

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC  
INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE  
CENTRE INRS-INSTITUT ARMAND-FRAPPYER SANTÉ ET BIOTECHNOLOGIE

**MISE AU POINT DE FORMULATIONS ANTIMICROBIENNES ET  
APPLICATION POUR LA VIANDE FRAICHE ET TRANSFORMÉE**

**Par**

**Gildas Gaëlle Domguia Foudjing**

Mémoire présenté pour l'obtention du grade de Maître en sciences (M. Sc.) en **Microbiologie**  
**Appliquée**

Jury d'évaluation

Examineur interne et  
Président du jury

Pr Charles Dozois  
INRS Centre INRS- Institut Armand-Frappier  
Santé et biotechnologie

Examineur externe

Pr Paul Angers  
Université Laval

Directrice de recherche

Pre Monique Lacroix  
INRS Centre INRS- Institut Armand-Frappier  
Santé et biotechnologie

*A mes parents, qui  
m'ont bercée et m'inculqué  
des bonnes valeurs*

*A mes frères et sœurs, qui  
m'ont soutenue et encouragée*

*A mes enfants, ma source  
d'inspiration et de motivation*

*A mon époux pour sa patience,  
son amour et sa tendresse*

## REMERCIEMENTS

Parce qu'une seule main ne peut faire un balai, ce travail est le fruit d'une équipe forte et dynamique.

Mes sincères remerciements vont à l'endroit de :

Pre Monique Lacroix, qui a supervisé et encadré ce travail. Pour l'orientation scientifique, la grande attention et la disponibilité accordées à ce travail, je vous suis infiniment reconnaissante. Votre humilité et votre caractère simpliste dépassent tout enseignement. Merci pour votre soutien et pour cette opportunité. Trouvez ici, l'expression de ma profonde gratitude.

M. Stéphane Salmieri. Votre rigueur scientifique et votre simplicité de cœur sont des exemples pour moi. Merci pour tous nos échanges.

Mes stagiaires Monique Momeni et Thibault Hemzacek. Merci pour l'aide précieuse que vous avez apportée pour l'accomplissement de ce travail.

Les membres du laboratoire : Jumana Mahmud, Tofa Begum, Alexandra Gobeil, Ghada Sassi, Chaima Dridi, Athishparsuram Balaji, Johanne Manus, Mohammad Masoomian, Karelle Contant, Shams Zahra, Jiali Ji, Hallahdad Zahra et Elham Sarmast. J'ai eu la chance de vous rencontrer et je chérirai à jamais les moments que nous avons partagés.

Mes parents M. et Mme Foudjing. Votre soutien et vos conseils sont pour moi l'expression même de votre amour inconditionnel. Je vous aime très fort.

Mes frères et sœurs : Chimène Djuikouo, Nathalie Kouchieu, Maxime Tessouop, Coralie Djuidje, Laure Keumogne, Marlyse Guemning, Karelle Komguem, Lynda Mekue et Shomron Sougang. Merci pour les fous rires et nos moments vitaminés. Vous êtes ma force. Je vous serai à jamais reconnaissante pour votre soutien et vos multiples conseils.

Mes beaux-frères, belles sœurs et ami(e)s: Casimir Djoko, Lydie Kapnang, Mireille Dioni et Dominique Essome. Merci pour votre soutien démesuré. Je suis heureuse de vous avoir à mes côtés.

Mes enfants Raphaël Tessouop et Emmanuel Tchokouassi. Merci pour la joie que vous me procurez chaque jour. C'est en vous que je trouve la persévérance pour accomplir toute œuvre.

Mon époux Stéphane Kamtcheu, pour avoir cru en moi. Merci pour ton épaule et ton amour qui me donnent des ailes.

Tous ceux dont les noms ne figurent pas ici, mais qui ont contribué d'une manière ou d'une autre à l'édifice de ce travail. Veuillez agréer ma profonde gratitude.

## RÉSUMÉ

Cette étude visait à développer des formulations antimicrobiennes à base d'huiles essentielles (HE) et de bactériocine pour prolonger la durée de conservation des produits carnés. Dans un premier temps, l'optimisation de la production de bactériocines par les bactéries lactiques présentes dans deux ferments commerciaux (ferments FLC et MnF) a été réalisée en variant les conditions de culture de ces bactéries, et l'activité antimicrobienne des bactériocines a été mesurée par la méthode de diffusion des puits. Les résultats ont montré que la production de bactériocine par les bactéries lactiques du ferment FLC était améliorée dans le bouillon MRS contenant du mannose et de l'extrait de levure, avec un pH initial de 5 dans une fermentation conduite à 28 °C et l'activité était de 2044,44 UA/mL. L'activité antimicrobienne des bactéries lactiques du ferment MnF a été améliorée avec de la peptone de pois ajoutée au milieu MRS avec un pH initial de 6,5 dans une fermentation conduite à 24 °C et l'activité était de 188,89 UA/mL. La CMI des bactériocines du ferment FLC et d'autres composés dont l'extrait de citron, la formulation méditerranéenne, et les huiles essentielles de thym, *Cinnamon tamala* et *Cinnamon zeylanicum* a ensuite été déterminée par le test de microdilution sur des bactéries pathogènes et détérioration de la viande. La méthode du damier a par la suite été utilisée pour évaluer l'effet combiné de ces antimicrobiens. Les résultats ont montré que l'extrait de citron, la formulation méditerranéenne, les HE de thym, *Cinnamon tamala* et *Cinnamon zeylanicum* ont inhibé la croissance des bactéries testées à des concentrations comprises entre 20 et 5 000 ppm ; sauf *Pseudomonas aeruginosa*, qui n'a pas été inhibé par le thym. La bactériocine du ferment FLC a montré une activité entre 10000 et 80000 ppm contre les bactéries G+ sauf *Lactobacillus sakei* mais n'a eu aucun effet sur les bactéries G- sauf *Pseudomonas aeruginosa*. La combinaison des antimicrobiens bactériocine/*Cinnamon tamala*/*Cinnamon zeylanicum* ou *Cinnamon tamala*/*Cinnamon zeylanicum* ou thym/formulation méditerranéenne/extrait de citron a eu un effet synergique ou additif sur toutes les bactéries; mais la combinaison antimicrobienne bactériocine/thym/formulation méditerranéenne/extrait de citron n'a montré aucune interaction sur les bactéries *E. coli* O157 : H7 380-94, *E. coli* O157 : H7 RM1239, *E. coli* O157 : H7 RM1931, *S. Typhimurium* 1344 et *S. enterica*. Afin de protéger l'efficacité et assurer une libération contrôlée des formulations antimicrobiennes, l'encapsulation dans la gélatine de ces derniers a été envisagée. L'encapsulation dans la gélatine a maintenu plus longtemps la disponibilité en antimicrobiens durant le stockage, comparativement aux antimicrobiens libres. L'utilisation de formulations antimicrobiennes encapsulées a permis de maintenir des concentrations de TBARS plus faibles, de réduire la détérioration de la couleur et de prolonger de 2 jours la durée de conservation des boulettes de viande en termes d'analyse microbienne par rapport au contrôle et aux échantillons avec des antimicrobiens libres.

**Mots clés** : bactéries lactiques, paramètres de croissance, bio-conservateurs, encapsulation, durée de vie, évaluation sensorielle, produits carnés.

## ABSTRACT

This study aimed to develop antimicrobial formulations based on essential oils (EOs) and bacteriocin to extend the shelf life of meat products. Initially, the optimization of the production of bacteriocins by the lactic acid bacteria present in two commercial ferments (FLC and MnF ferments) was carried out by varying the culture conditions of these bacteria, and the antimicrobial activity of the bacteriocins was measured by the well diffusion method. The results showed that the bacteriocin production by lactic acid bacteria of the FLC ferment was improved in MRS broth containing mannose and yeast extract, with initial pH of 5 in a fermentation conducted at 28 °C and the activity was 2044.44 UA/mL. The antimicrobial activity of lactic acid bacteria of MnF ferment was improved with MRS medium containing pea peptone with initial pH of 6.5 in a fermentation conducted at 24 °C and the activity was 188.89 UA/mL. The MIC of the bacteriocins of the FLC ferment as well as for other compounds including the citrus extract, the Mediterranean formulation, and the essential oils of thyme, *Cinnamon tamala* and *Cinnamon zeylanicum* was then determined by the microdilution test on a set of pathogenic and spoilage bacteria of the meat. The checkerboard method was then used to assess the combined effect of these antimicrobials. The results showed that the citrus extract, Mediterranean formulation, *Cinnamon tamala*, *Cinnamon zeylanicum*, and thyme EOs inhibited the growth of the bacteria tested at concentrations between 20 and 5000 ppm; except *Pseudomonas aeruginosa*, which was not inhibited with thyme. The bacteriocin of the FLC ferment showed activity between 10,000 and 80,000 ppm against G<sup>+</sup> bacteria except *Lactobacillus sakei* but had no effect on G<sup>-</sup> bacteria except *Pseudomonas aeruginosa*. The combination of the antimicrobials bacteriocin/*cinnamon tamala*/*cinnamon zeylanicum* or *cinnamon tamala*/*cinnamon Zeylanicum* or thyme/Mediterranean formulation/citrus extract had a synergistic or additive effect on all bacteria; but the combination of bacteriocin / thyme/Mediterranean formulation/citrus extract antimicrobials did not show any interaction on *E. coli* O157: H7 380-94, *E. coli* O157: H7 RM1239, *E. coli* O157: H7 RM1931, *S. Typhimurium* 1344 and *S. enterica*. In order to protect the efficacy and ensure a controlled release of the antimicrobial formulations, the encapsulation in gelatin of the latter has been considered. Gelatin encapsulation maintained the available antimicrobials content to greater extent during storage compared to free antimicrobials. The use of encapsulated antimicrobial formulations kept lower TBARS concentrations, reduced color deterioration and prolonged by 2 days the shelf life of meatballs in terms of microbial analysis compared to the control and samples with free antimicrobials.

**Keywords:** lactic acid bacteria, growth parameters, bio-preservatives, encapsulation, shelf life, sensorial evaluation, meat products.

# TABLE DE MATIÈRES

Table des matières	
<b>REMERCIEMENTS</b> .....	iii
<b>RÉSUMÉ</b> .....	iv
<b>ABSTRACT</b> .....	v
<b>TABLE DE MATIÈRES</b> .....	vi
<b>LISTE DES FIGURES</b> .....	x
<b>LISTE DES TABLEAUX</b> .....	xi
<b>LISTE DES ABRÉVIATIONS</b> .....	xii
<b>CHAPITRE 1: REVUE DE LITTÉRATURE</b> .....	1
<b>1. Introduction</b> .....	1
<b>2. Les viandes</b> .....	2
<b>2.1. Consommation mondiale de la viande</b> .....	2
<b>2.2. Caractéristiques nutritionnelles de la viande</b> .....	3
<b>3. Altération des viandes</b> .....	3
<b>3.1. Oxydation des lipides</b> .....	4
<b>3.2. Détérioration de la couleur</b> .....	4
<b>3.3. Altération microbienne</b> .....	5
<b>3.4. Altération enzymatique autolytique</b> .....	6
<b>4. Quelques méthodes de conservation de la viande</b> .....	7
<b>5. Les bactériocines produites par les bactéries lactiques</b> .....	9
<b>5.1. Définition et propriétés antimicrobiennes des bactériocines</b> .....	9
<b>5.2. Production et optimisation des conditions de production des bactériocines par les bactéries lactiques</b> .....	10
<b>5.3. Classification des bactériocines</b> .....	11
<b>5.4. Mécanisme d'action des bactériocines</b> .....	14
<b>5.5. Applications alimentaires des bactériocines</b> .....	14
<b>5.6. Résistance aux bactériocines</b> .....	15
<b>6. Les huiles essentielles</b> .....	15
<b>6.1. Définition et propriétés antimicrobiennes des huiles essentielles</b> .....	15
<b>6.2. Mécanisme d'action des huiles essentielles</b> .....	16
<b>6.3. Applications alimentaires des huiles essentielles</b> .....	17

7. La technologie des barrières.....	18
8. Microencapsulation .....	20
8.1. Définition et généralités .....	20
8.2. Le matériau de la paroi.....	21
8.3. Libération contrôlée de la substance d'intérêt .....	21
8.4. Les techniques d'encapsulation.....	22
8.5. La microencapsulation dans l'industrie agroalimentaire.....	25
9. Hypothèse, but et objectifs du projet.....	26
9.1. Hypothèse.....	26
9.2. But.....	26
9.3. Objectifs spécifiques.....	26
9.4. Moyens pour atteindre les objectifs .....	26
<b>CHAPITRE 2: INFLUENCE OF GROWTH PARAMETERS ON BACTERIOCIN-LIKE INHIBITORY SUBSTANCES (BLIS) PRODUCED BY LACTIC ACID BACTERIA AND APPLICATION AGAINST <i>LISTERIA SPP.</i>.....</b>	<b>28</b>
Résumé .....	29
Abstract .....	31
1. Introduction .....	32
2. Material and Methods.....	33
2.1. Materials .....	33
2.2. Preparation of bacteria .....	33
2.3. Antibacterial activity of CFSs .....	34
2.3.1. Effect of fermentation temperature on BLIS production .....	34
2.3.2. Effect of the initial pH of fermentation on BLIS production .....	35
2.3.3. Effect of carbon sources on BLIS production.....	35
2.3.4. Effect of nitrogen sources on BLIS production .....	35
2.4. Sensitivity of the CFS-LC/PA to changes of pH and temperature.....	35
2.5. Statistical analysis.....	36
3. Results and Discussion .....	36
3.1. Antimicrobial activity of CFSs .....	36
3.2. Effect of Temperature on production of BLIS .....	37
3.3. Effect of the initial pH of the culture media on BLIS production .....	39
3.4. Effect of carbon sources on production of BLIS .....	41

3.5.	Effect of different nitrogen sources on BLIS production .....	42
3.6.	Sensitivity of the CFS-LC/PA to changes of pH and temperature.....	44
4.	Conclusions .....	45
	References .....	47
<b>CHAPITRE 3: EVALUATION OF COMBINED EFFECTS OF BIOPRESERVATIVES ON SENSORY QUALITY AND SHELF LIFE OF MEATBALLS .....</b>		<b>54</b>
	Résumé .....	56
	Abstract .....	58
1.	Introduction .....	59
2.	Materials and Methods .....	60
2.1.	Materials .....	60
2.2.	Microorganisms and growing conditions .....	60
2.3.	Minimum inhibitory concentration (MIC) of the antimicrobial compounds on the spoilage and pathogenic flora.....	60
2.4.	Determination of the synergistic effects between essential oils and bacteriocins by the checkerboard method.....	61
2.5.	Preparation of the nanoemulsion .....	62
2.6.	Encapsulation of the nanoemulsion .....	62
2.7.	Deep well model in BHI agar to assess depletion of antimicrobial activity.....	62
2.8.	Antimicrobial bioassay against <i>Carnobacterium divergens</i> .....	62
2.9.	<i>In situ</i> test on meatballs.....	63
2.9.1.	Meat processing .....	63
2.9.2.	Microbial analysis.....	63
2.9.3.	Lipid oxidation analysis .....	63
2.9.4.	Color measurement .....	64
2.9.5.	Sensory analysis.....	64
2.10.	Statistic analysis.....	64
3.	Results .....	65
3.1.	Minimum inhibitory concentration of antimicrobials on bacterial strains.....	65
3.2.	Fractional inhibitory concentration index of combined antimicrobials.....	67
3.3.	Availability of encapsulated or non-encapsulated antimicrobials during storage: <i>in vitro</i> test .....	68
3.4.	Microbial analysis.....	71
3.4.1.	<i>Brochothrix Thermosphacta</i> .....	71



3.4.2.	Lactic acid bacteria .....	71
3.4.3.	<i>Pseudomonas spp.</i> .....	71
3.4.4.	Total viable count .....	72
3.5.	Lipid oxidation.....	74
3.6.	Color .....	74
3.7.	Sensory analysis.....	75
4.	Discussion.....	76
5.	Conclusion.....	78
	References .....	79
	<b>CHAPITRE 4: DISCUSSION GÉNÉRALE.....</b>	<b>82</b>
	<b>CHAPITRE 5: CONCLUSION GÉNÉRALE .....</b>	<b>85</b>
	<b>RÉFÉRENCES .....</b>	<b>86</b>

# LISTE DES FIGURES

## CHAPITRE 1

**Figure 1:** Séquence et structure de lantibiotiques de type A (Nisine), B (Mersacidine) et d'un lantibiotique « two-peptides » (Lacticine 3147 A1 et A2). ..... 12

## CHAPITRE 2

**Figure 1:** Effect of temperature on the BLIS production by LC/PA bacteria..... 39

**Figure 2:** Effect of temperature on the BLIS production by LS bacterium ..... 39

**Figure 3:** Effect of pH on the BLIS production by LC/PA and LS bacteria ..... 41

**Figure 4:** Effect of carbon sources on the BLIS production by LC/PA and LS bacteria ..... 42

**Figure 5:** Effect of nitrogen sources on the BLIS production by LC/PA and LS bacteria ..... 44

**Figure 6:** Effect of pH variation on the antimicrobial activity of the CFS-LC/PA ..... 45

**Figure 7:** Effect of temperature variation and exposure time on the antimicrobial activity of the CFS-LC/PA ..... 45

## CHAPITRE 3

**Figure 1:** Available antimicrobial concentration of free Cinnamon tamala/Cinnamon zeylanicum (A), encapsulated Cinnamon tamala/Cinnamon zeylanicum (B), free Cinnamon tamala/Cinnamon zeylanicum/FLC ferment bacteriocin (C), and encapsulated Cinnamon tamala/Cinnamon zeylanicum/FLC ferment bacteriocin (D) against *Carnobacterium divergens* during storage at 4 °C in BHI agar. .... 70

**Figure 2:** Effects of antimicrobial formulations on *Brochothrix thermosphacta* (A), lactic acid bacteria (B), *Pseudomonas* spp. (C) and total viable count (D) during storage at 4°C of meatballs..... 73

**Figure 3:** Effects of different concentrations of antimicrobials on the sensory properties of meatballs. ... 76

## LISTE DES TABLEAUX

### CHAPITRE 1

<b>Tableau 1:</b> Séquence de quelques bactériocines de classe II .....	13
<b>Tableau 2:</b> les techniques de microencapsulation .....	22

### CHAPITRE 2

<b>Table 1:</b> Inhibitory activities against indicator strains of neutralized, cell-free supernatants from cultures of <i>Lactobacillus curvatus</i> / <i>Pediococcus acidilactici</i> and <i>Lactobacillus sakei</i> bacteria .....	37
---	----

### CHAPITRE 3

<b>Table 1:</b> Minimum inhibitory concentration of selected antimicrobials on different bacterial strains.....	66
<b>Table 2:</b> Fractional inhibitory concentration index (FIC) of combined antimicrobial compounds against target bacteria .....	68
<b>Table 3:</b> Effects of antimicrobial formulations on TBARS concentrations and color parameters of meatballs during storage.....	75

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

ATP = adenosine triphosphate

AU = arbitrary unit

aW = water activity (activité d'eau)

Ba = bacteriocin

BLIS = bacteriocin-like inhibitory substances

CFS = cell-free supernatant

CMI = Concentration minimale inhibitrice

Ct = *Cinnamon tamala*

Cz = *Cinnamon zeylanicum*

EDTA = acide éthylène diamine tétra-acétique

EOs = Essential oils

ERO = espèces réactives à l'oxygène

FAO = Food and Agriculture Organization of the United Nations (Organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture)

FIC = Fractional inhibitory concentration index (indice de concentration inhibitrice fractionnaire)

HE = huiles essentielles

LAB = Lactic acid bacteria

MA = Malonaldéhyde

MDA = Malondialdéhyde

Mf = Mediterranean formulation

MIC = Minimal inhibitory concentration

pHu = potentiel d'hydrogène ultime

TBARS = Thiobarbituric acid reactive substances

UFC = Unité formant colonie

# CHAPITRE 1: REVUE DE LITTÉRATURE

## 1. Introduction

La viande et ses dérivés sont un des quatre groupes alimentaires qui prend une place importante dans la consommation humaine. (**Ouattara et al., 1997**). L'industrie de la viande au Canada est la plus grande industrie de transformation alimentaire et l'un des secteurs manufacturiers les plus importants par ses ventes, dépassant 24,1 milliards de dollars (**CMC, 2016**). Selon une communication de Statistique Canada parue en 2011, l'industrie canadienne de la viande a réalisé des exportations de l'ordre 23,6 milliards de dollars. Ces exportations ont connu un accroissement substantiel comparativement aux données recueillies pour l'année 2009, où les chiffres de ventes de l'industrie de la viande et la volaille étaient de 21,3 milliards de dollars. Sur cette même période, les ventes des autres denrées de première nécessité présentaient des performances en dessous de celle de l'industrie de la viande : il s'agit des produits laitiers (13,2 milliards de dollars), des poissons et fruits de mer (3,5 milliards de dollars), des pains et boulangeries (6,1 milliards de dollars) et des fruits et légumes (7,4 milliards de dollars) (**CMC, 2012**). Ces chiffres permettent de classer le Canada parmi les exportateurs nets de produits de viande (**Amenan et al., 2018**). De telles données rendent compte de l'enjeu que représente la filière viande dans l'économie canadienne.

Du fait de sa richesse en nutriments (protéines, lipides, composés à faible poids moléculaire), son pH physiologique proche de la neutralité et son activité de l'eau élevée ( $a_w \sim 0,99$ ), la viande constitue un environnement particulièrement favorable à la croissance des microorganismes. C'est principalement cette facilité avec laquelle les microorganismes arrivent à croître qui définit le caractère périssable de la viande (**Saucier, 1999**). La courte durée de vie de la viande nécessite de développer des technologies de conservation (**Dave et al., 2011; Mello et al., 2014; Zhou et al., 2010**). Ces méthodes de conservation ont donc pour but de priver l'accès des éléments nutritifs aux microorganismes (**PPCP PB REST, 2008-2009**). Selon la **FAO (2016)**, 1,3 milliard de tonnes de nourriture sont perdues ou gaspillées chaque année dans le monde alors que seulement en Europe, 79 millions de personnes vivent en dessous du seuil de pauvreté et qu'un quart d'entre elles dépendent de l'aide financière gouvernementale (**Godard et al., 2014**). Un constat alarmant et accablant quand on sait les répercussions du point de vue social, économique et environnemental, mais aussi que 795 millions de personnes meurent de faim ou de malnutrition chaque année dans le monde. Toujours d'après les données de la **FAO (2016)**, la viande à elle seule subit plus de 20% de pertes. **Kantor et al. (1997)** ont signalé qu'environ 3,5 milliards de kg de volaille et de viande ont été gaspillés au niveau des consommateurs, des détaillants et des services alimentaires. Une partie importante de cette perte est due à la détérioration microbienne. **Cervený et al. (2009)** ont déclaré que si 5 % de cette perte de viande était conservée, elle pourrait satisfaire les besoins quotidiens d'environ 320 000 personnes en viande et volaille. D'après **Saucier (2016)**, la réduction des déchets et la détérioration, passe

par des stratégies efficaces pour améliorer le contrôle microbien des produits carnés, car ces derniers sont denses en nutriments et hautement périssables.

Soucieux de résoudre ce problème, tout en se conformant à la demande des consommateurs qui exigent des aliments naturels exempts d'agents conservateurs d'origine chimique, les chercheurs et les industriels de l'agroalimentaire se penchent de plus en plus sur d'autres alternatives. Ils privilégient en effet des techniques de préservation beaucoup plus douces conduisant à l'obtention d'aliments présentant un aspect beaucoup plus naturel avec une qualité nutritive excellente. Ces techniques sont notamment basées sur l'activité antimicrobienne naturelle associée à certains composés ayant prouvé leur efficacité, notamment les huiles essentielles (**Oussalah et al., 2007; Burt et al., 2003**) et les métabolites tels que les bactériocines sécrétées par les bactéries lactiques (**Plummer et al. 2004; Millette et al., 2007a**); ou sur l'action combinée de différents processus et méthodes de conservation pour inhiber la croissance microbienne dans le but de lever les limites liées aux méthodes prises de façon individuelle (**Mahrour et al., 2003; Ponce et al., 1998; Chen et al., 2004**). En effet, pour assurer une sécurité optimale sans affecter les propriétés organoleptiques des aliments, de nouvelles méthodes de contrôle antimicrobien basées sur l'utilisation de la combinaison de facteurs de transformation modérés des aliments devraient être établies (**Cui et al., 2010; Cui et al., 2011**). Ce concept connu sous le nom de technologie des barrières a été appliqué pour la première fois par Leistner en 1978 (**Leistner, 1978**). La stabilité et la sécurité des produits alimentaires impliquent la création d'un environnement hostile pour les micro-organismes pathogènes et de détérioration (**Casaburi et al., 2016**).

## **2. Les viandes**

### **2.1. Consommation mondiale de la viande**

La viande et ses dérivés ont une place importante dans la consommation humaine (**Oussalah, 2007**). Selon la FAO, il se consomme plus de 10.000 kilos de viande chaque seconde dans le monde, soit 323 millions de tonnes pour l'année 2017; cette consommation a progressé de 2,3% par an au cours de ces 10 dernières années (**planetoscope.com 2020**). La consommation annuelle par habitant est passée de 10 kg dans les années 1960 à 26 kg en 2000 et atteindra 37 kg d'ici 2030 (**Heinz et al., 2007**). Dans l'alimentation canadienne, la consommation de viande en 2008 était estimée à 36,6 kg/habitant (bœuf et veau à 12,8 kg/habitant, porc à 9,7 kg/habitant, viande de poulet à 11,2 kg/habitant, dinde à 2,4 kg/habitant et l'agneau était à 0,5 kg/habitant) (**SC, 2009**). La consommation totale estimée de viande (poulet, dinde, veau, agneau, bœuf, porc) aux États-Unis était de 101 kg/habitant en 2007 (**THSUS, 2010**). Selon Statistiques Canada, le montant total des recettes annuelles provenant du secteur de la production et de la transformation de la viande (principalement du bœuf, du porc et de la volaille) s'élevait à plus de 28 milliards de dollars en 2016, soit 2,5 milliards \$ des ventes de viandes transformées, dont 409,77 millions \$ des ventes de saucisses. En moyenne, les ménages canadiens dépensent annuellement plus de 1 100 \$ pour se procurer des viandes

fraîches et transformées. La transformation des aliments, y compris les produits carnés, constitue la plus importante industrie de fabrication du Canada.

([http://tuac.ca/index.php?option=com\\_content&view=article&id=32096:en-chiffres-la-production-et-la-consommation-de-viande-au-canada&catid=10004&Itemid=6&lang=fr](http://tuac.ca/index.php?option=com_content&view=article&id=32096:en-chiffres-la-production-et-la-consommation-de-viande-au-canada&catid=10004&Itemid=6&lang=fr)).

## **2.2. Caractéristiques nutritionnelles de la viande**

La viande est constituée principalement d'eau, de protéines et de lipides. C'est une source importante de micronutriments comme les minéraux et les vitamines nécessaires au bon fonctionnement de l'organisme (**Combes *et al.*, 2005**). La viande fournit une combinaison de nutriments assez équilibrée; les protéines contiennent une forte proportion en acides aminés essentiels, dont la lysine, la méthionine, la cystéine, la thréonine, le tryptophane, l'isoleucine, la leucine, la valine et la phénylalanine. C'est un tissu musculaire qui regroupe des protéines exocellulaires comme le collagène et l'élastine, et des protéines endocellulaires comme les myofibrilles et la myoglobine. Les matières grasses de la viande représentent une source d'énergie pour le corps, elles fournissent les acides gras nécessaires comme l'acide linoléique et l'acide arachidonique et jouent un rôle de transporteur pour les vitamines liposolubles (vitamines A, D, E et K) (**Lefebvre, 1990**). La viande de bœuf contient les vitamines du complexe B dont la thiamine, la riboflavine, la niacine, la floacine et la vitamine B<sub>12</sub> (**Geay *et al.*, 2002**). La vitamine B<sub>12</sub> joue un rôle très important dans le bon fonctionnement du système nerveux; la vitamine B<sub>6</sub> contribue à la prévention de la dermatite et des troubles nerveux; la niacine quant à elle joue un rôle dans la digestion, le système nerveux, la croissance et la reproduction. Parmi les minéraux présents dans la viande, il y a le fer, le zinc, le magnésium, le sodium, le potassium et le phosphore. Ces minéraux sont indispensables pour le maintien d'une bonne santé des dents. La viande est une source principale de fer et de zinc. Une carence en fer dans l'alimentation humaine peut entraîner l'anémie; c'est un composant de l'hémoglobine présent dans les globules rouges, qui joue un rôle essentiel dans le transport de l'oxygène vers les cellules (**Lefebvre, 1990**). Le zinc joue un rôle très important dans les réactions enzymatiques et a un impact physiologique sur la synthèse protéique comme l'activation de l'ADN et ARN polymérase, la régulation des histones et le déclenchement de la lecture du génome (**Rock, 2002**). Le phosphore est un composant des acides nucléiques et joue un rôle très important dans les réactions métaboliques.

## **3. Altération des viandes**

La viande est issue de la transformation de tissus généralement stériles. Ces tissus proviennent de l'abattage d'animaux adultes normalement sains (**Dickson *et al.*, 1992; Ouattara *et al.*, 1997**). Cependant, la viande se contamine après l'abattage à la suite des opérations d'éviscération, par contact avec l'équipement, les outils, les mains et les vêtements des travailleurs, en dépit de toutes les précautions prises (**Dainty *et al.*, 1992**). La viande extrêmement périssable offre des conditions de croissance favorables à divers micro-



organismes. Elle est également très sensible à la détérioration due aux activités chimiques et enzymatiques. La décomposition des matières grasses, des protéines et des glucides de la viande entraîne le développement d'odeurs désagréables et de mauvais goûts qui rendent la viande répréhensible pour la consommation humaine (**Dave et al., 2011**). Il existe plusieurs mécanismes d'altération de la viande et des produits carnés après l'abattage et pendant la transformation et le stockage dont l'oxydation des lipides, la détérioration de la couleur, l'altération microbienne et l'altération enzymatique autolytique.

### **3.1. Oxydation des lipides**

L'oxydation des lipides se produit par une auto-oxydation, une photo-oxydation et lors d'une oxydation enzymatique. Cependant dans les produits alimentaires, incluant les produits carnés, le principal processus d'oxydation est l'auto-oxydation qui est catalysée par l'oxygène ou la température ambiante et initiée par des espèces réactives de l'oxygène (ERO). La photo-oxydation quant à elle, est initiée par la lumière en présence de photosensibilisateurs tandis que l'oxydation enzymatique l'est par la présence d'enzymes qui catalysent les réactions d'oxydation (**Morales et al., 2006**). Le taux d'oxydation des lipides est un facteur de détérioration important qui a généralement un effet néfaste sur les attributs de qualité de la viande (**Gray et al., 1996**). La peroxydation lipidique est une réaction en chaîne de radicaux libres dans laquelle l'oxygène est le facteur le plus important, et elle se compose de trois étapes principales : l'initiation, la propagation et la terminaison (**Min et al., 2005**). L'oxydation des lipides dans la viande dépend de plusieurs facteurs dont la composition en acides gras, les acides gras polysaturés étant plus sensibles à l'oxydation, le niveau de la vitamine E antioxydante (tocophérol) et de prooxydants tels que du fer libre dans les muscles. Les hydroperoxydes sont produits en raison de l'oxydation lipidique des fractions d'acides gras hautement insaturés des phospholipides membranaires, qui sont susceptibles d'être davantage oxydées (**Enser, 2001 ; Simitzis et al., 2010**). Leur rupture provoque la formation des produits secondaires tels que le pentanal, l'hexanal, le 4-hydroxynonanal et le malondialdéhyde (MDA) ainsi que d'autres composés oxygénés tels que des aldéhydes, des acides et des cétones (**Fernandez et al., 1997; Shahidi, 1994; Raharjo et al., 1993**). Ces produits secondaires peuvent entraîner une perte de couleur et de valeur nutritive en raison d'effets sévères sur les lipides, les pigments, les protéines, les glucides et les vitamines (**Simitzis et al., 2010**) et sont directement liés aux processus cancérogènes et mutagènes (**Liu et al., 1995**).

### **3.2. Détérioration de la couleur**

L'apparence de la viande est la propriété sensorielle la plus importante influençant son achat par les consommateurs (**Luzardo, 2016**). La stabilité de la couleur dépend de la quantité de myoglobine (pigment dont le rôle est de transporter l'oxygène à l'intérieur de la cellule musculaire), des états chimiques (formes oxydée, réduite et oxygénée) et des vitesses relatives d'oxydation du pigment (**Lebret et al., 1996, Amenan et al., 2018**). En effet, la myoglobine est présente dans le muscle sous trois formes principales : la

désoxymyoglobine (Mb2 +, forme réduite), l'oxymyoglobine (OMb2 +, forme oxygénée) et la metmyoglobine (MMb3 +, la forme oxydée), chacune donnant une couleur différente à la viande (**Amenan et al., 2018**). Ainsi, la couleur de la viande dépend de son degré d'exposition à l'oxygène. La surface d'une viande fraîchement coupée est rouge vif (OMb2 +), car la myoglobine fixe l'oxygène de l'air, alors que le cœur de la pièce est sombre et de couleur pourpre (Mb2 +), faute d'oxygène. Cependant, si les surfaces coupées sont exposées très longtemps à l'air, la myoglobine s'oxyde et prend alors une coloration brune (MMb3 +) peu attrayante (**Kerry et al., 2002**). La couleur est également affectée par le pH ultime (pHu) de la viande. En effet, les viandes à pHu élevé absorbent beaucoup de lumière et ont une couleur sombre alors qu'un pHu bas entraîne une faible pénétration de la lumière dans le muscle donnant ainsi une viande plus claire (**Interbev, 2006**).

