiée comme responsable d’une intoxication alimentaire après consommation de fromage suisse (Stratton *et al.*, 1991 ; Sumner *et al.*, 1985).



**Tableau 7 : Bactéries à Gram positif productrices d'amines biogènes dans les aliments**

BACTERIES A GRAM POSITIF	AMINES BIOGENES	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES
<b>Bactéries Lactiques</b> <i>Lactobacillus curvatus, farciminis</i> <i>Lactobacillus brevis, sakei</i> <i>Enterococcus faecalis</i> <i>Enterococcus faecium</i>	tyramine	Produits carnés fermentés (Suzzi and Gardini, 2003)
<i>Carnobacterium divergens</i> <i>Carnobacterium piscicola</i> <i>Lactobacillus curvatus</i>	tyramine	Produits carnés fermentés (Ansorena <i>et al.</i> , 2002)  Saumon frais (Emborg <i>et al.</i> , 2002) Saumon fumé (Jorgensen <i>et al.</i> , 2000b ; Connil <i>et al.</i> , 2002c)
<i>Lactobacillus brevis</i> <i>Lactobacillus hilgardii</i> <i>Oenococcus oeni</i>	tyramine, putrescine	Vin (Arena and Manca de Nadra, 2001 ; Moreno-Arribas <i>et al.</i> , 2000)
<i>Lactobacillus buchneri</i>	histamine	Vin (Lonvaud-Funel, 2001)
<i>Tetragenococcus muriaticus</i>	histamine	Fromages (Stratton <i>et al.</i> , 1991 ; Joosten and Northolt, 1989 ; Sumner <i>et al.</i> , 1985)
<i>Staphylococcus xylosum</i>	histamine, tyramine, spermine, spermidine	Sauce de poisson (Kimura <i>et al.</i> , 2001)  Produits carnés fermentés (Martuscelli <i>et al.</i> , 2000)

Plusieurs études montrent également que la production d'une amine biogène n'est pas toujours liée à une espèce déterminée mais peut être souche-dépendante à l'intérieur de cette espèce (Geornaras *et al.*, 1995 ; Marino *et al.*, 2000 ; Bover-Cid *et al.*, 2001).

Certaines bactéries cultivées seules peuvent ne pas produire d'amines biogènes, cependant l'association d'entérobactéries comme *Serratia liquefaciens* et *Hafnia alvei* avec des bactéries lactiques (*Carnobacterium*, *Lactobacillus*) peut augmenter de 10 à 15 fois la production de putrescine (Jorgensen *et al.*, 2000b), mettant ainsi en évidence un métabolisme associatif de l'arginine entre espèces : l'arginine présente dans le poisson est désaminée par les bactéries lactiques en ornithine qui peut ensuite être décarboxylée en putrescine par les entérobactéries.

Lorsque certaines bactéries sont fréquemment identifiées comme de forts producteurs d'une amine biogène en particulier, elles peuvent être classées comme organisme d'altération spécifique (OAS) d'un produit alimentaire (Gram and Dalgaard, 2002) : *Photobacterium phosphoreum* a notamment été identifié comme OAS dans le saumon fumé (Jorgensen *et al.*, 2000b).

### 3.5.2. Les décarboxylases d'origine microbienne

Les amines biogènes ayant été largement étudiées dans la littérature, les décarboxylases ont ensuite été recherchées. Aujourd'hui il existe plusieurs séquences protéiques et nucléiques de décarboxylases identifiées chez diverses espèces bactériennes (tableau 8).

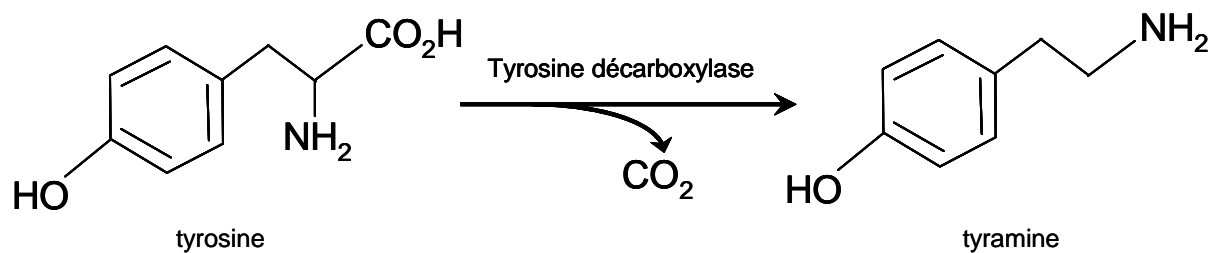
**Tableau 8 : Les décarboxylases identifiées chez les bactéries**

DECARBOXYLASES D'ORIGINE BACTERIENNE	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES
Histidine décarboxylase	<i>Oenococcus oeni</i> (Coton <i>et al.</i> , 1998) <i>Lactobacillus buchneri</i> , <i>Clostridium perfringens</i> (Recsei <i>et al.</i> , 1983)
Tyrosine décarboxylase	<i>Enterococcus faecalis</i> (1863 pb) (Borresen <i>et al.</i> , 1989 ; Connil <i>et al.</i> , 2002a) <i>Lactobacillus brevis</i> (1908 pb) (Moreno-Arribas and Lonvaud-Funel, 2001 ; Lucas <i>et al.</i> , 2003) <i>Carnobacterium divergens</i> (1875 pb) (Coton <i>et al.</i> , 2004) <i>Lactococcus lactis</i> (1872 pb) (Fernandez <i>et al.</i> , 2004)
Lysine décarboxylase Arginine décarboxylase Ornithine décarboxylase	<i>Escherichia coli</i> (Sabo <i>et al.</i> 1974 ; Boeker <i>et al.</i> , 1969 ; Tabor and Tabor, 1985)

Les facteurs influençant l'activité des décarboxylases sont variables (Santos, 1996) : les procédés de fabrication et les températures de stockage peuvent diminuer la croissance des bactéries susceptibles de contaminer le produit et donc de diminuer la synthèse et l'activité des décarboxylases. Des conditions d'anaérobiose et un pH acide induisent la synthèse des décarboxylases (défense contre l'acidité) tandis qu'une faible concentration en leur acide aminé libre précurseur a l'effet inverse (Halasz *et al.*, 1994). La production de composés organiques et les concentrations en sel et en glucose influencent également la synthèse des décarboxylases (Connil *et al.*, 2002b).

Contrairement aux autres décarboxylases, la plupart des travaux concernant la caractérisation de la TDC chez les bactéries lactiques sont récents, raison pour laquelle ces travaux seront développés dans la suite de cette étude.

**La tyrosine décarboxylase (TDC)** permet de décarboxyler la tyrosine pour produire de la tyramine et du  $\text{CO}_2$  (figure 12). Cette enzyme est biodégradable c'est-à-dire que sa synthèse est induite par les conditions environnementales. Cette enzyme a d'abord été identifiée dans le persil : sa séquence protéique présentait des similitudes avec la tryptophane décarboxylase de la pervenche et la dopa décarboxylase de *Drosophila melanogaster*, et son expression chez *Escherichia coli* a montré une forte spécificité de l'enzyme pour la tyrosine (Kawalleck *et al.*, 1993).



**Figure 12 : Réaction de décarboxylation de la tyrosine en tyramine**

**Les caractéristiques biochimiques** de la TDC ont été étudiées chez quelques microorganismes. Les premières études ont été menées chez *Enterococcus faecalis* : l'enzyme serait un dimère composé de sous-unités de 74500 et 76000 Da (Borresen *et al.*, 1989). Le phosphate de pyridoxal (PLP) en excès est un coenzyme nécessaire à son activité. Les conditions optimales nécessaires à l'activité de la TDC sont une température de  $37^\circ\text{C}$  et un pH de 5,5 (Orlacchio and Borri-Voltattorni, 1979). Les paramètres cinétiques de la TDC purifiée d'*Enterococcus faecalis* ont été évalués par une méthode spectrophotométrique : le  $K_m$  était de 0,35 mM et l'activité spécifique était de  $1,3 \mu\text{mol tyramine}/\text{min}/\mu\text{g}$  enzyme (Phan *et al.*, 1983).

La TDC de *Lactobacillus brevis* IOEB 9809 isolé du vin (Moreno-Arribas and Lonvaud-Funel, 2001) a été purifiée et caractérisée plus récemment : son activité était optimale à pH 5,0 (90% de l'activité maximale est conservée à pH 6,0) et la cinétique obtenue par une méthode de dosage du  $\text{CO}_2$  permettait de calculer les constantes biochimiques selon la théorie de Michaelis-Menten. La valeur du  $K_m$  était de 0,63 mM et celle de l'activité spécifique était de  $0,998 \mu\text{mol}/\text{min}/\mu\text{g}$  de protéine après purification. Cette enzyme diffère

légèrement de celle d'*Enterococcus faecalis* (Borresen *et al.*, 1989) car bien qu'il s'agisse d'un dimère, la TDC de *Lactobacillus brevis* est composée de deux sous-unités identiques d'environ 70000 Da. La TDC est très spécifique de son substrat car en présence de L-DOPA ou d'autres acides aminés (histidine, lysine, phénylalanine, tryptophane, ornithine), aucun de ces composés n'est décarboxylé en amine (Moreno-Arribas and Lonvaud-Funel, 2001).

Il existe plusieurs **méthodes** pour mesurer l'**activité enzymatique** des décarboxylases chez les microorganismes. Le CO<sub>2</sub> libéré lors de la réaction de décarboxylation peut-être mesuré par une électrode à CO<sub>2</sub> (Moreno-Arribas and Lonvaud-Funel, 1999 ; Moreno-Arribas and Lonvaud-Funel, 2001). La tyramine peut-être dosée par chromatographie liquide haute performance (HPLC) : cette méthode est la plus utilisée dans la littérature et comprend une étape de dansylation des amines suivie de leur séparation par chromatographie sur colonne en polarité de phase inversée (Eerola *et al.*, 1993). Une autre méthode de dosage de la tyramine utilisant la spectrophotométrie repose sur le principe que la tyramine (et non la tyrosine) réagit avec l'acide 2,4,6-trinitrobenzènesulfonique pour former un complexe soluble dans le toluène et capable d'absorber à 340 nm (Phan *et al.*, 1983).

Concernant **les caractéristiques génétiques**, les gènes de structure de la TDC d'*Enterococcus faecalis* JH2-2, de *Lactobacillus brevis* IOEB 9809, et plus récemment de *Carnobacterium divergens* 508 et *Lactococcus lactis* IPLA 655 ont été séquencées (Connil *et al.*, 2002a ; Lucas *et al.*, 2003 ; Coton *et al.*, 2004 ; Fernandez *et al.*, 2004). L'alignement protéique des séquences des TDC connues est présenté sur la figure 13.

Cdiv508	-----MESLSNELNLNLF IGDKAENGQLYKDLLNDLVDEHLGWRQNYMPQDM
LlactisIPLA655	-----MESLSNDLNLNALLSGTKLRTAKSIKLVN-RFRGRPLGWRQNYMPQDM
EfaecJH2-2	-----MKNEKLAKGEMNLNLF IGDKAENGQLYKDLLIDLVDLVEHLGWRQNYMPQDM
LbrevisIOEB9809	MLNLQEVSDMEKSNRSLKDLDLNLF IGDKAENGQLYKDLLNKLVDLVEHLGWRKNIYIPSDP
Cdiv508	PVITPEEQISASFEHTVNKTKDVLSEISARMRTHSVPWHTAGRYWGHMNSSETLMPSELLAY
LlactisIPLA655	PIITPEEKSSASFEHTVNRTKDVLSAISARMRTHSVPWHNAGRYWGHMNSSETLMPSELLAY
EfaecJH2-2	PVISSQERTSESYEKTVMHMKDVLNEISSRMRTHSVPWHTAGRYWGHMNSSETLMPSELLAY
LbrevisIOEB9809	NMIGPEDQNSPAFKKTVGHMKTVDLQQLSERIRTESVPWHSAGRYWGHMNSSETLMPALLAY
Cdiv508	NFAMLWNGNNVAYESSPATSQMEEVGLFVAKLMGYKDGWGHIVADGSLANLEGLWYARN
LlactisIPLA655	NFAMLWNGNNVAYESSPATSQMEEVGLFVAKLMSYKDGWGHIVADGSLANLEGLWYARN
EfaecJH2-2	NFAMLWNGNNVAYESSPATSQMEEVGLFVAKLMSYKNGWGHIVADGSLANLEGLWYARN
LbrevisIOEB9809	NYAMLWNGNNVAYESSPATSQMEEVGLFVAKLMSYKNGWGHIVADGSLANLEGLWYARN
Cdiv508	IKSLPLAMKEVAPELVSGKSDWELMNMSTKEIMDLLDSVPEKIDDIKAHSARSGKHLQQL
LlactisIPLA655	IKSLPLAMQEVTPPELVAGKSDWELMNMSTKEIMDLLDSVPEKIDDIKAHSARSGKHLQQL
EfaecJH2-2	IKSLPFAMKEVKPELVAGKSDWELMNMSTKEIMDLLESAEDEIDEIKAHARSARSGKHLQAI
LbrevisIOEB9809	IKSLPFAMKEVNPELVAGKSDWELMNMSTKEIMDLLENAGSQIDEVKKRSARSGKHLQRL
Cdiv508	GKWLVPQTKHYSWLKAADIIGIGLDQVIPVPVDHNYRMDINELEKIVRQLAAEKTPIILGV
LlactisIPLA655	GKWLVPQTKHYSWLKAADIIGVGLDQVIPVPVDHNYRMDINELEKIVRGLAAEKTPIILGV
EfaecJH2-2	GKWLVPQTKHYSWLKAADIIGIGLDQVIPVPVDHNYRMDINELEKIVRGLAAEQIPVLGV
LbrevisIOEB9809	GKWLVPQTKHYSWMLKAADIIGIGLDQVVPVPIDSNYRMDIQALESIRKYAAEKTPIILGV
Cdiv508	VGVGSTEEGAIDGIDKIVALRRVLEKDGIFYFLHVDAAAYGGYGRSIFLDEENNFIPIFEE
LlactisIPLA655	VGVGSTEEGAIDGIDKIVELRRVLEKDGIFYFLHVDAAAYGGYGRAIFLDEENNFIPIFEE
EfaecJH2-2	VGVGSTEEGAIVDSIDKIALRDELMDKDGIIYVHVDAAAYGGYGRAIFLDEENNFIPIFEE
LbrevisIOEB9809	VGVGSTEEGAIVDIDKIVALRQKLQKEGIFYFLHVDAAAYGGYARALFLDEDDQFIPYKN
	<b>motif HVDAAY</b>
Cdiv508	LKDVFHAKHHVFTENKNYILEDVHSFAKAIIEEAESVTIDPHKMGYVPPYSAGGIVIKDVRMR
LlactisIPLA655	LKDVFHAKHHVFTENKNYILEEVHSAYKAIIEEAESVTIDPHKMGYVPPYSAGGIVIKDVRMR
EfaecJH2-2	LQDVHEEYGVFKEKKEHISREVDYDAYKAIELAESVTIDPHKMGYVPPYSAGGIVIQDIRMR
LbrevisIOEB9809	LQKVHAENHVFTEDKEYIKPEVYAAKAFDQAESITIDPHKMGYVPPYSAGGIVIQDIRMR
	<b>Site d'attachement du PLP</b>
Cdiv508	DVISYFATYVFEKGADIPALLGAYILEGSKAGATAASVWAAHVLPLNVTGYGKLMGASI
LlactisIPLA655	DVISYFATYVFEKGADIPALLGAYILEGSKAGATAASVWAAHVLPLNVTGYGKLMGASI
EfaecJH2-2	DVISYFATYVFEKGADIPALLGAYILEGSKAGATAASVWAAHVLPLNVAGYGKLMGASI
LbrevisIOEB9809	DTISYFATYVFEKGADIPALLGAYILEGSKAGATAASVWAAHHTLPLNVTGYGKLMGASI
Cdiv508	EGAHRFYNFLQDLSFKVGDKEIEVHPLTYPDFNMVDYVFKKEGNDDLAMNKLNDVDYDY
LlactisIPLA655	EGAHRFYNFLNLSFKVGDKEIEVHPLTYPDFNMVDYVFKKEGNDDLAMNKLNDVDYDY
EfaecJH2-2	EGSHHFYNFLNDLTFKVGDKIEVHTLTHPDFNMVDYVFKKEGNDDLAMNKLNDVDYDY
LbrevisIOEB9809	EGAHRYYDFLKNLKFVAGKRISVHPLISPDFNMVDYVFKKEGNDDLIEMNRLNHAFYEQ
Cdiv508	SSYVKGSIYGNFSLTSHDFAIPDYGNSPLQFVNQLGFSDEEWNRAGKVTVLRASVMTPTY
LlactisIPLA655	SSYVKGSIYGNFSLTSHDFAIPDYGNSPLQFVNQLGFSDEEWNRAGKVTVLRASVMTPTY
EfaecJH2-2	ASYVKGNINNEFITSHDFAIPDYGNSPLKQFVNSLGFSDVEEWNRAGKVTVLRASVMTPTY
LbrevisIOEB9809	ASYVKGSLYKKEYIVSHDFAIPDYGNSPLAFQFVNSLGFSEVEWRHAGKVTIIRASVMTPTY
Cdiv508	MNKAENFEYAGKIKAAALQEKLEKIYANQLLASEEK
LlactisIPLA655	MNKEEHFEYAEKIKAAALQEKLEKIYADQLLASEEK
EfaecJH2-2	MNDKEEFVYAPKIQAAALQEKLEKIYDVK-----
LbrevisIOEB9809	MNQRENFDYFAPRIKKAIQADLEKQVYASVQKENV-

(Cdiv508 : *Carnobacterium divergens* 508 ; LlactisIPLA655 : *Lactococcus lactis* IPLA 655 ; EfaecJH2-2 : *Enterococcus faecalis* JH2-2 ; LbrevisIOEB9809 : *Lactobacillus brevis* IOEB 9809)

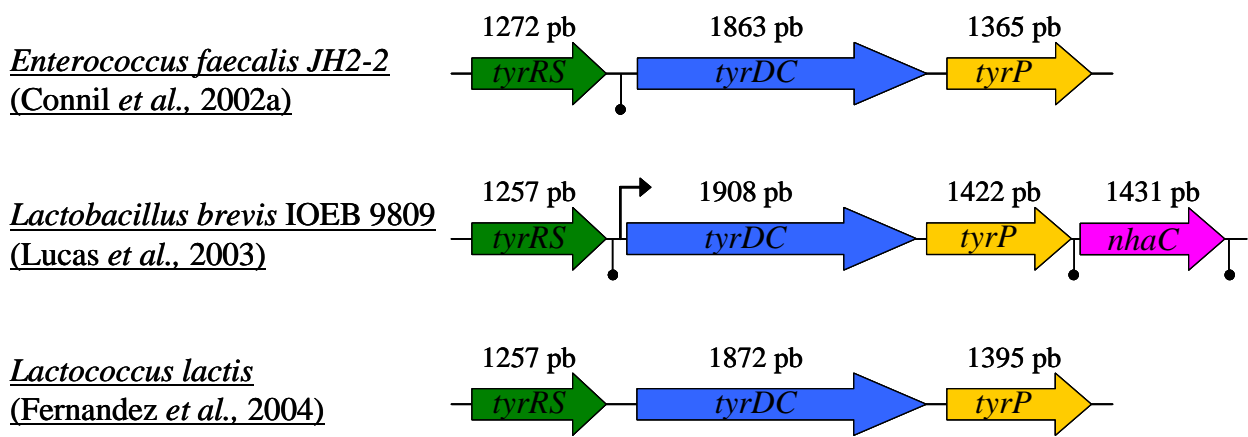
**Figure 13 : Alignement des séquences protéiques de la tyrosine décarboxylase de quatre bactéries lactiques**

Certaines de ces études récentes ont montré que le gène de structure de la TDC était situé à proximité d'autres gènes, et que les séquences intergéniques les séparant étaient courtes (maximum 300 pb). Ainsi, quatre gènes ont été identifiés (figure 14) : un gène codant pour une tyrosyl ARN<sub>t</sub> synthétase (*tyrRS*), le gène de structure de la TDC (*tyrDC*), un gène codant pour un transporteur d'acide aminé (*tyrP*) de type antiport tyrosine/tyramine et parfois un gène codant pour un antiport Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> (*nhaC*). Ils sont orientés dans le même sens. La taille du gène codant pour la TDC séquencé chez les quatre bactéries est de 1863 à 1908 pb (tableau 8). Les séquences protéiques TDC identifiées possèdent toutes une région conservée propre aux décarboxylases PLP dépendantes (motif VHVDAAY, figure 13). Il a été montré que le gène de structure de la TDC était associé en opéron avec le gène codant pour le transporteur d'acide aminé (Connil *et al.*, 2002a ; Lucas *et al.*, 2003).

Chez *Enterococcus faecalis* JH2-2, les trois gènes codant pour la tyrosyl ARN<sub>t</sub> synthétase, la TDC, et le transporteur d'acide aminé ont été mis en évidence. Les régions intergéniques sont composées de 200 à 300 pb et les trois gènes peuvent être co-transcrits, bien qu'il existe un terminateur Rho indépendant entre le gène de la tyrosyl ARN<sub>t</sub> synthétase et le gène de la TDC, dont l'action serait incomplète, supposant ainsi que les gènes codant pour la TDC et le transporteur d'acide aminé sont transcrits moins souvent (Connil *et al.*, 2002a).

Chez *Lactobacillus brevis* IOEB 9809, les trois gènes ont également été localisés. De plus, un gène codant pour un antiport Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> a été identifié en aval du transporteur d'acide aminé (figure 14). Les régions intergéniques sont composées de 209, 92, et 72 pb respectivement. Cette organisation autour de quatre gènes a aussi été retrouvée dans le génome de *Enterococcus faecium* (Lucas *et al.*, 2003). Ce gène codant pour l'antiport Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> serait également présent en aval du transporteur d'acide aminé d'*Enterococcus faecalis* V583 d'après la séquence complète du génome qui est disponible pour cette bactérie (Lucas *et al.*, 2003). Comme chez *Enterococcus faecalis* JH2-2, il existe chez *Lactobacillus brevis* un terminateur entre le gène de la tyrosyl ARN<sub>t</sub> synthétase et le gène de la TDC, mais aussi entre le gène du transporteur d'acide aminé et l'antiport Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>. Par contre, aucun terminateur n'a été mis en évidence entre les gènes de la TDC et du transporteur d'acide aminé chez *Enterococcus faecalis* JH2-2 et *Lactobacillus brevis*, montrant ainsi que ces deux gènes sont toujours co-transcrits. La présence d'un promoteur en amont du gène de structure de la TDC chez *Lactobacillus brevis* renforce cette hypothèse (Lucas *et al.*, 2003). Par ailleurs, l'analyse des transcrits montrent que les quatre gènes chez *Lactobacillus brevis* peuvent être co-transcrits. Cependant, des transcrits excluant la tyrosyl ARN<sub>t</sub> synthétase et/ou l'antiport

Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ont également été observés, montrant ainsi qu'il est difficile d'associer ces deux gènes à l'opéron TDC-transporteur. Les gènes codant pour la tyrosyl ARN<sub>t</sub> synthétase et l'antiport Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> peuvent aussi être retrouvés ailleurs au sein du génome, et ne sont donc pas toujours associés à cet opéron, leur fonction étant respectivement liée à la synthèse protéique générale et à l'équilibre du pH et des ions Na<sup>+</sup> dans la cellule bactérienne (Lucas *et al.*, 2003). De fait, il semblerait que les gènes codant pour la TDC et le transporteur d'acide aminé n'existent qu'en une seule copie dans le génome.



*tyrRS* : gène du tyrosyl ARN<sub>t</sub> synthétase ; *tyrDC* : gène de structure de la tyrosine décarboxylase ; *tyrP* : gène du transporteur d'acide aminé ; *nhaC* : gène de l'antiport Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>

⬇ : terminateur putatif ; ◻ : promoteur

**Figure 14 : Organisation génétique de l'opéron TDC chez *Enterococcus faecalis*, *Lactobacillus brevis* et *Lactococcus lactis***

Chez *Carnobacterium divergens* 508, une séquence partielle du gène codant pour la tyrosyl ARN<sub>t</sub> synthétase, le gène complet de la TDC, ainsi qu'une séquence partielle du gène codant pour le transporteur d'acide aminé ont également été localisés (Coton *et al.*, 2004).

Chez *Lactococcus lactis* IPLA 655, les gènes codant pour la tyrosyl ARN<sub>t</sub> synthétase, la TDC, et le transporteur d'acide aminé (figure 14) ont aussi été identifiés (Fernandez *et al.*, 2004). Les séquences intergéniques sont composées de 200 à 300 pb comme chez *Enterococcus faecalis*.

Enfin, les séquences disponibles de ces gènes montrent toutes une organisation similaire. Seule la taille des gènes et des régions intergéniques varie ainsi que la présence éventuelle du gène codant pour l'antiport  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ , qui peut aussi ne pas avoir été séquencé lors de la recherche des gènes codant pour la TDC chez les bactéries étudiées.

### 3.5.3. Catabolisme des amines biogènes par les microorganismes

Certains microorganismes sont capables de dégrader les amines biogènes, car ils possèdent une autre enzyme appelée amine oxydase. Les amines oxydases catalysent la désamination oxydative des amines primaires en produisant des aldéhydes, du peroxyde d'hydrogène et de l'ammoniaque. *Brevibacterium linens* qui intervient dans la maturation de certains fromages (Munster) possède une activité histamine et tyramine oxydase permettant de réduire la concentration en histamine et en tyramine de 55 à 70% en 4 semaines de maturation (Leuschner and Hammes, 1998). Une seconde étude a permis de montrer que sur 64 bactéries lactiques testées, 27 dégradait l'histamine et une seule la tyramine, avec une faible activité (Leuschner *et al.*, 1998). De plus, parmi 32 souches de *Brevibacterium linens* et de bactéries corynéformes, 21 souches dégradait l'histamine et la tyramine. De même, sur 44 souches de *Micrococcus* spp. testées, 17 d'entre elles étaient capables de dégrader une ou deux amines biogènes : une de ces souches, *Micrococcus varians*, possédait la plus forte activité tyramine oxydase (1,7 mM de tyramine par heure) parmi toutes les bactéries testées au cours de l'étude (Leuschner *et al.*, 1998). L'enzyme a été localisée à l'intérieur du cytoplasme de la cellule bactérienne. Dapkevicius *et al.* (2000) se sont également intéressés à la dégradation des amines biogènes dans des produits fermentés à base de poisson : parmi 77 bactéries lactiques, 48 souches ont été testées vis-à-vis de la dégradation de l'histamine et 5 souches ont montré une activité histamine oxydase. Enfin, une autre étude a montré que sur 51 souches de *Staphylococcus xylosus* isolées de saucissons italiens, 26 d'entre elles ne produisaient pas d'amine biogène, et parmi celles-ci, 21 souches étaient capables de dégrader l'histamine et/ou la tyramine (Martuscelli *et al.*, 2000).

Le choix des souches utilisées comme ferment est donc important et il ne faut pas négliger le fait que certaines d'entre elles sont capables de produire des amines biogènes et ainsi d'augmenter leur concentration dans le produit fini. Le choix de souches non productrices d'amines ou bien capables de dégrader les amines biogènes est à privilégier. Notamment, l'utilisation d'un ferment non producteur d'amine (*Lactobacillus sakei*) a permis



de mettre en évidence une diminution des concentrations en tyramine et autres amines pendant la maturation de saucisson (Bover-Cid *et al.*, 2000a), et l'utilisation d'un mélange de ferments (*Lactobacillus sakei* et *Staphylococcus* spp.) a permis de diminuer considérablement les concentrations en tyramine, cadavérine et putrescine pendant la fabrication de saucisson (Bover-Cid *et al.*, 2000b). Enfin, une autre étude utilisant des ferments producteurs de bactériocine (dont *Lactococcus lactis* producteur de nisine) ont permis d'éliminer la production d'histamine en inhibant *Lactobacillus buchneri* dans le fromage (Joosten and Nunez, 1996).

L'utilisation de bactéries lactiques non productrices d'amines biogènes et/ou ayant une activité oxydase, ou encore de ferments capables d'inhiber la croissance des producteurs d'amines dans le produit, sont des stratégies qui peuvent être envisagées pour la biopréservation des aliments pour réduire ou éliminer les amines biogènes.

## **4. LA BIOPRESERVATION DES PRODUITS DE LA MER PAR LES BACTERIES LACTIQUES**

La biopréservation consiste à inoculer un aliment par un microorganisme sélectionné pour ses capacités à inhiber la croissance de microorganismes indésirables sans modifier la qualité du produit.

### **4.1. Propriétés inhibitrices des bactéries lactiques**

La conservation des aliments peut être assurée artificiellement par l'ajout d'inhibiteurs tels que le sel, la fumée, les composés chimiques (nitrate, nitrite...) mais aussi par la présence de bactéries lactiques. Elles ont en effet des propriétés inhibitrices intéressantes liées à différents mécanismes comme la compétition nutritionnelle et la production de métabolites qu'elles produisent naturellement lors de la fermentation par exemple. Une étude a mis en évidence chez une même espèce ces deux mécanismes d'inhibition de *Listeria monocytogenes* dans le saumon fumé : une souche de *Carnobacterium piscicola* inhibait la bactérie pathogène par compétition nutritionnelle, et une autre souche de *Carnobacterium piscicola* produisait une bactériocine active contre *Listeria monocytogenes* (Nilsson *et al.*, 1999). Parmi les

métabolites produits par les bactéries lactiques, figurent les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène, le dioxyde de carbone, le diacétyle...ainsi que les bactériocines. Notons que les bactéries lactiques sont reconnues comme GRAS (Generally Recognized As Safe) et sont souvent associées à l'image de produits naturels et sains comme les produits laitiers.

#### 4.1.1. Les métabolites (acides, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>...)

Les acides organiques sont produits par les bactéries lactiques lors du processus de fermentation et permettent d'inhiber la croissance des levures et d'autres bactéries qui ne peuvent se développer à pH acide. L'effet inhibiteur de ces acides organiques est principalement provoqué par les molécules non dissociées qui diffusent à travers les couches lipidiques des membranes des microorganismes provoquant ainsi un abaissement du pH dans le cytoplasme qui a pour conséquence la déstabilisation des cellules. Ouattara *et al.* (Ouattara *et al.*, 1997) ont testé l'inhibition de *Brochothrix thermosphacta*, *Carnobacterium piscicola*, *Lactobacillus curvatus* et *sakei*, *Pseudomonas fluorescens* et *Serratia liquefaciens* par les acides, acétique, lactique, citrique, propionique, benzoïque et sorbique en milieu de culture. Les quatre premiers acides, les plus solubles, ont montré une inhibition efficace de la croissance à des concentrations comprises entre 0,1 et 1% (p/v). Dans cette étude, *Brochothrix thermosphacta* et *Carnobacterium piscicola* étaient les bactéries les plus sensibles aux acides.

Le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), produit en présence d'oxygène, a tendance à s'accumuler en raison de l'absence de catalase chez les bactéries lactiques. Les enzymes impliquées dans cette production peuvent être la NADH oxydase, l' $\alpha$ -glycérophosphatase, la pyruvate oxydase, et la superoxyde dismutase. Le peroxyde d'hydrogène a un potentiel oxydatif capable d'inhiber certains microorganismes en altérant les acides nucléiques et en oxydant les lipides.

Le dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>) produit par les bactéries lactiques lors de la fermentation hétérolactique, crée une atmosphère anaérobie qui est toxique pour les bactéries aérobies strictes qui ont besoin d'oxygène comme seul accepteur final d'électron lors de la respiration.

Le diacétyle est issu du métabolisme du citrate et est produit principalement par les bactéries lactiques des genres *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Pediococcus* et *Lactobacillus*. Ce

composé possède à la fois des propriétés antimicrobiennes et des propriétés aromatiques qui sont intéressantes dans le domaine des produits laitiers. L'acidification qui a lieu lors de la production de yaourt par exemple, augmente l'action du diacétyl qui tend alors à inhiber préférentiellement les bactéries à Gram négatif ainsi que les levures, mais son effet reste limité, car le diacétyl présent dans les produits fermentés n'est généralement pas en quantité suffisante pour contribuer efficacement à une activité antimicrobienne.

D'autres métabolites peuvent avoir un effet inhibiteur, tels que la reutéline et la reutélicine produites par *Lactobacillus reuteri* (Ross *et al.*, 2002), cette dernière étant un antibiotique. La reutéline est produite lors de la phase stationnaire en anaérobiose en présence d'un mélange de glucose et de glycérol (ou de glycéraldéhyde) et permet d'inhiber les champignons, certains protozoaires et aussi une large proportion de bactéries à Gram négatif et positif. La reutélicine, seul antibiotique produit par une bactérie lactique, est un type d'acide tétramique. Son spectre d'inhibition est large et comprend notamment de nombreuses bactéries à Gram positif pathogènes (*Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*...) mais aussi *Escherichia coli* et *Salmonella* spp. dans certaines conditions. De fait, son mode d'action ressemblerait à celui de la nisine (Ross *et al.*, 2002).

Tous ces métabolites compétitifs produits par les bactéries lactiques contribuent à limiter le développement microbien. Ils ont cependant un large spectre d'action et peuvent de ce fait aussi inhiber des bactéries d'intérêt dans les produits alimentaires (bactéries probiotiques par exemple). D'autres métabolites, appelés bactériocines, ont un spectre d'action plus limité et peuvent ainsi mieux cibler les bactéries indésirables dans le cadre d'une stratégie de biopréservation des aliments.

#### 4.1.2. Les bactériocines

Les bactériocines sont de petits peptides produits par des bactéries et qui inhibent la croissance d'autres bactéries (action bactériostatique ou bactéricide). On les distingue des antibiotiques, qui sont des métabolites secondaires, car les bactériocines sont synthétisées par les ribosomes sous forme d'un précurseur qui subit ensuite une maturation au cours de son transport vers le milieu extracellulaire. Les autres bactéries peuvent posséder des gènes de résistance vis-à-vis de certaines bactériocines. La plupart des bactériocines agissent en

formant des pores dans les membranes des cellules cibles (Abee, 1995). Klaenhammer (Klaenhammer, 1993) a classé les bactériocines en 4 groupes, puis selon l'évolution des connaissances, Cleveland *et al.* (Cleveland *et al.*, 2001) les ont classées en trois groupes selon leur structure :

- le groupe I : ce sont les lantibiotiques, petits peptides inférieurs à 5 kDa et contenant des acides aminés modifiés tels que la lanthionine et la  $\beta$ -méthyl-lanthionine. La nisine A est la mieux connue des bactériocines du groupe I et est produite par *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*.

- Le groupe II : la classe IIa est constituée de petits peptides thermostables (<10 kDa) à activité anti-*Listeria* (Ennahar *et al.*, 1999) synthétisés sous forme de précurseur. La partie N-terminale présente une séquence consensus YGNGV-C. Les bactéries lactiques sont les principaux producteurs des bactériocines de cette classe IIa (Ennahar *et al.*, 2000). Les bactériocines les plus connues appartenant à ce groupe sont la pédiocine PA-1, les sakacine A et P, la leucocine A, les carnobactériocines (dont la divercine V41), etc...

La classe IIb comporte des bactériocines à deux composantes, c'est-à-dire qu'il est nécessaire d'avoir deux peptides différents pour former un complexe capable de perforer la membrane de la cellule cible. On retrouve les lactococcines G et F, la lactacine F, les plantaricine EF et JK.

- le groupe III : il est constitué de gros peptides thermosensibles (>30 kDa), comme les helvécines J et V-1829, l'acidophilucine A, et les lactacines A et B.

Actuellement, la seule bactériocine autorisée en tant qu'additif alimentaire en Europe est la nisine (3353 Da, 34 acides aminés) produite par *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* (Directive 95/2/CE, 1995). L'application concerne essentiellement certains produits laitiers tels que les fromages fondus (code E234 dans la liste européenne des additifs). Dans le commerce, on la retrouve sous le nom de Nisaplin (nisine sur un support lait). La FAO accepte jusqu'à 12,5 mg de nisine par kg dans ce type de produit laitier (Ross *et al.*, 2002). Elle est utilisée dans 45 pays comme agent de biopréservation des produits laitiers et des conserves (légumes...).

Elle est capable d'inhiber un grand nombre de bactéries à gram positif dont *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* et *Clostridium botulinum*.

Néanmoins, l'apparition de résistants spontanés à la nisine parmi les bactéries pathogènes a souvent été décrite (Szabo and Cahill, 1998 ; Gänzle *et al.*, 1999 ; Rasch and Knochel, 1998 ; Gravesen *et al.*, 2002). L'utilisation de bactériocines de classe IIa ou de bactéries lactiques productrices de ces bactériocines en association éventuelle avec la nisine est une alternative (Schillinger *et al.*, 1998 ; Schillinger *et al.*, 2001). Cependant selon la réglementation en vigueur dans un pays et le type de produit à biopréserver, l'utilisation de la nisine, ou d'autres conservateurs (sorbate de potassium, Avery and Buncic, 1997 ; lactate de sodium, Nykanen *et al.*, 2000, lactate de potassium associé au diacétate de sodium (Yoon *et al.*, 2004) peut être interdite. D'autres paramètres technologiques peuvent aussi être combinés à l'action listéricide d'une bactériocine, comme par exemple un emballage sous atmosphère contrôlée en CO<sub>2</sub> associé à un stockage à 5°C (application au saumon fumé additionné de nisine à 1000 UI/g, Nilsson *et al.*, 1997 ; Nilsson *et al.*, 2000), ou bien une diminution du pH associée à une augmentation de la concentration en sel (Thomas and Wimpenny, 1996). L'effet combiné de plusieurs paramètres permet aussi de limiter l'apparition de souches résistantes aux bactériocines.

Dans le saumon fumé, l'utilisation d'additifs étant interdite, la biopréservation par l'ajout de bactéries protectrices semble être une voie plus prometteuse. Certaines bactéries lactiques ont plus d'aptitude que d'autres à se développer dans les viandes et les poissons réfrigérés (genres *Lactobacillus*, *Leuconostoc*...), ce qui est un critère important pour les utiliser en biopréservation. Dans les produits de la mer, le genre *Carnobacterium* semble être le plus adapté pour inhiber les bactéries indésirables.

## **4.2. Utilisation de *Carnobacterium* pour la biopréservation des produits de la mer**

### **4.2.1. Les Carnobacteria**

Le genre *Carnobacterium* a été créé par Collins *et al.* (1987) afin de regrouper des lactobacilles atypiques isolés de différents produits alimentaires carnés. Le genre *Carnobacterium* présente des cellules en forme de bâtonnets assez courts, isolés ou en paire, parfois en courtes chaînes, mobiles ou non. Ces bactéries sont catalase, oxydase et nitrate

réductase négatives. La température optimale de croissance des *Carnobacterium* varie de 23 à 30°C, elles peuvent se multiplier à des températures proches de 0°C et sont inhibées à partir de 45°C. Ce sont donc des bactéries psychrotrophes. Seule l'espèce *Carnobacterium divergens* arrive à se développer à 40°C. Leur pH optimum de croissance varie selon les espèces de 6,0 à 7,4. Leur comportement vis-à-vis de l'oxygène est anaérobie aéro-tolérant. La plupart des espèces sont inhibées à partir de 7% de NaCl. En présence de sucre, leur métabolisme n'est que très faiblement hétérofermentaire, avec une large production d'acide lactique L(+) (avec un peu de D pour *Carnobacterium piscicola*). Contrairement aux *Lactobacillus*, les *Carnobacterium* sont peu acidifiants. Par ailleurs, trois caractères les distinguent de *Lactobacillus* : l'absence de croissance sur gélose à l'acétate (milieu Rogosa contenant 15 g/L acétate de sodium), la composition en acides gras de la membrane (acide oléique (C18:1  $\Delta$ 9,10) au lieu de l'acide cis-vaccénique (C18:1  $\Delta$ 11,12)) et la présence majoritaire de l'acide *méso*-diaminopimélique dans le peptidoglycane de la paroi des *Carnobacterium* (Collins *et al.*, 1987).

On retrouve ces bactéries essentiellement dans les produits carnés (Sakala *et al.*, 2002), dans les produits de la mer (Leroi *et al.*, 1998 ; Gonzalez-Rodriguez *et al.*, 2002 ; Paarup *et al.*, 2002 ; Ringo and Holzapfel, 2000 ; Dalgaard *et al.*, 2003) mais aussi dans les produits laitiers (Milliere *et al.*, 1994). Actuellement, les huit espèces constituant le genre *Carnobacterium* sont *C. piscicola*, *C. divergens*, *C. gallinarum*, *C. mobile*, *C. funditum*, *C. alterfunditum*, *C. inhibens* et *C. viridans*. Ces espèces étant difficiles à distinguer par les techniques classiques d'identification, des outils moléculaires spécifiques ont été mis au point dans notre laboratoire (Kabadjova *et al.*, 2002 ; Rachman *et al.*, 2004).

*Carnobacterium divergens* et *Carnobacterium piscicola* partagent des niches écologiques similaires telles que les poissons fumés, notamment la truite fumée (Lyhs *et al.*, 2002) et le saumon fumé (Gonzalez-Rodriguez *et al.*, 2002), les poissons frais (Baya *et al.*, 1991) et les viscères du poisson (Pilet *et al.*, 1995 ; Ringo *et al.*, 2000), la crevette (Dalgaard *et al.*, 2003) et la viande de bœuf et de poulet (Collins *et al.*, 1987) emballés sous vide ou sous atmosphère modifiée, et conservés à basse température. Ces deux espèces ont également été isolées du calamar emballé sous vide (Paarup *et al.*, 2002). *Carnobacterium gallinarum* et *Carnobacterium mobile* ont été isolés du poulet (Collins *et al.*, 1987). Etant donné que ces espèces sont rarement retrouvées, leur rôle dans les aliments n'est pas encore clairement établi. Deux nouvelles espèces de *Carnobacterium* (*Carnobacterium funditum* et

*Carnobacterium alterfunditum*) ont été isolées des eaux du lac Ace en Antarctique (Franzmann *et al.*, 1991). *Carnobacterium inhibens* a été isolé de l'intestin du saumon Atlantique (Joborn *et al.*, 1999). *Carnobacterium inhibens* a une capacité à inhiber la croissance de bactéries à Gram-négatif pathogènes du poisson, telles que *Vibrio anguillarum* et *Aeromonas salmonicida*. Comme *Carnobacterium mobile* et *Carnobacterium alterfunditum*, *Carnobacterium inhibens* est mobile. Par ailleurs, une nouvelle espèce de *Carnobacterium* dénommée *Carnobacterium viridans* a été décrite (Holley *et al.*, 2002) et provoquerait la décoloration de la saucisse de Bologne emballée sous vide dûe à la production de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> lors de l'ouverture de l'emballage. Enfin, une nouvelle espèce présumée de *Carnobacterium* sp. nov. a été identifiée chez la crevette car elle présentait un profil électrophorétique différent des autres espèces déjà décrites (Dalgaard *et al.*, 2003).

#### 4.2.2. Les bactériocines produites par le genre Carnobacterium

Les *Carnobacterium* produisent des bactériocines comme de nombreuses bactéries lactiques. Certaines de ces bactériocines ont été caractérisées et sont répertoriées dans le tableau 9.

Guyonnet *et al.* (Guyonnet *et al.*, 2000) a comparé l'activité de six bactériocines de la classe IIa, dont la divercine V41 : ses recherches ont montré que la divercine V41 possède une des plus fortes activités inhibitrices contre *Listeria spp.*

La divercine V41, produite par *Carnobacterium divergens* V41 a été étudiée du point de vue génétique (Métivier *et al.*, 1998) et physico-chimique (Bhugaloo-Vial *et al.*, 1999). Cette molécule fait partie de la classe IIa des bactériocines : c'est un peptide thermostable de 4509 Da composé de 43 acides aminés, avec un fort pourcentage de petits amino-acides tels que la glycine, et comportant 2 ponts disulfure. Elle possède dans la partie N-terminale la séquence conservée propre aux bactériocines appartenant à cette classe (motif YGNGV). Fortement cationique, elle possède un domaine hydrophobe (C-terminal) et une région hydrophile (N-terminale) qui serait en relation avec son activité sur les membranes des cellules cibles (Bhugaloo-Vial *et al.*, 1999). Trois gènes groupés en un seul opéron sont impliqués dans la production de la bactériocine : le gène div 1 (pas de fonction déterminée), le

gène de structure (dvn A) codant pour un pré-peptide de 66 acides aminés, et le gène div 2 codant probablement pour un transporteur de type ABC (Métivier *et al.*, 1998).

Le mode d'action de la divercine V41 n'a pas encore été établi : elle agit sur la membrane cytoplasmique des cellules cibles mais les interactions entre la divercine et la membrane ne sont pas encore connues. De même, le système de régulation de la production de divercine n'a pas encore été élucidé mais pour les autres bactériocines de la classe IIa, une régulation positive par un facteur inductif est nécessaire à la fois pour l'induction de la synthèse et pour le maintien de la production (Métivier *et al.*, 1998).

**Tableau 9 : Bactériocines produites par *Carnobacterium* isolés de produits alimentaires**

SOUCHE PRODUCTRICE	BACTERIOCINE	ORIGINE	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES
<i>Carnobacterium piscicola</i> CP5	carnocine CP5	fromage à pâte molle	Herbin <i>et al.</i> , 1997 Ross <i>et al.</i> , 2002
<i>Carnobacterium piscicola</i> UI49	carnocine UI49	poisson frais	Stoffels <i>et al.</i> , 1992
<i>Carnobacterium piscicola</i> 213	carnocine KZ213	viande	Khouiti and Simon, 1997 Khouiti and Simon, 2004
<i>Carnobacterium piscicola</i> A9b	carnobactériocine B2	Saumon fumé	Nilsson <i>et al.</i> , 2002
<i>Carnobacterium piscicola</i> LV17A	carnobactériocine A	viande sous vide	Worobo <i>et al.</i> , 1994
<i>Carnobacterium piscicola</i> LV17B	carnobactériocine BM1 carnobactériocine B2		Quadri <i>et al.</i> , 1994
<i>Carnobacterium piscicola</i> LV61	piscicoline LV61		Schillinger <i>et al.</i> , 1993 Holck <i>et al.</i> , 1994
<i>Carnobacterium piscicola</i> JG126	piscicoline 126	jambon altéré	Jack <i>et al.</i> , 1996 Ross <i>et al.</i> , 2002
<i>Carnobacterium piscicola</i> L103	BLIS*	viande sous vide	Schobitz <i>et al.</i> , 2003
<i>Carnobacterium piscicola</i> CS526	piscicocine CS526	surimi	Yamazaki <i>et al.</i> , 2003 Yamazaki <i>et al.</i> , 2005
<i>Carnobacterium piscicola</i> V1	piscicocines V1A et V1B (V1A=carnobactériocine BM1)	viscères de saumon	Bhugaloo-Vial <i>et al.</i> , 1996 Pilet <i>et al.</i> , 1995
<i>Carnobacterium divergens</i> V41	divercine V41		Métivier <i>et al.</i> , 1998 Pilet <i>et al.</i> , 1995
<i>Carnobacterium divergens</i> M35	divergicine M35	moule	Tahiri <i>et al.</i> , 2004
<i>Carnobacterium divergens</i> LV13	divergicine A	indéterminée	Worobo <i>et al.</i> , 1995
<i>Carnobacterium divergens</i> 750	divergicine 750	indéterminée	Holck <i>et al.</i> , 1996
<i>Carnobacterium</i> 377	carnocine H	indéterminée	Blom <i>et al.</i> , 2001

\* BLIS : bacteriocin-like inhibitory substance



#### 4.2.3. Utilisation de *Carnobacterium* comme agent de biopréservation

Rappelons que la flore du saumon fumé conditionné sous vide est largement dominée par les bactéries lactiques au bout de deux semaines de stockage à 8°C : on retrouve surtout *Carnobacterium piscicola* (97 souches sur 155 bactéries lactiques isolées) puis *Lactobacillus spp.* en fin de stockage (Leroi *et al.*, 1998). Par ailleurs puisque les *Carnobacterium* semblent présenter de très faibles activités d'altération sur le saumon fumé (Leroi *et al.*, 2001 ; Stohr *et al.*, 2001) et que plusieurs souches possèdent des activités inhibitrices marquées vis-à-vis des bactéries à gram positif dont *Listeria monocytogenes* (Ahn and Stiles, 1990a ; Ahn and Stiles, 1990b ; Pilet *et al.*, 1995 ; Duffes *et al.*, 1999b ; Yamazaki *et al.*, 2003), leur utilisation comme agents de biopréservation est envisageable. A titre indicatif, notons aussi qu'une autre application a été envisagée : une souche de *Carnobacterium sp.* a été utilisée comme souche probiotique chez le saumon de l'Atlantique (*Salmo salar*) et la truite (*Oncorhynchus mykiss*) afin de diminuer certaines maladies provoquées par des bactéries pathogènes du poisson (Robertson *et al.*, 2000).

Plusieurs auteurs ont proposé l'utilisation des *Carnobacterium* pour empêcher le développement des bactéries pathogènes dans la viande (McMullen and Stiles, 1996) et le saumon fumé (Duffes *et al.*, 1999a ; Nilsson *et al.*, 2004). Par exemple, sur saumon fumé, la croissance de *Listeria monocytogenes* était inhibée de 4 log (UFC/g) à partir de 14 jours de stockage à 5°C en présence d'une souche de *Carnobacterium piscicola* productrice de bactériocine, sans que les caractéristiques organoleptiques du produit ne soient modifiées par l'ajout de la souche de *Carnobacterium* (Nilsson *et al.*, 1999). De plus, les travaux de Duffes *et al.* (1999a) ont montré que les souches de *Carnobacterium divergens* V41 et *Carnobacterium piscicola* V1, isolées de saumon et de truite par Pilet *et al.* (1995), inhibaient la croissance d'une souche de *Listeria monocytogenes* lorsqu'elles étaient inoculées sur du saumon fumé avant conditionnement sous vide. Notamment, par rapport à un témoin de saumon inoculé avec *Listeria monocytogenes* seule, la croissance de la souche pathogène était inhibée de 5 log en présence de *Carnobacterium divergens* V41 au bout de 3 semaines de conservation à 8°C. De fait, *Carnobacterium divergens* V41 avait un effet bactériostatique pendant trois semaines de conservation à 4°C et à 8°C. D'autre part, les *Carnobacterium* n'altèrent pas les caractéristiques organoleptiques du saumon fumé et sont très peu acidifiants, contrairement aux *Lactobacillus*. Les *Carnobacterium* producteurs de bactériocines présentent donc un réel intérêt en biopréservation.

### **4.3. Réglementation concernant l'utilisation de bactéries productrices de bactériocine dans les aliments**

L'utilisation industrielle de bactériocines ou de souches productrices de ces substances se heurte à la démonstration de l'innocuité pour l'homme. En effet, afin de garantir la sécurité du consommateur, l'efficacité et l'innocuité de la souche doivent être démontrées. Les microorganismes entrant dans la chaîne alimentaire par l'intermédiaire de l'alimentation pour animaux sont régulés en Europe (Directive 93/113/EC, 1993). Il n'existe cependant pas de réglementation nationale ou communautaire concernant les microorganismes utilisés directement pour l'alimentation humaine (Wessels *et al.*, 2004). De fait, en France, l'AFSSA (2002) a émis un avis concernant les « recommandations pour la présentation des données permettant l'évaluation de l'innocuité des microorganismes utilisés dans le secteur agro-alimentaire (souches nouvelles ou modifiées, application différente de souches déjà utilisées) ». Les conclusions sont présentées sous la forme d'un arbre décisionnel (figure 15).

Cet avis est à ce jour le seul document sur lequel peuvent s'appuyer les industriels et les autorités gestionnaires du risque pour délivrer un agrément d'utilisation (la DGCCRF ou la DSV en France). Cette autorisation de commercialisation et d'utilisation d'une souche de bactérie lactique dans un procédé de biopréservation est en effet nécessaire pour des applications non traditionnelles de souches déjà utilisées, à l'exception des microorganismes qui n'ont pas été utilisés à un niveau significatif dans des préparations pour l'alimentation humaine dont l'utilisation est régie par le règlement 258/97/CE « nouveaux aliments et nouveaux ingrédients alimentaires ».

De plus, notons que dans le cadre de l'utilisation de souche bactérienne pour biopréserver les aliments, il sera nécessaire de prendre en compte l'ajout de ces microorganismes et de faire évoluer les critères microbiologiques de flore totale présentés dans le tableau 3 (Cf. chapitre 2 sur la microbiologie du saumon fumé).

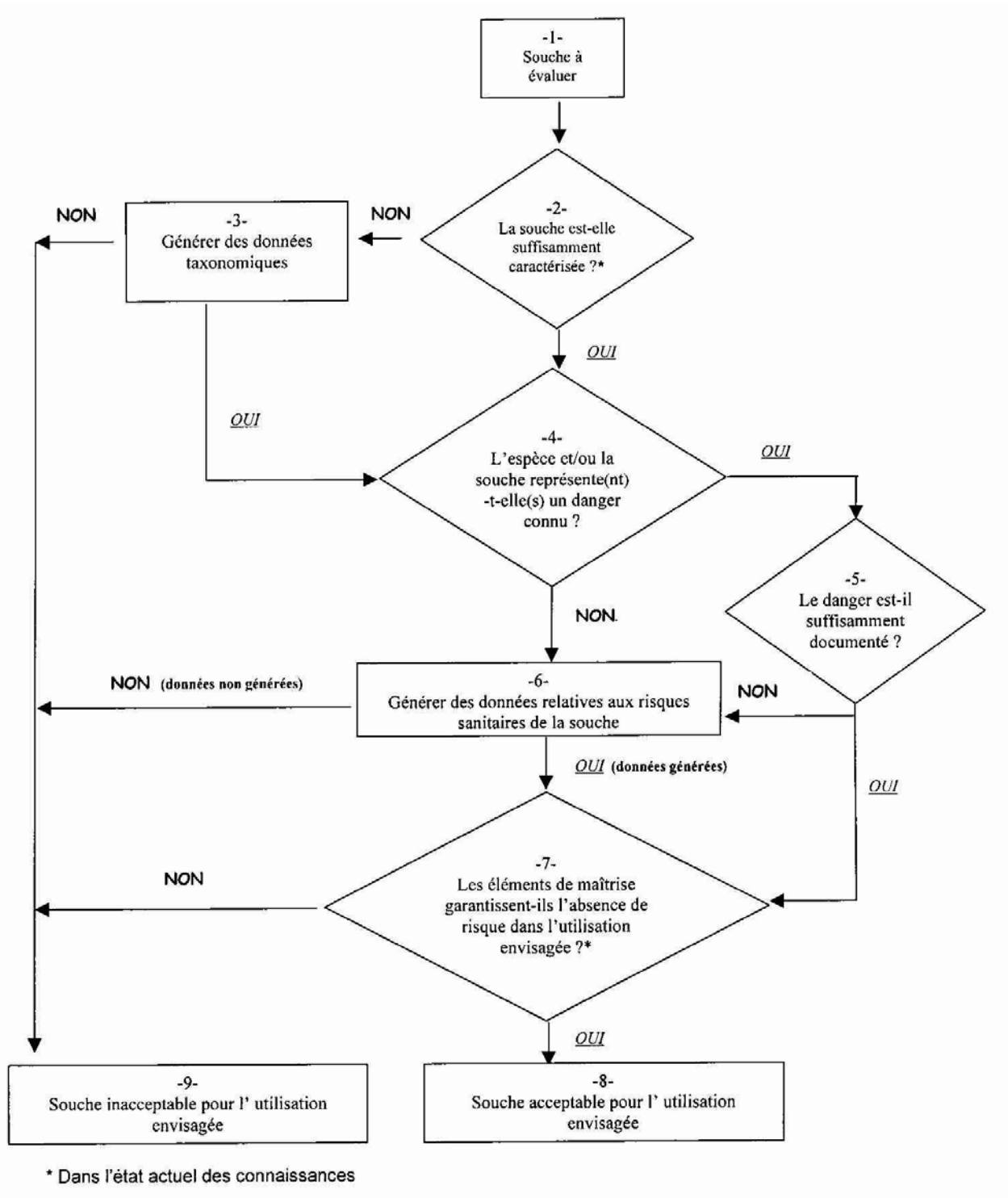


Figure 15 : Arbre décisionnel pour l'évaluation de l'innocuité d'une souche microbienne utilisée dans le secteur agro-alimentaire (AFSSA, 2002)

Actuellement, la commission européenne explore la possibilité d'introduire un système similaire au concept GRAS utilisé aux USA puisque aucune réglementation européenne ne définit les caractéristiques d'un microorganisme formellement reconnu comme sûr pour des applications en alimentation humaine. Une méthodologie de qualification de sécurité présumée (Qualified Presumption of Safety, QPS) est proposée (Working document of the European Commission). Elle pourrait être appliquée au cas par cas et limitée à quelques aspects en fonction des microorganismes considérés, comme par exemple d'identifier des résistances aux antibiotiques chez les bactéries lactiques ou bien encore de mettre en évidence des facteurs de virulence ou de production de toxine chez des espèces contenant des souches pathogènes. Cette méthode permettrait d'assurer aux producteurs et aux consommateurs la sécurité des aliments contenant ces souches, bien que cela risque d'engendrer des investissements financiers importants pour les producteurs de microorganismes pour l'alimentation humaine, même si ceux-ci sont déjà utilisés dans des procédés industriels.

# RESULTATS

---

# CHAPITRE I

**ÉTUDE DES CAPACITES D'INHIBITION DE SOUCHES DE *CARNOBACTERIUM*  
PRODUCTRICES DE BACTERIOCINE, VIS-A-VIS D'UNE COLLECTION DE SOUCHES  
DE *LISTERIA MONOCYTOGENES* ISOLEES DE L'INDUSTRIE DU SAUMON FUME**

---

**Biodiversity of *Listeria monocytogenes* sensitivity to bacteriocin-producing  
*Carnobacterium* strains and application in sterile cold-smoked salmon**

**BRILLET Anne, PILET Marie-France, PREVOST Hervé,  
BOUTTEFROY Anne and LEROI Françoise**

*Journal of Applied Microbiology* (2004) **97**, 1029-1037.

---

## Introduction

Les bactéries lactiques du genre *Carnobacterium* ont été initialement choisies pour plusieurs raisons : leur capacité à produire des bactériocines leur conférant un potentiel d'inhibition envers les bactéries à Gram positif a déjà été étudiée (Métivier *et al.*, 1998 ; Bhugaloo-Vial *et al.*, 1996 et 1999), plusieurs espèces appartenant à ce genre sont naturellement présentes au sein de la flore du saumon fumé (Leroi *et al.*, 1998), et enfin, ce genre n'est *à priori* pas impliqué dans l'altération de ce produit (Paludan-Muller *et al.*, 1998 ; Stohr *et al.*, 2001).

Le but de cette première partie est de sélectionner une souche de *Carnobacterium* parmi trois souches potentiellement intéressantes (*C. divergens* V41, *C. piscicola* V1 et *C. piscicola* SF668) sur la base de leur capacité d'inhibition de *Listeria monocytogenes*. Pour cela, nous avons choisi de réaliser une première étude d'inhibition sur milieu gélosé vis à vis d'une large collection de *L. monocytogenes*. En effet, la plupart des études sur les bactéries inhibitrices montrent un potentiel d'inhibition vis-à-vis d'une à deux souches de *L. monocytogenes* seulement, et il est plus intéressant de vérifier les capacités d'inhibition des *Carnobacterium* sur de nombreuses souches, et qui proviennent surtout de l'environnement du saumon fumé et du produit. Puis une seconde étude a été réalisée directement sur saumon fumé, afin de vérifier que les capacités d'inhibition des *Carnobacterium* contre les souches de *L. monocytogenes* s'exercent également dans le produit au cours de la conservation à température réfrigérée.

La publication qui suit présente l'ensemble des travaux mis en œuvre, les matériels et méthodes utilisés y sont décrits précisément et font partie des techniques classiques de microbiologie. Nous résumerons ensuite les principaux résultats qui ressortent de cette étude.

## Résultats importants

Une première étude du spectre d'inhibition de *Carnobacterium* vis-à-vis de 57 souches de *L. monocytogenes* isolées d'usines de fabrication de saumon fumé (collection ASEPT) a été effectuée sur milieu gélosé par la technique classique des halos d'inhibition sur boîtes de Pétri. **Les 57 souches de *Listeria monocytogenes* testées sont toutes sensibles** aux trois souches de *Carnobacterium*, avec des sensibilités plus ou moins fortes selon les *Listeria*. Un test de comparaison des moyennes d'inhibition ainsi qu'un test de Student apparié ont montré qu'il n'y a pas de différence significative entre le pouvoir inhibiteur de *C. piscicola* V1 et *C. piscicola* SF668 (les 57 souches de *L. monocytogenes* ont sensiblement la même sensibilité) alors que ***C. divergens* V41 a un pouvoir inhibiteur toujours bien supérieur** aux deux autres, quelle que soit la souche de *L. monocytogenes* considérée (3 à 8 dilutions d'écart). Ces expériences ont également permis d'appréhender la biodiversité du comportement des *L. monocytogenes* vis à vis des trois souches de *Carnobacterium*. La classification hiérarchique ascendante montre qu'il y a trois grands types de comportements des *Listeria* : 8 souches (14% de la collection) très sensibles à chacun des 3 *Carnobacterium* (inhibition jusqu'aux puits 8 à 12, correspondant aux facteurs de dilution 256 à 4096 des surnageants), 11 souches (19%) moyennement sensibles à chacun des trois *Carnobacterium* (inhibition jusqu'aux puits 3 à 7, correspondant aux facteurs de dilution 8 à 128 des surnageants), et 38 souches (67%) très sensibles à *C. divergens* V41 et moyennement sensibles à *C. piscicola* SF668 et V1.

Ensuite, une seconde étude a été réalisée sur la base des travaux cités ci-dessus. Trois mélanges de 4 à 5 souches de *L. monocytogenes* représentant les trois classes ont été retenus et ensemencés sur des dés de saumon fumé stériles seuls ou avec une souche de *Carnobacterium*. Les résultats ont montré que les *L. monocytogenes* s'implantent très bien sur le saumon fumé, et ce quel que soit le mélange considéré (passage de  $20$  à  $10^5$  UFC/g en fin de conservation). Les *Carnobacterium* se développent également très facilement (taux maximal de  $10^{7-8}$  UFC/g atteint dès 21 jours), avec un avantage néanmoins pour *C. divergens* V41. En terme d'inhibition, ***C. divergens* V41 présente le plus fort pouvoir inhibiteur puisqu'il permet de maintenir le nombre de *L. monocytogenes* à un seuil inférieur à 50 UFC/g durant toute la période de stockage, quel que soit le mélange de *Listeria***



---

**considéré.** *C. piscicola* V1 a un effet bactéricide sur les souches de *L. monocytogenes* qui lui sont très sensibles, en revanche elle permet juste un maintien de la population de *L. monocytogenes* au seuil de 100 UFC/g pour les souches qui lui sont moyennement sensibles (qui représentent une majorité des *Listeria* rencontrées dans les usines françaises). Enfin, l'effet de *C. piscicola* SF668 est faible (réduction maximum 1 à 2 log) et ne permet pas de maintenir le nombre de *L. monocytogenes* à un niveau inférieur au seuil réglementaire de 100 UFC/g.

A l'issue de ces résultats, il apparaît que les souches inhibitrices les plus efficaces sont *C. divergens* V41 et *C. piscicola* V1. Cependant, la souche qui a un effet bactériostatique sur tous les mélanges testés et qui permet notamment de maintenir un seuil inférieur à 100 UFC/g de *L. monocytogenes* est *C. divergens* V41.

La souche de *C. divergens* V41 semble donc être la plus prometteuse en terme d'inhibition de *L. monocytogenes* sur le produit. Néanmoins, avant de pouvoir choisir une souche bioprotectrice en particulier, il est nécessaire d'effectuer des tests sensoriels et des tests biochimiques (amines biogènes, ABVT) afin de comparer le potentiel d'altération des trois souches sur saumon fumé. Ceci fera l'objet du chapitre II.

# Biodiversity of *Listeria monocytogenes* sensitivity to bacteriocin-producing *Carnobacterium* strains and application in sterile cold-smoked salmon

A. Brillet<sup>1</sup>, M.-F. Pilet<sup>1</sup>, H. Prevost<sup>1</sup>, A. Bouttefroy<sup>2</sup> and F. Leroi<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire de Microbiologie Alimentaire et Industrielle, ENITIAA, Nantes, <sup>2</sup>ASEPT, Rue des docteurs Calmette et Guérin, Laval, and

<sup>3</sup>Laboratoire de Génie Alimentaire, IFREMER, Nantes, France

2003/1166: received 18 December 2003, revised 5 April 2004 and accepted 4 June 2004

## ABSTRACT

A. BRILLET, M.-F. PILET, H. PREVOST, A. BOUTTEFROY AND F. LEROI. 2004.

**Aims:** The aim of this study was to demonstrate the inhibitory capacity of *Carnobacterium* strains against a collection of *Listeria monocytogenes* strains in cold-smoked salmon (CSS).

**Methods and Results:** Three bacteriocin-producing strains, *Carnobacterium divergens* V41, *C. piscicola* V1 and *C. piscicola* SF668, were screened for their antilisterial activity against a collection of 57 *L. monocytogenes* strains selected from the French smoked salmon industry, using an agar spot test. All the *Listeria* strains were inhibited but three different groups could be distinguished differing in sensitivity to the three *Carnobacterium* strains. However, *C. divergens* V41 always had the highest inhibitory effect. The antilisterial capacity was then tested in sterile CSS blocks co-inoculated with *Carnobacterium* spp. and mixtures of *L. monocytogenes* strains. *C. divergens* V41 was the most efficient strain, maintaining the level of *L. monocytogenes* at <50 CFU g<sup>-1</sup> during the 4 weeks of vacuum storage at 4 and 8°C, whatever the sensitivity of the set of *L. monocytogenes* strains.

**Conclusions:** *C. divergens* V41 may be a good candidate for biopreservation in CSS.

**Significance and Impact of the Study:** A biopreservation strategy for CSS against the risk of *L. monocytogenes* was investigated using bacteriocin-producing lactic acid bacteria.

**Keywords:** bacteriocin, biopreservation, *Carnobacterium*, cold-smoked salmon, *Listeria monocytogenes*.

## INTRODUCTION

*Listeria monocytogenes* is the pathogenic bacterium responsible for listeriosis, which is a food-borne disease. Listeriosis is generally associated with a high mortality rate (20–40%) and is regarded as the most fatal food-borne infection (Feldhusen 2000; Rocourt *et al.* 2000). Populations at greatest risk are pregnant women, newborn infants, the elderly and people with a weak immune system. However, it has recently been established that *L. monocytogenes* may cause febrile gastroenteritis in healthy adults not associated with the above-mentioned risk groups (Miettinen *et al.* 1999).

Correspondence to: F. Leroi, Laboratoire de Génie Alimentaire, IFREMER, Rue de l'Île d'Yeu, BP 21105, 44311 NANTES cedex 3, France (e-mail: f.leroi@ifremer.fr).

A whole range of food categories have been linked to listeriosis outbreaks, including fish and ready-to-eat fish products (Rocourt *et al.* 2000). Lightly preserved fish products, such as cold-smoked salmon (CSS), are classified as high risk merchandise. Indeed, the raw material is frequently contaminated by *L. monocytogenes* and the processing conditions, i.e. salting, drying, smoking and vacuum packaging, are insufficient to inactivate the bacterium or to prevent growth during chilled storage. Thus, contamination during or after processing can occur. As this product has an extended shelf-life and is consumed without further cooking, it represents a health risk for consumers. Although no listeriosis outbreak due to consumption of CSS has been reported in France, the detection of *L. monocytogenes* in CSS has led to recalls, destruction, cleaning, adverse publicity and sometimes the closure of factories. In France

(DGAL/SDHA/N98/N°8088, 1998) and in many European countries, the guidelines for the presence of *L. monocytogenes* in CSS is <100 CFU g<sup>-1</sup> until the sell-by date. In recent years, many efforts have been made in clean-up and sanitation procedures, reducing significantly the prevalence of *L. monocytogenes* in this product (Rorvik *et al.* 1997; Autio *et al.* 1999). However, the production of CSS consistently free of the bacterium is impossible because there is no elimination step for bacteria in the smoking process (Huss *et al.* 2000). In parallel, many publications about *Listeria* inhibitory treatments of food products, such as gamma irradiation (Savvaidis *et al.* 2002), ultra-high pressure (Ritz *et al.* 2000; Lakshmanan *et al.* 2003), antimicrobial agents (Antunes *et al.* 2002), sodium lactate (Nykanen *et al.* 2000; Glass *et al.* 2002), sodium chloride (Peterson *et al.* 1993), sodium nitrite (Lyhs *et al.* 1998), and lactoperoxidase (Boussouel *et al.* 1999), have been reported. Nevertheless, many of these treatments have a negative incidence on the quality of the CSS and most of them are not allowed by the European regulation.

