

---

## Des bactéries marines pour la conservation des aliments

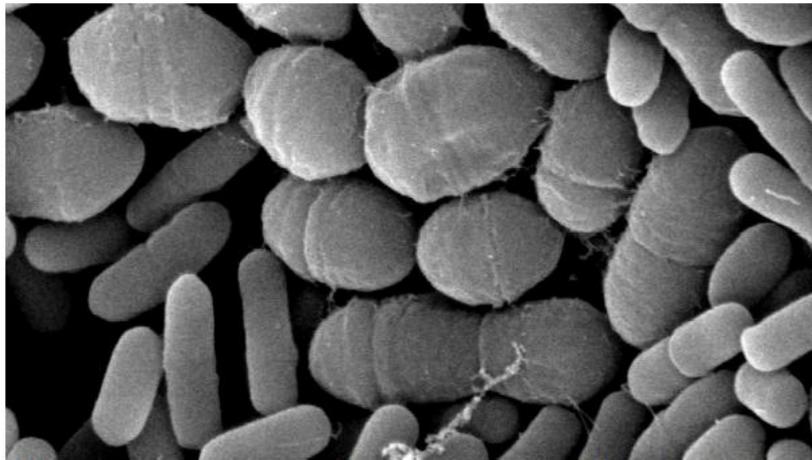
Leroi Françoise <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Ifremer, Laboratoire Écosystèmes microbiens et molécules marines pour les biotechnologies (EM3B), Département de biotechnologie des ressources marines (BRM), Nantes, France

---

### Résumé :

Bien que recherchés pour leurs qualités nutritionnelles, les produits alimentaires marins sont associés à de nombreux risques sanitaires, dont plusieurs leur sont relativement spécifiques. L'utilisation de bactéries dites « protectrices » est une solution innovante pour lutter contre le développement d'agents pathogènes ou altérants et pour garantir la qualité et la sécurité de ces produits.



SOL24h -05.jpg Photo en microscopie à balayage (grossissement 20 000) de *Lactococcus piscium* (coque) et *Listeria monocytogenes* (bâtonnet)  
© Ifremer

Avec les nouvelles habitudes alimentaires, le désir accru de manger bon et sain et les nouvelles tendances culinaires, toute une gamme de produits de la mer s'est développée : des produits consommés crus (sushi, carpaccio, tartare de poisson), des produits légèrement préservés (fumé, mariné, salé), des produits élaborés prêt à consommer (salade et terrine de la mer, crevette cuite décortiquée, saucisse de poisson) ou encore des produits dont le conditionnement est pratique lors de l'acte d'achat (poisson ou coquillage frais conservés sous vide ou sous atmosphère modifiée)... Ces produits peu stabilisés sont très fragiles d'un point de vue microbologique puisque des bactéries pathogènes ou altérantes, naturellement présentes dans le milieu marin ou provenant de recontaminations, peuvent s'y développer. De

10 à 20 % des épidémies alimentaires sont liées à la consommation de produits de la mer et on estime à plus de 20 % les pertes de produits liées à la dégradation microbienne.

La qualité et la sécurité microbiologique des aliments en général est basée sur l'application de différents traitements pour éliminer les micro-organismes et/ou empêcher leur développement dans le produit au cours de la conservation. Les traitements classiques de décontamination comme la chaleur provoquent des dénaturations sensorielles inacceptables pour ces produits délicats et les technologies douces plus modernes (lumière pulsée, hautes pressions) ne sont pas efficaces. Par ailleurs, les additifs chimiques autorisés sont souvent mal perçus par le consommateur.

## **La biopréservation**

La biopréservation, ou bioconservation, est une méthode de conservation des aliments faisant appel à des micro-organismes ou que l'on appelle alors des cultures protectrices ou à leurs métabolites naturels (1). Cette technologie qui consiste à ensemercer un aliment avec un micro-organisme non pathogène pour empêcher le développement d'autres microbes indésirables s'apparente à la lutte biologique utilisée en agronomie pour éliminer des nuisibles au moyen de leurs prédateurs naturels. L'utilisation de bactéries pour la conservation des aliments est ancestrale dans les produits fermentés où l'acidification est souvent responsable de la conservation. Son recours pour les produits délicats ou peu ou pas stabilisés par des traitements technologiques classiques mais dans lesquels aucune modification sensorielle et nutritionnelle n'est souhaitée ou ne date que d'une dizaine d'années.