### 3.3. Altération microbienne

La viande est un milieu favorable à la croissance des microorganismes. En plus d'avoir une activité de l'eau élevée ( $a_w = 0.99$ ) et un pH proche de la neutralité, la viande est un milieu très nutritif avec des caractéristiques qui conviennent à la croissance d'une variété de microflore (bactéries, levures et moisissures) dont certaines sont des agents pathogènes (**Jay et al., 2005; Silliker et al., 1980**). Le tractus intestinal et la peau de l'animal sont les principales sources de ces micro-organismes. La capacité des micro-organismes à se développer dans les aliments est étroitement liée à de nombreux facteurs, dont certains sont intrinsèques au substrat et d'autres extrinsèques, mais tous influencent l'évolution du milieu écologique (**Cenci-Goga, 2012**). Les principaux facteurs qui affectent la durée de conservation des produits carnés et favorisent certaines souches bactériennes plutôt que d'autres sont : le conditionnement (aérobie, sous vide ou atmosphère modifiée), la température de stockage, la composition des produits (présence de matière grasse, teneur en NaCl, nitrites,  $a_w$ , pH) et d'autres facteurs, tels que les substances antibactériennes ou bioconservatrices (**Nychas et al., 2008 ; Remenant et al., 2015**). Les bactéries qui se développent dans la viande à des températures froides sont considérées comme psychrotrophes et comprennent les genres tels que : *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Brochothrix*, *Flavobacterium*, *Psychrobacter*, *Moraxella*, *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Clostridium*, bactéries lactiques et différents genres de la famille des *Enterobacteriaceae* (**Dainty et al., 1983 ; Dainty et al., 1992 ; Labadie, 1999 ; Doulgeraki et al., 2012**). Malgré le nombre élevé de micro-organismes, seules quelques espèces dominent pour causer la détérioration, car la température, la durée de stockage et l'atmosphère d'emballage peuvent affecter à la fois la croissance microbienne et la sélection des espèces pendant le stockage de la viande fraîche (**Ercolini et al., 2006, Ercolini et al., 2009, Ercolini et al., 2010b, Ercolini et al., 2011; Doulgeraki et al., 2010, Doulgeraki et al., 2011; Pennacchia et al., 2011**). Dans le stockage aérobie à basse température, plusieurs espèces de *Pseudomonas* sont souvent isolées de la viande avariée (**Stanbridge et al., 1998 ; Labadie, 1999**).

; Liao, 2006 ; Ercolini *et al.*, 2007, Ercolini *et al.*, 2010a) et *Pseudomonas fragi* est l'espèce la plus fréquemment trouvée, suivie par les *Pseudomonas lundensis* et *Pseudomonas fluorescens* (Molin *et al.*, 1986 ; Dainty *et al.*, 1992 ; Stanbridge *et al.*, 1998). Leur activité de détérioration est due à la production de nombreux composés organiques volatils (Dainty *et al.*, 1989; Ercolini *et al.*, 2009, Ercolini *et al.*, 2010a) reconnus comme des molécules actives odorantes pouvant être responsables de la libération d'odeurs désagréables pendant le stockage de la viande à température froide. D'autres bactéries Gram négatives telles que *Enterobacteriaceae* et *Aeromonas* peuvent également contribuer à la détérioration de la viande (Dainty *et al.*, 1983; Dainty *et al.*, 1992; Borch *et al.*, 1996; Nychas *et al.*, 1998). *Serratia liquefaciens* en particulier, est le membre le plus commun des entérobactéries dans la viande stockée dans différentes atmosphères (Stanbridge *et al.*, 1998 ; Doulgeraki *et al.*, 2011). Les bactéries lactiques telles que *Lactobacillus spp.*, *Carnobacterium spp.* et *Leuconostoc spp.* sont impliquées dans la détérioration de la viande stockée en MAP ou VP (Tsigarida *et al.*, 2000 ; Castellano *et al.*, 2004 ; Nychas *et al.*, 2005) et parfois aussi en conditions aérobies (Labadie, 1999). Les espèces principalement trouvées sont *Lactobacillus curvatus*, *Leuconostoc spp.* et *Lactobacillus sakei* (Yost *et al.*, 2002 ; Fontana *et al.*, 2006 ; Pennacchia *et al.*, 2011). De plus, *Leuconostoc spp.* a été identifié comme étant des organismes prédominants dans la viande bovine stockée en conditions aérobies (Doulgeraki *et al.*, 2010) et dans VP/MAP (Stanbridge *et al.*, 1998 ; Yost *et al.*, 2002). Au sein du groupe LAB, *Carnobacterium maltaromaticum* et *Carnobacterium divergens* sont les carnobactéries principalement présentes dans la viande (Stanbridge *et al.*, 1998 ; Ercolini *et al.*, 2010b, Ercolini *et al.*, 2011 ; Pennacchia *et al.*, 2011). *Brochothrix thermosphacta* est une autre bactérie d'altération importante trouvée dans la viande stockée dans l'air, MAP et VP, et il est reconnu qu'elle contribue au développement d'odeurs désagréables (Stanbridge *et al.*, 1998; Ercolini *et al.*, 2006, Ercolini *et al.*, 2010b, 2011 ; Pennacchia *et al.*, 2011).

### 3.4. Altération enzymatique autolytique

Les actions enzymatiques sont un processus naturel dans les cellules musculaires des animaux après leur abattage et sont la principale cause de détérioration de la viande. Les enzymes ont la capacité de se combiner chimiquement avec d'autres composés organiques et agissent comme catalyseurs de réactions chimiques qui aboutissent finalement à une autodétérioration de la viande (Tauro *et al.*, 1986). Dans le processus d'autolyse, les composés complexes (glucides, graisses et protéines) des tissus sont décomposés en composés plus simples, entraînant un ramollissement et une décoloration verdâtre de la viande. Ces changements d'autolyse comprennent la protéolyse et l'hydrolyse des graisses qui sont des conditions préalables à la décomposition microbienne (Tauro *et al.*, 1986). Les enzymes protéolytiques sont actives à basse température (5°C) ce qui entraîne une détérioration de la qualité de la viande en raison de la croissance des microbes et de la production d'amines biogènes (Kuwahara *et al.*, 2003).

## 4. Quelques méthodes de conservation de la viande

La conservation de la viande existe depuis très longtemps. Il existe de très nombreuses méthodes de conservation, des méthodes “artisanales” aux méthodes chimiques ultra-modernes connues aujourd’hui. La plupart des méthodes ont pour principe de retirer l’eau de la viande, principal facteur favorisant sa dégradation. Pour vivre et se développer, les micro-organismes ont besoin des éléments tels que, le carbone, l’azote, des minéraux et de l’eau. Les méthodes de conservation ont donc pour but de leur priver l’accès à ces éléments afin d’augmenter la durée de conservation de la viande et de maintenir sa valeur nutritionnelle, sa texture et sa saveur. Parmi ces méthodes, il y a :

- **La réfrigération** : ce procédé permet le stockage des denrées pendant quelques jours. La température est comprise entre 0°C et +8°C. Il concerne les produits frais, les semi-conserves et les produits frais transformés (**Zhou *et al.*, 2010**).

- **La congélation** maintient la température au cœur de la denrée jusqu’à -18°C. Ce procédé provoque la cristallisation en glace de l’eau libre contenue dans les aliments et permet ainsi la conservation à plus long terme que la réfrigération (**PPCP PB REST, 2008-2009**).

- **La pasteurisation** qui consiste à porter un produit à haute température pendant un certain temps. La durée du traitement thermique permettant de pasteuriser varie selon la température et l’épaisseur de la viande. ([https://www.mapaq.gouv.qc.ca/fr/Publications/Cuisson\\_lente\\_sous\\_vide.pdf](https://www.mapaq.gouv.qc.ca/fr/Publications/Cuisson_lente_sous_vide.pdf))

- **L’irradiation** : c’est un traitement physique de l’aliment avec une radiation ionisante à forte énergie. Elle peut être utilisée pour prolonger la durée de vie des produits alimentaires et/ou pour réduire les risques pour la santé associés à certains produits dus à la présence de microorganismes pathogènes. Ce procédé est utilisé pour réduire le nombre de microorganismes viables dans les aliments, dont les fruits de mer, la volaille, les fruits et légumes et les viandes transformées. Selon le comité de la salubrité des aliments irradiés, les doses maximales d’irradiation utilisées pour contrôler la croissance des bactéries pathogènes et d’altération dans la viande et les produits carnés sont de l’ordre de 4,5 kGy pour la viande hachée fraîche et de 7 kGy pour la viande hachée congelée (**Giroux, 1999**; <https://www.canada.ca/fr/sante-canada/services/aliments-nutrition/salubrite-aliments/irradiation-aliments/irradiation-viande-hachee-resume-processus-soumission.html>)

- **Le saumurage** : la saumure est une solution d’eau et de sel dans laquelle est plongé l’aliment. La solution doit être saturée ou de forte concentration en sel. La teneur en sel de la solution inhibe la prolifération microbienne. On l’utilise pour la conservation des viandes, des poissons et des légumes (**Sindelar *et al.*, 2011**).

- **Le fumage** : ce procédé consiste à soumettre un aliment à l’action des composés gazeux qui se dégagent lors de la combustion de certains végétaux. La fumée dégagée aromatise, colore et durcit la texture

du produit. Les propriétés antiseptiques et antioxydantes de la fumée des fumoirs permettent de prolonger la durée de conservation de la viande et ses dérivés (PPCP PB REST, 2008-2009).

- **La fermentation** : Le processus de fermentation consiste à favoriser une flore utile au détriment d'une flore indésirable afin de prévenir les risques sanitaires. On a l'exemple de la fermentation lactique dans le yaourt, le fromage et le saucisson (PPCP PB REST, 2008-2009).

- **Les additifs chimiques** sont des substances utilisées pour prolonger la durée de conservation de la viande en réduisant la prolifération microbienne pendant l'abattage, le transport, la transformation et le stockage (Dave *et al.*, 2011). Chaque pays a élaboré ses propres règles et réglementations et établi des limites dans le but de prévenir les effets nocifs pour l'homme (Cassens, 1994; Dave *et al.*, 2011). Au Canada, il faut être conforme aux bonnes pratiques de fabrication conformément à la Loi sur les aliments et drogues du Canada (HC, 2006). De plus, Santé Canada n'autorise pas l'ajout des additifs dans les viandes fraîches, mais plutôt dans les viandes transformées. Les antimicrobiens chimiques courants comprennent les nitrites et les acides organiques (Chipley, 2005; Ray, 2004; Archer, 2002). Les nitrites utilisés dans l'industrie de la conservation de la viande sont sous forme de sels tels que le nitrite de sodium ou le nitrite de potassium. En plus de contrôler la croissance des bactéries anaérobies, les sels de nitrite sont efficaces pour contrôler la couleur, l'odeur et l'oxydation des lipides (Sindelar *et al.*, 2009; Ray, 2004; Dave *et al.*, 2011). L'acide ascorbique, l'ascorbate de sodium et le D-isoascorbate ont été utilisés comme conservateurs dans la viande. Giroux *et al.* (2001) ont évalué l'effet des concentrations d'acide ascorbique (0,03 à 0,5 %) et des doses d'irradiation (0,5 à 4 kGy) sur la croissance microbienne et les coordonnées de couleur des galettes de bœuf pendant le stockage à 4 °C et ont trouvé une stabilité significative de la couleur et des réductions significatives de la flore totale aérobie et des coliformes totaux.

Ces conservateurs ont été largement utilisés pour éliminer les bactéries et prolonger la durée de conservation des produits carnés. Au cours de ces dernières années, il y a eu une résistance considérable des consommateurs à l'utilisation des antimicrobiens synthétiques (Basuny *et al.*, 2013). Les consommateurs s'inquiètent des effets toxiques et cancérigènes probables des agents antimicrobiens synthétiques utilisés dans les produits alimentaires (Jayasena *et al.*, 2013). Ainsi, la recherche d'agents antimicrobiens naturels nouveaux et potentiels provenant de différentes sources telles que les métabolites microbiens, les extraits de plantes et d'épices pour l'application alimentaire a été augmentée de manière significative en réponse à la demande croissante des consommateurs pour des produits alimentaires le plus naturels possible (Cueva *et al.*, 2011). Certaines HE telles que celles de l'origan, du romarin, du thym et du clou de girofle ont montré leur potentiel en tant qu'agents antimicrobiens pouvant être utilisés dans la viande et les produits carnés (Jayasena *et al.*, 2013). De même, l'ajout de la bactériocine bifidine de *Bifidobacterium lactis* Bb-12 a amélioré la durée de conservation de la viande hachée jusqu'à 3 mois à 4 °C (Mokhtar *et al.*, 2016). Turgis

*et al.* (2012a) ont montré que l'ajout de nisine améliorait de 1,23 fois la radiosensibilité de *L. monocytogenes* dans les saucisses.

## 5. Les bactériocines produites par les bactéries lactiques

### 5.1. Définition et propriétés antimicrobiennes des bactériocines

La définition d'une bactériocine a considérablement évolué au cours des années. Aujourd'hui, les bactériocines sont définies comme des petits peptides antimicrobiens synthétisés par voie ribosomique et produits par des bactéries qui sont immunisées contre leurs propres bactériocines (Cotter *et al.*, 2013). Ce sont des peptides antimicrobiens le plus souvent cationiques, modifiés ou non post-traductionnellement, de masses moléculaires généralement faibles (rarement plus de 10 kDa) (Heng *et al.*, 2007; Zacharof *et al.*, 2012) et le plus souvent organisées en une ou plusieurs structures hélicoïdales amphiphiles (Rodriguez *et al.*, 2003; Heng *et al.*, 2007). Leur nature protéique permet leur dégradation par les enzymes protéolytiques en particulier les protéases du tractus gastro-intestinal des mammifères, ce qui les rend sans danger pour la consommation humaine (Zacharof *et al.*, 2012). La première découverte des bactériocines a été signalée il y a presque un siècle, lorsque Gratia (1925) a démontré l'inhibition de souches d'*Escherichia coli* S par une substance thermostable provenant d'une culture d'*E. coli* V. Ces substances inhibitrices ont été appelées colicines en référence à l'espèce productrice (Frederiq, 1946). L'inhibition de la croissance de différentes bactéries lactiques par un métabolite produit par *S. lactis*, aujourd'hui classifié comme *L. lactis* (McAuliffe *et al.*, 2001), est à la base de la découverte de la première bactériocine produite par une bactérie lactique, et ceci en 1928 (Rogers, 1928). Celle-ci a été décrite par Whitehead cinq ans plus tard et en 1947, elle a été nommée nisine (Mattick *et al.*, 1947). En 1951, d'autres travaux ont prouvé qu'au cours de l'affinage d'un fromage, les clostridies étaient inhibées par la nisine (Hirsch *et al.*, 1951). C'est à partir de cette date que l'usage des bactériocines a été recommandé dans la lutte contre les contaminations alimentaires. Les bactériocines produites par les bactéries lactiques sont généralement actives à faible concentration contre des bactéries phylogénétiquement proches (Belguesmia *et al.*, 2011; Cotter *et al.*, 2005) ou s'étendent jusqu'à atteindre de nombreuses espèces et genres différents (Cotter *et al.*, 2005). En effet, plusieurs genres de bactéries à Gram négatif tels que *Haemophilus*, *Helicobacter* ou *Neisseria* se sont révélés être sensibles à certaines de ces bactériocines (Morency *et al.*, 2001). Delves-Broughton *et al.* (1996) ont montré que la nisine est bien active contre les bactéries à Gram positif à l'état végétatif et qu'elle est capable d'empêcher la germination des spores. Par ailleurs d'autres études ont montré que la nisine nécessite des agents de chélation tels que l'acide éthylène diamine tétraacétique (EDTA) pour agir contre les bactéries à Gram négatif (Breukink *et al.*, 1999; Khan *et al.*, 2015). L'activité antimicrobienne des bactériocines est généralement bactéricide, provoquant la mort de la bactérie cible; mais un effet bactériostatique inhibant la croissance bactérienne a été constaté (Kęska *et al.*, 2017). Les bactériocines produites par les bactéries

lactiques sont les plus abondantes (**Margaret et al., 2002**) et sont les plus étudiées, en raison de leur statut GRAS (**Settanni et al., 2008; Zacharof et al., 2012**) et de leur rôle dans la bonne conservation des aliments (**Cotter et al., 2005**).

## **5.2. Production et optimisation des conditions de production des bactériocines par les bactéries lactiques**

Les facteurs influençant la production des métabolites sont principalement la souche productrice, la température, le pH, la composition du milieu et la technologie de fermentation employée (**Dortu et al., 2009**). Comme l'ont montré **Moretro et al. (2000)** pour la production de sakacin P par *Lactobacillus sakei*, une même bactériocine peut être produite par des souches ou espèces différentes dont la capacité de production peut être variable. Lors d'une optimisation de production, si différentes souches sont disponibles, le choix de la souche pourra être déterminant. Les conditions de culture influencent fortement la production de bactériocines. Les travaux de **Dussault et al. (2016)** ont montré que le milieu contenant 50 % de bouillon MRS et 50 % de lait écrémé a donné une meilleure activité antibactérienne par *Lactococcus lactis subsp lactis* BSA par rapport aux autres formulations de milieu testées dans leurs travaux. De plus, l'ajout de 0,15 ug/ml de nisine dans le milieu contenant 50 % de bouillon MRS et 50 % de lait écrémé a permis d'obtenir l'activité antimicrobienne la plus élevée de la nisine soit 18 820 UA/ml. Cette activité était 4 et 2,83 fois plus élevée que le milieu contenant 100 % de bouillon MRS sans nisine ajoutée et 100 % de bouillon MRS avec 0,15 lg/ml de nisine ajoutée respectivement. L'optimisation de la croissance bactérienne ne résulte pas nécessairement en l'optimisation de la production de bactériocines (**Parente et al., 1999**). Il a même été suggéré que des conditions de croissance défavorables permettaient de stimuler leur production (**Verluyten et al., 2004**). Les températures et pH optimaux de production sont souvent inférieurs à ceux optimaux pour la croissance. C'est par exemple le cas pour la production de bactériocine par *Lactobacillus curvatus* LTH1174 (**Messens et al., 2003**), *Leuconostoc mesenteroides* L124 et *L. curvatus* L442 (**Mataragas et al., 2003**), de sakacin P par *L. sakei* CCUG42687 (**Moretro et al., 2000**), d'amylovorin L471 par *Lactobacillus amylovorus* DC E471 (**De Vuyst et al., 1996**) et de pediocin PA-1 par *Pediococcus damnosus* (**Nel et al., 2001**). Les résultats des travaux de **Funck et al. (2020)** ont montré que la condition de croissance optimale était de pH 6,3 à 29,3 °C pendant 18,6 h, et la production optimale des bactériocines était inférieure à pH 6,22 à 30,6 °C pendant 17,9 h pour la souche *Lactobacillus curvatus* P99. La composition du milieu, tout particulièrement les sources et concentrations de carbone et d'azote, affecte fortement la production de bactériocines. Les bactéries lactiques productrices requièrent de nombreux nutriments pour leur croissance et des milieux riches contenant de l'extrait de viande, de levure et des hydrolysats de protéines sont nécessaires. Il a déjà été montré que l'augmentation des concentrations en extrait de levure, extrait de viande ou peptone peut permettre une augmentation de la production de

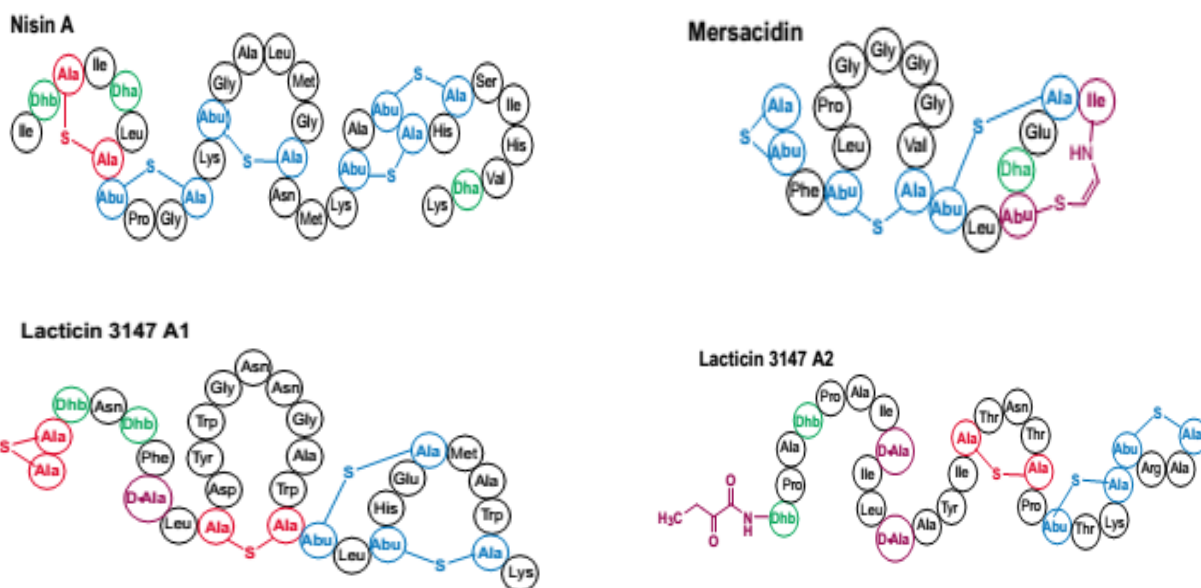
bactériocines (Aasen *et al.*, 2000 ; Nel *et al.*, 2001 ; Mataragas *et al.*, 2004 ; Todorov *et al.*, 2004 ; Verluyten *et al.*, 2004). De plus, quelques études ont montré que la source de carbone utilisée et sa concentration sont des facteurs importants dans l'optimisation de la production de bactériocines (Leal-Sanchez *et al.*, 2002 ; Leroy *et al.*, 2006 ; Chen *et al.*, 2007 ; Anastasiadou *et al.*, 2008). En effet, les travaux de Turgis *et al.* (2016) ont montré qu'une supplémentation du bouillon MRS avec du glucose et la peptone de blé E430 comme source de carbone et d'azote, respectivement augmentait par rapport au bouillon de base MRS la production de nisine par *Lactococcus lactis* MM19 à 30 °C et à un pH initial de 9. De même, ils ont montré que le fructose et la peptone de pois comme source de carbone et d'azote respectivement, supplémentés au bouillon MRS augmentait par rapport au bouillon de base MRS la production de pédiocine par *Pediococcus acidilactici* MM33 à 45 °C et pH initial de 6. L'ajout de ces nutriments lors d'une culture *fed-batch* permet souvent d'augmenter la production comparativement à une culture en *batch* (Callewaert *et al.*, 2000 ; Lv *et al.*, 2005 ; Pérez *et al.*, 2005). Aussi, l'utilisation de la technique des cellules immobilisées peut permettre d'augmenter la durée et la stabilité de la production de bactériocines. Les cellules peuvent être immobilisées dans des biofilms ou des billes d'alginate de calcium. Cette technique a déjà été utilisée avec succès pour la lacticine 3147 et la nisine (Scannell *et al.*, 2000 ; Pongtharangkul *et al.*, 2006).

### 5.3. Classification des bactériocines

Les bactériocines produites par les bactéries lactiques sont réparties en quatre classes (Klaenhammer, 1993). Ces quatre classes sont :

**Classe I.** Les lantibiotiques : peptides de taille inférieure à 5 kDa, stables à la chaleur et qui contiennent des acides aminés inhabituels soufrés formés posttraductionnellement, c'est-à-dire la lanthionine, la  $\beta$ -méthyl lanthionine, la déhydrobutyrine et la déhydroalanine. Ils peuvent être divisés en deux types : la classe Ia qui comprend des peptides cationiques hydrophobes allongés contenant jusqu'à 34 acides aminés et la classe Ib qui comprend les peptides globulaires chargés négativement ou sans charge nette et contenant jusqu'à 19 acides aminés (McAuliffe *et al.*, 2001 ; Twomey *et al.*, 2002). Certains lantibiotiques sont par ailleurs constitués de deux peptides agissant ensemble pour avoir une activité comme la lacticin 3147. Les séquences et structures d'un lantibiotique de chaque type se trouvent à la **figure 1**.





**Figure 1:** Séquence et structure de lantibiotiques de type A (Nisine), B (Mersacidine) et d'un lantibiotique « two-peptides » (Lacticine 3147 A1 et A2).

**Classe II.** Peptides de taille inférieure à 10 kDa, stables à la chaleur, ne contenant pas d'acides aminés modifiés. Leur point isoélectrique varie entre un pH de 8 et 10. Les séquences de quelques bactériocines appartenant à cette classe se trouvent au **tableau 1**. Cette classe est divisée en trois sous-classes. Les bactériocines de la sous-classe IIa contiennent entre 27 et 48 acides aminés et ont toutes une partie N-terminale hydrophobe contenant la séquence consensus YGNGV ainsi qu'un pont disulfure et une partie C-terminale moins conservée, hydrophobe ou amphiphile qui détermine la spécificité d'action (**Fimland et al., 2000 ; Richard et al., 2006**). Elles ont toutes une activité contre *Listeria monocytogenes*. Certaines bactériocines de cette sous-classe contiennent également un deuxième pont disulfure dans leur domaine C-terminale qui semble être important dans la stabilisation de la structure tertiaire. Il semble par ailleurs qu'il leur conférerait une meilleure activité antimicrobienne, une meilleure résistance à l'exposition à des hautes températures et un spectre d'action plus large (**Fimland et al., 2000 ; Drider et al., 2006 ; Richard et al., 2006**). La sous-classe IIb comprend les bactériocines ayant besoin de deux peptides pour avoir une activité. Deux types de bactériocines de classe IIb peuvent être distingués : le type E (*Enhancing*) où la fonction d'un des deux peptides est d'augmenter l'activité de l'autre et le type S (*Synergy*) où les deux peptides sont complémentaires. La sous-classe IIc contient les bactériocines ne pouvant pas être classées dans les autres sous-classes.

**Tableau 1:** Séquence de quelques bactériocines de classe II

<b>Classe IIa: « Pediocin-like bacteriocin »</b>	
Mésentéricine Y105	MTNMKSVEAYQQLDNQNLKQVVG <b>GGKYYGNGV</b> HCTKSGCSVNWGEAASAGIHRLANGGNGFW
Sakacine P	-----MEKFIELSLKEVTAIT <b>GGKYYGNGV</b> HCGKHSCTVDWGTAIGNIGNNAAANWATGWNAGG
Curvacine A	-----MNNVKELSMTELTIT <b>GGARSYGNV</b> YCNNKCCWVNRGEATQSIIIGMISGWASGLAGM
Piscicoline 126	-----MKTVKELSVKEMQLTT <b>GGKYYGNGV</b> SCNKNCTVDWSKAIGIIGNNAAANLTTGGAAGWNKG
Carnobactériocine Bm1	-----MKSVKELNKKEMWWING <b>GGAISYGNV</b> YCNEKCCWVNRKAENKQAITGIVIGGWASSLAGMGH
Pédiocine PA-1	-----MKKIEKLTEKEMANI <b>IGGKYYGNGV</b> TCGKHSCTVDWGKATTCIINNAMAWATGGHQGNHKC
Entéroccine A	-MKHLKILSIKETWLI <b>YGGTTHSGKYGNV</b> YCTKNKCTVDWAKATTCIAGMSIGGFLGGAIPGKC
Sakacine G	-----MKNTRSLTIQEIKSIT <b>GGKYYGNGV</b> SCNSHGC SVNWGQAWTCGVNHLANGGHGGVC
<b>Classe IIb: « Two-peptides bacteriocin »</b>	
ABP-118	$\alpha$ KRGPNCVGNFLGGLFAGAAAGVPLGPAGIVGGANLGMVGGALTCL
	$\beta$ KNGYGGSGNRVWHCGAGIVGGALIGAIGGPWSAVAGGISGGFTSCR
Lactocine 705	$\alpha$ MDNLNKFKKLSDNKLQATIGG
	$\beta$ MESNKLEKFANISNKDLNKITGG
Lactococcine MN	M IRGTGKGLAAAMVSGAAMGGAIGAFGGPVGAIMGAWGGAVGGAMKYSI
	N GSIWGA IAGGAVKGAIAASWTGNPVGIGMSALGGAVLGGVTYARPVH
Plantaricine EF	E FNRGGYNFGKSVRHVVDAIGSVAGIRGILKSIR
	F VFHAYSARGVRNNYKSAVGPADWVISAVRGF IHG
<b>Classe IIc</b>	
Plantaricine A	MKIQIKGMKQLSNKEMQKIVGGKSSAYSLSQMGATAIKQVKKLFKKWGW
Lactococcine A	MKNQLNFNIVSDEELSEANGGKLTFIQSTAAGDLYNTNTHKYVYQQTQNAFGAAANTIVNGWMMG AAGGFGLHH
Lactococcine 972	MKTKSLVLALSAVTLFSAGGIVAQAEGTWQHGYGVSSAYSNYHHGSKTHSATVNNNTGRQGKDTQ RAGVWAKATVGRNLTEKASFYYNFW

**Classe III.** Protéines de taille supérieure à 30 kDa et sensibles à la chaleur. La structure et le mode d'action de ces bactériocines diffèrent complètement des autres bactériocines produites par les bactéries lactiques. Cette classe ne contient que quatre bactériocines : l'helveticin J produite par *Lactobacillus helveticus* A, l'enterolysin A produite par *Enterococcus faecium*, la zoocin A produite par *Spreptococcus zooepidemicus* et la millericin B produite par *Streptococcus milleri* (Nilsen *et al.*, 2003 ; Papagianni, 2003 ; Nigutova *et al.*, 2007).

**Classe IV.** Peptides requérant une partie carbohydratée ou lipidique pour avoir une activité. Aucune bactériocine de cette classe n'a été décrite.

#### 5.4. Mécanisme d'action des bactériocines

Les bactériocines produites par les bactéries lactiques agissent en général par le même mécanisme d'action, en perturbant le fonctionnement de la membrane cytoplasmique (Nes *et al.*, 2007). C'est le mode d'action le plus répandu, surtout chez les bactériocines de la classe II. La première étape est une interaction initiale de la bactériocine avec des récepteurs cellulaires spécifiques (reconnaissance d'une cible), c'est le cas notamment de la mersacidine (Brotz *et al.*, 1998) et de la nisine (Van de Venet *et al.*, 1991), ou non spécifiques (interactions électrostatiques ou hydrophobes) (Brogden, 2005). Les bactériocines vont par la suite s'adsorber sur la membrane cytoplasmique et la perméabiliser par formation de pores conduisant à la mort de la cellule cible (Ecker, 1992; Ennahar *et al.*, 2000; Peschel, 2002; Brogden, 2005). Ainsi, l'action de la bactériocine se traduit, d'une part par l'augmentation de la perméabilité membranaire, provoquant un déséquilibre ionique et une fuite de phosphate inorganique (Klaenhammer, 1993; Cenatiempo *et al.*, 1996; Ennahar *et al.*, 2000) et d'autre part par une perte de la force proton-motrice (FPM) qui implique la dissipation totale du potentiel transmembranaire et du gradient de pH (Nicholls *et Ferguson*, 1992; Montville *et al.*, 1998; Ennahar *et al.*, 2000). Cette FPM joue un rôle central dans la synthèse de l'ATP, le transport actif et la mobilité bactérienne (Nicholls *et al.*, 1992).

D'autres bactériocines ont un autre mode d'action : la perturbation du fonctionnement de la cellule. Koo *et al.* (2001) ont montré que la perméabilisation seule de la membrane de *S. aureus* par la gramicidine D et la protamine ne conduisait pas à la mort de la cellule. Différentes cibles peuvent être attaquées, ce qui contribue à perturber le fonctionnement cellulaire. L'épidermine, la mersacidine, ainsi que la nisine (Brotz *et al.*, 1998) se lie au lipide II et inhibent la transglycosylation, étape clé de la biosynthèse de la paroi bactérienne. D'autres peptides antimicrobiens peuvent inhiber la synthèse des acides nucléiques, comme la pleurocidine et la dermaseptine S1 (Patrzykat *et al.*, 2002), ou inhiber la synthèse protéique ou encore inhiber certaines fonctions enzymatiques (Brogden, 2005).

#### 5.5. Applications alimentaires des bactériocines

Plusieurs travaux ont permis de montrer l'efficacité des bactériocines ou de souches productrices de bactériocines dans différentes matrices alimentaires. Ennahar *et al.* (1998a) ont montré que *L. monocytogenes*, présente dans le fromage Munster, était inhibée par l'addition de *L. plantarum* WHE 92, une souche productrice de pédiocine PA-1. La même souche de *L. monocytogenes* a également été inhibée par l'enterocine 81 produite par *E. faecium* WHE 81 (Ennahar *et al.* 1998b). Izquierdo *et al.*, (2009), en utilisant cette même souche d'*Enterococcus faecium* WHE 81, comme culture de surface au début de la maturation du fromage Munster ont également empêché le développement de *L. monocytogenes*. De même, il a été démontré que la pédiocine PA-1 incorporée dans un film d'emballage permet de réduire significativement la charge initiale de *Listeria monocytogenes* sur la surface de la viande (Woraprayote *et*

*al.*, 2013). De leur côté, **Ananou et al. (2010)** en additionnant l'entérocoque AS-48 sous forme lyophilisée à du lait écrémé, ont pu inhiber la prolifération de *L. monocytogenes* et réduire progressivement la population de *S. aureus*. De même, **Martinez et al. (2015)** ont montré l'inhibition de la croissance de deux souches de *L. monocytogenes* (4b et ½ a) dans un fromage à tartiner en utilisant la souche *L. sakei* ssp. *sakei* 2a, présentant une bonne capacité bactériocinogénique et probiotique ainsi qu'une adaptation à la matrice laitière testée. Cette même souche, encapsulée dans des nano-vésicules liposomiques et introduite dans du lait de chèvre, a retardé la croissance de *L. monocytogene* pendant plusieurs jours (**Malheiros et al., 2016**). **Casaburi et al., (2016)**, en utilisant la souche *L. curvatus* 54M16, une souche multi-productrice de bactériocines (les sakacines X, T et P), ont montré une activité inhibitrice permettant l'amélioration de la qualité sanitaire de saucisses fermentées traditionnelles. En effet, ces trois sakacines ont permis l'inhibition des souches pathogènes testées telles que *L. monocytogenes* et *Bacillus cereus*. Cependant, aucune bactérie à Gram négatif n'a montré de sensibilité à ces bactériocines.

## **5.6. Résistance aux bactériocines**

Les phénomènes de résistance des souches sensibles peuvent exister naturellement ou résulter d'une exposition répétée aux bactériocines. Les mécanismes de résistance des bactéries sont très variés. Ils impliquent des changements structuraux et physiologiques de la cellule bactérienne (**Galvin et al., 1999**; **Guangshun et al., 2015**). Ils peuvent être de deux ordres : le premier mécanisme consiste en une diminution de la perméabilité cellulaire suite à une modification de la structure de la membrane, les constituants lipidiques de la membrane jouant un rôle plus ou moins direct dans la fixation des bactériocines à la surface membranaire (**Mazzotta et al., 1997**). La résistance de *L. monocytogenes* à la nisine a ainsi été attribuée à des changements de la composition en acides gras membranaires et à des modifications au niveau de la paroi, mais aucune modification au niveau du lipide II n'a été détectée (**Kramer et al., 2006**; **Naghmouchi et al., 2007**). Le second mécanisme de développement de résistance est l'inactivation de la molécule active par modification chimique ou dégradation protéolytique du peptide antimicrobien (**Kraus et al., 2006**). Ainsi, la nisinase, produite par certaines souches bactériennes, inactive la nisine (**Klaenhammer, 1993**). Des résistances croisées contre des bactériocines de classes différentes sont aussi possibles. Par exemple, la résistance de *L. monocytogenes* acquise à la nisine A ou Z (classe I) augmente sa résistance à la pédiocine PA-1 et à la divergicine M35, deux bactériocines de classe IIa (**Naghmouchi et al., 2007**).