Biopreservation, which consists of inoculating food products with selected bacteria to inhibit the growth of undesirable micro-organisms, seems to be an interesting strategy to control the risk of *L. monocytogenes* in CSS. Many studies report the use of lactic acid bacteria (LAB) as protective cultures in a range of ready-to-eat food products (Kelly *et al.* 1996) and a variety of refrigerated meat (Schillinger *et al.* 1991; McMullen and Stiles 1996; Hugas 1998; Bredholt *et al.* 1999; Budde *et al.* 2003), vegetable (Vescovo *et al.* 1996; Schillinger *et al.* 2001), dairy (Eppert *et al.* 1997; Benkerroum *et al.* 2002; Foulquié Moreno *et al.* 2003) and fish products (Nilsson *et al.* 1999; Katla *et al.* 2001). In CSS, the natural microflora are frequently dominated by LAB, in which the *Carnobacterium* genus is often represented (Leroi *et al.* 1998, 2000; Truelstrup Hansen and Huss 1998; Jorgensen *et al.* 2000). *Carnobacterium* species are good candidates for a biopreservation strategy as many strains secrete antimicrobial compounds called bacteriocins, capable of inhibiting related bacteria such as *L. monocytogenes*. Moreover, they are not believed to have any adverse effect on the sensory properties of CSS (Stohr *et al.* 2001). In previous studies, the antilisterial activity of three bacteriocin-producing strains isolated from seafood, *C. divergens* V41, *C. piscicola* V1 and *C. piscicola* SF668, has been demonstrated in model culture media (Pilet *et al.* 1995; Duffes *et al.* 1999a). The results have been confirmed by Duffes *et al.* (1999b) in CSS against one strain of *L. monocytogenes* chosen for its high sensitivity to each bacteriocin-producing strain.

The aim of this study was to evaluate the robustness of this bioprotective technology. This included an assessment of the inhibitory spectrum against a range of *L. monocytogenes* strains. Target strains were chosen out of a wide

collection representative for *L. monocytogenes* strains encountered in the French CSS industry. The sensitivity of each *L. monocytogenes* strain to *C. divergens* V41, *C. piscicola* V1 and *C. piscicola* SF668 was tested in plate medium and in CSS so as to select the bacteriocin-producing strain with the strongest inhibitory effect for a potential application as a safety agent in fish products.

## MATERIALS AND METHODS

### Bacterial strains and subcultures conditions

*Carnobacterium divergens* V41 and *C. piscicola* V1 were isolated from salmon and trout intestine and characterized by Pilet *et al.* (1995). *C. piscicola* SF668 was isolated from commercial Norwich CSS by Leroi *et al.* (1998), and studied by Duffes *et al.* (1999a).

A total of 152 strains of *L. monocytogenes* were isolated from the environment and from salmon products of five French CSS manufacturers (ASEPT, Laval, France). After phenotypic (serotype, resistance to cadmium, arsenic and tetracycline) and genotypic typing (pulsed-field gel electrophoresis), 57 different strains were selected as representative for the collection and were kindly provided by ASEPT for this study.

The subculture media used were Elliker broth (BK 054, Biokar, Beauvais, France) for *Carnobacterium* spp. and brain heart infusion (BK015, Biokar) with 3% (w/v) NaCl for *L. monocytogenes*. *Carnobacterium* and *Listeria* strains were subcultured for 24 h at 20°C and 15°C respectively. All strains were stored at -80°C in their growth medium with 20% (v/v) sterile glycerol.

### Preparation of sterile CSS model

Five whole-gutted salmon (*Salmo salar*) of approx. 4–5 kg, stored in ice, were bought from a Norwich salmon farm. According to Joffraud *et al.* (1998), the fish were washed with different washing and sanitizing solutions and fillets were collected and skinned respecting the highest hygienic conditions. Fillets were dry-salted for 140 min at 12°C with heat-treated salt (1 h, 160°C), rinsed in sterile water for salt removal, dried for 90 min (65% RH) and smoked for 120 min at 20°C in a smoking kiln previously cleaned and heated to 70°C. Cold-smoked fillets were then vacuum packed and stored for 40 h at 2°C before being aseptically cut into small blocks (about 1 cm<sup>3</sup>). Salmon blocks were distributed into 34 parts of 300 g and stored in polyamide polythene bags purchased from Bourdeau (St-Etienne-de-Montluc, France), vacuum packed and frozen at -80°C. Then, frozen bags were ionized (1.9 kGy) in a plant equipped with electron beam facilities (Gradient Ouest, Berric, France). Sodium chloride was measured with a Chloride Analyser 926 (Corning,

Halstead, UK) and total phenols were quantified by the method described in the French standard for smoked salmon (NF V 45-065 1995).

### Biodiversity of *L. monocytogenes* sensitivity to the three *Carnobacterium* spp.

The antibacterial activity of the three *Carnobacterium* bacteriocin producers was tested on 57 *L. monocytogenes* strains by a standardized agar spot test with a critical dilution assay (Pilet *et al.* 1995). The three *Carnobacterium* spp. were separately grown in fermentors (SGI 2L, Setric, Toulouse, France). One litre of Elliker broth was inoculated with 20 ml of a *Carnobacterium* spp. subculture. Cultures were run at 20°C under agitation with the pH adjusted to 6.5 by automatic addition of NaOH (6 N). Growth was controlled by regular O.D.<sub>600 nm</sub> measurements and, when the stationary phase was reached (approx. 30 h), 100 ml of cell-free supernatant of each *Carnobacterium* was obtained by centrifugation (8000 g, 5 min at 4°C). Supernatants, containing the thermoresistant bacteriocins, were also heated for 15 min at 80°C to inactivate protease activity then stored at -80°C until used. Two successive individual subcultures of *L. monocytogenes* target strains were run as previously described and 1 ml of the 100-fold dilution was poured onto a plate with Elliker containing 1% agar. For each *Carnobacterium* strain, 10 µl of the treated supernatant and their twofold successive dilutions in phosphate buffer (0.1 M; pH 6.5) were spotted onto the 57 indicator plates. After overnight incubation at 30°C, a translucent zone, corresponding to the absence of *L. monocytogenes* growth (inhibition zone), revealed sensitivity. The first spot of the 1/2<sup>nd</sup> dilution showing no inhibition zone was retained for data treatment.

### Antibacterial activity of *Carnobacterium* spp. in CSS

Three groups of *L. monocytogenes* strains were designed according to their sensitivity to *Carnobacterium* strains observed in the agar spot test. According to ASEPT, some strains of their collection were persistent in the plant (they have been isolated from the environment at two different times at least, and some of them have also been found in the product) and others were sporadic. In each group, four to five strains were chosen to represent this diversity. Set 1, corresponding to group 1, was constituted of strains RF107, RF114, RF119, RF129, RF148, set 2 (group 2) of RF100, RF120, RF122, RF123, RF140, and set 3 (group 3) of RF131, RF132, RF133, RF151. Table 1 summarizes the sensitivity of the different sets to the three *Carnobacterium* strains. *C. piscicola* SF668 and *C. piscicola* V1 were co-inoculated individually with *L. monocytogenes* set 1 and set 3 separately (strains fairly and highly sensitive respectively to the two *C. piscicola*). Set 2, composed of strains fairly sensitive to the three *Carnobacterium*, was not tested because it was similar to set 1 (Table 1). In the same way, *C. divergens* V41 was co-inoculated with *L. monocytogenes* strains of set 1 and set 2 separately (strains fairly and highly sensitive respectively to this strain). Each set of *L. monocytogenes* was tested in at least three independent experiments in CSS, inoculated alone (control) and in co-culture with *Carnobacterium* spp.

For one set, each *L. monocytogenes* strain was individually subcultured twice in 10 ml tubes (24 h, 30°C). All final cultures were adjusted to the same optical density (600 nm) using fresh medium and mixed (v/v) in a sterilized test tube. Cultures of *C. divergens* V41, *C. piscicola* V1 and SF668 were

**Table 1** Sensitivity of *Listeria monocytogenes* strains to the three supernatants of bacteriocin-producing *Carnobacterium* strains, determined by agar spot test

<i>Listeria monocytogenes</i> strains	<i>C. divergens</i> V41	<i>C. piscicola</i> V1	<i>C. piscicola</i> SF668
Group 1 <b>RF107, RF114, RF119, RF129, RF148, RF96, RF97, RF98, RF99, RF101, RF102, RF103, RF104, RF105, RF106, RF108, RF109, RF110, RF111, RF112, RF117, RF121, RF126, RF127, RF128, RF130, RF134, RF136, RF137, RF139, RF141, RF143, RF144, RF145, RF146, RF147, RF149, RF150</b>	++	+	+
Group 2 <b>RF100, RF120, RF122, RF123, RF140, RF113, RF115, RF116, RF118, RF135, RF138</b>	+	+	+
Group 3 <b>RF131, RF132, RF133, RF151, RF124, RF 125, RF152, RF142</b>	++	++	++

++: *Listeria monocytogenes* strains highly sensitive to *Carnobacterium* spp. (inhibited by a supernatant diluted more than 256 times).

+: *Listeria monocytogenes* strains fairly sensitive to *Carnobacterium* spp. (inhibited by a supernatant diluted <256 times).

The sets of strains representative for each group are in bold.

grown in 100 ml of Elliker broth for 24 h at 30°C before cells were centrifuged and washed in physiological salt solution [0.1% (w/v) tryptone (Biokar) and 0.85% (w/v) NaCl]. Immediately, appropriate dilutions of mixed *L. monocytogenes* and *Carnobacterium* strains were mixed and inoculated (2% v/w) in parts of 30 g of thawed sterile CSS pieces distributed in polyamide polythene bags (Bourdeau). The pieces were gently mixed with the inoculating solution and samples were then vacuum packed and incubated for 28 days under the following conditions: 9 days at 4°C followed by 19 days at 8°C as specified in the French standard for shelf-life validation of perishable and refrigerated food (NF V 01-003 2004), with a break of 2 h at 20°C after 19 days of storage (to imitate a break in the cold chain during distribution and sale). The initial desired levels in the salmon flesh for *L. monocytogenes* and *Carnobacterium* were 20 and 10<sup>5</sup> CFU g<sup>-1</sup> respectively. For each *L. monocytogenes* set, a control was prepared by inoculating CSS pieces with *L. monocytogenes* alone (the *Carnobacterium* subculture being replaced by sterile physiological salt solution). Microbial analysis was carried out weekly in triplicate (three different bags analysed).

### Bacterial enumeration

Salmon samples (30 g) were transferred aseptically into a stomacher bag containing 120 ml of chilled physiological salt solution and homogenized for 2 min in a stomacher (Lab Blender, London, UK). The homogenate was left at room temperature for 30 min for resuscitation. *Carnobacterium* spp. was counted on Elliker plates incubated aerobically for 5 days at 20°C. *L. monocytogenes* was counted on Palcam agar (BK145, Biokar) with a selective supplement (BS00408, Biokar) incubated for 48 h at 30°C. The detection threshold of *L. monocytogenes* was lowered to 1 CFU g<sup>-1</sup> by pour plating 5 ml of the mother solution on five Palcam plates.

### Statistical analysis

The 57 strains of *L. monocytogenes* were clustered in their sensitivity to the three *Carnobacterium* spp. using Ward's hierarchical clustering method with the squared Euclidean distance (Uniwin software, Uniwin Plus, version 3.01, Sigma Plus, Paris, France).

A comparison of the inhibition potential of the three *Carnobacterium* spp. against 57 *L. monocytogenes* strains (agar spot test) was made with a paired-sample Student's test. The effect of the three *Carnobacterium* on the different sets of *L. monocytogenes* (test in sterile CSS) was treated with one-way variance analysis. Mean values were compared by the least significant difference test at the 0.05 level of probability (Statgraphics Plus, version 4, Sigma Plus).

## RESULTS

### Biodiversity of *L. monocytogenes* sensitivity to the three *Carnobacterium* spp.

A total of 57 *L. monocytogenes* strains representative for five French smoked salmon factories (from product and the environment) were screened for their sensitivity to the three *Carnobacterium* supernatants. All *L. monocytogenes* strains were inhibited by each supernatant, but the sensitivity was different between *Listeria* strains. A clustering method distinguished three groups of *Listeria* showing different behaviour towards the three *Carnobacteria* supernatants. Sensitivity was defined as follows: a target strain inhibited by a supernatant diluted more than 256 times was considered as 'highly sensitive', inhibition by a lower dilution led the strain to be considered as 'fairly sensitive'. The results are summarized in Table 1. The first group was constituted of 38 *Listeria* strains (67%) which were highly sensitive to *C. divergens* V41 and fairly sensitive to *C. piscicola* V1 and SF668. Eleven strains (19%) were fairly sensitive to the three *Carnobacteria* supernatants (group 2), and eight strains (14%) were highly sensitive to the three *Carnobacteria* supernatants (group 3).

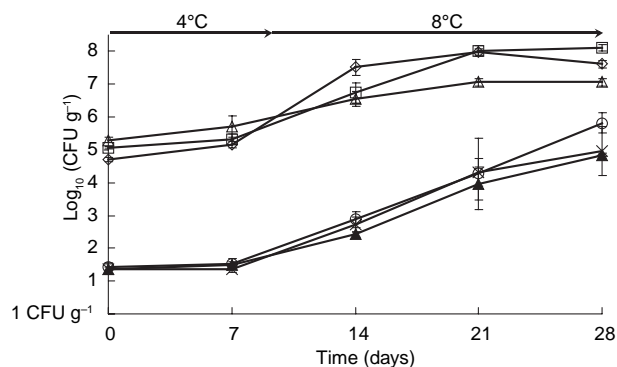
### Inhibitory capacity of *Carnobacterium* spp.

Paired Student's tests revealed that there was no significant difference between the effect of *C. piscicola* SF668 and *C. piscicola* V1, showing that their inhibitory effect was equivalent on all the target strains considered. On the other hand, a significant difference was observed between the inhibitory effect of *C. divergens* V41 and the two *C. piscicola* strains. Whichever *L. monocytogenes* strain was considered, *C. divergens* V41 always had the highest inhibitory effect. In the presence of *C. divergens* V41 supernatant, an inhibition zone was always observed with three to eight twofold dilutions more than with the two *C. piscicola* strains.

### Inhibition test in sterile CSS

The aim of this part was to compare the inhibitory effect of the three *Carnobacterium* strains against *L. monocytogenes* in a CSS matrix. The number of experiments was reduced by testing a set of four to five strains of *L. monocytogenes* for each of the three groups previously described.

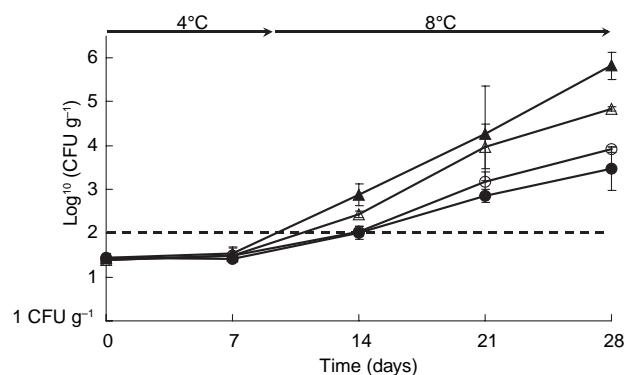
The salt and phenol concentrations of the smoked salmon used in these experiments were 5.0% (w/w, water phase) and 0.81 mg/100 g respectively. Fat content was 14.5% (w/w), dry matter 40.0% (w/w) and pH 6.0. The results showed that *L. monocytogenes* alone grew very easily in CSS, from 20 CFU g<sup>-1</sup> at the beginning to 10<sup>4</sup>–10<sup>5</sup> CFU g<sup>-1</sup> at the end of the experiment (Fig. 1). No difference was observed between the three sets, except at the end of the



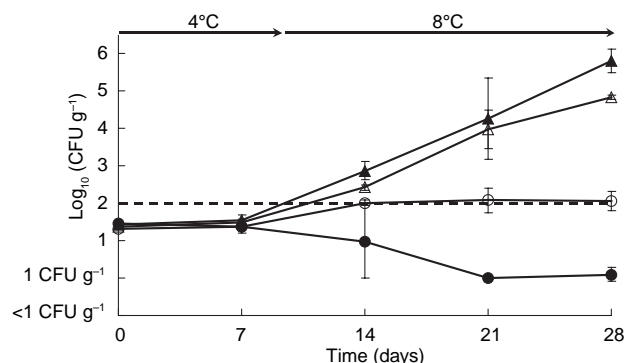
**Fig. 1** Growth of *L. monocytogenes* strains alone (▲) set 1, highly sensitive to *C. divergens* V41 and fairly sensitive to *C. piscicola* V1 and SF668; ×: set 2, fairly sensitive to the three *Carnobacteria*; ○: set 3, highly sensitive to the three *Carnobacteria*) and growth of *Carnobacterium* spp. (◇: *C. divergens* V41; □: *C. piscicola* V1; △: *C. piscicola* SF668) in sterile cold-smoked salmon during storage (9 days at 4°C and 19 days at 8°C, with a break of 2 h at 20°C after 19 days of storage). Bars indicate 95% confidence intervals

experiment when strains of set 3 reached a level slightly but significantly higher than sets 1 and 2 (respectively  $8 \times 10^5$ ,  $7 \times 10^4$  and  $2 \times 10^5$  CFU  $\text{g}^{-1}$ ). Concerning *Carnobacteria*, the three strains colonized the product very well, with a slight advantage for *C. divergens* V41. For this strain, the growth began at 4°C, increasing from  $5 \times 10^4$  to  $10^5$  CFU  $\text{g}^{-1}$  after 1 week (statistically significant difference). The growth increased considerably at 8°C and *C. divergens* V41 reached  $10^8$  CFU  $\text{g}^{-1}$  after 1–2 weeks at 8°C. The break at 20°C did not seem to modify the growth curve but this break occurred when *C. divergens* V41 had already reached its maximum level. Growth of the two *C. piscicola* strains was a little weaker, *C. piscicola* V1 reaching  $10^8$  CFU  $\text{g}^{-1}$  after 3 weeks of storage and *C. piscicola* SF668 reaching only  $10^7$  CFU  $\text{g}^{-1}$ . The presence or the absence of *L. monocytogenes* did not influence the growth of *Carnobacterium* spp. (data not shown).

Experiments in CSS confirmed that *C. divergens* V41, *C. piscicola* SF668 and *C. piscicola* V1 were able to inhibit partly or totally the growth of *Listeria* strains, whichever set was considered. The inhibitory effect of *C. piscicola* SF668 was significant but weak. The biggest decrease observed at the end of the experiment was 1 log CFU  $\text{g}^{-1}$  for *L. monocytogenes* set 1 (fairly sensitive strains) and 2 log for set 3 (highly sensitive strains) (Fig. 2). *C. piscicola* V1 had a greater effect (Fig. 3). For highly sensitive strains of *L. monocytogenes* (set 3), *C. piscicola* V1 had a bactericidal effect, the number of *Listeria* decreasing from 20 to 1 CFU  $\text{g}^{-1}$  after 3 weeks. This level was maintained till the end of the experiment. For fairly sensitive *L. monocytogenes* (set 1), the level never exceeded  $10^2$  CFU  $\text{g}^{-1}$ , whereas *L. monocytogenes* reached  $10^4$  CFU  $\text{g}^{-1}$  in the



**Fig. 2** Growth of *L. monocytogenes* strains inoculated alone (△, ▲) and in co-culture with *C. piscicola* SF668 (○, ●) in sterile cold-smoked salmon during storage (9 days at 4°C and 19 days at 8°C, with a break of 2 h at 20°C after 19 days of storage). Open symbol: *L. monocytogenes* set 1, fairly sensitive to *C. piscicola* SF668; closed symbol: *L. monocytogenes* set 3, highly sensitive to *C. piscicola* SF668. Bars indicate 95% confidence intervals

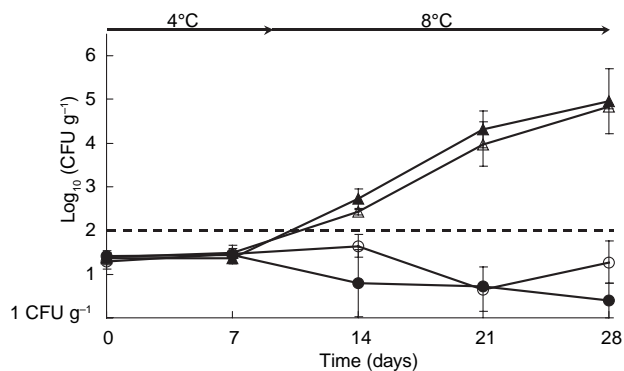


**Fig. 3** Growth of *L. monocytogenes* strains inoculated alone (△, ▲) and in co-culture with *C. piscicola* V1 (○, ●) in sterile cold-smoked salmon during storage (9 days at 4°C and 19 days at 8°C, with a break of 2 h at 20°C after 19 days of storage). Open symbol: *L. monocytogenes* set 1, fairly sensitive to *C. piscicola* V1; closed symbol: *L. monocytogenes* set 3, highly sensitive to *C. piscicola* V1. Bars indicate 95% confidence intervals

control. Finally, *C. divergens* V41 had the strongest inhibitory effect. For the two sets tested, *C. divergens* V41 had a bactericidal or bacteriostatic effect and this strain was able to maintain the number of *L. monocytogenes* at lower than  $50$  CFU  $\text{g}^{-1}$  during the 4 weeks of vacuum storage, whatever the sensitivity of the target strains (Fig. 4).

## DISCUSSION

The inhibitory activity of three bacteriocin-producing *Carnobacteria* was demonstrated against a collection of 57 *L. monocytogenes* strains representative for the French



**Fig. 4** Growth of *L. monocytogenes* strains inoculated alone ( $\Delta$ ,  $\blacktriangle$ ) and in co-culture with *C. divergens* V41 ( $\circ$ ,  $\bullet$ ) in sterile cold-smoked salmon during storage (9 days at 4°C and 19 days at 8°C, with a break of 2 h at 20°C after 19 days of storage). Open symbol: *L. monocytogenes* set 1, highly sensitive to *C. divergens* V41; closed symbol: *L. monocytogenes* set 2, fairly sensitive to *C. divergens* V41. Bars indicate 95% confidence intervals

smoked salmon industry using the agar spot test. All the *Listeria* strains tested were sensitive to the three *Carnobacterium* spp. supernatants. It has been shown in previous studies that one or two class IIa bacteriocins are produced by the *Carnobacterium* strains used in this experiment: divercin V41 secreted by *C. divergens* V41 (Metivier *et al.* 1998), piscicocin V1a (identical to piscicolin 126, characterized by Jack *et al.* 1996) and piscicocin V1b (identical to carnobacteriocin BM1) produced by *C. piscicola* V1 (Bhugaloo-Vial *et al.* 1996), and probably one bacteriocin identical to piscicolin 126 for *C. piscicola* SF668 (Pellé *et al.*, unpublished data). The results of inhibition are in agreement with those of Katla *et al.* (2003), who have shown the activity of several bacteriocins of class IIa against large numbers of *L. monocytogenes* isolated from food and the food industry environment. Nevertheless, differences in the sensitivity of *Listeria* strains to the three *Carnobacteria* could be observed: 67% of *Listeria* strains (group 1) were highly sensitive to the supernatant of *C. divergens* V41 but fairly sensitive to the supernatant of *C. piscicola* V1 and *C. piscicola* SF668. Katla *et al.* (2003) have reported differences in sensitivity of *L. monocytogenes* strains to class IIa bacteriocins, such as sakacin P, sakacin A and pediocin PA-1. This is partly due to large differences, such as surface properties, between target strains. Further experiments with the *L. monocytogenes* collection from ASEPT are currently being carried out to search for any correlation between sensitivity to bacteriocin and other properties such as serotyping, pulsotyping, adhesion properties, sensitivity to disinfectants or the production of monocine.

Among our collection, 81% of *Listeria* strains were highly sensitive to the supernatant of *C. divergens* V41 and 86% were fairly sensitive to the supernatant of *C. piscicola* V1 and

*C. piscicola* SF668. Divercin V41, produced by *C. divergens* V41, has been characterized and contains two disulphide bridges (Metivier *et al.* 1998), whereas piscicocins V1a and V1b, produced by *C. piscicola* V1 and SF668, have a single disulphide bridge (Bhugaloo-Vial *et al.* 1996). According to several studies, the number of disulphide bridges could explain the higher activity of certain class IIa bacteriocins (Fimland *et al.* 2000; Guyonnet *et al.* 2000). However, a comparison of the exact sensitivity of *L. monocytogenes* strains to these bacteriocins would require the complete purification of each peptide.

The addition of a purified antimicrobial agent to fish products or any type of food product is subject to food preservative legislation. In Europe, nisin is the only bacteriocin permitted in a limited number of food products, e.g. semolina puddings, refined and melted cheese, and coated cream (Directive 95/2/CE 1995). The use of food preservatives in French CSS is not allowed and previous studies have shown that nisin activity in CSS is limited during the time of storage (Nilsson *et al.* 1997). In addition, the use of bacteriocin-producing strains directly on CSS was shown to be more effective than the application of bacteriocin alone (Duffes *et al.* 1999b). Therefore, our strategy was to add bacteriocin-producing strains to CSS just before vacuum packaging. This approach has already been used in several studies on CSS (Wessels and Huss 1996; Nilsson *et al.* 1999; Katla *et al.* 2001; Yamazaki *et al.* 2003). In these studies, inhibition was tested against one or a few strains of *L. monocytogenes* that are usually very sensitive to the bacteriocin tested. Due to the strain-to-strain differences in bacteriocin sensitivity of this pathogenic bacterium, the validation of antilisterial activity on a wide range of representative strains encountered in the industry seems essential for the development of a biopreservation strategy. In order to decrease the number of experiments in CSS, three sets of four to five *L. monocytogenes* strains were selected, representing the different sensitivity classes of the three bacteriocin-producing *Carnobacterium* strains.

Our experiments demonstrate the ability of the different sets of *L. monocytogenes* to grow in CSS even when it was inoculated at very low levels (around 20 CFU g<sup>-1</sup>). The chemical characteristics of CSS, particularly phenol and salt concentrations, are known to be determinant in limiting the growth of *L. monocytogenes* in this product (Dalgaard and Jorgensen 1998). However, Thurette *et al.* (1998) demonstrated that the phenol concentration required for effective inhibition of the pathogenic bacterium was 2 mg/100 g at 8°C whereas the concentration of phenol in CSS used in our experiments was representative of the typical levels encountered in French commercial CSS (<1 mg/100 g; Leroi 2002). The temperature of storage is another important factor for growth limitation of *L. monocytogenes* in CSS. Our results showed that the number of *L. monocytogenes* in the

product increased from the ninth day to the end of the experiment, which corresponds to the period of storage at 8°C. These results are in agreement with previous studies showing that when inoculated at low levels (<200 CFU g<sup>-1</sup>), *L. monocytogenes* exhibited a slight growth at 4°C in CSS, but reached 10<sup>6</sup>–10<sup>8</sup> CFU g<sup>-1</sup> in 2–4 weeks at 8 or 10°C (Peterson *et al.* 1993; Thurette *et al.* 1998; Duffes *et al.* 1999b). *Carnobacterium* strains grew very easily on CSS from 10<sup>4</sup>–10<sup>5</sup> CFU g<sup>-1</sup> at the beginning to 10<sup>7</sup>–10<sup>8</sup> CFU g<sup>-1</sup> at the end of storage, showing their capacity for colonization of smoked products at refrigerated temperatures, with high NaCl concentration and without sugar, as was previously demonstrated by Duffes *et al.* (1999b).

With each of the three *Carnobacteria* tested, inhibition of the growth of *L. monocytogenes* was effective throughout the 4-week storage. For *C. piscicola* V1, as observed in agar spot tests, inhibition was higher for highly sensitive strains than for fairly sensitive strains. An almost two logarithm difference at the end of the experiment was observed between counts of *L. monocytogenes* set 1 (fairly sensitive) and set 3 (highly sensitive) in the presence of *C. piscicola* V1 (Fig. 3). Katla *et al.* (2002) have also shown that differences in sensitivity to bacteriocins measured in microtitre plate assays were comparable with differences seen for the same strains of *L. monocytogenes* in food model systems. However, for *C. piscicola* SF668 and *C. divergens* V41, the differences in sensitivity between sets of *L. monocytogenes* were not so pronounced in CSS and no statistical difference was observed between counts of highly and fairly sensitive strains (Figs 2 and 4). Gänzle *et al.* (1999) have shown that intrinsic factors could affect the activity of a bacteriocin in a food product.

In CSS, *C. piscicola* SF668 was less active than *C. piscicola* V1 to maintain the level of the different sets of *L. monocytogenes* below 100 CFU g<sup>-1</sup>. This result had already been observed in sterile CSS blocks by Duffes *et al.* (1999b) when working with a highly sensitive strain of *L. monocytogenes*. In contrast, in agar spot tests no difference was observed between the inhibitory effect of supernatant from *C. piscicola* V1 and from *C. piscicola* SF668. This could be attributed to differences in bacteriocin production in CSS by *Carnobacterium* spp. *C. divergens* V41 showed a greater inhibitory capacity in CSS throughout the storage time, whatever the sensitivity of the *Listeria* set recorded on the agar spot test. In the presence of *C. divergens* V41, the number of *L. monocytogenes* was maintained at around 50 CFU g<sup>-1</sup>, which is lower than the 100 CFU g<sup>-1</sup> tolerated level for lightly preserved products such as CSS (DGAL/SDHA/N98/N°8088, 1998). Bacteriocin production by this strain has been detected in CSS extract (Connil *et al.* 2002). Moreover, evidence of inhibition of *L. monocytogenes* by divercin V41 on CSS has recently been demonstrated using a divercin V41 deficient mutant of *C. divergens* V41 (Richard *et al.* 2003). In the study of Duffes *et al.* (1999b) in a sterile

CSS model, the inhibitory activity of *C. piscicola* V1 against *L. monocytogenes* was higher than the activity of *C. divergens* V41. The fact that the activity was demonstrated against only one highly sensitive strain of *L. monocytogenes* is one of the possible explanations of these differences, showing the importance of using different strains with various sensitivities for inhibition assessment.

The results of this study show a promising application of at least two strains: *C. divergens* V41 and *C. piscicola* V1, as natural food preservatives against the pathogenic bacteria *L. monocytogenes* on vacuum-packed CSS stored at 4°C and excessive temperatures such as 8°C. *Carnobacteria* are frequently isolated from CSS during storage, and several studies have shown that these bacteria are not believed to affect the sensory quality of the product (Paludan-Müller *et al.* 1998; Nilsson *et al.* 1999; Stohr *et al.* 2001). Further work should therefore be carried out to determine the real effect of our strains on the sensory quality of CSS and their potential inhibitory effects on the endogenous flora of these products.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank Mrs Carol Robins (MA Oxon.) for critical reading of the manuscript. This work was supported by grants from The European SEAFOODplus project, the 'Aliment Qualité Sécurité' project no. R01/05 from the French Ministry of Agriculture and Fishery, and from partners CITPPM (Confédération des Industriels de la Transformation des Produits de la Pêche Maritime), ENITIAA (Ecole Nationale des Ingénieurs des Techniques des Industries Agricoles et Alimentaires), IFREMER (Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer) and ASEPT (Association pour l'Aseptie).

## REFERENCES

- Antunes, P., Reu, C., Sousa, J.C., Pestana, N. and Peixe, L. (2002) Incidence and susceptibility to antimicrobial agents of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* isolated from poultry carcasses in Porto, Portugal. *Journal of Food Protection* **65**, 1888–1893.
- Autio, T., Hielm, S., Miettinen, M., Sjöberg, A.M., Aarnisalo, K., Björkroth, J., Mattila-Sandholm, T. and Korkeala, H. (1999) Sources of *Listeria monocytogenes* contamination in a cold-smoked rainbow trout processing plant detected by pulsed-field gel electrophoresis typing. *Applied and Environmental Microbiology* **65**, 150–155.
- Benkerroum, N., Oubel, H. and Mimoun, L.B. (2002) Behavior of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in yogurt fermented with a bacteriocin-producing thermophilic starter. *Journal of Food Protection* **65**, 799–805.
- Bhugaloo-Vial, P., Dousset, X., Metivier, A., Sorokine, O., Anglade, P., Boyaval, P. and Marion, D. (1996) Purification and amino acid sequences of piscicocins V1a and V1b, two class IIa bacteriocins



- secreted by *Carnobacterium piscicola* V1 that display significantly different levels of specific inhibitory activity. *Applied and Environmental Microbiology* **62**, 4410–4416.
- Boussouel, N., Mathieu, F., Benoit, V., Linder, M., Revol-Junelles, A.M. and Milliere, J.B. (1999) Response surface methodology, an approach to predict the effects of a lactoperoxidase system, Nisin, alone or in combination, on *Listeria monocytogenes* in skim milk. *Journal of Applied Microbiology* **86**, 642–652.
- Bredholt, S., Nesbakken, T. and Holck, A. (1999) Protective cultures inhibit growth of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 in cooked, sliced, vacuum- and gas-packaged meat. *International Journal of Food Microbiology* **53**, 43–52.
- Budde, B.B., Hornbaek, T., Jacobsen, T., Barkholt, V. and Koch, A.G. (2003) *Leuconostoc carnosum* 4010 has the potential for use as a protective culture for vacuum-packed meats: culture isolation, bacteriocin identification, and meat application experiments. *International Journal of Food Microbiology* **83**, 171–184.
- Connil, N., Prevost, H. and Dousset, X. (2002) Production of biogenic amines and diverцин V41 in cold smoked salmon inoculated with *Carnobacterium divergens* V41, and specific detection of this strain by multiplex-PCR. *Journal of Applied Microbiology* **92**, 611–617.
- Dalgaard, P. and Jorgensen, L.V. (1998) Predicted and observed growth of *Listeria monocytogenes* in seafood challenge tests and in naturally contaminated cold-smoked salmon. *International Journal of Food Microbiology* **40**, 105–115.
- DGAL/SDHA/N98/N°8088 (1998) *Gestion des non-conformités des denrées alimentaires, annexe IV: Listeria monocytogenes*. Paris, France: Note de service, Direction Générale de l'alimentation.
- Directive 95/2/CE (1995) *L61, additifs, annexe III, partie C, concernant les additifs alimentaires autres que les colorants et édulcorants, modifiée par la directive 98/72/CE*. Journal officiel des communautés européennes.
- Duffes, F., Leroi, F., Boyaval, P. and Dousset, X. (1999a) Inhibition of *Listeria monocytogenes* by *Carnobacterium* spp. strains in a simulated cold smoked fish system stored at 4 degrees C. *International Journal of Food Microbiology* **47**, 33–42.
- Duffes, F., Corre, C., Leroi, F., Dousset, X. and Boyaval, P. (1999b) Inhibition of *Listeria monocytogenes* by in situ produced and semipurified bacteriocins of *Carnobacterium* spp. on vacuum-packed, refrigerated cold-smoked salmon. *Journal of Food Protection* **62**, 1394–1403.
- Eppert, I., Valdes-Stauber, N., Gotz, H., Busse, M. and Scherer, S. (1997) Growth reduction of *Listeria* spp. caused by undefined industrial red smear cheese cultures and bacteriocin-producing *Brevibacterium linens* as evaluated in situ on soft cheese. *Applied and Environmental Microbiology* **63**, 4812–4817.
- Feldhusen, F. (2000) The role of seafood in bacterial foodborne diseases. *Microbes and Infection* **2**, 1651–1660.
- Fimland, G., Johnsen, L., Axelsson, L., Brurberg, M.B., Nes, I.F., Eijsink, V.G. and Nissen-Meyer, J. (2000) A C-terminal disulfide bridge in pediocin-like bacteriocins renders bacteriocin activity less temperature dependent and is a major determinant of the antimicrobial spectrum. *Journal of Bacteriology* **182**, 2643–2648.
- Foulquié Moreno, M.R., Rea, M.C., Cogan, T.M. and De Vuyst, L. (2003) Applicability of a bacteriocin-producing *Enterococcus faecium* as a co-culture in Cheddar cheese manufacture. *International Journal of Food Microbiology* **81**, 73–84.
- Gänzle, M.G., Weber, S. and Hammes, W.P. (1999) Effect of ecological factors on the inhibitory spectrum and activity of bacteriocins. *International Journal of Food Microbiology* **46**, 207–217.
- Glass, K.A., Granberg, D.A., Smith, A.L., McNamara, A.M., Hardin, M., Mattias, J., Ladwig, K. and Johnson, E.A. (2002) Inhibition of *Listeria monocytogenes* by sodium diacetate and sodium lactate on wieners and cooked bratwurst. *Journal of Food Protection* **65**, 116–123.
- Guyonnet, D., Fremaux, C., Cenatiempo, Y. and Berjeaud, J.M. (2000) Method for rapid purification of class IIa bacteriocins and comparison of their activities. *Applied and Environmental Microbiology* **66**, 1744–1748.
- Hugas, M. (1998) Bacteriocinogenic lactic acid bacteria for the biopreservation of meat and meat products. *Meat Science* **49**, S139–S150.
- Huss, H.H., Jorgensen, L.V. and Vogel, B.F. (2000) Control options for *Listeria monocytogenes* in seafood. *International Journal of Food Microbiology* **62**, 267–274.
- Jack, R.W., Wan, J., Gordon, J., Harmark, K., Davidson, B.E., Hillier, A.J., Wettenhall, R.E., Hickey, M.W. et al. (1996) Characterization of the chemical and antimicrobial properties of piscicolin 126, a bacteriocin produced by *Carnobacterium piscicola* JG126. *Applied and Environmental Microbiology* **62**, 2897–2903.
- Joffraud, J.J., Leroi, F. and Chevalier, F. (1998) Development of a sterile cold-smoked fish model. *Journal of Applied Microbiology* **85**, 991–998.
- Jorgensen, L.V., Huss, H.H. and Dalgaard, P. (2000) The effect of biogenic amine production by single bacterial cultures and metabiosis on cold-smoked salmon. *Journal of Applied Microbiology* **89**, 920–934.
- Katla, T., Moretro, T., Aasen, I.M., Holck, A., Axelsson, L. and Naterstad, K. (2001) Inhibition of *Listeria monocytogenes* in cold smoked salmon by addition of sakacin P and/or live *Lactobacillus sakei* cultures. *Food Microbiology* **18**, 431–439.
- Katla, T., Moretro, T., Sveen, I., Aasen, I.M., Axelsson, L., Rorvik, L.M. and Naterstad, K. (2002) Inhibition of *Listeria monocytogenes* in chicken cold cuts by addition of sakacin P and sakacin P-producing *Lactobacillus sakei*. *Journal of Applied Microbiology* **93**, 191–196.
- Katla, T., Naterstad, K., Vancanneyt, M., Swings, J. and Axelsson, L. (2003) Differences in susceptibility of *Listeria monocytogenes* strains to sakacin P, sakacin A, pediocin PA-1, and nisin. *Applied and Environmental Microbiology* **69**, 4431–4437.
- Kelly, W.J., Asmundson, R.V. and Huang, C.M. (1996) Isolation and characterization of bacteriocin-producing lactic acid bacteria from ready-to-eat food products. *International Journal of Food Microbiology* **33**, 209–218.
- Lakshmanan, R., Piggott, J.R. and Paterson, A. (2003) Potential applications of high pressure for improvement in salmon quality. *Trends in Food Science and Technology* **14**, 354–363.
- Leroi, F. (2002) La microbiologie du saumon fumé à froid: aspects hygiéniques et qualité. *Revue générale du froid* **1028**, 35–40.
- Leroi, F., Joffraud, J.J., Chevalier, F. and Cardinal, M. (1998) Study of the microbial ecology of cold-smoked salmon during storage at 8 degrees C. *International Journal of Food Microbiology* **39**, 111–121.
- Leroi, F., Joffraud, J.J. and Chevalier, F. (2000) Effect of salt and smoke on the microbiological quality of cold-smoked salmon during storage at 5 degrees C as estimated by the factorial design method. *Journal of Food Protection* **63**, 502–508.

- Lyhs, U., Bjorkroth, J., Hyytia, E. and Korkeala, H. (1998) The spoilage flora of vacuum-packaged, sodium nitrite or potassium nitrate treated, cold-smoked rainbow trout stored at 4 degrees C or 8 degrees C. *International Journal of Food Microbiology* **45**, 135–142.
- McMullen, L.M. and Stiles, M.E. (1996) Potential use of bacteriocin-producing lactic acid bacteria in the preservation of meats. *Journal of Food Protection* **58**(Suppl.1), 64–71.
- Metivier, A., Pilet, M.F., Dousset, X., Sorokine, O., Anglade, P., Zagorec, M., Piard, J.C., Marion, D. *et al.* (1998) Divercin V41, a new bacteriocin with two disulphide bonds produced by *Carnobacterium divergens* V41: primary structure and genomic organization. *Microbiology* **144**, 2837–2844.
- Miettinen, M.K., Siitonen, A., Heiskanen, P., Haajanen, H., Bjorkroth, K.J. and Korkeala, H.J. (1999) Molecular epidemiology of an outbreak of febrile gastroenteritis caused by *Listeria monocytogenes* in cold-smoked rainbow trout. *Journal of Clinical Microbiology* **37**, 2358–2360.
- NF V 01-003 (2004) *Hygiène et sécurité des produits alimentaires. Lignes directrices pour l'élaboration d'un protocole de test de vieillissement pour la validation de la durée de vie microbiologique. Denrées périssables, réfrigérées*, Norme AFNOR.
- NF V 45-065 (1995) *Poisson transformé. Saumon fumé*, Norme AFNOR.
- Nilsson, L., Huss, H.H. and Gram, L. (1997) Inhibition of *Listeria monocytogenes* on cold-smoked salmon by nisin and carbon dioxide atmosphere. *International Journal of Food Microbiology* **38**, 217–227.
- Nilsson, L., Gram, L. and Huss, H.H. (1999) Growth control of *Listeria monocytogenes* on cold-smoked salmon using a competitive lactic acid bacteria flora. *Journal of Food Protection* **62**, 336–342.
- Nykanen, A., Weckman, K. and Lapvetelainen, A. (2000) Synergistic inhibition of *Listeria monocytogenes* on cold-smoked rainbow trout by nisin and sodium lactate. *International Journal of Food Microbiology* **61**, 63–72.
- Paludan-Muller, C., Dalgaard, P., Huss, H.H. and Gram, L. (1998) Evaluation of the role of *Carnobacterium piscicola* in spoilage of vacuum- and modified-atmosphere-packed cold-smoked salmon stored at 5 degrees C. *International Journal of Food Microbiology* **39**, 155–166.
- Peterson, M.E., Pelroy, G.A., Paranjpye, R., Poysky, F.T., Almond, J.S. and Eklund, M.W. (1993) Parameters for control of *Listeria monocytogenes* in smoked fishery products: sodium chloride and packaging method. *Journal of Food Protection* **56**, 938–943.
- Pilet, M.F., Dousset, X., Barré, R., Novel, G., Desmazeaud, M. and Piard, J.C. (1995) Evidence for two bacteriocins produced by *Carnobacterium piscicola* and *Carnobacterium divergens* isolated from fish and active against *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection* **58**, 256–262.
- Richard, C., Brillet, A., Pilet, M.F., Prevost, H. and Drider, D. (2003) Evidence on inhibition of *Listeria monocytogenes* by divercin V41 action. *Letters in Applied Microbiology* **36**, 288–292.
- Ritz, M., Jugiau, F., Rama, F., Courcoux, P., Semenou, M. and Federighi, M. (2000) Inactivation of *Listeria monocytogenes* by high hydrostatic pressure: effects and interactions of treatment variables studied by analysis of variance. *Food Microbiology* **17**, 375–382.
- Rocourt, J., Jacquet, C. and Reilly, A. (2000) Epidemiology of human listeriosis and seafoods. *International Journal of Food Microbiology* **62**, 197–209.
- Rorvik, L.M., Skjerve, E., Knudsen, B.R. and Yndestad, M. (1997) Risk factors for contamination of smoked salmon with *Listeria monocytogenes* during processing. *International Journal of Food Microbiology* **37**, 215–219.
- Savvaïdis, I.N., Skandamis, P., Riganakos, K.A., Panagiotakis, N. and Kontominas, M.G. (2002) Control of natural microbial flora and *Listeria monocytogenes* in vacuum-packaged trout at 4 and 10 degrees C using irradiation. *Journal of Food Protection* **65**, 515–522.
- Schillinger, U., Kaya, M. and Lucke, F.K. (1991) Behaviour of *Listeria monocytogenes* in meat and its control by a bacteriocin-producing strain of *Lactobacillus sakei*. *Journal of Applied Bacteriology* **70**, 473–478.
- Schillinger, U., Becker, B., Vignolo, G. and Holzapfel, W.H. (2001) Efficacy of nisin in combination with protective cultures against *Listeria monocytogenes* Scott A in tofu. *International Journal of Food Microbiology* **71**, 159–168.
- Stohr, V., Joffraud, J.J., Cardinal, M. and Leroi, F. (2001) Spoilage potential and sensory profile associated with bacteria isolated from cold-smoked salmon. *Food Research International* **34**, 797–806.
- Thurette, J., Membre, J.M., Hanching, L., Tailliez, R. and Catteau, M. (1998) Behavior of *Listeria* spp. in smoked fish products affected by liquid smoke, NaCl concentration, and temperature. *Journal of Food Protection* **61**, 1475–1479.
- Truelstrup Hansen, L. and Huss, H.H. (1998) Comparison of the microflora isolated from spoiled cold-smoked salmon from three smokehouses. *Food Research International* **31**, 703–711.
- Vescovo, M., Torriani, S., Orsi, C., Macchiarolo, F. and Scolari, G. (1996) Application of antimicrobial-producing lactic acid bacteria to control pathogens in ready-to-use vegetables. *Journal of Applied Bacteriology* **81**, 113–119.
- Wessels, S. and Huss, H.H. (1996) Suitability of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 as a protective culture for lightly preserved fish products. *Food Microbiology* **13**, 323–332.
- Yamazaki, K., Suzuki, M., Kawai, Y., Inoue, N. and Montville, T.J. (2003) Inhibition of *Listeria monocytogenes* in cold-smoked salmon by *Carnobacterium piscicola* CS526 isolated from frozen surimi. *Journal of Food Protection* **66**, 1420–1425.

---

# CHAPITRE II

**EFFET DE L'ENSEMENCEMENT DE *CARNOBACTERIUM* SUR LES  
CARACTERISTIQUES ORGANOLEPTIQUES ET LES FLORES ENDOGENES  
DU SAUMON FUME**

---

**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**

**BRILLET Anne, PILET Marie-France, PREVOST Hervé,  
CARDINAL Mireille and LEROI Françoise**

*International Journal of Food Microbiology, article in press.*

---

## Introduction

Les travaux précédents ont permis de mettre en évidence une souche de *Carnobacterium* inhibitrice intéressante pour la suite des expériences. Cependant, il est nécessaire de tester **l'effet de l'ensemencement des trois *Carnobacterium* sur les qualités organoleptiques du saumon fumé** afin de ne pas choisir une souche inhibitrice dont l'utilisation provoquerait l'altération du produit. Pour cela l'ensemencement individuel des souches est réalisé sur saumon fumé stérile, et des dénombrements, des analyses sensorielles (aspect, odeur), des mesures de paramètres physico-chimiques (sel, phénols, eau, lipides, pH, ABVT), et de dosage de bactériocines et d'amines biogènes sont réalisés. A l'issue des résultats, le choix définitif de la souche de *Carnobacterium* sera effectué pour la suite des expériences.

Nous souhaitons également étudier **l'effet de l'ensemencement de la souche sélectionnée sur les flores endogènes du saumon fumé du commerce** afin de mettre en évidence ses éventuelles capacités à inhiber les flores d'altération. Nous avons choisi de travailler sur quatre lots de saumon fraîchement fumés provenant de quatre usines différentes et fabriqués selon le procédé de transformation traditionnel (salage au sel sec). En effet, la flore du saumon étant extrêmement variable d'une usine à l'autre, nous avons voulu tester la souche sélectionnée sur plusieurs lots. Comme dans l'expérience précédentes, des dénombrements de flores pertinentes pour évaluer la qualité du saumon, des analyses sensorielles (aspect, odeur, goût, texture), des mesures de paramètres physico-chimiques (sel, phénols, eau, lipides, pH, ABVT), et des dosages de bactériocines et d'amines biogènes sont effectués tout au long de la période de conservation des lots.

Les différents travaux mis en oeuvre sont présentés dans l'article suivant. Différents outils d'évaluation de la qualité sensorielle ont été utilisés (analyses sensorielles, mesure d'ABVT...). Cependant tous les résultats des analyses sensorielles n'ont pas pu être mis dans la publication et seront donc ajoutés à la suite.

## Résultats importants

**Les potentialités altérantes des trois souches de bactéries lactiques** (*Carnobacterium divergens* V41, *C. piscicola* V1 et *C. piscicola* SF668) **ont été testées sur du saumon fumé stérile**. La croissance des souches n'a pas été aussi forte que dans les essais effectués dans le chapitre I (taux maximum de  $10^{6,5}$  UFC/g au bout de 28 jours, contre  $10^{7-8}$  dans les essais précédents), ces résultats pouvant peut-être être attribués au taux de phénols plus fort dans ce lot de saumon fumé (1,3 mg/100 g contre 0,8). Néanmoins, on retrouve comme précédemment une **implantation légèrement meilleure pour la souche de *C. divergens* V41**. Aucune des souches ne produit d'ABVT (un des critères d'altération du saumon fumé) ni ne modifie le pH du produit. Par contre, elles produisent toutes une amine biogène, la **tyramine** mais à des teneurs inférieures à celles retrouvées classiquement dans le saumon fumé du commerce (Jorgensen *et al.*, 2000b ; Connil *et al.*, 2002c). Au niveau sensoriel, le jury (14 personnes entraînées, notant 19 critères d'odeur) n'a perçu aucune différence entre les 3 souches et le témoin non ensemencé, sauf pour le critère « fromage pied » légèrement plus élevé au bout de 21 jours de stockage pour la souche de *C. divergens* V41, mais avec une note ne dépassant pas 1 sur une échelle de 10. La souche ***C. divergens* V41**, donnant des résultats exceptionnels sur l'inhibition des *L. monocytogenes* (chapitre I) et **ne semblant pas présenter d'effets d'altération notoires, a donc été sélectionnée pour une implantation sur du saumon du commerce**.

**Quatre lots de saumons fumés différents** ont été ensemencés par pulvérisation avec la souche de *C. divergens* V41 afin de voir si elle a **un effet sur les flores endogènes du saumon fumé du commerce**. Les résultats des analyses montrent deux grands cas de figures.

a- **Soit les lots de saumons fournis sont très propres** (toutes les flores initiales sont inférieures à 20 UFC/g, cas des usines A et D), et dans ce cas, ***C. divergens* V41 s'implante facilement** ( $10^{7-8}$  UFC/g dès la 2<sup>ème</sup> semaine). Un effet sur les flores endogènes est perçu au bout de 21 jours, avec une **légère inhibition des *Lactobacillus*, des entérobactéries et des levures** (en général, 1 à 2 log de moins sur les lots ensemencés avec la souche, mais ces différences ne sont statistiquement pas significatives dues à une très grande variabilité des 3 répétitions). En présence de la souche inoculée, une production de **tyramine** trois fois

supérieure à celle retrouvée dans les essais sur saumon fumé stérile est observée, probablement due à la meilleure croissance de la souche dans les lots de saumon fumé du commerce qui contenaient deux à trois fois moins de phénols. Au niveau organoleptique, l'ajout de la souche de *C. divergens* V41 est perçue par le jury (goût et odeur) mais avec une intensité très faible, et les échantillons ensemencés ne sont jamais jugés comme très altérés. La perception sensorielle de la souche est peut être liée à une production d'ABVT (25 mg-N/100 g dans l'essai ensemencé, contre 15 dans le témoin). Cette production, qui n'avait pas été mise en évidence dans le saumon stérile est peut-être la conséquence d'un métabolisme associatif entre le ferment lactique ajouté et les flores endogènes.

b- **Soit les lots sont déjà relativement contaminés** en sortie usine (flore totale atteignant  $10^{4-5}$  UFC/g, usines B et C), avec des *Lactobacillus* qui deviennent vite majoritaires au cours de la conservation, mais aussi la présence d'autres genres de bactéries lactiques, d'entérobactéries, de levures et de *Brochothrix* dans des proportions variables selon l'usine. Dans ce cas, il est parfois difficile de savoir si *C. divergens* V41 s'implante correctement car il se trouve à peu près en même quantité que les autres flores. **L'ensemencement par *C. divergens* V41 n'a aucun effet sur les flores endogènes**, ni sur la production d'ABVT qui est déjà très forte dans le témoin. Concernant les amines biogènes, leurs concentrations sont comparables dans les essais inoculés par la souche et les témoins. De même, au niveau organoleptique, on observe peu de différences entre l'essai ensemencé et le témoin, les lots étant tous jugés très altérés par le jury dès la deuxième ou troisième semaine de conservation.

Par ailleurs, au cours de cette étude, un lot de saumon fumé présentait une contamination initiale en *Listeria* spp. (8 UFC/g), retrouvée tout au long de la conservation. Le même lot ensemencé par *C. divergens* V41 était légèrement moins contaminé que le témoin (cependant la différence est non significative statistiquement car la contamination est très faible). Notons que l'identification de 5 colonies de *Listeria* spp. isolées lors de cette expérience n'a pas pu mettre en évidence la présence de *L. monocytogenes* dans ce lot de saumon (tests sur gélose ALOA et Compass, résultats non présentés).

---

En conclusion, la souche de *C. divergens* V41 semble un bon candidat pour empêcher le développement de *L. monocytogenes* dans le saumon fumé. Sur des lots de bonne qualité microbiologique initiale et ne présentant pas de signes d'altération pendant toute la durée du stockage, *C. divergens* V41 s'implante facilement et sa présence est légèrement perçue par un jury entraîné, mais n'est jamais notée comme très altérante. Un test consommateur serait pertinent pour juger de l'acceptabilité de cette technologie. Sur des lots présentant une forte contamination initiale, la souche n'a pas d'effet sur les caractéristiques microbiologiques et organoleptiques du produit. Enfin, la production de tyramine par *C. divergens* V41 dans le saumon fumé, peut apparaître gênante dans le cadre de l'utilisation de cette souche en biopréservation. Une solution alternative sera développée et proposée dans le chapitre V.

La suite des travaux sera consacrée à la détermination du niveau d'inhibition lié à la compétition nutritionnelle par rapport à l'inhibition obtenue grâce à l'activité de la bactériocine chez *C. divergens* V41, afin d'évaluer l'importance du rôle de la bactériocine sur l'action anti-listeria de la souche sélectionnée.

**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**

**BRILLET Anne <sup>a</sup>, PILET Marie-France <sup>a</sup>, PREVOST Hervé <sup>a</sup>, CARDINAL Mireille <sup>b</sup> and LEROI Françoise <sup>b,\*</sup>**

<sup>a</sup> **Laboratoire de Microbiologie Alimentaire et Industrielle, ENTIAA, BP 82225, 44322 Nantes Cedex 3, France**

<sup>b</sup> **Laboratoire de Génie Alimentaire, IFREMER, BP 21105, 44311 Nantes Cedex 03, France**

*Corresponding author* : Dr F. Leroi, Laboratoire de Génie Alimentaire, IFREMER, Rue de l'Île d'Yeu, BP 21 105, 44 311 NANTES cedex 3, France.

Phone : +33-2-40 37 41 72 ; email : fleroi@ifremer.fr



## Abstract

The aim of this study was to develop a biopreservation strategy for cold-smoked salmon (CSS) by the use of lactic acid bacteria previously selected for their capability to inhibit the growth of *Listeria monocytogenes* in the product. The spoiling potential of three *Carnobacterium* strains (*C. divergens* V41, *C. piscicola* V1 and SF668) was tested in sterile CSS blocks inoculated by  $10^{4-5}$  CFU g<sup>-1</sup> and stored under vacuum for nine days at 4°C followed by 19 days at 8°C. *C. divergens* V41 grew a little faster than the other strains and none of the three carnobacteria showed any adverse effect on quality of the product (no off-odour detected by a trained panel, no total volatile basic nitrogen (TVBN) production, no acidification, no biogenic amine except a slight production of tyramine). An application on commercial CSS was tested by spraying *C. divergens* V41 ( $10^{4-5}$  CFU g<sup>-1</sup>) on slices of four batches freshly processed in different smokehouses. Microbial, chemical and sensory characteristics were weekly compared to a control during four weeks of vacuum storage. When the natural microflora was initially weak (two batches < 20 CFU g<sup>-1</sup>), *C. divergens* V41 quickly reached  $10^{7-8}$  CFU g<sup>-1</sup> and a slight inhibition of endogenous Enterobacteriaceae, lactobacilli and yeasts was observed. The presence of *C. divergens* V41 was slightly detected (odour and flavour) but none of the sample was considered as spoiled by the sensory panel. When the natural microflora was initially high (2 batches >  $10^{4-5}$  CFU g<sup>-1</sup>), no effect on the microflora, TVBN and biogenic amine production, nor on the sensory characteristics was observed in presence of *C. divergens* V41. In conclusion, biopreservation of CSS using lactic acid bacteria such as *C. divergens* V41 is a promising way to inhibit the growth of pathogenic bacteria such as *L. monocytogenes* with low effect on the quality of the product.

**Keywords** : cold-smoked salmon, biopreservation, *Carnobacterium*, spoilage microflora, biogenic amine, sensory analysis

## 1. Introduction

The cold-smoked salmon (CSS) market has grown rapidly during the last twenty years. The production of CSS within the European community supplies nearly 80% of the world market with an annual production rising 70000 tonnes (FAO, 2003). France is the first worldwide producer with approx. 19000 tonnes/year but other countries such as Denmark, Germany and United Kingdom have recently increased their production. Salting and smoking treatments which were traditionally used as preservation technology are nowadays lighter leading to highly perishable product, with an average salt content of around 5 % (water phase) in Europe and phenol content less than 1 mg 100 g<sup>-1</sup> (Cardinal et al., 2004). The major risk associated with this product is *Listeria monocytogenes* (Bledsoe et al., 2001). *L. monocytogenes* is of special concern to the CSS industry because it is able to grow at low temperature and in presence of high NaCl concentration. Indeed, a high prevalence of *L. monocytogenes* in CSS has been reported (Ben Embarek, 1994; Rorvik et al., 1995; Heinritz and Johnson, 1998; Jorgensen and Huss, 1998) and the processing steps (i.e. salting and smoking) are insufficient to inactivate this pathogenic bacterium (Guyer and Jemmi, 1991; Ribeiro Neunlist, in press). Moreover, growth in the final product stored at chilled temperature is possible (Jorgensen and Huss, 1998; Duffes et al., 1999a; Nykanen et al., 2000) and *L. monocytogenes* can reach 100 CFU g<sup>-1</sup> which is the maximum tolerable limit till the sell-by date in many European countries. Recently, a biopreservation strategy for this product has been developed. Biopreservation consists in inoculating food product by selected bacteria to inhibit the growth of undesired micro-organisms, without changing quality of the product. The inhibition capacity of three bacteriocin-producing strains isolated from seafood, *Carnobacterium divergens* V41, *C. piscicola* V1 and *C. piscicola* SF668, has been demonstrated against a wide collection of *L. monocytogenes* both in agar plate and in sterile CSS blocks artificially contaminated (Brillet et al., 2004). The three carnobacteria strains gave promising results, *C. divergens* V41 being the most efficient strain, maintaining the level of *L. monocytogenes* lower than 50 CFU g<sup>-1</sup> (initial contamination : 20 CFU g<sup>-1</sup>) during the four weeks of vacuum storage at 4° and 8°C.

In order to bring the biopreservative technology to a stage where it can become available for the CSS industry, it is necessary to evaluate the effect of the *Carnobacterium* strains on the quality of CSS. It has been clearly stated that the early quality deterioration of vacuum-packed CSS during vacuum storage at chilled temperature, resulting in the occurrence of off-odours and pasty textures (Stohr et al., 2001), is due to microbial activity

(Joffraud et al., 1998). However, spoilage mechanisms are still incompletely understood. Several authors have identified the CSS microflora (Truelstrup Hansen et al., 1998; Stohr et al., 2001) which is highly variable both qualitatively and quantitatively due to difference in the final product composition and in hygienic conditions in the smokehouses (Truelstrup Hansen and Huss, 1998; Leroi et al., 2001). Just after the process, the microflora is often composed of a mixture of Gram-negative marine bacteria such as *Shewanella putrefaciens*, *Photobacterium phosphoreum*, *Vibrio* spp. and psychrotrophic Enterobacteriaceae (Truelstrup Hansen et al., 1995; Leroi et al., 1998; Jorgensen et al., 2000a). During the vacuum storage at refrigerated temperatures, Gram-positive bacteria especially lactic acid bacteria (LAB), represented by *Lactobacillus* spp. and *Carnobacterium* spp. become by far the most common variety (Truelstrup Hansen and Huss, 1998; Leroi et al., 1998). *Brochothrix thermosphacta* and yeasts can also be found in CSS but generally at lower level (Leroi et al., 2001). When inoculated in pure culture in sterile cold-smoked salmon blocks, those micro-organisms do not all participate in spoilage. *Lb. sakei*, *B. thermosphacta*, *Serratia liquefaciens* and *P. phosphoreum* have been shown to be responsible of off-odours whereas the spoilage potential of *C. piscicola* is promisingly weak depending on the strain tested (Stohr et al., 2001).

The aim of the present study was to evaluate the effect of three biopreservative *Carnobacterium* strains showing a high inhibition potential of *L. monocytogenes* (Brillet et al., 2004) on microbiological, chemical and sensory quality of CSS. First, the spoilage potential of *C. divergens* V41, *C. piscicola* V1 and *C. piscicola* SF668, was studied on a sterile CSS system by sensory evaluation of off-odour production and analysis of some physico-chemical indices. Then one of the strains, *C. divergens* V41, was sprayed on slices of commercial CSS batches freshly processed, provided by four different French producers. The effect of inoculation on the sensory characteristics (odour, flavour, texture and colour), physico-chemical parameters (pH, TVBN, biogenic amines) and natural microflora was evaluated during the four weeks of storage at refrigerated temperature.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Bacterial strains and subcultures conditions

*C. divergens* V41 and *C. piscicola* V1 were isolated from salmon and trout intestine respectively and characterized by Pilet et al. (1995). *C. piscicola* SF668 was isolated from

commercial Norwegian CSS by Leroi et al. (1998), and studied by Duffes et al. (1999b). All strains were stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  in their growth medium with 20 % (v/v) sterile glycerol.

Elliker broth (BK 054, Biokar Diagnostics, Beauvais, France) was used as subculture medium to cultivate the *Carnobacterium* strains for 24 h at  $20^{\circ}\text{C}$  before inoculation in sterile CSS. As commercial CSS inoculated with *C. divergens* V41 was eaten by the panellists for sensorial analysis, the broth used to cultivate *C. divergens* V41 before inoculation was prepared without protein of animal origin, and contained wheat trypton ( $20\text{ g L}^{-1}$ ), glucose ( $5\text{ g L}^{-1}$ ), saccharose ( $5\text{ g L}^{-1}$ ), yeast extract ( $5\text{ g L}^{-1}$ ), NaCl ( $4\text{ g L}^{-1}$ ), ascorbic acid ( $0.5\text{ g L}^{-1}$ ),  $\text{MgSO}_4$  ( $0.4\text{ g L}^{-1}$ ) and  $\text{MnSO}_4$  ( $0.1\text{ g L}^{-1}$ ). This medium was named WAP (Without Animal Protein) broth.

## 2.2. Cold-smoked salmon

Sterile CSS blocks were prepared as described by Joffraud et al. (1998) and modified by Brillet et al. (2004), from five Norwegian farmed salmons (*Salmo salar*) of approximately 4-5 kg, processed at IFREMER. Vacuum-packed bags of 300 g of CSS blocks were sterilised under frozen conditions ( $-80^{\circ}\text{C}$ ) by ionising treatment at 1.2 kGy (Gradient Ouest, Berric, France). Bags were stored frozen until inoculation.

The commercial salmons (Norwegian farmed *Salmo salar*), traditionally processed (dry-salting, traditional smoking with smoke from beech and oak shaving combustion), were provided by four different French CSS producers. Each batch, at least constituted of 10 fillets, was freshly processed, sliced in constant 40 g weight slices and vacuum-packed just before conveying in refrigerated conditions at our laboratory. Sliced fillets were stored at  $4^{\circ}\text{C}$  just after reception and slices were inoculated in the following hours.

## 2.3. Sample preparation and storage

### 2.3.1. Sterile CSS blocks

Cultures of *C. divergens* V41, *C. piscicola* V1 and SF668 were carried out twice successively in 10 and then 100 ml of Elliker broth for 24 h at  $20^{\circ}$  before cells were centrifuged and washed in sterile saline water (NaCl : 0.85 % w/v). Immediately, appropriate dilutions of *Carnobacterium* strains were inoculated separately (2 % v/w) in 15 replicate samples of 50 g (for microbial and chemical analysis) and 28 samples of 20 g (for sensory analysis) of thawed sterile CSS blocks distributed in polyamide polyethylene bags (Bourdeau,

St Etienne de Montluc, France). Pieces were gently mixed with the inoculating solution and samples were then vacuum-packed and incubated for 28 days using the following conditions : nine days at 4°C followed by 19 days at 8°C as specified in the French standard for shelf-life validation of perishable and refrigerated food (NF V 01-003, 2004) with a break during 2 h at 20°C after 19 days of storage (industrial recommendations). The initial desired level in the flesh for *Carnobacterium* spp. was  $10^5$  CFU g<sup>-1</sup>. A control made of CSS blocks inoculated with 2 % of sterile saline was also prepared.

### 2.3.2. Commercial CSS slices

Cultures of *C. divergens* V41 were carried out twice successively in 10 and then 100 ml of WAP broth for 24 h at 20°C and cultures were washed as previously described for sterile CSS experiments. Immediately, appropriate dilution of *C. divergens* V41 was aseptically sprayed (1 % v/w) on each side of 70 slices per batch of commercial CSS with an aerographer (Paasches V, Paasche Airbrush Company, Illinois, USA). Slices were sprayed in a laminar flow hood. Slices were then aseptically installed on carbon tray (two slices per tray) and vacuum-packed in bags provided by each producer, to be in the same packing conditions as in supermarkets. The initial desired level in the flesh for *C. divergens* V41 was  $10^5$  CFU g<sup>-1</sup>. For each batch, a control was made of 70 slices packed in the same fashion as inoculated samples but without spraying saline, to be exactly as in commercial processing conditions. Samples and controls were stored for 28 days in the conditions previously described for sterile CSS experiments.

### 2.4. Microbiological analysis

For both inoculated CSS blocks and commercial slices, microbial analysis was done weekly in triplicate samples. Salmon samples (30 g) were homogenised and diluted in 120 ml chilled physiological saline containing 0.85 % (w/v) NaCl and 0.1 % (w/v) tryptone (Biokar Diagnostics) for 2 min in a stomacher (Lab. Blender, London, UK). After 30 min at room temperature, the homogenate was 10-fold serially diluted in physiological saline, and 0.1 ml or 1 ml of each appropriate dilution was spread-plated or pour-plated respectively in duplicate. For commercial CSS slices, total viable counts (TVC), total LAB, lactobacilli, Enterobacteriaceae, *B. thermosphacta* and yeasts were enumerated with appropriate agar medium and incubation conditions, as described by Cardinal et al. (2004). *Listeria* spp. was

enumerated in pour plates of Palcam agar (BK145, Biokar Diagnostics) with selective supplement (BS00408, Biokar Diagnostics). Plates were incubated at 30°C for 48 hours. In order to lower the threshold to one *Listeria* spp. per gram, five Palcam plates per sample were inoculated. For CSS inoculated blocks, only total LAB were enumerated, corresponding to the inoculated carnobacteria.

### 2.5. Chemical analysis

For both inoculated blocks and commercial CSS, 200 g of flesh were sampled just after processing, and homogenised in a Warring Blender. Dry matter content was analysed by oven drying 10 g of homogenate smoked salmon at 103°C until reaching a constant weight. Total fat content was determined by hexane extraction, and sodium chloride content was measured with a Chloride Analyser 926 (Corning, Halstead, England). Total phenols were quantified by the colorimetric method described by Cardinal et al. (2004).

Each week during storage, the remaining flesh in each package opened for microbiological analysis was homogenised in a Warning Blender. TVBN was determined in duplicate by the Conway micro-diffusion method (Conway and Byrne, 1933). The pH was measured in the homogenate of CSS used for microbiological analysis with a pH-meter (Mettler Delta 320, AES, Combourg, France).

### 2.6. Bacteriocin activity

For all samples (both inoculated CSS blocks and commercial slices) 1 ml of the five-fold dilution flesh was heated for 15 min at 80°C to inactivate protease and was stored at –80°C until used. Bacteriocin concentration was semi quantified against *L. monocytogenes* RF76 target strain (IFREMER collection) by a standardised agar diffusion test with critical dilution assay (Connil et al., 2002a).

### 2.7. Biogenic amines

Another fraction of 1 ml of the five-fold dilution flesh was kept at –80°C for biogenic amines analysis (tyramine, histamine, cadaverine and putrescine). According to Eerola et al. (1993), quantification of biogenic amines requires a step of derivatization of sample extract. The protocol has been modified as follow : 100 µl of NaOH (2N) were added to 300 µl of

thawed-homogenate of CSS. Next, 150 µl of saturated sodium bicarbonate were added, followed by 1 ml of freshly prepared dansyl chloride solution (10 mg dansyl chloride (Sigma Aldrich, L'Isle d'Abeau Chesnes, France) in 1 ml of acetone). Reaction mixture was incubated at 40°C during 45 min safe from the light. Then, residual dansyl chloride was removed by adding 50 µl ammonia. After 30 min in darkness, 700 µl of acetonitrile were added, and reaction mixture was centrifuged 10 min at 4000 g. Finally, supernatant was collected in glass tube and stored at -20°C before analysis. Dansylated amines in homogenate of CSS were then separated by reversed-phase liquid chromatography (Eerola et al., 1993) on a C18 ODS2 Equisorb column (4.6x250 mm, particle size 5 µm, CIL Cluzeau, France) mounted with a C18 Bondapack guard column (Waters, France) with a HPLC apparatus (Waters 600E Multisolute Delivery System and Waters 2487 Dual λ Absorbance Detector, Waters, France). The gradient elution was carried out with eluent A (ammonium acetate, 0.1 mol l<sup>-1</sup>) and eluent B (acetonitrile) as describe by Connil et al. (2002a). Dansylated amines were detected by u.v. absorption at 254 nm and their concentrations in each homogenate of CSS were calculated by a calibration curve for each amine (Borwin software).