Les bactéries lactiques ou regroupant 14 genres bactériens à Gram positif capables de produire de l'acide lactique ou sont de bonnes candidates pour la biopréservation car (i) elles possèdent de nombreuses propriétés antibactériennes naturelles; (ii) elles font partie de la flore commune de nombreux aliments; (iii) elles sont reconnues comme non dangereuses pour la santé humaine; (iv) elles bénéficient d'une image de santé véhiculée par les produits laitiers auprès des consommateurs.

Les travaux sur la biopréservation des produits de la mer sont récents puisque ce n'est que dans les années 1990, avec l'essor des produits marins transformés, que la présence naturelle de bactéries lactiques a été mise en évidence dans ces aliments. Si quelques études avaient démontré les potentialités de certaines bactéries en milieu modèle, c'est à l'Ifremer qu'eurent lieu les premiers travaux d'application de la biopréservation en produits (2). Le challenge consistait à sélectionner des bactéries peu acidifiantes, bien adaptées à la chair de poisson - pauvre en sucre - et capables de se développer aux températures de conservation des produits de la mer (soit entre 0 et 4°C); trois caractéristiques peu classiques chez les bactéries lactiques. Alors que la plupart des études utilisaient des bactéries isolées de produits laitiers ou carnés, la stratégie a consisté à cribler des bactéries d'origine marine, bien adaptées à la matrice à biopréserver (Figure 1).

## **Maîtrise des risques sanitaires**

La majeure partie des études publiées portent sur l'inhibition de *Listeria monocytogenes*, un pathogène majeur dans les produits de la mer légèrement préservés et mortel dans 30 % des cas. Les bactéries du genre *Carnobacterium* semblent indiscutablement être les bactéries les plus efficaces (3). Ainsi deux souches de *Carnobacterium maltaromaticum* et *Carnobacterium divergens* (propriété Ifremer/Oniris<sup>\*1</sup>) ont été sélectionnées pour leur activité contre *L. monocytogenes*. Elles empêchent totalement la croissance de ce pathogène dans les produits de la mer qui ne dépasse ainsi jamais les seuils réglementaires (100 *L. monocytogenes*/g) au cours de la conservation du produit (4). Elles ne modifient pas les

qualités organoleptiques\*<sup>2</sup> des produits traités (5). Des critères de sécurité sanitaire, comme l'absence de composés toxiques (telle que histamine par exemple), de résistance aux antibiotiques ou d'invasion cellulaire ont été apportés. Ces souches sont valorisées par un producteur de ferments pour une application sur des poissons frais et transformés. D'autres espèces comme *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus curvatus*, *Enterococcus faecium* ou *Pediococcus acidilactici* sont également intéressantes mais leur activité n'a été montrée que sur *Listeria innocua* (6).

L'histamine est la première cause de toxi-infections liées à la consommation de poisson. Elle se forme à la mort du poisson par la décarboxylation de l'histidine sous l'action d'une enzyme d'origine bactérienne, l'histidine décarboxylase. Les poissons incriminés sont des espèces riches en histidine comme le thon, le maquereau, la sardine, le hareng ou l'anchois. Les bactéries responsables sont en général des bactéries Gram négatif à croissance très rapide et faiblement sensibles aux bactéries lactiques. Aussi, on trouve très peu d'études concluantes sur le traitement du problème histaminique par la biopréservation. Seuls quelques travaux citent l'effet de *Staphylococcus carnosus*, *Staphylococcus xylosus* et de bactéries lactiques ou d'archées dans des sauces fermentées, des saucisses de carpe ou des anchois salés (7). Cependant, la réduction de l'histamine reste en général insuffisante pour une application industrielle. Récemment, une souche de *Lactobacillus sakei* a été sélectionnée pour ses capacités à empêcher la formation du dérivé toxique dans du thon cuit ou fumé. L'utilisation de ce ferment permet de maintenir la concentration en histamine inférieure aux seuils réglementaires en Europe et aux États-Unis. Un brevet a été déposé en 2013 par Ifremer et Oniris pour assurer la valorisation de cette découverte (8).