## **6. Les huiles essentielles**

### **6.1. Définition et propriétés antimicrobiennes des huiles essentielles**

Les huiles essentielles sont des produits odorants, généralement de composition complexe, obtenus à partir d'une matière première végétale botaniquement définie, soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par

distillation sèche, soit par un procédé mécanique approprié sans chauffage. Les huiles essentielles sont le plus souvent séparées de la phase aqueuse par un procédé physique n'entraînant pas de changement significatif de leur composition (**Pharmacopée Européenne, 2010**). Ce sont des composés volatils issus du métabolisme secondaire d'une plante aromatique. Ils sont formés dans des cellules ou groupes de cellules spécifiques, présents dans de nombreuses feuilles et tiges. Ils sont généralement concentrés dans une région particulière tels que les feuilles, l'écorce ou les fruits, et lorsqu'ils se produisent dans divers organes d'une même plante, ils ont souvent des profils de composition différents (**Conner, 1993**).

Les huiles essentielles (HE) ont été reconnues depuis longtemps pour leurs activités antioxydantes, antibactériennes, antiparasitaires et antifongiques (**Zhang et al., 2016**). Elles ont un potentiel en tant qu'agents naturels pour la conservation des aliments (**Conner, 1993**). Elles sont constituées d'un mélange hétérogène de substances organiques complexes et aromatiques telles que les terpènes et les terpénoïdes, les constituants aromatiques et aliphatiques, tous caractérisés par un faible poids moléculaire (**Bassolé et al., 2012**). Plusieurs d'entre elles présentent des activités prometteuses contre de nombreux agents pathogènes d'origine alimentaire et les microorganismes d'altération (**Bassolé et al., 2012**). Une caractéristique importante des HE et de leurs composants est leur caractère hydrophobe, ce qui leur permettra de partitionner avec les lipides de la membrane cellulaire des bactéries et des mitochondries, perturbant les structures cellulaires afin de les rendre plus perméables (**Solórzano-Santos et al., 2012 ; Perricone et al., 2015**).

## 6.2. Mécanisme d'action des huiles essentielles

Selon **Kim et al. (1995)**, il y a trois principales réactions : l'interférence avec les phospholipides membranaires des bactéries qui augmente la perméabilité membranaire, la perte des nutriments et la réduction des processus enzymatiques; la diminution de l'énergie cellulaire (activité de l'ATPase) et du métabolisme cellulaire; et la destruction du matériel génétique. Selon **Lambert et al. (2001)**, en présence de certains composés des huiles essentielles, un endommagement de la membrane plasmique des bactéries et une dispersion de deux éléments faisant partie de la force proton-motrice (FPM) dont le gradient de pH et le potentiel électrique surviennent, conduisant ainsi à une fuite des protons, des ions phosphate et potassium.

Chaque bactérie possède une réponse différente face aux composés actifs des huiles essentielles, car ces derniers ont des mécanismes d'action différents. Un classement en ordre décroissant basé sur l'activité antimicrobienne des principes actifs des huiles essentielles a été établi; les phénols sont en tête de liste. Ils sont suivis par les alcools, les aldéhydes, les cétones et les éthers (**Faid et al., 1996; Daferera et al., 2000**). Les composés phénoliques des huiles essentielles inhibent le transport direct des protéines cellulaires et aussi le transport actif des nutriments en interférant avec les éléments qui jouent un rôle dans la FPM (**Doyle**

*et al.*, 1997). Selon **Friedman *et al.* (2002)**, cela pourrait s'expliquer par l'inhibition d'enzymes essentielles au métabolisme et à la chélation d'éléments essentiels qui se trouvent sous forme de trace comme le fer.

Le carvacrol, un terpène phénolique attaque la membrane en la rendant perméable aux ions potassium et aux protons, acidifiant ainsi le cytoplasme de la bactérie, rendant impossible la synthèse de l'ATP et diminuant la quantité d'ATP intercellulaire (**Ultee *et al.*, 2000**) car l'augmentation du flux passif des ions affecte la transduction de l'énergie (**Sikkema *et al.*, 1995; Prashar *et al.*, 2003; Oussalah *et al.*, 2006**).

Les composés électronégatifs comme les aldéhydes contenus dans certaines huiles essentielles interfèrent avec le processus biologique, troublant le transfert d'électron, et réagissent avec les protéines et les acides nucléiques (**Dorman *et al.*, 2000**).

Les composés hydrophobes des huiles essentielles peuvent atteindre l'espace périplasmique des bactéries Gram négatif à travers les protéines porines (**Lambert *et al.*, 2001; Helander *et al.*, 1998**).

### **6.3. Applications alimentaires des huiles essentielles**

Les huiles essentielles possèdent des profils de composition chimique différents. Elles sont utilisées comme agents naturels de conservation des aliments. Leur utilisation comme agents de conservation est due à la présence de composés ayant des propriétés antimicrobiennes et antioxydantes (**Conner, 1993 ; Hammer *et al.*, 1999**). Bien que les huiles essentielles aient le statut GRAS et aient montré des effets antimicrobiens prometteurs, leur emploi est limité du fait de leurs propriétés gustatives assez fortes (**Ghabraie, 2014**). Les recherches actuelles sont axées sur la détermination de la CMI afin de joindre l'effet antimicrobien à la prolongation de la durée de conservation (**Oussalah *et al.*, 2007**). Selon **Velasco and Williams (2011)**, l'activité antimicrobienne des épices et des herbes a été largement étudiée et n'est plus à démontrer.

Les études menées par **Fратиanni *et al.* (2010)** ont montré que l'ajout des huiles essentielles de thym et de baume sur la viande fraîche de poulet entreposée pendant 3 semaines à 4°C a inhibé efficacement la croissance d'*E. coli* tandis que celle de baume a limité la croissance de *Salmonella spp.* **Chouliara *et al.* (2007)** ont constaté que l'ajout direct d'une combinaison d'huiles essentielles d'origan, sur la viande fraîche de poulet sous atmosphère modifiée, diminuait significativement les populations microbiennes (bactéries lactiques, microorganismes aérobies totaux, *Pseudomonas spp.*, levures) et l'oxydation des lipides. Des études récentes ont montré que les extraits de plantes sont utiles pour la réduction des pathogènes associés aux saucisses de Francfort (**Mytle *et al.*, 2006**) ou au bœuf cuit (**Ahn *et al.*, 2007**). Une autre étude d'**Ahn *et al.* (2004)** a démontré une inhibition de la population d'*E. coli* O157: H7, de *L. monocytogenes* et de *Salmonella* Typhimurium (1,08, 1,24 et 1,33 log ufc/g, respectivement) dans le bœuf haché cru traité avec 1% d'extraits naturels de pépins de raisin après 9 jours d'entreposage réfrigéré. De plus, toujours dans cette même étude, des extraits d'écorce de pin (1%) et d'oléorésine de romarin (1%) ont entraîné une réduction d'environ 1 log UFC/g dans les populations des trois pathogènes citées ci-haut après 9 jours d'entreposage.

D'autres études menées par **Oussalah et al. (2007)** ont montré que les huiles essentielles de *Corydothymus capitatus*, *Cinnamomum cassia*, *Origanum heracleoticum*, *Satureja montana* et *Cinnamomum verum* étaient très actives (CMI ≤ 0.05%) contre *E. coli*, *L. monocytogenes*, *S. Typhimurium* et *S. aureus*. Par ailleurs, d'après les études pilotées par **Daglia (2012)**, certains acides phénoliques (acides gallique, caféique et férulique) ont des propriétés antibactériennes contre *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *E. coli* et *P. aeruginosa*. Les composés phénoliques tels que les proanthocyanidines de la canneberge ont un spectre très large sur les bactéries pathogènes à Gram négatif (*E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*) et à Gram positif (*Enterococcus faecalis*, *L. monocytogenes*, *S. aureus* et *Bacillus subtilis*) (**Daglia et al., 2012; Caillet et al., 2012**).

Bien que les HE et les bactériocines aient le statut GRAS et aient montré des effets antimicrobiens prometteurs, leur application est limitée en raison du goût et de l'odeur forte des HE d'une part, et d'autre part, l'utilisation des bactériocines seules n'est pas susceptible d'assurer une innocuité complète en particulier dans le cas des bactéries Gram-négatives (**Zacharof et al., 2012; Ghabraie et al., 2016a**). Afin d'éviter d'éventuels effets secondaires des HE et d'améliorer leur efficacité antimicrobienne, les HE sont largement utilisées en association avec d'autres agents antimicrobiens (**Solomakos et al., 2008a, b; Ghabraie et al., 2016b**). L'utilisation des bactériocines doit également être combinée avec d'autres technologies capables de perturber par exemple la membrane cellulaire des bactéries Gram-négatives afin d'optimiser l'effet antimicrobien des bactériocines (**Zacharof et al., 2012**). La technologie de traitements combinés est intéressante pour la conservation des aliments. Elle aide non seulement à prévenir la résistance bactérienne au traitement antibactérien individuel, mais aussi à réduire le dosage de chaque traitement étant donné que le traitement combiné peut provoquer des effets synergiques entre les agents antibactériens et/ou les traitements antibactériens contre les bactéries cibles (**Zhou et al., 2010; Ghabraie et al., 2016b**).

## **7. La technologie des barrières**

Pour assurer une sécurité optimale sans affecter les propriétés organoleptiques des aliments, de nouvelles méthodes de contrôle antimicrobien (technologie des barrières) devraient être établies (**Cui et al., 2011**). La technologie des barrières utilise la combinaison de facteurs de transformation modérés des aliments pour obtenir une sécurité acceptable et de hautes qualités sensorielles (**Cui et al., 2010**). Ce concept de barrière ou obstacle technologique a été appliqué pour la première fois par Leistner en 1978 (**Leistner, 1978**). Cet auteur stipule que la sécurité microbienne, la stabilité ainsi que la qualité sensorielle et nutritionnelle des aliments sont meilleures lorsque celles-ci sont basées sur l'application combinée de conservateurs que les micro-organismes présents dans les denrées alimentaires sont incapables de surmonter. Une application intelligente de cette technologie nécessite une meilleure compréhension des événements et interactions se déroulant entre les différentes barrières dans les aliments, ainsi que les réponses physiologiques des micro-

organismes pendant la conservation des aliments (**Leistner, 2000**). Les différents obstacles ou traitements multiples dans les aliments ont non seulement un effet additif sur la stabilité microbienne, mais également un effet synergique. Ils offrent des réactions de stress non agressives qui perturbent la stabilité des bactéries cibles, tout en évitant l'épuisement des métabolites des cultures protectrices (**Leistner, 1995**).

La demande des consommateurs pour des aliments naturels à haute qualité sensorielle signifie une utilisation limitée des agents de conservation et un traitement thermique réduit. En règle générale, la méthode de préservation doit être économe en énergie, écologique, organoleptiquement acceptable et particulièrement efficace pour inhiber les agents pathogènes (**Zhou et al., 2010**). Pour préserver la viande fraîche transformée, il est préférable de ne pas utiliser de traitement thermique et de tirer parti des avantages d'autres technologies telles que la technologie des barrières (**Zhou et al., 2010**). Les technologies de conservation douces sont importantes pour les industries alimentaires modernes et, en combinant ces processus, la qualité organoleptique sera améliorée. La technologie des barrières ou la combinaison de différents processus peut être utilisée pour assurer la sécurité microbienne, car il est probable que l'utilisation d'un seul agent antimicrobien élimine un organisme, mais fournit une bonne condition pour d'autres micro-organismes.

La combinaison de bactériocines avec d'autres méthodes de conservation des aliments a donné des résultats prometteurs (**Milles et al., 2011**). En effet, cette technologie permet de minimiser le développement des souches résistantes, dans la mesure où les peptides antimicrobiens ont un effet additif ou synergique lorsqu'ils sont utilisés conjointement avec des traitements physiques par exemple (**Galvez et al., 2008 ; Milles et al., 2011**). Ainsi, un traitement à haute pression hydrostatique combiné à l'utilisation de bactériocines a montré d'importants dommages de la membrane cytoplasmique de la population microbienne cible (**Galvez et al., 2007**). En outre, les bactériocines ont une plus grande possibilité de cibler les agents pathogènes à Gram négatif en présence des agents chélatants. Ainsi, l'application de la nisine avec de l'EDTA a inhibé efficacement *E.coli*, *Salmonella spp* et *L. monocytogenes* (**Ukuku et al., 2009; Khan et al., 2016**). Plusieurs autres travaux rapportent que des applications alimentaires des bactériocines combinées à d'autres barrières chimiques ont été réussies, telles que l'enterocine AS-48 combinée avec le NaCl pour inhiber *S. aureus* (**Ananou et al., 2004**). Les travaux de **Ghabraie et al. (2014)** ont montré que l'utilisation de 0,025 ou 0,05% du mélange d'huiles essentielles de cannelle chinoise et d'écorce de cannelle en association avec de faibles concentrations de nitrites (100 ppm), de sels d'acides organiques (1,54%) et de nisine (12,5 ppm) pourrait réduire respectivement 1,5 ou 2,6 log UFC/g de *L. monocytogenes* dans les saucisses après 7 jours de stockage. D'autres études ont également montré l'efficacité des bactériocines couplées aux huiles essentielles. **Ettayebi et al. (2000)** ont inhibé *L. monocytogenes* en combinant la nisine Z au thymol. **Abdollahzadeh et al. (2014)** ont montré que la combinaison d'HE de thym et de nisine réduisait de 1,86 log UFC/g la charge de *L. monocytogenes* après 4 jours de stockage au froid, puis cette



charge restait inchangée jusqu'à 12 jours de stockage dans de la chair de poisson hachée. De même, **Solomakos et al. (2008b)** ont montré que la combinaison d'HE de thym avec la nisine avait un potentiel efficace pour inhiber la croissance de *L. monocytogenes* dans la viande de bœuf hachée. Par ailleurs, **Ghalfi et al. (2006)** ont montré que l'utilisation combinée de l'HE d'*O. vulgare* et de la bactériocine produite par *Lactobacillus curvatus* CWBI-B28 augmentait considérablement la durée de conservation de la viande. Les travaux de **Singh et al. (2001)** ont montré que la nisine et l'extrait d'ail combinés pouvaient aider à surmonter les problèmes de résistance des bactéries Gram-positives à la nisine dans les systèmes alimentaires tels que le houmous.

Les composants des aliments tels que les gras et les protéines, de même que les ingrédients alimentaires peuvent avoir un effet négatif sur l'efficacité des HE et des bactériocines (**Kyung, 2011; Cava-Roda et al., 2010; Solomakos et al., 2008b; Abdollahzadeh et al., 2014; Ghabraie et al., 2016b**). L'encapsulation des antimicrobiens dans un polymère comestible pourrait les protéger dans les systèmes alimentaires. Il a été démontré que les agents antimicrobiens encapsulés ont une activité inhibitrice plus élevée que les agents antimicrobiens libres (**Huq et al., 2014**). En plus de permettre une libération contrôlée des antimicrobiens, de sorte que leur activité antibactérienne dure plus dans le temps, l'encapsulation réduit l'effet organoleptique négatif probable des antimicrobiens sur les aliments (**Neetoo et al., 2010; Ghabraie et al., 2016b**).

## **8. Microencapsulation**

### **8.1. Définition et généralités**

La microencapsulation est un ensemble de technologies visant à produire de petites particules appelées microcapsules qui peuvent être libérées à une vitesse spécifique dans certaines conditions (**Pedro et al., 2019**). En général, les capsules sont classées en fonction de leur taille, distinguées entre les macrocapsules (> 5,000µm), les microcapsules (0,2 à 5,000µm) et les nanocapsules (<0,2 um) (**Pablo et al., 2014**). Le but de la microencapsulation est de recouvrir un composé actif (noyau) par un agent d'encapsulation, également connu sous le nom de matériau de paroi, qui isolera le noyau. Ainsi, elle permet entre autres de protéger les substances sensibles de l'environnement extérieur et de masquer les propriétés organoleptiques comme la couleur, le goût, l'odeur de la substance qui ne sont pas appréciées par les consommateurs. L'isolement fourni par le matériau d'encapsulation se brisera sous l'application d'un stimulus spécifique (par exemple, le pH ou la chaleur), libérant la substance active à l'emplacement cible spécifique ou dans des conditions idéales (**Suave et al., 2006**). Différents types de matériaux comme les ingrédients pharmaceutiques actifs, les protéines, les peptides, les huiles essentielles, les matériaux alimentaires, les pigments, les colorants, les monomères, les catalyseurs, les pesticides et les microorganismes peuvent être encapsulés avec différents types de matériaux de revêtement ou de coque comme l'éthylcellulose, l'hydroxyl propylméthylcellulose, le

carboxy méthylcellulose de sodium, l'alginate de sodium, la gélatine, le polyester et le chitosane (**Venkata et al., 2010**). La microencapsulation a de nombreuses applications dans des domaines tels que les industries pharmaceutique, médicale, agricole et alimentaire (**Azaredo, 2005**). Le succès de cette technologie dépend du choix du matériau de paroi, de la forme de libération du noyau et de la méthode d'encapsulation (**Pablo et al., 2014**). Par exemple, les travaux de **Huq et al. (2012)** ont montré que l'ajout de 5% (w/w) de nanocellulose cristalline renforçait les propriétés physicochimiques de l'alginate en termes de perméabilité à la vapeur d'eau et de stabilité thermique.

## **8.2. Le matériau de la paroi**

Le choix correct du matériau de la paroi est très important, car il influence l'efficacité d'encapsulation et la stabilité de la microcapsule. Le matériau idéal doit pouvoir former un film qui est cohésif avec le noyau actif, être chimiquement compatible et non réactif avec le noyau, pouvoir sceller et maintenir le noyau à l'intérieur de la capsule; et avoir la capacité à fournir une protection maximale au noyau contre les conditions défavorables. Pour pouvoir être appliqué dans les aliments, le matériau de la paroi doit être de qualité alimentaire, biodégradable et capable de former une barrière entre l'agent actif et le milieu et exempt de goût désagréable (**Gharsallaoui et al., 2007; Nazzaro et al., 2012; Pereira et al., 2018**).

Selon **Fávaro-trindade et al. (2008)**, la plupart des matériaux de la paroi n'ont pas toutes les propriétés souhaitées; une pratique courante consiste à mélanger deux ou plusieurs matériaux. Ces matières peuvent être choisies parmi une grande variété de polymères naturels et synthétiques, parmi lesquels : les glucides comme l'amidon, les amidons modifiés, les dextrines, le saccharose, la cellulose et le chitosane; les gommes telles que la gomme arabique, l'alginate et la carraghénane; les lipides comme la cire, la paraffine, les monoglycérides et diglycérides, les huiles et graisses hydrogénées; les matériaux inorganiques comme le sulfate de calcium et les silicates; les protéines telles que le gluten, la caséine, la gélatine et l'albumine.

## **8.3. Libération contrôlée de la substance d'intérêt**

Les principaux mécanismes impliqués dans la libération de la substance d'intérêt sont la diffusion, la dégradation, l'utilisation de solvant, le pH, la température et la pression. En pratique, une combinaison de plus d'un mécanisme est utilisée (**Desai et al., 2005**). Selon **Gouin (2004)**, l'encapsulation devrait permettre au noyau d'être isolé de l'environnement externe jusqu'à ce que la libération soit souhaitée. Par conséquent, la libération au moment et à l'endroit appropriés est une propriété extrêmement importante dans le processus d'encapsulation, améliorant l'efficacité, réduisant la dose requise d'additifs et élargissant les applications des composés d'intérêt. Les principaux facteurs affectant les taux de libération sont liés aux interactions entre le matériau de la paroi et le noyau, la volatilité du noyau, le rapport entre le noyau et le matériau de la paroi, la taille des particules et le degré de viscosité du matériau de la paroi (**Roberts et al., 2000**).

## 8.4. Les techniques d'encapsulation

Diverses techniques sont disponibles pour l'encapsulation des substances d'intérêt. Globalement, les méthodes sont divisées en trois types, dont les méthodes chimiques; physico-chimiques et mécaniques (Venkata *et al.* 2010). Le choix de la méthode la plus appropriée dépend du type de noyau, de l'application de la microcapsule, de la taille des particules requises, des propriétés physiques et chimiques du noyau et de la paroi, du mécanisme de libération requis, de l'échelle de production et du coût (Suave *et al.* 2006). Le tableau 2 suivant montre un ensemble de techniques de microencapsulation.

Tableau 2: les techniques de microencapsulation

Techniques	Avantages	Inconvénients	Rendement d'encapsulation	Nature du produit encapsulé	Réf.
<i>Procédés mécaniques</i>					
<b>Séchage par atomisation (spray drying)</b>	Simple, rapide, économique	- Perte importante d'actifs par adhérence aux parois de la chambre de séchage - Non applicable à des systèmes de viscosité trop élevée - Consommation d'énergie importante en raison de l'évaporation de l'eau	Jusque 40-50 %	Poudre	(Gouin, 2004) (Yeo <i>et al.</i> , 2001) (Giunchedi <i>et al.</i> , 1995)
<b>Gélification /congélation de gouttes (spray cooling)</b>	- Particules non poreuses et denses - Absence de solvant - Durée courte des procédés	- Températures des procédés pouvant affecter les actifs - Agglomération	Jusque 40-60 %	Microsphère cireuse	(Kerdudo <i>et al.</i> , 2015)
<b>Extrusion</b>	- Contrôle précis de la forme et de la taille des capsules - Degré élevé de stabilité des capsules en milieu formulé	- Taille des particules importante : 200-1000 µm - Non applicable pour les actifs trop sensibles à	Jusque 40 %	Microsphère	(Gouin, 2004) (Kerdudo <i>et al.</i> , 2015)

l'oxydation.

**RESS**

*(Rapid Expansion of Supercritical Solutions )*

<b>ASES</b> <i>(Aerosol Solvent Extraction System )</i>	Absence de solvants organiques et de tensioactifs	Limité aux polymères de faibles poids moléculaires	Variable	Microsphère	(Yeo <i>et al.</i> , 2001), (Gouin, 2004)
--	---	--	----------	-------------	---

**Procédés chimiques**

<b>Polymérisation Interfaciale</b>	- Contrôle de la porosité et de l'épaisseur de la paroi en fonction des polymères	- Interaction de certains actifs dans la réaction de polymérisation - Nombreux lavages nécessaires - Sous-produits interagissant avec les actifs	Variable (15-100 %)	Membrane polymérique	(Yeo <i>et al.</i> , 2001) (Kerdudo <i>et al.</i> , 2015)
------------------------------------	---	--	---------------------	----------------------	---

**Procédés physico-chimiques**

<b>Évaporation/extraction de solvant</b>	- Encapsulation de petites molécules - Possibilité de contrôle de la cinétique de relargage grâce au PLGA - Utilisation de polymères biodégradables et biocompatibles	- Utilisation de solvants organiques toxiques - Présence de solvants résiduels	Variable	Microsphère	(Kerdudo <i>et al.</i> , 2015)
<b>Coacervation simple</b>	- Distribution de taille étroite pour l'ajout de non-solvant : absence de contact entre la phase continue et l'actif	Agglomération, utilisation de solvant dans certains cas	Variable (6-90 %)	microcapsules	(Kerdudo <i>et al.</i> , 2015)
<b>Coacervation Complexe</b>	- Distribution de taille étroite	- Agents réticulant toxiques : glutaraldéhyde	Environ 80 %	microcapsules	(Kerdudo <i>et al.</i> , 2015)

	- Hauts rendements d'encapsulation - Conditions douces (absence de solvants organique et température ambiante)	ou formaldéhyde - Gamme de pH limitée			
<b>Émulsions doubles/multiples</b>	- Absence de solvants organiques - Possibilité d'encapsuler des actifs hydrophiles et hydrophobes en simultané	Risque de dégradation des actifs sensibles à la chaleur, car nécessité de chauffer les phases à émulsionner (dans la plupart des cas)	Variable	Gouttelettes d'émulsion	(Kerdudo <i>et al.</i> , 2015)
<b>Liposomes</b>	- Encapsulation simultanée d'actifs hydrophiles et hydrophobes - Augmente l'efficacité des principes actifs - Utilisation de molécules constituantes de la structure cutanée	- Utilisation de solvants organiques - Faible rendements d'encapsulation des actifs hydrophiles - Incompatibilité avec certains tensioactifs		Liposomes	(Gouin, 2004)
<b>Vésicules multilamellaires type oignons</b>	- Encapsulation simultanée d'actifs hydrophiles et hydrophobes - Augmente l'efficacité des principes actifs - Utilisation de molécules constituantes de la structure cutanée - Hauts rendements d'encapsulation	- Instabilité thermodynamique en phase aqueuse - Incompatibilité avec certains tensioactifs.	Variable	Vésicules multilamellaires type oignons	(Kerdudo <i>et al.</i> , 2015)

## 8.5. La microencapsulation dans l'industrie agroalimentaire

Les techniques de production de microcapsules sont beaucoup plus difficiles dans l'industrie alimentaire que dans d'autres industries, car les qualités sensorielles des aliments ne doivent pas être compromises par l'ajout de composants encapsulés. De plus, les matrices alimentaires sont plus complexes que celles utilisées dans les industries pharmaceutiques et cosmétiques (**Fávaro-trindade et al., 2008**). Plusieurs méthodes différentes de production de microcapsules ont été développées et les microcapsules peuvent être fabriquées en utilisant différents matériaux qui sont choisis suivant la fonction des microcapsules (**Pedro et al., 2019**).

Selon **Fávaro-Trindade et al. (2008)**, la microencapsulation est utilisée dans l'industrie alimentaire pour réduire la réactivité du matériau actif dans l'environnement extérieur, réduire la vitesse d'évaporation du noyau dans le milieu, améliorer la manipulation des aliments, assurer une libération contrôlée du principe actif, masquer l'odeur et le goût désagréables et répartir le matériau encapsulé dans une formulation alimentaire de manière homogène. Cependant, la microencapsulation est associée à des coûts de production considérablement accrus, ce qui peut limiter la viabilité économique de la méthode. Mais de nos jours, les consommateurs sont de plus en plus conscients de l'importance de consommer des repas bénéfiques pour la santé. Ainsi, des produits sont développés pour offrir des avantages pour la santé. On peut citer la microencapsulation de divers composés actifs, tels que les vitamines, les minéraux, les huiles essentielles et les acides gras polyinsaturés oméga-3 (**Suave et al., 2006**).

La microencapsulation peut être un moyen efficace de créer des aliments qui sont non seulement une source de nutriments avec un attrait sensoriel, mais aussi une source de bien-être et de santé pour les individus. On peut augmenter le niveau de calcium pour prévenir l'ostéoporose, utiliser des micro-organismes pour produire l'acide lactique afin de diminuer le cholestérol et, ajouter des composés phénoliques pour prévenir les problèmes cardiaques (**Oliveira et al., 2002; Sanguansri et al., 2006**). Des formulations de plus en plus complexes qui ne peuvent souvent être contrôlées que par microencapsulation comme les micro-organismes dans la viande fermentée; l'ajout d'acides gras polyinsaturés sensibles à l'auto-oxydation dans le lait, les yaourts ou les glaces; et l'utilisation de composés aromatiques très volatils dans les aliments instantanés a été appliquée dans l'industrie alimentaire (**Khan et al., 2011; Gharsallaoui et al., 2012**). Par ailleurs les travaux de **Huq et al. (2014; 2015)** ont montré l'efficacité de la microencapsulation dans la conservation des produits à base de viande; ils ont montré d'une part une activité antimicrobienne prolongée d'un antimicrobien encapsulé entraînant une réduction importante de la population de *Listeria* au cours du temps par rapport au même antimicrobien non encapsulé et, d'autre part l'augmentation de la sensibilité de *Listeria* à l'irradiation en présence d'antimicrobiens encapsulés comparativement à ces mêmes antimicrobiens non encapsulés.

## 9. Hypothèse, but et objectifs du projet

### 9.1. Hypothèse

L'action combinée des bactériocines des bactéries lactiques et des huiles essentielles assurerait les qualités microbiologiques et organoleptiques et augmenterait la durée de conservation des viandes transformées.

### 9.2. But

Le but de cette étude est de développer une nouvelle source de bactériocines pouvant être utilisée dans la viande transformée, de démontrer la synergie avec une formulation antimicrobienne à base d'huiles essentielles et de vérifier l'effet bénéfique de l'encapsulation afin d'assurer la qualité microbiologique et physico-chimique de la viande fraîche transformée pendant la transformation et le stockage.

### 9.3. Objectifs spécifiques

Afin de répondre à notre hypothèse, les objectifs ci-après ont été établis :

Objectif 1 : Identifier des ferments contenant des bactéries lactiques capables de produire des bactériocines et optimiser leur production au cours de la fermentation ;

Objectif 2 : Évaluer la CMI de l'extrait de bactériocines contre des bactéries affectant la qualité de la viande et déterminer la synergie entre l'extrait de bactériocines et des formulations antimicrobiennes renfermant des huiles essentielles;

Objectif 3 : Mettre au point une méthode d'encapsulation de la nouvelle formulation pour application dans la viande fraîche transformée ;

Objectif 4 : Évaluer *in situ* sur la viande fraîche transformée l'effet des antimicrobiens combinés (encapsulés et non encapsulés) sur la durée de conservation de la viande fraîche transformée en analysant l'évolution de la flore d'altération au cours du stockage;

Objectif 5 : Évaluer la qualité physicochimique et sensorielle de la viande fraîche transformée.

### 9.4. Moyens pour atteindre les objectifs

Objectif 1 : l'identification des ferments contenant des bactéries lactiques productrices de bactériocines a été démontrée par l'inhibition de l'activité antimicrobienne du surnageant obtenu de la culture de ces bactéries lactiques lorsque le surnageant était soumis à l'action d'une protéase. L'optimisation de la production des bactériocines a été effectuée par la méthode de diffusion de puits telle que décrite par **Millette *et al.* (2007a)** en variant les paramètres : température, pH initial et supplément de différentes sources de carbone et d'azote.

Objectif 2 : la concentration minimale inhibitrice (CMI) des bactériocines a été effectuée par la méthode de microdilution sur différentes souches microbiennes selon le protocole décrit par **Hossain *et al.* (2016)** et la

méthode de l'échiquier telle que décrite par **Turgis *et al.* (2012b)** a permis d'établir l'interaction entre ces bactériocines et des formulations antimicrobiennes à base d'huiles essentielles.

Objectif 3 : l'encapsulation des formulations antimicrobiennes s'est faite en utilisant la gélatine comme biopolymère selon le protocole décrit par **Syed *et al.* (2016)**.

Objectif 4 : l'évolution de la flore d'altération au cours du stockage a été déterminée par le comptage de colonies des germes à analyser après dilution et ensemencement en surface sur des géloses selon le protocole décrit par **Ouattara *et al.* (2002)**.

Objectif 5 : l'évaluation de la qualité physicochimique de la viande fraîche transformée s'est faite en analysant les paramètres de la couleur et le degré de l'oxydation des lipides au cours du stockage selon les protocoles décrits par **Pattarasiroj *et al.* (2020)** et **Ouattara *et al.* (2002)** respectivement. L'analyse sensorielle a été réalisée par le test hédonique suivant le protocole décrit par **Ghabraie *et al.* (2016a)**.



**CHAPITRE 2: INFLUENCE OF GROWTH PARAMETERS ON  
BACTERIOCIN-LIKE INHIBITORY SUBSTANCES (BLIS)  
PRODUCED BY LACTIC ACID BACTERIA AND APPLICATION  
AGAINST *LISTERIA SPP.***

---

**INFLUENCE DES PARAMÈTRES DE CROISSANCE SUR LES  
SUBSTANCES INHIBITRICES DE TYPE BACTÉRIOCINE  
PRODUITES PAR LES BACTÉRIES LACTIQUES ET  
APPLICATION CONTRE *LISTERIA SPP.***

Gildas Gaëlle Domguia Foudjing, Elham Sarmast, Zahra Allahdad, Stéphane Salmieri, Monique Lacroix\*

L'article a été soumis pour publication dans le journal scientifique « Food Control » le 10 Mars 2022 mais il a été refusé. Suite aux commentaires de l'éditeur du journal, des corrections ont été apportées à l'article. Il a été soumis pour publication dans le journal scientifique « Letters in Applied Microbiology » le 20 Avril 2022. Facteur d'impact: 2,858.

Le nombre de figures et de tableaux et le style des références ont été présentés selon le guide des auteurs du journal

**Contributions des auteurs**

Ce travail de recherche a été réalisé sous la supervision de Pre. Monique Lacroix. Toutes les expériences réalisées en laboratoire ainsi que la rédaction de l'article ont été faites par Gildas Gaëlle Domguia Foudjing. Les discussions sur les résultats et les protocoles ont été assistés par Stéphane Salmieri et Pre Monique Lacroix tandis que les corrections et révisions de l'article ont été effectuées par Elham Sarmast, Zahra Allahdad et Pre Monique Lacroix.

## Résumé

Cette étude visait à étudier la production possible de substances inhibitrices de type bactériocine et à optimiser leur production par *Lactobacillus sakei* (LS) et la combinaison des bactéries *Lactobacillus curvatus*/*Pediococcus acidilactici* (LC/PA), des bactéries lactiques présentes dans deux ferments utilisés pour la fermentation de la viande. L'effet des paramètres de croissance sur la production des substances inhibitrices de type bactériocine a été évalué en mesurant l'activité antibactérienne du surnageant acellulaire de ces bactéries à l'aide de la technique de diffusion des puits. La stabilité du surnageant acellulaire des bactéries LC/PA a également été examinée après les traitements thermiques et les variations pH. Les résultats ont montré que pour une production plus élevée de substances inhibitrices de type bactériocine, les températures de croissance étaient de 28 et 24 °C, et les valeurs de pH initiales étaient de 5 et 6,5 respectivement pour les bactéries LC/PA et LS. La production de substances inhibitrices de type bactériocine par les bactéries LC/PA a été fortement influencée par les sources de carbone et d'azote. Le mannose et l'extrait de levure ont respectivement été les sources de carbone et d'azote appropriées, et l'activité était de 2044,44 UA/ml, 4,84 fois supérieure à celle du milieu MRS non supplémenté. Aucune des sources de carbone utilisées dans cette étude n'a affecté la production de substances inhibitrices de type bactériocine par la bactérie LS, tandis que la peptone de pois en tant que source d'azote a amélioré l'activité antimicrobienne et a montré une valeur de 188,89 UA/ml, 1,47 fois supérieure à celle des milieux MRS non supplémentés. De plus, la caractérisation du surnageant acellulaire des bactéries LC/PA a montré que les substances inhibitrices de type bactériocine étaient thermostables et actifs dans une plage de pH de 2 à 10.