## 2.8. Sensory analysis

The method used was a quantitative descriptive analysis with conventional profiling performed by an internal regularly trained panel of 14 people (IFREMER). Panellists were required to make a comparative evaluation of the products by scoring each descriptor on an unstructured line scale from zero (low intensity) to ten (high intensity). For CSS blocks, the four samples (three inoculated batches with different *Carnobacterium* spp. and control) were evaluated in one session. Nineteen odour descriptors were quoted after one and three weeks of storage, using 20 g of blocks per panellist. For commercial CSS slices, 34 sensory attributes (odour, appearance, flavour and texture) were weekly scored by the panel. Two sessions per week were necessary to evaluate all the samples (two commercial batches inoculated with *C. divergens* V41 and their control per session). The day of analysis, each package was opened and slices were cut in two portions individually repacked in aluminium foils. The main relevant and discriminative descriptors of smoked salmon slices were : *odour* : global intensity, smoke, raw salmon, herring, amine, acid, green aroma, rancid, ham, plastic, fruity, sour, butter, rubber, cheese, musty, hydrogen sulphide, cabbage, fecal ; *appearance* : pink colour, orange colour, homogeneity of colour ; *flavour* : global intensity, smoke, raw salmon,

herring, rancid, salty taste, acid, amine, rubber ; *texture* : firmness, melting texture, pasty texture.

Another objective of the sensory evaluation was to assess the sensory rejection time. Samples were scored by the same 14 trained panellists who classified them into the following three classes defined by spoilage level on the basis of odour, flavour, texture and colour evaluation : class 1, no spoilage noted, class 2 : weak spoilage, class 3 : strong spoilage. A quality coefficient (QC) was calculated as follow (Leroi et al., 2001):  $QC = [(1 \times \% \text{ class 1}) + (2 \times \% \text{ class 2}) + (3 \times \% \text{ class 3})]/100$ . A sample was rejected when QC was higher than 2, corresponding to sample scored in class 3 by at least 50 % of the panellists.

### 2.9. Statistical analysis

Results are expressed as mean of three measures  $\pm$  95% Confidence Interval (CI =  $1.96 \times \sqrt{\frac{\text{standard deviation}^2}{3}}$ ). For microbial and chemical data, means were compared by one-way analysis of variance with the least significance difference (LSD) test at the 0.05 level of probability (Statgraphics Plus, version 4, Sigma Plus). For CSS blocks, results of the sensory profiling test were treated by two-way analysis of variance (ANOVA) to test the effect of the carnobacteria strains and panellists with Fizz 2.00 software (Fizz system, Biosystèmes, Dijon, France). In case where significant differences occurred, the means were compared by the Duncan test at the 0.05 level of probability. For each batch of commercial CSS, slices inoculated with *C. divergens* V41 were compared to their respective control. Score for each descriptor was compared using a paired-sample Student test (Fizz system).

## 3. Results

### 3.1. Effect of Carnobacterium spp. in sterile CSS blocks

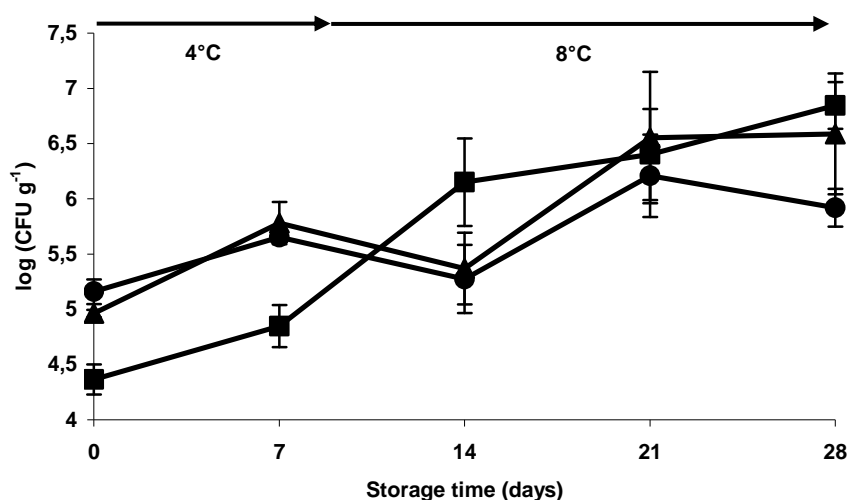
The salt and total phenol concentrations of CSS blocks used in these experiments were respectively 3.2% (w/w, total phase) corresponding to 5.0% (w/w, water phase) and 1.33 mg 100 g<sup>-1</sup>. Dry matter and total fat content were 40.1% (w/w) and 15.1 % (w/w) respectively.

Fig. 1 represents growth of the three carnobacteria in inoculated CSS during the four weeks of vacuum storage at chilled temperature. All strains grew in CSS blocks. For the two *C.*



*piscicola* strains, growth curves were similar during the first three weeks but final count was slightly higher for *C. piscicola* V1 than for *C. piscicola* SF668 ( $5.9 \pm 7.2 \times 10^6$  and  $8.7 \pm 3.6 \times 10^5$  CFU g<sup>-1</sup> respectively). For *C. divergens* V41, although the initial inoculation level was lower by approximately 1 log<sub>10</sub> (CFU g<sup>-1</sup>), the growth increased considerably at 8°C and this strain reached  $7.4 \pm 3.1 \times 10^6$  CFU g<sup>-1</sup> at the end of storage.

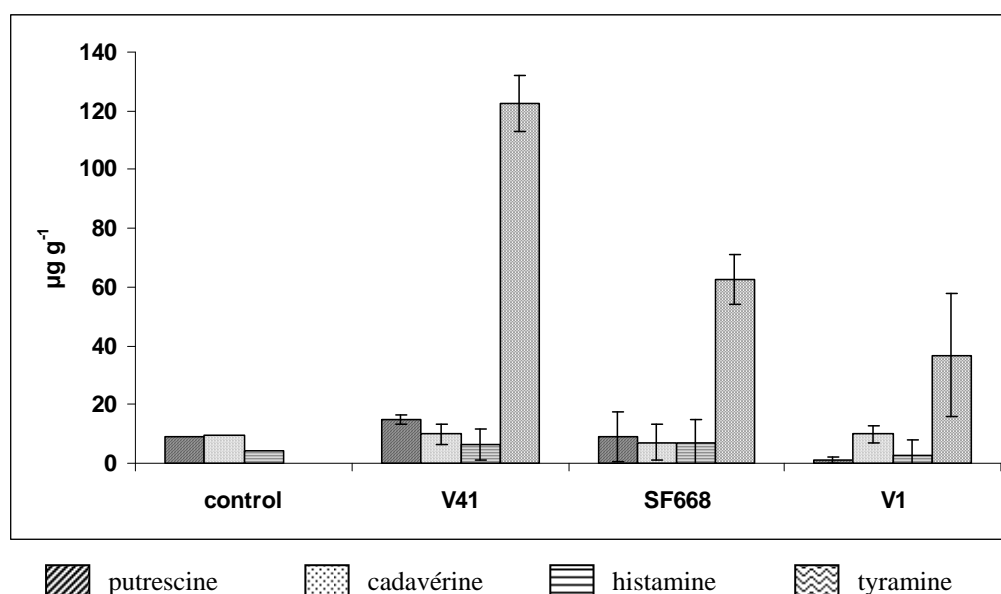
No TVBN was produced in CSS blocks, both in control and in inoculated samples. The average initial concentration was  $13.3 \pm 0.9$  mg-N 100 g<sup>-1</sup> and remained stable (data not shown) during the four weeks of storage whatever the *Carnobacterium* strain considered (the average concentration was  $15.3 \pm 1.7$  mg-N 100 g<sup>-1</sup> at the end of experiment). The pH was constant ranging between 5.95 and  $6.03 \pm 0.02$  during the four weeks of storage and was not significantly different in control and inoculated samples (data not shown). Bacteriocin was never detected by the agar diffusion test.



**Fig. 1** Growth of *Carnobacterium divergens* V41 (■), *Carnobacterium piscicola* SF668 (●) and *Carnobacterium piscicola* V1 (▲) in sterile cold-smoked salmon blocks during vacuum storage at 4 and 8°C. Each growth curve represents the mean of three enumerations (bars : 95% confidence interval).

Fig. 2 shows biogenic amines production in CSS blocks in presence of each *Carnobacterium* strain after four weeks of storage. The three carnobacteria strains produced tyramine, *C. divergens* V41 being the most important producer with  $122 \pm 9 \mu\text{g g}^{-1}$  of tyramine after four weeks. *C. piscicola* SF668 and V1 produced two to four times less tyramine concentrations, with  $63 \pm 8$  and  $37 \pm 21 \mu\text{g g}^{-1}$  respectively. None of the carnobacteria produced histamine, putrescine nor cadaverine.

After one week of storage, no significant difference between control and inoculated samples was observed for any of the nineteen sensory descriptors quoted, and samples were always considered as not spoiled (data not shown). Same results were observed after three weeks of storage, except a slight but significant note of cheese/feet detected in samples inoculated with *C. divergens* V41. However, the average score of the 14 panellists for this descriptor was very low (0.6 on a scale ranging from 0 to 10).



**Fig. 2** Biogenic amines concentration after four weeks of storage (nine days at  $4^{\circ}\text{C}$  and 19 days at  $8^{\circ}\text{C}$ ) in sterile cold-smoked salmon blocks (control) and in inoculated blocks with *Carnobacterium divergens* V41, *Carnobacterium piscicola* SF668 and V1 (bars : 95% confidence intervals).

### 3.2. Effect of *C. divergens* V41 in commercial CSS slices

In the first part of this study, no significant difference was observed between the three strains of carnobacteria concerning their spoilage potential in CSS. As *C. divergens* V41 had showed the highest inhibition capacity against a wide collection of *L. monocytogenes* (Brillet et al., 2004), this strain was selected for an application in naturally contaminated CSS slices. Chemical composition of each CSS batch is shown in Table 1. A wide variation among batches was noticed but all the results satisfied with the French CSS standard (NF V 45-065, 1997).

**Table 1** Chemical analysis of the four commercial cold-smoked salmon (CSS) batches

CSS batches	sodium chloride (% w/w WP)*	total phenols (mg 100 g <sup>-1</sup> )	dry matter (% w/w)	total fat (% w/w)
A	5.0	0.47	35.7	8.4
B	4.6	0.68	38.8	11.8
C	3.8	0.85	40.6	15.4
D	5.6	0.93	41.7	14.6

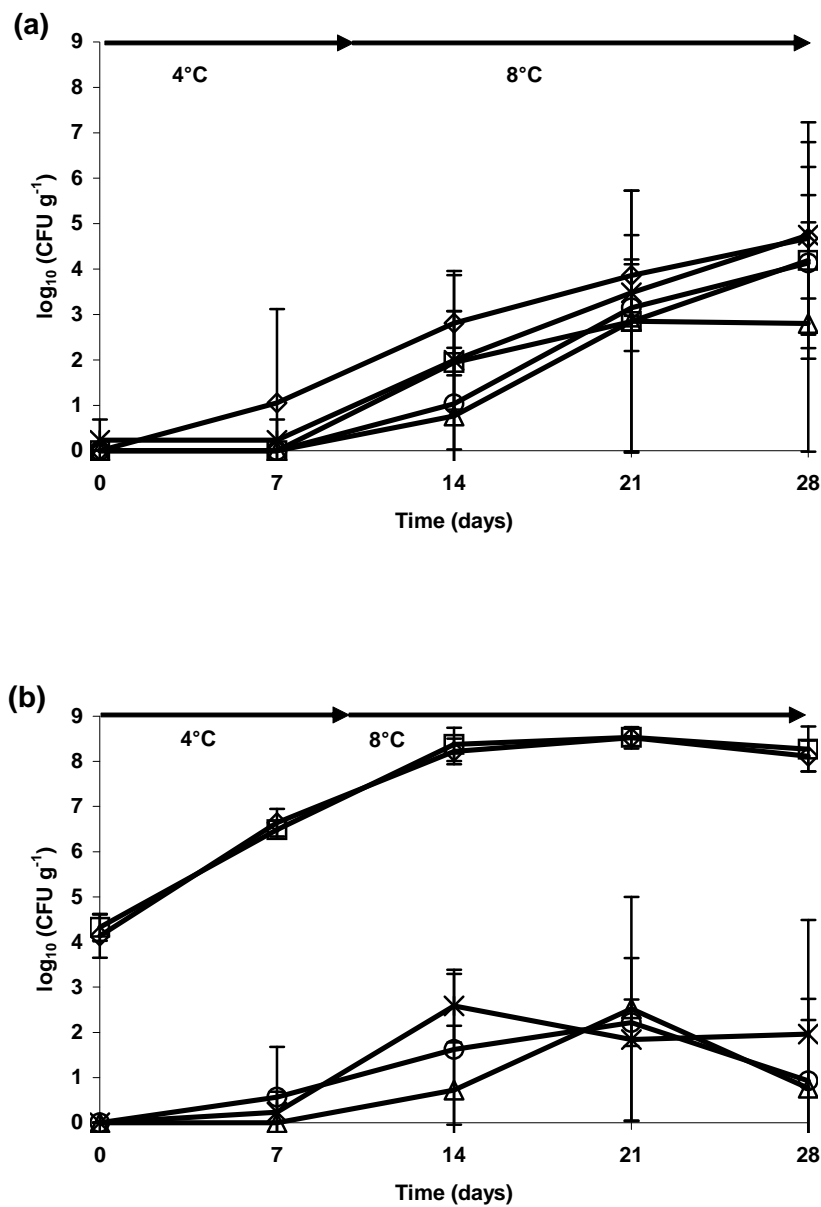
\* WP : in water phase = % NaCl (w/w in CSS) x 100 / % NaCl (w/w in CSS) + % water in CSS

#### 3.2.1. Effect of *C. divergens* V41 on microbiology

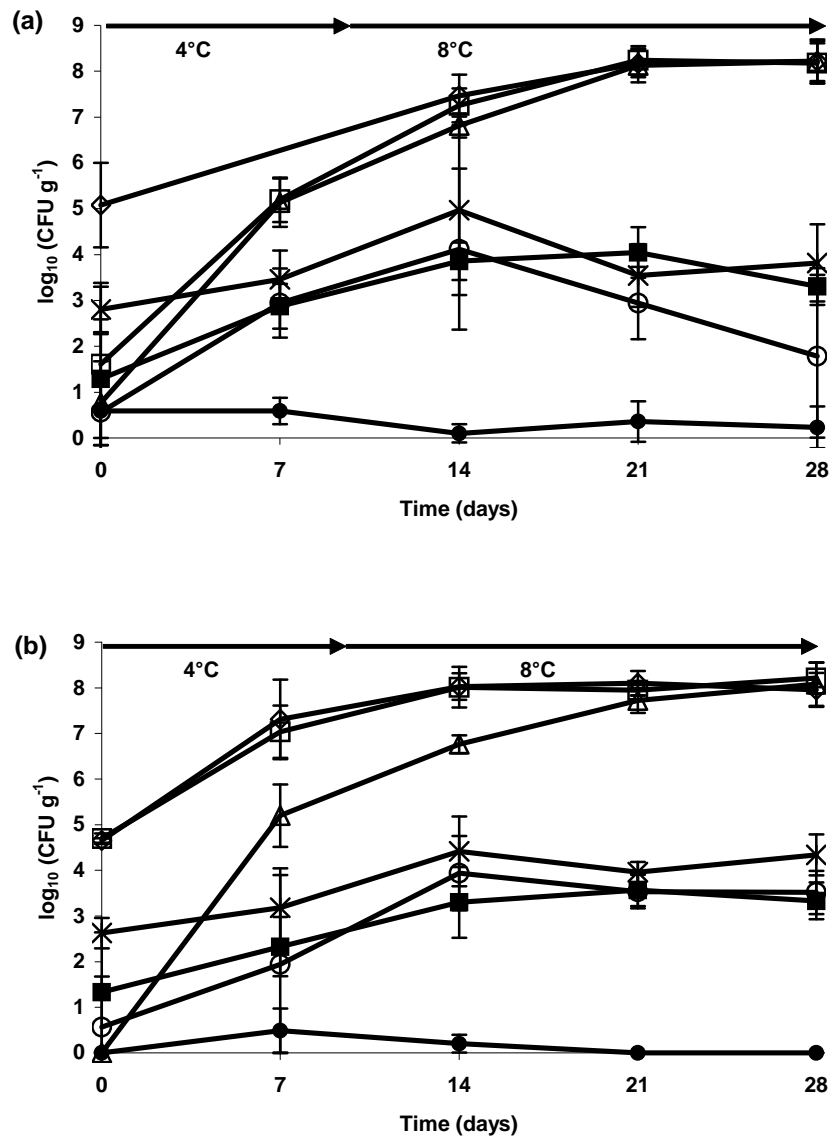
Just after reception, natural microflora of CSS was very different from one batch to another and two cases were observed : two batches (smokehouses A and D) were of high hygienic quality whereas two other batches (B and C) were strongly contaminated. In the first case (A and D), just after processing and reception of the batches at the laboratory, TVC was below the detection threshold (25 CFU g<sup>-1</sup>). In controls A, the microflora increased gradually to reach around 10<sup>5</sup> CFU g<sup>-1</sup> at the end of storage and was composed of a mixture of Enterobacteriaceae, yeasts and LAB partially represented by *Lactobacillus* (Fig. 3a). No *B. thermosphacta* nor *Listeria* spp. was detected on the plates. In controls D after four weeks of storage, a surprisingly very weak growth of the initial microflora was observed (data not shown) ; TVC never exceeded 10<sup>2</sup> CFU g<sup>-1</sup> and was represented by LAB probably belonging to the *Carnobacterium* genus (no count on Rogosa agar). When *C. divergens* V41 was

sprayed on batches A and D, TVC was only represented by the inoculated bacterium which grew from  $10^{4-5}$  to  $10^{7-8}$  CFU g<sup>-1</sup> in three weeks. The other groups of flora were slightly inhibited by the presence of *C. divergens* V41 (Fig. 3b). Average counts of Enterobacteriaceae, lactobacilli and yeasts never exceeded  $4 \times 10^2$ ,  $3 \times 10^2$  and  $2 \times 10^2$  CFU g<sup>-1</sup> respectively, whereas they reached  $6 \times 10^4$ ,  $7 \times 10^2$  and  $2 \times 10^4$  CFU g<sup>-1</sup> in controls. However, due to high heterogeneity in naturally contaminating flora within packages, differences between control and inoculated samples were not statistically significant.

In the second case (B and C, strongly spoiled CSS), TVC at the beginning of the storage was around  $10^5$  CFU g<sup>-1</sup> and was probably dominated by marine gram-negative bacteria such as *Photobacterium* spp., *Vibrio* spp., *Shewanella* spp. or *Pseudomonas* spp. TVC increased rapidly in both controls B and C and reached their maximum level ( $10^{7-8}$  CFU g<sup>-1</sup>) after one and three weeks respectively. LAB, mainly represented by lactobacilli, became rapidly the dominating flora but Enterobacteriaceae, *Brochothrix thermosphacta* and yeasts were also present at levels varying from  $10^2$  to  $10^4$  CFU g<sup>-1</sup>. As an example, Fig. 4a represents the evolution of naturally contaminating microflora of CSS for batch C. *Listeria* spp. were also detected in this batch, at a level never exceeding 8 CFU g<sup>-1</sup>, whereas in batch B, no colony was detected on Palcam plates. When *C. divergens* V41 was sprayed on batches B and C, the inoculated LAB represented the dominating flora during the first two weeks. However, it rapidly became difficult to distinguish the inoculated bacteria from the natural LAB contaminating slices because the level of LAB in controls was the same as in inoculated samples (Fig. 4b). No statistical reduction of the average count of the spoiling microflora was observed, for both batch B and C, during the four weeks storage period. Count of *Listeria* spp. in batch C was lowered ( $< 1$  CFU g<sup>-1</sup> after three and four weeks of storage) but inhibition was not significant due to very low level of contamination in control.



**Fig. 3** Growth of natural microflora (batch A) in control (a) and in the presence of *C. divergens* V41 (b) during vacuum storage at 4°C for nine days and 8°C for 19 days : (◇) total viable count, (□) lactic acid bacteria, (Δ) *Lactobacillus* spp., (×) Enterobacteriaceae, (○) yeast. Neither *Listeria* spp. nor *Brochothrix thermosphacta* were detected. Each growth curve represents the mean of three enumerations.



**Fig. 4** Growth of natural microflora (batch C) in control (a) and in the presence of *C. divergens* V41 (b) during vacuum storage at 4°C for nine days and 8°C for 19 days : (◇) total viable count, (□) lactic acid bacteria, (Δ) *Lactobacillus* spp., (×) Enterobacteriaceae, (o) yeast, (●) *Listeria* spp., (■) *Brochothrix thermosphacta*. Each growth curve represents the mean of three enumerations.

---

### 3.2.2. Effect of *C. divergens* V41 on physico-chemical parameters

All over the storage, the pH was rather stable in controls and in batches inoculated with *C. divergens* V41, ranging between 5.9 to 6.2, and no statistical difference was observed between samples. Results for TVBN production are shown in Table 2. In the first case (smokehouses A and D, high hygienic quality), no TVBN was produced, TVBN concentration ranging from  $16 \pm 0$  mg-N  $100 \text{ g}^{-1}$  and  $16 \pm 1$  mg-N  $100 \text{ g}^{-1}$  just after processing to  $18 \pm 2$  and  $21 \pm 2$  mg-N  $100 \text{ g}^{-1}$  in controls A and D respectively, after four weeks of storage. In the presence of *C. divergens* V41, TVBN production was slightly but significantly increased with  $29 \pm 0$  and  $25 \pm 2$  mg-N  $100 \text{ g}^{-1}$  after 4 weeks for samples A and D respectively. In the second case (smokehouses B and C, poor hygienic quality), important TVBN production was noticed in control ( $42 \pm 2$  and  $51 \pm 9$  mg-N  $100 \text{ g}^{-1}$  respectively, at the end of experiment) and there was no significant difference with inoculated samples ( $45 \pm 1$  and  $50 \pm 9$  mg-N  $100 \text{ g}^{-1}$  respectively). No bacteriocin activity was detected during storage by agar diffusion test, both for controls and inoculated samples.

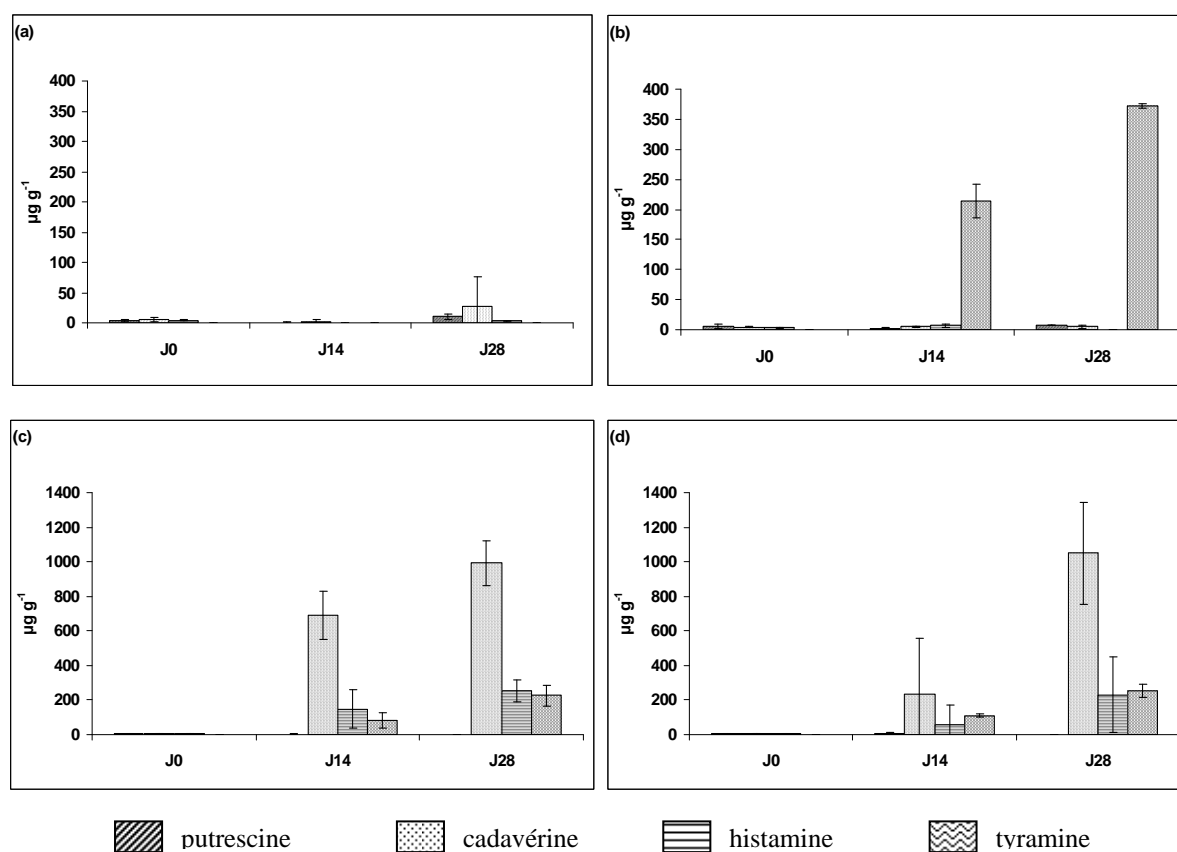
**Table 2** Total volatile basic nitrogen production (mg-N 100 g<sup>-1</sup>) in commercial batches of cold-smoked salmon alone and in the presence of *Carnobacterium divergens* V41, stored under vacuum during nine days at 4°C and 19 days at 8°C. Each result represents the mean of three measures (95% confidence interval).

CSS batch	Time (weeks)				
	0	1	2	3	4
A Control	16.4 (± 0.0)	16.6 (± 0.8)	18.8 (± 0.4)	16.7 (± 0.4)	18.2 (± 1.8)
A <i>C. divergens</i> V41	17.6 (± 0.2)	17.2 (± 0.9)	20.6 (± 1.0)	24.7 (± 1.9)	28.8 (± 0.0)
B Control	18.0 (± 3.2)	26.7 (± 9.4)	34.3 (± 3.1)	33.6 (± 2.7)	41.9 (± 2.0)
B <i>C. divergens</i> V41	19.5 (± 4.3)	32.3 (± 1.7)	38.1 (± 3.7)	39.5 (± 1.1)	44.8 (± 0.6)
C Control	16.2 (± 0.9)	26.6 (± 0.8)	29.5 (± 7.4)	44.0 (± 2.6)	51.3 (± 9.5)
C <i>C. divergens</i> V41	15.0 (± 0.8)	20.6 (± 6.8)	28.2 (± 6.8)	40.4 (± 1.9)	49.6 (± 8.6)
D Control	16.2 (± 0.9)	17.1 (± 1.9)	19.1 (± 1.2)	18.9 (± 1.2)	21.0 (± 2.0)
D <i>C. divergens</i> V41	15.9 (± 1.1)	17.0 (± 1.3)	19.4 (± 2.6)	27.4 (± 1.5)	25.0 (± 2.2)

The concentration of putrescine, cadaverine, histamine and tyramine produced during the storage is shown in Fig. 5 for batches A and C. In weakly spoiled CSS (batch A), no biogenic amine was detected except a weak quantity of putrescine and cadaverine in control (Fig. 5a) at the end of storage ( $10 \pm 5$  and  $28 \pm 9 \mu\text{g g}^{-1}$  respectively). In the presence of *C. divergens* V41, tyramine was produced ( $372 \pm 3 \mu\text{g g}^{-1}$  after four weeks), as it had previously been observed in inoculated sterile CSS blocks (Fig. 5b). In strongly spoiled CSS (batches B and C), biogenic amines were produced early during storage. As an example for batch C after two weeks,  $689 \pm 140$ ,  $147 \pm 110$  and  $81 \pm 3 \mu\text{g g}^{-1}$  of cadaverine, histamine and tyramine were respectively produced, reaching  $992 \pm 131$ ,  $254 \pm 66$  and  $226 \pm 61 \mu\text{g g}^{-1}$  after four



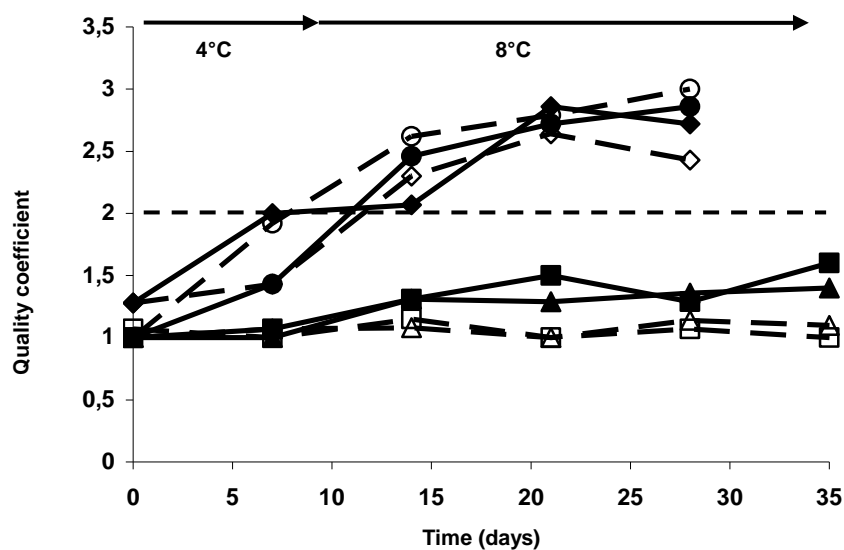
weeks (Fig. 5c). In the presence of *C. divergens* V41, a slight inhibition was observed in cadaverine and histamine production after two weeks (respectively  $235 \pm 322$  and  $59 \pm 110 \mu\text{g g}^{-1}$ ) but similar concentrations were observed at the end of storage ( $1050 \pm 295$  and  $231 \pm 216 \mu\text{g g}^{-1}$  respectively) (Fig. 5d). No significant difference between tyramine produced in naturally contaminated product (controls) and products inoculated with *C. divergens* V41 was noticed (respectively  $226 \pm 61$  and  $251 \pm 38 \mu\text{g g}^{-1}$  at the end of experiment). Similar results were observed in batch B (data not shown), excepted a slight putrescine production detected in controls and inoculated samples at the end of storage (respectively  $70 \pm 130$  and  $58 \pm 53 \mu\text{g g}^{-1}$ ).



**Fig. 5** Biogenic amines concentration in commercial cold smoked-salmon during vacuum storage at 4°C for nine days and 8°C for 19 days : (a) batch A, control ; (b) batch A inoculated with *Carnobacterium divergens* V41, (c) batch C, control (d) batch C inoculated with *Carnobacterium divergens* V41 (bars : 95% confidence intervals).

### 3.2.3. Effect of *C. divergens* V41 on sensory quality

Profiling sensory analysis were performed weekly on each batch of CSS (control and inoculated samples). In the first case (high hygienic quality, batches A and D), controls were of very high sensory quality all over the storage, with no degradation of the initial score for the 34 descriptors. Statistical analysis at 95% level of confidence revealed very few difference between controls and inoculated products for the descriptors of appearance, odour, flavour, and texture (data not shown). Inoculated products presented a slightly more intensive global and plastic odour, pink colour and firm texture but those differences were not observed regularly during storage. At 90% level of confidence, some odours such as sour, acid and feet and amine flavour were significantly higher in inoculated products than in controls, but always with a very low score (less than one on a scale ranging between zero and ten). The quality coefficient (QC) resulting of classification in three spoiling classes is shown on Fig. 6. Results confirm that control A and D were of very high quality during the four weeks of storage (QC = 1). The presence of *C. divergens* V41 was slightly detected by the trained panel after two to three weeks but QC remained always less than 1.5, which corresponds to products not or weakly spoiled. In the second case (batches B and C, strongly spoiled) controls were rejected by the panel (QC > 2) after 12 and 8 days respectively (Fig. 6). After three and two weeks for batches B and C respectively, panellists refused to eat the samples and only scored odour and appearance descriptors. The main sensory descriptors highly scored for these batches were amine and, to a lesser extend, sour, acid, cabbage, rancid and feecal odours. The presence of *C. divergens* V41 was not detected by the panel, for both batches B and C. There was no statistical difference between control and assays in any of the 34 sensory descriptors even at 90% level of confidence (data not shown) all over the storage period. Accordingly, low differences in QC between control and inoculated CSS slices were observed (Fig. 6).



**Fig. 6** Quality coefficient for commercial cold-smoked salmon batches. Open symbol : control ; closed symbol : inoculated with *Carnobacterium divergens* V41. Batch A ( $\square, \blacksquare$ ), batch B ( $\diamond, \blacklozenge$ ), batch C ( $\circ, \bullet$ ), batch D ( $\Delta, \blacktriangle$ ).

#### 4. Discussion

A strategy of biopreservation of CSS against *L. monocytogenes* risk by the use of LAB has been developed by Brillet et al. (2004). In order to allow implementation of this technology in the industry, the effect of the selected LAB on CSS quality had to be considered. The three *Carnobacterium* strains tested grew in inoculated CSS blocks, with a slight advantage for *C. divergens* V41. This result confirmed previous observations done by Brillet et al. (2004). However in the present study, final count of carnobacteria was always one to two  $\log_{10}$  (CFU  $g^{-1}$ ) lower than in the former study. This could be explained by a higher level of total phenols in this experiment (1.33 vs 0.81 mg 100  $g^{-1}$ ) (Thurette et al., 1998 ; Leroi et al., 2000), whereas salt concentrations were similar. No pH acidification was noticed in CSS blocks when inoculated with *C. divergens* V41, *C. piscicola* V1 or SF668, confirming the none aciduric status of carnobacteria. The three strains did not produce TVBN, which has been identified as one of the major quality index for CSS (Leroi et al., 2001). None of the three *Carnobacterium* strains showed any spoiling capacity according to the profiling test performed on odours by 14 trained panellists. These results are in agreement with previous

works in which *Carnobacterium* spp. were not considered as specific spoilage organisms (Leroi et al., 1998; Joffraud et al., 2001; Stohr et al., 2001) and were probably not involved in CSS spoilage (Paludan-Muller et al., 1998). Vaz-Velho et al. (in press) also have shown that *C. divergens* V41 did not produced off-odour in cold-smoked trout.

Concerning safety aspects, none of the three strains tested were able to produce histamine which is regarded as the main agent for scombroid fish poisoning (Taylor, 1986), nor putrescine and cadaverine, often correlated to spoilage (Jorgensen et al., 2000a). However, the three carnobacteria produced small amount of tyramine. Tyramine production by *Carnobacterium* spp. has already been observed by Edwards et al. (1987), Leisner et al. (1994) and Jorgensen et al. (2000b). In our set of experiments, *C. divergens* V41 was shown to be the greatest tyramine producer ( $122 \mu\text{g g}^{-1}$  vs  $63$  and  $37 \mu\text{g g}^{-1}$  for *C. piscicola* SF668 and V1 respectively) but this concentration is to be related to the highest *C. divergens* V41 count at the end of the experiment. To correlate tyramine production with cell numbers during bacterial growth, the apparent yield factor for production of tyramine,  $pY_{\text{TYR/CFU}}$ , was calculated according to Jorgensen et al. (2000b). The  $pY_{\text{TYR/CFU}}$  values were  $- 5.1 \pm 0.3$ ,  $- 4.8 \pm 0.2$  and  $- 4.1 \pm 0.1$  respectively for *C. piscicola* V1, *C. divergens* V41 and *C. piscicola* SF668 showing that *C. divergens* V41 and *C. piscicola* V1 had a lower activity of tyramine production than *C. piscicola* SF668 (i.e., lower  $pY_{\text{TYR/CFU}}$  value). Tyramine may cause migraine headaches and hypertensive effects, and in some cases can act as a potentiator of histamine effects (Ten Brink et al., 1990). However, tyramine concentration found in CSS blocks inoculated with *C. divergens* V41 is lower than natural tyramine concentrations currently reported in commercial CSS (Jorgensen et al., 2000b; Connil et al., 2002b). Moreover, no legal upper limit exists for tyramine in fish products in the European legislation and tyramine has never been associated with fish poisoning contrary to histamine. Finally, *C. divergens* V41 have shown the highest *L. monocytogenes* inhibitory capability (Brillet et al., 2004) which lead us to select it for an application on naturally contaminated CSS slices.

As the microbial ecology of CSS is very complex and may vary among smokehouses (Leroi et al., 2001), potential application of biopreservation on commercial CSS was tested by spraying *C. divergens* V41 at a level of  $10^{4-5}$  CFU  $\text{g}^{-1}$  on the slices of four batches provided by different smokehouses. According to several studies (Truelstrup Hansen and Huss, 1998; Leroi et al., 2001; Gram and Dalgaard, 2002; Cardinal et al., 2004), initial TVC just after

processing were very heterogeneous, with two batches presenting a very good hygienic quality ( $\text{TVC} < 25 \text{ CFU g}^{-1}$ ) and two batches being highly contaminated ( $\text{TVC} > 10^{4-5} \text{ CFU g}^{-1}$ ).

On weakly spoiled CSS slices (batches A and D), *C. divergens* V41 grew very well, from  $10^4$  to  $10^8 \text{ CFU g}^{-1}$  in two weeks. Growth was more obvious than in inoculated CSS blocks, probably due to a lower total phenol concentrations in batches A and D (respectively 0.47 and 0.93 mg  $100 \text{ g}^{-1}$ ) than in CSS blocks (1.33 mg  $100 \text{ g}^{-1}$ ) (salt contents were similar). It is also possible that bacterial growth on thin slices was enhanced compared with growth on blocks due to higher surface and nutrient availability. In the presence of *C. divergens* V41, growth of the different microflora specifically enumerated were slightly inhibited, but due to high heterogeneity of contamination of the slices inside a batch, those differences were not significant at the 95% probability level. Inhibition of lactobacilli could be explained by sensitivity of some *Lactobacillus* strains to divercin V41 produced by *C. divergens* V41 (Pilet et al., 1995). Inhibition of *Enterobacteriaceae* and yeasts could be due to nutrient competition but has not been further investigated. Concerning the TVBN production, an increase of around 10 mg-N  $100 \text{ g}^{-1}$  in samples containing the inoculated strain was observed in comparison with controls. This production had not been observed when *C. divergens* V41 was inoculated in CSS blocks, suggesting particular interaction between the LAB starter and the natural contaminating bacteria. For example, a high level production of TVBN has been observed in sterile CSS blocks inoculated with co-culture of *C. piscicola* and *B. thermosphacta* while no production was noticed by any of the strains when inoculated in pure culture (unpublished data). Nevertheless, the level of TVBN at the end of storage was always lower than the 30 mg-N  $100 \text{ g}^{-1}$  spoilage limit defined by Leroi et al. (2001) for CSS. No production of biogenic amines was detected in the controls whereas tyramine was produced in the samples inoculated with *C. divergens* V41 as it was expected. The amount of tyramine detected after four weeks of storage was three times higher than the amount measured in inoculated CSS, probably due to the high count of carnobacteria at the end of the storage. It is unlikely that production of tyramine by *Carnobacterium* was enhanced in the presence of indigenous flora as no particular metabolic interaction was detected when *Carnobacterium* spp. were co-inoculated with different species isolated from CSS (Jorgensen et al., 2000b). The final level of tyramine could be reduced by respecting the chilled storage temperature ( $4^\circ\text{C}$ ). Indeed, Connil et al. (2002a) have showed that tyramine production by *C. divergens* V41 was delayed at low temperatures. During the first two weeks of storage, no sensory difference between controls and inoculated products was noticed. After that, trained panellists

were able to discriminate the products, which is not really surprising because they compared CSS inoculated with high level of *C. divergens* V41 to CSS which natural contamination did not contain many bacteria. Some slight off-odours and taste were detected but always at very low level (less than one on a scale from zero to ten whereas in highly spoiled batches B and C, those descriptors reach five or six) and products were never rejected by the panel until the end of storage.

On extensively spoiled CSS batches, all flora grew very quickly and reached their maximum level after two to three weeks. Batches B and C had a low level of salt (respectively 4.6 and 3.8 % in WP) compared to batches A and D (5.0 and 5.6 % in WP), and were fairly smoked. As demonstrated by Leroi et al. (2000), these characteristics may explain the quicker growth of the natural microflora. LAB which were in the minority at the beginning quickly became dominant, and were represented mainly by lactobacilli (count on Rogosa agar at pH 5.5 identical to count on Nitrite Actidione Polymixine agar used for total LAB enumeration). This predominance has already been observed in several studies and specially at the end of the storage period (Leroi et al., 1998; Lyhs et al., 1998, Jorgensen et al., 2000a) probably because a lot of lactobacilli are well adapted to cold-smoked salmon condition, being psychrotrophic facultative anaerobic bacteria and able to grow in the presence of up to 8-10 % of NaCl. Both controls from batches B and C were rejected by the panellists, after three and two weeks respectively, because of very strong amine off-odours. Those odours are clearly linked with the presence of lactobacilli at high levels. Although unspecifically identified in this study, *Lb. curvatus* and *Lb. sakei* species frequently dominate the LAB colonizing lightly preserved fish product (Leroi et al., 1998; Truelstrup Hansen and Huss, 1998; Lyhs et al., 1999, Jorgensen et al., 2000a). *Lb. sakei* was identified as a great spoilage organism in CSS and often released strong sulphurous and acidic odours (Truelstrup Hansen et al., 1995; Stohr et al., 2001, Joffraud et al., 2001). *Lb. curvatus* was also identified as a specific spoilage organism of CSS because of its production of biogenic amines (Jorgensen et al., 2000b). It is also possible that psychrotrophic Enterobacteriaceae and *B. thermosphacta*, although present at a lower level, participate in spoilage because those micro-organisms can produce strong off-odours when inoculated in CSS blocks (Joffraud et al., 2001; Stohr et al., 2001). In the presence of *C. divergens* V41, none of the natural flora enumerated were inhibited and grew as well as in the control. No difference in TVBN production was observed. However, after two weeks of storage, cadaverine and histamine concentrations were significantly reduced in inoculated products. This could be explained by an inhibition of strains from the Vibrionaceae family

which were not specifically enumerated in this study. Indeed, Jorgensen et al. (2000b) have shown that *P. phosphoreum* was the only species isolated from CSS that produced histamine below 10°C. This species also produced cadaverine, as well as some Enterobacteriaceae (*S. liquefaciens*). During the first two weeks of storage, *C. divergens* V41 was dominant in the inoculated products (count of LAB one to two log<sub>10</sub> (CFU g<sup>-1</sup>) higher than in controls), which may explain the inhibition. After three weeks, no difference in biogenic amines concentration was observed between controls and inoculated CSS. At this time, LAB count in inoculated CSS is the same as in controls and the ratio *C. divergens* V41 / spoilage micro-organisms may be too small to observe an inhibition. It is also possible that strains (particularly *Lactobacillus* spp.) present in batches B and C differ from batch A and are insensitive to divercin V41. Concentration of histamine in naturally contaminated batches B and C after 4 weeks of storage (respectively 397 ± 45 and 254 ± 58 µg g<sup>-1</sup>) exceeded the European tolerated limit in Scombroids and Clupeids fish (mean of 9 samples < 100 µg g<sup>-1</sup> and no sample higher than 200 µg g<sup>-1</sup>, Council directive 91/493). Free histidine, which is the substrate for histamine production, can be found in sufficient concentration in *Salmo salar* flesh to allow such production (5860 µg g<sup>-1</sup> USDA nutrient database) and high levels of histamine have been found in routine controls of smoked salmon in Denmark (Huss et al., 1995). The most effective methods for preventing biogenic amines formation are handling and processing under sanitary conditions and temperature control (< 5°C) throughout the process. In our experiment, samples were stored at abuse temperatures (8°C for 19 days with a 2 h break at 20°C). Concerning the sensory aspect, low differences between controls and inoculated CSS was detected. Presence of *C. divergens* V41 in highly contaminated CSS slices was not detected by the trained panellists. On the other hand, this strain did not improved the quality of the product, but it clearly had been selected for its targeted antilisterial activity and not for controlling spoilage micro-organisms. The inhibitory effect of *C. divergens* V41 against *L. monocytogenes* has been shown to be specifically related to the divercin V41 production (Richard et al., 2003). Although no bacteriocin activity was detected in the inoculated flesh in this set of experiment, the inhibitory effect on *L. monocytogenes* by *C. divergens* V41 is effective (Brillet et al., 2004). Indeed, Duffes et al. (1999a) have emphasis those difficulties to measure divercin V41 in CSS, probably due to interaction with product and packaging, although inhibition was observed.

In conclusion, this study has shown that the strain *C. divergens* V41 inoculated in CSS in a biopreservation goal exhibits some interesting properties : it is able to grow at high level

without giving major sensory changes in the product. This solution will not replace other measures for controlling *L. monocytogenes* (and spoiling microflora) in cold-smoked salmon but will act as an extra hurdle specifically designed to eliminate the listeriosis risk. To our knowledge, application of protective LAB is not common in fish products mainly because of their limited growth in chilled foods (Wessels and Huss, 1996) and production of off-odour (Nilsson et al., 1999). In CSS batches of high hygienic quality, some slight off-odours and flavours were detected in inoculated samples by a trained panel. Differences are so slight that it is believed that *C. divergens* V41 probably would not be detected by a non trained consumer panel. Some negative effects of *C. divergens* V41, such as slight productions of TVBN and tyramine, could be reduced by optimising *C. divergens* V41 level of inoculation while keeping an efficient inhibition of *L. monocytogenes* and by avoiding abused temperature storage. Lastly, work is currently under way to select tyramine negative mutants of *C. divergens* V41 for an application in CSS.

### Acknowledgements

The authors would like to thank Mrs Josiane Cornet (IFREMER) for the data analysis with Fizz 2.00 software. This work was part of the “Aliment Qualité Sécurité” project (n° R 01/05) and was supported by grants from the French Ministry of Agriculture and Fishery, and from the European project “SEAFOODplus”.

### References

- Ben Embarek, P.K., 1994. Presence, detection and growth of *Listeria monocytogenes* in seafoods : a review. *International Journal of Food Microbiology* 23, 17-34.
- Bledsoe, G.E., Flick, G.J., Gram, L., Herman, D., Jahneke, M.L., Ward, D.R., 2001. Processing parameters needed to control pathogen in cold-smoked fish. *Journal of Food Science* 66 (supp), 1055-1133.
- Brillet, A., Pilet, M.F., Prevost, H., Bouttefroy, A., Leroi, F., 2004. Biodiversity of *Listeria monocytogenes* sensitivity to bacteriocin-producing *Carnobacterium* strains and application in sterile cold-smoked salmon. *Journal of Applied Microbiology* 97, 1029-1037.



Cardinal, M., Gunnlaugsdottir, H., Bjoernevik, M., Ouisse, A., Vallet, J.L., Leroi, F., 2004. Sensory characteristics of cold-smoked Atlantic salmon (*Salmo salar*) from European market and relationships with chemical, physical and microbiological measurements. *Food Research International* 37, 181-193.

Council Directive 91/493/EEC of 22 July 1991 laying down the health conditions for the production and the placing on the market of fishery products, *Official Journal L* 268, 24/09/1991, pp. 0015-0034.

Connil, N., Plissoneau, L., Onno, B., Pilet M.F., Prevost, H., Dousset, X., 2002a. Growth of *Carnobacterium divergens* V41 and production of biogenic amines and Divercin V41 in sterile cold-smoked salmon extract at varying temperatures, NaCl levels, and glucose concentrations. *Journal of Food Protection* 62, 2, 333-338.

Connil, N., Prevost, H., Dousset, X., 2002b. Production of biogenic amines and divercin V41 in cold smoked salmon inoculated with *Carnobacterium divergens* V41, and specific detection of this strain by multiplex-PCR. *Journal of Applied Microbiology* 92, 611-617.

Conway, E.J., Byrne, A., 1933. An absorption apparatus for the micro-determination of certain volatile substances. *Biochemistry* 27, 419-429.

Duffes, F., Corre, C., Leroi, F., Dousset, X., Boyaval, P., 1999a. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by in situ produced and semipurified bacteriocins of *Carnobacterium* spp. on vacuum-packed, refrigerated cold-smoked salmon. *Journal of Food Protection* 62, 1394-1403.

Duffes, F., Leroi, F., Boyaval, P., Dousset, X., 1999b. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by *Carnobacterium* spp. strains in a simulated cold-smoked fish system stored at 4°C. *International Journal of Food Microbiology* 47, 33-42.

Edwards, R.A., Dainty, R.H., Hibbard, C.M., Ramantanis, S.V., 1987. Amines in fresh beef of normal pH and the role of bacteria in changes in concentration observed during storage in vacuum packs at chill temperatures. *Journal of Applied Bacteriology* 63, 427-434.

Eerola, S., Hinkkanen, R., Lindfors, E., Hirvi, T., 1993. Liquid chromatographic determination of biogenic amines in dry sausages. *Journal of AOAC International* 76, 575-577.

FAO yearbook, 2003. Fishery statistics : Commodities 2001, Vol. 93. Food and Agriculture Organization of the United Nation, Rome, pp.143.

Gram, L., Dalgaard, P., 2002. Fish spoilage bacteria--problems and solutions. *Current Opinion in Biotechnology* 13, 262-266.

Guyer, S., Jemmi, T., 1991. Behavior of *Listeria monocytogenes* during fabrication and storage of experimentally contaminated smoked salmon. *Applied and Environmental Microbiology* 57, 1523-1527.

Heinitz, M.L., Johnson, J.M., 1998. The incidence of *Listeria* spp., *Salmonella* spp., and *Clostridium botulinum* in smoked fish and shellfish. *Journal of Food Protection* 61, 318-323.

Huss, H.H., Ben Embarek, P.K., From Jeppensen, V., 1995. Control of biological hazards in cold smoked salmon production. *Food Control* 6, 335-340.

Joffraud, J.J., Leroi, F., Chevalier, F., 1998. Development of a sterile cold-smoked fish model. *Journal of Applied Microbiology* 85, 991-998.

Joffraud, J.J., Leroi, F., Roy, C., Berdague, J.L., 2001. Characterisation of volatile compounds produced by bacteria isolated from the spoilage flora of cold-smoked salmon. *International Journal of Food Microbiology* 66, 175-184.

Jorgensen, L.V., Dalgaard, P., Huss, H.H., 2000a. Multiple compound quality index for cold-smoked salmon (*Salmo salar*) developed by multivariate regression of biogenic amines and pH. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48, 2448-2453.

Jorgensen, L.V., Huss, H.H., 1998. Prevalence and growth of *Listeria monocytogenes* in naturally contaminated seafood. *International Journal of Food Microbiology* 42, 127-131.

Jorgensen, L.V., Huss, H.H., Dalgaard, P., 2000b. The effect of biogenic amine production by single bacterial cultures and metabiosis on cold-smoked salmon. *Journal of Applied Microbiology* 89, 920-934.

Leisner, J.J., Millan, J.C., Huss, H.H., Larsen, L.M., 1994. Production of histamine and tyramine by lactic acid bacteria isolated from vacuum-packed sugar-salted fish. *Journal of Applied Bacteriology* 76, 417-423.

Leroi, F., Joffraud, J.J., Chevalier, F., 2000. Effect of salt and smoke on the microbiological quality of cold-smoked salmon during storage at 5°C as estimated by the factorial design method. *Journal of Food Protection* 63, 4, 502-508.

Leroi, F., Joffraud, J.J., Chevalier, F., Cardinal, M., 1998. Study of the microbial ecology of cold-smoked salmon during storage at 8 degrees C. *International Journal of Food Microbiology* 39, 111-121.

Leroi, F., Joffraud, J.J., Chevalier, F., Cardinal, M., 2001. Research of quality indices for cold-smoked salmon using a stepwise multiple regression of microbiological counts and physico-chemical parameters. *Journal of Applied Microbiology* 90, 578-587.

Lyhs, U., Bjorkroth, J., Hyytia, E., Korkeala, H., 1998. The spoilage flora of vacuum-packaged, sodium nitrite or potassium nitrate treated, cold-smoked rainbow trout stored at 4 degrees C or 8 degrees C. *International Journal of Food Microbiology* 45, 135-142.

Lyhs, U., Björkroth, J., Korkeala, H., 1999. Characterisation of lactic acid bacteria from spoiled vacuum-packaged, cold-smoked rainbow trout using ribotyping. *International Journal of Food Microbiology* 52, 77-84.

NF V 01-003, 2004. Hygiène et sécurité des produits alimentaires. Lignes directrices pour l'élaboration d'un protocole de test de vieillissement pour la validation de la durée de vie microbiologique. Denrées périssables, réfrigérées. Norme AFNOR.

NF V 45-065, 1997. Poisson transformé. Saumon fumé. Norme AFNOR.

- Nilsson, L., Gram, L., Huss, H.H., 1999. Growth control of *Listeria monocytogenes* on cold-smoked salmon using a competitive lactic acid bacteria flora. *Journal of Food Protection* 62, 336-342.
- Nykanen, A., Weckman, K., Lapvetelainen, A., 2000. Synergistic inhibition of *Listeria monocytogenes* on cold-smoked rainbow trout by nisin and sodium lactate. *International Journal of Food Microbiology* 61, 63-72.
- Paludan-Muller, C., Dalgaard, P., Huss, H.H., Gram, L., 1998. Evaluation of the role of *Carnobacterium piscicola* in spoilage of vacuum- and modified-atmosphere-packed cold-smoked salmon stored at 5 degrees C. *International Journal of Food Microbiology* 39, 155-166.
- Pilet, M.F., Dousset, X., Barré, R., Novel, G., Desmazeaud, M., Piard, J.C., 1995. Evidence for two bacteriocins produced by *Carnobacterium piscicola* and *Carnobacterium divergens* isolated from fish and active against *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection* 58, 256-262.
- Ribeiro Neunlist, M., Ralazamahaleo, M., Cappelier, J.M., Besnard, V., Federighi, M., Leroi, F., *In press*. Effect of salting and cold-smoking process on the culturability, viability and virulence of *listeria monocytogenes* strain Scott A. *Journal of Food Protection*.
- Richard, C., Brillet, A., Pilet, M.F., Prevost, H., Drider, D., 2003. Evidence on inhibition of *Listeria monocytogenes* by divercin V41 action. *Letters in Applied Microbiology* 36, 288-292.
- Rorvik, L.M., Caugant, D.A., Yndestad, M., 1995. Contamination pattern of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* spp. in a salmon slaughterhouse and smoked salmon processing plant. *International Journal of Food Microbiology* 25, 19-27.
- Stohr, V., Joffraud, J.J., Cardinal, M., Leroi, F., 2001. Spoilage potential and sensory profile associated with bacteria isolated from cold-smoked salmon. *Food Research International* 34, 797-806.
- Taylor, S.L., 1986. Histamine food poisoning : toxicology and clinical aspects. *Critical Reviews in Toxicology* 17, 91-128.
- Ten Brink, B., Damink, C., Joosten, H.M., Huis in 't Veld, J.H., 1990. Occurrence and formation of biologically active amines in foods. *International Journal of Food Microbiology* 11, 73-84.
- Thurette, J., Membré, J. M., Han Ching, L., Catteau, M., 1998. Behavior of *Listeria* spp. in smoked fish products affected by liquid smoke, NaCl concentration and temperature. *Journal of Food Protection* 61, 1475-1479.
- Truelstrup Hansen, L., Gill, T., Huss, H.H., 1995. Effects of salt and storage temperature on chemical, microbiological and sensory changes in cold-smoked salmon. *Food Research International* 28, 123-130.

Truelstrup Hansen, L., Huss, H.H., 1998. Comparison of the microflora isolated from spoiled cold-smoked salmon from three smokehouses. *Food Research International* 31, 703-711.

Truelstrup Hansen, L., Rontved, S.D., Henrik Huss, H., 1998. Microbiological quality and shelf life of cold-smoked salmon from three different processing plants. *Food Microbiology* 15, 137-150.

Vaz-Velho, M., Todorov, S., Ribeiro, J., Gibbs, P. *In press*. Growth control of *Listeria innocua* 2030c during processing and storage of cold-smoked trout by *Carnobacterium divergens* V41 culture and supernatant. *Food Control*.

Wessels, S., Huss, H.H., 1996. Suitability of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 as a protective culture for lightly preserved fish products. *Food Microbiology* 13, 323-332.

## Résultats complémentaires des analyses sensorielles réalisées lors de l'expérience sur l'effet de l'ensemencement de *C. divergens* V41 sur les flores endogènes de saumon fumé du commerce.

Rappelons que le jury entraîné composé de 14 juges a noté sur une échelle de 0 à 10 différents descripteurs d'odeur (19), de flaveur (9), d'aspect (3) et de texture (3). Les résultats présentés ci-après viennent compléter les analyses statistiques décrites dans la publication.

### *1- Cas des usines A et D*

Au niveau organoleptique, les notes attribuées à chaque descripteur ont été analysées : un test de Student apparié (comparaison des essais par rapport aux témoins pour un descripteur donné au cours des différents temps d'entreposage) a permis l'obtention d'un profil sensoriel pour chaque lot de saumon, et une Analyse en Composante Principale normée a permis une représentation des échantillons dans l'espace (moyenne des notes T et E pour chaque descripteur) par rapport aux descripteurs pour un lot donné au cours du temps. Les résultats des lots A et D étant similaires, seuls les résultats du lot A sont présentés sur le tableau 1 et la figure 1.

On remarquera que les descripteurs pour lesquels on observe une différence significative entre les essais et les témoins (entourés sur le tableau) ne sont pas des descripteurs d'altération.

O. altération = odeur aminée + acide + rance + plastique + fruité + aigre + beurre + caoutchouc + fromage pied + H<sub>2</sub>S + fécale + chou

S. altération = flaveur rance + aminée + acide + caoutchouc

**Tableau 1 : profil sensoriel du lot A (test de Student apparié sur témoins et essais)**

Echantillon Usine A	T0	T7	T14	T21	T28	T35
O. globale			p=0.10 E+	p=0.007 E+	p=0.11 E+	
O. poisson/saumon						p=0.06 T+
O. aminée/urine		P=0.08 E+				p=0.11 E+
O. acide/vinaigre						p=0.06 E+
O. plastique/agrume				p=0.04 E+	p=0.10 T+	
O. fruitée		p=0.10 T+				
O. aigre/fermentée			p=0.10 E+	p=0.10 E+	p=0.07 E+	
O. fromage/pied				p=0.09 E+		
couleur orange	p=0.02 E+					
couleur rose						p=0.02 E+
Homog. de la couleur						p=0.14 T+
Fermeté		p=0.004 E+		p=0.06 E+		
Texture fondante				p=0.10 T+		
Texture pâteuse	p=0.09 E+					
F. globale				p=0.10 E+		
F. aminée/urine				p=0.08 E+	p=0.07 E+	p=0.10 E+
O. altération			0.05 E+	0.01 E+		0.05 E+
S. altération						0.02 E+

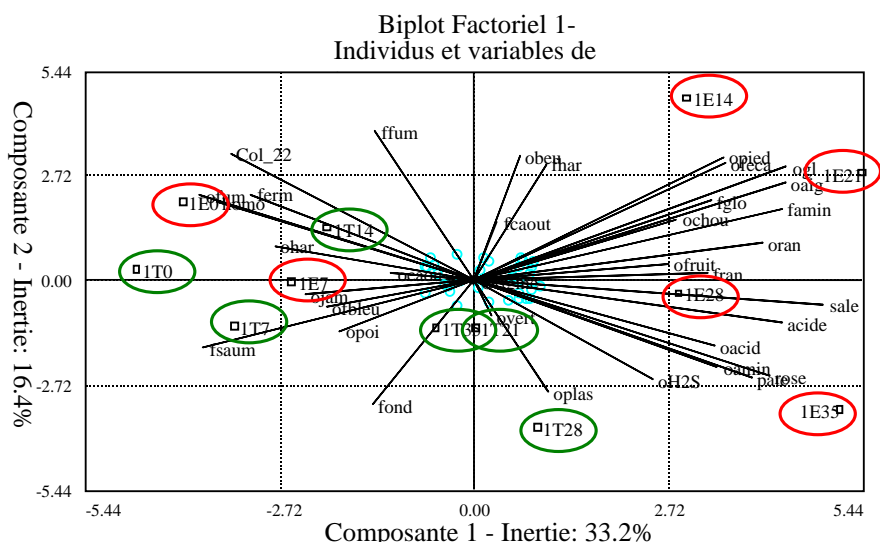


Figure 1 : ACP normée Usine A (plan 1-2)

L'ajout de la souche de *C. divergens* V41 est perçue par le jury (goût et odeur) mais avec une intensité très faible (note inférieure à 1 sur une échelle de 0 à 10), et les échantillonsensemencés ne sont jamais jugés comme très altérés par le jury.

2- Cas des usines B et C :

Le profil sensoriel du lot C est présenté sur le tableau 2 (les résultats du lot B sont similaires).

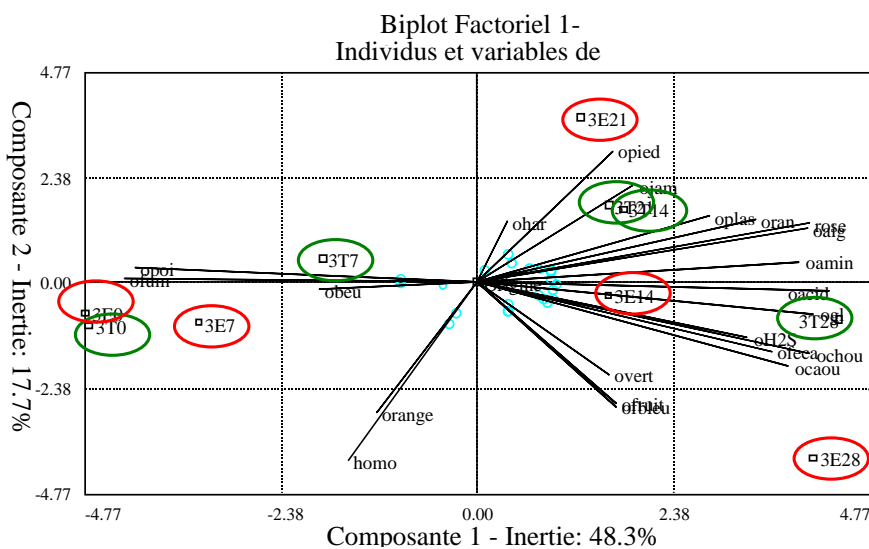
On remarquera que les descripteurs pour lesquels on observe une différence significative entre les essais et les témoins (entourés sur le tableau) font partie de certains descripteurs d'altération.

O. altération = odeur aminée + acide + rance + plastique + fruité + aigre+ beurre + caoutchouc + fromage pied + H<sub>2</sub>S + fécale + chou

S. altération = flaveur rance + aminée + acide + caoutchouc

Echantillon Usine C	T0	T7	T14	T21	T28
O. fumée		P=0.07 E+			
O. poisson/saumon	<b>p=0.04 E+</b>				
O. hareng			p=0.10 T+		
O. aminée/urine				p=0.10 T+	
O. acide/vinaigre		p=0.06 T+			
O. rance		p=0.08 E+			
O. jambon				<b>p=0.03 E+</b>	
O. fruitée	p=0.10 E+				
O. fromage/pied				<b>p=0.008 E+</b>	
O. H <sub>2</sub> S					p=0.06 T+
O. fécale			<b>P=0.04 E+</b>		p=0.08 T+
couleur orange					p=0.04 E+
couleur rose					p=0.12 T+
Fermeté	p=0.12 E+		Non Consommé	Non Consommé	Non Consommé
T. pâteuse	p=0.10 T+		NC	NC	NC
F. fumée		P=0.08 E+	NC	NC	NC
F. saumon	p=0.09 E+		NC	NC	NC
F. hareng	p=0.10 E+		NC	NC	NC
F. rance		<b>p=0.04 T+</b>	NC	NC	NC
S. salée		p=0.10 E+	NC	NC	NC
O. altération		0.10 T+			
S. altération		0.07 T+	NC	NC	NC

Tableau 2 : profil sensoriel du lot C (test de Student apparié sur témoins et essais)



**Figure 2 : ACP normée Usine C (plan 1-2)**

L'ACP normée est présentée sur la figure 2, on notera la rapide progression des échantillons essais et témoins vers des odeurs et saveurs d'altération.

Au niveau organoleptique, on observe donc peu de différences entre l'essai ensemencé et le témoin, les lots étant tous jugés très altérés par le jury dès la deuxième ou troisième semaine de conservation.

---

# CHAPITRE III

MISE EN EVIDENCE DE L'INHIBITION DE *LISTERIA MONOCYTOGENES*  
PAR LA DIVERCINE V41, LA BACTERIOCINE PRODUITE  
PAR *CARNOBACTERIUM DIVERGENS* V41

---

**Evidence on inhibition of *Listeria monocytogenes* by divercin V41 action**

**RICHARD Christelle, BRILLET Anne, PILET Marie-France,  
PREVOST Hervé and DRIDER Djamel**

*Letters in Applied Microbiology* (2003) **36**, 288-292.



## Introduction

Dans le cadre de l'utilisation potentielle de *Carnobacterium divergens* V41 comme agent de biopréservation dans les produits de la mer, il est intéressant d'évaluer le niveau d'inhibition lié à la compétition écologique essentiellement de type nutritionnelle de celle obtenue grâce à l'activité de la bactériocine, la divercine V41.

Dans cet objectif, il est nécessaire de disposer d'un mutant non producteur de divercine et de comparer ses capacités à inhiber *Listeria monocytogenes* par rapport à la souche sauvage. Dans un premier temps, des essais de mutagenèse dirigée par recombinaison homologue ont été réalisés. Cependant aucun mutant n'a pu être obtenu du fait que *C. divergens* V41 n'est pas une souche facile à transformer. Cette stratégie a donc été écartée en attendant de disposer d'un protocole de transformation par électroporation optimisé.

Par ailleurs, la fréquence moyenne de mutation spontanée dans une population pour un caractère donné est de l'ordre de  $10^{-6}$ , et aucun mutant divercine négatif n'est apparu spontanément. En effet, le taux d'erreur ou de mutation spontanée au cours de la réplication de l'ADN varie de  $10^{-8}$  à  $10^{-11}$  par paire de bases synthétisée et par génération, ce qui fait un taux de  $10^{-5}$  à  $10^{-8}$  pour un gène de 1000 paires de bases.

Une stratégie de mutagenèse chimique aléatoire a donc été mise en œuvre pour obtenir le mutant recherché. Les agents mutagènes favorisant l'apparition de mutants sont en général génotoxiques, c'est-à-dire qu'ils sont capables d'endommager l'ADN cellulaire. Certains agents mutagènes chimiques ne sont pas incorporés dans l'ADN, mais ils endommagent une base en fixant un groupe alkyl à l'ADN, générant ainsi des mésappariements spécifiques : c'est le cas des agents alkylants tels que l'éthylméthanesulfonate (EMS) et la N'-méthyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG). Bien que ces agents puissent alkyler les quatre bases de l'ADN en de très nombreuses positions, leur action mutagène semble surtout liée à leur capacité à alkyler la guanine en position O<sup>6</sup>. En effet, l'O<sup>6</sup>-méthylguanine se comporte fréquemment comme une adénine et peut donc se mésappairer avec la thymine lors de la réplication. Ainsi, l'EMS et la MNNG induisent préférentiellement des transitions G-C en A-

---

T. Ils induisent aussi à plus faible fréquence d'autres types de substitutions de paires de base (Quillardet, 1988).

Nous avons choisit d'utiliser l'EMS comme agent mutagène. Le protocole de mutagenèse est inspiré de celui utilisé par Joosten *et al.* (1995) et décrit dans la publication ci-après. Une étude a ensuite été réalisée en saumon fumé stérile pour évaluer la part de l'activité de la divercine V41 sur l'efficacité de l'action bioprotectrice de la souche sauvage contre *L. monocytogenes* par comparaison au mutant divercine négatif. Précisons que le saumon fumé stérile utilisé lors de l'expérience présente les mêmes caractéristiques que le saumon fumé stérile utilisé dans la publication du chapitre 2 (5.0% de sel en phase aqueuse, 1,33 mg de phénols /100g) et que les cinq souches de *L. monocytogenes* utilisées lors de l'expérience sur saumon appartiennent au mélange 1 décrit dans la publication du chapitre I (*L. monocytogenes* RF 107, RF 114, RF 119, RF 129 et RF 148).

## Résultats importants

Suite aux premiers essais de mutagenèse chimique, des quantités supérieures ou égales à 70 µl d'EMS (Sigma M0880 ; d= 1,17 g/ml) ont permis d'obtenir moins de 10% de survie, taux moyen à partir duquel on a la probabilité d'avoir une mutation dans le génome des bactéries formant les colonies survivantes. Environ 5300 colonies de *Carnobacterium divergens* V41 ont été isolées après mutagenèse chimique. Des tests d'inhibition de *Listeria* sur milieu gélosé en boîte de Pétri ont alors été réalisés. A l'issue des premiers tests, **un mutant potentiel ne produisant plus de halo d'inhibition vis-à-vis de *L. innocua* et de *L. monocytogenes* a été retenu**. La stabilité du caractère divercine négatif a été vérifiée par repiquages successifs en bouillon Elliker incubé à 30°C (30-50 générations). **Le mutant potentiel divercine négatif a été appelé *C. divergens* V41C9** et utilisé dans la suite des travaux.