Enfin, des flores protectrices ont donné des résultats prometteurs sur *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*, des bactéries pathogènes provenant généralement de contaminations d'origine humaine lors de la transformation des aliments (3).

### **Maîtrise des bactéries d'altération**

La réduction des pertes alimentaires liées au développement de micro-organismes altérants est un challenge important. La dégradation organoleptique est liée à la présence d'un mélange complexe d'espèces bactériennes à Gram positif et négatif. Les cultures protectrices doivent alors présenter un large spectre d'inhibition et leur efficacité ne peut être testée que par une analyse sensorielle, une procédure beaucoup plus lourde à mettre en place qu'un simple dénombrement bactérien. Les premiers travaux datent des années 2000. Des souches de *Leuconostoc mesenteroides*, *L. plantarum*, *Streptococcus phocae* et *E. faecium* ont donné des résultats intéressants sur de la pulpe et de la chair hachée de poisson, des sardines et des crevettes (1). Des souches de *Lactococcus piscium* et *Leuconostoc gelidum* ont fait l'objet d'études approfondies à l'Ifremer. Des tests organoleptiques ont montré une augmentation remarquable des durées de conservation de crevettes cuites décortiquées et de saumon fumé (9). Ces souches sont exceptionnellement adaptées au froid et ne poussent pas à des températures supérieures à 30 °C, ce qui est un atout pour permettre le contrôle de l'hygiène des procédés. En effet, le dénombrement de la flore totale d'un aliment, reflet de sa qualité, est effectué à 30 °C. À cette température, les cultures protectrices sélectionnées ne sont pas dénombrables et ne masquent ainsi pas les résultats du contrôle. Par ailleurs, ce caractère garantit l'absence de développement dans le tractus gastro-intestinal humain et apporte un élément supplémentaire de sécurité sanitaire. Outre l'altération, elles retardent la croissance de *L. monocytogenes* et de *Staphylococcus aureus* (9,10).

### **Mode d'action des cultures protectrices**

L'effet protecteur des bactéries lactiques est souvent attribué à la production d'acides organiques, de peroxyde d'hydrogène ou de peptides antimicrobiens comme les bactériocines. Dans le cas de l'inhibition de *L. monocytogenes*, les bactériocines\*<sup>3</sup> de classe IIa sont fréquemment responsables de cette effet. Ce sont de petits peptides thermostables à activité très ciblée qui forment des pores dans la membrane bactérienne. *C. divergens* et *C. maltaromaticum* produisent la divercine et deux piscicolines clairement responsables de l'effet protecteur. Des études ont comparé l'utilisation de la bactérie vivante ou de la bactériocine partiellement purifiée, avec des résultats variables selon les souches (11,12). Une compétition, au sein des communautés bactériennes, pour certains nutriments est également évoquée pour expliquer l'effet protecteur mais souvent elle est difficile à démontrer en matrice alimentaire.

Le mécanisme d'inhibition de *L. monocytogenes* par *L. piscium* est quant à lui totalement différent et encore en cours d'étude. Il ferait intervenir le contact cellulaire entre la culture protectrice et la cible, ce qui n'a encore jamais été décrit chez les bactéries lactiques (13). Dans ce cas, il est nécessaire que *L. piscium* ait atteint un niveau suffisant ( $10^{7-8}$  cfu/g) pour observer une inhibition.

La limitation de l'histamine peut être liée à l'inhibition de la croissance des souches histaminogènes ou parfois à la consommation de l'histamine formée par des espèces comme *S. xylosum*.

Concernant l'effet sur l'altération, il n'est pas toujours certain que l'amélioration soit en relation directe avec la prévention du développement des bactéries altérantes. Des améliorations sensorielles sont en effet parfois obtenues sans pour autant observer d'inhibition de flores spécifiques d'altération. D'autres mécanismes portant sur le métabolisme des souches pourraient rentrer en jeu.