Mots-clés : Bactéries lactiques, Post-biotique, Substances inhibitrices de type bactériocine, Paramètres de croissance, Activité antimicrobienne

**Influence of Growth Parameters on Bacteriocin-Like Inhibitory Substances (BLIS)  
Produced by Lactic Acid Bacteria and Application against *Listeria spp.***

Gildas Gaëlle Domguia Foudjing, Elham Sarmast, Zahra Allahdad, Stéphane Salmieri, Monique Lacroix\*

Research Laboratories in Sciences Applied to Food, Canadian Irradiation Center, INRS-Institut Armand-Frappier santé et biotechnologie, Institute of Nutraceutical and Functional Foods, 531, Boulevard des Prairies, Laval, Québec, Canada, H7V 1B7

\*Corresponding author: Pre. Monique Lacroix, *Tel: 450-687-5010 # 4489, Fax: 450-686-5501, E-mail:*  
[Monique.Lacroix@inrs.ca](mailto:Monique.Lacroix@inrs.ca)

## **Abstract**

This study aimed to investigate the possible production of bacteriocin-like inhibitory substances (BLIS) and optimize their production by *Lactobacillus sakei* (LS) and a co-culture of *Lactobacillus curvatus*/*Pediococcus acidilactici* (LC/PA) bacteria, lactic acid bacteria present in two ferments used for meat fermentation. The effect of growth parameters on BLIS production was evaluated by measuring the antibacterial activity of the cell-free supernatant (CFS) of these bacteria using well-diffusion technique. The stability of the CFS of LC/PA bacteria was also examined after heat treatment and pH variations. Results showed that for higher BLIS production, growth temperatures were 28 and 24 °C, and initial pH values were 5 and 6.5 respectively for the LC/PA and LS bacteria. The BLIS production by the LC/PA bacteria was greatly influenced by carbon and nitrogen sources. Mannose and yeast extract were found as suitable carbon and nitrogen sources, respectively, and the activity was 2044.44 UA/ml, 4.84-fold greater than un-supplemented MRS media. None of the carbon sources used in this study affected the BLIS production by the LS bacterium, while pea peptone as nitrogen source enhanced the antimicrobial activity and showed a value of 188.89 UA/ml, 1.47-fold greater than un-supplemented MRS media. Furthermore, characterization of CFS of the LC/PA bacteria showed that the BLIS were heat-stable and active at a pH range of 2–10.

**Keywords:** Lactic acid bacteria, Postbiotic, Bacteriocin-like inhibitory substances, Growth parameters, Antimicrobial activity

## 1. Introduction

There has been a continuous interest in bio-preservation of food as an effective approach in the field of food safety (**Balciunas *et al.*, 2013**). This technique can preserve the food from physicochemical changes, microbial deterioration, and foodborne pathogens through the application of natural substances. Plants, animals, and microorganisms are three main sources of natural additives, and a safe replacement for synthetic preservative compounds in food (**Cueva *et al.*, 2011**).

Lactic acid bacteria (LAB) are commonly used as starter cultures in dairy, meat and vegetable products. Besides their role in fermentation procedures, the antimicrobial compounds produced by LAB expand their development of applications in the food industry (**Van *et al.*, 2011**). LAB have the ability to secrete soluble materials with diverse functional activities during bacterial growth or after their lysis. These antimicrobial products are categorized in two different groups. Low molecular weight metabolites such as organic acids, and hydrogen peroxide and high molecular weight compounds such as bacteriocins and/or bacteriocin-like inhibitory substances (BLIS) (**Moradi *et al.*, 2019a; Yordshahi *et al.*, 2020**). BLIS are a common name for uncharacterized bacteriocins with bioactivity similar to bacteriocins (**Sidek *et al.*, 2018**).

Bacteriocins are ribosomically produced antimicrobial peptides with a diverse genetic origin, post-translationally modified or not, that can help the producer organism to outcompete other bacterial species (**Alvarez-Sieiro *et al.*, 2016**). They are well-known individual postbiotics, which are by-product metabolic agents produced during fermentation. These compounds have many beneficial properties such as their potential to control the growth of spoilage and pathogenic microorganisms, antioxidant, and anti-inflammatory activities (**Rad *et al.*, 2021**). The potential biotechnological applications of postbiotic metabolites in the food industry are of growing interest, which is related to non-toxicity to humans and stability at various ranges of pH and temperature (**Todorov, 2009; Ahmad *et al.*, 2017; Moradi *et al.*, 2020; O'Bryan *et al.*, 2018; O'Connor *et al.*, 2020; Silva *et al.*, 2018; Yang *et al.*, 2014**).

Different genus of LAB such as *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* and *Enterococcus* have the ability to synthesize bacteriocins during the fermentation process. The effectiveness of bacteriocin-producing *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus curvatus* or *Pediococcus acidilactici* bacteria in inhibiting pathogenic bacteria in different food products has been reported (**Katikou *et al.*, 2005; Castellano *et al.*, 2006; Ghalfi *et al.*, 2006; Héquet *et al.*, 2007, Albano *et al.*, 2009; Casquete *et al.*, 2017**). It has been reported that their antimicrobial activity is attributed to their bacteriocins such as sakacin, curvacin and pediocin (**Barbosa *et al.*, 2015; Casaburi *et al.*, 2016; Fontana *et al.*, 2015; Todorov *et al.*, 2013**). Bacteriocins can be supplemented in foods by means of several approaches including the direct application of CFS, purified or partially purified single bacteriocin or a mixture of bacteriocins (**Favaro *et al.*, 2017**).

A mixture application containing more than one bacteriocin could have an additive or synergistic bactericidal activity against a range of sensitive bacteria (**Dortu *et al.* 2008; Vijayakumar *et al.* 2017**).

Several studies indicate that the production of bacteriocins is strongly influenced by environmental conditions such as the incubation atmosphere, pH, temperature, microbial growth phase, microbial load, and the composition of the culture medium. Addition of some compounds such as sugar, salt, and surfactants to the growth media of LAB can impact the production of bacteriocins (**Gálvez *et al.*, 2007; Todorov *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2012; Zhou *et al.*, 2015; Turgis *et al.*, 2016; Dussault *et al.*, 2016; Mataragas *et al.*, 2003, 2004; Todorov *et al.*, 2009; 2010**). Since there is no guarantee that high bacteriocin production occurs under optimal growth conditions and high cell mass (**Todorov *et al.*, 2009; Masuda *et al.*, 2016**), it is necessary to study the link between bacterial growth conditions and bacteriocin production and optimize the production of bacteriocin for possible industrial application and their production at an industrial scale. The aim of this work was to investigate the possible production of BLIS by *Lactobacillus sakei* and the mixed culture of *Lactobacillus curvatus* and *Pediococcus acidilactici* present in meat starter cultures and to optimize the production of BLIS by these bacteria.

## **2. Material and Methods**

### **2.1. Materials**

Selected compounds used in this study were: D-glucose (Fisher Scientific, USA), D-(+) maltose monohydrate (Sigma-Aldrich, Japan), D-(-)-fructose (Sigma-Aldrich, USA), D-(+)- lactose monohydrate (Sigma-Aldrich, Netherlands), D-(+)-mannose (Sigma-Aldrich, United Kingdom), D-(+)-galactose (Sigma-Aldrich, Italy), and sucrose (Sigma-Aldrich, USA); yeast extract, meat extract, pea peptone, wheat peptone purchased from Sigma-Aldrich, France and tryptone from Fisher Scientific, Australia. de Man Rogosa and Sharpe broth (MRS) obtained from Difco Laboratories, Detroit, MI, USA, and Brain-Heart Infusion medium (BHI) purchased from Alpha Biosciences Inc. Baltimore, MD, USA.

### **2.2. Preparation of bacteria**

The lactic acid bacteria used in this study were obtained from commercial ferments used for meat fermentation. Two ferments in powder form named as MnF containing LS, and FLC containing both LC/PA were used in this study. A quantity of 0.25 g of each ferment was dissolved in 2 ml of sterile distilled water, then the solution was introduced into 9 ml of MRS broth and incubated for 24 h at 24 °C and 37 °C for LS and for LC/PA, respectively. A second 24 h subculturing was carried out by adding 1 ml of the previous microbial culture into 9 ml of MRS broth, then, glycerol (20% v/v) was added, and the bacteria were stored at -80 °C for subsequent experiments. Each bacterium was subjected to 2 subcultures of 24 hours before each experiment.

Eight *Listeria* as indicator strains were used. Two strains of *Listeria innocua* (LIN): LIN 3285 and LIN 51742; and 6 strains of *Listeria monocytogenes* (LM): LM 1045, LM 2371, LM 2558, LM 2569, LM 2739, and LM 2812. These strains were stored at -80 °C in BHI containing glycerol (20% v/v). Twice sub culturing was carried out at 37 °C for 24 h for each strain before experiment.

### 2.3. Antibacterial activity of CFSs

The antibacterial activity of CFS of *Lactobacillus sakei* bacterium (CFS-LS) and *Lactobacillus curvatus/Pediococcus acidilactici* bacteria (CFS-LC/PA) against *Listeria* spp. as indicator bacterium was determined based on the method of well diffusion assay used by **Turgis et al. (2016)**. LS and LC/PA bacteria were grown in MRS broth overnight. Then, supernatants were collected by centrifugation at 6000 g for 30 min at 4 °C followed by neutralization to pH 6.5 using 10N NaOH solution. The neutralization of supernatant aimed at preventing the effect of organic acids produced by the LAB. The neutralized supernatant was then filtered through a 0.2µl filter to obtain CFS (**Turgis et al., 2016**).

For indicator strain, 30 ml of BHI broth supplemented with 0.75% agar was inoculated with approximately  $10^6$  CFU ml<sup>-1</sup> of each strain of *Listeria*. The mixture was then poured into standard petri dishes and allowed to solidify for 30 min at room temperature. Wells of 6 mm diameter were cut from the gel and filled with 80 µl of crude neutralized and filtered CFS. The incubation was performed at 37 °C for 24 h. Clear zones surrounding the wells indicate antimicrobial activity against the test organism. The halos were measured in millimeters, and the most sensitive indicator strain was chosen for subsequent experiments to quantify CFS antimicrobial activity (**Millette et al., 2007**).

To verify whether the inhibition was caused by an antimicrobial peptide, the evaluation was performed in the presence of 1% trypsin prior to the addition in the well by incubating at 35 °C for 2 h in a laboratory water bath. A sample incubated at 35 °C for 2 h without protease was considered as control (**Millette et al., 2007**).

#### 2.3.1. Effect of fermentation temperature on BLIS production

To assess the effect of temperature on BLIS production, 100 ml of sterile MRS broth was inoculated with 2% (v/v) inoculum (LS or LC/PA). Then the mixtures were incubated at 24, 28 and 37 °C. Aliquots of culture were taken every 2h to quantify the antibacterial activity (AU/ml) of the CFS-LS or CFS-LC/PA using LM 2371 as an indicator strain. CFS was serially diluted with sterile deionized water; then 80µl of crude CFS and each dilution were filled into the wells. All plates were then incubated at 37 °C for 24 h and examined for formation of inhibition zones. The inhibition was scored positive if the width of the clear zone around the well was  $\geq 0.5$  mm. Antimicrobial activity was expressed as arbitrary units (AU) per ml. The AU was defined as the reciprocal of the highest dilution showing a clear zone of growth inhibition (**Turgis**

*et al.*, 2016). The temperature at which the highest production of BLIS was achieved was selected for the following experiments.

### **2.3.2. Effect of the initial pH of fermentation on BLIS production**

The MRS medium was prepared, and the pH was adjusted to the desired pH 5; 5.5; 6; 6.5; 7 and 8 with NaOH or HCl (10N) solutions. Following inoculation of the various sterile culture media with 2% (v/v) inoculum (LS or LC/PA), the cultures were incubated at 28 °C for LC/PA and 24 °C for LS during 12 h. Then, the supernatant of each bacterial culture was collected, and the antibacterial activity was evaluated as described in the previous experiment. The pH at which the highest amount of BLIS was produced was selected for the next experiments.

### **2.3.3. Effect of carbon sources on BLIS production**

The MRS medium was supplemented with 2% (p/v) of different carbon sources: glucose, maltose, fructose, lactose, mannose, galactose, and sucrose. Culture media were then, adjusted to pH 5 and 6.5 respectively for LC/PA and LS bacteria using NaOH or HCl (10N). The sterile media were inoculated with 2% (v/v) inoculum (LS or LC/PA) and incubated at 24 °C and 28 °C for 12 h, respectively, for LS and LC/PA bacteria. The CFS-LS and CFS-LC/PA were collected, and the antibacterial activity was evaluated as in the previous experiment. Likewise, the carbon source which showed the maximum production of BLIS was selected for the following experiments.

### **2.3.4. Effect of nitrogen sources on BLIS production**

In addition to the best carbon source, the MRS medium was also supplemented with 2% (p/v) of different nitrogen sources including yeast extract, meat extract, pea peptone, wheat peptone and tryptone. Then the various culture media were adjusted to pH 5 and 6.5 for LC/PA and LS bacteria respectively. The sterilized media were inoculated with 2% (v/v) of inoculum (LS or LC/PA) and incubated at 28 °C and 24 °C for 12 h for the LC/PA and LS bacteria, respectively. Following incubation time, the supernatant of each bacterial culture was collected, and the antibacterial activity was evaluated as described previously.

## **2.4. Sensitivity of the CFS-LC/PA to changes of pH and temperature**

The effect of pH on the antimicrobial activity was determined by adjusting the pH of CFS-LC/PA to values between 2 and 12 using 10N HCl or NaOH. The effect of temperature on the antimicrobial activity was determined by subjecting the CFS-LC/PA in a water bath at temperatures of 30 and 105 °C for 15, 30 and 60 minutes. To assess the residual antimicrobial activity, *L. monocytogenes* 2371 was used as an indicator strain and 80 µl of CFS-LC/PA was placed into wells. All plates were then incubated at 37 °C for 24 h and examined for formation of inhibition zones. The halos were measured in millimeters, and the residual



activity was calculated in comparison with CFS-LC/PA, which corresponded to a 100% antimicrobial activity (Millette *et al.*, 2007).

## 2.5. Statistical analysis

All experiments were conducted in triplicate and data were denoted as mean  $\pm$  standard error. Statistical analysis was performed using PASW Statistics 19 software (IBM Corporation, Somers, NY, USA). Analysis of variance (ANOVA) and Duncan's multiple-comparison tests were used to compare all results. Differences between means were considered significant when the confidence interval was smaller than 5 % ( $P \leq 0.05$ ).

# 3. Results and Discussion

## 3.1. Antimicrobial activity of CFSs

The antimicrobial activity of CFS-LS and CFS-LC/PA before and after treatment with trypsin against 2 strains of *Listeria innocua* and 6 strains of *Listeria monocytogenes* are presented in **Table 1**. The results show that un-treated CFSs with trypsin were effective against all tested strains. The strain of LM 2371 was the most sensitive one and was chosen for the subsequent experiments. Addition of trypsin led to a complete loss of the antimicrobial activity of CFSs, which indicates that BLIS, the substances of proteinaceous nature, present in CFSs were responsible for the antimicrobial activity against the selected strains (Rad *et al.*, 2021; Yang *et al.*, 2018). Studies have demonstrated the antimicrobial activity of bacteriocins obtained from LAB against bacteria such as *Clostridium perfringens* (Shanmugasundaram *et al.*, 2020), *Escherichia coli* (Moradi *et al.*, 2019b) and *Listeria monocytogenes* (Moradi *et al.*, 2019a). The two CFSs produced in this study were active against all tested *Listeria monocytogenes* strains, which showed their potential application as food bio-preservatives since *Listeria monocytogenes* is considered as one of the most important foodborne pathogens (Funck *et al.*, 2020). The antimicrobial mechanism of bacteriocins could be attributed to inhibition of cell wall synthesis by bacteria, degradation of DNA and RNA by the proteinaceous property of bacteriocins, and formation of pores in cell membrane, which lead to the loss of essential cell compounds such as ions and ATP, and eventually cell lysis (Haney *et al.*, 2019; Abitayeva *et al.*, 2021).

Wang *et al.* (2019) reported that bacteriocins produced by *Lactiplantibacillus plantarum* LPL-1 formed pores in the membrane of *Listeria monocytogenes*, which occurred after acidifying the environment. Kim *et al.* (2020) found that antimicrobial activity of bacteriocins produced by *Lactococcus taiwanensis* against *Salmonella gallinarum* and *Escherichia coli* was due to bacterial membrane lysis. The antimicrobial activity, spectrum, mechanism, and target microorganism (Gram-negative or Gram-positive bacteria) are different among different bacteriocins, produced from various LAB (Darbandi *et al.*, 2022; Tang *et al.*, 2022).

**Table 1:** Inhibitory activities against indicator strains of neutralized, cell-free supernatants from cultures of *Lactobacillus curvatus*/*Pediococcus acidilactici* and *Lactobacillus sakei* bacteria

Indicator strains	Inhibition <sup>a</sup>		Inhibition <sup>a</sup> CFS without trypsin (35 °C, 2h)		Inhibition <sup>a</sup> CFS with trypsin (35 °C, 2h)	
	CFS-LC/PA	CFS-LS	CFS-LC/PA	CFS-LS	CFS-LC/PA	CFS-LS
LIN 3285	++	++	++	++	-	-
LIN 51742	+++	++	+++	++	-	-
LM 1045	++	++	++	++	-	-
LM 2371	+++	++	+++	++	-	-
LM 2558	+++	++	+++	++	-	-
LM 2569	+++	++	+++	++	-	-
LM 2739	+++	++	+++	++	-	-
LM 2812	+++	++	+++	++	-	-

<sup>a</sup> = + + +, diameter of the inhibition zone  $\geq$  20 mm; + +, 10–19 mm; +, 7–9 mm; -, no inhibition.

LIN = *Listeria innocua*

LM = *Listeria monocytogenes*

CFS-LC/PA = cell-free supernatant of *Lactobacillus curvatus*/*Pediococcus acidilactici* bacteria

CFS-LS = cell-free supernatant of *Lactobacillus sakei* bacterium

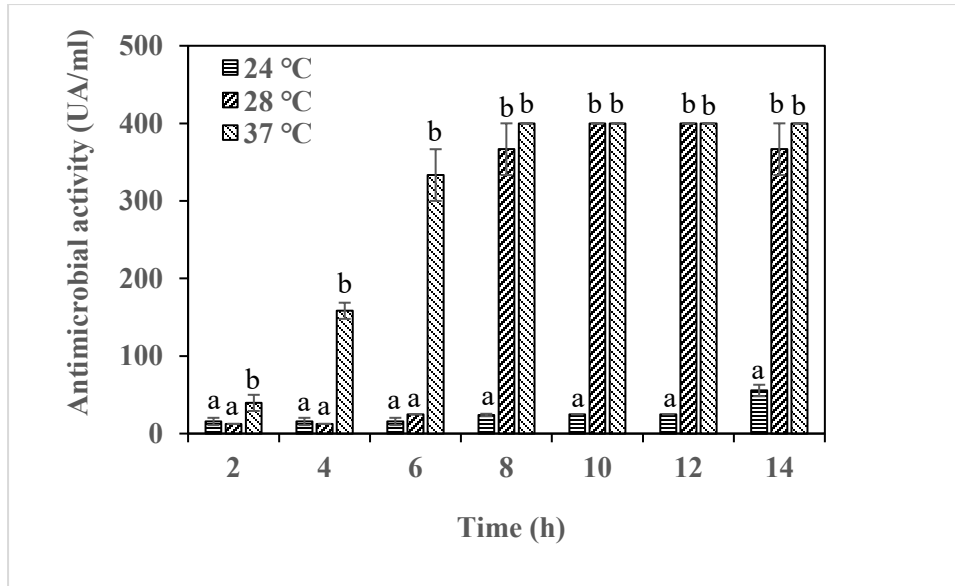
### 3.2. Effect of Temperature on production of BLIS

Production of bacteriocins by LAB can be influenced by culture conditions during fermentation such as temperature (Tome *et al.*, 2008; Abbasiliasi *et al.*, 2017). The production of BLIS was measured by its antimicrobial activity against an indicator pathogen, *Listeria monocytogenes* 2371 at 24, 28, and 37 °C for 14 h. **Figure 1** shows the results of the impact of different temperatures on the BLIS produced by combination of LC/PA bacteria. The highest production of BLIS and consequently antimicrobial activity 400 AU/ml was obtained at 37 and 28 °C after 8 and 10h of fermentation, respectively. Up to 14h of fermentation, there was no difference in antimicrobial activities at temperatures 28 and 37 °C ( $P > 0.05$ ) and the value remained unchanged around 400 AU/ml. The lowest antimicrobial activity <100 AU/ml occurred for BLIS produced at 24 °C. The temperature of 28 °C and fermentation time of 12 h were selected for the rest of the experiments.

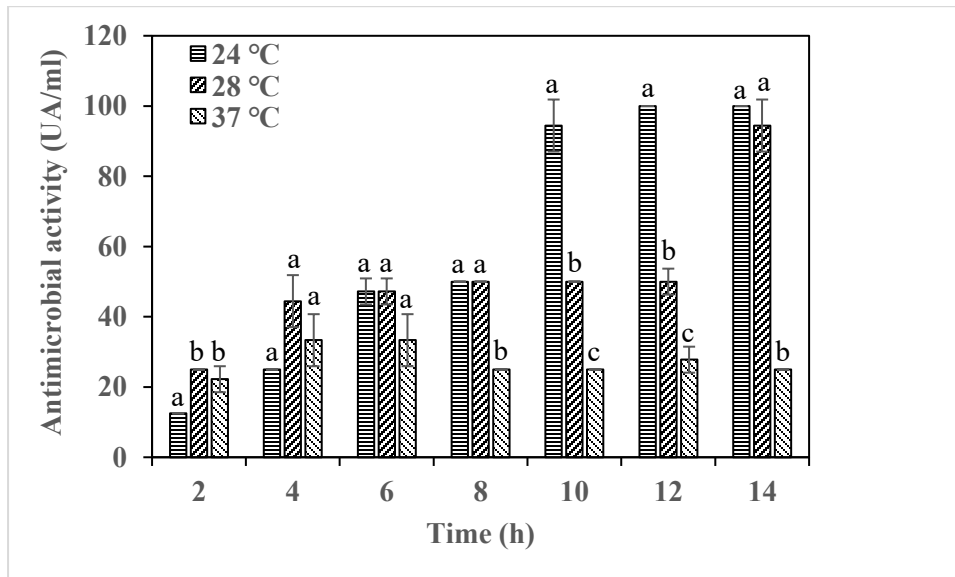
Effect of different temperatures on production of BLIS by LS bacterium is indicated in **Figure 2**. Results demonstrated that the highest level of BLIS production with an antimicrobial activity of 100 AU/ml was achieved at 24 °C after passing 12h of fermentation. This value obtained at this point was two fold of that obtained at 28 °C (50 AU/ml) as well as 3.6 folds of that obtained at 37°C (27.78 AU/ml). No significant

difference ( $P > 0.05$ ) in antimicrobial activity of BLIS produced at 24 and 28 °C from 4-8 hours was observed. However, after 10h of incubation there was a dramatic increase in antimicrobial activity at 24 °C. Incubation at 28 °C for 14h showed a noticeable increase of antimicrobial activity. At the end of incubation, the lowest production of BLIS was found at 37 °C. Thus, the temperature of 24 °C and a fermentation time of 12h were retained in the next experiments. Higher bacteriocin production at low temperatures was also reported for sakacin P due to a better utilization of essential metabolites for bacteriocin production (**Moretro et al., 2000; Aasen et al., 2000**). **Malheiros et al. (2015)** found that the highest antimicrobial activity of bacteriocins produced by *L. sakei* occurred after 12h of incubation at 25 °C, coinciding with the early stationary growth phase (**Malheiros et al., 2015**) like in this study. This phenomenon was also reported by other researchers (**Castro et al., 2011; Leroy and De Vuyst, 1999**).

Temperature plays an important role on bacteriocin production (**Abbasiliasi et al., 2017**). An increase in temperature led to an increase in the BLIS antimicrobial activity of the LC/PA bacteria while a reverse interaction was observed for temperature and BLIS antimicrobial activity for the LS bacterium as, there was a reduction in the BLIS antimicrobial activity with increasing temperature. Growth temperature and bacteriocin production are frequently correlated, as it has been previously observed for nisin and pediocin where the optimum temperatures were 30 and 45 °C respectively (**Turgis et al., 2016**). **Funck et al. (2020)** investigated the influence of growth parameters on the BLIS production by *Lactobacillus curvatus* P99. The authors found that optimal temperature for the maximal bacteriocin production was 30.6 °C. Other studies showed the impact of the temperature on bacteriocin production as observed for bacteriocin ST311LD (**Todorov et al., 2005a**), bacteriocin BD1 (**Hye et al., 2011**), nisin (**Cheigh et al., 2002**) and bacteriocin ST194BZ (**Todorov et al., 2005b**). Thus, depending on bacterial strain, the optimum incubation temperature for high yield bacteriocin production can vary significantly and must be evaluated on an individual basis.



**Figure 1:** Effect of temperature on the BLIS production by LC/PA bacteria



**Figure 2:** Effect of temperature on the BLIS production by LS bacterium

### 3.3. Effect of the initial pH of the culture media on BLIS production

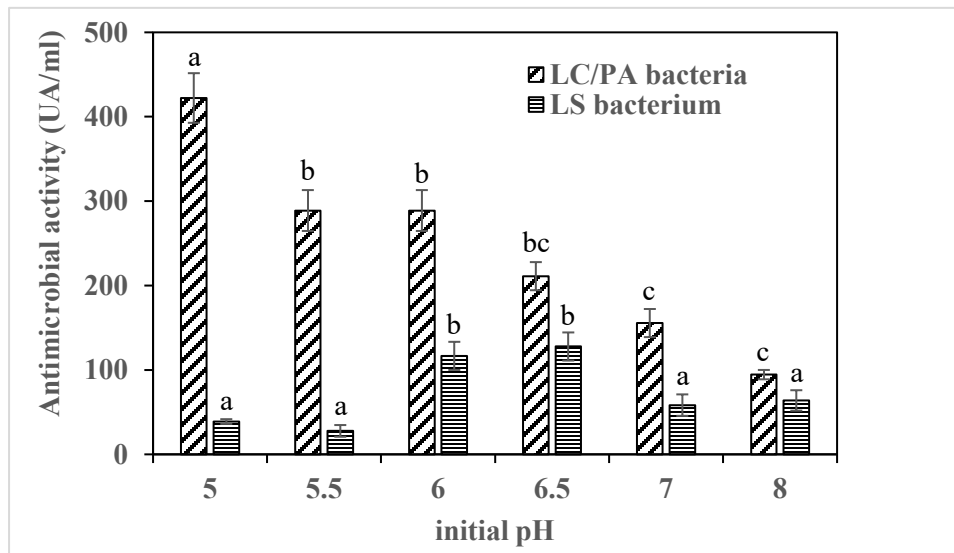
Different culture media were adjusted to pH 5, 5.5, 6, 6.5, 7, and 8. The LC/PA bacteria were cultured at 28 °C and the LS bacterium at 24 °C for 12h. **Figure 3** shows the results of the antimicrobial activity of the different bacteria. pH changes in the media affected BLIS production significantly ( $p \leq 0.05$ ) and different behaviours were observed for both LC/PA and LS bacteria. The highest antimicrobial activity 422.22 AU/ml was found at pH 5 for BLIS produced by LC/PA bacteria ( $p \leq 0.05$ ). A decreasing trend for antimicrobial

activity ranging from 422.22 to 94.44 AU/ml with increasing pH from 5 to 8 was observed for BLIS produced by LC/PA bacteria. It could be explained that the acidic pH enhances the production of bacteriocins; until the pH reaches an acidity that is unsuitable for bacterial growth. This phenomenon is in accordance with the results of other researchers, who reported that improvement in nisin and pediocin production was observed by decreasing pH of medium. This could be related to the post-translation processing for synthesis of bioactive bacteriocins, wherein production is higher at a lower pH (**Guerra and Pastrana 2003; Cabo et al., 2001; Yang et al., 2018**).

The maximum antimicrobial activity of 127.78 AU/ml ( $p \leq 0.05$ ) was obtained with the BLIS produced by LS at pH 6.5 followed by 116.67 AU/ml at pH 6, while for other pH values the antimicrobial activity showed less than 100 UA/ml. It should be noted that there was no significant difference in antimicrobial activity between pH 6 and 6.5 for the BLIS produced by LS. Thus, pH 5 and 6.5 were retained in the next experiments for the LC/PA and LS bacteria, respectively. These results suggest that the initial pH of the culture media strongly influenced the quantity of bacteriocins and the optimal pH for bacteriocin production is significantly dependent on the characteristics of the strain of bacteria. **Yang et al. (2018)** also found that pH had impact on bacteriocin production by *Lactobacillus curvatus*, *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus paracasei*, and *Streptococcus thermophiles*. They reported that the optimum pH for production of bacteriocins is correlated to the pH for growth of each bacterium. (**Yang et al., 2018**). The metabolic activity of LAB is greatly affected by the pH of culture media. pH is important for bacteriocin production since it affects the aggregation of the bacterial cell and the adsorption of bacteriocin to the surface of bacteria (**Malheiros et al., 2015**). Besides, the regulation of biosynthetic genes may be controlled by pH (**Yang et al., 2018**). It has been reported that at lower pH (acidic), less absorption of bacteriocin to its producer bacterium was observed and consequently, bacteriocin was more bioavailable to act as an antimicrobial compound (**De Vuyst et al., 2007**). Our observations for BLIS produced by LC/PA bacteria are in agreement with this hypothesis.

Bacteriocins are produced within a specific pH range which varies with the producer LAB and can be quite different from the pH range at which the bacteriocin is stable and active (**Abbasiliasi et al., 2016**). The optimal pH for bacteriocin production is reported to be from pH 5.5 to 6.0. However, some studies demonstrated that bacteriocin production could be enhanced at low pH (5.0), as observed in this study for LC/PA bacteria (**Turgis et al., 2016; Abbasiliasi et al., 2017**). **Malheiros et al. (2015)** also found that the production of bacteriocin by *Lactobacillus sakei* 2a isolated from Brazilian pork sausage was also affected by pH of the culture medium. The authors found that higher bacteriocin activity was obtained at pH 6.28. Similar results were obtained for bacteriocins ST461BZ and ST462BZ (**Todorov et al., 2005c**), enterocin RS C5 (**Leroy et al., 2003**), plantaricin ST31 (**Todorov et al., 2000**), nisin and pediocin (**Turgis et al.,**

2016), bacteriocin produced by *Lactobacillus curvatus* P99 (Funck *et al.*, 2020) and bacteriocin produced by *Lactobacillus sp. MSU3IR* (Iyapparaj *et al.*, 2013).



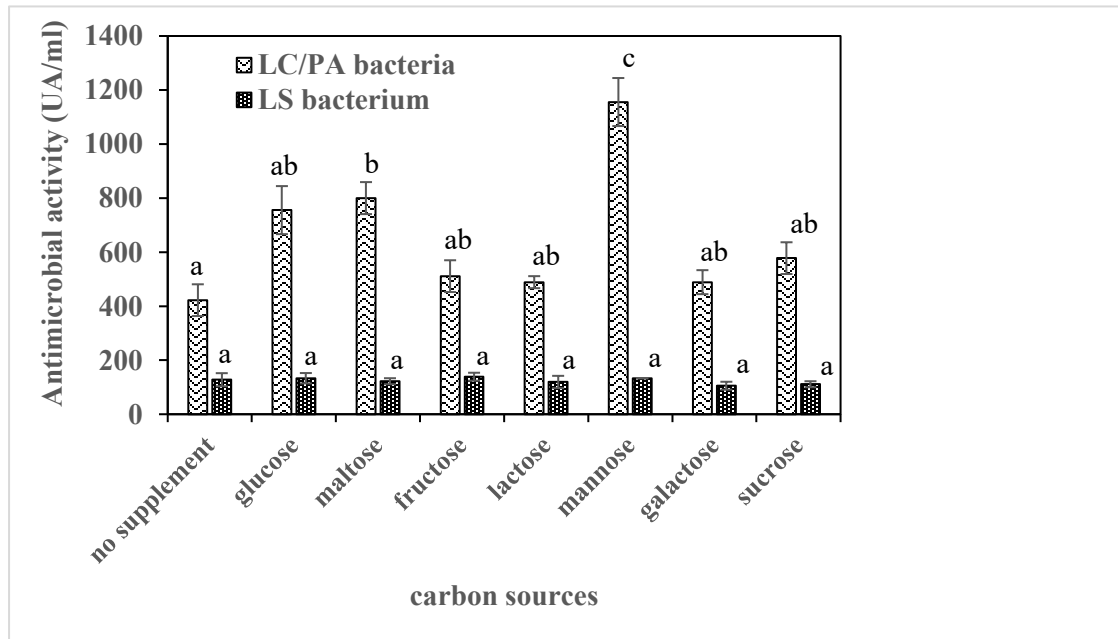
**Figure 3:** Effect of pH on the BLIS production by LC/PA and LS bacteria

### 3.4. Effect of carbon sources on production of BLIS

The results of different carbon sources including glucose, maltose, fructose, lactose, mannose, galactose, and sucrose, as a variable in BLIS production by LC/PA and LS bacteria are shown in **figure 4**. Regarding LC/PA bacteria, the addition of 2% (p/v) mannose to the culture medium resulted in a significant increase of the antimicrobial activity from 422.22 AU/ml to 1155.56 AU/ml, which was 2.7 folds higher compared to the medium without supplement. Addition of other sugars such as maltose, glucose, and sucrose led to an increase in antimicrobial activity with values of 800, 755.56, and 577.78 AU/ml, respectively. However, no noticeable impact in antimicrobial activity was observed after adding fructose, lactose, and galactose as carbon sources to the fermentation media. Thus, mannose was selected for the following experiments. Our results are in accordance with the results reported by **Todorov *et al.* (2005b)**. They found that *Lactiplantibacillus plantarum* was able to produce bacteriocin levels of 12,800 AU/ml in the presence of 10 to 20 g/l of D-mannose and the antimicrobial activity level increased up to 25,600 AU/ml in the presence of 30 to 40 g/l of mannose, while other sugars such as fructose, saccharose, or lactose did not influence bacteriocin production. In addition, **Turgis *et al.* (2016)** found a higher concentration of nisin in MRS supplemented with 2% glucose or lactose and an increase in production of pediocin in tryptone-glucose-

yeast extract supplemented with 2% fructose or galactose. It can be concluded that bacteriocin production is highly affected by type and level of the carbon sources.