*C. divergens* V41 et *C. divergens* V41C9 ont été co-inoculés individuellement en saumon fumé stérile avec un mélange de cinq souches de *L. monocytogenes*. Le suivi de la croissance des différents germes dans les échantillons de saumon emballés sous vide et incubés à 4 et 8°C a été effectué tout au long des 35 jours de conservation. À l'issue de cette expérience, les résultats suivants ont pu être observés : dans les échantillons témoins de *Listeria* (ensemencés seules à environ 20 UFC/g), le taux de *L. monocytogenes* est de  $4,7 \cdot 10^4$  UFC/g en fin de conservation. Dans les échantillons inoculés avec la souche sauvage *C. divergens* V41 ( $1,7 \cdot 10^5$  UFC/g) et les bactéries pathogènes (20 UFC/g), ***C. divergens* V41 se développe facilement et atteint un taux de  $2,2 \cdot 10^7$  UFC/g en fin de conservation alors que la croissance de *L. monocytogenes* est inhibée et reste inférieure à 100 UFC/g pendant 35 jours** ( $8,0 \cdot 10^1$  UFC/g en fin de conservation). Dans les échantillons inoculés avec la souche mutante *C. divergens* V41C9 ( $1,7 \cdot 10^5$  UFC/g) et les bactéries pathogènes (20 UFC/g), ***C. divergens* V41C9 se développe rapidement et atteint  $2,2 \cdot 10^8$  UFC/g**, soit un log supplémentaire par rapport à la souche sauvage. Par contre, **la croissance de *L. monocytogenes* n'est pas inhibée en présence du mutant et atteint  $6,2 \cdot 10^4$  UFC/g en fin de conservation**. Ce résultat de croissance est comparable à celui des échantillons témoins de *Listeria*. Le mutant n'a donc pas d'activité inhibitrice, ***L. monocytogenes* n'est pas inhibée par compétition écologique (nutritionnelle) en présence de *C. divergens* V41C9**. Seule la

**divercine V41 produite par la souche sauvage est responsable de l'inhibition de *L. monocytogenes* dans le saumon fumé.**

Ces travaux ont permis de mettre en évidence **l'importance de l'activité de la divercine V41 sur l'efficacité de l'action bioprotectrice de *C. divergens* V41.**

La souche *C. divergens* V41, ayant des capacités élevées d'inhibition de *L. monocytogenes* sur saumon fumé sans modifier de façon notable les caractéristiques sensorielles du produit, a été sélectionnée, et les connaissances concernant l'importance du rôle de la divercine V41 sur l'action inhibitrice de la souche ont été approfondies. Dans l'hypothèse de l'utilisation de *C. divergens* V41 en biopréservation à l'échelle industrielle, les conditions de production de la souche doivent maintenant être optimisées. Cette étude fera l'objet du prochain chapitre.

# Evidence on inhibition of *Listeria monocytogenes* by divercin V41 action

C. Richard, A. Brillet, M.F. Pilet, H. Prévost and D. Drider

Laboratoire de Microbiologie Alimentaire et Industrielle, ENTIAA, Rue de la Géraudière, Nantes cedex, France

2002/365: received 27 November 2002, revised 23 January 2003 and accepted 31 January 2003

## ABSTRACT

C. RICHARD, A. BRILLET, M.F. PILET, H. PRÉVOST AND D. DRIDER. 2003.

**Aims:** The aim of this study was to investigate the role of divercin V41 in inhibition and prevention of *Listeria monocytogenes*.

**Methods and Results:** *Carnobacterium divergens* V41 deficient in bacteriocin production was isolated and characterized by enzyme-linked immunosorbent assay, multiplex polymerase chain reaction and bacteriocin diffusion test. *Carnobacterium divergens* V41 (divercin<sup>+</sup>) and *Carnobacterium divergens* V41C9 (divercin<sup>-</sup>) were grown in the presence of *L. monocytogenes* in smoked salmon model medium. *Carnobacterium divergens* V41, but not *C. divergens* V41C9, was able to inhibit growth of *L. monocytogenes*. The results indicate that inhibition of *L. monocytogenes* in the presence of *C. divergens* V41 is because of the production of divercin V41 and not to a nutritional advantage.

**Conclusions:** *Carnobacterium divergens* V41 may be a promising agent in food safety.

**Significance and Impact of the Study:** The study demonstrates a potential use of a bacteriocin producing lactic acid bacteria in the area food protection.

**Keywords:** *Carnobacterium divergens* V41, divercin V41, class IIa bacteriocin, anti-listerial activity, growth inhibition, food-borne pathogen.

## INTRODUCTION

Lactic acid bacteria produce antimicrobial peptides referred to as bacteriocins that have potential as natural food preservatives. Over the last decade, a large variety of bacteriocins have been isolated and characterized allowing to gain insight into the mechanisms involved in self-protection, membrane protein interactions, protein modification, secretion and genetic organization (Ennahar *et al.* 2002). Two main groups of bacteriocins have been established on the basis of their chemical structure (Klaenhammer 1993). The bacteriocins of class I named lantibiotics contain two modified amino acid residues (lanthionine and methyllanthionine), which are formed post-translationally (De Vos *et al.* 1995), whereas class II bacteriocins do not contain any post-translational modifications. The class IIa bacteriocins, a

subgroup of class II bacteriocins, offer potential industrial applications in the food protection area because of their ability to inhibit the growth of the potentially pathogenic, food-borne *Listeria monocytogenes*.

The class IIa bacteriocins are low-molecular-weight, heat-stable peptides containing at least two cysteine residues in the N-terminal region which form disulphide bridges. The primary structure of class IIa bacteriocins is characterized by the presence of a consensus sequence YNGVx<sub>4</sub>C(x)<sub>4</sub>V(x)<sub>4</sub>A (x denotes any amino acids) within the conserved N-terminal region, whereas the C-terminal region is more variable with respect to the amino acid sequence. Production of class IIa bacteriocins seems to be affected by environmental parameters such as pH (Ahn and Stiles 1990), temperature (De Vuyst *et al.* 1996), NaCl (Uguen *et al.* 1999), ethanol (Mortvedt-Abildgaard *et al.* 1995) and acetate (Nilsson *et al.* 2002).

The class IIa bacteriocin divercin V41 produced by *Carnobacterium divergens* V41 has previously been isolated

Correspondence to: Dr D. Drider, Laboratoire de Microbiologie Alimentaire et Industrielle, ENTIAA, Rue de la Géraudière, BP 82225. 44322 Nantes cedex 3, France (e-mail: drider@entiaa-nantes.fr).

and characterized in our laboratory (Pilet *et al.* 1995). The sequencing of divercin V41 revealed the presence of four cysteines, which may be important for the structure/activity of this antimicrobial peptide. Moreover, the chromosomal genetic organization and the main biochemical properties of divercin V41 have been established (Métivier *et al.* 1998; Bhugaloo-vial *et al.* 1999), and evidences on the anti-listerial activity of this bacteriocin were reported (Duffes *et al.* 1999).

Here we describe the isolation and characterization of a *C. divergens* V41 mutant deficient in divercin V41 production.

## MATERIALS AND METHODS

### Bacterial strains and media

The bacterial strains used in this study were *C. divergens* V41 (Pilet *et al.* 1995) and *C. divergens* NCDO 2763. These strains were grown in Man-Rogosa-Sharpe (MRS) (De Man *et al.* 1960) (Biokar Diagnostics, Beavais, France), or Elliker medium (Biokar Diagnostics, Beavais, France). *Listeria innocua* F and strains of *L. monocytogenes* used as bacteriocin-sensitive indicator organisms were grown in Elliker medium. Both *Listeria* and *Carnobacterium* were grown at 30°C without shaking. It should be noted that bacteria cultures for immunoassays were grown in Tween-free MRS broth and incubated 25 h at 30°C.

### Mutagenesis and isolation of mutants

A modified version of the experimental procedure described by Joosten *et al.* (1995) was used for isolation of a mutant deficient in divercin production. *Carnobacterium divergens* V41 was grown in 10 ml Elliker medium at 30°C to an O.D. of 0.9 at 600 nm (about  $10^{10}$  CFU ml<sup>-1</sup>). The growth was dispatched into different aliquots of 1 ml each. Each culture was twofold diluted by adding 1 ml fresh Elliker medium. Thereafter, 10–120 µl ethyl methanesulphonate (EMS) (Sigma M0880, d = 1.17 g ml<sup>-1</sup>, Sigma, St Louis, MA, USA) was added to each 2 ml culture giving concentration of 6–68 mg ml<sup>-1</sup> EMS. The cultures were incubated at 30°C for 2 h to allow development of mutations. At the end of this incubation, 1 ml of each culture was harvested, centrifuged (8000 g; 5 min), and washed twice with physiological solution. Cells were thereafter resuspended and diluted in physiological solution before spreading out on Elliker agar plates. After 48 h at 30°C, colonies obtained from culture with less than 10% survival rate were selected and studied for divercin V41 deficiency.

### Bacteriocin activity assay

Ten millilitre cell free supernatant of *C. divergens* V41 was obtained by centrifugation (8000 g; 6 min at 4°C) of bacteria

cultures grown at 30°C for 25 h. The entire cell-free supernatant was heated during 10 min at 100°C and stored at -20°C. Bacteriocin activity was determined by the agar diffusion assay against *L. monocytogenes* or *L. innocua* F as indicator strains according to the following. Ten microlitres of the pre-heated supernatant (free cell) was added to Elliker soft agar plates containing  $10^7$  CFU ml<sup>-1</sup> of *Listeria* indicator strain. The growth inhibition of the indicator strains was determined after 16 h of incubation at 30°C by observing the formation of inhibition zones around the supernatant drop.

### Detection of divercin V41 by competitive ELISA

Microtitre plates (Maxisorp; Nunc, Wiesbaden, Germany) were coated overnight at 37°C with 200 µg of proteins present in the cell-free supernatant measured with BCA protein assay reagent (kit 23225, Pierce, Rockford, IL, USA) following the instructions of the manufacturer. The proteins were diluted in a 100 mmol l<sup>-1</sup> phosphate-buffered saline (PBS) (pH 7.4). After washing three times with PBS containing 0.05% (w/v) Tween 20 (washing solution), the unoccupied sites of the microtitre plate wells were blocked by adding 250 µl/well of PBS containing 0.05% (w/v) Tween 20 and 2% (w/v) freeze-dried low-fat milk (PTM). After incubation for 1 h at 37°C the plates were washed three times with washing solution. Thereafter, 100 µl of diluted serum (1 : 2000 in PTM) was added to each well and incubated for 90 min at 37°C. Unbound antibodies were removed by washing the wells three times with washing solution. One hundred microlitres of alkaline-phosphate goat anti-rabbit IgG (Sigma A-8025) diluted 1 : 3000 in PTM was added to each well. The plates were incubated for 1 h at 37°C and washed three times as before. Bound antibodies were detected by adding 150 µl of *p*-nitrophenylphosphate (Sigma-Aldrich N-2765; 1 mg ml<sup>-1</sup>) in 1000 mmol<sup>-1</sup> Tris-HCl (pH 9.8) to each well. After 30-min incubation at 37°C, the plates were then read spectrophotometrically at an O.D. of 405 nm. Three cultures per strain were carried out and three wells per supernatant were used to each test, and each supernatant was tested twice.

### Enumeration of *L. monocytogenes* and *Carnobacterium* in SMM

Five different strains of *L. monocytogenes* were individually grown in Elliker medium for 24 h at 30°C. After this period, all cultures were adjusted to the same O.D. at 600 nm using fresh Elliker medium. A mixture composed of one volume of each culture was carried out, and diluted before inoculation in the presence of *C. divergens* V41 in 30 g of sterile vacuum packaged salmon model medium (Joffraud *et al.* 1998). The initial inoculation of the strains were 20 CFU g<sup>-1</sup> of

*L. monocytogenes* and  $10^5$  CFU  $g^{-1}$  of *C. divergens* V41. The samples were incubated for 35 days using the following conditions: 9 days at 4°C and 26 days at 8°C. In addition, after 21 days of incubation (according to industrial recommendations), incubation temperature was set to 20°C for 2 h. Enumeration of CFU in SMM was determined at certain time intervals using Palcam agar (Biokar) plates for *L. monocytogenes* and Elliker agar (Biokar) plates for *C. divergens* V41, and *C. divergens* V41C9.

### PCR, electrophoresis and DNA sequencing

Specific detection of *Carnobacterium* species was realized by multiplex PCR as described recently (Connil *et al.* 2002). Amplification of divercin V41 encoding DNA was carried out using *Taq* DNA polymerase (Biolabs, UK) using the following programme: 10 min at 94°C, followed by 35 cycles (1 min at 94°C, 1 min at 47°C and 1 min at 72°C), and finally 10 min at 72°C. The sequence of the forward and reverse primers (Invitrogen Life Technology, Cergy Pontoise, France) were 5'-C ATA ATA TAA ATA CCA GAG C-3' and 5'-CA GCA TAT TCT GTG CTT TC-3', respectively. The PCR products were analysed using ethidium bromide stained agarose gel. The PCR fragments were sequenced by ESGS Company (Evry, France).

## RESULTS

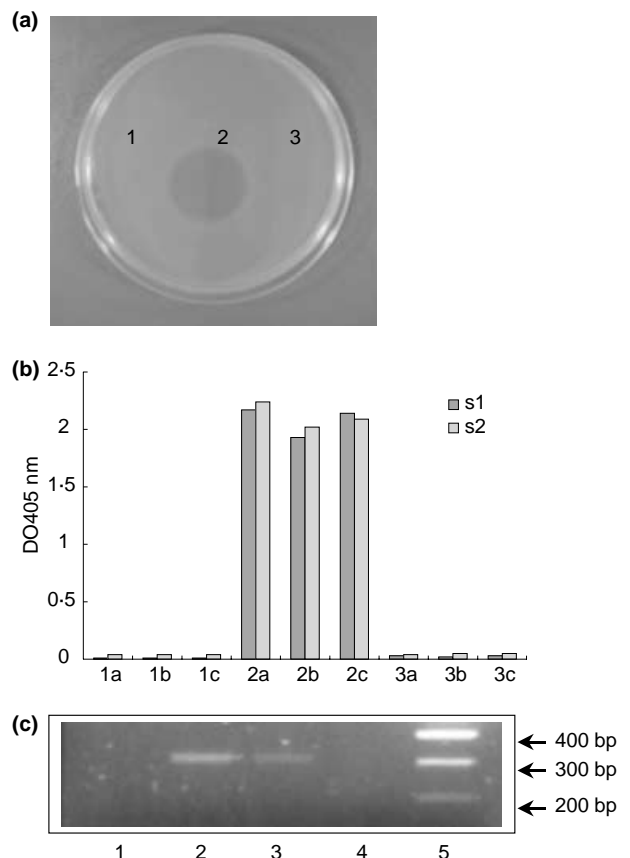
### Isolation and characterization of a mutant strain deficient in bacteriocin production

*Carnobacterium divergens* V41 strain was exposed to increasing concentrations of EMS as described in the 'Materials and methods' section. The required percentage of survival (<10%) was obtained with EMS concentrations higher than 40 mg  $ml^{-1}$  (70  $\mu$ l of EMS in 2 ml of culture). The various mutated strains that were isolated from the different mutagenesis assays were tested for inhibitory activity against *L. innocua* F used as indicator organism. This screening resulted in the isolation of a strain referred as *C. divergens* V41C9, which was completely devoid of bacteriocin activity.

Multiplex PCR carried out on chromosomal DNA from *C. divergens* V41C9 revealed an amplification pattern composed of four DNA fragments. This pattern was identical to that obtained from *C. divergens* V41 (Connil *et al.* 2002).

Interestingly, the multiplex PCR of both wild type and mutant strains was different from that of *C. divergens* NCDO 2763 as the DNA fragment corresponding to divercin V41 was not observed in this strain (data not shown).

The inhibitory effect of *C. divergens* V41, *C. divergens* V41C9 and *C. divergens* NCDO 2763 was tested in at least three independent experiments against *L. innocua* F and a set of *L. monocytogenes* strains used as indicator organisms.



**Fig. 1** (a): Bacteriocin activity diffusion test. Cell-free culture supernatants (10  $\mu$ l) of *Carnobacterium divergens* NCDO 2763 (lane 1), *C. divergens* V41 (lane 2), and *C. divergens* V41C9 (lane 3) was applied. (b): Detection of divercin V41 by a competitive ELISA test. Histograms 1a,b,c (*C. divergens* NCDO2763), histograms 2a,b,c (*C. divergens* V41), and histograms 3a,b,c (*C. divergens* V41C9). (c): PCR DNA-fragments obtained using divercin V41 specific primers on chromosomal DNA extracted from *C. divergens* NCDO 2763 (lane 1), *C. divergens* V41 (lane 2), *C. divergens* V41C9 (lane 3). Lane 4 corresponds to PCR negative control, and lane 5 to DNA weight markers (100 bp DNA Ladders, Biolabs)

As expected *C. divergens* V41 was able to inhibit growth of the *Listeria* strains (Fig. 1a, lane 2). However, *C. divergens* V41C9 and *C. divergens* NCDO 2763 were unable to inhibit growth of the *Listeria* strains and were therefore characterized by the absence of the inhibition zones (Fig. 1a, lanes 1 and 3). These results demonstrate the absence of divercin V41 production in *C. divergens* NCDO 2763, and the loss of such production in *C. divergens* V41C9.

### Immunoreactivity against divercin V41 of *C. divergens* V41

The supernatants obtained from *C. divergens* V41, *C. divergens* NCDO2763 and *C. divergens* V41C9 cultures, were

tested to see whether they interact or not with antibodies raised against divercin V41 using a competitive ELISA method. The results obtained (Fig. 1b, lanes 1–3) indicate that antibodies do react with supernatant of *C. divergens* V41, but not with those of *C. divergens* V41C9 and *C. divergens* NCDO 2763 ( $O.D._{405} > 2$ ). Furthermore, it was not possible to detect intracellular divercin V41 in either the wild type or mutant strain of *C. divergens*.

### Detection of divercin V41 coding DNA

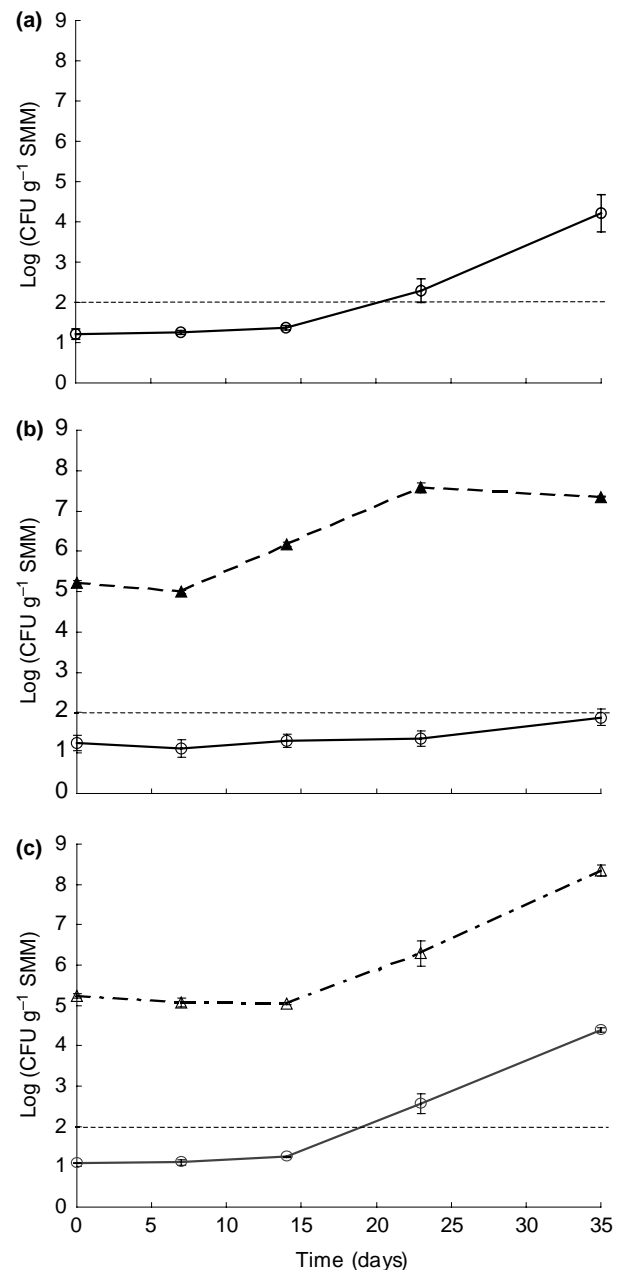
Total DNA extracted from *C. divergens* V41, *C. divergens* V41C9 and *C. divergens* NCDO 2763 was subjected to PCR amplification. As expected no PCR product was obtained using chromosomal DNA from *C. divergens* NCDO 2763 as template (Fig. 1c, lane 1), but PCR products with expected size encoding divercin V41 were obtained using chromosomal DNA from *C. divergens* V41 and *C. divergens* V41C9 (Fig. 1c, lanes 2 and 3).

### *L. monocytogenes* inhibition in the presence of *C. divergens* V41 and *C. divergens* V41C9 is correlated to production of divercin V41

To investigate whether growth inhibition of *L. monocytogenes* in the presence of *C. divergens* V41 is because of the production of divercin V41 by *C. divergens* V41, or merely to a nutritional advantage of this strain at the expense of *L. monocytogenes*, a set of *Listeria* growth experiments using SMM were set up. (Fig. 2a–c). The growth of *L. monocytogenes* in the absence of the divercin V41 producer, increased rapidly after 2 weeks and had reached 4.2 log of CFU  $g^{-1}$  SMM after 5 weeks, which correspond to a 3 log increase from the initial inoculum (Fig. 2a). However, the growth of *L. monocytogenes* strains was inhibited in the presence of *C. divergens* V41. (Fig. 2b). Remarkably in this experiment, the growth of *L. monocytogenes* remains under 2 log (100 CFU  $g^{-1}$  SMM), while the growth of *C. divergens* V41 continues to occur normally. Thus, the antagonistic effect of *C. divergens* V41 towards *L. monocytogenes* was demonstrated. In a second experiment *L. monocytogenes* was grown in the presence of *C. divergens* V41C9. As indicated on Fig. 2c, *L. monocytogenes* was not inhibited by *C. divergens* V41C9, and both strains display normal growth. These data shows that the observed antagonistic effect of *C. divergens* V41 was because of divercin V41 production, and was not a consequence of a nutritional advantage.

### DISCUSSION

A mutant strain deficient in divercin V41 production was made and isolated from *C. divergens* V41. This new strain was characterized by three different methods, and the loss of



**Fig. 2** (a): Growth curves of *Listeria monocytogenes* (○). (b): *L. monocytogenes* (○) and *Carnobacterium divergens* V41 (▲). (c): *L. monocytogenes* (○) and *C. divergens* V41C9 (△) on SMM. Samples were harvested at the indicated intervals of time and were used for cell number determination on Palcam medium for *L. monocytogenes* and Elliker medium for *C. divergens*

anti-listerial activity in *C. divergens* V41C9 seems to be stable after at least 50 generations (data not shown). The multiplex PCR carried out on the *C. divergens* V41C9 mutant resulted in the expected amplification pattern of *C. divergens* V41 (Connil *et al.* 2002). These results lead to



an investigation of divercin coding DNA generated from wild type and mutant strains using divercin V41 specific primers. The obtained PCR products were sequenced and compared but did not reveal any mutation which could explain this loss of anti-listerial activity. It is evident that the loss of divercin V41 production in the *C. divergens* V41 strain may not be related to loss of the bacteriocin gene but may be due to another genetic alterations that remain to be characterized.

The presence of divercin V41 was investigated in the supernatant of a 25-h-old culture of *C. divergens* V41C9 and *C. divergens* V41 grown in MRS broth without Tween 80 by competitive ELISA. This method allowed detection and quantification of divercin V41 in the wild-type strain only. It should be mentioned that assays to detect intracellular divercin V41 were unsuccessful in both wild type and mutant strains (data not shown).

Moreover, the different growth experiments carried out on SMM using *L. monocytogenes* alone (Fig. 2a), or combinations of *L. monocytogenes* and *C. divergens* V41 (Fig. 2b), or *C. divergens* V41C9 (Fig. 2c) clearly demonstrated, for the first time that inhibition of the pathogenic food-borne *L. monocytogenes* is linked to divercin V41 production. The results from this work indicate a potential role for lactic acid bacteria producing class IIa bacteriocins in food safety.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank Dr F. Leroi (Ifremer, Nantes, France), Dr A. Bouttefroy (Asept, Laval, France) for providing facilities for this work, and Dr Gunnar Finland (University of Oslo, Norway) for critical reading of the manuscript. This work was supported in part by AQS grant from French Ministry of Research and Ministry of Agriculture and Fishery. CR and AB were recipient of PhD scholar fellowships from Région des Pays de la Loire, ENITIAA and CITPPP.

## REFERENCES

- Ahn, C. and Stiles, M.E. (1990) Plasmid-associated bacteriocins production by a strain of *Carnobacterium piscicola* from meat. *Applied and Environmental Microbiology* **56**, 2503–2510.
- Bhugaloo-vial, P., Douliet, J.P., Molle, D., Dousset, X., Boyaval, P. and Marion, D. (1999) Delineation of key amino-acid side chains and peptide domains of antimicrobial properties of divercin V41. *Applied and Environmental Microbiology* **65**, 2895–2900.
- Connil, N., Prévost, H. and Dousset, X. (2002) Production of biogenic amines and divercin V41 in cold smoked salmon inoculated with *Carnobacterium divergens* V41, and specific detection of this strain by multiplex-PCR. *Journal of Applied Microbiology* **92**, 611–617.
- De Man, J.C., Rogosa, M. and Sharpe, M. E. (1960) A medium for the cultivation of *Lactobacilli*. *Journal of Applied Bacteriology* **23**, 130–135.
- De Vos, W.M., Kuipers, O.P., van der Meer, J. R. and Siezen, J. (1995) Maturation pathway of nisin and other lantibiotics: post-translationally modified antimicrobial peptides exported by gram-positive bacteria. *Molecular Microbiology* **17**, 427–437.
- De Vuyst, L., Callewaert, R. and Crabbé, K. (1996) Primary metabolite kinetics of bacteriocin biosynthesis by *Lactobacillus amylovorus* and evidence for stimulation of bacteriocin production under unfavourable growth conditions. *Microbiology* **142**, 817–827.
- Duffes, F., Corre, C., Leroi, F., Dousset, X. and Boyaval, P. (1999) Inhibition of *Listeria monocytogenes* by an *in situ* produced and semipurified bacteriocins of *Carnobacterium* spp. On vacuum-packed, refrigerated cold-smoked salmon. *Journal of Food Protection* **62**, 1394–1403.
- Ennahar, S., Sashihara, T., Sonomoto, K. and Ishizaki, A. (2000) Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity. *FEMS Microbiology Reviews* **24**, 85–106.
- Joffraud, J.J., Leroi, F. and Chevalier, F. (1998) Development of a sterile cold-smoked fish model. *Journal of Applied Microbiology* **85**, 991–998.
- Joosten, H.M.L., Gaya, P. and Nunez, M. (1995) Isolation of tyrosine decarboxylaseless mutants of a bacteriocin-producing *Enterococcus faecalis* strain and their application in cheese. *Journal of Food Protection* **58**, 1222–1226.
- Klaenhammer, T.R. (1993) Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Reviews* **12**, 39–86.
- Métivier, A., Pilet, M.F. and Dousset, X. (1998) Divercin V41, a new bacteriocin with two disulphide bonds produced by *Carnobacterium divergens* V41: primary structure and genomic organization. *Microbiology* **144**, 2837–2844.
- Mortvedt-Abildgaard C.I., Nissen-Meyer, J., Jelle, B., Grenov, B., Skaugen, M. and Nes, I.F. (1995) Production and pH dependant bactericidal activity of lactocinS, a lantibiotic from *Lactobacillus sake* L45. *Applied and Environmental Microbiology* **61**, 175–179.
- Nilsson, L., Nielsen, M.K., Ng, Y. and Gram, L. (2002) Role of acetate in production of an autoinducible class IIa bacteriocin in *Carnobacterium piscicola* A9b. *Applied and Environmental Microbiology* **68**, 2251–2260.
- Pilet, M.F., Dousset, X., Barré, R., Novel, G., Desmazaud, M. and Piard, J.C. (1995) Evidence for two bacteriocins produced by *Carnobacterium piscicola* and *Carnobacterium divergens* isolated from fish and active against *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection* **58**, 256–262.
- Uguen, P., Hamelin, J., Le Penne, J.P. and Blanco, C. (1999) Influence of osmolarity and the presence of an osmoprotectant on *Lactococcus lactis* growth and bacteriocins production. *Applied and Environmental Microbiology* **65**, 291–293.

---

# CHAPITRE IV

**OPTIMISATION DE LA CROISSANCE DE *CARNOBACTERIUM DIVERGENS* V41 ET DE  
LA PRODUCTION DE DIVERCINE V41 DANS UN MILIEU DE CULTURE DEPOURVU  
DE PROTEINE D'ORIGINE ANIMALE**

---

**Optimization of growth of *Carnobacterium divergens* V41, an interesting  
bacteriocin-producing strain for the biopreservation of cold-smoked fish,  
by batch fermentation in a culture medium  
deprived of protein of animal origin**

**BRILLET Anne, PILET Marie-France, HORAKOVA Sylva, COURCOUX  
Philippe, PREVOST Hervé and LEROI Françoise**

Article soumis à *Applied and Environmental Microbiology*

---

## Introduction

La souche *Carnobacterium divergens* V41 a été choisie lors des précédents travaux pour une utilisation potentielle sur les poissons fumés dans un objectif de biopréservation de ce type de produit. Dans cet objectif, la souche doit être produite à plus grande échelle en vue de son application par pulvérisation sur les produits de type poissons fumés. Pour une meilleure compatibilité avec les aliments destinés à la consommation humaine, nous avons choisi de produire cette souche dans un milieu de culture ne contenant aucun produit d'origine animale, de manière à ce qu'aucun résidu (protéine d'extrait de viande...) provenant du milieu et pouvant se retrouver avec la souche ne puisse représenter un quelconque facteur de risque de transmission de prion responsable d'encéphalopathie humaine telle que la maladie de Creutzfeld-Jakob.

Cette étude d'optimisation se déroule en plusieurs étapes : le choix des peptones végétales qui remplacent les peptones de viande, le choix des composants principaux du milieu de culture (sucres, vitamines...), et le choix du pH et de la température de culture. Pour cela, il est important de cribler de nombreux facteurs de manière à sélectionner ceux qui ont un effet positif sur la croissance et la production de bactériocine. Des outils statistiques peuvent être utilisés comme la méthodologie des plans d'expériences. L'optimisation des conditions de production de la souche devra être effectuée en fermenteur pour obtenir une quantité de cellules suffisante. A l'issue de ces expériences, il est nécessaire de vérifier si les conditions de production de la souche n'influencent pas ses capacités de croissance et d'inhibition de *Listeria monocytogenes* dans le saumon fumé. Le projet de publication qui suit décrit l'ensemble des travaux réalisés.

## Résultats importants

Les conditions de croissance de *Carnobacterium divergens* V41 et de sa production de divercine V41 ont été optimisées afin de pouvoir produire la souche à grande échelle en vue de son application potentielle comme agent de biopréservation sur les poissons fumés.

Concernant le choix des peptones végétales testées, originaires de la pomme de terre, du blé, du soja et du malt, **les peptones de soja A2** ont permis d'obtenir la culture de *C. divergens* V41 la plus dense (DO=0,658 dans le bouillon SYGNa).

Un premier **plan de criblage** a été réalisé dans **des puits de microplaques** pour déterminer l'influence de **12 facteurs** sur la croissance et l'activité de la bactériocine de *C. divergens* V41. Pour cela, 64 milieux de culture différents combinant les 12 facteurs **à deux niveaux** ont été réalisés, puis **192 expériences** ont été mises en œuvre pour le criblage. Les facteurs choisis étaient des composants de milieux de culture (sucres, NaCl, peptones de soja, extrait de levure, acide ascorbique, thiamine, sulfate de magnésium, sulfate de manganèse, citrate d'ammonium, acétate de sodium), le pH et la température de culture. Le niveau des facteurs a été choisi selon les concentrations classiquement retrouvées dans les milieux de culture tels que Elliker ou MRS. Ce plan de criblage permettait d'évaluer les effets principaux des 12 facteurs et la majorité des interactions de premier ordre. Les résultats ont montré que la **concentration en NaCl avait l'effet significatif et négatif le plus fort sur les réponses croissance et activité de la bactériocine**. Ensuite, **les effets significatifs et positifs les plus forts sur la croissance étaient ceux de la concentration en sucres** (glucose-lactose-saccharose, équivalent en masse), **du pH et de la concentration en acide ascorbique**. **Les effets significatifs les plus forts sur l'activité de la bactériocine après le NaCl étaient le pH (effet négatif), l'acide ascorbique (effet positif), les concentrations en peptones de soja (effet positif) et en sucres (effet positif)**.

**Trois facteurs** ont ensuite été choisis pour que leur effet soit vérifié **en fermenteur** : **la concentration en sucres, le pH et la température de culture**, dont l'effet était discuté lors du criblage. **Un plan d'expériences 2<sup>3</sup>, avec trois répétitions au point central, a été réalisé** pour connaître les effets principaux des trois facteurs et toutes leurs interactions de premier ordre. Tous les autres facteurs ayant un effet positif sur la croissance lors du criblage ont été fixés à leur niveau le plus haut et ceux dont l'effet était négatif ont été fixés à leur niveau le plus bas, constituant ainsi le milieu de base. Les résultats ont montré que **la température avait un effet positif sur le taux de croissance de la souche, et un effet**

**négalif sur la biomasse finale. La concentration en sucres avait un effet positif sur la biomasse finale. Le pH avait un effet négatif sur l'activité de la bactériocine, ainsi que l'effet de la température.** Les conditions ayant permis d'obtenir **une biomasse supérieure à  $2.10^{10}$  UFC/ml** en fermenteur étaient une **concentrations en sucres de 20 g/L** et une **température de 15°C**, quel que soit le niveau du pH (6,5 ou 8). Les conditions permettant d'obtenir la plus forte **activité de la bactériocine** étaient un **pH 6,5** et une **température de 15°C**. Avec une **concentration en sucres de 20 g/L**, cette activité a été de **3276800 unités arbitraires par millilitre**, ce qui est de 4 à 8 fois plus qu'une culture en fermenteur de *C. divergens* V41 en bouillon Elliker dans les mêmes conditions de température et de pH.

**Trois conditions de culture** différentes ont ensuite été choisies afin de tester leur influence sur la croissance de *C. divergens* V41 et sa capacité d'inhibition de *Listeria monocytogenes* sur saumon fumé stérile. Après culture en fermenteur en conditions 1 (30°C, pH 8, 20 g/L de sucres), conditions 2 (15°C, pH 6,5, 20 g/L de sucres) et conditions 3 (15°C, pH 6,5, 2 g/L de sucres), *C. divergens* V41 **s'est développé jusqu'à environ  $10^6$  UFC/g sur saumon fumé. *L. monocytogenes*, co-inoculée avec *C. divergens* V41 cultivé sous les conditions 2 et 3, a été maintenue à un taux inférieur à  $10^2$  UFC/g pendant les 35 jours de conservation à température réfrigérée.** Cependant en présence de *C. divergens* V41 cultivé dans les conditions 1, *L. monocytogenes* a dépassé ce taux après 23 jours de conservation. Le fait que le taux d'ensemencement de *C. divergens* V41 cultivé sous les conditions 1 était inférieur d'environ 1 log par rapport aux taux d'ensemencement de la souche inhibitrice cultivée en conditions 2 et 3 peut expliquer la meilleure croissance de *L. monocytogenes* dans ce cas précis. Néanmoins, il faudra répéter cette expérience pour déterminer l'influence des conditions 1 sur *C. divergens* V41. De plus, la question du taux minimal d'ensemencement pour que *C. divergens* V41 soit efficace en terme d'inhibition se pose aussi. Des expériences devront être réalisées pour déterminer ce taux minimal. Pour conclure, **les conditions de culture 2 et 3 n'ont pas d'influence sur la croissance de *C. divergens* V41 ni sur sa capacité d'inhibition de *L. monocytogenes* dans le saumon fumé. La souche inhibitrice pourra néanmoins être cultivée sous les conditions 2 puisqu'elles ont permis d'obtenir plus de  $2.10^{10}$  UFC/ml et une activité de bactériocine maximale (3276800 UA/ml).** Précisons que la quantité de cellules de *C. divergens* V41 obtenues en fermenteurs était de 2,6 g/l après culture sous les conditions 1 et 2,4 g/l sous les conditions 2, alors que sous les conditions 3 (dix fois moins de sucres) nous avons obtenu 0.9 g/l (résultats non présentés). Les conditions 1 et 2 permettent d'obtenir une quantité suffisante de cellules pour envisager une production industrielle.

**Optimization of growth of *Carnobacterium divergens* V41, an interesting bacteriocin-producing strain for the biopreservation of cold-smoked fish, by batch fermentation in a culture medium deprived of protein of animal origin**

**BRILLET Anne<sup>1</sup>, PILET Marie-France<sup>1</sup>, HORAKOVA Sylva<sup>1</sup>, COURCOUX Philippe<sup>1</sup>,  
PREVOST Hervé<sup>1</sup> and LEROI Françoise<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> **Laboratoire de Microbiologie Alimentaire et Industrielle, ENITIAA, Rue de la Géraudière, 44322 Nantes, France.**

<sup>2</sup> **Département des Sciences et Techniques Alimentaires Marines, IFREMER, Rue de l'Ile d'Yeu, BP 21105, 44311 Nantes Cedex 3, France.**

Corresponding author : Dr F. Leroi, Département des Sciences et Techniques Alimentaires Marines, IFREMER, Rue de l'Ile d'Yeu, BP 21 105, 44 311 NANTES cedex 3, France.

Phone : +33-2-40 37 41 72 ; email : fleroi@ifremer.fr

---

**ABSTRACT**

Optimization of growth and bacteriocin production by *Carnobacterium divergens* V41 was performed using a statistical approach. In a screening experiment, twelve factors, including components of medium, pH and temperature, were tested for their influence on the maximal growth and maximal bacteriocin activity using a two-level incomplete factorial design containing 192 experiments in microtiter plate wells. The level of factors showing a positive effect on the responses were fixed at their optimum value and the effect of three variables (pH, temperature and carbohydrates concentration) showing an interesting effect on the growth and/or on the production of bacteriocin in microtiter plate wells were selected for study in fermentor. A  $2^3$  complete factorial design was performed, allowing the estimation of linear effects of factors and all the first order interactions. Results indicated that the best conditions for the biomass were obtained with a temperature of 15°C and a carbohydrates concentration of 20 g l<sup>-1</sup> whatever the pH (6.5-8), and the best conditions for the bacteriocin activity were obtained with a pH 6.5 and the conditions of temperature and carbohydrates concentration described above. The final count of *C. divergens* V41 under these conditions (15°C, pH 6.5, 20 g l<sup>-1</sup> carbohydrates) was higher than  $2 \times 10^{10}$  CFU ml<sup>-1</sup> and the maximal bacteriocin activity was  $3.3 \times 10^6$  arbitrary units per milliliter. After inoculating *C. divergens* V41 in cold-smoked salmon with *Listeria monocytogenes*, the results showed that the growth and inhibition capacities of *C. divergens* V41 were not influenced by the conditions of culture of the strain. This study showed the optimized conditions of growth and bacteriocin activity of *C. divergens* V41 so that the strain or its bacteriocin can be used as a biopreservative agent in seafood products.

**Keywords :**

optimization, *Carnobacterium*, growth, bacteriocin activity, cold-smoked salmon.

---

## INTRODUCTION

Microbiological quality of food, especially ready-to-eat food, is a constant concern in the food industry. Lightly preserved fish products such as cold-smoked salmon (CSS) are classified as high risk products towards micro-organisms and particularly *Listeria monocytogenes* (3, 17, 34). Indeed, (i) there is no critical control point during the process, (ii) those products have extended shelf-life during which growth of some psychrotrophic micro-organisms is possible and (iii) they are consumed without further cooking. In combination with classical preservative hurdles used in such products, e.g. salting, drying, smoking, vacuum-packaging and chilled-storage, and in association with good hygienic and manufacturing practices in industry, Lactic Acid Bacteria (LAB) could be used as an extra hurdle to prevent the growth of spoiling and pathogenic bacteria. LAB are able to grow in cold-smoked fish products (15, 22) and some of them show an effective microbial antagonism due to competition mechanisms, production of organic acids, and/or production of bacteriocins (32, 33), and in particular in seafood products (11, 21, 28, 36). In a former study at laboratory level, we have shown that a bacteriocin-producing strain of LAB, *Carnobacterium divergens* V41, co-inoculated with several strains of *Listeria monocytogenes* in CSS (inoculation level  $10^5$  and 20 CFU g<sup>-1</sup> respectively), was able to prevent growth of the pathogenic strains during the four weeks of vacuum storage at 4° and 8°C (7).

In order to implement this biopreservation strategy in industry, it is necessary to optimize the production of the starter culture and to check its subsequent ability to grow and show inhibition capacity in the product after inoculation. Several studies have investigated parameters to optimize lactic acid bacterial growth (9) and/or bacteriocin production (20). NaCl, pH and temperature are the most frequently tested factors as they characterize most food products, and are supposed to have an influence on growth and bacteriocin production (24, 27). In most studies, optimization is performed in laboratory culture media such as MRS (10), which contain meat extracts or animal sourced materials. In the hypothesis that residues of medium could be found in the protective culture that will be added to a food product, the composition of the media used for the starter production should be considered. In France, the use of cattle materials (like animals' flours) is totally prohibited in the feed for animals intended for human consumption (1, 2) as well as in dietary supplements and cosmetics in the United States (FDA, 2004). To avoid the risk of bovine spongiform encephalopathy infectivity in meat extract, optimization of the growth of *C. divergens* V41 was performed in a medium from which meat proteins were replaced by vegetal proteins.



A first screening of the effect of 12 factors on the growth of *C. divergens* V41 was performed in microtiter plate wells. Experiments were organized following a two-level incomplete factorial design containing 192 experiments. Optimization was then performed in 2-liters fermentor. Nine of the previous factors were fixed at the level providing the best growth. A complete factorial design was used to model the effect of three selected factors (carbohydrate concentration, pH and temperature). Finally, challenge tests with the strain cultivated under the optimal conditions of growth and/or bacteriocin production were investigated in CSS in co-culture with *L. monocytogenes*.

## MATERIALS AND METHODS

**Bacterial strains.** *C. divergens* V41 was isolated from salmon intestine and has been previously characterized by Pilet et al. (29). This strain produces a class II a bacteriocin called divercin V41 (26), active against *L. monocytogenes* both in model medium and in CSS (7, 11, 12, 31). *L. monocytogenes* RF76, RF107, RF114, RF119, RF129 and RF148 were kindly provided by ASEPT (Laval, France) for this study. All strains were stored at -80°C with 20% (v/v) sterile glycerol in Elliker broth (BK 054, Biokar Diagnostics, Beauvais, France) for *C. divergens* V41 and Brain Heart broth (BK015, Biokar Diagnostics) for *L. monocytogenes*.

**Culture media and inoculum preparation.** The broth used to cultivate *C. divergens* V41 before inoculation in microtiter plate wells and fermentors was made without protein of animal origin, and contained soy trypton (10 g l<sup>-1</sup>, Organotechnie S.A., La Courneuve, France), yeast extract (5 g l<sup>-1</sup>, Biokar Diagnostics), D-glucose (10 g l<sup>-1</sup>) and NaCl (4 g l<sup>-1</sup>). This medium was named SYGNa broth (Soy, Yeast, Glucose and NaCl). For each experiment, the *Carnobacterium* strain was sub-cultured twice successively in 10 and 100 ml of SYGNa broth for 24 h at 30°C. *L. monocytogenes* RF76 used in the agar diffusion method was sub-cultured twice successfully in 10 ml of Elliker broth for 24 h at 30°C, and *L. monocytogenes* RF107, RF114, RF119, RF129 and RF148 used in the CSS experiment were sub-cultured twice successfully in 10 ml of Brain Heart broth with 3% (w/v) NaCl for 24 h at 15°C.

**Experimental designs.** First, a screening experimental design was performed. Twelve factors having potential influence on growth have been selected : pH, temperature, carbohydrates (glucose-lactose-saccharose ; w/w/w), NaCl, yeast extract, soy peptone, sodium acetate, ammonium citrate, magnesium sulphate, manganese sulphate, ascorbic acid and

thiamine concentrations. The effects of these factors were estimated by performing a two-level incomplete factorial design (128 experiments), with duplicates of 64 experiments. The factor levels, coded as values of -1 and +1, were as follows : pH 6.5 (-1) and 8.0 (+1), temperature 15°C (-1) and 30°C (+1), carbohydrates 2 g l<sup>-1</sup> (-1) and 20 g l<sup>-1</sup> (+1), NaCl 10 g l<sup>-1</sup> (-1) and 60 g l<sup>-1</sup> (+1), yeast extract 5 g l<sup>-1</sup> (-1) and 15 g l<sup>-1</sup> (+1), soy peptone 1 g l<sup>-1</sup> (-1) and 10 g l<sup>-1</sup> (+1), sodium acetate 0 g l<sup>-1</sup> (-1) and 5 g l<sup>-1</sup> (+1), ammonium citrate 0 g l<sup>-1</sup> (-1) and 4 g l<sup>-1</sup> (+1), magnesium sulphate 0 g l<sup>-1</sup> (-1) and 0.4 g l<sup>-1</sup> (+1), manganese sulphate 0 g l<sup>-1</sup> (-1) and 0.08 g l<sup>-1</sup> (+1), ascorbic acid 0 g l<sup>-1</sup> (-1) and 1 g l<sup>-1</sup> (+1), and thiamine 0 g l<sup>-1</sup> (-1) and 0.05 g l<sup>-1</sup> (+1). The design, presented in Table 1, is a D-optimal design (6) allowing the estimation of the main effect of each factor and most of the first order interactions without aliasing.

TABLE 1 : Screening experimental design and factor levels (coded values) used to estimate the main effect of each factor (and most of the order one interactions without aliasing) on the growth of *Carnobacterium divergens* V41 (OD<sub>max</sub>) and its maximal bacteriocin activity. Experiments are performed in microtiter plate wells.

Run no.	Factor level <sup>a</sup>												Maximum OD <sub>600nm</sub>		Maximum BA (log <sub>2</sub> AU 10 μl <sup>-1</sup> ) <sup>c</sup>	
	T	pH	C	YE	SP	NaCl	NaA	MgS	MnS	AC	AA	Th	run	rep. <sup>b</sup>	run	rep. <sup>b</sup>
1	+1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	0,619	0,587	nd	nd
2	+1	+1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	+1	+1	-1	0,589		nd	
3	+1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	+1	-1	+1	0,724		1	
4	+1	+1	+1	-1	-1	-1	-1	-1	+1	-1	-1	-1	1,107	1,108	nd	nd
5	+1	-1	-1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	-1	+1	+1	0,823		nd	
6	+1	+1	-1	+1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	+1	-1	0,752	0,768	nd	nd
7	+1	-1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	-1	+1	1,084	1,084	nd	nd
8	+1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	-1	-1	-1	1,384		nd	
9	+1	-1	-1	-1	+1	-1	-1	+1	-1	-1	-1	-1	0,761	0,803	3	3
10	+1	+1	-1	-1	+1	-1	-1	+1	+1	+1	-1	+1	0,837		nd	
11	+1	-1	+1	-1	+1	-1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	1,076		8	
12	+1	+1	+1	-1	+1	-1	-1	+1	-1	-1	+1	+1	1,449	1,436	2	2
13	+1	-1	-1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	-1	-1	0,790		5	
14	+1	+1	-1	+1	+1	-1	-1	-1	-1	+1	-1	+1	0,991	0,995	nd	nd
15	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	-1	+1	+1	-1	1,162	1,249	11	11
16	+1	+1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	1,222		3	
17	+1	-1	-1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	-1	-1	-1	0,019		nd	
18	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	+1	-1	+1	-1	+1	0,002	0,006	nd	nd
19	+1	-1	+1	-1	-1	+1	-1	+1	-1	+1	+1	-1	0,039	0,044	nd	nd
20	+1	+1	+1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	+1	0,027		nd	
21	+1	-1	-1	+1	-1	+1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	0,144	0,079	nd	nd
22	+1	+1	-1	+1	-1	+1	-1	-1	+1	+1	-1	+1	0		nd	
23	+1	-1	+1	+1	-1	+1	-1	-1	+1	+1	-1	-1	0,099		nd	
24	+1	+1	+1	+1	-1	+1	-1	-1	-1	-1	+1	+1	0,026	0,038	nd	nd
25	+1	-1	-1	-1	+1	+1	-1	-1	-1	-1	+1	+1	0,051		nd	
26	+1	+1	-1	-1	+1	+1	-1	-1	+1	+1	+1	-1	0,023	0,092	nd	nd
27	+1	-1	+1	-1	+1	+1	-1	-1	+1	+1	-1	-1	0,021	0,011	nd	nd
28	+1	+1	+1	-1	+1	+1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	0,001		nd	
29	+1	-1	-1	+1	+1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	+1	0,224	0,202	3	3
30	+1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	+1	-1	+1	+1	-1	0,084		nd	
31	+1	-1	+1	+1	+1	+1	-1	+1	-1	+1	-1	+1	0,042		nd	
32	+1	+1	+1	+1	+1	+1	-1	+1	+1	-1	-1	-1	0	0	nd	nd
33	+1	-1	-1	-1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	-1	-1	0,377	0,160	nd	nd
34	+1	+1	-1	-1	-1	-1	+1	-1	-1	-1	-1	+1	0,478		nd	
35	+1	-1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	0,598		3	
36	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	+1	+1	0,471	0,507	nd	nd



113	-1	-1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	0	0	nd	nd
114	-1	+1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	+1	-1	0		nd	
115	-1	-1	+1	-1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	0,006		nd	
116	-1	+1	+1	-1	-1	+1	+1	+1	+1	+1	-1	-1	0,013	0	nd	nd
117	-1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	-1	-1	+1	+1	+1	0,037		nd	
118	-1	+1	-1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	-1	+1	-1	0,248	0,255	nd	nd
119	-1	-1	+1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	-1	-1	+1	0,001	0	nd	nd
120	-1	+1	+1	+1	-1	+1	+1	-1	-1	+1	-1	-1	0,017		nd	
121	-1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	+1	-1	-1	0	0	nd	nd
122	-1	+1	-1	-1	+1	+1	+1	-1	+1	-1	-1	+1	0		nd	
123	-1	-1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	+1	-1	+1	-1	0		nd	
124	-1	+1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	+1	+1	+1	0	0	nd	nd
125	-1	-1	-1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	-1	-1	0		nd	
126	-1	+1	-1	+1	+1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	0	0	nd	nd
127	-1	-1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	-1	-1	+1	-1	0,025	0	nd	nd
128	-1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	0,053		nd	

<sup>a</sup> The factor levels, coded as values of -1, 0 and +1 in the table, were as follows : temperature (T) 15°C (-1) and 30°C (+1), pH 6.5 (-1) and 8.0 (+1), carbohydrates (C) 2 g l<sup>-1</sup> (-1) and 20 g l<sup>-1</sup> (+1), yeast extract (YE) 5 g l<sup>-1</sup> (-1) and 15 g l<sup>-1</sup> (+1), soy peptone (SP) 1 g l<sup>-1</sup> (-1) and 10 g l<sup>-1</sup> (+1), NaCl 10 g l<sup>-1</sup> (-1) and 60 g l<sup>-1</sup> (+1), sodium acetate (NaA) 0 g l<sup>-1</sup> (-1) and 5 g l<sup>-1</sup> (+1), magnesium sulphate (MgS) 0 g l<sup>-1</sup> (-1) and 0.4 g l<sup>-1</sup> (+1), manganese sulphate (MnS) 0 g l<sup>-1</sup> (-1) and 0.08 g l<sup>-1</sup> (+1), ammonium citrate (AC) 0 g l<sup>-1</sup> (-1) and 4 g l<sup>-1</sup> (+1), ascorbic acid (AA) 0 g l<sup>-1</sup> (-1) and 1 g l<sup>-1</sup> (+1), and thiamine (Th) 0 g l<sup>-1</sup> (-1) and 0.05 g l<sup>-1</sup> (+1)

<sup>b</sup> rep are the repetitions of the runs ; nd : not determined

<sup>c</sup> *Listeria monocytogenes* RF76 was used as the indicator strain.

Three variables (pH, temperature and carbohydrates concentration) showing an interesting effect on the growth and/or on the production of bacteriocin by *C. divergens* V41 in microtiter plate wells were selected for study in fermentor. In general, each component previously tested showing a positive effect on the responses was retained for the basic composition of the culture medium. Their concentration corresponded to the level coded by the value (+1) in the previous screening experiments. A 2<sup>3</sup> complete factorial design was performed, allowing the estimation of linear effects of factors and all the first order interactions (Table 2). Three replicates of the center point were also done in order to estimate experimental error and to test the adequacy of the linear model *a priori* postulated. All experiments were randomly run. The factor levels, coded as values of -1, 0 and +1, were as follows : pH 6.5 (-1), 7.25 (0) and 8.0 (+1), temperature 15°C (-1), 22.5 (0) and 30°C (+1), carbohydrates 2 g l<sup>-1</sup> (-1), 11 (0) and 20 g l<sup>-1</sup> (+1).

TABLE 2. Experimental design and factor levels (coded values) used to model *Carnobacterium divergens* V41 maximum growth rate ( $\mu_{\max}$ ), maximum bacterial count ( $N_{\max}$ ) and bacteriocin activity (BA) as a function of carbohydrates concentration, pH and temperature. Experiments are performed in fermentor.

Run no.	Factor level <sup>a</sup>			Growth response <sup>b</sup>		Maximum bacteriocin activity <sup>c</sup>
	Carbohydrates	pH	Temperature	$\mu_{\max}$ (h <sup>-1</sup> )	$N_{\max}$ (CFU ml <sup>-1</sup> )	BA (log <sub>2</sub> AU 10 $\mu$ l <sup>-1</sup> )
1	-1	-1	-1	0.32	3,2.10 <sup>9</sup>	9
2	-1	-1	+1	0.72	2,5.10 <sup>9</sup>	10
3	-1	+1	-1	0.31	3,0.10 <sup>9</sup>	4
4	-1	+1	+1	0.81	7,5.10 <sup>8</sup>	0
5	+1	-1	-1	0.22	2,3.10 <sup>10</sup>	15
6	+1	-1	+1	0.77	1,8.10 <sup>9</sup>	2
7	+1	+1	-1	0.27	2,6.10 <sup>10</sup>	4
8	+1	+1	+1	0.67	2,6.10 <sup>9</sup>	0
9	0	0	0	0.54	1,4.10 <sup>9</sup>	5
10	0	0	0	0.60	7,7.10 <sup>9</sup>	7
11	0	0	0	0.50	3,8.10 <sup>9</sup>	3

<sup>a</sup> The factor levels, coded as values of -1, 0 and +1 in the table, were as follows : carbohydrates concentration (glucose-lactose-saccharose ; w/w/w) 2 g l<sup>-1</sup> (-1), 11 g l<sup>-1</sup> (0), and 20 g l<sup>-1</sup> (+1) ; pH 6.5 (-1), 7.25 (0) and 8.0 (+1) ; temperature 15°C (-1), 22.5°C (0), and 30°C (+1).

<sup>b</sup> Maximum growth rate ( $\mu_{\max}$ ) was estimated by the Gompertz model.

<sup>c</sup> *Listeria monocytogenes* RF76 was used as the indicator strain.

**Experimental conditions.** For the screening design, experiments were performed in microtiter plate containing 250  $\mu$ l of medium per well (200  $\mu$ l of culture medium and 50  $\mu$ l of inoculum). Each compound (carbohydrates, soy peptone, sodium acetate, ammonium citrate, magnesium sulphate, manganese sulphate, ascorbic acid and thiamine) was dissolved individually in a buffer solution Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0.1 M) at pH 6.5 and 8.0. For each level (+1 or -1) a 12.5-fold concentrated stock solution was prepared. NaCl being insoluble when

concentrated 12.5 times was prepared with yeast extract, allowing a 6.25-fold concentration. Because of solubility problem in phosphate buffer, magnesium sulphate and manganese sulphate solutions were prepared in distilled water adjusted at pH 6.5 and 8.0 with HCl/NaOH. Five milliliters of each of the eight individual solutions and 10 ml of NaCl + yeast extract solution were mixed according to the composition of the 64 culture media required for the experiments (Table 1). The volume was adjusted to 50 ml when necessary with the appropriate buffer solution. The pH of each culture medium was verified and media were sterile filtered (0.22  $\mu\text{m}$ ) and kept at 4°C before used. Sixty four experiments were performed respectively at 15°C and at 30°C in two successive blocks of experiments, in a microtiter plate containing 200  $\mu\text{l}$  of medium per well. For each temperature, 32 experiments were repeated (Table 1). The culture media were inoculated with 50  $\mu\text{l}$  of an appropriate dilution of a pre-culture of *C. divergens* V41 to obtain an initial inoculation concentration of  $10^6$  CFU  $\text{ml}^{-1}$ .

Experiments in fermentors were performed in a 2-liter SGI fermentor (SGI, Toulouse, France). Nine hundred and forty milliliters of the optimized culture broth according to the results of the screening experiments in microtiter plate wells (see results) were prepared and sterilized by autoclaving 15 min at 121°C in fermentor. This medium contained (g  $\text{l}^{-1}$ ) : NaCl (10), yeast extract (15), soy peptone (10),  $\text{MgSO}_4$  (0.4) and ascorbic acid (1). Next, 4, 22 or 40 ml of filter-sterilized carbohydrates solution (glucose-lactose-saccharose ; w/w/w ; 500 g  $\text{l}^{-1}$ ) were added to bring the final carbohydrates concentration to 2, 11 and 20 g  $\text{l}^{-1}$  respectively. When required, the volume was adjusted to 980 ml with sterile distilled water. The culture medium was brought to the final volume (1 liter) by addition of 20 ml of the *C. divergens* V41 inoculum. The subculture obtained in SYGNa broth as described above was appropriately diluted to obtain an initial concentration of  $10^7$  CFU  $\text{ml}^{-1}$  in each fermentor. Cultures were run under agitation (200 rpm) at 15, 22.5 or 30°C when appropriate, with the pH adjusted to 6.5, 7.25 or 8.0 by automatic addition of NaOH (6N). The pH and temperature values were controlled online by the fermentor probes.

**Analysis of the sample.** For the screening design, bacterial growth was estimated by automatic optical density (OD) measurements at 600 nm, after shaking, with a microplate reader (ELX808iu Ultra Microplate Reader, Biotek Instruments, St-Quentin Yvelines, France). Measurements were done every hour during 48 h at 15°C and every half hour during 24 h at 30°C and data were collected on a computer (Excel software, version 10, Microsoft, France) ; the response retained was the maximal  $\text{OD}_{600\text{nm}}$  ( $\text{OD}_{\text{max}}$ ) calculated as the difference between the maximum  $\text{OD}_{600\text{nm}}$  observed within 24-48 h of culture and minimum  $\text{OD}_{600\text{nm}}$ .

For the wells where a growth was observed, experiments were repeated in a new set and divercin V41 was quantified in the supernatant by the agar diffusion method (7), using *L. monocytogenes* RF76 as target strain. A translucent zone revealed sensitivity of the target strain. The measures were done at the beginning of the stationary phase and at the end of the experiment (24 h at 30°C, or 48 h at 15°C), and the maximal bacteriocin activity detected in the supernatants was retained. Results were expressed as base 2 logarithm of arbitrary activity units per 10 µl.

For experiments in fermentors, samples were aseptically withdrawn from the fermentation vessel at convenient time intervals. The OD<sub>600nm</sub> was measured every hour, and culturable cell number and bacteriocin activity were determined after inoculation, and at the beginning and the end of the stationary phase. Culturable cells were determined by spread plating serial dilutions of the samples onto Elliker with 1.5% agar plates and incubating at 30°C for 48 h. Growth curves were modeled with the Gompertz model (37). Maximum growth rate ( $\mu_{\max}$ ) estimated from the Gompertz fitting and maximum bacterial count ( $N_{\max}$ ) estimated by the plating technique were retained as responses. Bacteriocin concentration was semi quantified by the same method described for experiments in microtiter plate wells and the maximum concentration was retained as response ( $\log_2$  AU 10 µl<sup>-1</sup>).

**Experiments in sterile CSS blocks.** According to results from the experimental design in fermentor, *C. divergens* V41 was cultivated again in three different conditions. Conditions 1 : carbohydrates 20 g l<sup>-1</sup>, pH = 8.0 , 30°C ; conditions 2 : carbohydrates 20 g l<sup>-1</sup>, pH = 6.5, 15°C and conditions 3 : carbohydrates 2 g l<sup>-1</sup>, pH = 6.5, 15°C. The inoculum size of *C. divergens* V41 and the regulation of parameters in fermentor were the same as describe above. When the growth in the three fermentors reached the stationary phase, cultures were stopped and the cells were centrifuged and washed in physiological saline solution (0.1% (w/v) tryptone (Biokar) and 0.85% (w/v) NaCl) just before used. Appropriate dilutions of these cultures were co-inoculated with a set of five *L. monocytogenes* strains (RF107, RF114, RF119, RF129 and RF148) in parts of 30 g of sterile CSS blocks (18). CSS blocks were vacuum-packed and stored for 36 days (9 days at 4°C followed by 27 days at 8°C). The initial desired levels of *L. monocytogenes* and *C. divergens* V41 in the salmon flesh were 20 and 10<sup>5</sup> CFU g<sup>-1</sup> respectively. A control for *L. monocytogenes* was prepared by inoculating CSS blocks with *L. monocytogenes* alone (the *Carnobacterium* subculture being replaced by sterile physiological saline solution). Microbial analysis (LAB and *Listeria* spp.) was carried out weekly with method described by Brillet et al. (7). Each experiment was repeated three times.

**Statistical analysis.** Results of the screening design and the design in fermentor were analyzed by the Experimental Design Module of the Statgraphics software (Statgraphics Plus, version 4, Manugistics, Rockville, Maryland, USA). For microbial data in CSS, results are expressed as mean of three independent measures  $\pm$  95% Confidence Interval ( $CI = 1.96 \times \sqrt{\text{standard deviation}^2/3}$ ). Means were compared by the least significance difference (LSD) test at the 0.05 level of probability (Statgraphics Plus).

## RESULTS

**Screening experimental design.** The 192 growth curves performed in microtiter plate wells have been plotted ( $OD_{600nm} - OD_{initial}$  as a function of time) and  $OD_{max}$  was retained as response. Results are presented in Table 1. The incomplete factorial design allowed the estimation without aliasing of the main effects of the twelve factors and most of the first order interactions. Nine factors had a significant effect ( $P < 0.05$ ) on the response  $OD_{max}$ . Carbohydrates (+0.16), pH (+0.15), ascorbic acid (+0.11), yeast extract (+0.10), soy peptone (+0.07) and magnesium sulphate (+0.06) had a positive effect, indicating that the response increased when these factors reached their maximum level (coded by the value +1). The estimated effects of NaCl (-0.86), sodium acetate (-0.15) and manganese sulfate (-0.12) concentrations were negative, indicating that the response decreased when the concentration of these factors increased, and conversely, into the limits of the coded values used in this study. Three factors (ammonium citrate, thiamine and temperature) did not show significant effects on the response. Among the nine factors cited, NaCl had by far the main influence on the growth (-0.86). That means that when NaCl concentration varies from the level -1 (1%) to +1 (1%),  $OD_{max}$  estimated can be decreased by 0.86 DO unit. As an indication, the average  $OD_{max}$ , estimated when all the factors are at level 0, was 0.46. The effect of the eight other factors, positive or negative, were significant but weakest, ranging between 0.06 to 0.16. Five first order interactions had also a significant but slight effect on the response. The interactions of NaCl with carbohydrates (-0.19), pH (-0.16), or ascorbic acid (-0.08) or the interaction of temperature with ascorbic acid (-0.10) had a negative estimated effect, whereas the interaction of sodium acetate with NaCl (+0.13) had a positive effect on the response. Those results indicate that the inhibiting effect of NaCl on growth is reinforced at high value of carbohydrate, pH and ascorbic acid, but lowered in presence of sodium acetate.



For the wells where a growth was observed, runs were repeated in a new set of experiments and bacteriocin activity was measured at the beginning of the stationary phase (known from the first set of experiments) and at the end of the experiment (24 h at 30°C, 48 h at 15°C). The maximal bacteriocin activity detected in the supernatants was retained as response and results are presented in Table 1. For the wells where no growth was observed ( $OD_{max} < 0.01$  in 52 wells among 192), bacteriocin was supposed not to be produced. This hypothesis has been previously validated in two wells showing no  $OD_{600nm}$  increase. Seven factors were found to have significant effects ( $P < 0.05$ ) on the bacteriocin activity expressed as  $\log_2 AU 10 \mu l^{-1}$ . The estimated effects of soy peptone (+1.61), ascorbic acid (+1.24), carbohydrates (+1.09), yeast extract (+0.70) and sodium acetate (+0.28) were positive, indicating that the response  $BA_{max}$  (maximum bacteriocin activity) increased when these factors reached the level coded by the value (+1). The estimated effects of NaCl (-3.53), pH (-1.99), temperature (-0.84) and manganese sulphate (-0.51) were negative, indicating that the response decreased when the value of these factors increased. Thiamine, ammonium citrate and magnesium sulphate concentrations did not show significant effects on the response. Once again, NaCl was the factor with the highest effect on the response, followed by pH. The average  $BA_{max}$ , estimated when all the factors are at level 0, was 1.83. When NaCl concentration varies from the level +1 (6%) to -1 (1%),  $BA_{max}$  estimated can be increased by  $3.53 \log_2 AU 10 \mu l^{-1}$ . When the pH varies from 8 to 6.5,  $BA_{max}$  estimated can be increased by  $1.99 \log_2 AU 10 \mu l^{-1}$ . The effect of the seven other factors, positive or negative, were significant but weakest, ranging between 0.28 to 1.61. Seven first order interactions had also a significant but slight effect on the response. The interactions of NaCl with carbohydrates (-1.21) or ascorbic acid (-1.11), the interaction of pH with soy peptone (-0.74) and the interaction of temperature with ascorbic acid (-0.59) had a negative estimated effect, whereas the interaction of NaCl with pH (+1.86), temperature (+0.94) or manganese sulphate (+0.59) had a positive effect on the response  $BA_{max}$ .

The purpose of the screening experimental design in microtiter plate wells was to obtain experimental data which served as an initial approach to optimize growth in larger volume, establishing which factors had significant effects on both responses, and whether these effects were positive or not. In the purpose of an application of *C. divergens* V41 in CSS at pilot scale, it is necessary to produce high quantity of living cells and so to validate in fermentor results obtain in microtiter plate wells. The two factors having the main positive effects on growth were retained for further experiments : carbohydrates concentration (2-20 g  $l^{-1}$ ) and pH (6.5-8.0). The other components previously tested showing a significant positive

effect on the responses (ascorbic acid, yeast extract, soy peptone and magnesium sulphate) were retained for the basic composition of the culture medium. The concentration chosen corresponded to the level coded by the value (+1). Concentrations of the components showing a negative or a non significant effect (NaCl, sodium acetate, manganese sulphate, ammonium citrate and thiamine) were fixed at the level coded by the value (-1). For all those factors, the levels chosen for the basic medium also corresponded to the levels in favor of a high production of bacteriocin. The factor temperature (15-30°C) was tested again because of its influence on the bacteriocin production. Finally, the composition of the basic culture medium used in fermentor was as follows ( $\text{g l}^{-1}$ ) : NaCl (10), yeast extract (15), soy peptone (10),  $\text{MgSO}_4$  (0.4) and ascorbic acid (1).

**Optimization of growth and bacteriocin activity by *C. divergens* V41 in fermentor.** The eleven growth curves followed by  $\text{OD}_{600\text{nm}}$  measurements were fitted with the Gompertz model and  $\mu_{\text{max}}$  was retained as one of the responses. As an example, Fig. 1 shows the triplicates growth curves of *C. divergens* V41 at the central point of the domain.

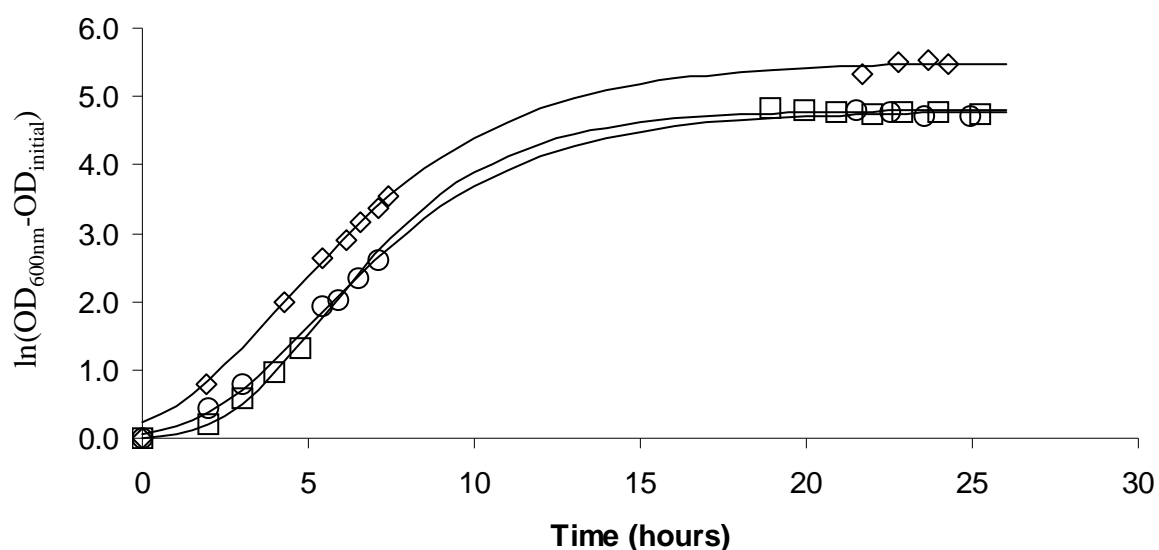


FIG. 1 Growth curves of *Carnobacterium divergens* V41 at the central point of the domain (temperature 22,5°C ; pH 7,25 ; carbohydrates 11  $\text{g l}^{-1}$ ). Experimental points in triplicate ( $\diamond$  ;  $\square$  ;  $\circ$ ) and fitted curves with the Gompertz model are shown.