### **Une technologie prometteuse**

La recherche de technologies de conservation des aliments moins coûteuses en énergie que les méthodes traditionnelles (le froid par exemple) et alternatives à l'utilisation d'antibiotiques et autres additifs chimiques est une préoccupation mondiale. Les bactéries, et certainement les bactéries marines, constituent un réservoir énorme et largement sous exploré pour apporter des réponses à ces questions sociétales. La biopréservation des aliments suscite un intérêt grandissant, avec une intensification des prises de brevet et des publications depuis les années 2000, ainsi qu'une augmentation des ventes de bactéries protectrices ces quatre dernières années. Une réglementation claire sur le statut des cultures protectrices (ferment ou additif) est actuellement en débat au niveau européen et sur les critères de sécurité sanitaire requis pour la mise sur le marché de nouvelles souches microbiennes contribuera à l'intensification de ce secteur encore jeune. En France, les membres du réseau mixte technologique « Florepro », soutenu par l'Association de coordination technique pour l'industrie agroalimentaire, travaillent activement à l'évaluation et à la promotion de cette technologie, en relation avec les producteurs et utilisateurs de ferments, les consommateurs, les chercheurs et les pouvoirs publics (14).

\*<sup>1</sup> L'École nationale vétérinaire, agroalimentaire et de l'alimentation, Nantes-Atlantique

\*<sup>2</sup> relatif aux qualités sensorielles d'un produit.