On the other hand, the addition of different carbon sources to the medium did not show a significant effect ( $P > 0.05$ ) on the production of BLIS by LS bacterium. The antimicrobial activity of BLIS produced by LS bacterium was between 105.56 and 138.89 AU/ml after addition of different carbon sources. It has been reported that addition of different supplements in the growth medium have a positive impact on production of bacteriocins. However, in some cases over-loading of supplements has a reverse impact and can inhibit the growth and bacteriocin production by LAB (Abbasiliasi *et al.*, 2016).



**Figure 4:** Effect of carbon sources on the BLIS production by LC/PA and LS bacteria

### 3.5. Effect of different nitrogen sources on BLIS production

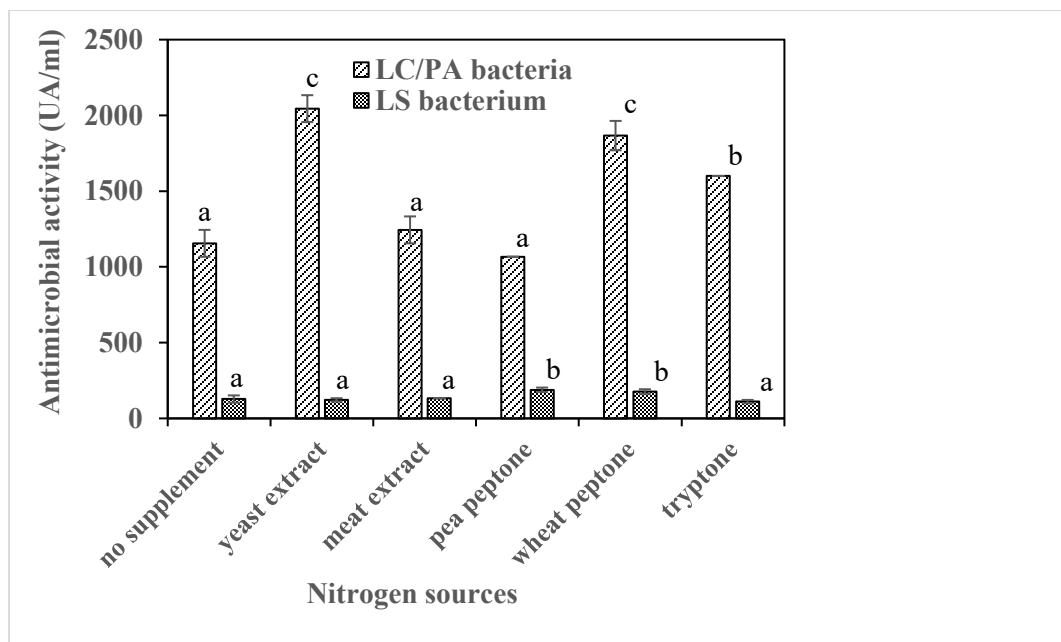
Nitrogen sources are considered an important ingredient for growth and production of bacteriocins by LAB. In this study various nitrogen sources such as yeast extract, meat extract, pea peptone, wheat peptone, and tryptone were added as supplement to MRS medium. Results are shown in **Figure 5**. A pronounced increase in the antimicrobial activity of BLIS in the media supplemented with yeast extract, wheat peptone and tryptone was observed for the LC/PA bacteria in comparison with the medium without addition of nitrogen source. An increasing antimicrobial activity to 2044.44 AU/ml obtained as a result of addition of yeast extract, which could be the most potent compound in inducing BLIS production. Antimicrobial activity of BLIS produced in MRS medium enriched with yeast extract showed an increase of 1.77 and 4.84 times

higher compared to those produced in medium supplemented with mannose and un-supplemented MRS medium, respectively.

Regarding LS bacterium, results showed an increase in the antimicrobial activity of BLIS produced in media supplemented with pea peptone and wheat peptone to the level of 188.89 and 177.78 AU/ml, respectively. These increasing values were 1.48 and 1.39 times higher compared to un-supplemented MRS medium (127.78 AU/ml). Study conducted by **Mataragas *et al.* (2004)** showed that addition of nitrogen sources had a significant impact on bacteriocin production during the growth of *Leuconostoc mesenteroides* L124 and *Lactobacillus curvatus* L442 (**Mataragas *et al.*, 2004**).

In most cases the presence of a nitrogen source is crucial for bacteriocin production (**Abbasiliasi *et al.*, 2017**). **Abo-Amer (2011)** studied the effect of organic nitrogen sources on bacteriocin production by *Lactobacillus acidophilus* AA11 and found that optimal production was recorded in the presence of yeast extract (4%). *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* A164 produced more nisin in M17L broth supplemented with 1.0% yeast extract and this activity was at least 2-fold higher than those observed in presence of other nitrogen sources (**Cheigh *et al.*, 2002**). Studies carried out by **Aasen *et al.* (2000)** showed that media supplemented by yeast extract was more effective than other sources of nitrogen such as tryptone for production of bacteriocins by *Lactobacillus sakei* (**Aasen *et al.*, 2000**). Yeast extract is the water-soluble fraction of yeast cells made up primarily of amino acids, peptides, carbohydrates, and salts. The amino acids or peptides in yeast extract could act as inducer or precursor for bacteriocin synthesis by LAB (**Abbasiliasi *et al.*, 2017**). **Ramachandran *et al.* (2012)** showed that among the various nitrogen sources investigated peptone was found to be the best inducer of bacteriocin production by *Lactococcus lactis*. Similar results were reported by **Mataragas *et al.* (2004)**, who found that production of bacteriocin by *Lactobacillus curvatus* was increased in MRS enriched with 2% peptone. Hence, specific nutrients are required to produce bacteriocins and should be evaluated since it also depends on properties of LAB strains as observed in current study. It can be concluded that the type of nitrogen source plays an important role in the synthesizing process of bacteriocin by different LAB.





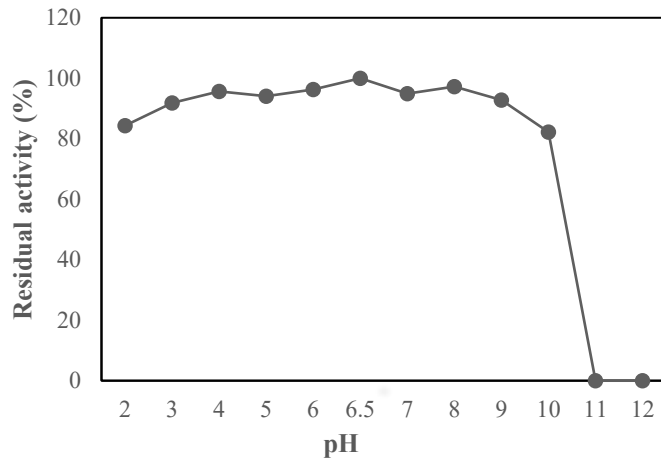
**Figure 5:** Effect of nitrogen sources on the BLIS production by LC/PA and LS bacteria

### 3.6. Sensitivity of the CFS-LC/PA to changes of pH and temperature

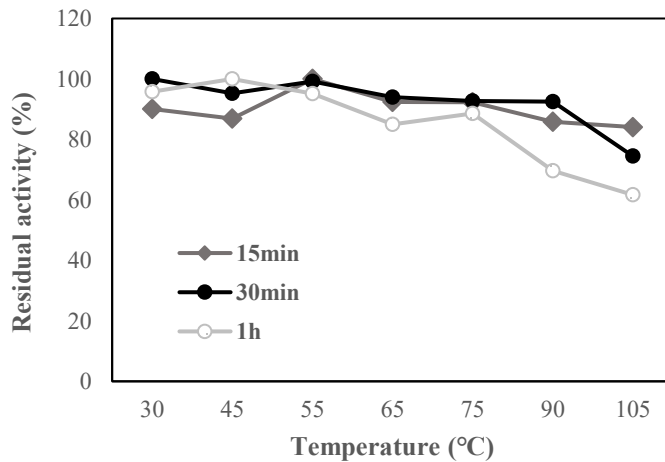
Bacteriocins have their antimicrobial activity even after changes in pH and temperature of food matrix or preserving condition due to their heat-stable characteristic (Yang *et al.*, 2018). Based on the results of antimicrobial activity, CFS-LC/PA was selected to evaluate its sensitivity to changes in pH and temperature. **Figures 6 and 7** show the residual antimicrobial activity of BLIS in relation to the variation in pH and temperature of the CFS of LC/PA bacteria. In terms of pH variation, the maximum antimicrobial activity was at pH 6.5. There was no significant difference in antimicrobial activity at different pH between 3 and 9, which the residual activity was above 90%. This activity dropped to 84.34% and 82.20% at pH 2 and 10, respectively, while there was no antimicrobial activity above pH 10.

Regarding the temperature variation at different times of 15, 30, and 60 minutes, it can be noted that the maximum antimicrobial activity was dependent on the time of exposure to a given temperature. Thus, maximum activity was observed after 15 minutes of incubation of the CFS at 55 °C or after 1 hour of exposure at 45 °C. For the temperature range tested in this work, 15 min of exposure led to changes in the activity of the CFS between 80 and 100%; on the other hand, above 75 °C, the exposure of the supernatant for 1 hour reduced its antimicrobial activity to below 70%. According to Ross *et al.* (1999), the potential application of a bacteriocin can be predicted by its properties, such as temperature and pH stability and broad action spectrum against microorganisms. Our results showed that the BLIS of LC/PA bacteria were heat-stable and had their antibacterial activity over a wide pH range; therefore, they are good candidates for food preservation. Similarly, bacteriocins produced by *Lactobacillus curvatus* (Funck *et al.*, 2020),

*Lactobacillus plantarum* (Le *et al.*, 2019), and *Lactobacillus sakei*, isolated from salpicao, a fermented meat product from North-West of Portugal, were heat-resistant and stable from pH 2.0 to 10.0 (Todorov *et al.*, 2013).



**Figure 6:** Effect of pH variation on the antimicrobial activity of the CFS-LC/PA



**Figure 7:** Effect of temperature variation and exposure time on the antimicrobial activity of the CFS-LC/PA

#### 4. Conclusions

In this study we addressed the role of growth parameters on BLIS production by LC/PA and LS bacteria. The maximum BLIS activity was achieved at temperature of 28 °C and pH of 5 for LC/PA bacteria and, applying mannose as a source of carbon and yeast extract as a source of nitrogen in the culture medium of MRS broth improved the production of BLIS. BLIS of the LC/PA bacteria retained its activity over a wide range of pH and at high temperatures making it a good candidate to be used in food preservation. Further

study on the evaluation of its application in combination with other antibacterial agents such as essential oils in preservation of food products should be conducted. Results of this study demonstrated potential application of bacteriocinogenic LAB as starter culture in meat products and as a bio-preservative for improving the safety of food products.

### **Funding**

This study was funded by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) (RDCPJ 531475-18) and Montpak International (veal meat processing company) (grant number of CRSNG-RDCPJ 531475-18), and by a chair granted by Quebec Ministry of Agriculture, Fishery and Food (MAPAQ) (grant number of PPIA 12).

### **Conflict of interest**

The authors have no relevant financial or non-financial interests to disclose

## References

- Aasen I.M., Møretrø T., Katla T., Axelsson L., & Storrø I. (2000). Influence of complex nutrients, temperature and pH on bacteriocin production by *Lactobacillus sakei* CCUG 42687. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 53(2): 159-166.
- Abbasiliasi S., Tan J.S., Kadkhodaei S., Nelofer R., Tengku I.T.A., Mustafaa S., & Ariff A.B. (2016). Enhancement of BLIS production by *Pediococcus acidilactici* kp10 in optimized fermentation conditions using an artificial neural network. *RSC Advances*, 6: 6342–6349.
- Abbasiliasi S., Tan J.S., Tengku I.T.A., Bashokouh F., Ramakrishnan N.R., Mustafa S. & Ariff A.B. (2017). Fermentation factors influencing the production of bacteriocins by lactic acid bacteria: a review. *RSC Advances*, 7: 29395-29420.
- Abitayeva G.K., Urazova M.S., Abilkhadirov A.S., Sarmurzina Z.S. & Shaikhin S.M. (2021). Characterization of a new bacteriocin-like inhibitory peptide produced by *Lactobacillus sakei* B-RKM 0559. *Biotechnology Letters*, 43(12): 2243-2257.
- Abo-Amer A.E. (2011). Optimization of bacteriocin production by *Lactobacillus acidophilus* AA11, a strain isolated from Egyptian cheese. *Annals of Microbiology*, 61: 445–452.
- Ahmad V., Khan M.S., Jamal Q.M.S., Alzohairy M.A., AlKaraawi M.A. & Siddiqui M.U. (2017). Antimicrobial potential of bacteriocins: In therapy, agriculture and food preservation. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 49(1): 1–11.
- Albano H., Pinho C., Leite D., Barbosa J., Silva J., Carneiro L., Magalhães R., Hogg T. & Teixeira P. (2009). "Evaluation of a bacteriocin-producing strain of *Pediococcus acidilactici* as a biopreservative for "Alheira", a fermented meat sausage." *Food Control*, 20(8): 764-770.
- Alvarez-Sieiro P., Montalbán-López M., Mu D. & Kuipers O.P. (2016). Bacteriocins of lactic acid bacteria: extending the family. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100, 2939–2951.
- Balciunas E.M., Martinez F.A.C., Todorov S.D., de Melo F.B.D.G., Converti A., de Souza O.R.P. (2013). Novel biotechnological applications of bacteriocins: a review. *Food Control*, 32: 134–142.
- Barbosa M.S., Todorov S.D., Ivanova I., Chobert J-M., Haertlé T. & Franco B.D.G.M. (2015). Improving safety of salami by application of bacteriocins produced by an autochthonous *Lactobacillus curvatus* isolate. *Food Microbiology*, 46: 254–262.
- Cabo M.L., Murado M.A., Gonza´lez M.P. & Pastoriza L. (2001). Effects of aeration and pH gradient on nisin production. A mathematical model. *Enzyme and Microbial Technology*, 29(4–5): 264–273.
- Casaburi A., Di M.V., Ferranti P., Picariello L. & Villani F. (2016). Technological properties and bacteriocins production by *Lactobacillus curvatus* 54M16 and its use as starter culture for fermented sausage manufacture. *Food Control*, 59: 31-45.
- Casquete R., Castro S.M. & Teixeira P. (2017). Evaluation of the combined effect of chitosan and lactic acid bacteria in Alheira (Fermented Meat Sausage) Paste. *Journal of Food Processing and Preservation*, 41(2), Article e12866.

Castellano P. & Vignolo G. (2006). Inhibition of *Listeria innocua* and *Brochothrix thermosphacta* in vacuum-packaged meat by addition of bacteriocinogenic *Lactobacillus curvatus* CRL705 and its bacteriocins. *Letters in Applied Microbiology*, 43: 194–199.

Castro M.P., Palavecino N.Z., Herman C.O., Garro O.A. & Campos C.A. (2011). Lactic acid bacteria isolated from artisanal dry sausages: Characterization of antibacterial compounds and study of the factors affecting bacteriocin production. *Meat Science*, 87: 321–329.

Cheigh C-I., Choi H-J., Park H., Kim S-B., Kook M-C., Kim T-S., Hwang J-K. & Pyun Y-R. (2002). Influence of growth conditions on the production of a nisin-like bacteriocin by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* A164 isolated from kimchi. *Journal of Biotechnology*, 95: 225–235.

Cueva C., Moreno-Arribas M.V., Bartolome B., Salazar O., Vicente M.F. & Bills G.F. (2011). Antibiosis of vineyard ecosystem fungi against food-borne microorganisms. *Research in Microbiology*, 162(10): 1043–1051.

Darbandi A., Asadi A., Mahdizade A.M., Ohadi E., Talebi M., Halaj Z.M. & Kakanj M. (2022). Bacteriocins: Properties and potential use as antimicrobials. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 36(1): Article e24093.

De Vuyst L., & Leroy F. (2007). Bacteriocins from lactic acid bacteria: production, purification, and food applications. *Microbial Physiology*, 13(4): 194–199.

Dortu C., Huch M., Holzapfel W.H., Franz C.M.A.P. & Onart P. (2008). Anti-listerial activity of bacteriocin-producing *Lactobacillus curvatus* CWBI-B28 and *Lactobacillus sakei* CWBI-B1365 on raw beef and poultry meat. *Letters in Applied Microbiology*, 47(6): 581–586.

Dussault D., Vu K.D. & Lacroix M. (2016). Enhancement of nisin production by *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis*. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 8: 170–175.

Favaro L. & Todorov S.D. (2017). Bacteriocinogenic LAB strains for fermented meat preservation: perspectives, challenges, and limitations. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 9, 444–458.

Fontana C., Coconcelli P.S., Vignolo G. & Saavedra L. (2015). Occurrence of antilisterial structural bacteriocins genes in meat borne lactic acid bacteria. *Food Control*, 47: 53–59.

Funck G.D., Marques J.L., Dannenberg G.S., Cruxen C.E.S., Pohl S.C.P., Prigol M., Silva M.R.P., Silva W.P. & Fiorentini A.M. (2020). Characterization, toxicity, and optimization for the growth and production of bacteriocin-like substances by *Lactobacillus curvatus*. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 12: 91–101.

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

Ghalmi H., Allaoui A., Destain J., Benkerroum N. & Thonart P. (2006). Bacteriocin activity by *Lactobacillus curvatus* CWBI-B28 to inactivate *Listeria monocytogenes* in coldsmoked salmon during 4 degrees C storage. *Journal of Food Protection*, 69: 1066–1071.

Guerra N.P. & Pastrana L. (2003). Influence of pH drop on both nisin and pediocin production by *Lactococcus lactis* and *Pediococcus acidilactici*. *Letters in Applied Microbiology*, 37(1): 51–55.

- Haney E.F., Straus S.K. & Hancock R.E.W. (2019). Reassessing the host defense peptide landscape. *Frontiers in Chemistry*, 7: 1–22.
- Héquet A., Laffitte V., Simon L., De Sousa-Caetano D., Thomas C., Fremaux C. & Berjeaud J.M. (2007). Characterization of new bacteriocinogenic lactic acid bacteria isolated using a medium designed to simulate inhibition of *Listeria* by *Lactobacillus sakei* 2512 on meat. *International Journal of Food Microbiology*, 113, 67–74.
- Hye Y.C., Joon S.K. & Wang J.K. (2011). Optimization of conditions for the maximum bacteriocin production of *Enterococcus faecium* DB1 using response surface methodology. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, 31: 176-182.
- Iyapparaj P., Thirumalai M., Ramasamy R., Santhiyagu P., Chandrasekaran K., Grasian I. & Arunachalam P. (2013). Optimization of bacteriocin production by *Lactobacillus sp.* MSU3IR against shrimp bacterial pathogens. *Aquatic Biosystems*, 9: 1-10.
- Katikou P., Ambrosiadis I., Georgantelis D., Koidis P. & Georgakis S.A. (2005). Effect of *Lactobacillus*-protective cultures with bacteriocin-like inhibitory substances on microbiological, chemical and sensory changes during storage of refrigerated vacuum-packaged sliced beef. *Journal of Applied Microbiology*, 99: 1303–1313.
- Kim S.W., Ha Y.J., Bang K.H., Lee S., Yeo J-H., Yang H-S., Kim T-W., Lee K.P. & Bang W.Y. (2020). Potential of bacteriocins from *Lactobacillus taiwanensis* for producing bacterial ghosts as a next generation vaccine. *Toxins*, 12(7): 432.
- Le N.T.T., Bach L.G., Nguyen D.C., Le T.H.X., Pham K.H., Nguyen D.H. & Huang T.T.T. (2019). Evaluation of factors affecting antimicrobial activity of bacteriocin from *Lactobacillus plantarum* microencapsulated in alginate-gelatin capsules and its application on pork meat as a bio-preservative. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 16(6): 1017.
- Leroy F. & De Vuyst L. (1999). Temperature and pH conditions that prevail during fermentation of sausages are optimal for production of the antilisterial bacteriocin sakacin K. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(3): 974-981.
- Leroy F., Moreno M.F. & 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.
- Malheiros P.S., Sant’Anna V., Todorov S.D. & Franco B.D.G.M. (2015). Optimization of growth and bacteriocin production by *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* 2a. *Brazilian Journal of Microbiology*, 46: 825–834.
- Masuda Y., Perez R.H., Zendo T. & Sonomoto K. (2016). Nutrition-adaptive control of multiple-bacteriocin production by *Weissella hellenica* QU 13. *Journal of Applied Microbiology*, 120(1): 70–79.
- Mataragas M., Metaxopoulos J., Galiotou M. & Drosinos E.H. (2003). Influence of pH and temperature by *Leuconostoc mesenteroides* L124 and *Lactobacillus curvatus* L442. *Meat Science*, 64(3): 265–271.

- Mataragas M., Drosinos E.H., Tsakalidou E. & Metaxopoulos J. (2004). Influence of nutrients on growth and bacteriocin production by *Leuconostoc mesenteroides* L124 and *Lactobacillus curvatus* L442. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 85: 191–198.
- Millette M., Dupont C., Archambault D. & Lacroix M. (2007). Partial characterization of bacteriocins produced by human *Lactococcus lactis* and *Pediococcus acidilactici* isolates. *Journal of Applied Microbiology*, 102: 274–282.
- Moradi M., Mardani K. & Tajik H. (2019a). Characterization and application of postbiotics of *Lactobacillus* spp. on *Listeria monocytogenes* in vitro and in food models. *LWT*, 111: 457-464,
- Moradi M., Tajik H., Mardani K., & Ezati P. (2019b). Efficacy of lyophilized cell-free supernatant of *Lactobacillus salivarius* (Ls-BU2) on *Escherichia coli* and shelf life of ground beef. *Veterinary research forum*, 10(3): 193-198.
- Moradi M., Kousheh S.A., Almasi H., Alizadeh A., Guimarães J.T., Yılmaz N. & Lotfi A. (2020). Postbiotics produced by lactic acid bacteria: The next frontier in food safety. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 19: 3390-3415.
- Møretrø T., Aasen I.M., Storrø I. & Axelsson L. (2000). Production of sakacin P by *Lactobacillus sakei* in a completely defined medium. *Journal of Applied Microbiology*, 88: 536–545.
- O’Bryan C.A., Koo O.K., Sostrin M.L., Ricke S.C., Crandall P.G. & Johnson M.G. (2018). Characteristics of bacteriocins and use as food antimicrobials in the United States. *Food and feed safety systems and analysis*, 273–286.
- O’Connor P.M., Kuniyoshi T.M., Oliveira R.P.S., Hill C., Ross R.P. & Cotter P.D. (2020). Antimicrobials for food and feed; a bacteriocin perspective. *Current Opinion in Biotechnology*, 61: 160–167.
- Ramachandran B.J., Srivathsan V., Sivakami J., Harish M., Ravi K.D.J. & kumar M. (2012). Production and optimization of bacteriocin from *Lactococcus lactis*. *Journal of Academia and Industrial Research*, 1: 306–309.
- Rad A.H., Aghebati-Maleki L., Kafil H.S., Gilani N., Abbasi A. & Khani N. (2021). Postbiotics, as Dynamic Biomolecules, and Their Promising Role in Promoting Food Safety. *Biointerface Research in Applied Chemistry*, 11(6): 14529 – 14544.
- Ross R.P., Galvin M., McAuliffe O., Morgan S.M., Ryan M.P., Twomey D.P., Meaney W.J. & Hill C. (1999). Developing applications for lactococcal bacteriocins. *Antonie van Leeuwenhoek*, 76: 337–346.
- Shanmugasundaram R., Markazi A., Mortada M., Ng T., Applegate T., Bielke L., Syed B., Pender C., Curry S. & Murugesan G. (2020). Research Note: Effect of synbiotic supplementation on caecal *Clostridium perfringens* load in broiler chickens with different necrotic enteritis challenge models. *Poultry Science*, 99: 2452-2458.
- Sidek N.L.M., Halim M., Tan J.S., Abbasiliasi S., Mustafa S. & Ariff A.B. (2018). Stability of bacteriocin-like inhibitory substance (blis) produced by *Pediococcus acidilactici* kp10 at different extreme conditions. *BioMed Research International*, (5973484):1-11.

Silva C.C.G., Silva S.P.M. & Ribeiro S.C. (2018). Application of bacteriocins and protective cultures in dairy food preservation. *Frontiers in Microbiology*, 9: 594.

Tang H.W., Phapugrangkul P., Fauzi H.M. & Tan J.S. (2022). Lactic acid bacteria bacteriocin, an antimicrobial peptide effective against multidrug resistance: a Comprehensive Review. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 28(1): 1-14.

Todorov S., Gotcheva B., Dousset X., Onno B. & Ivanova I. (2000). Influence of growth medium on bacteriocin production in *Lactobacillus plantarum* ST31. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 14(1): 50–55.

Todorov S.D. & Dicks L.M.T. (2005a). Optimization of bacteriocin ST311LD production by *Enterococcus faecium* ST311LD, isolated from spoiled black olives. *Journal of Microbiology*, 43(4): 370-374.

Todorov S.D. & Dicks L.M.T. (2005b). Effect of growth medium on bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* ST194BZ, a Strain Isolated from Boza. *Food Technology and Biotechnology* 43(2): 165–173.

Todorov S.D. & Dicks L.M.T. (2005c). Growth parameters influencing the production of *Lactobacillus rhamnosus* bacteriocins ST461BZ and ST462BZ. *Annals of Microbiology*, 55(4): 283-289.

Todorov S.D. (2009). Bacteriocins from *Lactobacillus plantarum* production, genetic organization and mode of action. A review. *Brazilian Journal of Microbiology*, 40(2): 209–221.

Todorov S.D. & Dicks L.M.T. (2009). Effect of modified MRS medium on production and purification of antimicrobial peptide ST4SA produced by *Enterococcus mundtii*. *Anaerobe*, 15(3): 65–73.

Todorov S.D., Wachsman M., Tomé E., Dousset X., Destro M.T., Dicks L.M.T., Melo F.B.D.G., Vaz-Velho M. & Drider D. (2010). Characterization of an antiviral pediocin-like bacteriocin produced by *Enterococcus faecium*. *Food Microbiology*, 27: 869–879.

Todorov S.D., Oliveira R. & Vaz-Velho M. (2012). Media optimization of bacteriocin ST22CH production by *Lactobacillus sakei* ST22CH isolated from *salpicão*, a traditional meat-product from Portugal. *Chemical Engineering Transactions*, 27: 283-288.

Todorov S.D., Vaz-Velho M., Franco B.D.G.M. & Holzapfel W.H. (2013). Partial characterization of bacteriocins produced by three strains of *Lactobacillus sakei*, isolated from *salpicão*, a fermented meat product from North-West of Portugal. *Food Control*, 30(1), 111–121.

Tome E., Pereira V.L. Lopes C.I., Gibbs P.A. & Teixeira P.C. (2008). *In vitro* tests of suitability of bacteriocin-producing lactic acid bacteria, as potential biopreservation cultures in vacuum-packaged cold-smoked salmon. *Food Control*, 5: 535–543.

Turgis M., Vu K.D., Millette M., Dupont C. & Lacroix M. (2016). Influence of environmental factors on bacteriocin production by human isolates of *Lactococcus lactis* MM19 and *Pediococcus acidilactici* MM33. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 8(1): 53–59.

Van H.A.J., Montalban-Lopez M. & Kuipers O.P. (2011). Evaluating the feasibility of lantibiotics as an alternative therapy against bacterial infections in humans. *Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology*, 7: 675–680.



Vijayakumar P.P. & Muriana P.M. (2017). Inhibition of *Listeria monocytogenes* on ready-to-eat meats using bacteriocin mixtures based on mode-of-action. *Foods*, 6(3): 22.

Wang Y., Qin Y., Zhang Y., Wu R. & Li P. (2019). Antibacterial mechanism of plantaricin LPL-1, a novel class IIa bacteriocin against *Listeria monocytogenes*. *Food control*, 97: 87-93.

Yang S-C., Lin C-H., Sung C.T. & Fang J-Y. (2014). Antibacterial activities of bacteriocins: Application in foods and pharmaceuticals. *Frontiers in Microbiology*, 5: 241.

Yang E., Fan L., Yan J., Jiang Y., Doucette C., Fillmore S. & Walker B. (2018). Influence of culture media, pH and temperature on growth and bacteriocin production of bacteriocinogenic lactic acid bacteria. *AMB Express*, 8(1): 1-14.

Yordshahi A.S., Moradi M., Tajik H. & Molaei R. (2020). Design and preparation of antimicrobial meat wrapping nanopaper with bacterial cellulose and postbiotics of lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 321.

Zhang J., Zhang Y., Liu S.N., Ye H. & Zhou Z.J. (2012). Modelling growth and bacteriocin production by *Pediococcus acidilactici* PA003 as a function of temperature and pH value. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 166(6): 1388–1400.

Zhou K., Zeng Y.T., Han X.F. & Liu S.L. (2015). Modelling growth and bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* BC-25 in response to temperature and pH in batch fermentation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 176(6): 1627–1637.

### **Lien entre le chapitre 2 et le chapitre 3**

Le chapitre 2 intitulé « Influence of Growth Parameters on Bacteriocin Production by Lactic Acid Bacteria Present in Commercial Ferments Used for the Fermentation of Meat » avait pour objectif de développer une nouvelle source de bactériocines à partir de *Lactobacillus sakei* et de la combinaison *Lactobacillus curvatus/Pediococcus acidilactici*, des bactéries lactiques présentes dans des ferments utilisés pour la fermentation de la viande, et d'améliorer la production des bactériocines par ces bactéries en variant les conditions de fermentation. Les bactériocines obtenues à l'issue de cette phase ont été nécessaires pour le développement des formulations antimicrobiennes. Cet aspect a été abordé dans le chapitre 3 intitulé « Evaluation of Combined Effects of Biopreservatives on Sensory Quality and Shelf life of Meatballs ». Les bactériocines ont été combinées aux huiles essentielles afin d'obtenir des formulations à fort pouvoir antimicrobien. Les formulations antimicrobiennes développées ont été incorporées dans les boulettes de viande pour améliorer leur durée de conservation.

### **CHAPITRE 3: EVALUATION OF COMBINED EFFECTS OF BIOPRESERVATIVES ON SENSORY QUALITY AND SHELF LIFE OF MEATBALLS**

---

#### **ÉVALUATION DES EFFETS COMBINÉS DES BIOCONSERVATEURS SUR LA QUALITÉ SENSORIELLE ET LA DURÉE DE CONSERVATION DES BOULETTES DE VIANDE**

Gildas Gaëlle Domguia Foudjing, Zahra Allahdad, Stéphane Salmieri, Monique Lacroix\*

L'article a été soumis pour publication dans le journal scientifique « Meat Science » le 14 février 2022.  
Facteur d'impact: 5.209.

Le nombre de figures et de tableaux et le style des références ont été présentés selon le guide des auteurs du journal

#### **Contributions des auteurs**

Ce travail de recherche a été réalisé sous la supervision de Pre. Monique Lacroix. Toutes les expériences réalisées en laboratoire ainsi que la rédaction de l'article ont été faites par Gildas Gaëlle Domguia Foudjing. Les discussions sur les résultats et les protocoles ont été assistés par Stéphane Salmieri et Pre Monique Lacroix tandis que les corrections et révisions de l'article ont été effectuées par Zahra Allahdad et Pre Monique Lacroix.

De : em.meatsci.0.795e22.4c8f378e@editorialmanager.com  
<em.meatsci.0.795e22.4c8f378e@editorialmanager.com> De la part de Meat Science  
Envoyé : 14 février 2022 23:25  
À : Lacroix, Monique <monique.lacroix@inrs.ca>  
Objet : Confirming handling editor for submission to Meat Science

Attention : ce courriel provient d'un expéditeur externe.

\*This is an automated message.\*

Manuscript Number: MEATSCI-D-22-00108

Evaluation of combined effects of biopreservatives on sensory quality and shelf life of meatballs

Dear Professor Lacroix,

The above referenced manuscript will be handled by Editor-in-Chief Dr David Hopkins .

To track the status of your manuscript, please log into Editorial Manager  
at <https://www.editorialmanager.com/meatsci/>.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Meat Science

More information and support

You will find information relevant for you as an author on Elsevier's Author  
Hub: <https://www.elsevier.com/authors>

FAQ: How can I reset a forgotten password?

[https://service.elsevier.com/app/answers/detail/a\\_id/28452/supporthub/publishing/](https://service.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/28452/supporthub/publishing/)

For further assistance, please visit our customer service

site: <https://service.elsevier.com/app/home/supporthub/publishing/>

Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions, and learn more about Editorial Manager via interactive tutorials. You can also talk 24/7 to our customer support team by phone and 24/7 by live chat and email

#AU\_MEATSCI#

To ensure this email reaches the intended recipient, please do not delete the above code

---

In compliance with data protection regulations, you may request that we remove your personal registration details at any time. (Use the following URL: <https://www.editorialmanager.com/meatsci/login.asp?a=r>). Please contact the publication office if you have any questions.

## Résumé

Le but de cette étude était de prolonger la durée de conservation des boulettes de viande en développant des formulations antimicrobiennes à base d'huiles essentielles (HE) et de bactériocines. La détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) suivie de la méthode du damier a montré que l'extrait de citron, la formulation méditerranéenne et les HE de thym, *Cinnamon tamala* et *Cinnamon zeylanicum* ont des concentrations inhibitrices comprises entre 20 et 5000 ppm. La bactériocine du ferment FLC a montré une activité entre 10000 et 80000 ppm contre *Leuconostoc mesenteroides*, *Carnobacterium divergens*, *Lactobacillus curvatus*, *Listeria innocua*, *Listeria monocytogenes* et *Pseudomonas aeruginosa*, mais n'a eu aucun effet sur certaines bactéries Gram-négatives. La combinaison des antimicrobiens bactériocine/*Cinnamon tamala*/*Cinnamon zeylanicum* ou *Cinnamon tamala*/*Cinnamon zeylanicum* a eu un effet synergique ou additif sur toutes les bactéries. L'encapsulation d'antimicrobiens dans de la gélatine a permis de maintenir plus longtemps la teneur en antimicrobiens disponibles, de réduire les concentrations de TBARS et de réduire la détérioration de la couleur par rapport aux antimicrobiens libres. Cette nouvelle formulation a démontré une efficacité à prolonger le temps de conservation de la viande fraîche transformée de 2 jours en termes d'analyse microbienne par rapport au témoin et aux échantillons avec des antimicrobiens libres.