The triplicates are similar and the maximal bacterial count is obtained after 20 h of culture in fermentor. For all the experiments, the maximum culturable bacterial count was

determined by the plating technique when  $OD_{max}$  was reached. Results from the complete two-level factorial design performed in fermentor allowed to estimate the linear effects of the three factors carbohydrate concentration, pH and temperature and their first order interactions on the different responses ( $\mu_{max}$ , and  $N_{max}$ ). An additional experiment in the center of the domain, done in triplicate, allowed to estimate experimental error and to validate the linear model *a priori* postulated. Results are shown in Table 3. Temperature was the only factor having a significant effect ( $+0.47$  ;  $P<0.05$ ) on  $\mu_{max}$  and no interaction between factors was detected. The effect of temperature was linear and positive, indicating that  $\mu_{max}$  increased proportionally to the temperature increase in the domain studied. Maximum growth rate can be increased by  $0.47 \text{ h}^{-1}$  when temperature increases from 15 to  $30^\circ\text{C}$ . As an example, Fig. 2 shows  $\mu_{max}$  as a function of temperature and carbohydrate, pH being fixed at level 0 (7.25).

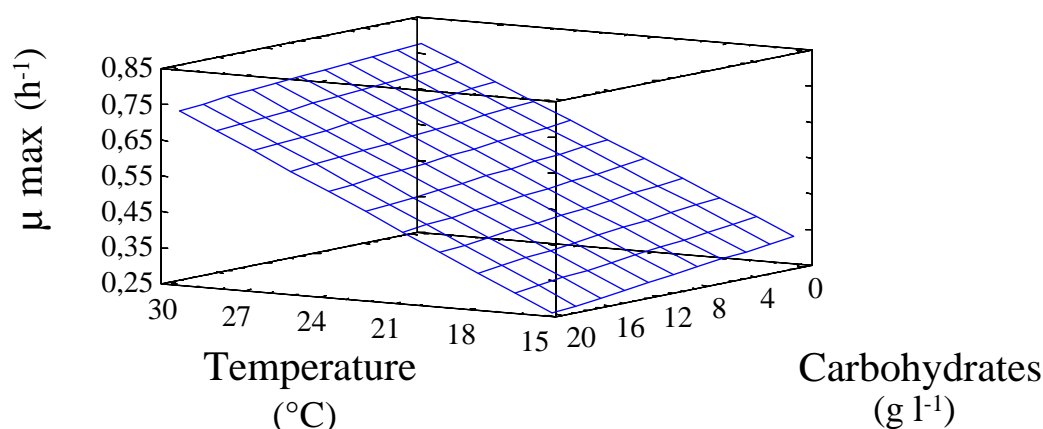


FIG. 2 Response surface of the maximum growth rate  $\mu_{max}$  ( $\text{h}^{-1}$ ) of *Carnobacterium divergens* V41 as a function of temperature and carbohydrates concentration at pH 7.25.

A lack of fit test was designed to determine whether the linear model chosen was adequate to describe the observed data, or whether a more complicated model should be used. The test was performed by comparing the variability of the current model residuals to the variability between observations at replicate settings of the factors. The P-value for lack-of-fit was 0.32 (greater than 0.05), indicating the model was adequate for the observed data at the 95.0% confidence level. The R-Squared statistic indicates that the model as fitted explains 96.6% of the variability in  $\mu_{max}$ . Concerning  $N_{max}$ , temperature and carbohydrates concentration and their interaction, showed significant effects (respectively  $-12.1 \times 10^9$ ,  $+11.2 \times 10^9$ ;  $-10.6 \times 10^9$ ;  $P<0.05$ ) on this response whereas pH had no effect (Table 3).

TABLE 3. Effects of temperature (A), pH (B) and carbohydrates (C) and their interactions on the responses maximum growth rate ( $\mu_{\max}$ ), maximum bacterial count ( $N_{\max}$ ) and bacteriocin activity (BA ; *Listeria monocytogenes* RF76 was used as the indicator strain).

Effects	$\mu_{\max}$ ( $\text{h}^{-1}$ )	$N_{\max}$ ( $10^9$ CFU $\text{ml}^{-1}$ )	BA ( $\log_2$ AU $10 \mu\text{l}^{-1}$ )
Average	0.52	6.9	5.4
A	0.47**	-12.1**	-5.0*
B	0.01	0.5	-7.0**
C	-0.06	11.2**	-0.5
AB	-0.01	-0.9	1.0
AC	0.01	-10.6**	-3.5
BC	-0.03	1.4	0.5

\*\*  $P < 0.05$

\*  $P < 0.10$

The maximum bacterial count as a function of temperature and carbohydrate is shown on Fig. 3, pH being fixed at level 0 (7.25). Contrary to what has been observed for the maximum growth rate, the effect of temperature is negative, indicating that the maximum bacterial count increased when the temperature decreased in the limit of the experimental design. The effect of carbohydrates concentration is positive, i.e. the response increased when the carbohydrates concentration increased. Due to an important negative interaction between temperature and carbohydrates concentrations, the negative effect of temperature is reinforced at high carbohydrates concentrations, and the positive effect of carbohydrate concentration is increased at low temperatures. The lack of fit test ( $P = 0.41$ ) indicated that the linear model could be validated at the 95.0% confidence level. The R-Squared statistic indicates that the model as fitted explains 94.0% of the variability in maximum bacterial counts.

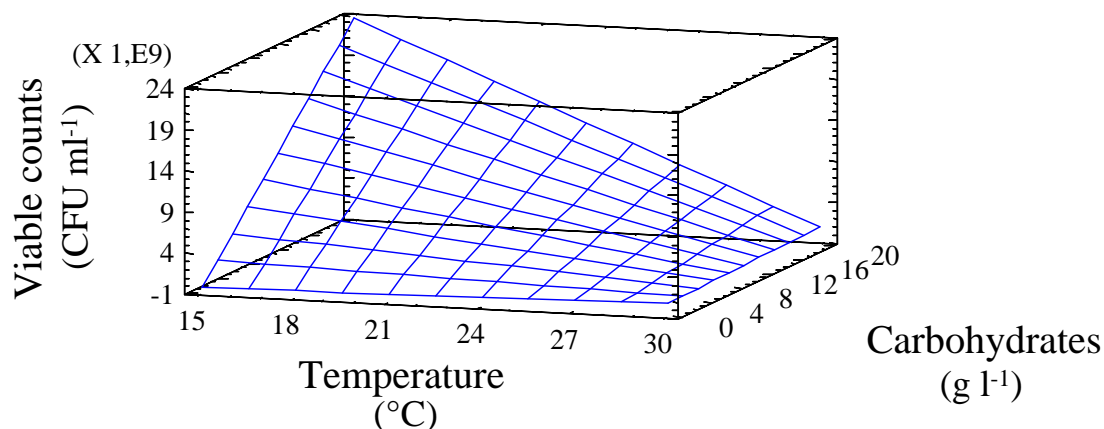


FIG. 3 Response surface of the maximum bacterial count (CFU ml<sup>-1</sup>) of *Carnobacterium divergens* V41 as a function of temperature and carbohydrates concentration at pH 7.25.

Concerning the bacteriocin activity (BA), pH was the factor which had the main effect on the response, expressed as  $\log_2$  AU 10 $\mu$ l<sup>-1</sup> (-7.0 ;  $P < 0.05$ ). This effect was negative, i.e. bacteriocin activity decreased when pH increased. Temperature had a slight significant effect on the response (-5.0 ;  $P < 0.10$ ) whereas carbohydrates concentration had no significant effect. No interaction between factors was observed. The linear model was once again validated by the three experiments performed at the centre of the domain. The R-Squared statistic indicates that the model as fitted explains 84.2% of the variability in viable counts. As an example, the bacteriocin activity as a function of temperature and pH is shown on Fig. 4, carbohydrates being fixed at 11 g l<sup>-1</sup>. The average BA, estimated when all the factors are at level 0, was 5.4  $\log_2$  AU 10 $\mu$ l<sup>-1</sup>, corresponding to 4222 UA ml<sup>-1</sup>. When the pH varies from the level +1 (8.0) to -1 (6.5), BA estimated can be increased by 7.0  $\log_2$  AU 10 $\mu$ l<sup>-1</sup>. That means the bacteriocin activity in AU per milliliter is multiplied by 2<sup>7</sup> when pH varies from 8.0 to 6.5. As an example, predicted BA is equal to 1.9  $\log_2$  AU 10 $\mu$ l<sup>-1</sup> at pH 8 (the other factors being fixed at the level 0), corresponding to 373 UA ml<sup>-1</sup>, and was equal to 8.9  $\log_2$  AU 10  $\mu$ l<sup>-1</sup> at pH 6.5, corresponding to 47771 UA ml<sup>-1</sup>.

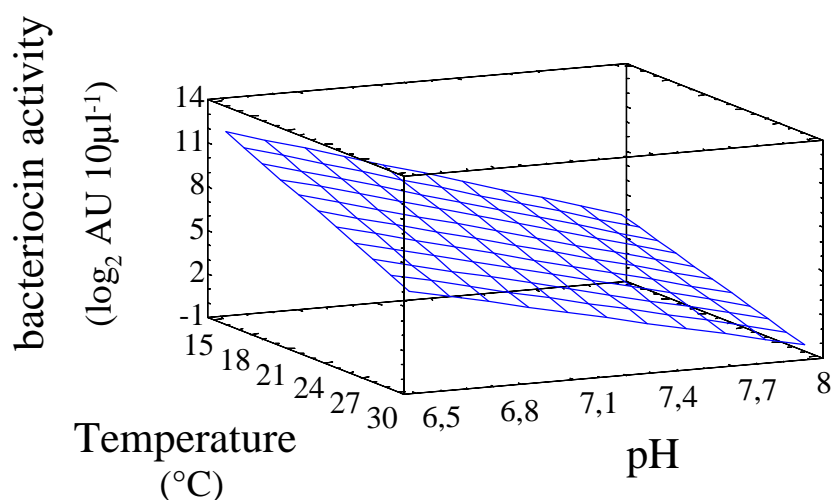


FIG. 4 Response surface of the bacteriocin production ( $\log_2$  AU  $10 \mu\text{l}^{-1}$ ) by *Carnobacterium divergens* V41 as a function of temperature and pH with a carbohydrates concentration of  $11 \text{ g l}^{-1}$ . *Listeria monocytogenes* RF76 was used as the indicator strain.

According to these results, the culture conditions to maximize the final bacterial culturable count in fermentor in the broth without animal protein are  $20 \text{ g l}^{-1}$  of carbohydrates and a temperature of  $15^\circ\text{C}$ , pH within the range  $6.5 - 8.0$  having low effect on this response. With those conditions (carbohydrate  $20 \text{ g l}^{-1}$ , temperature  $15^\circ\text{C}$ , pH  $8.0$ ), a final predicted bacterial count of  $2.5 \times 10^{10} \text{ CFU ml}^{-1}$  can be reached. On the other hand, at  $15^\circ\text{C}$ ,  $\mu_{\text{max}}$  is much lower than at  $30^\circ\text{C}$  ( $0.26$  and  $0.73 \text{ h}^{-1}$  respectively) and consequently, the maximum bacterial count is reached after  $44-50 \text{ h}$  of fermentation versus  $22-26 \text{ h}$  at  $30^\circ\text{C}$ .

The optimal conditions for bacteriocin production in the broth without animal protein were pH  $6.5$  with a temperature of  $15^\circ\text{C}$ , carbohydrates concentration within the range  $2-20 \text{ g l}^{-1}$  having no significant effect on the response. In those conditions (pH  $6.5$ , temperature  $15^\circ\text{C}$ , carbohydrate  $20 \text{ g l}^{-1}$ ), a production of  $13 \log_2 \text{ AU } 10\mu\text{l}^{-1}$  was predicted, corresponding to  $819200 \text{ AU ml}^{-1}$ .

**Growth and inhibition capacities of *C. divergens* V41 in CSS after growing in optimized media.** To evaluate the influence of the culture conditions on the subsequent capacity of *C. divergens* V41 to grow in CSS and inhibit *L. monocytogenes*, *C. divergens* V41 was cultivated either in the optimal conditions of growth or in the optimal conditions of production of divercin V41. For the optimal conditions of growth (conditions 1), it was decided to retain condition providing a rapid growth i.e. to work at  $30^\circ\text{C}$ . The pH having no

significant effect on  $\mu_{\max}$ , was fixed at 8.0 to be very different from pH chosen in condition 2. Carbohydrates concentration also had low influence on  $\mu_{\max}$  and was fixed at 20 g l<sup>-1</sup> to increase the final bacterial count. In conditions 1 (temperature 30°C, pH 8.0, carbohydrates 20 g l<sup>-1</sup>), a final bacterial count of 1.6 x 10<sup>9</sup> CFU ml<sup>-1</sup> is predicted by the model, in 22 h. The optimal conditions for bacteriocin production (conditions 2) were pH = 6.5 and 15°C. Carbohydrates concentration having no significant effect on the response was fixed at 20 g l<sup>-1</sup> for the same reason evocated previously. Another culture of *C. divergens* V41 in fermentor with the composition of culture medium nearer from the CSS matrix was carried out : the variables were fixed at 2 g l<sup>-1</sup> carbohydrates, pH 6.5 and temperature of growth 15°C (conditions 3). As a potential application of the strain in a biopreservation strategy, *C. divergens* V41 cultivated in those three different conditions was inoculated in sterile CSS blocks in co-culture with *L. monocytogenes*. The salt and total phenol concentrations of CSS blocks used in these experiments were respectively 4.3% (w/w, total phase) corresponding to 6.3% (w/w, water phase) and 1.25 mg 100 g<sup>-1</sup>. Dry matter and total fat content were 35.9% (w/w) and 7.6% (w/w) respectively. Fig. 5 represents the growth curves of *C. divergens* V41 and *L. monocytogenes* in CSS during the five weeks of vacuum storage at chilled temperature. *C. divergens* V41 inoculated after pre-cultivating under the three different conditions were able to colonize CSS blocks. For *C. divergens* V41 cultivated under conditions 2 and 3, the inoculation levels in CSS blocks were 3.7 ± 1.7 x 10<sup>5</sup> and 2.3 ± 0.6 x 10<sup>5</sup> CFU g<sup>-1</sup> respectively (no statistical difference). Then a very slight growth was observed during the chilled storage, growth curves being generally similar but final count was slightly higher for *C. divergens* V41 pre-cultivated in conditions 2 than for *C. divergens* V41 in conditions 3 (1.8 ± 0.9 x 10<sup>6</sup> and 6.1 ± 1.5 x 10<sup>5</sup> CFU g<sup>-1</sup> respectively). For *C. divergens* V41 pre-cultivated in conditions 1, the initial inoculation level was lower by approximately 1 log<sub>10</sub> (1.6 ± 0.4 x 10<sup>4</sup> CFU g<sup>-1</sup> at day 0). No change was observed during the first two weeks, but during the third week (storage at 8°C), the growth increased considerably and at the end of storage the strain reached the same level (6.7 ± 7.6 x 10<sup>5</sup> CFU g<sup>-1</sup>) than for *C. divergens* V41 pre-cultivated in conditions 2 or 3. *L. monocytogenes* inoculated alone grew easily in CSS blocks (from 4.0 ± 0.9 x 10<sup>1</sup> to 0.8 ± 1.2 x 10<sup>4</sup> CFU g<sup>-1</sup>). When the pathogenic strains were in co-culture with *C. divergens* V41 pre-cultivated in conditions 2 and 3, the growth of *L. monocytogenes* was totally inhibited all over the storage, the final count reaching 3.5 ± 0.5 x 10<sup>1</sup> and 2.2 ± 0.9 x 10<sup>1</sup> CFU g<sup>-1</sup> respectively. When *L. monocytogenes* was inoculated with *C. divergens* V41 pre-cultivated in conditions 1, only a slight but not significant inhibition was observed at the end of the storage

( $5.6 \pm 1.0 \times 10^2$  CFU g<sup>-1</sup> for *L. monocytogenes* with *C. divergens* V41 versus  $0.8 \pm 1.2 \times 10^4$  CFU g<sup>-1</sup> for *L. monocytogenes* alone).

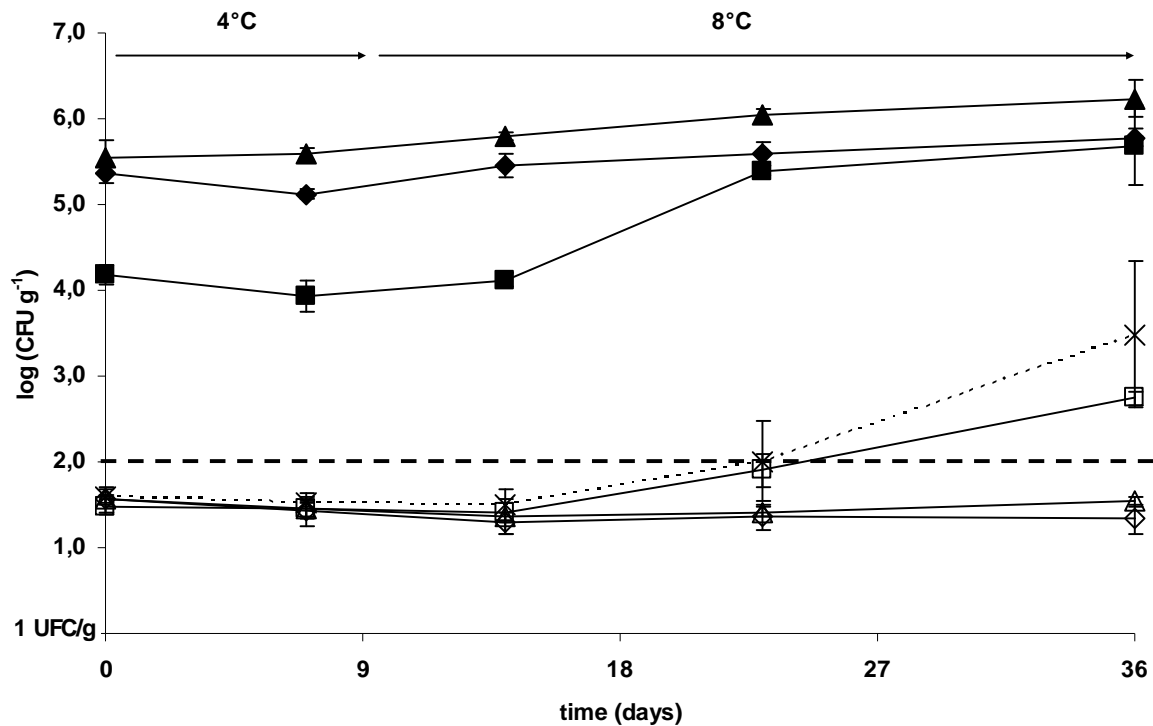


FIG. 5 Growth of *Carnobacterium divergens* V41 in sterile CSS blocks after culture in fermentor in conditions 1 (■ : 30°C, pH 8.0, 20 g l<sup>-1</sup> carbohydrates), conditions 2 (▲ : 15°C, pH 6.5, 20 g l<sup>-1</sup> carbohydrates) and conditions 3 (◆ : 15°C, pH 6.5, 2 g l<sup>-1</sup> carbohydrates) in co-culture with a mix of five strains of *Listeria monocytogenes* (□ : conditions 1 ; △ : conditions 2 ; ◇ : conditions 3) during vacuum storage at 4 and 8°C. The growth curve in dotted lines (×) represents the mix of *Listeria monocytogenes* inoculated alone. Each growth curve represents the mean of three enumerations (bars : 95% confidence interval).

## DISCUSSION

Optimization of growth and bacteriocin production by *C. divergens* V41 in fermentor as a preliminary step to produce the strain or its bacteriocin for an application in fish products



was established. The study was accomplished in three successive steps : first, a screening experimental design was performed in microtiter plate wells to determine the main variables that could affect the growth and bacteriocin activity ; second, a  $2^3$  complete factorial two-level design with replication at the central point was performed in fermentors to verify the results obtained in microtiter plate wells ; third, a potential application of the strain *C. divergens* V41 in CSS pre-cultivated in different conditions was investigated to verify its capability to grow in the product and inhibit *L. monocytogenes*.

Twelve factors having potential influence on growth have been chosen according to the literature (9, 24, 27) and composition of selective LAB culture media such as Elliker (14) or MRS (10). The screening experimental design to estimate the effect of each factor was chosen according to different considerations. Very often in literature, screening of numerous factors is performed with experimental designs containing reduced number of experiments ( $k+3$  at maximum,  $k$  being the number of factors studied). Those designs, called Hadamard matrices (30) allow the estimation of the main effect of the  $k$  factors but they are all aliased with first (and higher) order interactions, thus leading to possible confusions when selecting the most influent factors. In our study, we wanted to estimate without aliasing the main effects of the twelve factors and their first order interactions. A  $2^{12-5}$  (128 experiments) fractional factorial design was necessary to estimate these effects. However, preparing 128 different culture media was unrealistic and we decided, for material and time reasons, that we could prepare 64 different culture media at the maximum. A D-optimal design was generated using the Federov modified method (procedure OPTEX of the SAS/QC software : Version 6, First Edition, Cary, NC:SAS Institute Inc., 1991, 660 pp.) : the determinant of the information matrix is maximized iteratively under the constraint of the number of experiments. 64 runs combining eleven factors (corresponding to 64 different culture media, see Table 1) were performed at 30°C in a first block of experiments and the same runs were then performed at 15°C in a second block. This design provided much more information than a classical fractional  $2^{12-6}$  (64) factorial design. A microtiter plate contains 96 wells, allowing replicates of 32 experiments in each block.

The response “maximum optical density” was chosen in the screening experiments because the increase of the number of cells could be easily observed every half hour or every hour by the use of a microplate reader with automatic measurements of optical density at 600 nm, allowing the follow-up of 96 growth curves per run. The cells enumerations (CFU ml<sup>-1</sup>), providing a better estimation of the growth parameters, were not realizable to follow the 192 growths in two runs. Concerning the bacteriocin activity, results were expressed as base 2

logarithm of arbitrary activity units per 10  $\mu\text{l}$  ( $\log_2 \text{AU } 10 \mu\text{l}^{-1}$ ). This logarithmic transformation was used to reduce variance due to the wide range of activity values obtained. This answer had also a biological significance, corresponding to  $n$ ,  $1/2^n$  being the dilution factor of the last spot showing no inhibition zone.

After analyzing the screening experiments, the NaCl concentration showed the greatest effect on the growth and the bacteriocin activity. The level (+1) corresponding to 6% NaCl (w/v) in the medium was chosen because it corresponded to the NaCl concentration found in CSS (water phase) in Europe (8). The effect of NaCl was negative into the limits of the values used in this study. Although the Carnobacteria are halotolerant (23), a high concentration of NaCl partially inhibited the growth, as it has been shown by Connil et al. (9) in sterile CSS extract. The pH factor had a significant but slight positive effect on the growth. It is reported that Carnobacteria can grow easily at alkaline pH (16), therefore a slight increase of pH may favour their growth in a culture medium. On the contrary, the pH had a significant negative effect on the bacteriocin production, showing a slight acidic pH (such as 6.5) are necessary to obtain a high bacteriocin activity. The optimum pH for growth differed from the optimum pH for bacteriocin activity as it was already observed for a bacteriocin-producing strain of *Lactobacillus curvatus* (24). Concerning the main components of the culture medium, carbohydrates, soy peptone and ascorbic acid are energetic and constitutive substrates. The ascorbic acid decreases the redox potential which is favourable for the growth of LAB, which are aero-anaerobic micro-organisms. Manganese sulphate, as a stimulator of certain enzymes in LAB (4), has been shown to stimulate growth of Carnobacteria (5) and a high concentration is used by Wasney et al. (35) to develop a selective culture medium for this genus. In our study, magnesium sulphate and manganese sulphate did not show interesting effects on the growth and bacteriocin activity, probably due to the presence of other components (vitamins, cofactors...) in the soy peptone and yeast extract present in the medium even at level -1 (1 and 5 g l<sup>-1</sup> respectively).

The experimental design in fermentors was performed to verify the results obtained in the screening experiment. Indeed, the conditions in fermentors are probably different from those in microtiter plate wells, especially agitation conditions and pH regulation. Values of the three variables selected were the same as for the screening experiment so as to keep the region of highest growth and highest bacteriocin activity previously observed. The experimental design allowed to find a correlation between the responses and the three variables tested. The maximum bacterial count was mainly correlated to temperature and carbohydrate concentration, pH showing no significant effect. In microtiter plate wells, a

positive effect of pH had been noticed. However, pH regulation was very different in microassay (buffered) and in fermentor (addition of NaOH). Moreover, the response measured in fermentor was the culturable count whereas in microtiter plate wells, bacterial count was estimated by OD, which does not distinguish living from dead micro-organisms. A maximum count was observed at high carbohydrate value and low temperature. The simplified fitted model (non significant parameters have been left out) for the maximal bacterial count was  $N_{\max} \text{ (CFU ml}^{-1}\text{)} = 6.9 \times 10^9 - 6,0 \times 10^9 \cdot (T^\circ)_c + 5.6 \times 10^9 \cdot (\text{carbohydrate})_c - 5.3 \times 10^9 \cdot (T^\circ)_c \cdot (\text{carbohydrate})_c$  where  $(T^\circ)_c$  and  $(\text{carbohydrate})_c$  were the coded values of the factors. Carbohydrate concentration at  $2 \text{ g l}^{-1}$  is probably a limiting factor for growth. Although the negative effect of temperature had not been noticed in the screening experiments, may be for the same reasons than for pH, this negative effect was coherent with previous results observed in Elliker broth by Duffes et al. (12). Although increasing temperature from 15 to 30°C had an inhibiting effect on the final living biomass, it allowed to reduce the time to reach the maximum bacterial count. Indeed,  $\mu_{\max}$  was highly dependant of temperature ; the fitted model was  $\mu_{\max} \text{ (h}^{-1}\text{)} = -0,52 + 0,23 \cdot (T^\circ)_c$ . In conclusion, at 15°C and  $20 \text{ g l}^{-1}$  of carbohydrate, a final biomass of  $2.4 \times 10^{10} \text{ CFU ml}^{-1}$  can be obtained in 44-50 h, whereas at 30°C,  $1.2 \times 10^9 \text{ CFU ml}^{-1}$  can be reached in 20-26 h. The bacteriocin production was mainly dependent on pH and temperature, maximum BA being obtained at low pH and low temperature, confirming results in microtiter plate wells. Duffes et al. (12) also have shown that *C. divergens* V41 produced more divercin V41 in 10 ml Elliker tube at 20°C than at 30°C. In the optimum condition, (pH 6.5, temperature 15°C, carbohydrate  $20 \text{ g l}^{-1}$ ), a production of  $13 \log_2 \text{ AU } 10\mu\text{l}^{-1}$  was predicted, corresponding to  $819200 \text{ AU ml}^{-1}$ . The observed value was even more elevated (Table 2) :  $15 \log_2 \text{ AU } 10 \mu\text{l}^{-1}$ , corresponding to  $3276800 \text{ AU ml}^{-1}$ . This production is much higher than semi-optimized production obtained by Métivier et al. (25) in the aim of purification of divercin V41. After 40 h of culture in 2-l or 10-l bioreactor in tween-80 deficient MRS, 20°C and pH regulated at 6.5,  $4050 \text{ UA ml}^{-1}$  was obtained. However, results are often difficult to compare as the indicating strain may differ from one study to another. In the study of Métivier et al. (25), the indicating strain was *C. piscicola* NCDO 2762 which is as sensitive as *L. monocytogenes* Scott A, whereas in our study, *L. monocytogenes* RF76 was used.

The experiment in CSS was performed to verify if the conditions of culture of the strain had an effect on the growth and the inhibition capacity in CSS. The initial level of the inoculated strain grown in conditions 1 (30°C, pH 8,  $20 \text{ g l}^{-1}$  carbohydrates) was 1 log (CFU  $\text{g}^{-1}$ ) lower to the initial level of the strain grown in the other conditions. The final biomass in

conditions 1 may have been over-estimated because of a bad correlation between  $OD_{600nm}$  and bacterial count. The inhibition capacity of *C. divergens* V41 cultivated under conditions 2 (15°C, pH 6.5, 20 g l<sup>-1</sup> carbohydrates) and 3 (15°C, pH 6.5, 2 g l<sup>-1</sup> carbohydrates) was better than when cultivated in conditions 1. However, it was difficult to conclude if this difference was due to the culture condition or to differences in inoculation level. It is possible that *C. divergens* V41 cells cultivated at high pH and temperature are stressed by the new cultures conditions in CSS (pH currently around 6.2 and storage at 4-8°C) and take a longer time to adapt their metabolism to those new conditions. On the other hand, inhibition of *L. monocytogenes* by *Carnobacterium* spp. in CSS is highly dependant of the ratio *Carnobacterium/listeria*, the higher this ratio, the higher the inhibition observed (unpublished data). More experiment should be necessary to confirm which one of the hypothesis is true. When cultivated in conditions 2 and 3, no difference was observed on growth and inhibition capacity of *C. divergens* V41 in CSS and *L. monocytogenes* was maintained under 100 CFU g<sup>-1</sup> during five weeks of vacuum storage at chilled and abuse temperature, these results being in concordance with those of Brillet et al. (7).

In conclusion, for a biopreservation strategy, *C. divergens* V41 biomass can be produced in fermentor in a medium deprived of protein of animal origin. The best culture conditions to obtain both a maximum biomass and an effective subsequent implantation and inhibition of *L. monocytogenes* in CSS are 15°C, pH 6.5, 20 g l<sup>-1</sup> carbohydrates. In those conditions, a maximum biomass of living cells of 2.4 x 10<sup>10</sup> CFU ml<sup>-1</sup> can be obtained in 44-50 h. When inoculated in CSS at an initial level of 10<sup>5</sup> CFU g<sup>-1</sup>, the strain is able to guarantee that the count of *L. monocytogenes*, if not exceeding 20 CFU g<sup>-1</sup> just after production, which is by far higher than the contamination level currently found in the CSS industry (13, 19), will never overpass 100 CFU g<sup>-1</sup> which is the maximum tolerable limit till the sell-by date in many European countries.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This work was performed within the “Aliment Qualité Sécurité” project (n° R 01/05) and the Integrated project (IP) SEAFOODplus and was granted by the French Ministry of Agriculture and Fishery and by the EU commission under contract N° FOOD-CT-2004-506359.

---

**REFERENCES**

1. Arrêté du 14 novembre 2000, modifiant l'arrêté du 24 juillet 1990 portant interdiction de l'emploi de certaines protéines d'origine animale dans l'alimentation et la fabrication d'aliments destinés aux animaux de l'espèce bovine et étendant cette interdiction à certaines graisses animales et pour l'alimentation d'autres animaux (NOR : AGRG0002286A), ABROGÉ par l'arrêté du 24 août 2001. J.O. n°264 du 15 Novembre 2000 : 18081.
2. Arrêté du 24 août 2001, modifiant l'arrêté du 24 juillet 1990 portant interdiction de l'emploi de certaines protéines et graisses d'origine animale dans l'alimentation et la fabrication d'aliments des animaux et fixant des conditions supplémentaires à la commercialisation, aux échanges, aux importations et aux exportations de certains produits d'origine animale destinés à l'alimentation animale et à la fabrication d'aliments des animaux. J.O. n°199 du 29 Août 2001 : 13831.
3. **AFSSA**. 2001. Avis du 29 octobre 2001 relatif à la classification des aliments selon le danger représenté par *Listeria monocytogenes*. n°2000-SA-0094.
4. **Archibald, F.** 1986. Manganese : its acquisition by and function in the lactic acid bacteria. Crit. Rev. Microbiol. **13**: 63-109.
5. **Baird, R. M., J. E. L. Corry, G. D. W. Curtis, D. A. A. Mossel and N. P. Skovgaard.** 1989. Cresol Red Thallium Acetate Sucrose (CTAS) Agar. Int. J. Food Microbiol. **9**: 129-131.
6. **Box, G. E. P. and N. R. Draper.** 1987. Empirical Model-Building and Response Surfaces. John Wiley and Sons, New-York, USA.
7. **Brillet, A., M. F. Pilet, H. Prevost, A. Bouttefroy and F. Leroi.** 2004. Biodiversity of *Listeria monocytogenes* sensitivity to bacteriocin-producing *Carnobacterium* strains and application in sterile cold-smoked salmon. J. Appl. Microbiol. **97**: 1029-1037.
8. **Cardinal, M., H. Gunnlaugsdottir, M. Bjoernevik, A. Ouisse, J. L. Vallet and F. Leroi.** 2004. Sensory characteristics of cold-smoked Atlantic salmon (*Salmo salar*) from European market and relationships with chemical, physical and microbiological measurements. Food Research Int. **37**: 181-193.
9. **Connil, N., L. Plissoneau, B. Onno, M. F. Pilet, H. Prevost and X. Dousset.** 2002. Growth of *Carnobacterium divergens* V41 and production of biogenic amines and divercin V41 in sterile cold-smoked salmon extract at varying temperatures, NaCl levels, and glucose concentrations. J. Food Prot. **65**: 333-338.
10. **De Man, J. D., M. Rogosa and M. E. Sharpe.** 1960. A Medium for the Cultivation of *Lactobacilli*. J. Appl. Bacteriol. **23**: 130-135.
11. **Duffes, F., C. Corre, F. Leroi, X. Dousset and P. Boyaval.** 1999. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by in situ produced and semipurified bacteriocins of *Carnobacterium* spp. on vacuum-packed, refrigerated cold-smoked salmon. J. Food Prot. **62**: 1394-1403.

12. **Duffes, F., F. Leroi, P. Boyaval and X. Dousset.** 1999. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by *Carnobacterium* spp. strains in a simulated cold smoked fish system stored at 4 degrees C. *Int. J. Food Microbiol.* **47**: 33-42.
13. **Eklund, M. W., F. T. Poysky, R. N. Paranjpye, L. C. Lashbrook, M. E. Peterson and G. A. Pelroy.** 1995. Incidence and sources of *Listeria monocytogenes* in cold-smoked fishery products and processing plants. *J. Food Prot.* **58**: 502-508.
14. **Elliker, P. R., A. W. Anderson and G. Hannesson.** 1956. An agar culture medium for lactic acid *Streptococci* and *Lactobacilli*. *J. Dairy. Sc.* **39**: 1611-1612.
15. **Gonzalez-Rodriguez, M. N., J. J. Sanz, J. A. Santos, A. Otero and M. L. Garcia-Lopez.** 2002. Numbers and types of microorganisms in vacuum-packed cold-smoked freshwater fish at the retail level. *Int. J. Food Microbiol.* **77**: 161-168.
16. **Holzappel, W. H.** 1992. Culture media for non-sporulating Gram-positive food spoilage bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* **17**: 113-133.
17. **Huss, H. H., A. Reilly and P. K. Ben Embarek.** 2000. Prevention and control of Hazards in seafood. *Food Control* **11**: 149-156.
18. **Joffraud, J. J., F. Leroi and F. Chevalier.** 1998. Development of a sterile cold-smoked fish model. *J. Appl. Microbiol.* **85**: 991-998.
19. **Jorgensen, L. V. and H. H. Huss.** 1998. Prevalence and growth of *Listeria monocytogenes* in naturally contaminated seafood. *Int. J. Food Microbiol.* **42**: 127-131.
20. **Leal-Sanchez, M. V., R. Jimenez-Diaz, A. Maldonado-Barragan, A. Garrido-Fernandez and J. L. Ruiz-Barba.** 2002. Optimization of bacteriocin production by batch fermentation of *Lactobacillus plantarum* LPCO10. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 4465-4471.
21. **Leroi, F., N. Arbey, J.-J. Joffraud and F. Chevalier.** 1996. Effect of inoculation with lactic acid bacteria on extending the shelf life of vacuum-packed cold smoked salmon. *Int. J. Food Sci. Technol.* **31**: 497-504.
22. **Leroi, F., J. J. Joffraud, F. Chevalier and M. Cardinal.** 1998. Study of the microbial ecology of cold-smoked salmon during storage at 8 degrees C. *Int. J. Food Microbiol.* **39**: 111-121.
23. **Mauguin, S. and G. Novel.** 1994. Characterization of lactic acid bacteria isolated from seafood. *J. Appl. Bacteriol.* **76**: 616-625.
24. **Messens, W., J. Verluyten, F. Leroy and L. De Vuyst.** 2003. Modelling growth and bacteriocin production by *Lactobacillus curvatus* LTH 1174 in response to temperature and pH values used for European sausage fermentation processes. *Int. J. Food Microbiol.* **81**: 41-52.

25. **Métivier, A., P. Boyaval, F. Duffes, X. Dousset, J. P. Compoint and D. Marion.** 1999. Triton X-114 phase partitioning for the isolation of a pediocin-like bacteriocin from *Carnobacterium divergens*. *Lett. Appl. Microbiol.* **30**: 42-46.
26. **Métivier, A., M. F. Pilet, X. Dousset, O. Sorokine, P. Anglade, M. Zagorec, J. C. Piard, D. Marion, Y. Cenatiempo and C. Fremaux.** 1998. Divercin V41, a new bacteriocin with two disulphide bonds produced by *Carnobacterium divergens* V41: primary structure and genomic organization. *Microbiology* **144 (Pt 10)**: 2837-2844.
27. **Neysens, P., W. Messens and L. De Vuyst.** 2003. Effect of sodium chloride on growth and bacteriocin production by *Lactobacillus amylovorus* DCE 471. *Int. J. Food Microbiol.* **88**: 29-39.
28. **Nilsson, L., L. Gram and H. H. Huss.** 1999. Growth control of *Listeria monocytogenes* on cold-smoked salmon using a competitive lactic acid bacteria flora. *J. Food Prot.* **62**: 336-342.
29. **Pilet, M. F., X. Dousset, R. Barré, G. Novel, M. Desmazeaud and J. C. Piard.** 1995. Evidence for two bacteriocins produced by *Carnobacterium piscicola* and *Carnobacterium divergens* isolated from fish and active against *Listeria monocytogenes*. *J. Food Prot.* **58**: 256-262.
30. **Plackett, R. L. and J. P. Burmann.** 1946. The design of optimum multifactorial experiments. *Biometrika* **33**: 305-332.
31. **Richard, C., A. Brillet, M. F. Pilet, H. Prevost and D. Drider.** 2003. Evidence on inhibition of *Listeria monocytogenes* by divercin V41 action. *Lett. Appl. Microbiol.* **36**: 288-292.
32. **Rodgers, S.** 2001. Preserving non-fermented refrigerated foods with microbial cultures - a review. *Trends Food Sci. Technol.* **12**: 276-284.
33. **Ross, R. P., S. Morgan and C. Hill.** 2002. Preservation and fermentation : past, present and future. *Int. J. Food Microbiol.* **79**: 3-16.
34. **Sumner, J. and T. Ross.** 2002. A semi-quantitative seafood safety risk assessment. *Int. J. Food Microbiol.* **77**: 55-59.
35. **Wasney, M. A., R. A. Holley and D. S. Jayas.** 2001. Cresol Red Thallium Acetate Sucrose Inulin (CTSI) agar for the selective recovery of *Carnobacterium* spp. *Int. J. Food Microbiol.* **64**: 167-174.
36. **Wessels, S. and H. H. Huss.** 1996. Suitability of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 as a protective culture for lightly preserved fish products. *Food Microbiol.* **13**: 323-332.
37. **Zwietering, M. H., I. Jongenburger, F. M. Rombouts and K. Van't Riet.** 1990. Modeling of the bacterial growth curve. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 1875-1881

---

# CHAPITRE V

**SELECTION ET CARACTERISATION D'UN MUTANT TYROSINE DECARBOXYLASE  
NEGATIF D'UNE SOUCHE DE *CARNOBACTERIUM DIVERGENS* PRODUCTRICE D'UNE  
BACTERIOCINE ACTIVE CONTRE *LISTERIA MONOCYTOGENES***

---

**Characterization of a tyrosine decarboxylase negative mutant  
of a bacteriocin-producing *Carnobacterium divergens* strain  
used in the biopreservation of cold-smoked salmon**

**BRILLET Anne, BLANCHET-CHEVROLLIER Christine, PREVOST  
Hervé, LEROI Françoise and PILET Marie-France**

*Article en préparation*



## Introduction

Les *Carnobacterium* étant des producteurs de tyramine, cette caractéristique peut freiner l'utilisation de ces souches comme agent de biopréservation. Cette production de tyramine a déjà été mise en évidence au laboratoire chez *Carnobacterium divergens* V41, et le chapitre II a confirmé ce résultat.

Étant donné le problème que peut poser la tyramine dans les aliments pour certains consommateurs comme nous avons pu le voir au cours de l'étude bibliographique, l'utilisation de souche non productrice de tyramine et applicable en biopréservation a été envisagée. De récents travaux menés au laboratoire ont permis de montrer que dans une collection de 48 souches de *Carnobacterium*, toutes les souches étaient productrices de tyramine à des concentrations de l'ordre de 1500 µg/ml (Matamoros, communication personnelle) en milieu de culture enrichi en tyrosine. Par ailleurs, aucun mutant non producteur de tyramine n'est apparu spontanément chez *Carnobacterium divergens* V41, la souche chez qui nous avons déjà mis en évidence des capacités exceptionnelles d'inhibition de *Listeria monocytogenes* (chapitre I). De fait, l'utilisation d'une technique de biologie moléculaire telle que la mutagenèse insertionnelle a été envisagée dans un premier temps, mais n'a donné aucun résultat, la souche sauvage étant difficile à transformer. Aussi, afin de favoriser l'apparition de mutant tyramine négatif, l'utilisation de l'éthylméthanesulfonate, un agent mutagène, a été choisi. De plus, les mutants résultants de la mutagenèse chimique ne sont pas considérés comme des Organismes Génétiquement Modifiés (OGM) puisqu'ils sont mutés aléatoirement, sans ajout d'ADN exogène. Cette caractéristique est essentielle pour que les souches mutées puissent être utilisées dans les aliments dans le respect de la réglementation actuelle.

La publication qui suit décrit les différents travaux mis en œuvre pour obtenir un tel mutant. Des essais d'activité enzymatique ont été réalisés dans un premier temps afin de confirmer l'inaptitude du mutant à produire la tyramine, mais aussi dans le but de caractériser la tyrosine décarboxylase chez la souche sauvage. Le gène de la tyrosine décarboxylase a également été recherché au sein du génome de la souche sauvage et du mutant afin de voir si la mutation apparaissait au niveau du gène de structure de la TDC et si la mutation pouvait être considérée comme stable.

## Résultats importants

**La mutagenèse chimique aléatoire en utilisant l'EMS a permis d'isoler un mutant potentiel de *Carnobacterium divergens* V41, nommé *Carnobacterium divergens* V41A8, non producteur de tyramine**, parmi 5300 colonies. Dans un premier temps, plusieurs expériences ont permis de montrer que *C. divergens* V41A8 produit la même quantité de divercine que la souche sauvage sur milieu gélosé, et que leur croissance, leur capacité à fermenter les sucres et leur sensibilité à plusieurs antibiotiques sont similaires.

Les **essais de mesure d'activité enzymatique menés sur des extraits acellulaires** de la souche sauvage et du mutant ont confirmé que **le mutant ne possède pas d'activité tyrosine décarboxylase**. De plus, ces essais ont permis de déterminer que **les paramètres cinétiques des extraits acellulaires de la souche sauvage** ( $K_m=0.648$  mM, Activité Spécifique=0.226 UI/mg protéine) étaient comparables à ceux décrits pour d'autres microorganismes (Moreno-Arribas et Lonvaud-Funel, 2001).

Les souches de *C. divergens* V41 et V41A8 ont été inoculées dans du saumon fumé stérile, et la croissance et la production de tyramine ont été comparées au cours du stockage à 4 et 8°C. ***C. divergens* V41A8 s'est développé plus lentement** que la souche sauvage, et **aucune production de tyramine n'a été détectée après 28 jours de conservation**, alors que 122 µg de tyramine par g de saumon ont été produits par la souche sauvage dans les mêmes conditions. Par ailleurs, **aucune modification sensorielle du saumon fumé, ni de modification de pH et d'ABVT en présence du mutant** n'a été observée après 21 jours de conservation.

L'étude de l'inhibition de *Listeria monocytogenes* en co-culture avec *C. divergens* V41A8 dans le saumon fumé a également été étudiée. La capacité d'inhibition du mutant a permis de maintenir *L. monocytogenes* en dessous de  $3,3 \cdot 10^3$  UFC/g au bout de 28 jours de conservation par rapport au témoin *L. monocytogenes* qui atteignait  $6,9 \cdot 10^5$  UFC/g. La croissance plus faible de la souche mutante sur saumon fumé peut expliquer sa capacité d'inhibition moins exceptionnelle que celle de la souche sauvage. Mais **les propriétés inhibitrices du mutant sont également intéressantes, puisqu'il permet d'inhiber la**

---

**croissance de *L. monocytogenes* de plus de 2 log au cours des quatre semaines de conservation au froid.**

Par ailleurs, **le gène de structure potentiel de la tyrosine décarboxylase a été détecté au sein du génome de *C. divergens* V41** par la technique de PCR inverse, puis entièrement séquencé (**1863 pb**). La séquence génétique présente des homologies avec les séquences des décarboxylases PLP-dépendantes et les séquences TDC isolées chez d'autres espèces bactériennes. **Le gène de structure de la TDC a également été séquencé chez le mutant. La présence d'une mutation** au sein du 166<sup>ème</sup> codon du gène de structure de la tyrosine décarboxylase (497<sup>ème</sup> nucléotide exactement) a été mise en évidence, donnant lieu à **un codon stop (TGG→TAG)** et montrant ainsi la **stabilité de la mutation chez *C. divergens* V41A8.**

Cette étude a permis d'**isoler et de caractériser une souche inhibitrice incapable de produire de la tyramine, *C. divergens* V41A8.** L'ensemble des caractéristiques de ce mutant fait que cette souche est également **un bon candidat comme agent de biopréservation** des poissons fumés. Parallèlement, **le séquençage du gène TDC permet d'enrichir les données génétiques concernant la tyrosine décarboxylase des bactéries,** notamment pour développer des outils moléculaires de détection ou de quantification des microorganismes producteurs de tyramine dans les aliments.

**Characterization of a tyrosine decarboxylase negative mutant  
of a bacteriocin-producing *Carnobacterium divergens* strain  
used in the biopreservation of cold-smoked salmon**

**BRILLET Anne <sup>a</sup>, BLANCHET-CHEVROLLIER Christine <sup>a</sup>, PREVOST Hervé <sup>a</sup>,  
LEROI Françoise <sup>b</sup> and PILET Marie-France<sup>a,\*</sup>**

<sup>a</sup> **Laboratoire de Microbiologie Alimentaire et Industrielle, ENITIAA, Rue de la  
Géraudière, BP 82225, 44322 Nantes Cedex 3, France**

<sup>b</sup> **Département des Sciences et Techniques Alimentaires Marines, IFREMER, Rue de  
l'Île d'Yeu, BP 21105, 44311 Nantes Cedex 03, France**

*\*Corresponding author* : Dr M.F. Pilet, Laboratoire de Microbiologie Alimentaire et  
Industrielle, ENITIAA, Rue de la Géraudière, BP 82225, 44 322 NANTES cedex 3, France.

Phone : +33-2-51 78 55 23 ; email : pilet@enitiaa-nantes.fr

---

**ABSTRACT**

*Carnobacterium divergens* V41 is a bacteriocin-producing strain that have been previously selected and studied for its capacity of inhibition of *Listeria monocytogenes* strains in cold-smoked salmon during storage without affecting sensory quality of the product. As this strain produced small amounts of tyramine, a mutation procedure using ethyl methanesulphonate (EMS) has been used to select a tyramine negative mutant of this strain. A mutant strain called *C. divergens* V41A8 was selected and characterized. The specific multiplex profile consisting in the amplification of rDNA internal region spacers and bacteriocin genes was obtained for both wild and mutant strains. The mutant was also identical to the wild strain concerning carbohydrates fermentation profile, antibiogram spectrum and bacteriocin spectrum towards *Listeria monocytogenes*. *C. divergens* V41A8 did not produce tyramine after culture on a tyrosine enriched medium due to a lack of tyrosine decarboxylase activity. Sequencing of the tyrosine decarboxylase structural gene on the wild strain revealed the presence of 1863 bp encoding a putative tyrosine decarboxylase that showed 63 to 68 % identity with four other bacterial tyrosine decarboxylase genes that have been already characterized. In the mutant strain, the sequence exhibited a single mutation that involved the apparition of a stop codon in the protein sequence of the tyrosine decarboxylase confirming the stability of the mutation. The mutant strain *C. divergens* V41A8 was tested by comparison to the wild strain for its ability to limit the growth of a mix of *Listeria monocytogenes* on a sterile cold-smoked salmon model. The mutant grew more slowly than the wild strain on the product but it reached nearly the same level after 28 days of storage. It exhibited inhibition activity against inoculated *Listeria monocytogenes* strains but this inhibition was also less effective than the one observed with the wild strain. The effect of the inoculation of *C. divergens* V41 and V41A8 on the quality of sterile cold-smoked salmon showed that they did not modify the pH nor the total volatile basic nitrogen level after 14 and 21 days of storage. The sensory profile of cold-smoked salmon was not affected by any of both strains. However the production of tyramine detected on cold-smoked salmon inoculated with *C. divergens* V41 ( $122 \text{ g g}^{-1}$  after 28 days of storage) was not detected at all when the product was inoculated with the mutant strain *C. divergens* V41A8. This strain could be an interesting alternative for the application of biopreservative *Carnobacterium* on food products naturally contaminated with tyramine producing bacteria such as smoked fishes.

## INTRODUCTION

Lactic acid bacteria are the main flora isolated on cold-smoked salmon during chilled storage. Among them, the genus *Carnobacterium* is well represented at the end of the shelf-life of these products (Leroi *et al.*, 1998 ; Gonzalez-Rodriguez *et al.*, 2002). Many carnobacteria strains are known for bacteriocin production, and this property could be used to control the development of food pathogens like *Listeria monocytogenes* on such lightly preserved product. *Carnobacterium* strains are also known to grow on smoked fish without affecting the sensory quality of the product (Paludan-Muller *et al.*, 1998 ; Stohr *et al.*, 2001 ; Nilsson *et al.*, 2004). We have isolated the strain *Carnobacterium divergens* V41 that produces a bacteriocin, named divercin V41, active against *L. monocytogenes* (Pilet *et al.*, 1995 ; Metivier *et al.*, 1998). This strain has been shown to reduce the growth of inoculated *L. monocytogenes* in sterile cold-smoked salmon (Duffes *et al.*, 1999), and it maintains the population of a mix of *L. monocytogenes* strains below 50 CFU g<sup>-1</sup> on cold-smoked salmon during 28 days of storage at abuse temperature (Brillet *et al.*, 2004). It has been recently demonstrated that this inhibitory activity could be attributed to the production of divercin V41 by *C. divergens* V41 (Richard *et al.*, 2003). The growth of this strain on cold-smoked salmon does not affect sensory attributes of the product (Brillet *et al.*, 2005) and it could be used as a biopreservative agent to ensure safety of cold-smoked salmon.

However, some *Carnobacterium* strains are known to produce tyramine, a biogenic amine (Leisner *et al.*, 1994 ; Masson *et al.*, 1999 ; Emborg *et al.*, 2002). Tyramine is after histamine the main biogenic amine produced in smoked fish or fresh fish packed under vacuum or modified atmosphere (Jorgensen *et al.*, 2000b ; Emborg *et al.*, 2002). Whereas the production of histamine can be attributed to Gram negative spoilage flora such as *Photobacterium phosphoreum* or *Morganella morganii* (Emborg *et al.*, 2002 ; Kim *et al.*, 2000), tyramine production on fish products is mainly the consequence of the presence and growth of lactic acid bacteria from the genus *Carnobacterium* and in a lesser extent *Lactobacillus* (Jorgensen *et al.*, 2000b ; Emborg *et al.*, 2002). The level of tyramine production by *C. divergens* V41 added on cold-smoked salmon vary from 200 to 372 mg kg<sup>-1</sup> after four weeks of storage for a population of 10<sup>8</sup> to 5.10<sup>8</sup> CFU g<sup>-1</sup> (Duffes *et al.*, 1999 ; Brillet *et al.*, 2005). These levels are on the range of naturally contaminated cold-smoked salmon that frequently contain more than 200 mg kg<sup>-1</sup> of tyramine at the end of the storage (Connil *et al.*, 2002c ; Jorgensen *et al.*, 2000a). However tyramine may have toxicological effects on the consumer when high amounts are produced in food (Santos, 1996 ; ten Brink *et*

*al.*, 1990) and although it has never been implicated in fish poisoning, the production of this biogenic amine by a strain used for biopreservation could be a barrier to its use in the European legislative context (Wessels *et al.*, 2004). This is also a matter of concern for the use of lactic acid bacteria starters in fermented products such as sausages or cheese (Bover-Cid *et al.*, 2000 ; Joosten, 1995).

In this study, we describe the isolation and the characterization of a mutant strain from *Carnobacterium divergens* V41 that do not produce tyramine nor other biogenic amine and is able to control the growth of *Listeria monocytogenes* on cold-smoked salmon without affecting its quality.

## MATERIAL AND METHODS

### Bacterial strains and media

*Carnobacterium divergens* V41 was isolated from fish intestine Pilet *et al.*, 1995. *Listeria monocytogenes* strains RF107, RF114, RF119, RF129, RF148 were isolated from French salmon smoked plants and were supplied by ASEPT (Laval, France). *Listeria innocua* 1 was obtained from IFREMER (Nantes, France). All the strains were grown for 24 h in Elliker broth (BK054, Biokar, Beauvais, France) broth at 30°C for carnobacteria, and in Brain Heart Infusion broth (BK015, Biokar diagnostics, Beauvais, France) at 37°C for *Listeria* strains.

### Mutagenesis and isolation of mutants

The experimental procedure used in this work was described previously (Richard *et al.*, 2003). Briefly, 10 to 120 µl of ethyl methanesulphonate (EMS, d = 1,17 g ml<sup>-1</sup>, Sigma M0880, St Louis, MA, USA) was added to 2 ml of exponential growth cultures (OD<sub>600 nm</sub> = 0.9) of *Carnobacterium divergens* V41 and incubated at 30°C for 2 h. After centrifugation, the cells were washed twice with physiological water and appropriated dilutions were plated onto Elliker agar plates and incubated 48 h at 30°C. Colonies obtained from culture with less than 10% survival rate were picked and studied for tyramine production.

### Screening of tyramine non producing strains

The colonies obtained from the mutagenesis procedure were inoculated in microplates containing 150 µl modified Maijala broth (tryptone 5 g l<sup>-1</sup>, yeast extract 4 g l<sup>-1</sup>, meat extract 8 g l<sup>-1</sup>, tyrosine 2 g l<sup>-1</sup>, tween 80 0.5 g l<sup>-1</sup>, MgSO<sub>4</sub> 0.02 g l<sup>-1</sup>, CaCO<sub>3</sub> 0.01 g l<sup>-1</sup>, MnSO<sub>4</sub> 0.005 g l<sup>-1</sup>

<sup>1</sup>, FeSO<sub>4</sub> 0.004 g l<sup>-1</sup>, bromocresol purple 0.006 g l<sup>-1</sup>) (Maijala, 1993). After incubation at 30°C for 48-72 h, apparition of purple colour suggesting alcalinisation of the media indicated tyramine producing strains. The isolates giving no alcalinisation were cultured one day and five days at 30°C in Majaila broth. At each time, one milliliter of fresh culture was centrifuged (10 min, 5000 g) and analyzed for tyramine according to Eerola *et al.* (1993) as follow : 100 µl of NaOH (2N) were added to 300 µl of supernatant. Next, 150 µl of saturated sodium bicarbonate were added, followed by 1 ml of freshly prepared dansyl chloride solution (10 mg dansyl chloride (D2525 Sigma Aldrich, L'Isle d'Abeau Chesnes, France) in 1 ml of acetone). Reaction mixture was incubated at 40°C during 45 min safe from the light. Then, residual dansyl chloride was removed by adding 50 µl ammonia. After 30 min in darkness, 700 µl of acetonitrile were added, and reaction mixture was centrifuged 10 min at 4000 g. Finally, supernatant was collected in glass tube and stored at -20°C before analysis. Dansylated amines were then separated by reversed-phase liquid chromatography on a C18 ODS2 Equisorb column (4.6x250 mm, particle size 5 µm, CIL Cluzeau, France) mounted with a C18 Bondapack guard column (Waters, France) with a HPLC apparatus (Waters 600E Multisolvant Delivery System and Waters 2487 Dual λ Absorbance Detector, Waters, France). The gradient elution was carried out with eluent A (ammonium acetate, 0.1 mol l<sup>-1</sup>) and eluent B (acetonitrile) as described by Connil *et al.* (Connil *et al.*, 2002b). Dansylated amines were detected by u.v. absorption at 254 nm and their concentrations were calculated by a calibration curve for tyramine performed with 10 to 500 µg ml<sup>-1</sup> of pure tyramine solutions treated as described above (Borwin software). *Listeria innocua* 1 was used as tyramine negative control.

### **Activity of tyrosine decarboxylase on cell extracts**

The strains were grown on modified Maijala broth for 20h at 30°C. Cultures were then centrifuged (5000 g, 5 min) and cells pellets were washed twice in phosphate buffer (0.05 M, pH 5.5). Cell concentration was adjusted to OD<sub>600 nm</sub> = 1, and the suspension was sonicated (Vibra Cell 72434, Labcaire, Avon, United Kingdom) with 5 cycles of 4 min sonication followed by 1 min storage in ice. After centrifugation (11200 g, 10 min), supernatant was collected and designed as free-cell extract. Total protein content was determined on this extract using the Bradford method (Bradford, 1976) with the Bio-Rad protein assay reagent (Bio-Rad, Marnes la Coquette, France) and bovine serum albumine as the standard. Tyrosine decarboxylase activity was determined according to methods previously described (Phan *et*



*al.*, 1983 ; Lemonnier and Lane, 1998) : 100  $\mu\text{l}$  of cell-free extract was added to 500  $\mu\text{l}$  of the mix containing 0.05 M phosphate buffer at pH 5.5, 1 to 5 mM L-tyrosine and 0.1 mM pyridoxal phosphate, and pre-incubated 5 min at 37 °C. Enzymatic reaction was performed at 37°C during 20 min and stopped by addition of 600  $\mu\text{l}$  of  $\text{K}_2\text{CO}_3$  1M on ice. The amount of tyramine produced was determined by HPLC as described before, and kinetic parameters of the enzyme TDC were calculated in  $\mu\text{mol}_{\text{tyramine}} \text{min}^{-1} \text{ml}^{-1}$  for the maximal speed  $V_m$ , and mM for  $K_m$ . Specific activity was also calculated in International Unit per mg of total proteins contained in the free cell extract.

### Characterization of the mutant

The tyrosine decarboxylaseless strain was characterized in comparison with the wild strain by fermentation profile using API 50 CH (BioMérieux, Marcy l'Etoile, France) and by multiplex PCR (Connil *et al.*, 2002c). Antibiotic resistance was checked on wild and mutant strains using 18 antibiotics reported in table 1 (BioMérieux, Marcy l'Etoile, France) by the disc diffusion test. Bacteriocin activity was tested as follow : *Carnobacterium divergens* V41 and V41A8 were grown at 30°C for 24 h in Elliker broth. After centrifugation (5000 g, 6 min), cell-free supernatant (CFS) was treated 10 min at 80°C. CFS was serially two-fold diluted in phosphate buffer (0.1 M, pH 6.5) and 10  $\mu\text{l}$  of each dilution was spotted onto Elliker agar plates containing  $10^7$  CFU  $\text{ml}^{-1}$  of *Listeria innocua* 1 as indicator strain. The bacteriocin activity was defined as the reciprocal of the lowest dilution showing no inhibition of the indicator strain in arbitrary units AU  $\text{ml}^{-1}$ . Bacteriocin spectrum on 57 *Listeria monocytogenes* strains described in a previous study (Brillet *et al.*, 2004) was checked by spotting the supernatant of *C. divergens* V41 and V41A8 prepared as described before onto Elliker agar plates containing  $10^7$  CFU  $\text{ml}^{-1}$  of each *Listeria* strain.

### Determination of tyrosine decarboxylase gene sequence on *C. divergens* V41 and V41A8

Total DNA of *C. divergens* V41 and V41A8 was purified with phenol-chloroform and precipitated with ethanol. PCR were performed in a total volume of 50  $\mu\text{l}$  containing 1X PCR buffer, 1.5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0.2 mM of each dNTP, 0.4  $\mu\text{M}$  of each primer, 20 U  $\text{ml}^{-1}$  of *Taq* polymerase (Appligene Oncor, Espoo, Finland) and 1  $\mu\text{g}$   $\text{ml}^{-1}$  of DNA. Degenerated primers TDCg (5'-AARGCNGCNGAYATHATHGGNATHGG-3') and TDCd (5'-YWDYTTTRTGNGGRTCDATNGTNAC-3') were used to detect a 300 bp inside the TDC gene in *C. divergens* V41 with the following conditions : 10 min at 94°C, followed by 35 cycles (1 min at 94°C, 1 min at 48°C, 1 min at 72°C), and finally 10 min at 72°C. The

adjacent regions of the TDC gene were obtained by inverse – PCR as follow : nine restriction enzymes which did not cut inside the 300 bp sequence of the TDC gene of *C. divergens* V41 were chosen : *Apa* I, *Bam* HI, *Bsa* BI, *Bsp* HI, *Not* I, *Sac* II, *Sca* I, *Xba* I and *Xho* I (Biolabs, Hitchin, United Kingdom). The digestions of total DNA with each restriction enzyme were performed as follow : 2.5 µg of DNA, 0.5 µL of enzyme, 4 µl of enzyme buffer 10X, 0.5 µl of BSA when necessary, and water adjusted to a final volume of 40 µl were gently mixed and incubated for 3 h at the optimal temperature of each restriction enzyme (37, 25 or 60°C). Heat inactivation of enzyme was then realized at 65 or 80°C for 20 min. Ligation of the digestion mix was performed overnight at 20°C with 1200 units of T4 DNA Ligase (Biolabs, Hitchin, United Kingdom) in a total volume of 400 µl. After precipitation with ethanol, the ligated fragments were digested with *Sna* BI (Biolabs, Hitchin, United Kingdom) in a total volume of 50 µl, and incubated at 37°C for 2.5 h. Heat inactivation of the enzyme was next performed at 80°C for 20 min. Then inverse PCR was done using primers MO 057 (5'-ATGG AAAAAATGATTGGTTA -3') and MO 056 (5'-TAAATCACGAATTTGTGCTTC-3') using DyNAzyme polymerase 20 U ml<sup>-1</sup> instead of *Taq* polymerase (Finnzymes, Espoo, Finland) and the following conditions : 7 min at 95°C, followed by 35 cycles (1 min at 95°C, 45s at 49°C, 4 min at 72°C), and finally 10 min at 72°C. Resulted amplified products were separated on an 1% agarose gel in TAE buffer (40 mM Tris Acetate, 1 mM EDTA, pH 8).

For the mutant strain *Carnobacterium divergens* V41A8, amplification of the whole TDC gene was performed using primers MO 055 (5'-GAAGCACAAATTCGTGATTTA-3') and MO 212 (5'-GCGCTCCACTATACTACTG-3') and primers MO 211 (5'-CATGA AAAACACATTTAATACAGA-3') and MO 058 (5'-TAACCAATCATTTTTTCCAT-3') using the following conditions : 7 min at 95°C, followed by 35 cycles (1 min at 95°C, 45s at 49°C, 2 min at 72°C), and finally 10 min at 72°C.

Cloning experiments were done using the PCR 2.1 TA Cloning kit (Invitrogen Life Technology) or Quiagen PCR cloning kit (Quiagen S.A., Courtaboeuf, France) according to the manufacturer's instruction. White colonies were screened by PCR using primers MO 057 and MO 056 and *Eco* RI digestion for cloning of the TDC gene of *C. divergens* V41, and primers MO 211/MO 058 and MO 055/MO 212 for cloning of the TDC gene *C. divergens* V41A8.

Nucleotide sequences were determined on recombinant plasmids purified with QIAprep Spin Miniprep kit (Quiagen S.A., Courtaboeuf, France) by Genome Express (Meylan, France).

### **Antibacterial activity of *C. divergens* V41 and V41A8 against *Listeria monocytogenes* in sterile cold-smoked salmon**

Sterile cold-smoked salmon (CSS) was prepared as described by Joffraud *et al.* (1998). Each *Carnobacterium* strain ( $10^5$  CFU g<sup>-1</sup>) was co-inoculated in CSS with a mix of five *Listeria monocytogenes* strains (20 CFU g<sup>-1</sup>) as described by Brillet *et al.* (2004). Samples were then vacuum-packed and incubated for 28 days using the following conditions : 9 days at 4°C followed by 19 days at 8°C, with a break during 2 h at 20°C after 19 days of storage. A control was prepared by inoculating CSS pieces with *L. monocytogenes* strains alone. Microbial analysis was done weekly in triplicates in Elliker plates incubated aerobically for 48 h at 30°C for *Carnobacterium* and in Palcam plates (BK145, Biokar) with selective supplement (BS00408, Biokar) incubated for 48 h at 30°C for *L. monocytogenes*. Results were expressed as mean of three measures  $\pm$  95% Confidence Interval (CI =  $1.96 \times \sqrt{\frac{\text{standard deviation}^2}{3}}$  ).

### **Comparative effects of *C. divergens* V41 and V41A8 on quality of sterile cold-smoked salmon**

Sterile cold-smoked salmon blocks were separately inoculated with *C. divergens* V41 and V41A8 and stored as described above. Microbial analysis was done weekly in triplicates in Elliker plates incubated aerobically for 48 h at 30°C. Physico-chemical analysis were performed at days 14 and 21 : total volatile basic nitrogen level (TVBN) was determined in duplicate by the Conway micro-diffusion method (Conway and Byrne, 1933) ; the pH was measured in the homogenate of CSS used for microbiological analysis with a pH-meter (Mettler Delta 320, AES, Combourg, France) ; biogenic amines analysis (tyramine, histamine, cadaverine and putrescine) were determined by HPLC on salmon flesh as described by Connil *et al.* (2002c).

Sensorial analyses were made at days 7 and 21. The method used a quantitative descriptive analysis with conventional profiling performed by an internal regularly trained panel of 14 people (IFREMER). Panelists were required to make a comparative evaluation of the products by scoring each descriptor on an unstructured line scale from zero (low intensity) to ten (high intensity). Nineteen odor descriptors were quoted after one and three weeks of storage, using 20 g of blocks per panelist.

---

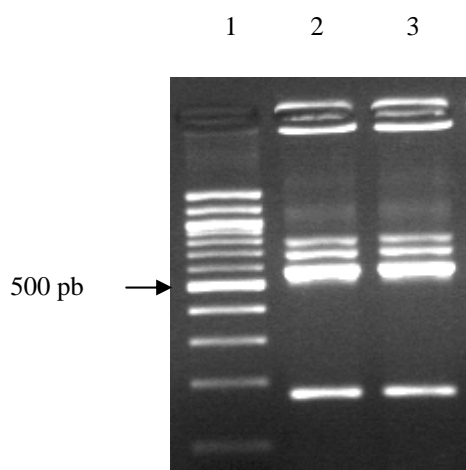
## RESULTS

### Screening of non-producing tyramine mutants

5300 colonies of *Carnobacterium divergens* V41 were screened on modified Maijala's broth after exposure to ethyl methanesulphonate. 12 colonies showing no modification of media color were streaked on Elliker agar and re-inoculated in modified Maijala to check tyramine production. Two isolates remaining negative named *C. divergens* V41A8 and V41A9 were kept for tyramine quantification on HPLC. Tyramine production was quantified after 1 and 5 days incubation at 30°C for the wild strain and the potential mutants V41A8 and V41A9. Tyramine production was around 2051  $\mu\text{g ml}^{-1}$  for the wild strains after 1 day and 2069  $\mu\text{g ml}^{-1}$  after 5 days. For V41A9, a lower amount was detected after 1 day (32  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) reaching 276  $\mu\text{g ml}^{-1}$  after 5 days. No tyramine production was detectable for *C. divergens* V41A8, so this strain was retained for the following experiments.

### Characterization of the non-producing tyramine mutant

*C. divergens* V41A8 was compared to the native strain using a specific PCR-multiplex test allowing the amplification of 16S-23S intergenic region spacers, and the amplification of a part of divercin V41 gene. Both strains exhibited the same profile *i.e.* three intergenic regions (approximately 600, 700 and 800 bp) that are characteristics for the genus *Carnobacterium* (Kabadjova *et al.*, 2002) and one PCR products of 179 pb corresponding to the divercin V41 gene, specific for *C. divergens* V41 (figure 1).



**Figure 1** PCR multiplex pattern of *C. divergens* V41 (lane 2) and *C. divergens* V41A8 tyramine negative mutant (lane 3). 600, 700, 800 bp bands : *Carnobacterium* genus IRS amplification with primers 16S-2 and 23S-7 ; 179 bp band : divercin V41 gene amplification specific for *C. divergens* V41. Lane 1 : molecular weight ladder (100 bp Biolabs).