\*<sup>3</sup> peptides ou protéines synthétisés naturellement par des bactéries

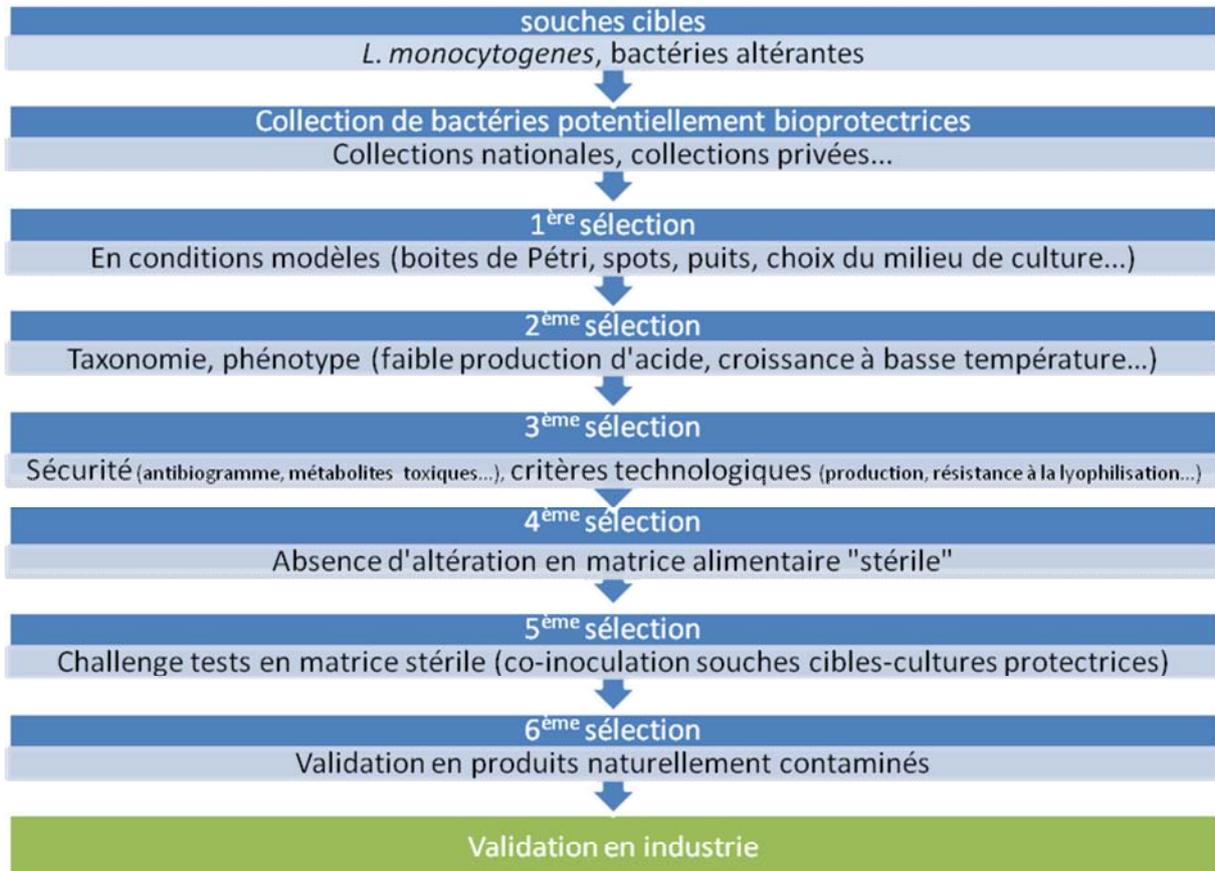
### **Références bibliographiques**

(1) Zagorec M, Christieans S (2013) *Flores protectrices pour la conservation des aliments* Editions Quæ

- (2) Leroi, F *et al.* (1996) *Int J Food Sci Tech* 31, 497-504
- (3) Lacroix C (2011) *Protective cultures, antimicrobial metabolites and bacteriophages for food and beverage biopreservation* Whoodhead Publishing Limited, pages 324-47
- (4) Brillet A *et al.* (2004) *J App Bacteriol* 97, 1029-37
- (5) Brillet A *et al.* (2005) *Int J Food Microbiol* 104, 309-24
- (6) Leroi F (2010) *Food Microbiol* 27, 698-709
- (7) Podeur G (2014) *Maîtrise de la formation de l'histamine dans les produits de la mer par le procédé de biopréservation* Thèse de doctorat, Université Nantes
- (8) Leroi F *et al.* (2013) Brevet FR 1353586. Déposants Ifremer et Oniris
- (9) Matamoros S *et al.* (2009) *J Food Protect* 72, 365-74
- (10) Fall PA *et al.* (2010) *J Aquat Food Prod Tech* 19, 84-92
- (11) Duffes FC *et al.* (1999) *J Food Protect* 62, 1394-403
- (12) Katla T *et al.* (2001) *Food Microbiol* 18, 431-9
- (13) Fall PA (2011) *Impact et modélisation des paramètres physico-chimiques et des interactions bactériennes sur la croissance des micro-organismes pathogènes et altérants dans les produits de la mer, application à la crevette tropicale.* Thèse de doctorat, Université de Nantes
- (14) [tinyurl.com/FLOREPRO](http://tinyurl.com/FLOREPRO)

### Figure 1 : Stratégie de sélection de cultures protectrices

La première étape consiste à identifier les bactéries cibles à éliminer (Quel pathogène ? Quelle bactérie d'altération ?). Les cultures protectrices à tester peuvent être des micro-organismes déjà commercialisés pour certaines applications alimentaires ou isolés de différents aliments par les chercheurs ou les industriels eux-mêmes. Ils sont ensuite testés pour leurs potentialités inhibitrices selon les différentes étapes décrites.



### **Applications industrielles et réglementation**

Les applications industrielles de la biopréservation dans les aliments, et en particulier dans les produits de la mer, sont encore assez peu nombreuses mais suscitent de plus en plus l'intérêt des industriels. Citons la société nantaise Biocéane qui commercialise le ferment LLO pour conserver les crevettes et le producteur de ferment Sacco qui a récemment développé le ferment Lyoflora pour des applications antilisteria dans le saumon et d'autres produits de la mer.

L'absence de texte réglementaire concernant l'usage des cultures bactériennes à des fins de biopréservation des aliments est sans doute un frein. Cependant, une réflexion est engagée au niveau français et européen sur le statut des cultures protectrices, à laquelle participe activement les membres du Réseau mixte technologique « Florepro »(14). La crainte d'une perception négative par le consommateur ou les producteurs, ou de l'obligation d'étiquetage sous certaines rubriques, alimente aussi le débat. Néanmoins, quelques travaux récents montrent que le consommateur verrait plutôt favorablement l'utilisation de flores protectrices. Les études sur cette technologie de conservation sont relativement récentes au regard de celles qui concernent les aliments fermentés mais ce marché encore jeune est en expansion.