**Mots clés :** Bio-conservateurs, Encapsulation, Durée de vie, Évaluation sensorielle, Produits carnés

## **Evaluation of Combined Effects of Biopreservatives on Sensory Quality and Shelf life of Meatballs**

Gildas Gaëlle Domguia Foudjing, Zahra Allahdad, Stéphane Salmieri, Monique Lacroix\*

INRS Armand-Frappier Health Biotechnology Research Centre, Research Laboratories in Sciences, Applied to Food (RESALA), MAPAQ Research Chair in food safety and quality, Canadian Irradiation Center (CIC), Institute of Nutrition and Functional Foods (INAF), 531 des Prairies Blvd, Laval, QC, H7V 1B7, Canada

\*Corresponding author: Pre. Monique Lacroix, *Tel: 450-687-5010 # 4489, Fax: 450-686-5501, E-mail:*

[Monique.Lacroix@inrs.ca](mailto:Monique.Lacroix@inrs.ca)

Declaration of Interest: none

## **Abstract**

The aim of this study was to extend the shelf life of meatballs through developing antimicrobial formulations based on essential oils (Eos) and bacteriocin. Determination of minimum inhibitory concentration (MIC) followed by checkerboard method showed citrus extract, *Cinnamon tamala*, *Cinnamon zeylanicum*, Mediterranean formulation and thyme EOs have inhibitory concentrations between 20 and 5000 ppm. The bacteriocin of the FLC ferment showed activity between 10,000 and 80,000 ppm against *Leuconostoc mesenteroides*, *Carnobacterium divergens*, *Lactobacillus curvatus*, *Listeria innocua*, *Listeria monocytogenes* and *Pseudomonas aeruginosa*, but had no effect on some Gram-negative bacteria. The combination of the antimicrobials bacteriocin/*cinnamon tamala*/*cinnamon zeylanicum* or *cinnamon tamala*/*cinnamon Zeylanicum* had a synergistic or additive effect on all bacteria. Encapsulation of antimicrobials in gelatin kept the available antimicrobial content to a greater extent, lower TBARS concentrations, and reduced color deterioration compared to free antimicrobials. This new formulation demonstrated efficacy in extending the shelf life of fresh processed meat by 2 days in terms of microbial analysis compared to the control and samples with free antimicrobials.

**Keywords:** Bio-preservatives, Encapsulation, Shelf life, Sensorial evaluation, Meat products

## 1. Introduction

Fresh meat is known as the most perishable food among all the important foodstuffs due to its chemical composition. Meat contains all the nutritive compounds in sufficient amounts required for microbial growth (Jay, 1992). Its pH corresponding to the optimal range for microbial growth (5.5–6.5), and its high-water activity ( $a_w > 0.99$ ) are both encouraging factors for microbial growth (Buncic *et al.*, 2014). Spoilage and pathogenic bacteria are causes of serious concern for the food industry because of fast deterioration of some products and transmitted diseases. Spoilage microorganisms generate significant economic losses for producers as they decrease the shelf life of meat and meat products by forming off-odours, colour changes, and unpleasant tastes as well as textural defects (Sun *et al.*, 2012). *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Carnobacterium* and *Pseudomonas* are among the most frequently encountered genera on vacuum or modified atmosphere packaged meat and play an important role in the spoilage of refrigerated raw meat (Holzapfel, 1998; Parente *et al.*, 2001; Nychas *et al.*, 2005). Microbial growth is the main factor in meat spoilage (Sun *et al.*, 2012); besides, oxidation of lipids and pigments is another indicator of spoilage of the meats stored under refrigerated conditions (Barbosa-Pereira *et al.*, 2014).

The control of microbial growth on meat products should be considered on proactive measures coupled with technological interventions. Consumers are increasingly concerned about the effects of food intake on their health. These effects are related to allergies, behavioral changes, and carcinogenic effects, leading to the tendency to foods processed with little or even without synthetic additives (Balciunas *et al.*, 2013). Biopreservation is an important approach to maintain the microbiological quality and safety of meat and meat products. This technique is used to extend food shelf life and reduce the risk of transmission of pathogenic microorganisms, permitting the reduction in the use of synthetic preservatives (Castellano *et al.*, 2008). The use of natural antimicrobial components as preservative agents has increased due to the consumer demand for more natural food products. Not only pressure of the consumer health concerns, but also a trend towards natural food additives so called “clean-labeling” has driven food industry to exploring of natural antimicrobial compounds as an alternative to synthetic food additives. Among natural antimicrobial compounds, essential oils (EOs) and metabolites such as bacteriocins secreted by lactic acid bacteria are increasingly studied; they can be used alone or in combination to optimize their effects (Chen *et al.*, 2004).

Due to their high volatility, the addition of EO to foods may cause undesirable sensorial changes (Lis-Balchin, *et al.*, 1998); further, higher concentrations of EOs are required for use in foods than in experimental media to achieve the same inhibitory effect due to the interaction of EOs with food compounds, such as meat fat (Burt, 2004). In addition, Rose *et al.* (1999) reported that direct application of bacteriocins may also be inactivated by proteolytic enzyme of meat components such as Glutathione (GSH, glutathione



S-transferase), which results in a loss of antibacterial activity. Therefore, an alternative method encapsulating these compounds using coating materials before their introduction into food improves their activity and their stability in complex food systems. Many researchers have reported the potential of microencapsulation of antimicrobial compounds to control foodborne pathogens such as *L. monocytogenes* (Ibarguren *et al.*, 2015; Narsaiah *et al.*, 2015).

The choice of biopolymers is an important step for the success of the microencapsulation processes. Gelatin is a transparent, tasteless and odorless protein obtained by prolonged boiling of connective tissue or animal bones. Its potential as an edible coating comes from its natural presence in meat and its film-forming ability. Villegas *et al.* (1999) have shown that gelatin coatings on meat in oxygen permeable or vacuum packaging reduce moisture loss and control lipid oxidation.

The aim of this study was to evaluate the potential of the microencapsulation based on gelatin to protect the antimicrobial activity of natural antimicrobial compounds during storage of fresh processed meat to extend its shelf life.

## **2. Materials and Methods**

### **2.1. Materials**

Selected antimicrobial compounds used in this study are bacteriocin of the FLC ferment, produced in our lab from the FLC ferment marketed; Citrus extract, Mediterranean formulation, thyme, *Cinnamon tamala* and *Cinnamon zeylanicum* essential oils (EOs) were purchased from BSA (Montréal, Québec, Canada).

### **2.2. Microorganisms and growing conditions**

*Leuconostoc mesenteroides subsp mesenteroides*, *Lactobacillus sakei* 15521, *Lactobacillus curvatus* V32, *Carnobacterium divergens* 35677, *Pseudomonas aeruginosa* 15442, *Brochothrix thermosphacta* 11509, *Listeria monocytogenes* (LM 1045), *Listeria innocua* (LIN 51742), *Escherichia coli* (*E. coli* O157:H7 380-94, *E. coli* O157:H7 RM1239, *E. coli* O157:H7 RM1931, *E. coli* O157:H7 RM1933, *E. coli* O157:H7 RM1934), and *Salmonella* (*S. Typhimurium* 1344, *S. enterica* 6962) were stored at -80 °C in the Brain-Heath Infusion medium (BHI; Difco) or Man Rosa and Sharpe (MRS) containing glycerol (20% v/v) and their sub-culturing was carried out at 30 or 37 °C. Before each experiment, each strain was subjected to 2 subcultures of 24 hours.

### **2.3. Minimum inhibitory concentration (MIC) of the antimicrobial compounds on the spoilage and pathogenic flora**

The microdilution test as described by Hossain *et al.* (2016) was performed in sterile 96-well flat-bottom microplates. The first step was introducing 100 µL of appropriate culture medium into all the wells. 100 µL of the antimicrobial solution were added to the first column. Then, 100 µL were taken from the first column

and added to the next column and so on, making it possible to carry out the cascade dilution of the solution containing the antimicrobial. Once the dilutions were carried out, 100 µL of the target strain at a concentration of 10<sup>5</sup> CFU/mL were added to the wells. One well row served as a negative control (did not contain bacteria replaced by peptone water) and the last column served as a positive control (does not contain antimicrobial solution). Each experiment was carried out in triplicate. The microplates were then incubated at an appropriate temperature under agitation for 18 to 24 hours, then the absorbance was read at 595 nm. The MIC is defined as the lowest concentration at which the turbidity is identical to the negative control. The culture supernatant containing the bacteriocin was lyophilized and the protein content in the powder obtained was determined by the Kjeldahl method.

#### **2.4. Determination of the synergistic effects between essential oils and bacteriocins by the checkerboard method**

The checkerboard method was performed (Turgis *et al.*, 2012) to obtain the Fractional Inhibitory Concentration Index (FIC) for the combination of antimicrobials against the target bacteria. The method allows that different concentrations of each antimicrobial agent to be deposited in each well of the microplate in two axes (x and y) of a 6 × 6 array, so that each well of the microplate represents a different combination of two antimicrobial agents. The first antimicrobial (A) follows binary dilutions in a suitable medium along the x-axis, while the second antimicrobial (B) is always binary diluted along the y-axis. The final volume in each well was 100 µl comprising 50 µl of each dilution of antimicrobial. Subsequently, 100 µL of medium containing 5 log CFU/mL of the bacterial strain to be studied were added to all the wells. The plates were then incubated at the appropriate temperature for 18-24 hr and the optical density was read at 595 nm. All the tests were carried out in triplicate.

The FIC indices were calculated as follows:

$$FIC = FIC_A + FIC_B$$

$$FIC_A = MIC_{A \text{ (combined)}} / MIC_{A \text{ (alone)}}$$

$$FIC_B = MIC_{B \text{ (combined)}} / MIC_{B \text{ (alone)}}$$

The results were interpreted as follows:

synergistic effect if  $FIC < 0.5$ ; additive effect if  $0.5 \leq FIC \leq 1$ ; non-interactive effect if  $1 < FIC \leq 4$  or antagonistic effect if  $FIC > 4$ .

## 2.5. Preparation of the nanoemulsion

Two selected antimicrobial formulations were applied for nanoemulsion preparation by mixing the antimicrobial formulations at different concentrations in the presence of Tween 80 (same amount as the essential oils). The concentrations of the first formulation containing *Cinnanom tamala* and *Cinnamon zeylanicum* in the same ratio (1:1) were 0.05, 0.1 and 0.2% v/v, and the concentrations of the second formulation containing essentials oils and bacteriocin were: 0.39% (v/v) (i.e. 0.025% *Cinnamon tamala*; 0.025% *Cinnamon zeylanicum* and 0.34% bacteriocin of the FLC ferment), 0.77% (v/v) (i.e. 0.05% *Cinnamon tamala*; 0.05% *Cinnamon zeylanicum* and 0.67% bacteriocin from the FLC ferment) and 1.54% (v/v) (i.e. 0.1% of *Cinnamon tamala*; 0.1% of *Cinnamon zeylanicum* and 1.34% of bacteriocin of the FLC ferment). The mixture was homogenized using an Ultra-Turrax T25 high shear homogenizer (IKA Works Inc., Wilmington, NC, USA) at 15,000 rpm for 1 minute to obtain the coarse emulsion. This emulsion was then treated by sonication for 10 min at 70% amplitude with a Qsonica Q500 sonicator (Fisher Scientific, Ottawa, ON, Canada) to obtain the nanoemulsion (**Ben-Fadhel *et al.*, 2021**).

## 2.6. Encapsulation of the nanoemulsion

A gelatin solution (4%, w/v) was prepared by dissolving 4 g of gelatin in 100 mL of distilled water for 30 minutes, followed by heating at 45 °C for 30 minutes under continuous stirring. Then, the gelatin solution was mixed with the nanoemulsion at a 1:1 (v/v) ratio and homogenized at room temperature for 4 min at 13,000 rpm using an Ultra-Turrax homogenizer (**Seyed *et al.*, 2016**).

## 2.7. Deep well model in BHI agar to assess depletion of antimicrobial activity

The deep well model in BHI agar was followed according to **Huq *et al.* (2015)**. To prepare the deep well template in BHI agar for antimicrobial depletion assay, a solution containing BHI solids (3.7%) and agar (1.0%) was autoclaved for 20 min at 121 °C. The hot solution (225 mL) was poured into a 600 mL beaker at a height of 40 mm. After gel solidification, four wells (from the gel surface to the bottom) were made in each beaker using a 7.0 mm pipette tip. Subsequently, 1.0 mL of each preparation (free or encapsulated) was added to each well. Immediately after loading, day 0, and after 1, 3, 5, 7, 11, 18 and 25 days of storage at 4 °C, a 100 µL aliquot of each formulation preparation was transferred from the well to a plate of bioassay to determine antimicrobial availability.

## 2.8. Antimicrobial bioassay against *Carnobacterium divergens*

The activity of microencapsulated and free antimicrobials, either freshly prepared or stored according to the deep well model in BHI agar was determined as described by **Huq *et al.* (2015)**. BHI soft agar (1.0% agar instead of 1.5%) was prepared and autoclaved. After cooling, the solutions were inoculated with 1.0% (v/v) of BHI broth containing *Carnobacterium divergens* (10<sup>6</sup> CFU/mL) known as the most important lactic acid

bacterium in the putrefaction of meat. The inoculated broth (25mL) was poured into Petri dishes and allowed to solidify. Then, 7.0 mm diameter wells were made and 100  $\mu$ L of the antimicrobial's preparation were added to each well of agar. The dishes were incubated for 24 h at a temperature of 30 °C, and the zone of inhibition was measured to determine activity against *Carnobacterium divergens*. By plotting the zone of inhibition against different concentrations of the antimicrobials, the available content of antimicrobials (% v/v) was calculated during the storage.

## **2.9. In situ test on meatballs**

### **2.9.1. Meat processing**

Three independent batches of meat were supplemented with spice. The spicy meat was randomly separated into five groups. The first group served as the control (C) was mixed with 3% (v/w) sterile distilled water; the other 4 groups served as test samples were treated with 3% (v/w) of antimicrobial formulations in free (NE) and encapsulated (E) forms at concentrations of 0.2% v/v and 1.54% v/v respectively for the formulation 1 containing EOs (*Cinnamon tamala* + *Cinnamon zeylanicum*) and the formulation 2 containing EOs + bacteriocin. These antimicrobial concentrations were selected based on data of the previous experiment. The spice was irradiated at 5 kGy before adding in the meat. The meat was properly mixed with one of the antimicrobial formulations for 5 to 10 min with a sterile instrument then packaged and stored at 4 °C. Microbiological analysis of the meat samples was performed at given time intervals to reach 6 log CFU/g (acceptance limit).

### **2.9.2. Microbial analysis**

This analysis was carried out according to the method described by **Ouattara et al. (2002)**. Briefly, each ground veal sample was aseptically weighed (approximately  $10 \pm 0.2$  g) and homogenized for 2 min at 260 rpm in 90 mL of sterile peptone water (0.1%; Difco Laboratories, Detroit, Michigan) with a stomacher 400 laboratory mixer (Seward Medical, London, UK). From the resulting homogenate, serial dilutions were prepared, and the appropriate dilutions were plated out on sterile petri dishes containing the appropriate agar. Lactic acid bacteria, *Brochothrix thermosphacta* and *Pseudomonas spp.* were counted respectively on MRS, streptomycin thallos acetate actidione agar and cetrimide agar media with incubation at 25 °C for 48 h, and the total viable count was counted on TSA agar with incubation at 37 °C for 48 h.

### **2.9.3. Lipid oxidation analysis**

The thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) assay as described by **Ouattara et al. (2002)** was used to determine the amount of lipid oxidation in the meat samples. TBARS values were expressed as  $\mu$ g MA/g meat. Analyses were carried out on day 0 and at the end of the storage period based on total viable count. The end of the storage period was based on the limit of microbiological acceptability (6 log CFU/g).

#### 2.9.4. Color measurement

A color reader CR-10 Plus (Konica Minolta, Inc, Japan) with 8 mm diameter measuring aperture, illuminant D65, 10° Standard Observer was used to measure the CIE color attributes of meatballs on day 0 and at the end of the storage period based on total viable count. The measuring aperture was covered with a glass plate, and the instrument was calibrated against a white plate. The colour attributes were expressed as  $L^*$  (lightness),  $a^*$  (redness/greenness variation), and  $b^*$  (yellowness/blueness variation). The total colour change values ( $\Delta E$ ) were calculated with the formula as follows:

$$\Delta E = [(L_0^* - L^*)^2 + (a_0^* - a^*)^2 + (b_0^* - b^*)^2]^{1/2}$$

where  $L_0^*$ ,  $a_0^*$  and  $b_0^*$  denote values at day 0 of storage and  $L^*$ ,  $a^*$  and  $b^*$  denote values at the end of the storage period (Pattarasiroj *et al.*, 2020).

#### 2.9.5. Sensory analysis

Twenty trained panelists evaluated the smell and taste of the meat samples following the standard sensory evaluation protocol (Ghabraie *et al.*, 2016). The antimicrobial concentrations selected were 0.2% v/v for the EOs formulation (i.e. 0.1% *Cinnamom tamala* and 0.1% *Cinnamom zeylanicum*) and 1.54% v/v for the EOs + bacteriocin formulation (i.e. 0.1% *Cinnamom tamala* and 0.1% *Cinnamom zeylanicum* and 1.34% bacteriocin). Antimicrobials were used as encapsulated form. The prepared nanoemulsions were applied (3% v/w) to ground and spiced veal. The meat was cooked for 15 min at 205 °C and upon the temperature inside reached 80 °C, heating kept constant for 30 seconds. All treated samples were coded by random numbers and served to the panelists. The evaluation was carried out on a 9-point hedonic scale from 1 (I don't really like) to 9 (I like extremely). Sensorial tests were performed in a single session and panellists were provided with all treated samples at the same time.

#### 2.10. Statistic analysis

Statistical analysis was performed using PASW Statistics 19 software (IBM Corporation, Somers, NY, USA). All experiments were run in three independent batches for microbial and biochemical analysis and the data were subjected to analysis of variance (ANOVA) using a general linear model by considering treatment and days of storage as fixed effects and replicates as random factors. For the sensory analysis, treatments were considered as a fixed effect and panelist as random variable. Regarding sensorial test, it was done in a single session with 20 panelists. The difference of means was carried out using Duncan's Multiple Range test. Differences between means were considered significant when the confidence interval was smaller than 5 % ( $P \leq 0.05$ ).

### 3. Results

#### 3.1. Minimum inhibitory concentration of antimicrobials on bacterial strains

**Table 1** provides information on the MIC results. FLC ferment bacteriocin and essential oil solutions at an initial concentration of 80,000 ppm and 10,000 ppm respectively were tested on a set of bacterial strains. The essential oils *Cinnamon tamala*, *Cinnamon zeylanicum* and Mediterranean formulation showed MIC values of between 625 and 5000 ppm for all the strains tested; this was also the case with thyme, but this antimicrobial did not show any growth inhibition against *Pseudomonas aeruginosa*. The Citrus extract was active against all bacterial strains with MICs between 20 and 313 ppm, but there was an inhibition of growth of *Pseudomonas aeruginosa* at 1250 ppm. The bacteriocins of the FLC ferment have shown activity against certain strains including *Leuconostoc mesenteroides*, *Carnobacterium divergens*, *Lactobacillus curvatus*, *Listeria innocua*, *Listeria monocytogenes* and *Pseudomonas aeruginosa*, with MICs between 10,000 and 80,000 ppm. Strains of *E. coli*, *Salmonella* and *Lactobacillus sakei* were not inhibited by these bacteriocins.

**Table 1:** Minimum inhibitory concentration of selected antimicrobials on different bacterial strains

Antimicrobials (ppm)	Bacterial strains													
	<i>E.coli</i>	<i>E.coli</i>	<i>E.coli</i>	<i>E.coli</i>	<i>E.coli</i>	<i>Salmonella</i>	<i>Salmonella</i>	<i>LM</i>	<i>L.IN</i>	<i>P. aerugina</i>	<i>LB sakei</i>	<i>LB curvatus</i>	<i>L. mesenteroides</i>	<i>C. divergens</i>
Thyme	625	1250	625	313	1250	1250	625	1250	1250	> 10000	2500	1250	2500	1250
Mediterranean formulation	1250	1250	1250	625	2500	1250	1250	1250	2500	5000	1250	1250	2500	1250
<i>Cinnamon tamala</i>	625	625	625	625	625	625	1250	625	1250	2500	2500	625	2500	1250
<i>Cinnamon zeylanicum</i>	1250	625	625	1250	1250	1250	1250	1250	2500	2500	2500	625	2500	2500
Citrus extract.	156	156	156	78	156	156	313	78	156	1250	78	78	39	20
Bactériocin of ferment FLC	> 80000	> 80000	> 80000	> 80000	> 80000	> 80000	> 80000	80000	40000	80000	> 80000	40000	10000	40000

LB: *Lactobacillus*

LIN: *Listeria innocua*

LM: *Listeria monocytogenes*

### 3.2. Fractional inhibitory concentration index of combined antimicrobials

The combination of the antimicrobials made it possible to calculate the FIC index and to infer the resulting interaction between the compounds; the results are presented in **Table 2**. The combination of thyme/Mediterranean formulation/citrus extract and the combination of *Cinnamon tamala*/*Cinnamon zeylanicum* showed synergy or additive effects against all the bacteria strains. These two combinations were combined to FLC ferment bacteriocin to check synergy effects. The combination of the FLC ferment bacteriocin with the EOs *Cinnamon tamala* and *Cinnamon zeylanicum* exhibits synergistic activity against lactic acid bacteria (*Lactobacillus curvatus*, and *Carnobacterium divergens*), *Brochothrix thermosphacta* and all strains of *E. coli* and *Salmonella* tested in this work. Furthermore, an additive effect is observed for this same combination on other strains of lactic acid bacteria of *Lactobacillus sakei*, *Leuconostoc mesenteroides*, and on the strains of *Pseudomonas aeruginosa*, *L. monocytogenes* 1045 and *L. innocua* 51742.

The combination of the bacteriocins of the FLC ferment with the citrus extract and the essential oils of thyme and mediteranean formulation led a synergistic antimicrobial activity against the strains of *L. monocytogenes* 1045, *L. innocua* 51742, *Brochothrix thermosphacta* and all lactic acid bacteria used in this work. An additive effect of the antimicrobials is still noted on the strains of *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli* O157: H7 RM1933 and *E. coli* O157: H7 RM1934; however, there is no interaction between these antimicrobials on strains of *E. coli* O157: H7 380-94, *E. coli* O157: H7 RM1239, *E. coli* O157: H7 RM1931, *S. Typhimurium* 1344 and *S. enterica* 6962.



**Table 2:** Fractional inhibitory concentration index (FIC) of combined antimicrobial compounds against target bacteria

Bacteria	Formula							
	T + Mf + Ce		Ct + Cz		T + Mf + Ce + Ba		Ct + Cz + Ba	
	FIC	Effect	FIC	Effect	FIC	Effect	FIC	Effect
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	0.23	S	0.33	S	0.14	S	0.56	A
<i>Lactobacillus sakei</i>	0.28	S	0.29	S	0.14	S	0.91	A
<i>Lactobacillus curvatus</i>	0.32	S	0.10	S	0.27	S	0.27	S
<i>Carnobacterium divergens</i>	0.53	A	0.19	S	0.14	S	0.27	S
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0.54	A	0.50	A	0.75	A	0.50	A
<i>Brochothrix thermosphacta</i>	0.53	A	0.19	S	0.14	S	0.27	S
<i>Listeria monocytogenes</i> 1045	0.75	A	0.75	A	0.08	S	0.52	A
<i>Listeria innocua</i> 51742	1	A	0.625	A	0.08	S	0.52	A
<i>E.coli</i> O157:H7 380-94	1	A	0.75	A	1.02	NI	0.27	S
<i>E.coli</i> O157:H7 RM1239	1	A	0.625	A	1.02	NI	0.27	S
<i>E.coli</i> O157:H7 RM1931	1	A	0.625	A	1.05	NI	0.27	S
<i>E.coli</i> O157:H7 RM1933	0.75	A	0.75	A	0.86	A	0.27	S
<i>E.coli</i> O157:H7 RM1934	0.75	A	0.75	A	0.68	A	0.27	S
<i>Salmonella</i> Typhimurium 1344	1	A	0.625	A	1.02	NI	0.27	S
<i>Salmonella enterica</i>	1	A	0.625	A	1.02	NI	0.27	S

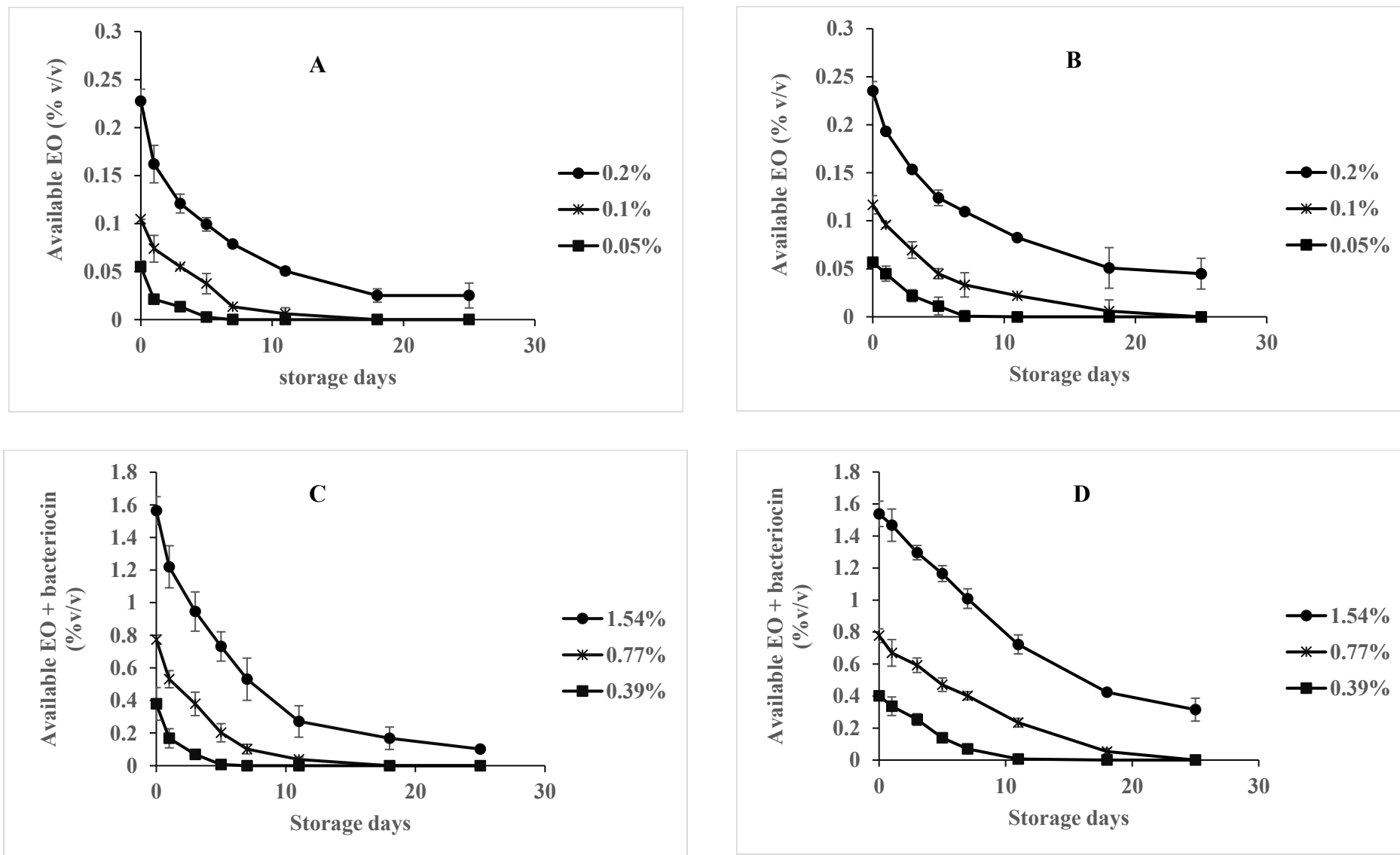
T= thyme; Mf=Mediterranean formulation; Ce=citrus extract; Ct= *Cinnamon tamala*, Cz= *Cinnamon Zeylanicum*; Ba= Bacteriocin

### 3.3. Availability of encapsulated or non-encapsulated antimicrobials during storage: *in vitro* test

The availability of free and encapsulated antimicrobials was assessed (*in vitro*) by assessment of growth inhibition of *Carnobacterium divergens* using the deep well model in BHI agar during storage at 4 °C. A

polynomial "standard curve" second order for free and encapsulated antimicrobials was used to correlate the inhibition zone with the amount of antimicrobials available. Fig. 1A and 1B show the results of the content of *Cinnamomum tamala*/*Cinnamomum zeylanicum* available for the free (A) and encapsulated (B) formulation during storage at 4 °C. After 1 day of storage, the concentration of the essential oils in the free form was 0.02, 0.07 and 0.16% whereas the values in the encapsulated form were 0.04, 0.09 and 0.19% respectively for the initial EOs concentrations of 0.05 %, 0.1% and 0.2% (v/v). After 7 days of storage, the free and encapsulated formulation of essential oils with the initial concentration of 0.05% has completely lost its antimicrobial activity while that of formulations 0.1 and 0.2% continue to decrease and show a residual amount of 0.01 and 0.08% respectively for the free EOs and 0.03 and 0.11% for the encapsulated forms, respectively. After 18 days of storage, the 0.1% free formulation exhibited no activity (absence of a clear zone of growth inhibition around the well) whereas the encapsulated form of 0.1% showed an activity corresponding to 0.006% of EOs that gradually disappeared around 25 days of storage. After 25 days of storage, the free and encapsulated form of 0.2% still showed an activity but free formulation exhibited an activity of 0.02% of EOs while that was 0.04% of EOs for encapsulated form (Fig. 1A and 1B).

Fig. 1C and 1D show the results of the available *Cinnamomum tamala*/*Cinnamomum zeylanicum*/bacteriocin for the free (C) and encapsulated (D) formulations during storage at 4 °C. After 1 day of storage, the antimicrobials in free form showed an available antimicrobial content of 0.17, 0.53 and 1.21%, whereas the encapsulated form showed the values of 0.34, 0.67 and 1.47% for initial antimicrobial concentrations of 0.39%, 0.77% and 1.54% (v/v) respectively. After 7 days of storage, there was no longer any antimicrobial activity for the free formulation of antimicrobials at a concentration of 0.39% while the encapsulated form showed an activity which corresponded to an antimicrobial content of 0.07%; this activity disappeared after 18 days of storage. The formulations with an initial antimicrobial content of 0.77 and 1.54% continued to decrease and showed an antimicrobial content of 0.1 and 0.53% respectively for free formulation and the values of 0.4 and 1.01% respectively for encapsulated form after 7 days of storage. The free antimicrobial formulation with an initial concentration of 0.77% showed no clear zone of growth inhibition after 18 days of storage at 4 °C; while the encapsulated form showed antimicrobial activity corresponding to an antimicrobial content of 0.05% and this activity disappeared after 25 days of storage. The formulations having an initial antimicrobial concentration of 1.54% still showed an antimicrobial activity after 25 days of storage with the values of 0.1 and 0.32% of antimicrobials compounds respectively for free and encapsulated formulation (Fig. 1C and 1D).



**Figure 1:** Available antimicrobial concentration of free *Cinnamon tamala/Cinnamon zeylanicum* (A), encapsulated *Cinnamon tamala/Cinnamon zeylanicum* (B), free *Cinnamon tamala/Cinnamon zeylanicum/FLC* ferment bacteriocin (C), and encapsulated *Cinnamon tamala/Cinnamon zeylanicum/FLC* ferment bacteriocin (D) against *Carnobacterium divergens* during storage at 4 °C in BHI agar.

### 3.4. Microbial analysis

#### 3.4.1. *Brochothrix Thermosphacta*

The results of microbiological analysis of *Brochothrix Thermosphacta* in meatballs during storage at 4 °C are shown in Fig. 2A. The results showed that on day 0 the load of *Brochothrix Thermosphacta* was 2.75, 2.68, 2.67, 2.67, and 2.52 log CFU/g respectively, for control (C); 0.2% non encapsulated (NE); 1.54% NE; 0.2% encapsulated (E) and 1.54% E. After 4 days of storage, the samples of C, 0.2% NE, 1.54% NE, 0.2% E, and 1.54% E exhibited the loads around 5.02, 5.03, 4.96, 4.74, and 4.3 log CFU/g, respectively. This microbial population changes gradually for all the samples tested, as the samples C and 0.2% NE reached the limit of acceptability with loads of around 6.15 and 6.12 log CFU/g respectively after 7 days of storage; while the samples of 1.54% NE, 0.2% E, and 1.54% E showed a respective charge of 5.94, 5.88 and 5.79 log CFU/g. The samples of 1.54% NE, 0.2% E, and 1.54% E reached the acceptability limit after 9 days of storage and showed the count of around 6.33, 6.25 and 6.16 log CFU/g respectively.