The fermentation profile determined on 50 carbohydrates was characteristic for *Carnobacterium divergens* and identical between both strains : glycerol, ribose, D-glucose, D-fructose, D-mannose, N-acetylglucosamine, amygdaline, arbutine, esculine, salicine, cellobiose, maltose, sucrose, trehalose,  $\beta$ -gentiobiose, and gluconate were positive, all the other sugars were not fermented. Both strains showed also the same antibiotic resistance and sensitivity (table 1). Bacteriocin production measured by the critical dilution assay was 12800 AU ml<sup>-1</sup> on *Listeria innocua* 1 for both mutant and wild strains. The supernatant of both strains gave inhibition zones on all the 57 *Listeria monocytogenes* strains tested.

**Table 1** Antibiogram spectrum of *C. divergens* V41 and *C. divergens* V41A8. R : resistant ; S : sensitive ; I : intermediate.

Antibiotics	Resistance or sensitivity of <i>C. divergens</i> V41 and V41A8
Penicillin G	R
Ampicillin	S
Cefalotin	I
Cefotaxim	R
Streptomycin	R
Gentamicin	R
Kanamycin	R
Chloramphenicol	S
Tetracyclin	S
Erythromycin	S
Spiramycin	S
Colistin	R
Vancomycin	S
Trimethoprim	S
Nalidixic acid	R
Norfloxacin	I
Rifampicin	S
Fusidic acid	I

### Activity of tyrosine decarboxylase on cell extracts

Enzymatic parameters of the TDC were determined on the free cell extract from *C. divergens* V41 and V41A8 grown in Maijala broth in the presence of tyrosine and pyridoxal phosphate. The total protein contents of the free cell extracts were 204  $\mu\text{g ml}^{-1}$  and 195  $\mu\text{g ml}^{-1}$  for the wild and the mutant strain respectively. Tyrosine decarboxylase activity in the free cell extract obtained from the wild strain culture exhibited a simple Michaelis-Menten kinetic allowing the determination of the  $V_m$  which was  $7.7 \times 10^{-3} \mu\text{mol}_{\text{tyramine}} \text{min}^{-1} \text{ml}^{-1}$  in the mix, and the apparent  $K_m$  of 0.65 mM (data not shown). The enzymatic activity was  $4.6 \times 10^{-2} \text{UI ml}^{-1}$  of the free cell extract of *C. divergens* V41 and the specific activity of the TDC was 0,226 UI  $\text{mg}^{-1}$  of total proteins. No tyrosine decarboxylase activity could be detected on the free cell extract nor on the crude extract of the mutant *C. divergens* V41A8, suggesting that the enzyme synthesis was affected by the mutation procedure.

### Determination of tyrosine decarboxylase gene sequence on *C. divergens* V41 and V41A8

Alignment of *Enterococcus faecalis* JH2-2 TDC and other putative tyrosine decarboxylase protein sequences allowed the design of two degenerate primers TDCd and TDCg that were checked by PCR on *Carnobacterium divergens* V41. The 300 bp amplicon was sequenced and exhibited similarities with the other bacterial TDC genes. This fragment contained a *Sna*BI restriction site allowing the use of an inverse PCR strategy. Using the specific primers MO 056 and MO 057, the 1863 bp of the potential TDC gene were determined on this strain (accession number DQ336701). Analysis of the protein sequence (figure 2) exhibited 69% identity with TDC gene of *Enterococcus faecalis* JH2-2 (Connil *et al.*, 2002a), 67% with *Carnobacterium divergens* 508 (Coton *et al.*, 2004), 66% with *Lactococcus lactis* IPLA 655 (Fernandez *et al.*, 2004) and 63% with *Lactobacillus brevis* IOEB 9809 (Lucas *et al.*, 2003), suggesting that this region encodes a putative tyrosine decarboxylase.

```

E. faecalis JH2-2      -----MKNEKLAKGEMNLNLFIGDKAENGQLYKDLLIDLVD EHLGWRQ
C. divergens 508      -----MESLSNELNLFNLFIGDKAENGQLYKDLLNDLVD EHLGWRQ
L. lactis IPLA655     -----MESLSNDLNLNALLSGTKLR TAKSIKLVN-RFRGRPLGWRQ
Lb. brevis IOEB9809  MLNLQEVSDMEKSNRSLKDLDLNLFIGDKAENGQLYKDLLNKLVD EHLGWRK
C. divergens V41      -----MKNTFNTDDTNLKALFLGDKGENVDLFKEILNKMIDEHVGWRQ
C. divergens V41A8    -----MKNTFNTDDTNLKALFLGDKGENVDLFKEILNKMIDEHVGWRQ
                                o o*o**o * * oo o * o o oo o**o

E. faecalis JH2-2  NYMPQDMPVISSQERTSESYEKT VNHMKDVLNEISSRMRTHSVPWHTAGRYWGHMNS ETL
C. divergens 508  NYMPQDMPVITPEEQISASFEHTVNKTKDVLSEISARMRTHSVPWHTAGRYWGHMNS ETL
L. lactis IPLA655  NYMPQDMP IITPEEKSSASFEHTVNR TKDVLSEISARMRTHSVPWHNAGRYWGHMNS ETL
Lb. brevis IOEB9809 NYIPSDPNMIGPEDQNSPAFKKT VGHMKT VLDQLSERIRTESVPWHSAGRYWGHMNS ETL
C. divergens V41  NYMPQDLPVITPQDRSSKEFQATADNMR SVFNVLSSRLRTESLPWH SAGRFWGHMNS ETL
C. divergens V41A8 NYMPQDLPVITPQDRSSKEFQATADNMR SVFNVLSSRLRTESLPWH SAGRFWGHMNS ETL
                                **o*o* o* oooo * oo *oo o *o o* *o**o*o*** **o*****

E. faecalis JH2-2  MPSELLAYNFAMLWNGNNVAYESSPAT SQMEEVGVGHEFAHLMSYKNGWGHIVADGSLANLE
C. divergens 508  MPSELLAYNFAMLWNGNNVAYESSPAT SQMEEVGVGLEFAKLMGYKDGWGHIVADGSLANLE
L. lactis IPLA655  MPSELLAYNFAMLWNGNNVAYESSPAT SQMEEVGVGLEFAKLMSYKDGWGHIVADGSLANLE
Lb. brevis IOEB9809 MPALLAYNYAMLWNGNNVAYESSPAT SQMEEVGVQEFARLMGYDYGWGHIVADGSLANLE
C. divergens V41  MPAI IAYTTAMLWNGNNVAYESSPAT SQMEEVGVMEFATLMGYKNGWGHIAADGSIANLE
C. divergens V41A8 MPAI IAYTTAMLWNGNNVAYESSPAT SQMEEVGVMEFATLMGYKNGWGHIAADGSIANLE
                                **oooo**o ***** **o**o *****o*****

```

*E. faecalis* JH2-2 GLWYARNIKSLPFAMKEVPELVAGKSDWELLMPTKEIMDLLSAEDEIDEIKAHSARS  
*C.divergens* 508 GLWYARNIKSLPLAMKEVAPPELVSGKSDWELMNMSTKEIMDLLDSVPEKIDDIKAHSARS  
*L.lactis* IPLA655 GLWYARNIKSLPLAMQEVTPPELVAGKSDWELMNMSTKEIMDLLDSVPEKIDDIKAHSARS  
*Lb.brevis* IOEB9809 GLWYARNIKSLPFAMKEVNPPELVAGKSDWELLMPTKEIMDLLENAGSQIDEVKKRSARS  
*C. divergens* V41 GLWYARNMKSPLFAIQEVAPPEMVAGKSEWELLMSTEEVLNILDQLDQDFEIKARSARS  
*C. divergens* V41A8 GL-----

\*\*\*\*\*O\*\*\*\*\*O\*\*\* \*\*O\*\*\*\*\*O\*\*\*\*\*O\*\*\*\*\*O\*\*\*\*\*O\*\*\*\*\*O\*\*\*\*\*O\*\*\*\*\*O\*\*\*\*\*

*E. faecalis* JH2-2 GKHLQAIGKWLVPQTKHYSWLKAADIIGIGLDQVIPVPVDHNYRMDINELEKIVRGLAAE  
*C.divergens* 508 GKHLQQLGKWLVPQTKHYSWLKAADIIGIGLDQVIPVPVDHNYRMDINELEKIVRQLAAE  
*L.lactis* IPLA655 GKNLQKLGKWLVPQTKHYSWLKAADIIGVGLDQVIPVPVDHNYRMDINELEKIVRGLAAE  
*Lb.brevis* IOEB9809 GKNLQRLGKWLVPQTKHYSWMKAADIIGIGLDQVVPVPIIDSNYRMDIQALESIRKYAAE  
*C. divergens* V41 GKNLEKLGKWIQVQTKHYSWLKAADIIGIGLDQVIAGEVNSEYRMDIDKLEAQIRDLLAAQ  
*C. divergens* V41A8 -----

\*\*\*O O\*\*\*\*\*O\*\*\*\*\*O\*\*\*\*\*O\*\*\*\*\*O\*\*\*\*\*O\*\*\*\*\*O\*\*\*\*\*O\*\*\*\*\*O\*\*\*\*\*O\*\*\*\*\*

*E. faecalis* JH2-2 QIPVLGVGVGSTEELGAVDSIDKIIALRDELMDGIYYVHVDAAYGGYGRAIFLDEDN  
*C.divergens* 508 KTPILGVGVGSTEELGAVDIDGIDKIVALRRVLEKDGIFYLHVDAAYGGYGRSIFLDEEN  
*L.lactis* IPLA655 KTPILGVGVGSTEELGAVDIDGIDKIVELRRVLEKDGIFYLHVDAAYGGYGRAIFLDEDN  
*Lb.brevis* IOEB9809 KTPILGVGVGSTEELGAVDIDGIDKIVALRQKQKEGIYFYLHVDAAYGGYARALFLDEDD  
*C. divergens* V41 GIPTLGVGVGSTEELGAVDIDQIIDRIALREKLAKEGIYFVHVDAAYGGYGRSIFLDEEN  
*C. divergens* V41A8 -----

\* \*\*\*\*\*O\*\*\*\*\* O\* \*\*O\*\* \* \* \*\*\*\*\*O\*\*\*\*\*O\*\*\*\*\*O\*\*\*\*\*O\*\*\*\*\*O\*\*\*\*\*

**HVDAAY motif**

*E. faecalis* JH2-2 NFIPYEDLQDVHEEYGVFKEKKEHISREVDYDAYKAIELAESVTIDPHKMGYIPYSAGGIV  
*C.divergens* 508 NFIPFEELKDVHAKHHVFTENKNYILEDVHSAFKAIEEAE SVTIDPHKMGYVYPYSAGGIV  
*L.lactis* IPLA655 NFIPFEELKDVHFKHNVFTENKNYILEEVHSAYKAIIEEAE SVTIDPHKMGYVYPYSAGGIV  
*Lb.brevis* IOEB9809 QFIPYKNLQKVHAENHVFTEDKEYIKPEVYAAKAFDQAE SITIDPHKMGYVYPYSAGGIV  
*C. divergens* V41 EFIELDQIEAVYAKNGIFMEKNDWLTREVYESFKAISLAE SVTIDPHKMGYIPYSAGGIV  
*C. divergens* V41A8 -----

\*\*\* O\*\*\*\*\* O\* O \* O\* O\* O\* O\* O\*\*\*\*\*O\*\*\*\*\*O\*\*\*\*\*O\*\*\*\*\*O\*\*\*\*\*O\*\*\*\*\*

**PLP attachment site**

*E. faecalis* JH2-2 IQDIRMRDVISYFATYVFEKGDIPALLGAYILEGSKAGATAASVWAAHHVPLPLNVAGYG  
*C.divergens* 508 IKDVRMRDVISYFATYVFEKGDIPALLGAYILEGSKAGATAASVWAAHHVPLPLNVTGYG  
*L.lactis* IPLA655 IKDVRMRDVISYFATYVFEKGDIPALLGAYILEGSKAGATAASVWAAHHVPLPLNVTGYG  
*Lb.brevis* IOEB9809 IQDIRMRDTISYFATYVFEKGDIPALLGAYILEGSKAGATAASVWAAHHTLPLNVTGYG  
*C. divergens* V41 IKDIRMRDVISYFATYVFEKGDIPALLGAYILEGSKAGATAAAVWTAHKVPLPLNVTGYG  
*C. divergens* V41A8 -----

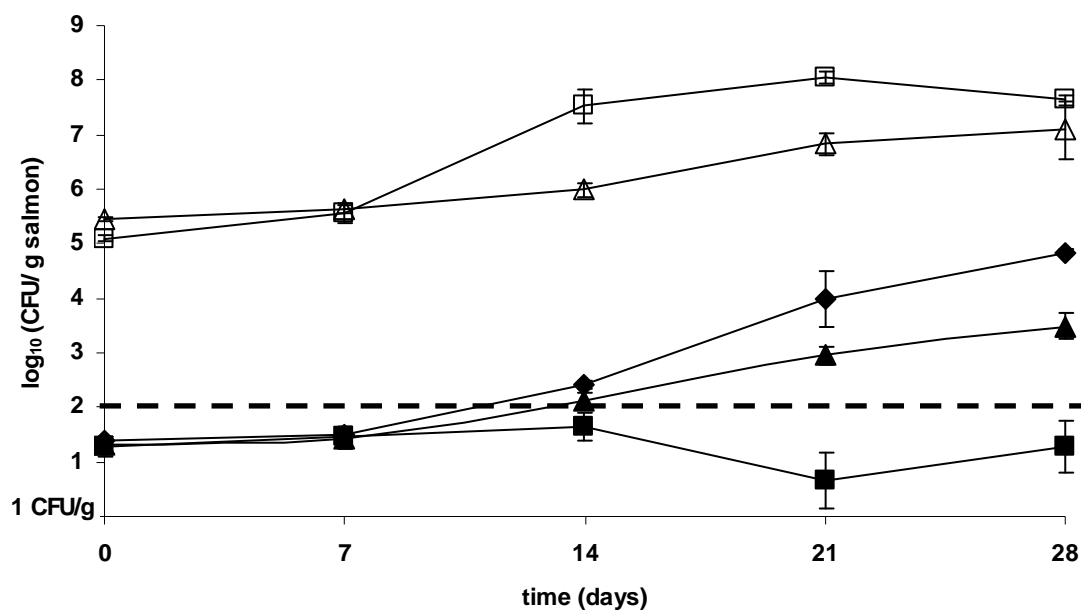
\*O\*\*\*\*\*O\*\*\*\*\*O\*\*\*\*\*O\*\*\*\*\*O\*\*\*\*\*O\*\*\*\*\*O\*\*\*\*\*O\*\*\*\*\*O\*\*\*\*\*O\*\*\*\*\*

*E. faecalis* JH2-2 KLIGASIEGSHHFYNFLNDLTFKVGDKIEVHTLTHPDFNMVDYVFEKGNDDLVMANLKL  
*C.divergens* 508 KLMGASIEGAHRFYNFLQDLSFKVGDKIEVHPLTYPDFNMVDYVFEKGNDDLVMANLKL  
*L.lactis* IPLA655 KLMGASIEGAHRFYNFLNLSFKVGDKIEVHPLTYPDFNMVDYVFEKGNDDLVMANLKL  
*Lb.brevis* IOEB9809 KLEGASIEGAHRYDFLNKLFVAGKRISVHPLISPDFNMVDYVFKEDGNDDLIEMNRL  
*C. divergens* V41 KLMGASIEGAYHFYHFDGKEFKVGDKTIELHALTKPDFNMVDYVFNKGNDDLVMANLKL  
*C. divergens* V41A8 -----

\*\* \*\*\*\*\*O\*\*\*\*\*O\*\*\*\*\* O\*\*\*\*\* O\*\*\*\*\* O\*\*\*\*\* O\*\*\*\*\* O\*\*\*\*\* O\*\*\*\*\*







**Figure 3** Growth of *Listeria monocytogenes* mix (5 strains) alone (◆) or with *C. divergens* V41 (■) or V41A8 (▲) in sterile cold-smoked salmon during storage (9 days at 4°C and 19 days at 8°C with a break of 2h at 20°C after 19 days). Growth of *C. divergens* V41 (□) or V41A8 (△). Bars indicate 95% confidence intervals.

For the wild strain, the growth began at 4°C, from  $1.2 \times 10^5$  to  $3.8 \times 10^5$  after one week (difference statistically significant). The growth rate increased considerably at 8°C and *C. divergens* V41 reached  $1.1 \pm 0.3 \times 10^8$  CFU g<sup>-1</sup> after three weeks of storage. The mutant strain grew more slowly during the first three weeks of storage but reached a level of  $1.6 \pm 1.2 \times 10^7$  CFU g<sup>-1</sup> after the four weeks. *C. divergens* V41 had a bacteriostatic effect on *L. monocytogenes* and this strain was able to maintain the number of the pathogenic bacteria below 50 CFU g<sup>-1</sup> during the four weeks of vacuum storage. The mutant strain *C. divergens* V41A8 was less efficient against the mix of *Listeria monocytogenes* during the same period of chilled storage. However, the population of pathogenic bacteria was maintained at  $9.2 \pm 3.4 \times 10^2$  and  $3.3 \pm 2.0 \times 10^3$  CFU g<sup>-1</sup> respectively after 21 and 28 days of storage when it was co-inoculated with the mutant strain V41A8 whereas it reached  $1.3 \pm 1.4 \times 10^4$  and  $6.9 \pm 0.7 \times 10^4$  CFU g<sup>-1</sup> on the samples inoculated with *Listeria monocytogenes* alone.

### Effect of inoculation of *C. divergens* V41 and V41A8 on the quality of cold-smoked salmon

The effect of inoculation of the biopreservative strains on pH, total volatile basic nitrogen and tyramine production was determined after 14 and 21 days of storage in sterile CSS (table 2). The salt and total phenol concentrations of CSS blocks used in these experiments were respectively 5.0% (w/w, water phase) and 1.33 mg 100 g<sup>-1</sup>. Dry matter and total fat content were 40.1% (w/w) and 15.1 % (w/w) respectively, and pH 6.0.

The levels of population of *C. divergens* V41A8 ( $2.6 \pm 1.9 \times 10^5$  CFU g<sup>-1</sup>) and *C. divergens* V41 ( $7.4 \pm 3.1 \times 10^6$  CFU g<sup>-1</sup>) at the end of storage were lower than in the preceding inhibition experiment probably due to a higher concentration of total phenols in this batch of sterile CSS.

**Table 2** Total volatile basic nitrogen production (TVBN, mg-N 100 g<sup>-1</sup>), pH in sterile batches of cold-smoked salmon alone and in the presence of *C. divergens* V41 or *C. divergens* V41A8, stored under vacuum during nine days at 4°C and 19 days at 8°C. Each result represents the mean of three measures (95% confidence interval).

	Storage (days)	TVBN (mg-N 100 g <sup>-1</sup> )	pH
Control (sterile CSS)	7	15.72	6.00
	21	15.72	5.96
<i>C. divergens</i> V41	7	14.30 (± 0.57)	6.01 (± 0.02)
	21	16.38 (± 0.37)	5.96 (± 0.01)
<i>C. divergens</i> V41A8	7	14.30 (± 0.43)	6.00 (± 0.01)
	21	15.72 (± 0.00)	5.96 (± 0.00)

pH and TVBN values were not modified either in the presence or absence of *Carnobacterium* strains. Moreover, there was no significative difference between the values obtained with the wild strain and with the mutant strain. A small amount of tyramine ( $43 \pm 23.2$  g g<sup>-1</sup>) was detected after 14 days when the product was inoculated with the strain *C.*

*divergens* V41 and it increased to  $122 \pm 9.4 \text{ g g}^{-1}$  after 28 days of storage. This production could be directly attributed to the strain as no tyramine was detected at all on the uninoculated control. On the opposite, on the presence of the mutant strain V41A8, no tyramine could be detected at 14 days nor at 28 days of storage. Histamine, cadaverine and putrescine were not detected in inoculated samples with *Carnobacterium* strains nor in the control.

After seven days of storage, no significant difference between control and inoculated samples was observed for any of the nineteen sensory descriptors quoted, and samples were always considered as not spoiled. Same results were observed after 21 days of storage, except a slight but significant note of cheese/feet detected in samples inoculated with *C. divergens* V41. However, the average score of the 14 panelists for this descriptor was very low (0.6 on a scale ranging from 0 to 10), suggesting that the presence of the biopreservative strains did not modify the sensorial quality of the product.

## DISCUSSION

In this study we have obtained a mutant strain of *Carnobacterium divergens* deficient of tyramine production, which could be an interesting strain in biopreservation of cold-smoked fish products.

The screening of natural mutants among a collection of 54 strains of *Carnobacterium* isolated from fish products did not allow the isolation of any tyramine negative strain (data not shown). For that reason, chemical mutagenesis was chosen to isolate a mutant from the wild strain. The screening of 5300 colonies was necessary for the isolation of one stable mutant after the exposition to EMS, and this rate was in agreement with the study of Joosten *et al.* who used the same method on *Enterococcus faecalis* (Joosten, 1995).

Phenotypic characterization of the mutant *C. divergens* V41A8 revealed that it did not differ from the wild strain *C. divergens* V41 concerning sugar fermentation, bacteriocin production, antibiotic resistance, suggesting that the mutation procedure did not affect the main metabolic activities. Moreover, the resistances observed to the antibiotics are in agreement with the results obtained by Duffes *et al.* (1999). The resistance to the penicillin G, cephalosporin (3<sup>rd</sup> generation), aminosides, colistin, and nalidixic acid are defined as natural (not acquired) and not transmissible (by plasmids). These characteristics show that the two *Carnobacterium* strains could be used in human food.

The mutant V41A8 did not produce any detectable amounts of tyramine in a medium supplemented with tyrosine. Moreover, no revertant could be detected after several propagation of the strain.

To demonstrate that this lack of production was due to a mutation in the enzymatic system, the enzymatic activity of tyrosine decarboxylase was measured on the mutant and the wild strain. Activity of tyrosine decarboxylase was studied on cell extract by measuring tyramine production as a function of time. These experiments confirmed that the mutant V41A8 was defective in tyrosine decarboxylase activity, and allowed the determination of kinetics parameters for the TDC of *Carnobacterium divergens* V41. The apparent  $K_m$  value of 0,65 mM for this enzyme was closed to those obtained for TDC activity of *Lactobacillus brevis* IOEB 9809 and ATCC 367 measured on cell extract (respectively 0,67 and 0,58 mM) (Moreno-Arribas and Lonvaud-Funel, 1999) or on pure enzyme (0,63 mM) (Moreno-Arribas and Lonvaud-Funel, 2001). However we have some difficulties to repeat these kinetics, probably due to the instability of the enzyme in the free cell extract (Moreno-Arribas and Lonvaud-Funel, 1999).

The origin and stability of the mutation was then studied by sequencing the TDC gene on both wild and mutant strains. At the beginning of this study, only two gene sequence of bacterial tyrosine decarboxylase were available on *Enterococcus faecalis* JH2-2 (Connil *et al.*, 2002a) and *Lactobacillus brevis* IOEB 9809 (Lucas and Lonvaud-Funel, 2002). Alignment between these sequences and putative decarboxylases on bacterial genome allowed the design of degenerated primers that amplified a 300 bp fragment homologous to other TDC sequences in *C. divergens* V41. By an inverse PCR strategy, the whole sequence of the TDC of *C. divergens* V41 was obtained showing the HVDAAY motif particularly conserved in pyridoxal phosphate-dependant decarboxylases (Kawalleck *et al.*, 1993), and the consensus sequence of the attachment site of pyridoxal phosphate, suggesting that this gene encodes a putative TDC. Alignment of this sequence with the four available TDC sequences is closely related (63 to 68% identity). The higher identity score was obtained with the protein sequence of the TDC from *E. faecalis* JH2-2 (68%). Moreover attempts to amplify adjacent gene of TDC using the primers designed by Coton *et al.* (2004) on the amino-acid transporter and the tRNA synthetase genes which were adjacent to the TDC gene of *C. divergens* 508 were unsuccessful suggesting that a variability exists for these genes among the same species.

Analysis of the TDC sequence of the mutant strain *C. divergens* V41A8 revealed that it differs from the wild strain by a single mutation on position 498 with an inversion of G in A, resulting in the apparition of a STOP codon. This mutation is in agreement with the kind of

mutation obtained with EMS. These results are in agreement with the lack of tyrosine decarboxylase activity observed in the former experiment and confirmed that *C. divergens* V41A8 is deficient on the synthesis of a functional tyrosine decarboxylase.

The comparison of wild and mutant *Carnobacterium* strains on cold-smoked salmon inoculated with *L. monocytogenes* showed that the mutant strain is slightly less efficient to grow and to limit the development of the pathogenic bacteria than the wild strain. It is possible that the mutation procedure has affected growth adaptability of the strain at low temperature or on fish muscle that is mainly composed of amino acids, peptides and proteins. The specific metabolic and physiologic properties that allow a good growth of *C. divergens* V41 and other lactic acid bacteria in these conditions should be analyzed to bring some basis to explain the differences observed between the wild and the mutant strain. However the inhibition observed with *C. divergens* V41A8 on *L. monocytogenes* strains allow the reduction of more than 1 log of the pathogenic strains that could be sufficient on products that are generally contaminated with low levels of the pathogenic bacteria. Optimization of the inoculation level and subculture conditions should also be investigated to obtain a better activity. Moreover the mutant strain has been shown to be unable to synthesize a tyrosine decarboxylase and it is confirmed by the lack of tyramine production on cold-smoked salmon, whereas tyramine is produced by the wild strain.

The effect of the inoculation of biopreservative strains on the quality of food product is also an important indicator of their potential application in food products. Physico-chemical parameters such as pH and total basic volatile nitrogen level and sensorial evaluation are known to be correlated to the spoilage evolution of the product (Leroi *et al.*, 1998 ; Stohr *et al.*, 2001 ; Leroi *et al.*, 2001). The inoculation of both *C. divergens* strains did not modify either physico-chemical or sensorial parameters of sterile CSS, by comparison to the uninoculated sample. These results are in agreement with other studies that have shown that *Carnobacterium* strains are not involved in the bacterial spoilage activity of cold-smoked salmon in opposition to *Lactobacillus* (Paludan-Muller *et al.*, 1998 ; Leroi *et al.*, 1998 ; Stohr *et al.*, 2001 ; Joffraud *et al.*, 2001). It also confirmed that the mutant strain was not affected during the mutation procedure on main metabolic activities that could be implicated in spoilage.

In conclusion of this study, we have shown that it is possible to obtain by a simple chemical mutation procedure a strain that keeps interesting properties as a biopreservative agent of cold-smoked fish products without production of tyramine. This strain could be an

interesting alternative for the biopreservation of cold-smoked salmon which is a product frequently contaminated by *L. monocytogenes*.

## ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from the European SEAFOODplus project, the “Aliment Qualité Sécurité” project no. R01 / 05 from the French Ministry of Agriculture and Fishery, and from partners CITPPM, ENITIAA, IFREMER and ASEPT. We are also grateful to Mireille Cardinal for sensorial analysis at IFREMER.

## REFERENCES

**Bover-Cid, S., Hugas, M., Izquierdo-Pulido, M. and Vidal-Carou, M.C.** (2000) Reduction of biogenic amine formation using a negative amino acid-decarboxylase starter culture for fermentation of Fuet sausages. *Journal of Food protection* **63**, 237-243.

**Bradford M.M.** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72** : 248-254.

**Brillet, A., Pilet, M.F., Prevost, H., Bouttefroy, A. and Leroi, F.** (2004) Biodiversity of *Listeria monocytogenes* sensitivity to bacteriocin-producing *Carnobacterium* strains and application in sterile cold-smoked salmon. *Journal of Applied Microbiology* **97**, 1029-1037.

**Brillet A., Pilet M-F., Prévost H., Cardinal M. and 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*, accepted.

**Connil, N., Le Breton, Y., Dousset, X., Auffray, Y., Rince, A. and Prevost, H.** (2002a) Identification of the *Enterococcus faecalis* tyrosine decarboxylase operon involved in tyramine production. *Appl Environ Microbiol* **68**, 3537-3544.

**Connil, N., Plissoneau, L., Onno, B., Pilet, M.F., Prevost, H. and Dousset, X.** (2002b) Growth of *Carnobacterium divergens* V41 and production of biogenic amines and divercin V41 in sterile cold-smoked salmon extract at varying temperatures, NaCl levels, and glucose concentrations. *Journal of Food protection* **65**, 333-338.

**Connil, N., Prevost, H. and Dousset, X.** (2002c) Production of biogenic amines and divercin V41 in cold smoked salmon inoculated with *Carnobacterium divergens* V41, and specific detection of this strain by multiplex-PCR. *Journal of Applied Microbiology* **92**, 611-617.

**Conway, E.J., Byrne, A.** (1933) An absorption apparatus for the micro-determination of certain volatile substances. *Biochemistry* **27**, 419-429.

**Coton, M., Coton, E., Lucas, P. and Lonvaud, A.** (2004) Identification of the gene encoding a putative tyrosine decarboxylase of *Carnobacterium divergens* 508. Development of molecular tools for the detection of tyramine-producing bacteria. *Food Microbiology* **21**, 125-130.

**Duffes, F., Corre, C., Leroi, F., Dousset, X. and Boyaval, P.** (1999) Inhibition of *Listeria monocytogenes* by in situ produced and semipurified bacteriocins of *Carnobacterium* spp. on vacuum-packed, refrigerated cold-smoked salmon. *Journal of Food protection* **62**, 1394-1403.

**Eerola, S., Hinkkanen, R., Lindfors, E. and Hirvi, T.** (1993) Liquid chromatographic determination of biogenic amines in dry sausages. *Journal of AOAC International* **76**, 575-577.

**Emborg, J., Laursen, B.G., Rathjen, T. and Dalgaard, P.** (2002) Microbial spoilage and formation of biogenic amines in fresh and thawed modified atmosphere-packed salmon (*Salmo salar*) at 2 degrees C. *Journal of Applied Microbiology* **92**, 790-799.

**Fernandez, M., Linares, D.M. and Alvarez, M.A.** (2004) Sequencing of the tyrosine decarboxylase cluster of *Lactococcus lactis* IPLA 655 and the development of a PCR method for detecting tyrosine decarboxylating lactic acid bacteria. *Journal of Food protection* **67**, 2521-2529.

**Gonzalez-Rodriguez, M.N., Sanz, J.J., Santos, J.A., Otero, A. and Garcia-Lopez, M.L.** (2002) Numbers and types of microorganisms in vacuum-packed cold-smoked freshwater fish at the retail level. *International Journal of Food Microbiology* **77**, 161-168.

**Joffraud, J.J., Leroi, F. and Chevalier, F.** (1998) Development of a sterile cold-smoked fish model. *Journal of Applied Microbiology* **85**, 991-998.

**Joffraud, J.J., Leroi, F., Roy, C. and Berdague, J.L.** (2001) Characterisation of volatile compounds produced by bacteria isolated from the spoilage flora of cold-smoked salmon. *International Journal of Food Microbiology* **66**, 175-184.

**Joosten, H.M.L.J.** (1995) Isolation of tyrosine decarboxylaseless mutants of a bacteriocin-producing *Enterococcus faecalis* strain and their application in cheese. *Journal of Food protection* **58**, 1222-1226.

**Jorgensen, L.V., Dalgaard, P. and Huss, H.H.** (2000a) Multiple compound quality index for cold-smoked salmon (*Salmo salar*) developed by multivariate regression of biogenic amines and pH. *J Agric Food Chem* **48**, 2448-2453.



- Jorgensen, L.V., Huss, H.H. and Dalgaard, P.** (2000b) The effect of biogenic amine production by single bacterial cultures and metabiosis on cold-smoked salmon. *Journal of Applied Microbiology* **89**, 920-934.
- Kabadjova, P., Dousset, X., Le Cam, V. and Prevost, H.** (2002) Differentiation of closely related *Carnobacterium* food isolates based on 16S-23S ribosomal DNA intergenic spacer region polymorphism. *Appl Environ Microbiol* **68**, 5358-5366.
- Kawalleck, P., Keller, H., Hahlbrock, K., Scheel, D. and Somssich, I.E.** (1993) A pathogen-responsive gene of parsley encodes tyrosine decarboxylase. *J Biol Chem* **268**, 2189-2194.
- Kim, S.H., Ben-Gigirey, B., Barros-Velazquez, J., Price, R.J. and An, H.** (2000) Histamine and biogenic amine production by *Morganella morganii* isolated from temperature-abused albacore. *Journal of Food protection* **63**, 244-251.
- Leisner, J.J., Millan, J.C., Huss, H.H. and Larsen, L.M.** (1994) Production of histamine and tyramine by lactic acid bacteria isolated from vacuum-packed sugar-salted fish. *Journal of Applied Bacteriology* **76**, 417-423.
- Lemonnier, M., and Lane, D.** (1998) Expression of the second lysine decarboxylase gene of *Escherichia coli*. *Microbiology* **144** ( Pt 3), 751-760.
- Leroi, F., Joffraud, J.J., Chevalier, F. and Cardinal, M.** (1998) Study of the microbial ecology of cold-smoked salmon during storage at 8 degrees C. *International Journal of Food Microbiology* **39**, 111-121.
- Leroi, F., Joffraud, J.J., Chevalier, F. and Cardinal, M.** (2001) Research of quality indices for cold-smoked salmon using a stepwise multiple regression of microbiological counts and physico-chemical parameters. *Journal of Applied Microbiology* **90**, 578-587.
- Lucas, P., and Lonvaud-Funel, A.** (2002) Purification and partial gene sequence of the tyrosine decarboxylase of *Lactobacillus brevis* IOEB 9809. *FEMS Microbiology Letters* **211**, 85-89.
- Lucas, P., Landete, J., Coton, M., Coton, E. and Lonvaud-Funel, A.** (2003) The tyrosine decarboxylase operon of *Lactobacillus brevis* IOEB 9809 : characterization and conservation in tyramine-producing bacteria. *FEMS Microbiology Letters* **229**, 65-71.
- Maijala, R.L.** (1993) Formation of histamine and tyramine by some lactic bacteria in MRS-broth and modified decarboxylation agar. *Letters in Applied Microbiology* **17**, 40-43.
- Masson, F., Johansson, G. and Montel, M.C.** (1999) Tyramine production by a strain of *Carnobacterium divergens* inoculated in meat-fat mixture. *Meat Science* **52**, 65-69.
- Métivier, A., Pilet, M.F., Dousset, X., Sorokine, O., Anglade, P., Zagorec, M., Piard, J.C., Marion, D., Cenatiempo, Y. and Fremaux, C.** (1998) Divercin V41, a new bacteriocin with two disulphide bonds produced by *Carnobacterium divergens* V41: primary structure and genomic organization. *Microbiology* **144** (Pt 10), 2837-2844.

- Moreno-Arribas, V., and Lonvaud-Funel, A.** (1999) Tyrosine decarboxylase activity of *Lactobacillus brevis* IOEB 9809 isolated from wine and *L. brevis* ATCC 367. *FEMS Microbiology Letters* **180**, 55-60.
- Moreno-Arribas, V., and Lonvaud-Funel, A.** (2001) Purification and characterization of tyrosine decarboxylase of *Lactobacillus brevis* IOEB 9809 isolated from wine. *FEMS Microbiology Letters* **195**, 103-107.
- Nilsson, L., Ng, Y.Y., Christiansen, J.N., Jorgensen, B.L., Grotnum, D. and Gram, L.** (2004) The contribution of bacteriocin to inhibition of *Listeria monocytogenes* by *Carnobacterium piscicola* strains in cold-smoked salmon systems. *Journal of Applied Microbiology* **96**, 133-143.
- Paludan-Muller, C., Dalgaard, P., Huss, H.H. and Gram, L.** (1998) Evaluation of the role of *Carnobacterium piscicola* in spoilage of vacuum- and modified-atmosphere-packed cold-smoked salmon stored at 5 degrees C. *International Journal of Food Microbiology* **39**, 155-166.
- Phan, A.P., Ngo, T.T. and Lenhoff, H.M.** (1983) Tyrosine decarboxylase. Spectrophotometric assay and application in determining pyridoxal-5'-phosphate. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **8**, 127-133.
- Pilet, M.F., Dousset, X., Barré, R., Novel, G., Desmazeaud, M. and Piard, J.C.** (1995) Evidence for two bacteriocins produced by *Carnobacterium piscicola* and *Carnobacterium divergens* isolated from fish and active against *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food protection* **58**, 256-262.
- Richard, C., Brillet, A., Pilet, M.F., Prevost, H. and Drider, D.** (2003) Evidence on inhibition of *Listeria monocytogenes* by divercin V41 action. *Letters in Applied Microbiology* **36**, 288-292.
- Santos, M.H.S.** (1996) Biogenic amines : their importance in foods. *International Journal of Food Microbiology* **29**, 213-231.
- Stohr, V., Joffraud, J.J., Cardinal, M. and Leroi, F.** (2001) Spoilage potential and sensory profile associated with bacteria isolated from cold-smoked salmon. *Food Research International* **34**, 797-806.
- ten Brink, B., Damink, C., Joosten, H.M. and Huis in 't Veld, J.H.** (1990) Occurrence and formation of biologically active amines in foods. *International Journal of Food Microbiology* **11**, 73-84.
- Wessels, S., Axelsson, L., Hansen, E.B., De Vuyst, L., Laulund, S., Lahteenmaki, L., Lindgren, S., Mollet, B., Salminen, S. and von Wright, A.** (2004) The lactic acid bacteria, the food chain, and their regulation. *Trends in Food Science & Technology* **15**, 498-505.

# DISCUSSION GENERALE

## Biopréserver le saumon fumé contre *Listeria monocytogenes* ...

La **biopréservation** d'un produit alimentaire consiste à inoculer le produit avec des bactéries sélectionnées dans le but d'**inhiber la croissance d'autres microorganismes indésirables** (flore pathogène, flore d'altération) et d'augmenter ainsi la sécurité et la durée de vie du produit sans en modifier la qualité. Cette technologie peut s'appliquer sur les produits fermentés traditionnels (boissons fermentées, produits laitiers, fromages, beurre, fruits et végétaux fermentés, viandes, saucissons, cacao, thé, café, etc...) et sur les produits non fermentés dont la conservation s'étend sur plusieurs semaines à basse température. Les produits concernés sont notamment les produits carnés et les produits de la mer faiblement préservés.

Parmi les produits de la mer, le **saumon fumé** sur lequel a porté cette étude est un exemple particulièrement adapté aux études de biopréservation (Leroi *et al.*, 1996 ; Duffes *et al.*, 1999a ; Nilsson *et al.*, 1999 ; Yamazaki *et al.*, 2003). Les conditions de conservation de ce produit permettent aux bactéries lactiques de se développer facilement et de devenir souvent majoritaires en fin de conservation (Truelstrup Hansen *et al.*, 1995 ; Leroi *et al.*, 1998 ; Paludan-Muller *et al.*, 1998 ; Gonzalez-Rodriguez *et al.*, 2002). Dans le cadre de la biopréservation, les interactions entre ces bactéries lactiques et les autres flores microbiennes peuvent être mises à profit soit pour maîtriser un risque dû à la présence de bactéries pathogènes dans le produit, soit pour limiter le développement des flores d'altération afin d'augmenter la durée de vie du produit (Rodgers, 2001).

Le traitement de salage-fumage appliqué au saumon fumé et associé à un conditionnement sous vide à basse température permet une conservation du produit assez longue sur plusieurs semaines. En revanche, comme nous l'avons vu dans l'étude bibliographique, c'est un aliment fréquemment contaminé par une bactérie pathogène, *Listeria monocytogenes* (Ben Embarek, 1994 ; Heinitz and Johnson, 1998 ; Jorgensen and Huss, 1998 ; Dauphin *et al.*, 2001), et les conditions physico-chimiques et de conservation du produit ne sont pas toujours suffisantes pour inhiber le développement de cette bactérie. De plus, une évaluation du risque lié à *Listeria monocytogenes* réalisée par la FAO/WHO (2004) dans les produits prêts-à-consommer a permis de montrer que le risque de listériose associé au

saumon fumé était le plus élevé (0.053 cas de listériose par million de portions de saumon fumé consommées) par comparaison au lait et aux produits carnés fermentés (respectivement 0,005 et 0.0000021 cas de listériose par million de portions). C'est pourquoi nous avons centré cette étude sur la maîtrise du risque *Listeria monocytogenes* par l'utilisation de bactéries lactiques du genre *Carnobacterium* productrices de bactériocines.

Dans un produit non fermenté réfrigéré tel que le saumon fumé, la biopréservation vis-à-vis du risque *Listeria monocytogenes* peut être envisagée sous deux angles : utilisation du peptide purifié ou semi-purifié, comme **additif**, ou ensemencement *in situ* d'une souche productrice de bactériocine comme un **auxiliaire technologique**. La première stratégie est difficilement applicable car elle fait appel à la réglementation concernant les additifs qui, rappelons-le, est draconienne en Europe (Directive 95/2/CE, 1995), et actuellement, à l'exception de la nisine, les bactériocines ne sont pas autorisées dans les aliments. La seconde stratégie semble offrir un meilleur contrôle du procédé en terme de sécurité et de prévention d'altération (Duffes *et al.*, 1999a ; Rodgers, 2001) et a donc été choisie.

Comme l'a montré l'étude bibliographique, le choix de bactéries lactiques du genre *Carnobacterium* paraissait particulièrement adapté à la problématique du saumon fumé : il s'agit en effet de bactéries peu fermentaires, souvent productrices de bactériocines et fréquemment retrouvées sur ce type de produits, et donc potentiellement aptes à s'y développer. Dans le chapitre I, nous avons montré que la **croissance des trois souches sélectionnées est relativement aisée dans le saumon fumé**. De plus, elles ont montré leur **activité d'inhibition vis-à-vis d'un grand nombre de souches de *Listeria monocytogenes*** pendant la conservation au froid du produit. Cette étude a permis d'explorer **la biodiversité de la sensibilité de *Listeria monocytogenes***, ce qui n'a jamais été réalisé auparavant. En effet, les études d'inhibition en milieu de laboratoire ou directement dans le produit sont généralement réalisées sur un petit nombre de souches de la bactérie pathogène, qui souvent ne proviennent pas du produit ou de son environnement. Dans le saumon fumé, les tests d'inhibition ont été réalisés avec un taux de contamination initial très faible (20 UFC/g) simulant assez bien une contamination naturelle, qui est en moyenne de l'ordre de 10 UFC/g (Jorgensen *et al.*, 1998 ; Nilsson, *et al.*, 1999). Nos résultats ont permis de montrer que l'application de *Carnobacterium divergens* V41 sur le saumon fumé permet de **maintenir un taux de *Listeria monocytogenes* inférieur à 50 UFC/g** pendant quatre semaines de conservation à températures réfrigérées, ce qui est conforme à la recommandation AFSSA

(<100 UFC/g) pour limiter tout risque de listériose pour le consommateur. Les performances d'inhibition de *Carnobacterium divergens* V41 permettent de positionner cette souche parmi les *Carnobacterium* les plus **protecteurs** dans le saumon fumé (Nilsson *et al.*, 1999 ; Yamazaki *et al.*, 2003). La démonstration des activités d'inhibition dans ces conditions laisse supposer que les souches inhibitrices pourraient être efficaces sur des échantillons naturellement contaminés, ce qui reste toutefois à valider à l'échelle industrielle à un taux d'ensemencement minimal à déterminer. Enfin, l'application de cette technologie à d'autres produits de la mer (poisson frais...) ou à d'autres aliments (produits carnés...) susceptibles de présenter un risque de listériose pour les consommateurs pourra ensuite être étudiée.

Par ailleurs, les capacités d'inhibition de la souche sur les flores d'altération naturellement présentes sur le saumon fumé ont également été abordées dans le chapitre II. La croissance de la souche *Carnobacterium divergens* V41 sur les lots de saumon fumé du commerce n'a eu qu'un effet limité sur le développement des flores microbiennes, suggérant que la souche ne permet pas d'empêcher ni de retarder l'altération du produit. Le rôle spécifique de la divercine V41 dans l'inhibition de *Listeria monocytogenes* démontré *in situ* dans le chapitre III explique en partie ces résultats car les bactériocines de classe IIa sont essentiellement actives envers les bactéries à Gram positif (Richard *et al.*, 2005). Néanmoins, un mécanisme de compétition nutritionnelle vis-à-vis d'une source de carbone a été montré entre une souche de *Carnobacterium piscicola* non productrice de bactériocine et *Listeria monocytogenes* (Nilsson *et al.*, 2005). De ce fait, la recherche d'autres mécanismes d'inhibition chez *Carnobacterium divergens* V41 peut être envisagée (indépendamment de sa production de bactériocine) par exemple en co-inoculant des bactéries d'altération avec la souche inhibitrice sur saumon fumé stérile.

### **... sans en altérer la qualité sensorielle**

**Dans les produits fermentés**, l'activité des ferments entraîne une modification considérable des caractéristiques organoleptiques. Par exemple, à partir de la même matière première, une grande diversité de produits peut être obtenue selon la technologie de fermentation et les procédés appliqués (cas des fromages). Au contraire, **dans les produits non fermentés réfrigérés**, comme le saumon fumé, **les caractéristiques organoleptiques ne**

**doivent pas être modifiées** par le développement des microorganismes ajoutés pour la biopréservation. Le choix des souches bioprotectrices devra **prendre en compte leur capacité d'altération sur le produit**, ce que nous avons cherché à vérifier sur les trois souches bioprotectrices étudiées précédemment, et de façon plus approfondie sur *Carnobacterium divergens* V41 dans le chapitre II. Sur saumon fumé stérile, aucune des trois souches n'a montré de capacité de modification des propriétés sensorielles du produit. Sur saumon fumé commercial naturellement contaminé, nous avons montré que la souche *Carnobacterium divergens* V41 n'altérerait pas de façon notable les qualités sensorielles des lots, bien qu'elle fut parfois détectée par le jury entraîné. Ces résultats confirment que **le pouvoir altérant des *Carnobacterium* (pH, ABVT, odeur/goût désagréable) dans le saumon fumé semble très faible** comme cela a déjà été mis en évidence lors de précédentes études (Paludan-Muller *et al.*, 1998 ; Nilsson *et al.*, 1999 ; Stohr *et al.*, 2001). De plus, la capacité à améliorer la qualité sensorielle du saumon fumé de deux souches de *Carnobacterium* spp. isolées du cabillaud et du saumon avait auparavant été démontrée (Leroi *et al.*, 1996). Notons que les capacités d'altération de souches potentiellement applicables en biopréservation sont rarement étudiées alors qu'elles sont déterminantes dans le choix des souches ajoutées aux aliments.

### **Serait-ce possible avec *Carnobacterium divergens* V41 ? ...**

Cette souche possédant le plus fort potentiel d'inhibition de *Listeria monocytogenes* dans le produit sans en modifier les qualités organoleptiques, nous nous sommes intéressés à ses capacités à être produite en grande quantité en vue de son utilisation potentielle à l'échelle industrielle. L'**optimisation des conditions de production** de *Carnobacterium divergens* V41 en milieu de culture dépourvu de protéines animales a été présentée dans le chapitre IV. Cette étude a permis d'acquérir une méthode permettant de produire la souche en quantité suffisante pour envisager une production industrielle, sans risque de transmission de résidus animaux. Cultivée sous les conditions optimisées, *Carnobacterium divergens* V41 garde sa capacité à croître dans le saumon fumé et à inhiber *Listeria monocytogenes*. Cependant il faudra aussi évaluer au cours de futurs travaux la capacité de la souche à résister aux traitements de congélation, séchage ou lyophilisation qui sont généralement utilisés dans l'industrie de production des ferments. L'ensemble de ces études permet d'apporter des

connaissances supplémentaires sur les souches inhibitrices et constitue une étape essentielle avant la mise sur le marché de bactéries d'intérêt.

De plus, l'étude menée dans le chapitre IV a mis en évidence la capacité de *Carnobacterium divergens* V41 à s'adapter à des **substrats différents** (protéines végétales) et à des conditions de température et de pH variables. Les souches de *Carnobacterium* étudiées ont montré notamment de **bonnes aptitudes de croissance à température réfrigérée** et ces propriétés feront l'objet d'une étude plus approfondie au laboratoire. En effet, parmi les bactéries lactiques, ces capacités sont peu répandues et représentent un critère pour la sélection de souches d'intérêt dans les aliments réfrigérés (Hamazaki *et al.*, 2003). L'étude des mécanismes d'adaptation à la matrice alimentaire et à la température de conservation des aliments permettra de prévoir le comportement des souches protectrices dans différents produits alimentaires au travers de modèles expérimentaux (Messens *et al.*, 2003).

### **En toute sécurité ?...**

De façon générale, en France, l'utilisation de microorganismes destinés à de nouvelles applications en alimentaire reste soumise à une demande d'autorisation auprès de la DGCCRF ou de la DSV. Plus précisément, ces microorganismes doivent faire l'objet d'études prouvant leur **innocuité** pour l'homme. Dans cet objectif, en l'absence de réglementation communautaire, il existe en France un avis édité par l'AFSSA destiné aux industriels et aux autorités gestionnaires du risque qui peuvent délivrer un agrément d'utilisation (AFSSA, 2002). De plus, au niveau européen, une méthodologie de qualification de sécurité présumée (QPS) est en cours de réflexion (Working document of the European Commission). Parmi les informations demandées sur les souches microbiennes, **la production de métabolites** potentiellement indésirables doit être renseignée. En ce qui concerne la souche *Carnobacterium divergens* V41, la production de deux métabolites peut être prise en compte à ce niveau : la divercine V41 et la tyramine.



### ...la divercine V41 ...

Nous avons pu mettre en évidence dans le chapitre III que **cette bactériocine de classe IIa confère seule son pouvoir inhibiteur à *Carnobacterium divergens* V41 vis-à-vis de *Listeria monocytogenes***. Ce peptide antimicrobien a déjà été étudié au laboratoire du point de vue génétique et physico-chimique comme nous avons pu le voir dans l'étude bibliographique. L'étude menée dans le chapitre III constitue une information supplémentaire à la connaissance de cette souche d'intérêt. Mieux connaître son mode d'action permettrait de mieux comprendre ses interactions avec la membrane des cellules cibles. Par ailleurs, il a été montré que des bactéries pathogènes comme *Listeria monocytogenes* pouvaient résister à la nisine et à certaines bactériocines de classe IIa (Ennahar *et al.*, 2000 ; Cleveland *et al.*, 2001 ; Gravesen *et al.*, 2002). **La résistance** de souches de *Listeria monocytogenes* à la divercine V41 est en cours d'étude au laboratoire. La recherche de résistants naturels à la souche inhibitrice à l'issue des expériences dans l'aliment peut également être proposée. Ensuite, bien que la divercine V41 soit dégradée par les enzymes digestives, une étude approfondie de toxicité sur des cellules intestinales *in vitro* ou sur un modèle animal pourrait permettre de s'assurer de son innocuité ou de prévoir les éventuels effets liés à sa consommation par l'intermédiaire des aliments. L'absence de toxicité a déjà été montrée sur modèles animaux pour la pédiocine PA-1 et la nisine (Cleveland *et al.*, 2001). Cependant, les études démontrant l'innocuité des souches représentent des investissements financiers importants.

### ...la tyramine...

L'étude approfondie des propriétés des souches protectrices nous a conduit à envisager la recherche de caractères potentiellement négatifs comme la production de certains métabolites tels que les amines biogènes. En effet, de nombreuses bactéries lactiques (*Lactobacillus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*) isolées de produits carnés fermentés ou de produits de la mer sont généralement productrices de tyramine (Suzzi and Gardini, 2003 ; Ansorena *et al.*, 2002 ; Emborg *et al.*, 2002 ; Jorgensen *et al.*, 2000b). Dans le chapitre II, nous avons montré que **les trois souches de *Carnobacterium* testées sur saumon fumé stérile étaient productrices de tyramine**. De plus, une étude menée au laboratoire sur une large collection de *Carnobacterium* isolées de produits de la mer a permis de montrer que toutes les souches produisaient de la tyramine (communication personnelle). La recherche de

ce caractère apporte une information essentielle et il est rarement décrit chez les souches proposées dans la littérature pour des applications en biopréservation.

L'inoculation de la souche *Carnobacterium divergens* V41 n'augmente pas la concentration en tyramine lorsqu'elle est ensemencée sur des lots de saumon fumé du commerce avec une flore naturelle initiale de l'ordre de  $10^5$  UFC/g. Par contre, sur des lots initialement peu contaminés en sortie usine (flore totale  $<20$  UFC/g), *Carnobacterium divergens* V41 se développe facilement et augmente la concentration en tyramine jusqu'à 370 mg/kg. Cela peut poser un problème pour son utilisation, bien que les concentrations retrouvées ne dépassent pas les teneurs toxiques discutées dans la littérature (en moyenne à partir de 500 mg/kg ; Santos, 1996). La croissance et la production d'amines biogènes par *Carnobacterium divergens* V41 dans du saumon fumé avaient été précédemment étudiées, et les résultats avaient montré que la souche produisait de la tyramine jusqu'à 289 mg/kg dans le produit après 4 semaines de conservation à 4°C (Duffes *et al.*, 1999a). En revanche, dans une autre étude, la présence de *Carnobacterium divergens* V41 n'augmentait pas la concentration en amines biogènes dans le saumon fumé (putrescine, cadavérine, histamine et tyramine) par rapport au témoin non ensemencé (Connil *et al.*, 2002c). Par ailleurs, des études sur certains paramètres (NaCl, glucose, température de stockage) influençant la production de tyramine dans un jus de saumon fumé ont été réalisées (Connil *et al.*, 2002b) : au bout de 9 jours de stockage, la concentration en tyramine était très faible pour une température de 3°C et 6,5% de NaCl (environ 12 mg/l) alors que les plus fortes concentrations étaient observées à 9°C pour le même taux de NaCl (environ 28 mg/l). Cependant au bout de 27 jours de stockage, il s'est avéré que tous les échantillons atteignaient une valeur finale proche de 35 mg/l quels que soient les paramètres. **Toutes ces études montrent des variations dans la production de tyramine par *Carnobacterium divergens* V41 en saumon fumé.**

Le choix des souches de *Carnobacterium* potentiellement applicables en biopréservation du saumon fumé doit donc **tenir compte de leur capacité à produire de la tyramine** de façon plus approfondie. Si les souches biopréservatrices produisent de la tyramine à des taux classiquement retrouvés dans les produits naturellement contaminés, alors leur utilisation ne semble pas représenter un risque fondamental pour les consommateurs. Selon les études citées précédemment, la production de tyramine par *Carnobacterium divergens* V41 ne dépasse pas les taux retrouvés dans des lots de saumon fumé commercial liés à la flore de contamination. Cependant si l'ajout d'une souche modifie de façon

importante la concentration en tyramine, son utilisation en biopréservation doit être discutée, bien que le seuil de toxicité ne soit pas connu et qu'aucune teneur maximale ne soit spécifiée dans la réglementation pour cette amine biogène. Il serait intéressant de savoir comment le niveau d'inoculation de *Carnobacterium divergens* V41 sur saumon fumé influe sur la production de tyramine et si les conditions environnementales de conservation du produit peuvent modifier cette production, comme cela a déjà été abordé en jus de saumon (Connil *et al.*, 2002b).

### **Et si on fabriquait des souches inhibitrices qui ne produisent plus de tyramine ?...**

Dans ce contexte, **pouvoir disposer de souches de *Carnobacterium* inhibitrices non productrices de tyramine** peut être une alternative pour envisager leur application en vue de la biopréservation des produits de la mer. En effet, la présence de tyramine dans un aliment étant un problème pour une catégorie de consommateurs (sous traitement médical contre les maladies cardiaques, contre la dépression, ou contre les maladies d'Alzheimer et de Parkinson par exemples), il est possible d'envisager la suppression de ce caractère chez la souche.

En ce qui concerne *Carnobacterium divergens* V41, étant donné qu'aucun mutant tyramine négatif n'est apparu spontanément, l'utilisation d'agents chimiques mutagènes a été envisagée. Comme nous l'avons vu dans le chapitre V, **un mutant de *Carnobacterium divergens* V41, nommé *Carnobacterium divergens* V41A8, non producteur de tyramine, a été isolé après mutagenèse chimique aléatoire (EMS)**. Il conserve des propriétés inhibitrices intéressantes vis-à-vis de *Listeria monocytogenes* et ne pose pas de problème quant à son utilisation dans les aliments au regard de la réglementation, puisque ce n'est pas un OGM. De plus **la stabilité de la mutation** a été mise en évidence par la présence d'une mutation au sein du 166<sup>ème</sup> codon du gène de structure de la tyrosine décarboxylase, donnant lieu à un codon stop. Ceci concorde avec **l'absence d'activité enzymatique** observée chez le mutant *Carnobacterium divergens* V41A8. La production de ce mutant pourra être envisagée en utilisant les conditions optimisées de production de la souche sauvage, développées dans le chapitre IV. Ce mutant tyramine négatif est non seulement une **solution alternative** au problème que posent les *Carnobacterium* producteurs de tyramine en biopréservation, mais

est aussi un outil pour étudier de façon plus approfondie la production de tyramine dans différentes conditions. Joosten *et al.* (1995) ont utilisé une approche similaire pour isoler deux mutants d'*Enterococcus faecalis* INIA 4 (producteur d'une bactériocine) produisant près de 1000 fois moins de tyramine que la souche d'origine, et ceci afin de pouvoir envisager leur application dans le fromage. Bien que l'utilisation d'agents mutagènes chimiques puisse produire des mutations supplémentaires à celles recherchées, la MNNG et l'EMS sont des agents mutagènes connus pour ne pas provoquer trop de lésions au sein du génome.

Les informations obtenues sur le gène de structure de la tyrosine décarboxylase de *Carnobacterium divergens* V41 dans le chapitre V et les récentes études sur les déterminants génétiques de différentes TDC d'origine bactérienne pourraient également permettre d'envisager de modifier ou de supprimer spécifiquement ce caractère en allant interrompre par exemple le gène de structure de la TDC par mutagenèse génétique insertionnelle. Cette approche nécessite cependant de développer des **outils moléculaires** qui fonctionnent chez *Carnobacterium* et qui jusqu'ici ont été peu développés. De plus, le mutant obtenu par cette technologie deviendrait un OGM dont l'utilisation dans les aliments est actuellement soumise à une réglementation européenne (directive 90/219/CE, règlement 258/97/CE).

Néanmoins, un programme de recherche visant à **évaluer le risque des bactéries génétiquement modifiées en alimentation** a été mis en place (Renault *et al.*, 2004). Ce programme est basé sur des techniques post-génomiques permettant d'évaluer de manière globale l'expression des gènes chez le modèle *Lactococcus lactis* dont différentes souches améliorées génétiquement sont disponibles. L'expression des gènes chez des souches industrielles et leurs dérivés a été évaluée par la mesure des transcrits et des protéines (1600 gènes, 400 protéines) afin d'établir des profils d'expression. Les résultats montraient que les techniques de modification (électroporation, intégration de plasmide, expression de marqueurs de sélection...) ne produisaient pas d'effets collatéraux sur l'expression des gènes. La mutation d'un gène supplémentaire ne modifie pas systématiquement et significativement le profil d'expression. Par ailleurs, cette étude a permis de proposer des hypothèses lorsque des modifications d'expression ont été constatées et ainsi d'évaluer le risque et l'impact des modifications dans le cadre de la sécurité alimentaire. Enfin cette étude a aussi montré que les profils d'expression de souches industrielles naturelles appartenant à la même espèce étaient très différents (sur de nombreux gènes) comparés aux profils de souches génétiquement modifiées par rapport à leur parent.

## En conclusion...

Les études menées sur *Carnobacterium divergens* V41 ces dernières années ont permis d'acquérir de nombreuses connaissances sur cette souche. Elle a été caractérisée aussi bien d'un point de vue génétique que biochimique, ce qui a permis d'avoir des données taxonomiques précises (Pilet *et al.*, 1995 ; Kabadjova *et al.*, 2002 ; Rachman *et al.*, 2004). Un antibiogramme a été effectué chez la souche sauvage et chez le mutant *Carnobacterium divergens* V41A8 (chapitre V), et les résistances observées pour la pénicilline G, les céphalosporines (3<sup>ème</sup> génération), les aminosides, la colistine et l'acide nalidixique sont définies comme naturelles (non acquises) et non transmissibles (par des plasmides...). De plus, ces deux souches sont sensibles à la vancomycine, l'un des antibiotiques qui est prescrit lorsque les traitements médicaux par d'autres antibiotiques ne sont pas efficaces. Par ailleurs, certains gènes de *Carnobacterium divergens* V41 ont été étudiés (gènes de la divercine et de la tyrosine décarboxylase). Enfin, les deux souches ne modifient pas de façon notable les caractéristiques sensorielles des poissons fumés pour lesquels leur utilisation est envisagée. Ces connaissances sont nécessaires à **la validation de l'innocuité** d'une souche destinée au secteur agro-alimentaire. Notons que par rapport aux nombreux travaux sur la biopréservation, bien que beaucoup de souches aient été proposées, peu d'entre elles ont été caractérisées sur autant de plans que *Carnobacterium divergens* V41, notamment concernant les caractéristiques négatives des souches (potentialités d'altération de l'aliment, production de métabolites indésirables...). Sur la souche *Carnobacterium divergens* V41, nous disposons aujourd'hui d'informations scientifiques détaillées qui pourront être fournies à d'éventuels utilisateurs, et qui peuvent constituer une bonne partie du dossier qui sera nécessaire pour valider l'utilisation d'une souche dans le secteur agro-alimentaire.

Plusieurs essais d'**applications de souches bioprotectrices** sur d'autres aliments que les produits de la mer ont été effectués. Ainsi, des souches de *Lactobacillus sakei* productrices de bactériocines ont été proposées au cours de différentes études comme agent de biopréservation vis-à-vis de *Listeria monocytogenes* dans des découpes de poulet et de saucisses (Katla *et al.*, 2002 ; Liserre *et al.*, 2002). Les informations sur la commercialisation de ces souches sont rarement communiquées. L'utilisation d'une souche de *Leuconostoc carnosum* anti-*Listeria* dans le cervelas de porc (Jacobsen *et al.*, 2003) a abouti à la

commercialisation de la souche par le producteur de ferment danois Chr. Hansen (Jacobsen, communication personnelle). En France, l'application d'une bactérie lactique dans le but d'allonger la durée de vie microbiologique de produits de la mer a été développée par la société Biocéane qui commercialise depuis bientôt trois ans un ferment capable de doubler la DLC de crevettes cuites décortiquées (Lorre et Daniel, 2001). La technologie de biopréservation pour les produits non fermentés réfrigérés est en cours de développement. Elle s'inscrit notamment dans le concept de la technologie des barrières pour la conservation des produits de la mer faiblement préservés qui est développée dans le cadre du programme européen SEAFOODplus. La recherche de nouvelles souches microbiennes d'intérêt et l'étude de leurs interactions avec les flores naturellement présentes dans les produits pourront aider à la maîtrise de la qualité et de la sécurité des aliments.

# REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

**A**

- Abee, T.** (1995) Pore-forming bacteriocins of gram-positive bacteria and self-protection mechanisms of producer organisms. *FEMS Microbiology Letters* **129**, 1-10.
- AFSSA** (2000) Rapport de la commission d'étude des risques liés à *Listeria monocytogenes*.
- AFSSA** (2001) Avis du 29 octobre 2001 relatif à la classification des aliments selon le danger représenté par *Listeria monocytogenes*. n°2000-SA-0094.
- AFSSA** (2002) Recommandations du 22 novembre 2002 « Recommandations pour la présentation des données permettant l'évaluation de l'innocuité des microorganismes utilisés dans le secteur agro-alimentaire (souches nouvelles ou modifiées, application différente de souches déjà utilisées) », <http://www.afssa.fr>
- Ahn, C., and Stiles, M.E.** (1990a) Plasmid-associated bacteriocin production by a strain of *Carnobacterium piscicola* from meat. *Applied and Environmental Microbiology* **56**, 2503-2510.
- Ahn, C., and Stiles, M.E.** (1990b) Antibacterial activity of lactic acid bacteria isolated from vacuum-packaged meats. *Journal of Applied Bacteriology* **69**, 302-310.
- Ansorena, D., Montel, M.C., Rokka, M., Talon, R., Eerola, S., Rizzo, A., M., R. and Demeyer, D.** (2002) Analysis of biogenic amines in northern and southern European sausages and role of flora in amine production. *Meat Science* **61**, 141-147.
- Antunes, P., Reu, C., Sousa, J.C., Pestana, N. and Peixe, L.** (2002) Incidence and susceptibility to antimicrobial agents of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* isolated from poultry carcasses in Porto, Portugal. *Journal of Food Protection* **65**, 1888-1893.
- Arena, M.E., and Manca de Nadra, M.C.** (2001) Biogenic amine production by *Lactobacillus*. *Journal of Applied Microbiology* **90**, 158-162.
- Autio, T., Hielm, S., Miettinen, M., Sjoberg, A.M., Aarnisalo, K., Bjorkroth, J., Mattila-Sandholm, T. and Korkeala, H.** (1999) Sources of *Listeria monocytogenes* contamination in a cold-smoked rainbow trout processing plant detected by pulsed-field gel electrophoresis typing. *Applied and Environmental Microbiology* **65**, 150-155.
- Avery, S.M., and Buncic, S.** (1997) Antilisterial effects of a sorbate-nisin combination in vitro and on packaged beef at refrigeration temperature. *Journal of Food Protection* **60**, 1075-1080.



---

**B**

- Baya, A.M., Toranzo, A.E., Lupiani, B., Li, T., Roberson, B.S. and Hetrick, F.M.** (1991) Biochemical and serological characterization of *Carnobacterium* spp. isolated from farmed and natural populations of striped bass and catfish. *Applied and Environmental Microbiology* **57**, 3114-3120.
- Ben Embarek, P.K.** (1994) Presence, detection and growth of *Listeria monocytogenes* in seafoods: a review. *International Journal of Food Microbiology* **23**, 17-34.
- Benkerroum, N., Oubel, H. and Mimoun, L.B.** (2002) Behavior of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in yogurt fermented with a bacteriocin-producing thermophilic starter. *Journal of Food Protection* **65**, 799-805.
- Benner, R.A., Jr., Staruszkiewicz, W.F. and Otwell, W.S.** (2004) Putrescine, cadaverine, and indole production by bacteria isolated from wild and aquacultured penaeid shrimp stored at 0, 12, 24, and 36 degrees C. *Journal of Food Protection* **67**, 124-133.
- Bergis, H.** (2002) Technologie de préparation du saumon fumé : incidence du froid sur le développement microbien. *Revue Générale du Froid*, n° 1028, 30-34.
- Bhugaloo-Vial, P., Dousset, X., Métivier, A., Sorokine, O., Anglade, P., Boyaval, P. and Marion, D.** (1996) Purification and amino acid sequences of piscicocins V1a and V1b, two class IIa bacteriocins secreted by *Carnobacterium piscicola* V1 that display significantly different levels of specific inhibitory activity. *Applied and Environmental Microbiology* **62**, 4410-4416.
- Bhugaloo-Vial, P., Douliez, J.P., Moll, D., Dousset, X., Boyaval, P. and Marion, D.** (1999) Delineation of key amino acid side chains and peptide domains for antimicrobial properties of divercin V41, a pediocin-like bacteriocin secreted by *Carnobacterium divergens* V41. *Applied and Environmental Microbiology* **65**, 2895-2900.
- Blom, H., Katla, T., Nissen, H. and Holo, H.** (2001) Characterization, production, and purification of carnocin H, a bacteriocin produced by *Carnobacterium* 377. *Current Microbiology* **43**, 227-231.
- Boeker, E.A., Fisher, E.H. et Snell, E.E.** (1969) Arginine decarboxylase from *Escherichia coli*. 3. Subunit structure. *The Journal of Biological Chemistry* **244**, 5239-5245.
- Borresen, T., Klausen, N.K., Larsen, L.M. and Sorensen, H.** (1989) Purification and characterisation of tyrosine decarboxylase and aromatic-L-amino-acid decarboxylase. *Biochimica and Biophysica Acta* **993**, 108-115.
- Boussouel, N., Mathieu, F., Benoit, V., Linder, M., Revol-Junelles, A.M. and Milliere, J.B.** (1999) Response surface methodology, an approach to predict the effects of a lactoperoxidase system, Nisin, alone or in combination, on *Listeria monocytogenes* in skim milk. *Journal of Applied Microbiology* **86**, 642-652.

- Bover-Cid, S., Hugas, M., Izquierdo-Pulido, M. and Vidal-Carou, M.C.** (2000a) Reduction of biogenic amine formation using a negative amino acid-decarboxylase starter culture for fermentation of Fuet sausages. *Journal of Food Protection* **63**, 237-243.
- Bover-Cid, S., Izquierdo-Pulido, M. and Vidal-Carou, M.C.** (2000b) Mixed starter cultures to control biogenic amine production in dry fermented sausages. *Journal of Food Protection* **63**, 1556-1562.
- Bover-Cid, S., Hugas, M., Izquierdo-Pulido, M. and Vidal-Carou, M.C.** (2001) Amino acid-decarboxylase activity of bacteria isolated from fermented pork sausages. *International Journal of Food Microbiology* **66**, 185-189.
- Bredholt, S., Nesbakken, T. and Holck, A.** (1999) Protective cultures inhibit growth of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 in cooked, sliced, vacuum- and gas-packaged meat. *International Journal of Food Microbiology* **53**, 43-52.
- Budde, B.B., Hornbaek, T., Jacobsen, T., Barkholt, V. and Koch, A.G.** (2003) *Leuconostoc carnosum* 4010 has the potential for use as a protective culture for vacuum-packed meats : culture isolation, bacteriocin identification, and meat application experiments. *International Journal of Food Microbiology* **83**, 171-184.

## C

- Cardinal, M., Berdagué, J.L., Dinel, V., Knockaert, C., Vallet, J.L.** (1997) Effet de différentes techniques de fumage sur la nature des composés volatils et les caractéristiques sensorielles de la chair de saumon. *Sciences des Aliments*, **17**, 679-696.
- Cardinal, M., Gunnlaugsdottir, H., Bjoernevik, M., Ouisse, A., Vallet, J.L. and Leroi, F.** (2004) Sensory characteristics of cold-smoked Atlantic salmon (*Salmo salar*) from European market and relationships with chemical, physical and microbiological measurements. *Food Research International* **37**, 181-193.
- Christen, P.** (2004) *Listeria*: la lutte continue. *Process*, mai, **1204**, 64.
- Chytiri, S., Paleologos, E., Savvaidis, I. and Kontominas, M.G.** (2004) Relation of biogenic amines with microbial and sensory changes of whole and filleted freshwater rainbow trout (*Onchorynchus mykiss*) stored on ice. *Journal of Food Protection* **67**, 960-965.
- Cleveland, J., Montville, T.J., Nes, I.F. and Chikindas, M.L.** (2001) Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *International Journal of Food Microbiology* **71**, 1-20.
- Collins, M.D., Farrow, J.A., Phillips, B., Ferusa, S. and Jones, D.** (1987) Classification of *Lactobacillus divergens*, *Lactobacillus piscicola* and some catalase-negative, asporogenous, rod-shaped bacteria from poultry in a new genus, *Carnobacterium*. *International Journal of Systematic Bacteriology* **37**, 310-316.

- Connil, N., Le Breton, Y., Dousset, X., Auffray, Y., Rince, A. and Prevost, H.** (2002a) Identification of the *Enterococcus faecalis* tyrosine decarboxylase operon involved in tyramine production. *Applied and Environmental Microbiology* **68**, 3537-3544.
- Connil, N., Plissoneau, L., Onno, B., Pilet, M.F., Prevost, H. and Dousset, X.** (2002b) Growth of *Carnobacterium divergens* V41 and production of biogenic amines and divercin V41 in sterile cold-smoked salmon extract at varying temperatures, NaCl levels, and glucose concentrations. *Journal of Food Protection* **65**, 333-338.
- Connil, N., Prevost, H. and Dousset, X.** (2002c) Production of biogenic amines and divercin V41 in cold smoked salmon inoculated with *Carnobacterium divergens* V41, and specific detection of this strain by multiplex-PCR. *Journal of Applied Microbiology* **92**, 611-617.
- Coton, E., Rollan, G.C. and Lonvaud-Funel, A.** (1998) Histidine carboxylase of *Leuconostoc oenos* 9204: purification, kinetic properties, cloning and nucleotide sequence of the *hdc* gene. *Journal of Applied Microbiology* **84**, 143-151.
- Coton, M., Coton, E., Lucas, P. and Lonvaud, A.** (2004) Identification of the gene encoding a putative tyrosine decarboxylase of *Carnobacterium divergens* 508. Development of molecular tools for the detection of tyramine-producing bacteria. *Food Microbiology* **21**, 125-130.

## D

- da Silva, M.V., Pinho, O., Ferreira, I., Plestilova, L. and Gibbs, P.A.** (2002) Production of histamine and tyramine by bacteria isolated from Portuguese vacuum-packed cold-smoked fish. *Food Control* **13**, 457-461.
- Dalgaard, P.** (1995) Qualitative and quantitative characterization of spoilage bacteria from packed fish. *International Journal of Food Microbiology* **26**, 319-333.
- Dalgaard, P., and Jorgensen, L.V.** (1998) Predicted and observed growth of *Listeria monocytogenes* in seafood challenge tests and in naturally contaminated cold-smoked salmon. *International Journal of Food Microbiology* **40**, 105-115.
- Dalgaard, P., Vancanneyt, M., Euras Vilalta, N., Swings, J., Fruekilde, P. and Leisner, J.J.** (2003) Identification of lactic acid bacteria from spoilage associations of cooked and brined shrimps stored under modified atmosphere between 0°C and 25°C. *Journal of Applied Microbiology* **94**, 80-89.
- Dapkevicius, M.L.N.E., Nout, M.J.R., Rombouts, F.M., Houben, J.H. and Wymenga, W.** (2000) Biogenic amine formation and degradation by potential fish silage starter microorganisms. *International Journal of Food Microbiology* **57**, 107-114.
- Dauphin, G., Ragimbeau, C. and Malle, P.** (2001) Use of PFGE typing for tracing contamination with *Listeria monocytogenes* in three cold-smoked salmon processing plants. *International Journal of Food Microbiology* **64**, 51-61.

- Déniel, P., Astruc, C. et Lecompte F.** (2004) Le saumon d'élevage sur la sellette. *LSA*, janvier, **1844**, 28-29.
- DGAL** (1998) note de service DGAL/SDHA, N98/N°8088 du 12 mai 1998. Gestion des non conformités des denrées alimentaires.
- DGAL** (2001) note de service DGAL/SDHA/N2001-8090 du 27 juin 2001. Critères microbiologiques applicables aux aliments. Deuxième version.
- DGAL** (2005) note de service DGAL/SDSSA/N2005-8033 du 27 janvier 2005. Plan de surveillance histamine dans les produits de la pêche – 2005.
- De Roin, M.A., Foong, S.C., Dixon, P.M. and Dickson, J.S.** (2003) Survival and recovery of *Listeria monocytogenes* on ready-to-eat meats inoculated with a desiccated and nutritionally depleted dustlike vector. *Journal of Food Protection* **66**, 962-969.
- Directive 90/219/CEE** (1990) du Conseil du 23 avril 1990, relative à l'utilisation confinée de micro-organismes génétiquement modifiés. Journal officiel n° L 117 du 08/05/1990 p. 0001 – 0014.
- Directive 91/493/CEE** (1991) du Conseil du 22 juillet 1991, fixant les règles sanitaires régissant la production et la mise sur le marché des produits de la pêche. Journal officiel des communautés européennes, n° L 268 du 24/09/1991 p. 0015 - 0034.
- Directive 93/113/CE** (1993) du Conseil du 14 décembre 1993, relative à l'utilisation et à la commercialisation des enzymes, des micro-organismes et de leurs préparations dans l'alimentation des animaux. Journal officiel n° L 334 du 31/12/1993 p. 0017 - 0023.
- Directive 95/2/CE** (1995) L61, additifs, annexe III, partie C, concernant les additifs alimentaires autres que les colorants et édulcorants, modifiée par la directive 98/72/CE. Journal officiel des communautés européennes.
- Duffes, F., Corre, C., Leroi, F., Dousset, X. and Boyaval, P.** (1999a) Inhibition of *Listeria monocytogenes* by in situ produced and semipurified bacteriocins of *Carnobacterium* spp. on vacuum-packed, refrigerated cold-smoked salmon. *Journal of Food Protection* **62**, 1394-1403.
- Duffes, F., Leroi, F., Boyaval, P. and Dousset, X.** (1999b) Inhibition of *Listeria monocytogenes* by *Carnobacterium* spp. strains in a simulated cold smoked fish system stored at 4 degrees C. *International Journal of Food Microbiology* **47**, 33-42.
- Durlu-Özkaya** (2001) Biogenic amines produced by *Enterobacteriaceae* isolated from meat products. *Meat Science* **58**, 163-166.

## E

- Edwards, R.A., Dainty, R.H., Hibbard, C.M. and Ramantanis, S.V.** (1987) Amines in fresh beef of normal pH and the role of bacteria in changes in concentration observed during storage in vacuum packs at chill temperatures. *Journal of Applied Bacteriology* **63**, 427-434.
- Eerola, S., Hinkkanen, R., Lindfors, E. and Hirvi, T.** (1993) Liquid chromatographic determination of biogenic amines in dry sausages. *Journal of AOAC International* **76**, 575-577.
- Emborg, J., Laursen, B.G., Rathjen, T. and Dalgaard, P.** (2002) Microbial spoilage and formation of biogenic amines in fresh and thawed modified atmosphere-packed salmon (*Salmo salar*) at 2 degrees C. *Journal of Applied Microbiology* **92**, 790-799.
- Ennahar, S., Sonomoto, K. and Ishizaki, A.** (1999) Class IIa bacteriocins from lactic acid bacteria : antibacterial activity and food preservation. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **87**, 705-716.
- Ennahar, S., Sashihara, T., Sonomoto, K. and Ishizaki, A.** (2000) Class IIa bacteriocins : biosynthesis, structure and activity. *FEMS Microbiology Review* **24**, 85-106.
- Eppert, I., Valdes-Stauber, N., Gotz, H., Busse, M. and Scherer, S.** (1997) Growth reduction of *Listeria* spp. caused by undefined industrial red smear cheese cultures and bacteriocin-producing *Brevibacterium linens* as evaluated in situ on soft cheese. *Applied and Environmental Microbiology* **63**, 4812-4817.
- Ericsson, H., Eklöw, M., Danielson- Tham, L., Loncarevic, S., Mentzing, L.O., Person, H., Unnerstad, H. and Tham, W.** (1997) An outbreak of Listeriosis suspected to have been caused by rainbow trout. *Journal of Food Protection* **35**, 2904-2907.
- Eurosurveillance Weekly** (2000) Listeriosis cases suspected to have been caused by vacuum-packed fish product in Finland, Issue 15, April 13, 2000. <http://www.eurosurv.org/update>

## F

- FAO Globefish/OFIMER** (2003) Commodity Update : salmon - Salmon : a study of global supply and demand. OFIMER, Le marché du saumon, février 2004. <http://www.ofimer.fr>
- FAO/WHO** (2004) Risk assessment of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods : interpretative summary. Microbiological risk assessment series 4.
- FDA/USDA** (2003) Quantitative assessment of relative risk to public health from foodborne *Listeria monocytogenes* among selected categories of ready-to-eat foods, Exposure assessment, Table III-14. Disponible sur : <http://www.foodsafety.gov/dms/lmr2-toc.html> (consulté le 9 juin 2005).

**Fernandez, M., Linares, D.M. and Alvarez, M.A.** (2004) Sequencing of the tyrosine decarboxylase cluster of *Lactococcus lactis* IPLA 655 and the development of a PCR method for detecting tyrosine decarboxylating lactic acid bacteria. *Journal of Food Protection* **67**, 2521-2529.

**Foulquié Moreno, M.R., Rea, M.C., Cogan, T.M. and De Vuyst, L.** (2003) Applicability of a bacteriocin-producing *Enterococcus faecium* as a co-culture in Cheddar cheese manufacture. *International Journal of Food Microbiology* **81**, 73-84.

**Franzmann, P.D., Hopfl, P., Weiss, N. and Tindall, B.J.** (1991) Psychrotrophic, lactic acid-producing bacteria from anoxic waters in Ace Lake, Antarctica; *Carnobacterium funditum* sp. nov. and *Carnobacterium alterfunditum* sp. nov. *Archives of Microbiology* **156**, 255-262.

## G

**Gänzle, M.G., Hertel, C. and Hammes, W.P.** (1999) Resistance of *Escherichia coli* and *Salmonella* against nisin and curvacin A. *International Journal of Food Microbiology* **48**, 37-50.

**Garcia-Garcia, P., Brenes-Balbuena, M., Hornero-Mendez, D., Garcia-Borrego, A. and Garrido-Fernandez, A.** (2000) Content of biogenic amines in table olives. *Journal of Food Protection* **63**, 111-116.

**Geornaras, I., Dykes, G.A. and von Holy, A.** (1995) Biogenic amine formation by poultry-associated spoilage and pathogenic bacteria. *Letters in Applied Microbiology* **21**, 164-166.

**Gingerich, T.M., Lorca, T., Flick, G.J., Pierson, M.D. and McNair, H.M.** (1999) Biogenic amine survey and organoleptic changes in fresh, stored, and temperature-abused bluefish (*Pomatomus saltatrix*) [In Process Citation]. *Journal of Food Protection* **62**, 1033-1037.

**Glass, K.A., Granberg, D.A., Smith, A.L., McNamara, A.M., Hardin, M., Mattias, J., Ladwig, K. and Johnsoni, E.A.** (2002) Inhibition of *Listeria monocytogenes* by sodium diacetate and sodium lactate on wieners and cooked bratwurst. *Journal of Food Protection* **65**, 116-123.

**González-Fernández** (2003) Influence of starter cultures and sugar concentrations on biogenic amine contents in chorizo dry sausage. *Food Microbiology* **20**, 275-284.

**Gonzalez-Rodriguez, M.N., Sanz, J.J., Santos, J.A., Otero, A. and Garcia-Lopez, M.L.** (2002) Numbers and types of microorganisms in vacuum-packed cold-smoked freshwater fish at the retail level. *International Journal of Food Microbiology* **77**, 161-168.

**Gram, L., and Huss, H.H.** (1996) Microbiological spoilage of fish and fish products. *International Journal of Food Microbiology* **33**, 121-137.

- Gram, L., and Dalgaard, P.** (2002) Fish spoilage bacteria-problems and solutions. *Current Opinion in Biotechnology* **13**, 262-266.
- Gram, L., Ravn, L., Rasch, M., Bruhn, J.B., Christensen, A.B. and Givskov, M.** (2002) Food spoilage-interactions between food spoilage bacteria. *International Journal of Food Microbiology* **78**, 79-97.
- Gravesen, A., Jydegaard Axelsen, A.M., Mendes da Silva, J., Hansen, T.B. and Knochel, S.** (2002) Frequency of bacteriocin resistance development and associated fitness costs in *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology* **68**, 756-764.
- Guyer, S., and Jemmi, T.** (1991) Behavior of *Listeria monocytogenes* during fabrication and storage of experimentally contaminated smoked salmon. *Applied and Environmental Microbiology* **57**, 1523-1527.
- Guyonnet, D., Fremaux, C., Cenatiempo, Y. and Berjeaud, J.M.** (2000) Method for rapid purification of class IIa bacteriocins and comparison of their activities. *Applied and Environmental Microbiology* **66**, 1744-1748.

## H

- Halasz, A., Barath, A., Simon-Sarkadi, L., et Holzapfel, W.H.** (1994) Biogenic amines and their production by microorganisms in food. *Trends in Food Science and Technology*. **5**, 42-49.
- Hamasaki Y, Ayaki M, Fuchu H, Sugiyama M, Morita H.** (2003) Behavior of psychrotrophic lactic acid bacteria isolated from spoiling cooked meat products. *Applied and Environmental Microbiology* **69**, 3668-3671.
- Heinitz, M.L., and Johnson, J.M.** (1998) The incidence of *Listeria* spp., *Salmonella* spp., and *Clostridium botulinum* in smoked fish and shellfish. *Journal of Food Protection* **61**, 318-323.
- Henry Chin, K.D., and Koehler, P.E.** (1986) Effect of salt concentration and incubation temperature on formation of histamine, phenethylamine, tryptamine and tyramine during miso fermentation. *Journal of Food Protection* **49**, 423-427.
- Herbin, S., Mathieu, F., Brule, F., Branlant, C., Lefebvre, G. and Lebrihi, A.** (1997) Characteristics and genetic determinants of bacteriocin activities produced by *Carnobacterium piscicola* CP5 isolated from cheese. *Current Microbiology* **35**, 319-326.
- Hernandez-Herrero, M.M., Duflos, G., Malle, P. and Bouquelet, S.** (2002) Amino acid decarboxylase activity and other chemical characteristics as related to freshness loss in iced cod (*Gadus morhua*). *Journal of Food Protection* **65**, 1152-1157.
- Hof, H.** (2003) History and epidemiology of listeriosis. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* **35**, 199-202.

- Hoffman, A.D., Gall, K.L., Norton, D.M. and Wiedmann, M.** (2003) *Listeria monocytogenes* contamination patterns for the smoked fish processing environment and for raw fish. *Journal of Food Protection* **66**, 52-60.
- Holck, A.L., Axelsson, L. and Schillinger, U.** (1994) Purification and cloning of piscicolin 61, a bacteriocin from *Carnobacterium piscicola* LV61. *Current Microbiology* **29**, 63-68.
- Holck, A., Axelsson, L. and Schillinger, U.** (1996) Divergicin 750, a novel bacteriocin produced by *Carnobacterium divergens* 750. *FEMS Microbiology Letters* **136**, 163-168.
- Holley, R.A., Guan, T.Y., Peirson, M.Y. and Yost, C.K.** (2002) *Carnobacterium viridans* sp. nov., an alkaliphilic, facultative anaerobe isolated from refrigerated, vacuum-packed bologna sausage. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **52**, 1881-1885.
- Hugas, M.** (1998) Bacteriocinogenic lactic acid bacteria for the biopreservation of meat and meat products. *Meat Science* **49**, S139-S150.
- Huss, H.H.** (1997) Control of indigenous pathogenic bacteria in seafood. *Food Control* **8**, 91-98.
- Huss, H.H., Jorgensen, L.V. and Vogel, B.F.** (2000) Control options for *Listeria monocytogenes* in seafood. *International Journal of Food Microbiology* **62**, 267-274.

## I

- Innocente, N., and D'Agostin, P.** (2002) Formation of biogenic amines in a typical semihard Italian cheese. *Journal of Food Protection* **65**, 1498-1501.
- Izquierdo-Pulido, M., Font-Fabregas, J., Carceller-Rosa, J.M., Marine-Font, A. and Vidal-Carou, C.** (1996) Biogenic amine changes related to lactic acid bacteria during brewing. *Journal of Food Protection* **59**, 175-180.

## J

- Jack, R.W., Wan, J., Gordon, J., Harmark, K., Davidson, B.E., Hillier, A.J., Wettenhall, R.E., Hickey, M.W. and Coventry, M.J.** (1996) Characterization of the chemical and antimicrobial properties of piscicolin 126, a bacteriocin produced by *Carnobacterium piscicola* JG126. *Applied and Environmental Microbiology* **62**, 2897-2903.
- Jacobsen, T., Budde, B.B. and Koch, A.G.** (2003) Application of *Leuconostoc carnosum* for biopreservation of cooked meat products. *Journal of Applied Microbiology* **95**, 242-249.



- Joborn, A., Dorsch, M., Olsson, J.C., Westerdahl, A. and Kjelleberg, S.** (1999) *Carnobacterium inihbens* sp. nov., isolated from the intestine of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *International Journal of Systematic Bacteriology* **49**, 1891-1898.
- Joffraud, J.J., Leroi, F., Roy, C. and Berdague, J.L.** (2001) Characterisation of volatile compounds produced by bacteria isolated from the spoilage flora of cold-smoked salmon. *International Journal of Food Microbiology* **66**, 175-184.
- Joosten, H.M.L.J., and Northolt, M.D.** (1989) Detection, growth and amine-producing capacity of *Lactobacilli* in cheese. *Applied and Environmental Microbiology* **55**, 2356-2359.
- Joosten, H.M.L.J.** (1995) Isolation of tyrosine decarboxylaseless mutants of a bacteriocin-producing *Enterococcus faecalis* strain and their application in cheese. *Journal of Food Protection* **58**, 1222-1226.
- Joosten, H.M.L.J., and Nunez, M.** (1996) Prevention of histamine formation in cheese by bacteriocin producing lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **62**, 1178-1181.
- Jorgensen, L.V., and Huss, H.H.** (1998) Prevalence and growth of *Listeria monocytogenes* in naturally contaminated seafood. *International Journal of Food Microbiology* **42**, 127-131.
- Jorgensen, L.V., Dalgaard, P. and Huss, H.H.** (2000a) Multiple compound quality index for cold-smoked salmon (*Salmo salar*) developed by multivariate regression of biogenic amines and pH. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **48**, 2448-2453.
- Jorgensen, L.V., Huss, H.H. and Dalgaard, P.** (2000b) The effect of biogenic amine production by single bacterial cultures and metabiosis on cold-smoked salmon. *Journal of Applied Microbiology* **89**, 920-934.
- Jorgensen, L.V., Huss, H.H. and Dalgaard, P.** (2001) Significance of volatile compounds produced by spoilage bacteria in vacuum-packed cold-smoked salmon (*Salmo salar*) analyzed by GC-MS and multivariate regression. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **49**, 2376-2381.

## K

- Kabadjova, P., Dousset, X., Le Cam, V. and Prevost, H.** (2002) Differentiation of closely related *Carnobacterium* food isolates based on 16S-23S ribosomal DNA intergenic spacer region polymorphism. *Applied and Environmental Microbiology* **68**, 5358-5366.
- Kaniou, I., Samouris, G., Mouratidou, T., Eleftheriadou, A. and Zantopoulos, N.** (2001) Determination of biogenic amines in fresh unpacked and vacuum-packed beef during storage at 4°C. *Food Chemistry* **74**, 515-519.

- Kanki, M., Yoda, T., Ishibashi, M. and Tsukamoto, T.** (2004) *Photobacterium phosphoreum* caused a histamine fish poisoning incident. *International Journal of Food Microbiology* **92**, 79-87.
- Katla, T., Moretro, T., Aasen, I.M., Holck, A., Axelsson, L. and Naterstad, K.** (2001) Inhibition of *Listeria monocytogenes* in cold smoked salmon by addition of sakacin P and/or live *Lactobacillus sakei* cultures. *Food Microbiology* **18**, 431-439.
- Katla, T., Moretro, T., Sveen, I., Aasen, I.M., Axelsson, L., Rorvik, L.M. and Naterstad, K.** (2002) Inhibition of *Listeria monocytogenes* in chicken cold cuts by addition of sakacin P and sakacin P-producing *Lactobacillus sakei*. *Journal of Applied Microbiology* **93**, 191-196.
- Kawalleck, P., Keller, H., Hahlbrock, K., Scheel, D. and Somssich, I.E.** (1993) A pathogen-responsive gene of parsley encodes tyrosine decarboxylase. *The Journal of Biological Chemistry* **268**, 2189-2194.
- Kelly, W.J., Asmundson, R.V. and Huang, C.M.** (1996) Isolation and characterization of bacteriocin-producing lactic acid bacteria from ready-to-eat food products. *International Journal of Food Microbiology* **33**, 209-218.
- Khouiti, Z., and Simon, J.P.** (1997) Detection and partial characterization of a bacteriocin produced by *Carnobacterium piscicola* 213. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* **19**, 28-33.
- Khouiti, Z., and Simon, J.P.** (2004) Carnocin KZ213 produced by *Carnobacterium piscicola* 213 is adsorbed onto cells during growth. Its biosynthesis is regulated by temperature, pH and medium composition. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* **31**, 5-10.
- Kim, S.H., Ben-Gigirey, B., Barros-Velazquez, J., Price, R.J. and An, H.** (2000) Histamine and biogenic amine production by *Morganella morganii* isolated from temperature-abused albacore. *Journal of Food Protection* **63**, 244-251.
- Kimura, B., Konagaya, Y. and Fujii, T.** (2001) Histamine formation by *Tetragenococcus muraticus*, a halophilic lactic acid bacterium isolated from fish sauce. *International Journal of Food Microbiology* **70**, 71-77.
- Klaenhammer, T.R.** (1993) Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology reviews*, 39-86.
- Knockaert C.** (2002). Le fumage du poisson, 7<sup>ème</sup> édition, collection « Valorisation des produits de la mer », IFREMER.
- Koutsoumanis, K., Lampropoulou, K. and Nychas, G.J.** (1999) Biogenic amines and sensory changes associated with the microbial flora of Mediterranean gilt-head sea bream (*Sparus aurata*) stored aerobically at 0, 8, and 15 degrees C. *Journal of Food Protection* **62**, 398-402.

## L

- Lakshmanan, R., Piggott, J.R. and Paterson, A.** (2003) Potential applications of high pressure for improvement in salmon quality. *Trends in Food Science & Technology* **14**, 354-363.
- Lakshmanan, R., and Dalgaard, P.** (2004) Effects of high-pressure processing on *Listeria monocytogenes*, spoilage microflora and multiple compound quality indices in chilled cold-smoked salmon. *Journal of Applied Microbiology* **96**, 398-408.
- Leblanc, L., Leroi, F., Hartke, A. and Auffray, Y.** (2000) Do stresses encountered during the smoked salmon process influence the survival of the spoiling bacterium *Shewanella putrefaciens* ? *Letters in Applied Microbiology* **30**, 437-442.
- Leroi, F., Arbey, N., Joffraud, J.-J. and Chevalier, F.** (1996) Effect of inoculation with lactic acid bacteria on extending the shelf life of vacuum-packed cold smoked salmon. *International Journal of Food Science and Technology* **31**, 497-504.
- Leroi, F., Joffraud, J.J., Chevalier, F. and Cardinal, M.** (1998) Study of the microbial ecology of cold-smoked salmon during storage at 8 degrees C. *International Journal of Food Microbiology* **39**, 111-121.
- Leroi, F., Joffraud, J.J. and Chevalier, F.** (2000) Effect of salt and smoke on the microbiological quality of cold-smoked salmon during storage at 5 degrees C as estimated by the factorial design method. *Journal of Food Protection* **63**, 502-508.
- Leroi, F., Joffraud, J.J., Chevalier, F. and Cardinal, M.** (2001) Research of quality indices for cold-smoked salmon using a stepwise multiple regression of microbiological counts and physico-chemical parameters. *Journal of Applied Microbiology* **90**, 578-587.
- Leroi, F.** (2002) La microbiologie du saumon fumé à froid : aspects hygiéniques et qualité. *Revue Générale du Froid*, **1028**, 35-40.
- Leroy, F., Foulquie Moreno, M.R. and De Vuyst, L.** (2003) *Enterococcus faecium* RZS C5, an interesting bacteriocin producer to be used as a co-culture in food fermentation. *International Journal of Food Microbiology* **88**, 235-240.
- Leuschner, R.G., Heidel, M. and Hammes, W.P.** (1998) Histamine and tyramine degradation by food fermenting microorganisms. *International Journal of Food Microbiology* **39**, 1-10.
- Leuschner, R.G.K., and Hammes, W.P.** (1998) Degradation of histamine and tyramine by *Brevibacterium linens* during surface ripening of munster cheese. *Journal of Food Protection* **61**, 874-878.
- Liserre, A. M., Landgraf, M., Destro, M.T., Franco B. D. G. M.** (2002) Inhibition of *Listeria monocytogenes* by a bacteriocinogenic *Lactobacillus sakei* strain in modified atmosphere-packaged Brazilian sausage. *Meat Science* **61**, 449-455.

- Lonvaud-Funel, A.** (2001) Biogenic amines in wines: role of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Letters* **199**, 9-13.
- Lopez-Sabater, E.I., Rodriguez-Jerez, J.J., Hernandez-Herrero, M. and Mora-Ventura, M.T.** (1994) Evaluation of histidine decarboxylase activity of bacteria isolated from sardine (*Sardina pilchardus*) by an enzymic method. *Letters in Applied Microbiology* **19**, 70-75.
- Lopez-Sabater, E.I., Rodriguez-Jerez, J.J., Hernandez-Herrero, M. and Mora-Ventura, M.T.** (1996) Incidence of histamine-forming bacteria and histamine content in scombroid fish species from retail markets in the Barcelona area. *International Journal of Food Microbiology* **28**, 411-418.
- Lorre S. et Daniel P.** (2001) Brevet n°01 12187.
- Lucas, P., Landete, J., Coton, M., Coton, E. and Lonvaud-Funel, A.** (2003) The tyrosine decarboxylase operon of *Lactobacillus brevis* IOEB 9809 : characterization and conservation in tyramine-producing bacteria. *FEMS Microbiology Letters* **229**, 65-71.
- Lyhs, U., Bjorkroth, J., Hyytia, E. and Korkeala, H.** (1998) The spoilage flora of vacuum-packaged, sodium nitrite or potassium nitrate treated, cold-smoked rainbow trout stored at 4 degrees C or 8 degrees C. *International Journal of Food Microbiology* **45**, 135-142.
- Lyhs, U., Lahtinen, J., Fredriksson-Ahomaa, M., Hyytia-Trees, E., Elfing, K. and Korkeala, H.** (2001) Microbiological quality and shelf-life of vacuum-packaged 'gravad' rainbow trout stored at 3 and 8 degrees C. *International Journal of Food Microbiology* **70**, 221-230.
- Lyhs, U., Korkeala, H. and Bjorkroth, J.** (2002) Identification of lactic acid bacteria from spoiled, vacuum-packaged 'gravad' rainbow trout using ribotyping. *International Journal of Food Microbiology* **72**, 147-153.

## M

- Marino, M., Maifreni, M., Moret, S. and Rondinini, G.** (2000) The capacity of *Enterobacteriaceae* species to produce biogenic amines in cheese. *Letters in Applied Microbiology* **31**, 169-173.
- Martuscelli, M., Crudele, M.A., Gardini, F. and Suzzi, G.** (2000) Biogenic amine formation and oxidation by *Staphylococcus xylosus* strains from artisanal fermented sausages. *Letters in Applied Microbiology* **31**, 228-232.
- Masson, F., Talon, R. and Montel, M.C.** (1996) Histamine and tyramine production by bacteria from meat products. *International Journal of Food Microbiology* **32**, 199-207.

- Messens, W., Verluyten, J., Leroy, F. and De Vuyst L. (2003) Modelling growth and bacteriocin production by *Lactobacillus curvatus* LTH 1174 in response to temperature and pH values used for European sausage fermentation processes. *International Journal of Food Microbiology* **81**, 41-52.
- McCabe, B.J. (1986) Dietary tyramine and other pressor amines in MAOI regimens: a review. *Journal of the American Dietetic Association* **86**, 1059-1064.
- McMullen, L.M., and Stiles, M.E. (1996) Potential use of bacteriocin-producing lactic acid bacteria in the preservation of meats. *Journal of Food Protection supplement*, 64-71.
- Métivier, A., Pilet, M.F., Dousset, X., Sorokine, O., Anglade, P., Zagorec, M., Piard, J.C., Marion, D., Cenatiempo, Y. and Fremaux, C. (1998) Divercin V41, a new bacteriocin with two disulphide bonds produced by *Carnobacterium divergens* V41: primary structure and genomic organization. *Microbiology* **144**, 2837-2844.
- Miettinen, M.K., Siitonen, A., Heiskanen, P., Haajanen, H., Bjorkroth, K.J. and Korkeala, H.J. (1999) Molecular epidemiology of an outbreak of febrile gastroenteritis caused by *Listeria monocytogenes* in cold-smoked rainbow trout. *Journal of Clinical Microbiology* **37**, 2358-2360.
- Mietz, J.L., Karmas, E. (1977) Chemical index of canned tuna determined by high-pressure liquid chromatography. *Journal of Food Science*. **42**, 155-158
- Milliere, J.B., Michel, M., Mathieu, F. and Lefebvre, G. (1994) Presence of *Carnobacterium* spp. in french surface mould-ripened soft-cheese. *Journal of Applied Bacteriology* **76**, 264-269.
- Moreno-Arribas, V., and Lonvaud-Funel, A. (1999) Tyrosine decarboxylase activity of *Lactobacillus brevis* IOEB 9809 isolated from wine and *L. brevis* ATCC 367. *FEMS Microbiology Letters* **180**, 55-60.
- Moreno-Arribas, V., Torlois, S., Joyeux, A., Bertrand, A. and Lonvaud-Funel, A. (2000) Isolation, properties and behaviour of tyramine-producing lactic acid bacteria from wine. *Journal of Applied Microbiology* **88**, 584-593.
- Moreno-Arribas, V., and Lonvaud-Funel, A. (2001) Purification and characterization of tyrosine decarboxylase of *Lactobacillus brevis* IOEB 9809 isolated from wine. *FEMS Microbiology Letters* **195**, 103-107.
- Moreno-Arribas, M.V., Polo, M.C., Jorganes, F. and Munoz, R. (2003) Screening of biogenic amine production by lactic acid bacteria isolated from grape must and wine. *International Journal of Food Microbiology* **84**, 117-123.

## N

- Nadon, C.A., Ismond, M.A. and Holley, R.** (2001) Biogenic amines in vacuum-packaged and carbon dioxide-controlled atmosphere-packaged fresh pork stored at -1.50 degrees C. *Journal of Food Protection* **64**, 220-227.
- NF V 45-065** (1997) Poissons transformés. Saumon fumé. Norme AFNOR.
- NF V 01-003** (2004) Hygiène et sécurité des produits alimentaires. Lignes directrices pour l'élaboration d'un protocole de test de vieillissement pour la validation de la durée de vie microbiologique. Denrées périssables, réfrigérées (indice de classement : V01-003). Norme AFNOR.
- Nilsson, L., Huss, H.H. and Gram, L.** (1997) Inhibition of *Listeria monocytogenes* on cold-smoked salmon by nisin and carbon dioxide atmosphere. *International Journal of Food Microbiology* **38**, 217-227.
- Nilsson, L., Gram, L. and Huss, H.H.** (1999) Growth control of *Listeria monocytogenes* on cold-smoked salmon using a competitive lactic acid bacteria flora. *Journal of Food Protection* **62**, 336-342.
- Nilsson, L., Chen, Y., Chikindas, M.L., Huss, H.H., Gram, L. and Montville, T.J.** (2000) Carbon dioxide and nisin act synergistically on *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology* **66**, 769-774.
- Nilsson, L., Nielsen, M.K., Ng, Y. and Gram, L.** (2002) Role of acetate in production of an autoinducible class IIa bacteriocin in *Carnobacterium piscicola* A9b. *Applied and Environmental Microbiology* **68**, 2251-2260.
- Nilsson, L., Ng, Y.Y., Christiansen, J.N., Jorgensen, B.L., Grotinum, D. and Gram, L.** (2004) The contribution of bacteriocin to inhibition of *Listeria monocytogenes* by *Carnobacterium piscicola* strains in cold-smoked salmon systems. *Journal of Applied Microbiology* **96**, 133-143.
- Nilsson, L., Hansen, T.B., Garrido, P., Buchrieser, C., Glaser, P., Knochel, S., Gram, L. and Gravesen, A.** (2005) Growth inhibition of *Listeria monocytogenes* by a non bacteriocinogenic *Carnobacterium piscicola*. *Journal of Applied Microbiology* **98**, 172-183.
- Norton, D.M., Scarlett, J.M., Horton, K., Sue, D., Thimothe, J., Boor, K.J. and Wiedmann, M.** (2001) Characterization and pathogenic potential of *Listeria monocytogenes* isolates from the smoked fish industry. *Applied and Environmental Microbiology* **67**, 646-653.
- Notermans, S., and Hoornstra, E.** (2000) Risk assessment of *Listeria monocytogenes* in fish products : some general principles, mechanism of infection and the use of performance standards to control human exposure. *International Journal of Food Microbiology* **62**, 223-229.

- Novella-Rodriguez, S., Veciana-Nogues, M.T. and Vidal-Carou, M.C.** (2000) Biogenic amines and polyamines in milks and cheeses by ion-pair high performance liquid chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **48**, 5117-5123.
- Novella-Rodriguez, S., Veciana-Nogues, M.T., Roig-Sagues, A.X., Trujillo-Mesa, A.J. and Vidal-Carou, M.C.** (2004) Comparison of biogenic amine profile in cheeses manufactured from fresh and stored (4 degrees C, 48 hours) raw goat's milk. *Journal of Food Protection* **67**, 110-116.
- Nykanen, A., Weckman, K. and Lapvetelainen, A.** (2000) Synergistic inhibition of *Listeria monocytogenes* on cold-smoked rainbow trout by nisin and sodium lactate. *International Journal of Food Microbiology* **61**, 63-72.

## O

- Orlacchio, A., and Borri-Voltattorni, C.** (1979) The steady state kinetics of tyrosine decarboxylase from *Streptococcus faecalis*. *The Italian Journal of Biochemistry* **28**, 1-10.
- Ouattara, B., Simard, R.E., Holley, R.A., Piette, J.P. and Begin, A.** (1997) Inhibitory effect of organic acids upon meat spoilage bacteria. *Journal of Food Protection* **60**, 246-253.

## P

- Paarup, T., Sanchez, J.A., Pelaez, C. and Moral, A.** (2002) Sensory, chemical and bacteriological changes in vacuum-packed pressurised squid mantle (*Todaropsis eblanae*) stored at 4 degrees C. *International Journal of Food Microbiology* **74**, 1-12.
- Paleologos, E.K., Savvaidis, I.N. and Kontominas, M.G.** (2004) Biogenic amines formation and its relation to microbiological and sensory attributes in ice-stored whole, gutted and filleted Mediterranean Sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Food Microbiology* **21**, 549-557.
- Paludan-Muller, C., Dalgaard, P., Huss, H.H. and Gram, L.** (1998) Evaluation of the role of *Carnobacterium piscicola* in spoilage of vacuum- and modified-atmosphere-packed cold-smoked salmon stored at 5 degrees C. *International Journal of Food Microbiology* **39**, 155-166.
- Parente, E., Martuscelli, M., Gardini, F., Grieco, S., Crudele, M.A. and Suzzi, G.** (2001) Evolution of microbial populations and biogenic amine production in dry sausages produced in Southern Italy. *Journal of Applied Microbiology* **90**, 882-891.
- Pereira, C.I., Crespo, M.T. and Romao, M.V.** (2001) Evidence for proteolytic activity and biogenic amines production in *Lactobacillus curvatus* and *L. homohiochii*. *International Journal of Food Microbiology* **68**, 211-216.

- Periago, M.J., Rodrigo, J., Ros, G., Rodriguez-Jerez, J.J. and Hernandez-Herrero, M.** (2003) Monitoring volatile and nonvolatile amines in dried and salted roes of tuna (*Thunnus thynnus L.*) during manufacture and storage. *Journal of Food Protection* **66**, 335-340.
- Peterson, M.E., Pelroy, G.A., Paranjpye, R., Poysky, F.T., Almond, J.S. and Eklund, M.W.** (1993) Parameters for control of *Listeria monocytogenes* in smoked fishery products : sodium chloride and packaging method. *Journal of Food Protection* **56**, 938-943.
- Phan, A.P., Ngo, T.T. and Lenhoff, H.M.** (1983) Tyrosine decarboxylase. Spectrophotometric assay and application in determining pyridoxal-5'-phosphate. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **8**, 127-133.
- Pilet, M.F., Dousset, X., Barré, R., Novel, G., Desmazeaud, M. and Piard, J.C.** (1995) Evidence for two bacteriocins produced by *Carnobacterium piscicola* and *Carnobacterium divergens* isolated from fish and active against *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection* **58**, 256-262.

## Q

- Quadri, L.E.N., Sailers, M., Roy, K.L., Vederas, J.C. and Stiles, M.E.** (1994) Chemical and genetic characterization of bacteriocins produced by *Carnobacterium piscicola* LV17B. *The Journal of Biological Chemistry* **269**, 12204-12211.
- Quillardet, P.** (1988) Eléments théoriques sur la pratique de la mutagenèse *in vivo*. In Mutagenèses et Protéines. Editions Herman.

## R

- Rachman, C., Kabadjova, P., Valcheva, R., Prevost, H. and Dousset, X.** (2004) Identification of *Carnobacterium* Species by Restriction Fragment Length Polymorphism of the 16S-23S rRNA Gene Intergenic Spacer Region and Species-Specific PCR. *Applied and Environmental Microbiology* **70**, 4468-4477.
- Rasch, M., and Knochel, S.** (1998) Variations in tolerance of *Listeria monocytogenes* to nisin, pediocin PA- 1 and bavaricin A. *Letters in Applied Microbiology* **27**, 275-278.
- Recsei, P.A., Moore, W.M. and Snell, E.E.** (1983) Pyruvoyl-dependent histidine decarboxylases from *Clostridium perfringens* and *Lactobacillus buchneri*. Comparative structures and properties. *The Journal of Biological Chemistry* **258**, 439-444.
- Règlement 258/97/CE** (1997) « nouveaux aliments et nouveaux ingrédients alimentaires ».



- Renault, P., Barrière, C., Guédon, E., Delorme, C., et Ehrlich, D.** (2004) Des profils d'expression pour une évaluation du risque des bactéries lactiques génétiquement modifiées en alimentation. 13<sup>ème</sup> Colloque du Club des Bactéries Lactiques, Nantes, les 8, 9 et 10 septembre 2004.
- Ribeiro Neunlist, M., Ralazamahaleo, M., Cappelier, J.M., Besnard, V., Federighi, M. and Leroi, F.** (2005) Effect of salting and cold-smoking process on the culturability, viability, and virulence of *Listeria monocytogenes* strain Scott A. *Journal of Food Protection* **68**, 85-91.
- Rice, S.L., and Koehler, P.E.** (1976) Tyrosine and histidine decarboxylase activities of *Pediococcus cerevisiae* and *Lactobacillus* species and the production of tyramine in fermented sausages. *Journal of Milk and Food Technology* **39**, 166-169.
- Richard, C., Canon, R., Naghmouchi, K., Bertrand, D., Prévost, H. and Drider, D.** (2005) Evidence on correlation between number of disulfide bridge and toxicity of class IIa bacteriocins. *Food Microbiology*, *in press*.
- Ringo, E., and Gatesoupe, F.J.** (1998) Lactic acid bacteria in fish : a review. *Aquaculture* **160**, 177-203.
- Ringo, E., Bendiksen, H.R., Wesmajervi, M.S., Olsen, R.E., Jansen, P.A. and Mikkelsen, H.** (2000) Lactic acid bacteria associated with the digestive tract of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Journal of Applied Microbiology* **89**, 317-322.
- Ringo, E., and Holzappel, W.** (2000) Identification and characterization of carnobacteria associated with the gills of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Systematic and Applied Microbiology* **23**, 523-527.
- Ritz, M., Jugiau, F., Rama, F., Courcoux, P., Semenou, M. and Federighi, M.** (2000) Inactivation of *Listeria monocytogenes* by high hydrostatic pressure : effects and interactions of treatment variables studied by analysis of variance. *Food Microbiology* **17**, 375-382.
- Robertson, P.A.W., O'Dowd, C., Burrells, C., Williams, P. and Austin, B.** (2000) Use of *Carnobacterium* sp. as a probiotic for Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *Aquaculture* **185**, 235-243.
- Rodgers, S.** (2001) Preserving non-fermented refrigerated foods with microbial cultures - a review. *Trends in Food Science & Technology* **12**, 276-284.
- Rorvik, L.M., Caugant, D.A. and Yndestad, M.** (1995) Contamination pattern of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* spp. in a salmon slaughterhouse and smoked salmon processing plant. *International Journal of Food Microbiology* **25**, 19-27.
- Rorvik, L.M., Skjerve, E., Knudsen, B.R. and Yndestad, M.** (1997) Risk factors for contamination of smoked salmon with *Listeria monocytogenes* during processing. *International Journal of Food Microbiology* **37**, 215-219.

- Rorvik, L.M.** (2000) *Listeria monocytogenes* in the smoked salmon industry. *International Journal of Food Microbiology* **62**, 183-190.
- Rorvik, L.M., Aase, B., Alvestad, T. and Caugant, D.A.** (2000) Molecular epidemiological survey of *Listeria monocytogenes* in seafoods and seafood-processing plants. *Applied and Environmental Microbiology* **66**, 4779-4784.
- Ross, R.P., Morgan, S. and Hill, C.** (2002) Preservation and fermentation : past, present and future. *International Journal of Food Microbiology* **79**, 3-16.
- Ruiz-Capillas, C., and Moral, A.** (2001) Formation of biogenic amines in bulk-stored chilled hake (*Merluccius merluccius* L.) packed under atmospheres. *Journal of Food Protection* **64**, 1045-1050.

## S

- Sabo, D.L., Boeker, E.A., Byers, B., Waron, H. et Fisher, E.H.** (1974) Purification and physical properties of inducible *Escherichia coli* lysine decarboxylase. *Biochemistry*. **13**, 662-670.
- Sakala, R.M., Hayashidani, H., Kato, Y., Hirata, T., Makino, Y., Fukushima, A., Yamada, T., Kaneuchi, C. and Ogawa, M.** (2002) Change in the composition of the microflora on vacuum-packaged beef during chiller storage. *International Journal of Food Microbiology* **74**, 87-99.
- SANCO/4198/2001 Rev. 14** (2004) Working document of the Commission of the European Communities, Draft Commission Regulation on microbiological criteria for foodstuffs, 10 décembre 2004, Brussels.
- Santos, M.H.S.** (1996) Biogenic amines : their importance in foods. *International Journal of Food Microbiology* **29**, 213-231.
- Savvaidis, I.N., Skandamis, P., Riganakos, K.A., Panagiotakis, N. and Kontominas, M.G.** (2002) Control of natural microbial flora and *Listeria monocytogenes* in vacuum-packaged trout at 4 and 10 degrees C using irradiation. *Journal of Food Protection* **65**, 515-522.
- Schillinger, U., Kaya, M. and Lucke, F.K.** (1991) Behaviour of *Listeria monocytogenes* in meat and its control by a bacteriocin-producing strain of *Lactobacillus sakei*. *Journal of Applied Bacteriology* **70**, 473-478.
- Schillinger, U., Stiles, M.E. and Holzapfel, W.H.** (1993) Bacteriocin production by *Carnobacterium piscicola* LV 61. *International Journal of Food Microbiology* **20**, 131-147.
- Schillinger, U., Chung, H.S., Keppler, K. and Holzapfel, W.H.** (1998) Use of bacteriocinogenic lactic acid bacteria to inhibit spontaneous nisin-resistant mutants of *Listeria monocytogenes* Scott A. *Journal of Applied Microbiology* **85**, 657-663.

- Schillinger, U., Becker, B., Vignolo, G. and Holzapfel, W.H.** (2001) Efficacy of nisin in combination with protective cultures against *Listeria monocytogenes* Scott A in tofu. *International Journal of Food Microbiology* **71**, 159-168.
- Schobitz, R., Suazo, V., Costa, M. and Ciampi, L.** (2003) Effects of a bacteriocin-like inhibitory substance from *Carnobacterium piscicola* against human and salmon isolates of *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology* **84**, 237-244.
- SECODIP/OFIMER** (2003) Le marché français des produits de la pêche et de l'aquaculture, la consommation. <http://www.ofimer.fr>
- Smith, T.A.** (1981) Amines in food. *Food Chemistry* **6**, 169-200.
- Stoffels, G., Nes, I.F. and Guthmundsdottir, A.** (1992) Isolation and properties of a bacteriocin-producing *Carnobacterium piscicola* isolated from fish. *Journal of Applied Bacteriology* **73**, 309-316.
- Stohr, V., Joffraud, J.J., Cardinal, M. and Leroi, F.** (2001) Spoilage potential and sensory profile associated with bacteria isolated from cold-smoked salmon. *Food Research International* **34**, 797-806.
- Stratton, J.E., Hutkins, R.W. and Taylor, S.L.** (1991) Biogenic amines in cheese and other fermented foods : a review. *Journal of Food Protection* **54**, 460-470.
- Sumner, S.S., Speckhard, M.W., Somers, E.B. and Taylor, S.L.** (1985) Isolation of histamine producing *Lactobacillus buchneri* from cheese implicated in a food poisoning outbreak. *Applied and Environmental Microbiology* **50**, 1094-1096.
- Sumner J., and Ross T.** (2002) A semi-quantitative seafood safety risk assessment. *International Journal of Food Microbiology* **77**, 55-59.
- Suzzi, G., and Gardini, F.** (2003) Biogenic amines in dry fermented sausages : a review. *International Journal of Food Microbiology* **88**, 41-54.
- Szabo, E.A., and Cahill, M.E.** (1998) The combined effects of modified atmosphere, temperature, nisin and ALTA 2341 on the growth of *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology* **43**, 21-31.
- Szabo, E.A., and Cahill, M.E.** (1999) Nisin and ALTA 2341 inhibit the growth of *Listeria monocytogenes* on smoked salmon packaged under vacuum or 100% CO<sub>2</sub>. *Letters in Applied Microbiology* **28**, 373-377.

## T

- Tabor, C.W., and Tabor, H.** (1985) Polyamines in microorganisms. *Microbiological Reviews* **49**, 81-99.

- Tahiri, I., Desbiens, M., Benech, R., Kheadr, E., Lacroix, C., Thibault, S., Ouellet, D. and Fliss, I.** (2004) Purification, characterization and amino acid sequencing of divergicin M35: a novel class IIa bacteriocin produced by *Carnobacterium divergens* M35. *International Journal of Food Microbiology* **97**, 123-136.
- Taillefer, F.** (2003) Dossier produits festifs. *Linéaires*, Octobre, **185**, 58-76.
- Taylor, S.L.** (1986) Histamine food poisoning : toxicology and clinical aspects. *Critical Reviews in Toxicology* **17**, 91-128.
- ten Brink, B., Damink, C., Joosten, H.M. and Huis in 't Veld, J.H.** (1990) Occurrence and formation of biologically active amines in foods. *International Journal of Food Microbiology* **11**, 73-84.
- Thimothe, J., Nightingale, K.K., Gall, K., Scott, V.N. and Wiedmann, M.** (2004) Tracking of *Listeria monocytogenes* in smoked fish processing plants. *Journal of Food Protection* **67**, 328-341.
- Thomas, L.V., and Wimpenny, J.W.** (1996) Investigation of the effect of combined variations in temperature, pH, and NaCl concentration on nisin inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*. *Applied and Environmental Microbiology* **62**, 2006-2012.
- Thurette, J., Membre, J.M., Han ching, L., Tailliez, R. and Catteau, M.** (1998) Behavior of *Listeria* spp. in smoked fish products affected by liquid smoke, NaCl concentration, and temperature. *Journal of Food Protection* **61**, 1475-1479.
- Truelstrup Hansen, L., Gill, T. and Huss, H.H.** (1995) Effects of salt and storage temperature on chemical, microbiological and sensory changes in cold-smoked salmon. *Food Research International* **28**, 123-130.
- Truelstrup Hansen, L., and Huss, H.H.** (1998) Comparison of the microflora isolated from spoiled cold-smoked salmon from three smokehouses. *Food Research International* **31**, 703-711.
- Truelstrup Hansen, L., Rontved, S.D. and Henrik Huss, H.** (1998) Microbiological quality and shelf life of cold-smoked salmon from three different processing plants. *Food Microbiology* **15**, 137-150.
- Tsai, Y.H., Kung, H.F., Lee, T.M., Lin, G.T. and Hwang, D.F.** (2004) Histamine-related hygienic qualities and bacteria found in popular commercial scombroid fish fillets in Taiwan. *Journal of Food Protection* **67**, 407-412.

## U

- UBIFRANCE/OFIMER** (2004) Le marché du saumon et de la truite fumés en Europe occidentale, synthèse et conclusion de l'étude. <http://www.ofimer.fr>

## V

- Veciana-Nogués, M.T., Mariné-Font, A. and Vidal-Carou, M.C.** (1997) Biogenics amines as hygienic quality indicators of tuna. Relationships with microbial counts, ATP-related compounds, volatile amines, and organoleptic changes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **45**, 2036-2041.
- Vescovo, M., Torriani, S., Orsi, C., Macchiarolo, F. and Scolari, G.** (1996) Application of antimicrobial-producing lactic acid bacteria to control pathogens in ready-to-use vegetables. *Journal of Applied Bacteriology* **81**, 113-119.
- Vogel, B.F., Huss, H.H., Ojeniyi, B., Ahrens, P. and Gram, L.** (2001a) Elucidation of *Listeria monocytogenes* contamination routes in cold-smoked salmon processing plants detected by DNA-based typing methods. *Applied and Environmental Microbiology* **67**, 2586-2595.
- Vogel, B.F., Jorgensen, L.V., Ojeniyi, B., Huss, H.H. and Gram, L.** (2001b) Diversity of *Listeria monocytogenes* isolates from cold-smoked salmon produced in different smokehouses as assessed by Random Amplified Polymorphic DNA analyses. *International Journal of Food Microbiology* **65**, 83-92.

## W

- Wessels, S., and Huss, H.H.** (1996) Suitability of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 as a protective culture for lightly preserved fish products. *Food Microbiology* **13**, 323-332.
- Wessels, S., Axelsson, L., Hansen, E.B., De Vuyst, L., Laulund, S., Lahteenmaki, L., Lindgren, S., Mollet, B., Salminen, S. and von Wright, A.** (2004) The lactic acid bacteria, the food chain, and their regulation. *Trends in Food Science & Technology* **15**, 498-505.
- Wilderdyke, M.R., Smith, D.A. and Brashears, M.M.** (2004) Isolation, identification, and selection of lactic acid bacteria from alfalfa sprouts for competitive inhibition of foodborne pathogens. *Journal of Food Protection* **67**, 947-951.
- Working document of the European Commission.** On a generic approach to the safety assessment of micro-organisms used in feed/food and feed/food production. Disponible sur : [http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scf/out178\\_en.pdf](http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scf/out178_en.pdf) (consulté le 22 mars 2005).
- Worobo, R.W., Henkel, T., Sailer, M., Roy, K.L., Vederas, J.C. and Stiles, M.E.** (1994) Characteristics and genetic determinant of a hydrophobic peptide bacteriocin, carnobacteriocin A, produced by *Carnobacterium piscicola* LV17A. *Microbiology* **140**, 517-526.

**Worobo, R.W., Van Belkum, M.J., Sailer, M., Roy, K.L., Vederas, J.C. and Stiles, M.E.** (1995) A signal peptide secretion-dependent bacteriocin from *Carnobacterium divergens*. *Journal of Bacteriology* **177**, 3143-3149.

## Y

**Yamazaki, K., Suzuki, M., Kawai, Y., Inoue, N. and Montville, T.J.** (2003) Inhibition of *Listeria monocytogenes* in cold-smoked salmon by *Carnobacterium piscicola* CS526 isolated from frozen surimi. *Journal of Food Protection* **66**, 1420-1425.

**Yamazaki, K., Suzuki, M., Kawai, Y., Inoue, N. and Montville, T.J.** (2005) Purification and characterization of a novel class IIa bacteriocin, pisciocin CS526, from surimi-associated *Carnobacterium piscicola* CS526. *Applied and Environmental Microbiology* **71**, 554-557.

**Yoon, K.S., Burnette, C.N., Abou-Zeid, K.A. and Whiting, R.C.** (2004) Control of growth and survival of *Listeria monocytogenes* on smoked salmon by combined potassium lactate and sodium diacetate and freezing stress during refrigeration and frozen storage. *Journal of Food Protection* **67**, 2465-2471.

# ANNEXES

- BRILLET A., PILET M-F., DRIDER D., et PREVOST H. (2005) **La biopréservation : une technologie innovante de conservation des aliments.** *Revue Générale du Froid*, mai 2005, **1053** : 32-35

- RICHARD C., LEROI F., BRILLET A., RACHMAN C., CONNIL N., DRIDER D., PILET M-F., ONNO B., DOUSSET X., PREVOST H. (2004) **Maîtrise du développement de *Listeria monocytogenes* dans le saumon fumé : intérêt de la biopréservation par des bactéries lactiques.** *Le Lait, Dairy Science and Technology*, **84** : 135-144

- PREVOST H., BRILLET A. et PILET M-F. **La biopréservation des aliments, intérêts et enjeux.** AGORAL, 16<sup>e</sup> Rencontres scientifiques et technologiques des Industries Alimentaires, Nantes, 30 novembre et 1<sup>er</sup> décembre 2004.

## Froid et denrées périssables

# La biopréservation : une technologie innovante de conservation des aliments

par Anne Brillet\*, Marie France Pilet\*, Djamel Drider\* et Hervé Prévost\*

**Cet article présente  
l'intérêt de la  
biopréservation  
pour la conservation  
des aliments et  
les recherches  
qui sont  
actuellement  
effectuées sur  
ce sujet.**

## Le concept de biopréservation

La biopréservation a pour objectifs d'augmenter la durée de vie microbiologique d'un aliment en utilisant des cultures de microorganismes protecteurs (MP) à croissance rapide dans les conditions de production et de conservation du produit et en utilisant les substances anti-microbiennes produites par ces microorganismes.

Il est possible de distinguer deux domaines d'application du concept de biopréservation des aliments. Le premier concerne les produits fermentés traditionnels (boissons fermentées, fromages, beurre, fruits et végétaux fermentés, viandes, saucissons, etc.). Dans ces produits, l'activité dominante des

microorganismes est une fermentation qui entraîne une modification considérable des caractéristiques organoleptiques des produits tout en préservant les propriétés nutritionnelles et hygiéniques de la matière première. Par exemple, on peut ainsi considérer la fabrication d'un fromage comme un procédé de biopréservation du lait.

Le second domaine d'application de la biopréservation concerne les produits non fermentés réfrigérés. En effet, la gamme des produits prêts à consommer et dont la durée de vie permet une souplesse d'utilisation par rapport à celle des produits frais s'élargit rapidement. Il s'agit notamment de produits frais comme

\* Enitiaa, Laboratoire de Microbiologie Alimentaire et Industrielle, 44322 Nantes.

### Résumé

La biopréservation correspond à l'utilisation de microorganismes afin de prolonger la durée de vie microbiologique et la sécurité d'un aliment sans utilisation de traitement thermique ni de conservateur et en préservant ses propriétés organoleptiques. Les bactéries lactiques présentent un important potentiel de développement dans les procédés de biopréservation car elles sont réputées sûres pour le consommateur et dominent naturellement la flore de nombreux aliments. Dans cet article sont présentés différents aspects du développement récent du concept de biopréservation appliqué aux produits non fermentés réfrigérés prêts à consommer, notamment la viande et les poissons conservés réfrigérés sous vide ou sous atmosphère contrôlée.

### Abstract

*Biopreservation refers to the use of microorganisms to extend storage life, to enhance safety of foods without thermal treatment or chemical conservatives and to preserve organoleptic qualities. Lactic acid bacteria have a major potential for the use in biopreservation because they are safe for the consumer and they naturally dominate the microflora of many foods. This paper reviews different aspects in the development of biopreservation applications in the field of non-fermented refrigerated ready-to-eat fish and meat including vacuum and modified atmosphere packed products.*



## Froid et denrées périssables

des découpes de viande, des filets de poisson conservés sous vide ou sous atmosphère modifiée, des produits légèrement préservés par salage, fumage, marinades ou encore des crustacés cuits, tels que les crevettes décortiquées. L'utilisation de conservateurs chimiques est très réglementée et peu compatible avec l'image d'aliments frais et sains véhiculée par ces produits. De plus, les traitements de salage et de fumage appliqués à certains de ces produits sont de plus en plus allégés, pour répondre aux préférences des consommateurs [1].

Dans ces conditions, la réfrigération et la réduction de la teneur en oxygène sont souvent les seuls facteurs de contrôle du développement des microorganismes ce qui peut donner un avantage sélectif à certaines bactéries pathogènes comme *Listeria monocytogenes* et *Clostridium botulinum* [2]. Dans la suite de cet article, seules les applications dans le domaine des produits réfrigérés seront abordées. Les conditions de conditionnement sous vide ou en présence de CO<sub>2</sub> des viandes ou des poissons stockés réfrigérés orientent l'écosystème microbien de telle sorte que les bactéries lactiques deviennent rapidement la flore dominante [3, 4]. Le développement de ces bactéries lactiques (BL) peut constituer un effet protecteur vis-à-vis des flores pathogènes ou d'altération et contribue à l'amélioration de la conservation du produit. Ces aliments peuvent être reformulés et les paramètres du procédé de fabrication redéfinis afin d'augmenter la croissance de ces BL. Cependant, comme pour la fermentation, l'ajout de cultures sélectionnées de BL directement dans le produit offre un meilleur contrôle du procédé [5].

### Sélection des microorganismes protecteurs

Il s'agit principalement de bactéries lactiques qui peuvent être des souches naturellement présentes dans le produit considéré ou isolées d'une grande variété d'écosystèmes végétaux et animaux. Les critères de sélection de ces bactéries sont leur aptitude à croître à température réfrigérée et à inhiber les microorganismes pathogènes ou d'altération sans modifier la qualité organoleptique des produits. Les BL répondant à ces critères

appartiennent généralement aux genres *Carnobacterium*, *Lactobacillus* et *Leuconostoc*. Les techniques d'identification moléculaire des BL permettent d'assurer leur traçabilité dans l'aliment à biopréserver. Des méthodes de réaction de polymérisation en chaîne (PCR) multiples ont notamment été utilisées pour distinguer les souches inoculées des autres souches de la même espèce participant à la flore indigène du produit [6].

### Efficacité et nature de l'inhibition

Les bactéries lactiques exercent un rôle de compétition et d'inhibition des flores endogènes du fait de leur capacité d'adaptation aux conditions nutritionnelles et physico-chimiques des produits, et du fait de leur aptitude à synthétiser différentes substances inhibitrices. En effet, la production d'acide lactique, et d'autres métabolites de faible poids moléculaire (bactériocines, peroxyde d'hydrogène, alcools, CO<sub>2</sub>, diacétyle, etc.), limite le développement d'autres microorganismes.

Les bactériocines sont de petits peptides, généralement bactéricides pour d'autres bactéries, qui ont une activité inhibitrice très élevée et n'affectent pas les qualités sensorielles du produit. Certaines bactériocines produisent des pores dans la membrane bactérienne ce qui cause la fuite des composés cellulaires essentiels (acides aminés, adénosine tri-phosphate) et provoque la mort de la cellule [7]. Différents mécanismes d'inhibition peuvent être observés chez une même espèce. C'est le cas pour *Carnobacterium piscicola* dont l'inhibition de *Listeria monocytogenes* résulte, pour une souche, de la production d'une bactériocine et, pour une autre, d'une compétition nutritionnelle [8]. Dans les produits non fermentés et réfrigérés, ces différentes capacités d'inhibition sont mises à profit pour développer un système de biopréservation et peuvent agir en synergie.

### Quelques exemples d'applications

De nombreux travaux sont consacrés à l'utilisation de microorganismes producteurs ou non de bactériocine pour inhiber les flores pathogènes et d'altération dans

les aliments [5]. Les cellules cibles sont majoritairement des bactéries à Gram positif et les travaux concernant l'inhibition de *Listeria monocytogenes* sont les plus répandus [9]. Des souches de *Lactobacillus* ont été appliquées pour la biopréservation des produits carnés [10], et des souches de *Carnobacterium* ont été utilisées pour le poisson (tableau I). Ainsi, dans notre laboratoire, une souche de *Carnobacterium divergens* produisant une bactériocine, la divercine V41 [11] a été utilisée avec succès pour inhiber *Listeria monocytogenes* dans le saumon fumé (figure 1), tout en préservant les qualités organoleptiques de ce produit après 28 jours de conservation au froid [12, 13]. L'utilisation directe de bactériocines dans les aliments a également été envisagée comme additif alimentaire mais semble moins efficace que l'application des souches productrices [14, 15]. La nisine est actuellement la seule bactériocine produite par une bactérie lactique (*Lactococcus lactis*) qui est autorisée dans 45 pays et notamment dans l'Union Européenne comme additif alimentaire (directive 95/2/EC, additifs alimentaires autres que colorants et édulcorants).

### Réglementation et innocuité des microorganismes protecteurs

Dans le cadre du développement d'un nouveau procédé de biopréservation d'un produit alimentaire, l'efficacité et l'innocuité pour le consommateur du microorganisme protecteur doivent être démontrées et l'utilisation autorisée par l'autorité gestionnaire du risque (Direction générale de la consommation et de la répression des fraudes, DGCCRF, et Direction des services vétérinaires, DSV). Cette autorisation est nécessaire pour des souches nouvelles ou des applications non traditionnelles de souches déjà utilisées, à l'exception des microorganismes qui n'ont pas été utilisés à un niveau significatif dans des préparations pour l'alimentation humaine.

Ces derniers sont couverts par le règlement européen 258/97/CE « nouveaux aliments et nouveaux ingrédients alimentaires ». Les microorganismes utilisés dans l'alimentation animale et la protection des plantes sont sujets à une évaluation

## Froid et denrées périssables

tion stricte de leur sécurité pour être autorisés (directive 93/113/EC et directive 2001/36/EC).

Il est très surprenant de constater qu'il n'existe pas de cadre réglementaire national ou européen pour les microorganismes utilisés pour l'alimentation humaine. Il n'existe pas non plus de liste de microorganismes autorisés en Europe en alimentation humaine. Actuellement la commission européenne explore la possibilité d'introduire un système similaire au concept « GRAS », (Generally recognised as safe) utilisé aux Etats-Unis. La proposition vise à définir une méthodologie de qualification de sécurité présumée des microorganismes pour l'alimentation humaine. Dans cette méthodologie, il est prévu d'identifier chez les microorganismes, par exemple, la présence de résistance aux antibiotiques, de facteurs de virulence ou de production de toxine. En France, l'AFSSA (Agence française de sécurité sanitaire des aliments) a émis un avis concernant les « recommandations pour la présentation des données permettant l'évaluation de l'innocuité des microorganismes utilisés dans le secteur agro-alimentaire » [16]. Cet avis est à ce jour le seul document sur lequel peuvent s'appuyer les industriels et l'autorité gestionnaire du risque pour délivrer un agrément d'utilisation. Il est maintenant probable que la réglementation européenne régulant l'utilisation de souches de microorganismes dans l'alimentation humaine évoluera vers celle en vigueur pour l'alimentation des animaux. Ceci nécessitera, de la part des industriels producteurs et utilisateurs de microorganismes

**Tableau I. Exemples de souches bioprotectrices utilisées pour contrôler la croissance de *Listeria monocytogenes* dans les viandes et les poissons emballés sous vide ou sous atmosphère modifiée**

Produits	Souches bioprotectrices	Références
<b>Viandes</b> viande de porc	<i>Lactobacillus sakei</i>	[17]
<b>Viandes emballées sous vide</b> cubes de boeuf saucisse de Frankfort découpes de poulet	<i>Lactobacillus bavaricus</i> <i>Pediococcus acidilactici</i> <i>Lactobacillus sakei</i>	[18] [19] [20]
<b>Viande emballée sous atmosphère modifiée</b> saucisse brésilienne cervelas	<i>Lactobacillus sakei</i> <i>Leuconostoc carnosum</i>	[21] [14]
<b>Poissons sous vide</b> saumon fumé	<i>Carnobacterium piscicola</i> <i>Carnobacterium divergens</i>	[8], [22] [12]

pour l'alimentation humaine, des études pour en démontrer l'innocuité.

### Conclusion

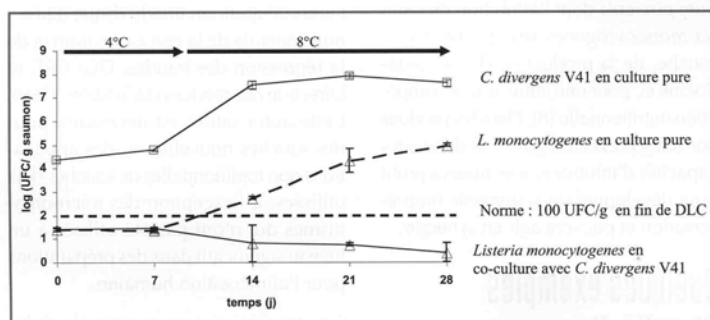
Les principaux problèmes à résoudre dans le domaine de la conservation des aliments ne sont pas nouveaux. Il s'agit de réduire les risques d'altération et de toxi-infections alimentaires. L'industrialisation, l'évolution des habitudes alimentaires et du contexte réglementaire ont généré une nouvelle version de ces problèmes qui nécessite de mettre en place des solutions innovantes. Le marché des viandes et des produits de la mer conditionnés sous atmosphère contrôlée continu à se développer.

La conservation réfrigérée assez longue (jusqu'à 4 semaines) associée au fait que ces produits peuvent être consommés crus, engendre un risque sanitaire lié à une contamination possible par des germes pathogènes psychrotrophes

comme *Listeria monocytogenes*. La biopréservation utilisant les cultures de microorganismes protecteurs (MP) apparaît comme une stratégie innovante pour garantir au consommateur des produits prêts à consommer sains et sûrs. La durée de vie microbiologique des produits est allongée sans ajout de conservateur.

Le système d'inhibition dépend de la température. Ainsi, la croissance des MP et donc l'effet protecteur s'activent en cas de rupture de la chaîne du froid. Les limitations de l'utilisation des MP sont : leur spectre d'action qui peut être réduit, le développement possible de résistance chez les microorganismes cibles et l'incapacité pour la plupart des systèmes à inhiber les bactéries à Gram négatif (*Escherichia coli*, *Salmonella*).

Le développement d'un procédé de biopréservation est un processus complexe. L'inhibition dépendra notamment de la vitesse de croissance des MP, qui est déterminée principalement par les paramètres intrinsèques de l'aliment. Les premiers produits de la mer biopréservés conditionnés sous atmosphère contrôlée sont commercialisés depuis deux ans en France. Il s'agit par exemple de crevettes cuites décortiquées (Société MITI) biopréservées par le ferment LLO de la société Biocéane (brevet déposé). Pour ce produit, la date limite de consommation est doublée grâce à la biopréservation (10 jours au lieu de 5). Ces premières réalisations laissent espérer un développement industriel et commercial pour ces produits frais biopréservés.



**Figure 1.** Inhibition de *Listeria monocytogenes* dans le saumon fumé emballé sous vide et conservé à 4 et 8°C pendant 28 jours (d'après Brillat et al. [12])

Croissance de souches de *Listeria monocytogenes* (triangles) en co-culture avec *Carnobacterium divergens* V41 (carrés) sur du saumon fumé stérile (stockage des échantillons de saumon : 1/3 temps à 4°C, 2/3 du temps à 8°C et rupture 2h à 20°C au bout de 2/3 du temps).