#### 3.4.2. Lactic acid bacteria

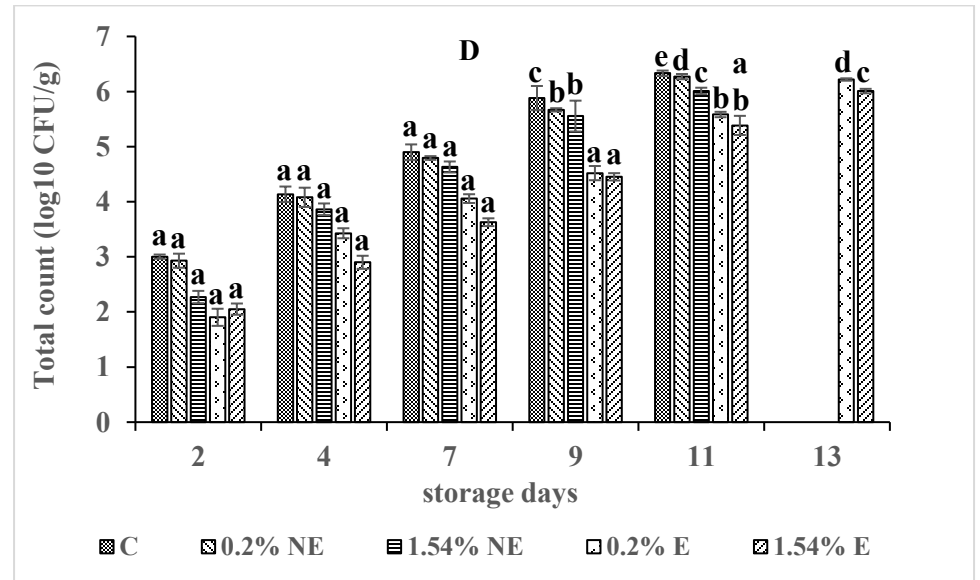
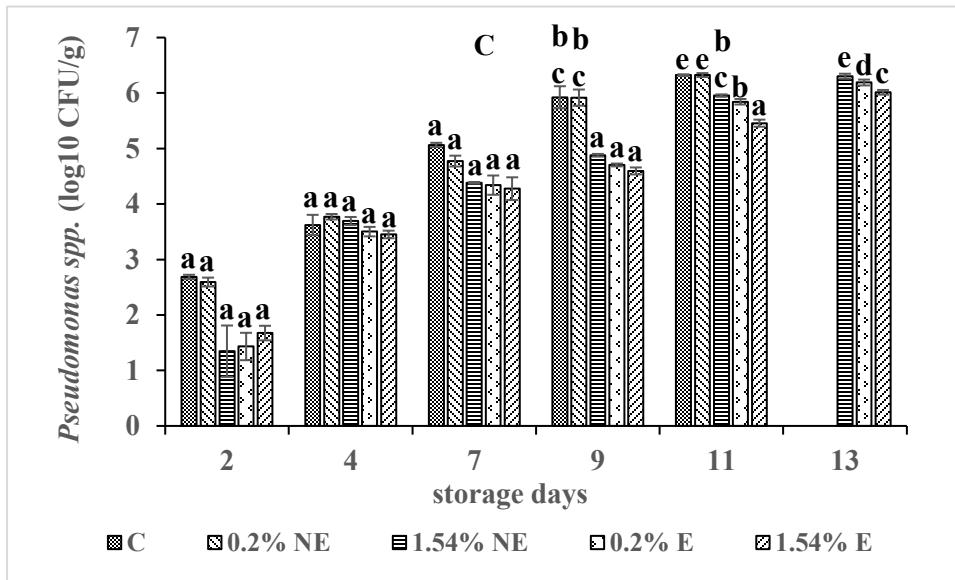
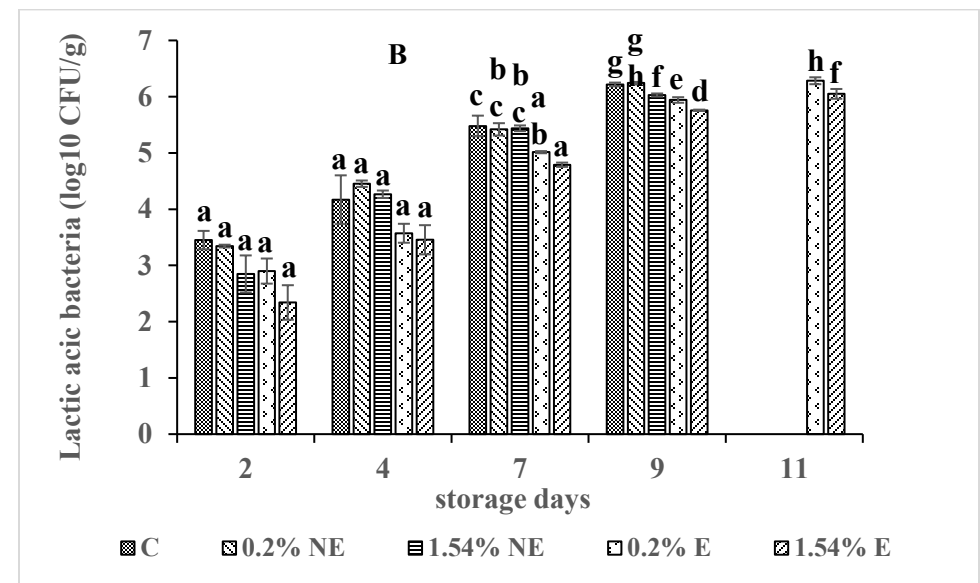
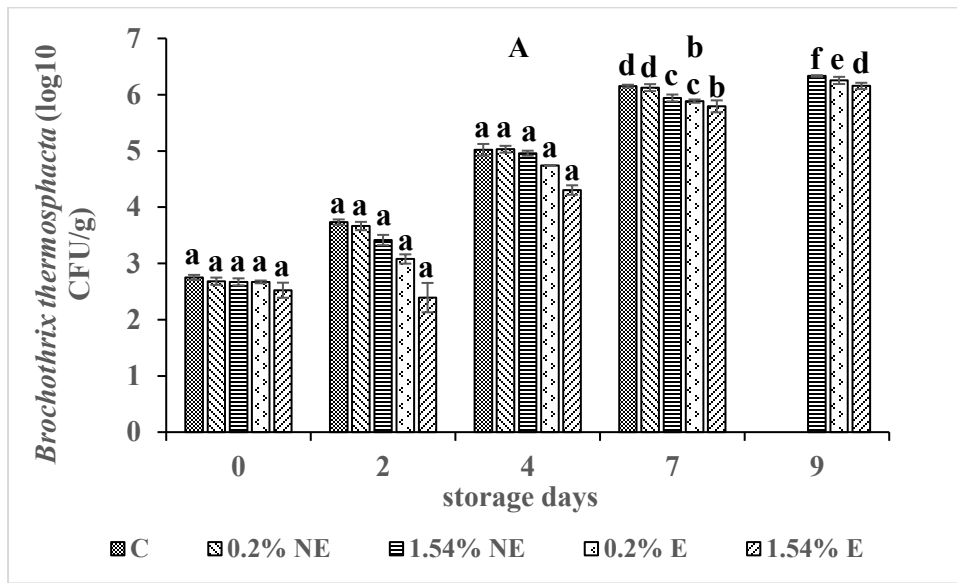
The results of the microbiological analysis of lactic acid bacteria in meatballs during storage at 4 °C are shown in Fig. 2B. It appears that after 2 days of storage at 4 °C, samples C, 0.2% NE, 1.54% NE, 0.2% E, and 1.54% E showed a lactic acid bacteria count of 3.45, 3.34, 2.85, 2.9, and 2.34 log CFU/g, respectively. After 4 days of storage, the results showed a lactic acid bacteria population of 4.17, 4.45, 4.27, 3.57, and 3.46 log CFU/g respectively for samples C, 0.2% NE, 1.54% NE, 0.2% E, and 1.54% E. The microbial growth reached 6.22, 6.24 and 6.03 log CFU/g on day 9 of storage for samples C, 0.2% NE, and 1.54% NE; while the samples 0.2% E and 1.54% E showed loads of 5.94 and 5.76 log CFU/g respectively. The acceptability threshold emerged for the 0.2% E and 1.54% E samples after 11 days of storage with counts of 6.28 and 6.05 log CFU/g, respectively.

#### 3.4.3. *Pseudomonas spp.*

Fig. 2C shows the results of population growth of *Pseudomonas spp.* in meatballs during storage at 4 °C. The results showed that on day 2 of storage, samples C, 0.2% NE, 1.54% NE, 0.2% E, and 1.54% E exhibited counts of 2.69, 2.59, 1.35, 1.43, and 1.67 log CFU/g, respectively. After 7 days of storage, this bacterial population increased to 5.06, 4.77, 4.38, 4.33, and 4.27 log CFU/g, respectively for samples C, 0.2% NE, 1.54% NE, 0.2% E, and 1.54% E. After 11 days of storage, the microbial load reached 6.32 log CFU/g for samples C and 0.2% NE, while the samples 1.54% NE, 0.2% E, and 1.54% E exhibited counts of 5.95, 5.84, and 5.45 log CFU/g, respectively. The samples 1.54% NE, 0.2% E, and 1.54% E reached the limit of acceptability on day 13 of storage and showed a respective microbial count of 6.3; 6.19 and 6.01 log CFU/g.

#### **3.4.4. Total viable count**

The results of the microbiological analysis of the total viable count in the meatballs during storage at 4 °C are shown in Fig. 2D. The results indicated that after 2 days of storage, samples C, 0.2% NE, 1.54% NE, 0.2% E, and 1.54% E showed microbial loads of 3, 2.93, 2.27, 1.9, and 2.05 log CFU/g, respectively. After 7 days of storage, the total count population showed the count of 4.9, 4.79, 4.63, 4.06, and 3.62 log CFU/g respectively for samples C, 0.2% NE, 1.54% NE, 0.2% E, and 1.54% E. Gradual population evolution after 11 days of storage, raised microbial population up to 6.33; 6.27; and 6.01 log CFU/g for the samples C, 0.2% NE and 1.54% NE, while the samples 0.2% E and 1.54% E showed respective counts of 5.58 and 5.39 log CFU/g. The acceptability threshold for the 0.2% E and 1.54% E samples was achieved after 13 days of storage with counts of 6.22 and 6.01 log CFU/g respectively.



**Figure 2:** Effects of antimicrobial formulations on *Brochothrix thermosphacta* (A), lactic acid bacteria (B), *Pseudomonas* spp. (C) and total viable count (D) during storage at 4°C of meatballs.

### 3.5. Lipid oxidation

The results of TBARS are presented **Table 3**. Results showed that at 0 day of storage, there was no difference ( $P > 0.05$ ) among samples and TBARS concentrations values were 0.38, 0.31, 0.32, 0.32, and 0.29  $\mu\text{g MA/g}$  meat respectively for the control, 0.2% NE, 1.54% NE, 0.2% E, and 1.54% E samples. These values increased during the storage and at day 12 (end of the storage for the control and samples treated with 0.2% NE), TBARS concentrations were 0.62, 0.59, 0.48, 0.44, and 0.39  $\mu\text{g MA/g}$  meat for the control, 0.2% NE, 1.54% NE, 0.2% E, and 1.54% E samples respectively.

### 3.6. Color

Color parameters and total color change of the meat during storage time are shown in **Table 3**. At 0 day, the  $L^*$  values were 45.6, 45.7, 49.8, 45.23, and 47.23 respectively for the C, 0.2% NE, 1.54% NE, 0.2% E, and 1.54% E samples. These values remained stable at the end of the storage period for the samples 0.2% NE, 1.54% NE, 0.2% E, and 1.54% E, and increased to 50.73 for the sample C. However, there was not significant difference ( $P > 0.05$ ) between all samples for  $L^*$  parameter at the end of storage.  $a^*$  values were 11.37, 10.03, 9, 7.2, and 11.4 at the beginning of the storage for the samples C, 0.2% NE, 1.54% NE, 0.2% E, and 1.54% E respectively. Except sample 0.2% E,  $a^*$  values decreased significantly ( $P \leq 0.05$ ) over time for all samples and reached values of 5.77, 3.03, 3.43, and 7.47 respectively for the samples C, 0.2% NE, 1.54% NE, and 1.54% E at the end of the storage. At day 0,  $b^*$  values were 28.97, 29.17, 25.7, 23.43, and 30.1 respectively for the samples C, 0.2% NE, 1.54% NE, 0.2% E, and 1.54% E. Like  $a^*$  parameter, these values decreased during storage for samples C, 0.2% NE, 1.54% NE, and 1.54% E and showed the values of 24.6, 21.97, 22.2, and 26.37, respectively at the end of the storage. However,  $b^*$  value for the sample 0.2% E increased from 23.43 to 25.53 at the end of the storage. The total color change values were 9.01, 10.88, 9.53, 4.12, and 7.57 for the samples C, 0.2% NE, 1.54% NE, 0.2% E, and 1.54% E respectively. There was not significant difference ( $P > 0.05$ ) in total color change among C, 0.2% NE, and 1.54% NE samples and between samples 0.2% E and 1.54% E.

**Table 3:** Effects of antimicrobial formulations on TBARS concentrations and color parameters of meatballs during storage

Samples	TBARS ( $\mu\text{g MA/g meat}$ ) <sup>a,b</sup>		Color <sup>a,b</sup>						
			$L^*$		$a^*$		$b^*$		$\Delta E$
	D0	D12	D0	D12	D0	D12	D0	D12	
<b>Control</b>	0.38 $\pm$	0.62 $\pm$	45.6 $\pm$	50.73 $\pm$	11.37 $\pm$	5.77 $\pm$	28.97 $\pm$	24.6 $\pm$	9.01 $\pm$
	0.05 a (A)	0.03 c (B)	0.57 a (A)	1.73 a (A)	0.32 a (A)	1.21 a,b (B)	0.27 a,b (A)	2.15 a (A)	2.15 b
<b>0.2% NE</b>	0.31 $\pm$	0.59 $\pm$	45.77 $\pm$	47.93 $\pm$	10.03 $\pm$	3.03 $\pm$	29.17 $\pm$	21.97 $\pm$	10.88 $\pm$
	0.01 a (A)	0.02 c (B)	2.02 a (A)	1.61 a (A)	0.63 a (A)	0.47 a (B)	1.59 a,b (A)	0.49 a (B)	0.66 b
<b>1.54% NE</b>	0.32 $\pm$	0.48 $\pm$	49.8 $\pm$	48.03 $\pm$	9.0 $\pm$	3.43 $\pm$	25.7 $\pm$	22.2 $\pm$	9.53 $\pm$
	0.01 a (A)	0.04 b (B)	2.41 a (A)	0.54 a (A)	2.36 a (A)	0.91 a (B)	2.8 a,b (A)	0.42 a (A)	1.06 b
<b>0.2% E</b>	0.32 $\pm$	0.44 $\pm$	45.23 $\pm$	47.1 $\pm$	7.2 $\pm$	6.8 $\pm$	23.43 $\pm$	25.53 $\pm$	4.12 $\pm$
	0.01 a (A)	0.03 a,b (B)	0.15 a (A)	1.61 a (A)	1.56 a (A)	1.03 b (A)	1.38 a (A)	1.73 a (A)	1.75 a
<b>1.54% E</b>	0.29 $\pm$	0.39 $\pm$	47.23 $\pm$	47.5 $\pm$	11.4 $\pm$	7.47 $\pm$	30.1 $\pm$	26.37 $\pm$	7.57 $\pm$
	0.03 a (A)	0.02 a (A)	2.17 a (A)	1.16 a (A)	1.85 a (A)	0.54 b (B)	2.23 b (A)	1.34 a (A)	1.09 a,b

Numbers are means  $\pm$  standard errors from triplicate samples.

<sup>a</sup> means with different lowercase letters in the same column are significantly different ( $P \leq 0.05$ ).

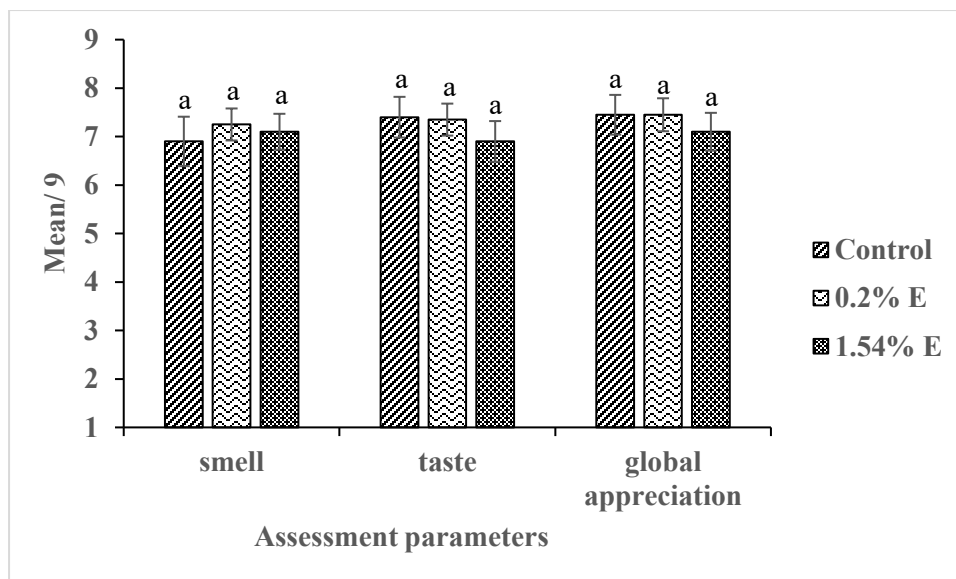
<sup>b</sup> means with different uppercase letters in the row show significant difference between D0 and D12 for each parameter ( $P \leq 0.05$ ).

NE = non encapsulated antimicrobials; E = encapsulated antimicrobials; TBARS: Thiobarbituric acid reactive substances; MA: Malondialdehyde; D stands for storage day;  $\Delta E$  Total color difference

### 3.7. Sensory analysis

Fig. 3 shows the results obtained from the sensory analysis of spicy meat (control) and spicy meat treated with different concentrations of antimicrobials. The results were the average of scores which the examiners gave to each sample. The results showed that the samples C, 0.2% E, and 1.54% E were all accepted and statistically similar. Based on 9-point hedonic scale, the values more than 5 were considered organoleptically acceptable. The odor parameter showed an average between 6.9 and 7.1; the taste parameter showed an average between 6.9 and 7.4 and the overall assessment, an average between 7.1 and 7.45 for all the samples.





**Figure 3:** Effects of different concentrations of antimicrobials on the sensory properties of meatballs.

#### 4. Discussion

EOs and bacteriocins are among natural antimicrobial compounds that can be used in food products as they are generally recognized as safe (GRAS) (Burt 2004; Cotter *et al.*, 2005; Fratianni *et al.*, 2010). Based on MIC values, EOs were classified into three distinct groups corresponding to i) highly effective (312.5 ppm - 5000 ppm) ii) moderately effective (5000 - 10,000 ppm), and iii) less effective (>10,000 ppm) (Hossain *et al.*, 2016). Citrus extract, Mediterranean formulation, *Cinnamon tamala*, *Cinnamon zeylanicum* and thyme EOs inhibited the growth of the bacteria tested at concentrations between 20 and 5000 ppm; except for *Pseudomonas aeruginosa*, which was not inhibited with thyme at 10000 ppm. The majority of EOs eliminates bacteria by permeabilizing their cell membrane in various ways causing the loss of ions and ATP, collapse of proton pumps and finally release of macromolecules and subsequently bacterial cell lysis (Oussalah *et al.*, 2006; Turgis *et al.*, 2012). By accumulating in the cytoplasm, they could also damage lipids and proteins (Bakkali *et al.*, 2008). It is recognized that carvacrol, thymol, cinnamaldehyde and polyphenols are the main compounds of citrus extract, mediterranean formulation and some EOs such as thyme, *Cinnamon tamala* and *Cinnamon zeylanicum* whose antibacterial activity have been already demonstrated in many studies (Ghabraie *et al.* 2016; Oussalah *et al.*, 2007; Hossain *et al.*, 2016). In general, Gram-positive bacteria are more sensitive than Gram-negative among which *pseudomonas* species are least sensitive to bioactive agents (Ceylan *et al.*, 2004).

The bacteriocin of the FLC ferment was active against the bacteria of *Leuconostoc mesenteroides*, *Carnobacterium divergens*, *Lactobacillus curvatus*, *Listeria innocua* and *Listeria monocytogenes* which are

Gram-positive bacteria; and against *Pseudomonas aeruginosa* which is a Gram-negative bacterium; but it was not active against other species (*E. coli*, *salmonella* and *Lactobacillus sakei*). This can be explained by an additional lipopolysaccharide outer membrane impeding the penetration of bacteriocins interacting with cell membrane anionic lipids of the target bacteria and causing their permeabilization through the formation of pores (Kęska *et al.*, 2017).

Since higher concentrations of EOs are generally required to ensure their antimicrobial activity for food preservation as compared to *in vitro* system, their application may be limited due to changes in organoleptic and textural quality of food or their interactions with food components (Gutierrez *et al.*, 2008). Thus, EOs are widely used in combination with other antimicrobial agents to minimize undesirable effects (Gutierrez *et al.*, 2008; Ghabraie *et al.*, 2016). EOs and bacteriocins are known as good antimicrobial agents; hence their combination seems to be a promising natural preservatives alternative. In this study, synergic or additive activity was obtained with the combination of thyme/Mediterranean formulation/citrus extract as well as the combination of *Cinnamon tamala/Cinnamon Zeylanicum* on all bacteria tested. This effect was also observed when the FLC ferment bacteriocins were combined with *Cinnamon tamala/Cinnamon Zeylanicum* EOs formulation; but the combination of the FLC ferment bacteriocins with formulation of thyme/Mediterranean formulation/citrus extract showed no interaction effect on some *E. coli* and *Salmonella*. Likewise, Ghabraie *et al.* (2016) found that combination of Chinese cinnamon and Cinnamon bark EOs had additive antibacterial effects against all bacteria tested. Hossain *et al.* (2016) also found that a combined formulation of oregano and thyme resulted in a synergistic effect against *A. flavus* and *A. parasiticus* and *P. chrysogenum*. Regarding the combination of bacteriocins and EOs, Turgis *et al.* (2012) found that the combination of nisin with *O. vulgare* EO induced a synergistic effect against *L. monocytogenes* whereas the combination of nisin with *T. vulgaris* EO caused a synergistic effect against *S. typhimurium*. They also found that Pediocin combined with the *S. montagna* EO caused a synergistic effect against *E. coli* O157: H7. The simultaneous use of EOs and bacteriocins plays a major role in the formation of membrane pores, which alter the permeability of the membrane, the proton motive force, the efflux of amino acid and the pH gradient of bacteria (Turgis *et al.*, 2012). The antimicrobial activity of preservatives depends not only on chemical composition but also on lipophilic properties, the potency of functional groups or aqueous solubility (Dorman *et al.*, 2000); thus, the mixture of compounds with different biochemical properties may increase efficacy. According to Gutierrez *et al.*, (2008), the antimicrobial efficacy of EOs was found to be a function of ingredient of food. In many food products, the hydrophobic essential oil constituents are impaired by interactions with food matrix components, such as fat (Cava-Roda *et al.*, 2010), starch (Gutierrez *et al.*, 2008), and proteins (Kyung, 2011). In addition, bacteriocins may also be degraded by proteolytic enzymes when they are directly applied in food leading to a loss of antibacterial activity (Rose *et al.*, 1999). The results of the microbial analysis during the storage of meatballs showed

that limit of acceptance was obtained faster in samples without gelatin than samples with gelatin. This result was expected since the encapsulation is an approach that increases the stability of antimicrobial compounds, protecting them from interacting with the food matrix, and increases their antimicrobial activity due to increased passive cellular uptake (Donsí *et al.*, 2011). The study of the depletion of antimicrobial formulations confirmed that encapsulation of antimicrobials resulted in their controlled release. Huq *et al.* (2015) found that encapsulated cinnamon and nisin in combination with  $\gamma$ -irradiation (at 1.5 kGy) showed 0.03 ln CFU/g/day growth rate of *L. monocytogenes* whereas the growth rate of non-encapsulated cinnamon and nisin in combination with  $\gamma$ -irradiation was 0.17 ln CFU/g/day. Furthermore, TBARS and color analysis revealed that at the end of the storage period, samples with encapsulated antimicrobials were less degraded in terms of lipid oxidation and total color change compared to control and samples without encapsulation. However, TBARS remained low for all samples (0.39 – 0.61  $\mu\text{g}$  MDA/g meat) at the end of the storage period since the rancid off-flavors can be generally detectable to a sensory panel when the TBARS value is equal to or greater than 2  $\mu\text{g}$  MDA/g meat (Suman *et al.*, 2010). Some studies proved the potential of gelatin in TBARS and color deterioration reduction (Herring *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2020). Gelatin is a good barrier to oxygen and thus can prevent lipid oxidation and, in turn, the deterioration of color (Herring *et al.*, 2010).

## 5. Conclusion

The combination of antimicrobial compounds could act synergically or additionally on spoilage and pathogenic bacteria contaminating food. In addition, encapsulation is a good way for controlling release of antimicrobials to prolong their activity. This allowed the use of lower concentrations of antimicrobials to reduce any unwanted organoleptic impact and increase the shelf life of meat products by 2 days in terms of microbiological and physicochemical properties compared to the control and samples without encapsulation.

### Funding

This study was funded by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) (RDCPJ 531475-18) and Montpak International (veal meat processing company) (grant number of CRSNG-RDCPJ 531475-18), and by a chair granted by Quebec Ministry of Agriculture, Fishery and Food (MAPAQ) (grant number of PPIA 12).

## References

- Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D. & Idaomar M. (2008). Biological effects of essential oils - a review. *Food and Chemical Toxicology*, 46(2): 446-475.
- Balciunas E.M., Castillo M.F.A., Todorov S.D., Franco B.D.G., Converti A. & Oliveira R.P. (2013). Novel biotechnological applications of bacteriocins: a review. *Food Control*, 32(1): 134-142.
- Barbosa-Pereira L., Angulo I., Lagaron J.M., Paseiro-Losada P. & Cruz J.M. (2014). Development of new active packaging films containing bioactive nanocomposites. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 26: 310-318.
- Ben-Fadhel Y., Cingolani M.C., Li L., Chazot G., Salmieri S., Horak C. & Lacroix M. (2021). Effect of  $\gamma$ -irradiation and the use of combined treatments with edible bioactive coating on carrot preservation. *Food Packaging and Shelf-Life*, 28: 100635.
- Buncic S., Nychas G.J., Lee M.R.F., Koutsoumanis K., Hébraud M., Desvaux M. & Antic D. (2014). Microbial pathogen control in the beef chain: recent research advances. *Meat Science*, 97(3): 288-297.
- Burt S. (2004). Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods-A review. *International Journal of Food Microbiology*, 94: 223-253.
- Castellano P., Belfiore C., Fadda, S. & Vignolo G. M. (2008). A review of bacteriocinogenic lactic acid bacteria used as bioprotective cultures in fresh meat produced in Argentina. *Meat Science*, 79(3): 483-499.
- Cava-Roda R., Taboada-Rodríguez A., Valverde-Franco M. & Marín-Iniesta F. (2010). Antimicrobial activity of vanillin and mixtures with cinnamon and clove essential oils in controlling *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 in milk. *Food and Bioprocess Technology* 5(6): 2120-2131.
- Ceylan E, & Fung Y.C.D. (2004). Antimicrobial activity of spices. *Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology*, 12: 1-55.
- Chen C.M., Sebranek J.G., Dickson J.S. & Mendonça A.F. (2004). Combining pediocin with post packaging irradiation for control of *Listeria monocytogenes* on frankfurters. *Journal of Food Protection*, 67: 1866-1875.
- Cotter P.D., Hill C. & Ross P. (2005). Bacteriocin: developing innate immunity for food. *Nature Reviews Microbiology*, 3: 777-788.
- Donsí F., Annunziata M., Sessa M. & Ferrari G. (2011). Nanoencapsulation of essential oils to enhance their antimicrobial activity in foods. *LWT-Food Science and Technology*. 44: 1908-1914.
- Dorman H.J.D. & Deans S.G. (2000). Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*, 88: 308-316.
- Fратиanni F., De Martino L., Melone A., De Feo V., Coppola R. & Nazzaro F. (2010). Preservation of chicken breast meat treated with thyme and balm essential oils. *Journal of Food Science*, 75: M528-M535.

- Ghabraie M., Dang V.K., Tata L., Salmieri S. & Lacroix M. (2016). Antimicrobial effect of essential oils in combinations against five bacteria and their effect on sensorial quality of ground meat. *LWT-Food Science and Technology*, 66: 332-339.
- Gutierrez J., Barry-Ryan C. & Bourke P. (2008). The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients. *International Journal of Food Microbiology*, 124(1): 91–97.
- Herring J.L., Jonnalongadda S.C., Narayanan V.C. & Coleman S.M. (2010). Oxidative stability of gelatin coated pork at refrigerated storage. *Meat Science*, 85: 651–656.
- Holzapfel W.H. (1998). The Gram-positive bacteria associated with meat and meat products. In R. G. Board, & A. R. Davies (Eds.), *The Microbiology of Meat and Poultry* (pp. 35-84). Blackie Academic and Professional.
- Hossain F., Follett P., Vu K.D., Harich M., Salmieri S. & Lacroix M. (2016). Evidence for synergistic activity of plant-derived essential oils against fungal pathogens of food. *Food microbiology*, 53: 24-30.
- Hosseini S.F., Rezaei M., Zandi M. & Ghavi F.F. (2016). Effect of fish gelatin coating enriched with oregano essential oil on the quality of refrigerated rainbow trout fillet. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 25(6): 835-842.
- Huq T., Vu K.D., Riedl B., Bouchard J. & Lacroix M. (2015). Synergistic effect of gamma ( $\gamma$ )-irradiation and microencapsulated antimicrobials against *Listeria monocytogenes* on ready-to-eat (RTE) meat. *Food Microbiology*, 46: 507-514.
- Ibarguren C., Céliz G., Díaz A.S., Bertuzzi M.A., Daz M. & Audisio M.C. (2015). Gelatine based films added with bacteriocins and a flavonoid ester active against food-borne pathogens. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 28: 66–72.
- Jay J. (1992). Spoilage of fresh and processed meats, poultry, and seafood. In *Modern food microbiology* (pp. 199-233). Springer, Netherlands.
- Kęska P., Stadnik J., Zielińska D. & Kołożyn-Krajewska D. (2017). Potential of bacteriocins from lab to improve microbial quality of dry-cured and fermented meat products. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, 16(2): 119–126.
- Kyung K.H. (2011). Antimicrobial properties of *Allium* species. *Current Opinion in Biotechnology*, 23(2): 142-147.
- Lis-Balchin M., Buchbauer G. & Hirtenlehner T. (1998). Antimicrobial activity of Pelargonium essential oil added to a quiche filling as a model food system. *Letters in Applied Microbiology*, 27: 207–210.
- Narsaiah K., Wilson R. A., Gokul K., Mandge H., Jha S., Bhadwal S. Anurag R.K., Malik R.K. & Vij S. (2015). Effect of bacteriocin-incorporated alginate coating on shelf-life of minimally processed papaya (*Carica papaya* L.). *Postharvest Biology and Technology*, 100: 212–218.
- Nychas G.E. & Skandamis P.N. (2005). Fresh meat spoilage and modified atmosphere packaging (MAP). In: J.N. Sofos (Ed.), *Improving the Safety of Fresh Meat* (PP. 461-502). CRC/ Woodhead Publishing Limited.

- Ouattara B., Giroux M., Smoragiewicz W., Saucier L. & Lacroix M. (2002). Combined effect of gamma irradiation, ascorbic acid, and edible coating on the improvement of microbial and biochemical characteristics of ground beef. *Journal of Food Protection*, 65(6): 981–987.
- Oussalah M., Caillet S., Saucier L. & Lacroix M. (2007). Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157:H7, *Salmonella Typhimurium*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. *Food Control*, 18: 414-420.
- Oussalah M., Caillet S. & Lacroix M. (2006). Mechanism of action of Spanish oregano, Chinese cinnamon, and savory essential oils against cell membranes and walls of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*, 69(5): 1046–1055.
- Parente E., Grieco S. & Crudele M.A. (2001). Phenotypic diversity of lactic acid bacteria isolated from fermented sausages produced in Basilicata (Southern Italy). *Journal of Applied Microbiology*, 90: 943-952.
- Pattarasiroj K., Kaewprachu P. & Rawdkuen S. (2020). Properties of rice flour-gelatine-nanoclay film with catechin-lysozyme and its use for pork belly wrapping. *Food Hydrocolloids*. 107: 105951.
- Rose N.L., Sporns P., Stiles M.E. & McMullen L.M. (1999). Inactivation of nisin by glutathione in fresh meat. *Journal of Food Science*, 64: 759-762.
- Suman S.P., Mancini R.A., Joseph P., Ramanathan R., Konda M.K.R., Dady G. & Yin S. (2010). Packaging-specific influence of chitosan on color stability and lipid oxidation in refrigerated ground beef. *Meat Science*, 86(4): 994–998.
- Sun X.D. & Holley R.A. (2012). Antimicrobial and antioxidative strategies to reduce pathogens and extend the shelf life of fresh red meats. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 11(4): 340-354.
- Turgis M., Vu K.D., Dupont C. & Lacroix M. (2012). Combined antimicrobial effect of essential oils and bacteriocins against foodborne pathogens and food spoilage bacteria. *Food Research International*, 48(2): 696-702.
- Villegas R., O'Connor T. P., Kerry J.P. & Buckley D.J. (1999). Effect of gelatin dip on the oxidative and colour stability of cooked ham and bacon pieces during frozen storage. *International Journal Food Science Technology*, 34(4): 385–389.
- Zhang H., Liang Y., Li X. & Kang H. (2020). Effect of chitosan-gelatin coating containing nano-encapsulated tarragon essential oil on the preservation of pork slices. *Meat science*, 166: 108137.

## CHAPITRE 4: DISCUSSION GÉNÉRALE

Ce travail avait pour objectif global d'améliorer la durée de conservation des viandes transformées en y apportant à faibles doses des formulations antimicrobiennes faites à base d'huiles essentielles et de bactériocines. Cinq objectifs spécifiques ont été définis pour atteindre notre but; à savoir : 1) Identifier des ferments contenant des bactéries lactiques capables de produire de bactériocines et optimiser leur production au cours de la fermentation ; 2) Évaluer la CMI de l'extrait de bactériocines contre des bactéries affectant la qualité de la viande et déterminer la synergie entre l'extrait de bactériocines et des formulations antimicrobiennes renfermant des huiles essentielles; 3) Mettre au point une méthode d'encapsulation de la nouvelle formulation pour application dans la viande fraîche transformée ; 4) Évaluer *in situ* sur la viande fraîche transformée l'effet des antimicrobiens combinés (encapsulés et non encapsulés) sur la durée de conservation de la viande fraîche transformée en analysant l'évolution de la flore d'altération au cours du stockage et 5) Évaluer la qualité physicochimique et sensorielle de la viande fraîche transformée.