## Froid et denrées périssables

### Remerciements

Les recherches concernant la biopréservation au Laboratoire de Microbiologie Alimentaire et Industrielle de l'Enitiaa sont réalisées en partie en

collaboration avec l'Ifrémer et soutenues par la région des Pays de la Loire et l'Union Européenne (projet intégré SEAFOODplus). Anne Brilllet réalise une thèse de doctorat avec le soutien

financier du conseil scientifique de l'Enitiaa et de la CITPPM (Confédération des industries de traitement des produits des pêches maritimes) que nous remercions. ■

### Bibliographie

- Leroi F., 2002, La microbiologie du saumon fumé à froid : aspects hygiéniques et qualité, *Revue Générale du Froid*, n° 1028, p. 35-40.
- Heinitz M. L., Johnson J. M., 1998, The incidence of *Listeria* spp., *Salmonella* spp., and *Clostridium botulinum* in smoked fish and shellfish, *Journal of Food Protection*, 61: 318-323.
- Leroi F., Joffraud J. J., Chevalier F., Cardinal M., 1998, Study of the microbial ecology of cold-smoked salmon during storage at 8 degrees C, *International Journal of Food Microbiology*, 39: 111-121.
- Nissen H., Sørheim O., Dainty R. H., 1996, Effects of vacuum, modified atmospheres and storage temperature on the microbial flora of packaged beef, *Food Microbiology*, 13: 183-191.
- Rodgers S., 2001, Preserving non-fermented refrigerated foods with microbial cultures—a review, *Trends in Food Science & Technology*, 12: 276-284.
- Connil N., Prevost H., Dousset X., 2002, Production of biogenic amines and divercin V41 in cold smoked salmon inoculated with *Carnobacterium divergens* V41, and specific detection of this strain by multiplex-PCR, *Journal of Applied Microbiology*, 92: 611-617.
- Ennahar S., Sashihara T., Sonomoto K., Ishizaki A., 2000, Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity, *FEMS Microbiology Review*, 24: 85-106.
- Nilsson L., Gram L., Huss H. H., 1999, Growth control of *Listeria monocytogenes* on cold-smoked salmon using a competitive lactic acid bacteria flora, *Journal of Food Protection*, 62: 336-342.
- Stiles M. E., 1996, Biopreservation by lactic acid bacteria, *Antonie Van Leeuwenhoek*, 70: 331-345.
- Hugas M., 1998, Bacteriocinogenic Lactic Acid Bacteria for the Biopreservation of Meat and Meat Products, *Meat Science*, 49: S139-S150.
- Pilet M. F., Dousset X., Barré R., Novel G., Desmazeaud M., Piard J. C., 1995, Evidence for two bacteriocins produced by *Carnobacterium piscicola* and *Carnobacterium divergens* isolated from fish and active against *Listeria monocytogenes*, *Journal of Food Protection*, 58: 256-262.
- Brillet A., Pilet M. F., Prevost H., Bouttefroy A., Leroi F., 2004, Biodiversity of *Listeria monocytogenes* sensitivity to bacteriocin-producing *Carnobacterium* strains and application in sterile cold-smoked salmon, *Journal of Applied Microbiology*, 97: 1029-1037.
- Brillet A., Pilet M. F., Prevost H., Leroi F., 2004, Effet de l'ensemencement de différentes souches de *Carnobacterium* sur les caractéristiques organoleptiques et les flores endogènes du saumon fumé, VI<sup>e</sup> Congrès national de la Société française de microbiologie, Bordeaux, 10-12 mai 2004.
- Jacobsen T., Budde B. B., Koch A. G., 2003, Application of *Leuconostoc carnosum* for biopreservation of cooked meat products, *Journal of Applied Microbiology*, 95: 242-249.
- Duffes F., Corre C., Leroi F., Dousset X., Boyaval P., 1999, Inhibition of *Listeria monocytogenes* by in situ produced and semipurified bacteriocins of *Carnobacterium* spp. on vacuum-packed, refrigerated cold-smoked salmon, *Journal of Food Protection*, 62: 1394-1403.
- AFSSA, Recommandations du 22 novembre 2002 « Recommandations pour la présentation des données permettant l'évaluation de l'innocuité des microorganismes utilisés dans le secteur agro-alimentaire (souches nouvelles ou modifiées, application différente de souches déjà utilisées) » [www.afssa.fr](http://www.afssa.fr).
- Schillinger U., Kaya M., Lucke F. K., 1991, Behavior of *Listeria monocytogenes* in meat and its control by a bacteriocin-producing strain of *Lactobacillus sakei*, *Journal of Applied Bacteriology*, 70: 473-478.
- Winkowski K., Crandall A., Montville T. J., 1993, Inhibition of *Listeria monocytogenes* by *Lactobacillus bavaricus* MN in beef systems at refrigeration temperatures, *Applied and Environmental Microbiology*, 59: 2552-2557.
- Berry E. D., Hutkins R. W., Mandigo R. W., 1991, The use of bacteriocin-producing *Pedococcus acidilactici* to control postprocessing *Listeria monocytogenes* contamination of frankfurters, *Journal of Food Protection*, 54: 681-686.
- Katla T., Moretro T., Svein I., Aasen I. M., Axelsson L., Rorvik L. M., Naterstad K., 2002, Inhibition of *Listeria monocytogenes* in chicken cold cuts by addition of sakacin P and sakacin P-producing *Lactobacillus sakei*, *Journal of Applied Microbiology*, 93: 191-196.
- Liserre A. M., Landgraf M., Destro M. T., M. F. B. D. G., 2002, Inhibition of *Listeria monocytogenes* by a bacteriocinogenic *Lactobacillus sakei* strain in modified atmosphere-packaged Brazilian sausage, *Meat Science*, 61: 449-455.
- Yamazaki K., Suzuki M., Kawai Y., Inoue N., Montville T. J., 2003, Inhibition of *Listeria monocytogenes* in cold-smoked salmon by *Carnobacterium piscicola* CS526 isolated from frozen surimi, *Journal of Food Protection*, 66: 1420-1425.

## Maîtrise du développement de *Listeria monocytogenes* dans le saumon fumé : intérêt de la biopréservation par des bactéries lactiques

Christelle RICHARD<sup>a</sup>, Françoise LEROI<sup>b</sup>, Anne BRILLET<sup>a</sup>, Cinta RACHMAN<sup>a</sup>,  
Nathalie CONNIL<sup>a</sup>, Djamel DRIDER<sup>a</sup>, Marie France PILET<sup>a</sup>, Bernard ONNO<sup>a</sup>,  
Xavier DOUSSET<sup>a</sup>, Hervé PREVOST<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup> Unité de Recherche Qualité Microbiologique et Aromatique des Aliments, ENITIAA,  
rue de la Géraudière, BP 82225, 44322 Nantes Cedex 3, France

<sup>b</sup> Laboratoire de Génie Alimentaire, IFREMER, rue de l'Île d'Yeu, BP 21105, 44311 Nantes Cedex 3, France

Published online 13 November 2003

**Abstract – Control development of *Listeria monocytogenes* in smoked salmon: interest of the biopreservation by lactic bacteria.** The interest of biopreservation using lactic bacteria to improve the food security of smoked salmon was evaluated. Cold smoked salmon is a non-stable microbiological product whose physicochemical characteristics allow the development of *Listeria monocytogenes* which constitutes the major microbiological risk depending on the consumption of this product. Biodiversity of the microflora of smoked salmon and its evolution during conservation, the origin of the contamination by *Listeria* and its consequences, and the parameters of the manufacturing process allowing a better control of microbiological quality are discussed. The innovating concept of biopreservation of smoked salmon is developed. It consists of an inoculation of salmon by a competitive lactic flora able to inhibit *Listeria monocytogenes* during storage. The selected strains are *Carnobacterium* which do not have any influence on sensory qualities of smoked salmon, nor any effect on the concentration of biogenic amines in the finished product.

**Cold smoked salmon / lactic acid bacteria / biopreservation / *Listeria* / *Carnobacterium***

**Résumé – L'intérêt de la biopréservation utilisant des bactéries lactiques pour améliorer la sécurité sanitaire du saumon fumé est présenté.** Le saumon fumé à froid est un produit microbiologiquement fragile dont les caractéristiques physico-chimiques permettent le développement de *Listeria monocytogenes* qui constitue le principal risque microbiologique lié à la consommation de ce produit. La biodiversité de la microflore du saumon fumé et son évolution au cours de la conservation, l'origine de la contamination par *Listeria* et ses conséquences, ainsi que les paramètres du procédé de fabrication permettant une meilleure maîtrise de la qualité microbiologique du procédé sont discutés. Le concept innovant de biopréservation du saumon fumé est développé. Celui-ci repose sur l'ensemencement du saumon fumé par une flore lactique compétitive capable d'inhiber *L. monocytogenes* au cours de la conservation au froid. Les souches sélectionnées appartiennent au genre *Carnobacterium* et n'ont pas d'influence sur les qualités sensorielles du saumon fumé, ni d'effet sur le niveau de concentration en amines biogènes du produit fini.

**Saumon fumé / bactérie lactique / biopréservation / *Listeria* / *Carnobacterium***

\* Auteur correspondant : prevost@enitiaa-nantes.fr

## 1. INTRODUCTION

De nos jours, dans les pays industrialisés, le but du salage et du fumage du saumon n'a plus uniquement pour objectif d'assurer une longue conservation au produit mais aussi de lui conférer les caractéristiques organoleptiques recherchées par les consommateurs. La conservation réfrigérée sous vide assez longue (généralement 4 semaines) associée au fait que le produit est principalement consommé cru engendre un risque sanitaire lié à une contamination possible par des germes psychotrophes pathogènes comme *Listeria monocytogenes*. La maîtrise de la recontamination et du développement de *L. monocytogenes* dans le saumon constitue, pour les industriels de la filière, la problématique centrale en terme d'assurance de la qualité sanitaire de ce produit.

Produit de luxe initialement consommé en période de fête, le saumon fumé est devenu un aliment de consommation courante présent en toutes saisons sur les linéaires. En France, sa consommation a été multipliée par six depuis 1980, pour se stabiliser aux environs de 20 000 tonnes par an, ce qui fait de notre pays le plus gros consommateur mondial [18]. Avec 64 000 tonnes en 1999, la production européenne de saumon fumé représente 80 % du marché mondial. La production française est réalisée par une quarantaine d'opérateurs répartis sur tout le territoire. Six entreprises réalisent à elles seules plus de 80 % de la production française qui se situe au premier rang mondial et s'est stabilisée aux alentours de 20 000 tonnes annuelles pour un chiffre d'affaires d'environ 300 millions d'euros.

## 2. TECHNOLOGIE DE FABRICATION

Les saumons destinés à être fumés proviennent essentiellement d'élevages norvégiens et, dans une moindre mesure, d'élevages irlandais, écossais ou chiliens. Les poissons sont abattus, saignés et éviscérés sur le lieu

d'élevage, puis mis en glace avant d'être transportés en quatre à cinq jours dans les entreprises françaises. Ils sont alors étêtés, découpés en filets, parés avant l'étape de salage. Le procédé de salage au sel sec, qui est le plus utilisé, permet d'atteindre en 2 à 10 h un taux de sel de l'ordre de 2,5 à 3,5 % dans le produit fini. Le séchage a pour but d'éliminer l'eau contenue dans la chair afin d'atteindre une teneur en eau inférieure à 65 % dans le produit. Les filets sont ensuite exposés à la fumée provenant de la combustion, le plus souvent, du hêtre ou du chêne. Dans la plupart des pays d'Europe, le saumon est fumé dans des séchoirs climatisés, à une température comprise entre 20 et 26 °C pendant une durée de 2 à 12 h. Il s'agit du procédé de fumage à froid, par opposition au fumage à chaud (70 °C) pratiqué en Europe du Nord et aux Etats-Unis. Le pH du saumon fumé est de l'ordre de 6,0–6,2 et l'Aw comprise entre 0,96 et 0,99. La majeure partie de la production est commercialisée en bandes ou en tranches emballées sous vide, et stockée à température réfrigérée (2 à 4 °C).

## 3. LA MICROFLORE DU SAUMON FUMÉ

Les bactéries principalement isolées des poissons d'eaux tempérées sont généralement à Gram négatif, appartenant aux genres *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Photobacterium*, *Vibrio*, et *Moraxella*. Le muscle du poisson vivant est stérile. Cependant, au cours des opérations d'éviscération, étêtage, filetage et parage, ces micro-organismes peuvent contaminer la chair. Lors de la transformation et particulièrement au tranchage et au conditionnement, le produit peut être contaminé par des germes de portage humain ou présents dans l'environnement de l'atelier [42].

En sortie d'usine, la contamination des produits peut atteindre  $10^2$  à  $10^6$  UFC·g<sup>-1</sup> avec une prédominance de bactéries à Gram négatif comme *Photobacterium*, *Shewanella*, *Vibrio*, *Serratia*, *Hafnia* mais aussi parfois la présence de *Brochothrix thermosphacta*,

de *Listeria*, de *Staphylococcus*, de *Salmonella* [22] et de bactéries lactiques appartenant aux genres *Carnobacterium* et *Lactobacillus* [20]. Il semble que le niveau de contamination du saumon fumé varie essentiellement selon l'usine considérée [42]. Le procédé de conservation sélectionne des bactéries psychrotrophes se multipliant encore très bien à 4 °C, aérobies ou anaérobies facultatives et supportant bien les concentrations en sel de l'ordre de 3 à 6 %. Dans ces conditions, la flore totale augmente rapidement dans le saumon fumé tranché et emballé sous vide et peut atteindre des niveaux de population de l'ordre de  $10^{6-8}$  UFC·g<sup>-1</sup> au bout de 2 à 3 semaines de stockage au froid.

La biodiversité de la flore du saumon fumé réfrigéré sous vide est complexe et évolue au cours de la conservation. Le saumon fumé peut être contaminé par plus de 15 espèces de bactéries différentes dans des proportions variant considérablement selon les lots [20]. L'analyse de la biodiversité de la flore du saumon fumé au cours de sa conservation a été également réalisée grâce à des méthodes d'inventaires moléculaires comme la technique ARDRA [7] et la TTGE (Rachman, communication personnelle). Ces techniques ont permis de différencier les principales flores à Gram positif (*Cb. piscicola*, *Cb. divergens*, *Lb. curvatus*, *Lb. sakei* et *B. thermosphacta*) et également les flores à Gram négatif du saumon fumé (*Photobacterium phosphoreum*, et *Shewanella putrefaciens*). Nous avons développé les méthodes d'identification moléculaire des espèces de *Carnobacterium* [29].

Une altération organoleptique peut parfois être observée dès la fin de la deuxième semaine de stockage. Le rôle dans l'altération organoleptique des différentes espèces de bactéries lactiques n'est pas clairement identifié. Il semble néanmoins que certaines espèces de *Lactobacillus* comme *Lb. sakei* soient très altérantes, causant un fort défaut de flaveur de type soufré, acide ou aigre [27, 35]. *P. phosphoreum*, *B. ther-*

*mosphacta* et les entérobactéries comme *Serratia liquefaciens* et *Proteus* peuvent également être impliqués [20, 27].

#### 4. ORIGINE ET CONSÉQUENCES DE LA CONTAMINATION PAR *LISTERIA*

Le principal danger pour la santé lié à la transformation du saumon fumé est d'ordre microbiologique. En effet, le procédé de fabrication est relativement long (environ 24 h) et comporte des séjours à des températures variant entre 12 et 26 °C avec une manipulation importante et donc un risque de contamination et de développement microbien non négligeable. De plus, aucune étape du procédé ne permet une élimination des germes contaminant le produit. Le procédé de salage-fumage du saumon est désormais surtout appliqué à des fins organoleptiques et les traitements avec des taux en sel généralement compris entre 2,5 et 3,5 % et en fumée inférieure à 1 mg de phénols/100 g ne constituent pas un environnement fortement inhibiteur du développement bactérien [31].

*Listeria monocytogenes* constitue le risque microbiologique majeur dans le saumon fumé. En effet, la fréquence de contamination du saumon fumé par *L. monocytogenes* varie entre 10 et 75 % des lots selon les études [4, 10, 22], avec un taux généralement inférieur à 10 UFC·g<sup>-1</sup> dans les produits en sortie usine. Plusieurs études indiquent que la source principale de contamination du produit fini a lieu pendant le procédé de transformation, par contact avec des surfaces ou équipements souillés [3, 19]. Seules, certaines souches résidentes qui ont la capacité de coloniser l'environnement au détriment des autres souches se retrouvent dans le produit fini [12, 24].

Les poissons fumés ont été incriminés dans plusieurs épidémies de listériose dont deux seraient liées à la consommation de saumon ou de truite fumés : l'une en Suède touchant 9 personnes et provoquant 2 décès [16] et l'autre en Finlande entraînant 5 cas

de gastro-entérite fébrile [34]. Par ailleurs, 23 cas de listériose ont été recensés en Finlande entre juin 1999 et février 2000, probablement dus à l'ingestion de poisson fumé ou salé à froid [17].

En France et dans d'autres pays européens, la législation tolère jusqu'à 100 UFC·g<sup>-1</sup> de *L. monocytogenes* dans le saumon fumé à sa date limite de consommation (DLC) à la condition que les entreprises aient effectué des études de vieillissement de leurs produits prouvant que le seuil de 100 UFC·g<sup>-1</sup> n'est jamais dépassé à la DLC [1, 13]. Toutes les études réalisées en ajoutant artificiellement *L. monocytogenes* dans du saumon fumé ont montré une croissance importante (2–3 log UFC·g<sup>-1</sup>) de cette bactérie en quelques semaines de conservation sous vide à 4 °C, avec une accentuation notable (5–6 log UFC·g<sup>-1</sup>) si le stockage s'effectue à 8 °C [14, 36]. Cependant, les résultats observés sur des saumons fumés naturellement contaminés sont beaucoup moins alarmants. En effet, entre 5 et 10 °C, la croissance est relativement lente, les taux maximum observés excèdent rarement 100–1000 UFC·g<sup>-1</sup> [11]. De plus, le potentiel pathogène de souches de *L. monocytogenes* isolées du saumon fumé semble faible [37].

En France, aucun cas de toxi-infection alimentaire n'a été imputé à ce jour au saumon fumé. Un tel événement serait catastrophique pour toute la filière. Les coûts occasionnés par les rappels et la destruction de lots, qui surviennent régulièrement, pèsent sur l'image et l'économie de ces entreprises. Pour ces raisons, l'amélioration de la maîtrise du développement de *Listeria* dans le saumon fumé est centrale pour l'activité de cette filière.

## 5. MAÎTRISE DE LA QUALITÉ MICROBIOLOGIQUE DU SAUMON FUMÉ

La lutte contre *L. monocytogenes* dans le saumon fumé doit s'effectuer au niveau de l'hygiène de l'entreprise, et des paramètres

directeurs de la croissance de *Listeria* dans le produit, que sont le taux de sel, le taux de fumée et la température de conservation. Cependant, compte tenu des critères de préférence organoleptique du consommateur, les amplitudes de variation sur ces paramètres sont faibles. En ce qui concerne les flores banales (flores totales, flores productrices d'H<sub>2</sub>S et bactéries lactiques), le sel (entre 0 et 5 %) a un effet protecteur bien plus important que la fumée (entre 0 et 1 mg de phénols pour 100 g de chair). À titre d'exemple, la flore totale peut être immédiatement réduite de 0,7 log par gramme de sel ajouté [31]. En ce qui concerne *L. monocytogenes*, les modèles prédictifs de la croissance en fonction de différents paramètres physico-chimiques (Food Micro-Model (Arrow Scientific, Sydney, Australia) et Pathogen Modelling Program (Eastern Regional Reserch Center, PN, USA)) surestiment tous la croissance de ce germe dans le saumon fumé. Le modèle de Membré et al. [32] qui a été développé et validé spécialement pour ce produit, montre bien les conséquences dramatiques d'un stockage à 8 °C plutôt qu'à 4 °C. À 8 °C, des taux de phénols (0 à 1 mg·100 g<sup>-1</sup>) et de sel (2 à 4 %) n'ont aucun effet sur le développement de *L. monocytogenes* dans le saumon [46]. De même, Guyer et Jemmi [21] ont montré qu'un taux de sel de 6 % et un fumage à froid de 26–30 h n'avaient aucun effet sur la population de *L. monocytogenes* inoculée au préalable sur des filets de saumon (23 à 23 000 UFC·g<sup>-1</sup>). En conclusion, il apparaît que la maîtrise de la contamination du saumon au cours du procédé de transformation soit un facteur bien plus important que le sel et la fumée sur la contamination finale du produit. La maîtrise microbiologique lors du salage et du fumage ainsi que le maintien de la chaîne du froid à une température inférieure à 4 °C jusque chez le consommateur sont des facteurs primordiaux pour assurer la qualité et la sécurité de ce produit.

En plus des paramètres technologiques inhérents au procédé de salage-fumage, différentes méthodes ont été testées pour

**Table I.** Bactériocines produites par des souches de *Carnobacterium* isolées de produits alimentaires.  
**Table I.** Bacteriocins synthesis by *Carnobacterium* strains isolated from food products.

Souche	Origine	Bactériocine	Nb d'acides aminés (forme mature)	Références
<i>Cb. piscicola</i> LV17A	porc emballé	carnobactériocine A	53	[48]
<i>Cb. piscicola</i> LV17B	porc emballé	carnobactériocine BM1	43	[40]
<i>Cb. piscicola</i> V1	poisson	piscicocine V1b		[5]
<i>Cb. piscicola</i> LV17B	porc emballé	carnobactériocine B2	48	[40]
<i>Cb. piscicola</i> CP5	fromage	carnocine CP52		[23]
<i>Cb. piscicola</i> CP5	fromage	carnocine CP51	N.D.	[23]
<i>Carnobacterium</i> 377	N.D.	carnocine H	75	[6]
<i>Cb. piscicola</i> UI49	poisson	carnocine UI49	N.D.	[44]
<i>Cb. divergens</i> V41	truite	divercine V41	43	[33]
<i>Cb. divergens</i> LV13	porc emballé	divergicine A	46	[49]
<i>Cb. divergens</i> 750	N.D.	divergicine 750	34	[25]
<i>Cb. piscicola</i> V1	poisson			[5]
<i>Cb. piscicola</i> JG126	jambon	piscicocine V1a	44	[26]
<i>Cb. piscicola</i> SF668	poisson	piscicoline 126		[14]
<i>Cb. piscicola</i> LV61	agneau emballé	piscicoline 61	53	[43]

N.D. = non déterminé.

limiter le développement de *L. monocytogenes* dans le saumon fumé. Il s'agit de l'ionisation, de l'ajout d'acides organiques, de glucono-delta-lactone [30]. Ces méthodes sont soit peu efficaces, soit entraînent des modifications organoleptiques du produit. Ces additifs ne sont d'ailleurs pas autorisés en France dans la dénomination "saumon fumé".

## 6. BIOPRÉSERVATION DU SAUMON FUMÉ

Les études réalisées sur la caractérisation des flores de contamination du saumon fumé ont mis en évidence la présence dans ce produit d'une flore lactique composée de *Lactobacillus* et de *Carnobacterium* [20]. Les bactéries du genre *Carnobacterium* ont été particulièrement étudiées pour leur aptitude à produire des peptides anti-*Listeria*. Les *Carnobacterium* producteurs de bactériocines que l'on retrouve dans des

produits alimentaires sont présentés dans le tableau I. La forme mature de ces 11 bactériocines possède entre 34 (divergicine 750) et 75 acides aminés (carnocin H). Il s'agit généralement de bactériocines de classe IIa. L'utilisation des bactériocines produites par des bactéries lactiques pour l'inhibition de *L. monocytogenes* dans le saumon fumé peut être envisagée dans deux contextes : comme un additif (ajout du peptide purifié ou semi-purifié) ou comme un auxiliaire technologique (ensemencement d'une souche productrice in situ de bactériocine).

Des préparations commerciales de nisine (Aplin and Barrett Ltd., Trowbridge, Angleterre; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) associée au CO<sub>2</sub>, inhibent la croissance de *L. monocytogenes* dans le saumon fumé [36, 45] mais le conditionnement sous atmosphère modifiée autorise, contrairement au conditionnement sous vide, le déplacement des fines tranches de saumon fumé dans l'emballage, ce qui ne permet pas une présentation adéquate du produit.



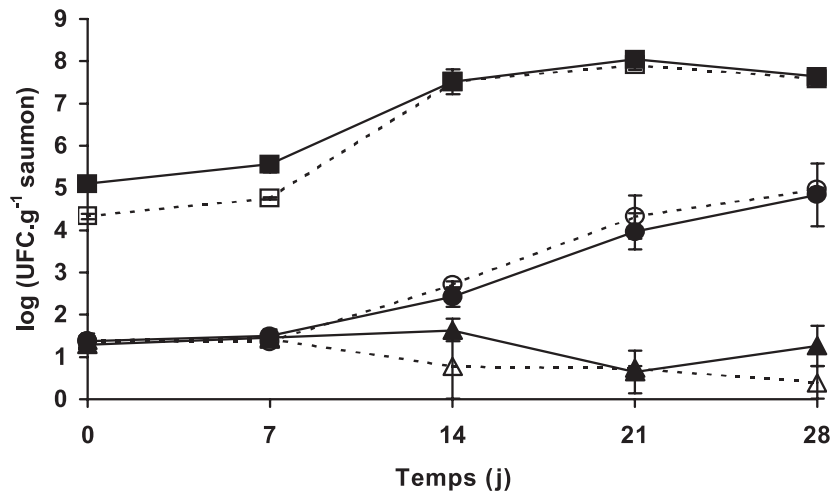
Le concept de biopréservation repose sur l'ensemencement du saumon par une flore lactique compétitive capable d'inhiber *L. monocytogenes* au cours de la conservation au froid. Ceci ne peut être envisagé que si les souches utilisées sont adaptées à la croissance en milieu saumon fumé. Ainsi les souches productrices de nisine comme *Lactococcus lactis* ATCC 11454 ne se développent pas dans un environnement saumon fumé [47]. En revanche, une souche de *L. sakei* montre une capacité satisfaisante à inhiber *L. monocytogenes* dans le saumon, cependant le produit présente alors une forte odeur d'altération [35]. En revanche, l'utilisation de bactéries lactiques isolées de produits de la mer (*Lactobacillus* et *Carnobacterium*) et sélectionnées pour leur capacité à inhiber *L. monocytogenes* a été évaluée comme cultures utilisables dans un procédé de biopréservation.

*Carnobacterium divergens* V41 produisant la divercine et *Carnobacterium piscicola* V1 produisant la carnobacteriocine BM1 et la pisciocine V1a, des bactériocines de classe IIa, ont été isolés dans notre laboratoire [5, 33, 39]. Cette dernière bactériocine est aussi produite par une autre souche isolée du saumon fumé, *Cb. piscicola* SF668 [14]. Ces trois souches sont capables d'inhiber *L. monocytogenes* dans un système simulant le saumon fumé conservé à 4 °C [14]. *Cb. piscicola* V1 présente une activité bactéricide contre *L. monocytogenes* dans du saumon stérile et du saumon commercial à 4 et 8 °C [15]. La biodiversité du niveau de sensibilité à la divercine V41 d'une collection de 57 souches de *L. monocytogenes* isolées d'ateliers de fabrication de saumon fumé [2] nous a permis de classer les souches de *L. monocytogenes* en 2 catégories : souches très sensibles (81 %) et souches de sensibilité intermédiaire (19 %) à *Cb. divergens* V41 (Brillet, communication personnelle). La croissance de mélanges de souches de *L. monocytogenes* de différentes sensibilités à la divercine en co-culture dans du saumon fumé avec *Cb. divergens* V41 est présentée sur la figure 1.

*Cb. divergens* V41 permet de réduire le taux de *Listeria* de 3,6 à 4,6 log (UFC·g<sup>-1</sup>) par rapport aux témoins non ensemencés par la souche bioprotectrice dont la population en *L. monocytogenes* atteint 4,8 à 5 log après 28 j. De manière générale, *Cb. divergens* V41 permet de maintenir un taux de *L. monocytogenes* inférieur à 50 UFC·g<sup>-1</sup> quelle que soit la sensibilité des souches. Récemment, l'utilisation d'un mutant déficient dans la production de divercine V41 a permis de démontrer le rôle déterminant de la production de divercine dans l'activité inhibitrice de *L. monocytogenes* dans le saumon fumé par *Cb. divergens* V41 [41].

Un autre critère de sélection important concerne les modifications des caractéristiques organoleptiques du saumon à la DLC engendrées par l'ensemencement de ces souches bioprotectrices. Ainsi, Paludan-Muller et al. [38] ont montré que l'inoculation du saumon fumé sous vide par un mélange de souches de *C. piscicola* isolées du saumon fumé provoquait le développement après stockage d'odeurs d'altération. Les potentialités altérantes de *Cb. divergens* V41, *Cb. piscicola* V1 et *Cb. piscicola* SF668 ensemencés à un taux initial de 10<sup>4-5</sup> UFC·g<sup>-1</sup> ont été testées sur du saumon fumé stérile et du saumon fumé commercial (2 % p/v). Concernant l'évaluation sensorielle sur saumon fumé stérile, le jury entraîné (14 juges entraînés, 19 critères d'odeur) n'a pas perçu d'effets d'altération notoires dus aux trois souches par comparaison au témoin non ensemencé. Cependant, l'ajout d'une culture de *Cb. divergens* V41 par pulvérisation recto-verso sur des lots de saumon fumé commercial est perçue par le jury (goût et odeur) mais avec une intensité toujours très faible (Brillet, communication personnelle). Ainsi, une population importante de *Carnobacterium* (10<sup>8</sup> UFC·g<sup>-1</sup>) n'a pas d'influence sur les qualités sensorielles du saumon fumé stocké quatre semaines à 4 puis 8 °C.

Les amines biogènes qui sont des indicateurs de l'altération du saumon fumé proviennent du métabolisme bactérien des



**Figure 1.** *Carnobacterium divergens* V41 dans du saumon fumé stérile.

Co-culture de *Cb. divergens* (□, ■) et de *L. monocytogenes* (△, ▲); culture pure de *L. monocytogenes* (○, ●); mélange de 5 souches de *L. monocytogenes* très sensibles à *Cb. divergens* V41 (□, △, ○); et mélange de 5 souches de *L. monocytogenes* de sensibilité intermédiaire à *Cb. divergens* V41 (■, ▲, ●).

**Figure 1.** Inhibition of *Listeria monocytogenes* by *Carnobacterium divergens* V41 in sterile smoked salmon.

Co-culture of *Cb. divergens* (□, ■) and *L. monocytogenes* (△, ▲); culture of *L. monocytogenes* alone (○, ●); pooled culture of 5 *L. monocytogenes* strains presenting high sensitivity to *Cb. divergens* V41 (□, △, ○); and pooled culture of 5 *L. monocytogenes* strains presenting medium sensitivity to *Cb. divergens* V41 (■, ▲, ●).

acides aminés. L'association d'entérobactéries comme *Serratia liquefaciens* ou *Hafnia alvei* avec des bactéries lactiques augmente la production d'amines biogènes [28]. Dans le contexte de la biopréservation du saumon fumé, il est important d'estimer l'effet de l'ensemencement du saumon fumé avec des souches de bactéries lactiques sur la production d'amines biogènes. L'effet des paramètres technologiques (température, concentration en sel) sur la croissance et la production d'amines biogènes par *Cb. divergens* V41 dans du saumon fumé stérile a été étudié. Les résultats montrent que l'inoculation du saumon fumé par *Cb. divergens* V41 ne génère pas de concentration plus élevée en amines biogènes (putrescine, cadavérine, histamine et

tyramine) que la flore indigène du témoin non ensemencé [8, 9].

## 7. CONCLUSION

Le concept de la biopréservation du saumon par des souches inhibitrices de *Listeria monocytogenes* est prometteur car il a démontré son efficacité à l'échelle du laboratoire et nécessite d'être validé au niveau industriel. Les connaissances sur les écosystèmes de ce produit doivent être approfondies afin d'évaluer les modifications entraînées par l'ensemencement de souches biopréservatrices. Ces souches devront être préalablement cultivées sur milieu dépourvu de protéines d'origine animale. De nouveaux développements de ce concept de technologie

des barrières devraient nous amener à proposer des stratégies à plus larges spectres permettant une inhibition de la flore banale de contamination en vue de l'augmentation de la DLC.

**Remerciements :** Les travaux réalisés dans nos laboratoires ont été financés par l'Union européenne (FAIR 1996–1999), la région Pays de la Loire, la CITPPM (Confédération des Industriels Transformateurs des Produits de la Pêche Maritime) ainsi que par le MAAPAR (programme « Aliment-Qualité-Sécurité AQS 2002 ») et le MJENR dans le cadre du programme « Bioressource et traçabilité pour le post-génoème 2001–2002 ».

## RÉFÉRENCES

- [1] AFSSA, Rapport de la commission d'étude des risques liés à *L. monocytogenes*, 2000.
- [2] ASEPT, Collection de *Listeria monocytogenes* isolées d'atelier de fabrication de saumon fumé, Laval, France, 2001.
- [3] Autio T., Hielm S., Miettinen M., Sjöberg A.M., Aarnisalo K., Björkroth J., Mattila-Sandholm T., Korkeala H., Sources of *Listeria monocytogenes* contamination in a cold-smoked rainbow trout processing plant detected by pulsed-field gel electrophoresis typing, *Appl. Environ. Microbiol.* 65 (1999) 150–155.
- [4] Ben Embarek P.K., Presence, detection and growth of *Listeria monocytogenes* in seafoods: a review, *Int. J. Food Microbiol.* 23 (1994) 17–34.
- [5] Bhugaloo-Vial P., Dousset X., Metivier A., Sorokine O., Anglade P., Boyaval P., Marion D., Purification and amino acid sequences of pisciocins V1a and V1b, two class IIa bacteriocins secreted by *Carnobacterium piscicola* V1 that display significantly different levels of specific inhibitory activity, *Appl. Environ. Microbiol.* 62 (1996) 4410–4416.
- [6] Blom H., Katla T., Nissen H., Holo H., Characterization, production, and purification of carnocin H, a bacteriocin produced by *Carnobacterium* 377, *Curr. Microbiol.* 43 (2001) 227–231.
- [7] Cambon-Bonavita M.A., Lesongeur F., Menoux S., Lebourg A., Barbier G., Microbial diversity in smoked salmon examined by a culture-independent molecular approach: a preliminary study, *Int. J. Food Microbiol.* 70 (2001) 179–187.
- [8] Connil N., Plissoneau L., Onno B., Pilet M.F., Prevost H., Dousset X., Growth of *Carnobacterium divergens* V41 and production of biogenic amines and divercin V41 in sterile cold-smoked salmon extract at varying temperatures, NaCl levels, and glucose concentrations, *J. Food Prot.* 65 (2002) 333–338.
- [9] Connil N., Prevost H., Dousset X., Production of biogenic amines and divercin V41 in cold smoked salmon inoculated with *Carnobacterium divergens* V41, and specific detection of this strain by multiplex-PCR, *J. Appl. Microbiol.* 92 (2002) 611–617.
- [10] Cortesi M.L., Sarli T., Santoro A., Murru N., Pepe T., Distribution and behavior of *Listeria monocytogenes* in three lots of naturally-contaminated vacuum-packed smoked salmon stored at 2 and 10 °C, *Int. J. Food Microbiol.* 37 (1997) 209–214.
- [11] Dalgaard P., Jørgensen L.V., Predicted and observed growth of *Listeria monocytogenes* in seafood challenge tests and in naturally contaminated cold-smoked salmon, *Int. J. Food Microbiol.* 40 (1998) 105–115.
- [12] Dauphin G., Ragimbeau C., Malle P., Use of PFGE typing for tracing contamination with *Listeria monocytogenes* in three cold-smoked salmon processing plants, *Int. J. Food Microbiol.* 64 (2001) 51–61.
- [13] DGAL, note de service DGAL/SDHA, N98/N°8088, 1998.
- [14] Duffes F., Corre C., Leroi F., Dousset X., Boyaval P., Inhibition of *Listeria monocytogenes* by in situ produced and semipurified bacteriocins of *Carnobacterium* spp. on vacuum-packed, refrigerated cold-smoked salmon, *J. Food Prot.* 62 (1999) 1394–1403.
- [15] Duffes F., Leroi F., Boyaval P., Dousset X., Inhibition of *Listeria monocytogenes* by *Carnobacterium* spp. strains in a simulated cold smoked fish system stored at 4 °C, *Int. J. Food Microbiol.* 47 (1999) 33–42.
- [16] Ericsson H., Eklow A., Danielsson-Tham M.L., Loncarevic S., Mentzing L.O., Persson I., Unnerstad H., Tham W., An outbreak of listeriosis suspected to have been caused by rainbow trout, *J. Clin. Microbiol.* 35 (1997) 2904–2907.
- [17] Eurosurveillance, Listeriosis cases suspected to have been caused by vacuum-packed fish product in Finland (<http://www.eurosurv.org/update>), Issue 15, April 13, 2000.
- [18] FAO, Statistiques des pêches, produits, 89 (1999) 90.
- [19] Fonnesebech Vogel B., Huss H.H., Ojeniyi B., Ahrens P., Gram L., Elucidation of *Listeria monocytogenes* contamination routes in cold-smoked salmon processing plants

- detected by DNA-based typing methods, *Appl. Environ. Microbiol.* 67 (2001) 2586–2595.
- [20] Gonzalez-Rodriguez M.N., Sanz J.J., Santos J.A., Otero A., Garcia-Lopez M.L., Numbers and types of microorganisms in vacuum-packed cold-smoked freshwater fish at the retail level, *Int. J. Food Microbiol.* 77 (2002) 161–168.
- [21] Guyer S., Jemmi T., Behavior of *Listeria monocytogenes* during fabrication and storage of experimentally contaminated smoked salmon, *Appl. Environ. Microbiol.* 57 (1991) 1523–1527.
- [22] Heinitz M.L., Johnson J.M., The incidence of *Listeria* spp., *Salmonella* spp., and *Clostridium botulinum* in smoked fish and shellfish, *J. Food Prot.* 61 (1998) 318–323.
- [23] Herbin S., Mathieu F., Brule F., Branlant C., Lefebvre G., Lebrhi A., Characteristics and genetic determinants of bacteriocin activities produced by *Carnobacterium piscicola* CP5 isolated from cheese, *Curr. Microbiol.* 35 (1997) 319–326.
- [24] Hoffman A.D., Gall K.L., Norton D.M., Wiedmann M., *Listeria monocytogenes* contamination patterns for the smoked fish processing environment and for raw fish, *J. Food Prot.* 66 (2003) 52–60.
- [25] Holck A., Axelsson L., Schillinger U., Divergicin 750, a novel bacteriocin produced by *Carnobacterium divergens* 750, *FEMS Microbiol. Lett.* 136 (1996) 163–168.
- [26] Jack R.W., Wan J., Gordon J., Harmark K., Davidson B.E., Hillier A.J., Wettenhall R.E., Hickey M.W., Coventry M.J., Characterization of the chemical and antimicrobial properties of piscicolin 126, a bacteriocin produced by *Carnobacterium piscicola* JG126, *Appl. Environ. Microbiol.* 62 (1996) 2897–2903.
- [27] Joffraud J.J., Leroi F., Roy C., Berdague J.L., Characterisation of volatile compounds produced by bacteria isolated from the spoilage flora of cold-smoked salmon, *Int. J. Food Microbiol.* 66 (2001) 175–184.
- [28] Jorgensen L.V., Huss H.H., Dalgaard P., The effect of biogenic amine production by single bacterial culture and metabiosis on cold-smoked salmon, *J. Appl. Microbiol.* 89 (2000) 920–934.
- [29] Kabadjova P., Dousset X., Le Cam V., Prevost H., Differentiation of closely related *Carnobacterium* food isolates based on 16S-23S ribosomal DNA intergenic spacer region polymorphism, *Appl. Environ. Microbiol.* 68 (2002) 5358–5366.
- [30] Leroi F., La microbiologie du saumon fumé à froid : aspects hygiéniques et qualité, *Rev. Gén. Froid* 1028 (2002) 35–40.
- [31] Leroi F., Joffraud J.J., Chevalier F., Cardinal M., Research of quality indices for cold-smoked salmon using a stepwise multiple regression of microbiological counts and physico-chemical parameters, *J. Appl. Microbiol.* 90 (2001) 578–587.
- [32] Membré J.M., Thurette J., Catteau M., Modelling the growth, survival and death of *Listeria monocytogenes*, *J. Appl. Microbiol.* 82 (1997) 345–350.
- [33] Metivier A., Pilet M.F., Dousset X., Sorokine O., Anglade P., Zagorec M., Piard J.C., Marion D., Cenatiempo Y., Fremaux C., Divercin V41, a new bacteriocin with two disulphide bonds produced by *Carnobacterium divergens* V41: primary structure and genomic organization, *Microbiology* 144 (1998) 2837–2844.
- [34] Miettinen M.K., Siitonen A., Heiskanen P., Haajanen H., Bjorkroth K.J., Korkeala H.J., Molecular epidemiology of an outbreak of febrile gastroenteritis caused by *Listeria monocytogenes* in cold-smoked rainbow trout, *J. Clin. Microbiol.* 37 (1999) 2358–2360.
- [35] Nilsson L., Huss H.H., Gram L., Inhibition of *Listeria monocytogenes* on cold-smoked salmon by nisin and carbon dioxide atmosphere, *Int. J. Food Microbiol.* 38 (1997) 217–227.
- [36] Nilsson L., Gram L., Huss H.H., Growth control of *Listeria monocytogenes* on cold-smoked salmon using a competitive lactic acid bacteria flora, *J. Food Prot.* 62 (1999) 336–342.
- [37] Norton D.M., Scarlett J.M., Horton K., Sue D., Thimothe J., Boor K.J., Wiedmann M., Characterization and pathogenic potential of *Listeria monocytogenes* isolates from the smoked fish industry, *Appl. Environ. Microbiol.* 67 (2001) 646–653.
- [38] Paludan-Muller C., Dalgaard P., Huss H.H., Gram L., Evaluation of the role of *Carnobacterium piscicola* in spoilage of vacuum- and modified-atmosphere-packed cold-smoked salmon stored at 5 °C, *Int. J. Food Microbiol.* 39 (1998) 155–166.
- [39] Pilet M.F., Dousset X., Barré R., Novel G., Desmazeaud M., Piard J.C., Evidence for two bacteriocins produced by *Carnobacterium piscicola* and *Carnobacterium divergens* isolated from fish and active against *Listeria monocytogenes*, *J. Food Prot.* 58 (1995) 256–262.
- [40] Quadri L.E., Sailer M., Roy K.L., Vederas J.C., Stiles M.E., Chemical and genetic characterization of bacteriocins produced by *Carnobacterium piscicola* LV17B, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 12204–12211.

- [41] Richard C., Brillet A., Pilet M.F., Prevost H., Drider D., Evidence on inhibition of *Listeria monocytogenes* by divercin V41 action, *Lett. Appl. Microbiol.* 36 (2003) 288–292.
- [42] Rorvik L.M., *Listeria monocytogenes* in the smoked salmon industry, *Int. J. Food Microbiol.* 62 (2000) 183–190.
- [43] Schillinger U., Stiles M.E., Holzapfel H.W., Bacteriocin production by *Carnobacterium piscicola* LV 61, *Int. J. Food Microbiol.* 20 (1993) 131–147.
- [44] Stoffels G., Nissen-Meyer J., Gudmundsdottir A., Sletten K., Holo H., Nes I.F., Purification and characterization of a new bacteriocin isolated from a *Carnobacterium* sp., *Appl. Environ. Microbiol.* 58 (1992) 1417–1422.
- [45] Szabo E.A., Cahill M.E., Nisin and ALTA 2341 inhibit the growth of *Listeria monocytogenes* on smoked salmon packaged under vacuum or 100% CO<sub>2</sub>, *Lett. Appl. Microbiol.* 28 (1999) 373–377.
- [46] Thurette J., Membre J.M., Ching L.H., Tailliez R., Cateau M., Behavior of *Listeria* spp. in smoked fish products affected by liquid smoke, NaCl concentration, and temperature, *J. Food Prot.* 61 (1998) 1475–1479.
- [47] Wessels S., Huss H.H., Suitability of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC11454 as a protective culture for lightly preserved fish products, *Food Microbiol.* 13 (1996) 323–332.
- [48] Worobo R.W., Henkel T., Sailer M., Roy K.L., Vederas J.C., Stiles M.E., Characteristics and genetic determinant of a hydrophobic peptide bacteriocin, carnobacteriocin A, produced by *Carnobacterium piscicola* LV17A, *Microbiology* 140 (1994) 517–526.
- [49] Worobo R.W., Van Belkum M.J., Sailer M., Roy K.L., Vederas J.C., Stiles M.E., A signal peptide secretion-dependent bacteriocin from *Carnobacterium divergens*, *J. Bacteriol.* 177 (1995) 3143–3149.

---

Agoral 2004

## **LA BIOPRESERVATION DES ALIMENTS, INTERETS ET ENJEUX.**

**H. Prévost, Anne Brillet et Marie France Pilet**

ENITIAA- Laboratoire de Microbiologie Alimentaire et Industrielle,  
Rue de la Géraudière, BP 82225, 44322 NANTES Cedex 3.

### *Abstract*

*Biopreservation refers to the use of microflora to extend storage life, to enhance safety of foods without thermal treatment or chemical conservatives and to preserve organoleptic qualities. Lactic acid bacteria have a major potential for the use in biopreservation because they are safe for the consumer and they naturally dominate the microflora of many foods. This paper reviews different aspects in the development of biopreservation applications in the field of non-fermented refrigerated ready-to-eat fish and meat including « sous vide » and modified atmosphere packed products.*

### *Résumé*

*La biopréservation correspond à l'utilisation d'une microflore afin d'augmenter la durée de vie microbiologique et la sûreté d'un aliment sans l'utilisation de traitement thermique ni de conservateur et en préservant ses propriétés organoleptiques. Les bactéries lactiques présentent un important potentiel de développement dans des procédés de biopréservation car elles sont réputées sûres pour le consommateur et dominent naturellement la flore de nombreux aliments. Dans cet article sont présentés différents aspects du développement récent du concept de biopréservation appliqué aux produits non-fermentés réfrigérés prêts à consommer notamment la viande et les poissons conservés réfrigérés sous vide ou sous atmosphère contrôlée.*

### **Le concept de biopréservation**

Le terme de biopréservation a été introduit récemment pour distinguer les traitements de préservation utilisant des substances chimiques ou biologiques dans les aliments. La biopréservation a pour objectifs d'augmenter la durée de vie microbiologique et la sûreté d'un aliment en utilisant des cultures microbiennes à croissance rapide dans les conditions de production et de conservation du produit et (ou) en utilisant les substances anti-microbiennes produites par ces cultures.

### **Domaines d'application de la biopréservation.**

Il est possible de distinguer deux domaines d'application du concept de biopréservation des aliments. Le premier concerne les produits fermentés traditionnels. Il s'agit des boissons fermentées, des produits laitiers, des fromages, beurre, fruits et végétaux

fermentés, viandes, saucissons, cacao, thé, café, etc. Dans ce type de produits, l'activité des flores entraîne une modification considérable des caractéristiques organoleptiques. Le développement de nombreuses technologies de fermentation des aliments a conduit à une grande diversité des produits fermentés pouvant présenter des caractéristiques organoleptiques très différentes pour une même matière première. Ainsi, les technologies fromagères développées par l'humanité permettent l'obtention d'une grande diversité de fromages. Il ne faut toutefois pas oublier que le contrôle du développement des microorganismes dans ces produits avait pour première finalité la conservation du lait.

Le second domaine d'application de la biopréservation concerne les produits non-fermentés réfrigérés dont les caractéristiques organoleptiques ne sont pas liées au développement de microorganismes. Une nouvelle génération de produits prêts à consommer se développe rapidement. Il s'agit de produits transformés à durabilité étendue incluant les produits conservés sous vide, ou sous atmosphère contrôlée. Le marché européen de ces produits est évalué à 15 milliards d'euros en 2003, SHEARD (1999). L'utilisation de conservateurs chimiques est très réglementée et peu compatible avec l'image d'aliments frais et sains véhiculée par ces produits où la température est souvent le seul facteur de contrôle du développement des microorganismes. Ainsi, les conditions douces des traitements thermiques lors de la production et les conditions de conservation réfrigérée sous vide ou sous atmosphère contrôlée, peuvent donner un avantage sélectif à des bactéries pathogènes comme *Listeria monocytogenes* et *Clostridium botulinum*, NOTERMANS et al (1990). Seules les applications dans le domaine des produits réfrigérés faiblement préservés seront considérées par la suite.

### **La biopréservation des produits non-fermentés réfrigérés.**

Dans des viandes ou poissons stockés réfrigérés sous vide ou en présence de CO<sub>2</sub>, les bactéries lactiques deviennent rapidement la flore dominante, LEROI (1998). Il est possible que des cultures protectrices (CP) présentes naturellement dans les produits, contribuent déjà à leur sûreté. Ces aliments peuvent être reformulés et les paramètres du procédé de fabrication redéfinis afin d'augmenter la croissance de ces espèces. Cependant comme pour la fermentation, l'ajout de CP sélectionnées directement dans le produit offre un meilleur contrôle du procédé en terme de sûreté et de prévention d'altérations, RODGERS (2001).

**Sélection de souches protectrices.** Les problématiques des cultures probiotiques et des cultures protectrices utilisées dans la biopréservation sont relativement similaires. En effet, comme les bactéries probiotiques, les CP sont des bactéries « food-grade », principalement des bactéries lactiques qui peuvent être ou non des souches naturellement présentes dans le produit considéré. Les bactéries lactiques peuvent être isolées d'une grande variété d'écosystèmes végétaux et animaux. Elles sont sélectionnées pour leur aptitude à la croissance dans le produit réfrigéré et pour leur capacité à inhiber les microorganismes pathogènes ou d'altération (MPA) plutôt que pour leurs aptitudes à modifier le profil texture/flaveur ou à présenter des bénéfices pour la santé comme dans le cas respectivement, des produits fermentés ou des probiotiques.

**Efficacité et nature de l'inhibition.** Le développement d'un système de biopréservation nécessite la compréhension de la nature de l'inhibition des MPA. L'effet antagoniste entre bactéries résulte de leur croissance compétitive, des produits de leur métabolisme, de la réduction du pH et de la production de bactériocines.

Les bactéries lactiques ont des exigences nutritionnelles complexes qui en font de fortes compétitrices dans leurs habitats naturels. Les bactéries lactiques ont développé la capacité de produire différentes substances inhibitrices incluant l'acide lactique, et d'autres métabolites de faible poids moléculaire (peroxyde d'hydrogène, alcools, CO<sub>2</sub>, diacétyl, acide benzoïque, reutenine etc.). Elles sont également connues pour produire des peptides de faible poids moléculaire (bactériocines) qui sont bactéricides pour d'autres bactéries à Gram positif. Les bactériocines ont une activité spécifique très élevée et n'affectent pas les qualités sensorielles du produit. Les bactériocines produisent des pores dans la membrane bactérienne ce qui cause la fuite des composés cellulaires essentiels (acides aminés, ATP) et peut provoquer une lyse de la cellule, ENNAHAR et al (2000).

Différents mécanismes d'inhibition peuvent être observés chez une même espèce. C'est le cas pour *Carnobacterium piscicola* dont l'inhibition de *L. monocytogenes* résulte, pour une souche, de la production d'une bactériocine, et pour une autre, d'une compétition nutritionnelle, NILSSON et al (1999). La traçabilité du microorganisme inoculé dans l'aliment à biopréserver peut être assurée par des méthodes permettant le dénombrement spécifique de la souche inoculée. Des méthodes de PCR (réaction de polymérisation en chaîne) multiplex sont utilisées pour distinguer les souches inoculées des autres souches de la même espèce participant à la flore indigène du produit, CONNIL et al (2002).

**Exemples d'applications.** Deux types de procédés de biopréservation peuvent être envisagés. Le premier concerne l'utilisation de substances antimicrobiennes purifiées, notamment les bactériocines. Le second concerne l'inoculation de l'aliment par une CP qui va s'implanter dans le produit dans les conditions de conservation au froid. Dans ce cas, la CP viable sera consommée avec l'aliment.

La nisine est la seule bactériocine produite par une bactérie lactique (*Lactococcus lactis*) qui est autorisée dans 45 pays comme additif alimentaire. D'autres bactériocines présentent un intérêt pour la biopréservation comme la pediocine A pour son activité anti-*C. botulinum* dans les produits carnés et la pediocine PA-1/AcH pour son activité anti-*Listeria* dans les produits laitiers. L'utilisation industrielle de ces substances se heurte à la démonstration de l'innocuité pour l'homme qui nécessite des investissements financiers importants, STILES (1996).

Il n'existe sans doute désormais plus aucun produit où les bactéries lactiques peuvent se développer qui n'a fait l'objet de travaux sur l'utilisation d'une CP productrice ou non de bactériocine pour inhiber les MPA. Les cellules cibles sont majoritairement des bactéries à Gram positif et les travaux concernant l'inhibition de *L. monocytogenes* sont les plus répandus, STILES (1996).

Les *Carnobacterium*, *Leuconostoc* et *Lactobacillus* sont les genres les plus cités pour leur aptitude à se développer dans les viandes et les poissons réfrigérés. La biopréservation du saumon fumé a fait l'objet de nombreux travaux dans notre laboratoire. Ainsi une souche de *Carnobacterium divergens* produisant une bactériocine, la divercine V41, PILET et al (1995), a été utilisée avec succès pour inhiber *L. monocytogenes* dans le saumon fumé tout en préservant les qualités organoleptiques du produit après 28 jours de conservation au froid (figure 1). Les CP ne doivent pas avoir d'effet sur les caractéristiques organoleptiques du produit, BRILLET et al (2004).



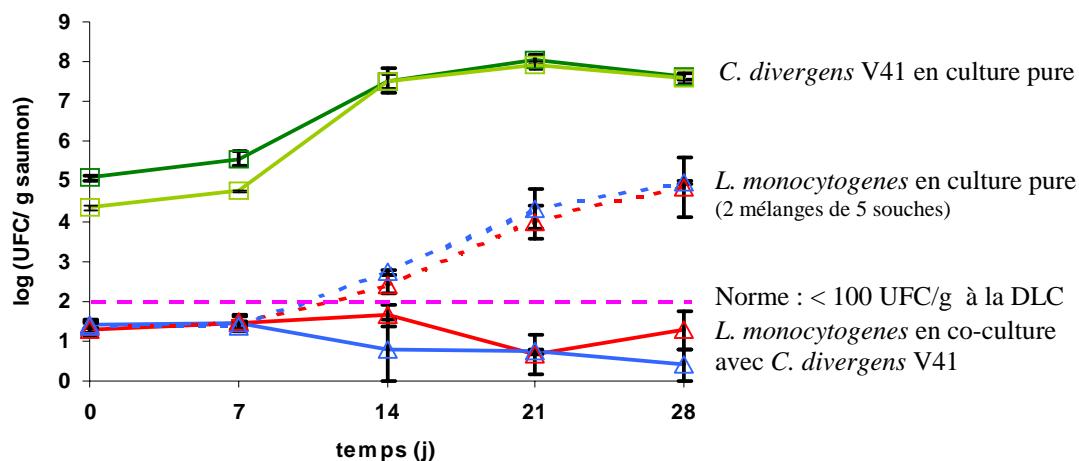


Figure 1 : Inhibition de *L. monocytogenes* dans le saumon fumé conservé à 8°C, d'après BRILLET et al. (2004).

Croissance de *Listeria monocytogenes* (triangles) en co-culture avec *Carnobacterium divergens* V41 (carrés) sur du saumon fumé stérile (stockage des échantillons de saumon : 1/3 temps à 4°C, 2/3 du temps à 8°C, et rupture 2h à 20°C au bout de 2/3 du temps)

**Réglementation et innocuité des souches.** Les bactéries lactiques constituent un groupe de bactéries regroupant plusieurs genres et sont isolées d'écosystèmes d'un très grand nombre d'aliments fermentés ou non. Ces bactéries sont généralement considérées comme inoffensives ou peuvent même présenter un intérêt pour la santé humaine (probiotique). Le risque potentiel associé aux bactéries lactiques est faible, toutefois sont reportés dans la littérature de rares cas de bactériémies associées aux bactéries lactiques, STILES (1996).

Dans le cadre du développement d'un nouveau procédé de biopréservation d'un produit alimentaire, la sûreté de l'utilisation de la souche pour le consommateur doit être validée par les autorités gestionnaires du risque. En France, l'autorisation de commercialisation et d'utilisation d'une souche de bactérie lactique dans un procédé de biopréservation peut être délivrée par la DGCCRF et la DSV. Celle-ci est nécessaire pour des souches nouvelles ou des applications non traditionnelles de souches déjà utilisées, à l'exception des microorganismes qui n'ont pas été utilisés à un niveau significatif dans des préparations pour l'alimentation humaine. Ces derniers sont couverts par le règlement 258/97/CE « nouveaux aliments et nouveaux ingrédients alimentaires », et les organismes génétiquement modifiés le sont par la directive 90/219/CE.

Afin de garantir la sécurité du consommateur, l'efficacité et l'innocuité de la souche doivent être démontrées sans qu'il n'existe cependant de cadre réglementaire. En effet, les microorganismes utilisés pour l'alimentation humaine ne sont pas sujets à une réglementation nationale ou communautaire. En revanche, les microorganismes entrant dans la chaîne alimentaire par l'intermédiaire de l'alimentation pour animaux ou présents dans les produits de protection des plantes sont régulés en Europe (directive 93/113/EC et directive 2001/36/EC). Beaucoup de microorganismes utilisés dans l'alimentation animale et la protection des plantes sont identiques ou proches et sont sujets à une évaluation stricte de leur sûreté pour être autorisés.

Il n'existe pas non plus de liste de microorganismes autorisés en alimentation humaine ni de définition claire d'un microorganisme utilisé traditionnellement et considéré comme « familier ». Ainsi, il n'y a pas de réglementation européenne définissant les caractéristiques d'un microorganisme formellement reconnu comme sûr pour des applications en alimentation humaine. Actuellement la commission européenne explore la possibilité d'introduire un système similaire au concept « GRAS », (Generally Recognised As Safe) utilisé aux USA. La proposition vise à définir une méthodologie de qualification de sûreté présumée (Qualified Presumption of Safety, QPS) qui serait appliquée au cas par cas et limitée à quelques aspects en fonction des microorganismes considérés. Il s'agirait par exemple d'identifier la présence de déterminants de résistance aux antibiotiques chez les bactéries lactiques, de facteurs de virulence ou de production de toxine chez des espèces contenant des souches pathogènes. La méthodologie QPS doit permettre d'assurer la sûreté des producteurs de produits alimentaires et des consommateurs. En France, l'AFSSA a émis un avis concernant les « recommandations pour la présentation des données permettant l'évaluation de l'innocuité des microorganismes utilisés dans le secteur agro-alimentaire (souches nouvelles ou modifiées, application différente de souches déjà utilisées) », AFSSA 2002. Les conclusions sont présentées sous la forme d'un arbre décisionnel. Cet avis est à ce jour le seul document sur lequel peuvent s'appuyer les industriels et l'autorité gestionnaire du risque pour délivrer un agrément d'utilisation.

Il est maintenant probable que la réglementation européenne régulant l'utilisation de souches de microorganismes dans l'alimentation humaine évoluera, après de longs débats, vers celle en vigueur pour l'alimentation des animaux. Ceci nécessitera de la part des industriels producteurs de microorganismes pour l'alimentation humaine de nombreux travaux pour assurer la qualification des souches même si celles-ci sont déjà utilisées dans des procédés industriels.

## Conclusion

Les principaux problèmes à résoudre dans le domaine de la conservation des aliments ne sont pas nouveaux. Il s'agit de réduire les risques d'altération et de toxi-infections alimentaires. L'industrialisation et l'évolution des habitudes alimentaires et du contexte réglementaire ont généré une nouvelle version de ces vieux problèmes qui nécessite de mettre en place des solutions innovantes. Le marché des viandes et produits de la mer légèrement préservés et conditionnés sous atmosphère contrôlée continue à se développer. La conservation réfrigérée assez longue (jusqu'à 4 semaines) associée au fait que les produits peuvent être consommés crus engendre un risque sanitaire lié à une contamination possible par des germes pathogènes psychrotrophes comme *L. monocytogenes*.

La biopréservation utilisant les CP apparaît comme une stratégie innovante pour garantir au consommateur des produits prêts à consommer sains et sûrs. En effet, les CP sont utilisables dans les produits réfrigérés conservés sous vide ou sous atmosphère contrôlée. La durée de vie microbiologique des produits est allongée sans ajout de conservateur. Le système d'inhibition dépend de la température. Ainsi, la croissance de la CP et la production de bactériocine s'activent en cas de rupture de la chaîne du froid. Les limitations de l'utilisation de CP sont : leur spectre d'action qui peut être réduit, le développement possible de résistance dans les cultures cibles et l'incapacité pour la plupart des systèmes à inhiber les bactéries à Gram négatif.

Le développement d'un procédé de biopréservation est un processus complexe. L'inhibition dépendra de la vitesse de croissance de la CP et des MPA, ainsi que de la vitesse de production des substances inhibitrices. Ceci est déterminé par les paramètres intrinsèques de l'aliment et des facteurs extrinsèques comme la quantité et la qualité des CP utilisés.

Les premiers produits de la mer biopréservés conditionnés sous atmosphère contrôlée sont commercialisés depuis deux ans en France. Il s'agit par exemple de crevettes décortiquées dont la DLC est doublée grâce à la biopréservation (10 jours au lieu de 5). Ces premières réalisations laissent espérer un développement industriel et commercial pour ces produits frais biopréservés.

## Bibliographie

AFSSA. (2002). Recommandations du 22 novembre 2002 « Recommandations pour la présentation des données permettant l'évaluation de l'innocuité des microorganismes utilisés dans le secteur agro-alimentaire (souches nouvelles ou modifiées, application différente de souches déjà utilisées) ». [www.afssa.fr](http://www.afssa.fr).

Brillet A., Pilet M.F., Prévost H., Bouttefroy A., Leroi F. (2004). "Biodiversity of *Listeria monocytogenes* sensitivity to bacteriocin-producing *Carnobacterium* strains and application in sterile cold-smoked salmon". *Journal of Applied Microbiology*. Sous presse.

Connil N., Prévost H., Dousset X. (2002). "Production of biogenic amines and divercin V41 in cold smoked salmon inoculated by *Carnobacterium divergens* V41, and specific detection of this strain by multiplex PCR". *Journal of Applied Bacteriology*. **92**-611-617.

Ennahar S., Sashihara T., Sonomoto K., Ishizaki A. (2000). "Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity". *FEMS Microbiology Review*. **24**-85-106.

Leroi, F., Joffraud, J.J., Chevalier, F., Cardinal, M. (1998). "Study of the microbial ecology of cold-smoked salmon during storage at 8 degrees C". *International Journal of Food Microbiology*. **39**-111-121.

Nilsson L., Graham L., Huss S.H. (1999). "Growth control of *Listeria monocytogenes* on cold smoked salmon using a competitive lactic acid bacteria flora". *Journal of Food Protection*. **62**-336-342.

Notermans S. Dufrenne J., Lund B.M. (1990). "Botulism risk of refrigerated processed foods of extended durability". *Journal of Food Protection*. **53**-1020-1024.

Pilet M. F., Dousset X., Barré R., Novel G., Desmazeaud M., Piard, J. C. (1995). "Evidence for two bacteriocins produced by *Carnobacterium piscicola* and *Carnobacterium divergens* isolated from fish and active against *Listeria monocytogenes*". *Journal of Food Protection*. **58**-256-262.

Rodgers S. (2001) "Preserving non-fermented refrigerated foods with microbial cultures". *Trends in Foods Science and technology*. **12**-276-284.

Sheard M.A. (1999). "Marketing and technological competence key to the development of the UK and sous vide market ". Proceeding of the third European symposium on sous vide. Leuven, Belgium, 419-436.

Stiles M.E. (1996). "Biopreservation by lactic acid bacteria". *Antonie von Leeuwenhoek*. **70**-331-345.

### **Remerciements**

Les recherches concernant la biopréservation au Laboratoire de Microbiologie Alimentaire et Industrielle de l'ENITIAA sont réalisées en collaboration avec l'IFREMER et soutenues par la région des Pays de la Loire, l'Union Européenne (projet intégré SEAFOODplus) et la CITPPM (Confédération des Industries de Traitement des Produits des Pêches Maritimes).

## **Sélection et caractérisation de souches de *Carnobacterium* pour la biopréservation du saumon fumé**

Afin de développer une stratégie de biopréservation du saumon fumé envers *Listeria monocytogenes*, la capacité d'inhibition de 3 souches de *Carnobacterium* isolées de poisson et productrices de bactériocine a été testée. *C. divergens* V41 maintient le niveau de *Listeria* à moins de 50 UFC/g dans le saumon fumé stérile pendant 28 jours à 4 et 8°C grâce à l'action de la divercine V41. Pour son utilisation dans le produit, la culture de la souche a été optimisée sur un milieu sans protéine animale. Sur saumon fumé commercial, la souche inhibe légèrement les flores endogènes et n'altère pas la qualité sensorielle mais elle produit une amine biogène, la tyramine. Un mutant tyramine négatif a été obtenu par mutagenèse chimique. Sa caractérisation a montré qu'il ne possède pas d'activité enzymatique du fait de la présence d'une mutation stable dans le gène de structure de la tyrosine décarboxylase (1863 pb). Le mutant *C. divergens* V41A8 a les caractéristiques d'un bon agent de biopréservation.

### **Mots clés :**

biopréservation, *Carnobacterium*, divercine V41, *Listeria monocytogenes*, saumon fumé, tyramine, tyrosine décarboxylase.

\* \* \*

## **Selection and characterisation of *Carnobacterium* strains for the biopreservation of cold-smoked salmon**

In order to develop a biopreservation strategy in cold-smoked salmon, the inhibitory capacity of 3 bacteriocin-producing *Carnobacterium* strains isolated from fish have been tested towards *Listeria monocytogenes* strains. *C. divergens* V41 maintains the level of *Listeria* below 50 CFU/g in sterile cold-smoked salmon during the 28 days of vacuum storage at 4 and 8°C, thanks to the divercin V41 action. For its use in the product, the culture of the strain was optimized in a growth medium without animal protein. On commercial cold-smoked salmon slices, the strain inhibits slightly the endogenous microflora and doesn't modify the sensorial quality, but it produces tyramine, a biogenic amine. A non-producing tyramine mutant was obtained by chemical mutagenesis. This mutant was characterized and showed no enzymatic activity due to a stable mutation in the structural gene of tyrosine decarboxylase (1863 bp). The mutant *C. divergens* V41A8 has the characteristics of a good biopreservation agent.

### **Keywords :**

biopreservation, *Carnobacterium*, divercin V41, *Listeria monocytogenes*, cold-smoked salmon, tyramine, tyrosine decarboxylase.

## RESUME

Traditionnellement utilisé pour la conservation, le procédé de salage-fumage du saumon, désormais surtout appliqué à des fins organoleptiques, met en œuvre des traitements de plus en plus allégés. Cette tendance, associée à une conservation réfrigérée sous vide assez longue et au fait que le produit est consommé cru, engendre un risque sanitaire lié à la présence et la croissance possible de *Listeria monocytogenes* dans le produit.

Ce projet de thèse consiste à développer une stratégie de biopréservation du saumon fumé vis à vis du risque *L. monocytogenes*, tout en garantissant la qualité organoleptique des produits. Dans un premier temps, les capacités d'inhibition de trois souches productrices de bactériocine, *Carnobacterium piscicola* SF668 et V1 et *Carnobacterium divergens* V41 sont étudiées vis-à-vis d'une large gamme de souches de *Listeria monocytogenes* isolées du saumon fumé et des ateliers de production. Ensuite, le potentiel d'altération de ces trois souches est testé sur saumon fumé stérile. A l'issue de ces études, *C. divergens* V41, la souche la moins altérante montrant le profil d'inhibition le plus intéressant est sélectionnée pour être ensemencée sur des lots de saumon fumé du commerce. La souche ne modifie pas ou peu les caractéristiques organoleptiques du produit et inhibe légèrement les flores endogènes responsables de l'altération organoleptique présentes naturellement sur les produits. De plus, l'activité anti-listeria est démontrée par la seule production de divercine V41 grâce à l'obtention d'une souche de *C. divergens* V41 non productrice de bactériocine. Parallèlement, la culture de *C. divergens* V41 est optimisée en fermenteur dans un milieu de culture dépourvu de protéines d'origine animale en vue de son utilisation potentielle dans les poissons fumés.

Le second objectif est d'approfondir les connaissances sur les activités de décarboxylation d'acides aminés par les souches de *Carnobacterium*, pouvant conduire à la production d'amines biogènes indésirables. La tyramine, issue de la décarboxylation de la tyrosine, est la seule amine produite par les *Carnobacterium* dans le saumon fumé. Un mutant tyramine négatif de la souche sélectionnée dans la première partie des travaux, et appelé *C. divergens* V41A8, a été obtenu par mutagenèse chimique afin qu'il soit utilisable dans le saumon fumé d'un point de vue réglementaire. Le gène de structure de la tyrosine décarboxylase (TDC) a ensuite été mis en évidence et séquencé chez la souche sauvage et chez le mutant (1863 pb). L'observation d'une transition G→A au niveau d'un nucléotide a conduit à l'apparition d'un codon stop chez le mutant, expliquant ainsi la stabilité de ce dernier. De plus, la souche *C. divergens* V41A8 présente des caractéristiques d'inhibition et d'altération similaires à celles de la souche sauvage. L'ensemble de ces caractéristiques, associé au fait que *C. divergens* V41A8 soit incapable de produire de la tyramine, font que cette souche est également un bon candidat comme agent de biopréservation des poissons fumés. Parallèlement, le séquençage du gène de structure de la TDC permet d'enrichir les données génétiques concernant la tyrosine décarboxylase des bactéries, notamment pour développer des outils moléculaires de détection ou de quantification des microorganismes producteurs de tyramine dans les aliments.

### Mots clés :

biopréservation, *Carnobacterium*, divercine V41, *Listeria monocytogenes*, saumon fumé, tyramine, tyrosine décarboxylase.