Dans un premier temps, les bactéries lactiques présentes dans deux ferments commerciaux (le ferment FLC et le ferment MnF) ont été analysées afin de vérifier leur capacité à produire les bactériocines par la méthode de diffusion de puits telle que décrite par **Millette *et al.* (2007a)**. Tel que présenté dans l'article 1, les résultats ont montré une inhibition de croissance des souches de *Listeria monocytogenes* et *Listeria innocua* autour des puits contenant les surnageants de culture des bactéries lactiques de ces ferments. Lorsque le surnageant de culture de ces bactéries lactiques était mis en présence d'une protéase, l'inhibition de croissance des souches de *Listeria* était levée; montrant ainsi que l'effet antimicrobien était dû aux bactériocines (substances de nature protéique) présentes dans le surnageant. Pour optimiser la production des bactériocines par les bactéries lactiques des ferments, l'influence des facteurs environnementaux dont la température de fermentation, le pH initial du milieu de culture, une supplémentation du milieu de culture avec différentes sources de carbone et une supplémentation du milieu de culture avec différentes sources d'azote a été évaluée en utilisant *Listeria monocytogenes* 2371 comme souche indicatrice. Les résultats obtenus à l'issue de cette expérience ont montré que la production des bactériocines était étroitement liée aux conditions environnementales et aux caractéristiques de la souche productrice. En effet, l'activité antimicrobienne du surnageant des bactéries lactiques du ferment FLC est passée de 422,22 AU/ml à 2044,44 AU/ml; cette amélioration de la production des bactériocines a été obtenue lorsque le milieu MRS était supplémenté de 2% (p/v) de mannose comme source de carbone et de 2% (p/v) d'extrait de levure comme source d'azote, le pH initial du milieu de culture ajusté à 5 et la fermentation conduite à 28°C. Dans le cas du ferment MnF, la meilleure activité antimicrobienne de l'ordre de 188,89 AU / ml a été obtenue lorsque le milieu MRS était supplémenté de 2% de peptone de pois, le pH initial du milieu de culture ajusté à 6,5 et la fermentation conduite à 24°C. Les sources de carbone utilisées dans ce travail n'ont pas amélioré

la production de bactériocines par les bactéries lactiques du ferment MnF. Des résultats similaires ont été obtenus par **Turgis et al. (2016)**. Ces auteurs ont montré l'implication des conditions de fermentation dans l'amélioration de la production des bactériocines par les bactéries *Lactococcus lactis* MM19 et *Pediococcus acidilactici* MM33.

Concernant l'objectif 2, la CMI des huiles essentielles et de l'extrait de bactériocines du ferment FLC sur des bactéries pathogènes et de détérioration de la viande ainsi que la synergie possible entre ces antimicrobiens ont été déterminées *in vitro* par les méthodes de microdilution et du Checkerboard telles que décrites par **Hossain et al. (2016)**. Les résultats de cette étude ont montré que les bactériocines des bactéries lactiques du ferment FLC ont une activité entre 10000 et 80000 ppm contre *Leuconostoc mesenteroides*, *Carnobacterium divergens*, *Lactobacillus curvatus*, *Listeria innocua*, *Listeria monocytogenes* et *Pseudomonas aeruginosa*, mais n'ont pas eu d'effet sur les autres bactéries. L'extrait de fruit citrin, la formulation méditerranéenne et les huiles essentielles *Cinnamon tamala*, *Cinnamon zeylanicum* et de thym ont inhibé la croissance des bactéries testées à des concentrations comprises entre 20 et 5000 ppm; sauf pour le cas de *Pseudomonas aeruginosa*, qui n'a pas été inhibé avec le thym. Les bactériocines sécrétées par les bactéries lactiques ont un large spectre d'action contre les bactéries Gram-positives, mais les Bactéries Gram-négatives sont dotées d'une membrane lipopolysaccharidique supplémentaire externe. Cette membrane externe empêche la pénétration des bactériocines dans la cellule, ce qui la rend insensible à l'effet antimicrobien de ces molécules (**Kęska et al., 2017**). La combinaison des bactériciones des bactéries lactiques du ferment FLC aux huiles essentielles *Cinnamon tamala* et *Cinnamon zeylanicum* a montré un effet synergique ou additif sur l'ensemble des souches testées et la combinaison des bactériocines à l'extrait de citron, la formulation méditerranéenne et le thym a montré un effet non interactif contre certaines souches de *E.coli* et contre les souches de *Salmonella* et un effet synergique ou additif pour le reste des souches. En raison de la caractéristique lipophile des huiles essentielles, leur utilisation conjointe avec les bactériocines joue un rôle important dans la formation des pores de la membrane, ce qui modifie la perméabilité membranaire, la force proton-motrice, l'efflux d'acides aminés et le gradient de pH des bactéries provoquant ainsi la mort cellulaire (**Bakkali et al., 2008; Turgis et al., 2012b**).

La formulation antimicrobienne *Cinnamon tamala/Cinnamon zeylanicum* à des concentrations de 0,05, 0,1 et 0,2% (v/v, ratio 1:1) et la formulation antimicrobienne bactériocine/*Cinnamon tamala/Cinnamon zeylanicum* à des concentrations de 0,39, 0,77 et 1,54% (v/v, ratio 6,7:1:1) ont ensuite été encapsulées par la méthode décrite par **Seyed et al. (2016)**. Il s'est agi de mettre la solution antimicrobienne en présence d'une solution de gélatine et d'homogénéiser rigoureusement à température ambiante. Afin de vérifier l'effet de l'encapsulation sur la formulation antimicrobienne, la méthode de puits profonds dans la gélose BHI telle que décrite par **Huq et al. (2015)** a été réalisé. Les résultats de cette analyse ont montré que l'encapsulation des antimicrobiens permet une libération contrôlée de ces derniers. En effet la déplétion des antimicrobiens



au cours du temps était plus accrue dans les formulations libres que dans les formulations encapsulées. Des résultats similaires ont été obtenus dans les travaux de **Huq et al. (2014, 2015)**.

L'étude *in situ* des antimicrobiens libres et encapsulés sur la viande fraîche transformée a été réalisée. Il était question d'étudier d'une part l'évolution au cours du temps de la flore d'altération (*Brochothrix thermosphacta*, bactéries lactiques, *Pseudomonas spp.* et le compte viable total) et d'autre part d'évaluer les paramètres de la couleur et le degré d'oxydation des lipides par l'analyse des TBARS. Ceci s'est fait par les méthodes décrites par **Ouattara et al. (2002)** et **Pattarasiriroj et al. (2020)**. La viande a été traitée avec les formes libres et encapsulées des formulations antimicrobiennes *Cinnamon tamala/Cinnamon zeylanicum* et bactériocine/*Cinnamon tamala/Cinnamon zeylanicum* à des concentrations de 0,2 et 1,54% (v/v) respectivement. Les résultats ont montré que les échantillons traités avec les antimicrobiens encapsulés ont permis d'obtenir un gain de 2 jours de stockage pour atteindre la limite d'acceptabilité (6 log UFC/g pour chaque microorganisme évalué) comparativement au contrôle et aux échantillons traités avec les antimicrobiens non encapsulés. De même, la détérioration de la couleur et l'oxydation des lipides étaient plus prononcées dans le contrôle et les échantillons traités avec les antimicrobiens non encapsulés que dans les échantillons traités avec les antimicrobiens encapsulés. D'autres études ont montré des résultats similaires (**Millette et al., 2007b; Huq et al., 2014, 2015; Herring et al., 2010; zhang et al., 2020**). En effet, l'encapsulation augmente la stabilité des composés antimicrobiens, les protège de l'interaction avec la matrice alimentaire et augmente leur activité antimicrobienne en raison de l'augmentation de l'absorption cellulaire passive. De plus, la gélatine constitue une barrière à l'oxygène ce qui a un impact positif sur l'oxydation des lipides et la couleur (**Villegas et al., 1999; Donsí et al., 2011**). L'analyse sensorielle par le test hédonique tel que décrit par **Ghabraie et al. (2016a)** a été réalisé et les résultats ont montré que l'ensemble des échantillons étaient acceptés en termes d'odeur et de goût.

## CHAPITRE 5: CONCLUSION GÉNÉRALE

Au terme de ce travail dont l'objectif était d'améliorer la durée de vie des viandes fraîches et transformées, des formulations antimicrobiennes à base d'huiles essentielles et de bactériocines ont été développées. Il a d'abord été nécessaire d'optimiser la production des bactériocines puis de combiner leur effet antimicrobien à celui des huiles essentielles afin de pouvoir les incorporer à faible dose dans les boulettes de viande. L'optimisation de la production a permis de passer d'une activité antimicrobienne de 422,22 à 2044,44 UA/mL avec les bactéries lactiques du ferment FLC en supplémentant le milieu MRS avec le mannose et l'extrait de levure, le pH du milieu étant ajusté à 5 et une température de fermentation de 28 °C. Dans le cas du ferment MnF, la température de 24 °C et le milieu MRS supplémenté de peptone de pois à un pH de 6,5 a permis d'obtenir une activité antimicrobienne de 188,89 UA/mL. La combinaison des huiles essentielles *Cinnamon tamala/Cinnamon zeylanicum* et la combinaison des bactériocines des bactéries lactiques du ferment FLC aux HE *Cinnamon tamala/Cinnamon zeylanicum* a montré un effet synergique ou additif sur l'ensemble des bactéries ciblées dans cette étude. Ces formulations sous forme libre et encapsulée ont été incorporées dans les boulettes de viande. Les antimicrobiens encapsulés ont prolongé de 2 jours la durée de conservation des boulettes de viande, réduit la détérioration de la couleur et le degré d'oxydation des lipides comparativement au contrôle et les échantillons traités avec les antimicrobiens non encapsulés.

## RÉFÉRENCES

- Aasen I.M., Moretro T., Storro I. & Axelsson L. (2000). Influence of complex nutrients, temperature and pH on bacteriocin production by *L. sakei* CCUG 42687. *Applied Microbiology Biotechnology*, 53: 159-166.
- Abdollahzadeh E., Rezaei M. & Hosseini H. (2014). Antibacterial activity of plant essential oils and extracts: the role of thyme essential oil, nisin, and their combination to control *Listeria monocytogenes* inoculated in minced fish meat. *Food Control*, 35: 177–183.
- Ahn J., Grün I.U. & Mustapha A. (2007). Effects of plant extracts on microbial growth, color change, and lipid oxidation in cooked beef. *Food Microbiology*, 24: 7-14.
- Ahn J., Grun I.U. & Mustapha, A. (2004). Antimicrobial and antioxidant activities of natural extracts *in vitro* and in ground beef. *Journal of Food Protection*, 67: 48-55.
- Amenan P.N.K., Saucier L. & Guay F. (2018). Stratégies alimentaires naturelles et innovatrices pour améliorer la qualité de la viande de lapin. Thèse de Doctorat (Philosophiae doctor (Ph. D.)) en sciences animales, Université Laval.
- Ananou S., Valdivia E., Martinez B.M., Galvez A. & Maqueda M. (2010). "Evaluation of an enterocin AS-48 enriched bioactive powder obtained by spray drying." *Food Microbiology*, 27: 58-63.
- Ananou S., Valdivia E., Martinez B.M., Galvez A. & Maqueda M. (2004). "Effect of combined physico-chemicals preservatives on enterocin AS-48 activity against the enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* CECT 976 strain". *Journal of Applied Microbiology*, 97:48–56.
- Anastasiadou S., Papagianni M., Ambrosiadis I. & Koidis P. (2008). Rapid quantifiable assessment of nutritional parameters influencing pediocin production by *Pediococcus acidilactici* NRRL B5627. *Bioresource Technology*, 99(14): 6646-6650.
- Archer D.L. (2002). Evidence that ingested nitrate and nitrite are beneficial to health. *Journal of Food Protection*, 65: 872-875. ISSN: 0362028X.
- Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D. & Idaomar M. (2008). Biological effects of essential oils: a review. *Food and Chemical Toxicology*, 46(2): 446-475.
- Bassolé I.H. & Juliani H.R. (2012). Essential oils in combination and their antimicrobial properties. *Molecules*, 17: 3989-4006.
- Basuny A., Arafat S. & Kamel S. (2013). Polyphenolic compounds of eggplant peel juice as a natural antioxidant for the stability of sunflower oil during deep-fat frying. *Current Research in Microbiology and Biotechnology*, 1: 1-8.
- Belguesmia Y., Naghmouchi K., Chihib N.E. & Drider, D. (2011). Class IIa bacteriocins: current knowledge and perspectives. Édité par D Drider, & S Rebuffat. Nantes: Springer Verlag. [https://ui.adsabs.harvard.edu/link\\_gateway/2011pap.book.171B/doi:10.1007/978-1-4419-7692-5\\_10](https://ui.adsabs.harvard.edu/link_gateway/2011pap.book.171B/doi:10.1007/978-1-4419-7692-5_10)
- Borch E., Kant-Muemans M.L. & Blixt Y. (1996). Bacterial spoilage of meat and cured meat products. *International Journal of Food Microbiology*, 33: 103-120.

Breukink E. & De Kruijff, B. (1999). The lantibiotic nisin, a special case or not? *Biochimica et Biophysica Acta*, 1462: 223–234.

Brogden K.A. (2005). «Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? » *Nature reviews*, 3: 238-250.

Brotz H., Josten M., Wiedemann I., Schneider U., Gotz F., Bierbaum G. & Sahl H-S. (1998). «Role of lipid-bound peptidoglycan precursors in the formation of pores by nisin, epidermin and lantibiotics. » *Molecular Microbiology*, 30: 317-327.

Burt S.A. & Reinders R.D. (2003). Antimicrobial activity selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157:H7. *Letters in Applied Microbiology*, 36: 162-167.

Caillet S., Côté J., Sylvain J-F. & Lacroix M. (2012). Antimicrobial effects of fractions from cranberry products on the growth of seven pathogenic bacteria. *Food Control*, 23(2): 419-428

Callewaert T. & De Vuyst L. (2000). Bacteriocin production with *L. amylovorus* DCE471 is improved and stabilized by fed-batch fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(2): 606-613.

Casaburi A., Di Martino V., Ferranti P., Picariello L. & Villani F. (2016). «Technological properties and bacteriocins production by *Lactobacillus curvatus* 54M16 and its use as starter culture for fermented sausage manufacture» *Food Control*, 59: 31-45.

Cassens R.G. (1994). Meat Preservation, Preventing Losses and Assuring Safety, 1st Edn., *Food and Nutrition Press*, Inc. Trumbull, Connecticut, USA, pp: 79-92. ISBN: 0917678346.

Castellano P.H., Holzapfel W.H. & Vingolo G.M. (2004). The control of *Listeria innocua* and *Lactobacillus sakei* in broth and meat slurry with the bacteriocinogenic strain *Lactobacillus casei* CRL705. *Food Microbiology*, 21: 291-298.

Cava-Roda R., Taboada-Rodríguez A., Valverde-Franco M. & Marín-Iniesta F. (2010). Antimicrobial activity of vanillin and mixtures with cinnamon and clove essential oils in controlling *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 in milk. *Food and Bioprocess Technology*, 5(6): 2120-2131.

Cenatiempo Y., Berjeaud J.M., Biet F. & Fremaux C. (1996). « Bactériocines de bactéries lactiques : données récentes sur leur structure, leur mode d'action et leurs déterminants génétiques » *Le Lait*, 76: 169-177.

Cenci-Goga B.T. (2012). Fattori che influenzano la crescita e la sopravvivenza dei microrganismi negli alimenti. In: G. Colavita (ed.), Igiene e Tecnologie degli alimenti di origine animale. Le Point Vétérinaire Italie Ed., Milano, Italy, pp 19-25.

Cervený J., Meyer J.D. & Hall P.A. (2009). Microbiological spoilage of meat and poultry products in: compendium of the microbiological spoilage, of foods and beverages. *Food Microbiology and Food Safety*, W.H. Sperber and M.P. Doyle (Eds.). Springer Science and Business Media, NY, pp. 69-868.

Chen C.M., Sebranek J.G., Dickson J.S. & Mendonça A.F. (2004). Combining pediocin with postpackaging irradiation for control of *Listeria monocytogenes* on frankfurters. *Journal of Food Protection*, 67: 1866-1875.

- Chen Y.S., Srionnual S., Onda T., Yanagida F. (2007). Effects of prebiotic oligosaccharides and trehalose on growth and production of bacteriocins by lactic acid bacteria. *Letters in Applied Microbiology*, 45: 190-193.
- Chipley J.R. (2005). Sodium benzoate and benzoic acid. In: *Antimicrobials in Foods*, 3rd Edn., Davidson, P.M., J.N. Sofos and A.L. Branen (Eds.). CRC Press, FL, pp: 11-48. ISBN: 92 4 153026 X.
- Chouliara E., Karatapanis A., Savvaidis I.N. & Kontominas M.G. (2007). Combined effect of oregano essential oil and modified atmosphere packaging on shelf-life extension of fresh chicken breast meat, stored at 4 degrees C. *Food Microbiology*, 24: 607-17.
- CMC. (2012). Canada Meat Council. Statistiques de l'industrie. <http://www.cmccvc.com/fr/%C3%A0-propos-de-nous/statistiques-de-l%20%99-industrie/statistiques-de-lindustrie>.
- CMC. (2016). Canada Meat Council. La viande: Bonne pour vous. Bonne pour le Canada. <http://www.cmccvc.com/fr/node/16> (Consulté Décembre 2016).
- Combes S., Dalle A.Z. (2005). La viande de lapin : valeur nutritionnelle et particularités technologiques. 11èmes Journées Rech. Cunicole 167-180.
- Conner D.E. (1993). Naturally occurring compounds. In Davidson P. M.; Branen A. L. *Antimicrobials in foods*, 2nd Ed. Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y. pp. 441-468
- Cotter P., Ross P. & Hill C. (2013). «Bacteriocin - a viable alternative to antibiotics? » *Nature Reviews Microbiology* 11: 95- 105.
- Cotter P.D., Hill C. & Ross P. (2005). «Bacteriocin: developing innate immunity for food. » *Nature Reviews Microbiology*, 3: 777-788.
- Cueva C., Moreno-Arribas M.V., Bartolome B., Salazar O., Vicente M.F. & Bills G.F. (2011). Antibiosis of vineyard ecosystem fungi against food-borne microorganisms. *Research in Microbiology*, 162(10): 1043-1051.
- Cui H., Gabriel A.A. & Nakano H. (2010). Antimicrobial efficacies of plant extracts and sodium nitrite against *Clostridium botulinum*. *Food Control*, 21: 1030-1036.
- Cui P., Li X., Man Y. & Fang Z. (2011). Heat transfer analysis of pile geothermal heat exchangers with spiral coils. *Applied Energy*, 88: 4113-4119.
- Daferera D.J., Ziogas B.N. & Polissiou M.G. (2000). GS-MS, Analysis of essential oils from some Greek aromatic plants and their fungitoxicity on *Penicillium digitatum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48: 2576-2581.
- Daglia M. (2012). Polyphenols as antimicrobial agents. *Current Opinion in Chemical Biology*, 23: 174-181.
- Dainty R.H. & Mackey B.M. (1992). The relationship between the phenotypic properties of bacteria from chill-stored meat and spoilage processes. *Society for Applied Bacteriology Symposium Series*, 21: 103S-14S.

- Dainty R.H., Shaw B.G. & Roberts T.A. (1983). Microbial and chemical changes in chill stored red meats. *Society for Applied Bacteriology Symposium Series*, 11: 151-178.
- Dainty R.H., Edwards R.A. & Hibbard C.M. (1989). Spoilage of vacuum-packed beef by a *Clostridium* sp. *J. Sci. Food Agric.*, 49: 473-486.
- Dave D. & Ghaly A.E. (2011). Meat spoilage mechanisms and preservation techniques: A critical review. *American Journal of Agricultural and Biological Sciences*, 6: 486.
- De Vuyst L., Callewaert R. & Crabbé K. (1996). Primary metabolite kinetics of bacteriocin biosynthesis by *L. amylovorus* and evidence for stimulation of bacteriocin production under unfavourable growth conditions. *Microbiology*, 142: 817-827.
- Delves-Broughton J., Blackburn P., Evans R.J. & Hugenholtz J. (1996). Applications of the bacteriocin, nisin. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 69: 193–202.
- Desai K.G.H. & Park H.J. (2005). Recent developments in microencapsulation of food ingredients. *Drying Technology*, 23(7): 1361-1394. Available from: <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1081/DRT-200063478#preview>>. Accessed: Jun.12, 2012.
- Dickson J.S. & Anderson M.A. (1992). Microbiological decontamination of food animal carcasses by washing and sanitizing systems: a review. *Journal of Food Protection*, 55: 133-140.
- Donsí F., Annunziata M., Sessa M. & Ferrari G. (2011). Nanoencapsulation of essential oils to enhance their antimicrobial activity in foods. *LWT-Food Science and Technology*, 44: 1908–1914.
- Dorman H.J.D. & Deans S.G. (2000). Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*, 88: 308-316.
- Dortu C. & Thonart P. (2009). Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires. *Biotechnology, Agronomy and Society and Environment*, 13(1): 143-154.
- Doulgeraki A.I., Ercolini D., Villani F. & Nychas G.J.E. (2012). Spoilage microbiota associated to the storage of raw meat in different conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 157: 130-141.
- Doulgeraki A.I., Paramithiotis S. & Nychas G.J.E. (2011). Characterization of the *Enterobacteriaceae* community that developed during storage of minced beef under aerobic or modified atmosphere packaging conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 145: 77-83.
- Doulgeraki A.I., Paramithiotis S., Kagkli, D.M. & Nychas G.J.E. (2010). Lactic acid bacteria population dynamics during minced beef storage under aerobic or modified atmosphere packaging conditions. *Food Microbiology*, 27: 1028-1034.
- Doyle M.P., Flowers R.S., Rank J.F.F., Labbe R.G., Lovett J., Madden J.M., Newsome R.L., Pierson M.D. & Reddy N.R. (1997). Bacteria associated with foodborne diseases. *Food Technology*, 42: 181-200.
- Drider D., Fimland G., Héchard Y., McMullen L.M. & Prévost H. (2006). The continuing story of class IIa bacteriocin. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 70(2): 564-582.

Dussault D., Vu K.D. & Lacroix M. (2016). Enhancement of nisin production by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 8: 170–175.

Ecker K.F. (1992). «Bacteriocin and food applications. » *Dairy Food Environ Sanit*, 12: 204-209.

Ennahar S., Sashihara T., Sonomoto K. & Ishizaki A. (2000). "Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity." *FEMS Microbiology Reviews*, 24: 85–106.

Ennahar S., Assobhel O. & Hasselmann C., (1998a). "Inhibition of *Listeria monocytogenes* in a smear-surface soft cheese by *Lactobacillus plantarum* WHE 92, a pediocin AcH producer." *Journal of food protection*, 2: 186-91.

Ennahar S., Aoude-Werner D., Assobhei O. & Hasselmann C. (1998b). «Antilisterial activity of enterocin 81, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* WHE 81 isolated from cheese. » *Journal of Applied Microbiology*, 85: 521–526.

Enser M. (2001). Muscle lipids and meat quality.  
<http://www.bsas.org.uk/downloads/annlproc/Pdf2001/243.pdf>.

Ercolini D., Casaburi A., Nasi A., Ferrocino I., Di Monaco R., Ferranti P., Mauriello G. & Villani F. (2010a). Different molecular types of *Pseudomonas fragi* have the overall behaviour as meat spoilers. *International Journal of Food Microbiology*, 142, 120-131.

Ercolini D., Ferrocino I., La Stora A., Mauriello G., Gigli S., Masi P. & Villani F. (2010b). Development of spoilage microbiota in beef stored in nisin activated packaging. *Food Microbiology*, 27: 137-143.

Ercolini D., Ferrocino I., Nasi A., Ndagijimana M., Vernocchi P., La Stora A., Laghi L., Mauriello G., Guerzoni M.E. & Villani F. (2011). Monitoring of microbial metabolites and bacterial diversity in beef stored in different packaging conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 77: 7372-7381.

Ercolini D., Russo F., Blaiotta G., Pepe O., Mauriello G. & Villani F. (2007). Simultaneous detection of *Pseudomonas fragi*, *P. lundensis*, and *P. putida* from meat by use of a multiplex PCR assay targeting the car A gene. *Applied and Environmental Microbiology*, 73: 2354-2359.

Ercolini D., Russo F., Nasi A., Ferranti P. & Villani F. (2009). Mesophilic and psychrotrophic bacteria from meat and their spoilage potential *in vitro* and in beef. *Applied and Environmental Microbiology*, 75: 1990-2001.

Ercolini D., Russo F., Torrieri E., Masi P. & Villani F. (2006). Changes in the spoilage related microbiota of beef during refrigerated storage under different packaging conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 72: 4663-4671.

Ettayebi K., Yamani J.E. & Rossi-Hassani B. (2000). "Synergistic effects of nisin and thymol on antimicrobial activities in *Listeria monocytogenes* and *Bacillus subtilis*". *FEMS Microbiology Letters*, 183 (2000): 191–95.

Faid M., Charai M. & Mosaddak M. & (1996). Chemical composition and antimicrobial activities of two aromatic plants: *Origanum majorana* L and *O. compactum* Benth. *Journal of Essential Oils Research*, 8: 657-664.

FAO (Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture). (2016). <http://www.fao.org/news/story/fr/item/168526/icode/> (Consulté Décembre 2016.)

Fávaro-Trindade C.S., de Pinho S.C. & Rocha G.A. (2008) Revisão: microencapsulação de ingredientes alimentícios. *Brazilian Journal of Food Technology*, 11(2): 103-112. Available from: <<http://bjft.ital.sp.gov.br/artigos/html/busca/PDF/v11n2318a.pdf>>. Accessed: May 23, 2012.

Fernandez J., Perez-Alvarez J.A. & Fernandez-Lopez J.A. (1997). Thiobarbituric acid test for monitoring lipid oxidation in meat. *Food Chemistry*, 59: 345-353.

Fimland G., Johnsen L., Lars A., Brurberg M.B., Nes I.F., Eijsink V.G.H. & 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.

Fontana C., Coconcelli P.S. & Vignolo G. (2006). Direct molecular approach to monitoring bacterial colonization on vacuum-packaged beef. *Applied and Environmental Microbiology* 72: 5618-5622.

Fратиани F., De Martino L., Melone A., De Feo V., Coppola R. & Nazzaro F. (2010). Preservation of chicken breast meat treated with thyme and balm essential oils. *Journal of Food Science*, 75: 528-535.

Frederiq P. (1946). « Sur la pluralité des récepteurs d'antibiose d'*E.coli*. » *C.R Soc Biol*, 140: 1189-1194.

Friedman M., Henika P.R. & Mandrell R.E. (2002). Bactericidal activities of plant essential oils and some of their constituents against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica*. *Journal of Food Protection*, 65: 1545-1560.

Funck G.D., Marques J.L., Dannenberg G.S., Cruzen C.E.S., Pohl Sehn C.P., Prigol M., Silva M.R.P., Silva W.P. & Fiorentini A.M. (2020). Characterization, toxicity, and optimization for the growth and production of bacteriocin-like substances by *Lactobacillus curvatus*. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 12: 91–101.

Galvez A., Lopez R.L., Abriouel H., Valdivia E. & Ben O.N. (2008). «Application of bacteriocins in the control of foodborne pathogenic and spoilage bacteria.» *Critical Reviews in Biotechnology*, 28: 125–152.

Galvez A., Abriouel H., Lopez R.L. & Ben O.N. (2007). «Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. » *International Journal of Food Microbiology*, 120: 51–70.

Galvin M., Hill C. & Ross R.P. (1999). "Lacticin 3147 displays activity in buffer against Gram positive bacterial pathogens which appear insensitive in standard plate assays" *Letters in Applied Microbiology*, 28: 355-358.

Geay Y., Bauchart D., Hocquette J-F. & Culioli J. (2002). Valeur diététique et qualités sensorielles des viandes de ruminants. Incidence de l'alimentation des animaux. *INRA Production animale*, 15: 37-52.

Ghabraie M. (2014). Antimicrobial effect of essential oils against pathogenic bacteria and optimization of its formulations combined with other preservative agents. Mémoire présenté pour l'obtention du grade de Maîtres en science, M.Sc en Microbiologie. Université du Québec, Institut National de la Recherche Scientifique-Institut Armand-Frappier



Ghabraie M., Khanh D.V., Huq T., Avik, K. & Lacroix M. (2014). Optimization of antibacterial activity of sixteen formulations containing essential oils, nisin, nitrite and organic acid salts against *Listeria monocytogenes* in a sausage model. Article submitted in *International Journal of Food Microbiology*

Ghabraie M., Khanh D.V., Tata, Lina, Salmieri S. & Lacroix M. (2016a). Antimicrobial effect of essential oils in combinations against five bacteria and their effect on sensorial quality of ground meat. *LWT - Food Science and Technology* 66: 332-339

Ghabraie M., Vu K.D., Huq T., Khan A & Lacroix M. (2016b). Antilisterial effects of antibacterial formulations containing essential oils, nisin, nitrite and organic acid salts in a sausage model. *Journal of Food Science and Technology*, 53(6): 2625–2633.

Ghalfi H., Allaoui A., Destain J., Benkerroum N. & Thonart P. (2006). Bacteriocin activity by *Lactobacillus curvatus* CWBI-B28 to inactivate *Listeria monocytogenes* in cold-smoked salmon during 4 degrees C storage. *Journal of Food Protection*, 69(5): 1066–1071.

Gharsallaoui A., Roudaut G., Chambrin O., Voilley A. & Saurel R. (2007). Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: an overview. *Food Research International*, 40(9): 1107-1121. Available from: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996907001238>>. Accessed: Jul. 10, 2012.

Gharsallaoui A., Roudaut G., Beney L., Chambrin O., Voilley A. & Saurel R. (2012). Properties of spray-dried food flavours microencapsulated with two-layered membranes: Roles of interfacial interactions and water. *Food Chemistry*, 132(4): 1713-1720. Available from: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814611004092>>. Accessed: May 15, 2013.

Giroux M. (1999). Effet de la combinaison de traitements antioxydants et antimicrobiens sur les qualités microbiologiques, biochimiques et organoleptiques du bœuf haché irradié. Maîtrise en microbiologie appliquée. INRS-IAF.

Giroux M., Ouattara B., Yefsah R., Smoragiewicz W., Saucier L. & Lacroix M. (2001). Combined effect of ascorbic acid and gamma irradiation on microbial and sensorial characteristics of beef patties during refrigerated storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49: 919-925.

Giunchedi P. & Conte U. (1995). Spray-drying as a preparation method of microparticulate drug delivery systems: an overview. *STP pharma Sciences*, 5(4): 276-290.

Godard G. & Reynders A-S. (2014). Journal Terre n°147 - L'économie sociale ne badine pas avec la nourriture. <http://fr.calameo.com/books/00034261212597fcec9c7> (Consulté Novembre 2016.)

Gouin S. (2004). Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends. *Trends in Food Science and Technology*, 15(7-8): 330-347. Available from: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924224403002723>>. Accessed: Jun. 16, 2012.

Gratia A. (1925). « Sur un remarquable exemple d'antagonisme entre deux souches de colibacille. » *C.R. Soc Biol*, 93: 1040-1041.

Gray J. I., Gomaa E.A. & Buckley D.J. (1996). Oxidative quality and shelf life of meats. *Meat Science*, 43 (Suppl.1): 111-123.

Guangshun W., Biswajit M., Kyle L., Tamara L., Radha G. & Xiuqing W. (2015). «Antimicrobial peptides in 2014. » *Pharmaceuticals*, 8: 123-150.

Hammer K.A., Carson C.F. & Riley T.V. (1999). Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of Applied Microbiology*, 86(6): 985-990.

HC (2006). Good manufacturing practices guidance document. Health Canada, Ottawa, Canada. Retrieved on 14th May 2010, from [http://www.hcsc.gc.ca/dhp-mps/alt\\_formats/hpfb-dgpsa/pdf/prodnatur/gmp-bpf-eng.pdf](http://www.hcsc.gc.ca/dhp-mps/alt_formats/hpfb-dgpsa/pdf/prodnatur/gmp-bpf-eng.pdf).

Heinz G. & Hautzinger P. (2007). Meat processing technology for small to medium scale producers. RAP Publication 2007/20. FAO, Bangkok.

Helander I.M., Alakomi H-L., Latva-Kala K., Mattila-Sandholm T., Pol I., Smid E.J., Gorris L.G.M. & Wright A. (1998). Characterization of the action of selected essential oil components on gram-negative bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46: 3590-3595.

Heng N.C.K., Wescombe P.A., Burton J.P., Jack R.W. & Tagg, J.R. (2007). The diversity of bacteriocins in Gram-positive bacteria. Édité par M.A Riley, & M.A Chavan. Berlin: Springer Verlag.

Herring J.L., Jonnalongadda S.C., Narayanan V.C. & Coleman S.M. (2010). Oxidative stability of gelatin coated pork at refrigerated storage. *Meat Science*, 85: 651–656.

Hirsch A., Grinsted E., Chapman H.R. & Mattick A.T.R. (1951). «A note on the inhibition of an anaerobic spore former in Swiss-type cheese by a nisin-producing *Streptococcus*» *Journal of Dairy Science*, 18: 205–206.

Hossain F., Follett P., Khang D.V., Mehdi H., Salmieri S. & Lacroix M. (2016). Evidence for synergistic activity of plant-derived essential oils against fungal pathogens of food. *Food Microbiology*, 53: 24-30

Huq T., Salmieri S., Khan A., Khan R.A., Le Tien C., Riedl B., Frascinic C., Bouchard J., Uribe Calderon J., Kamal M.R. & Lacroix M. (2012). Nanocrystalline cellulose (NCC) reinforced alginate based biodegradable nanocomposite film. *Carbohydrate Polymers* 90: 1757-1763.

Huq T., Riedl B., Bouchard J., Salmieri S. & Lacroix M. (2014). Microencapsulation of nisin in alginate-cellulose nanocrystal (CNC) microbeads for prolonged efficacy against *Listeria monocytogenes*. *Cellulose*, 21:4309–4321.

Huq T., Vu K.D., Riedl B., Bouchard J. & Lacroix M. (2015). Synergistic effect of gamma (g)-irradiation and microencapsulated antimicrobials against *Listeria monocytogenes* on ready-to-eat (RTE) meat. *Food Microbiology*, 46: 507-514.

Interbev (2006). Le point sur la couleur de la viande bovine. [http://www.agrireseau.qc.ca/bovinsboucherie/documents/couleur\\_viande\\_bovine1.pdf](http://www.agrireseau.qc.ca/bovinsboucherie/documents/couleur_viande_bovine1.pdf) (Consulté septembre 2014.)

Izquierdo E., Marchioni E., Aoude-Werner D., Hasselmann C. & Ennahara. S. (2009). Smearing of soft cheese with *Enterococcus faecium* WHE 81, a multibacteriocin producer, against *Listeria monocytogenes*. *Food Microbiology*, 26: 16–20.

Jay J.M., Loessner M.J. & Golden D.A. (2005). *Modern food microbiology*, 7th Edn., Springer Science and Business Media. NY, pp: 63-101. ISBN: 0387231803.

Jayasena D.D. & Jo C. (2013). Essential oils as potential antimicrobial agents in meat and meat products: a review. *Trends in Food Science & Technology*, 34: 96–108

Kantor L.S., Lipton K., Manchester A. & Oliveira V. (1997). Estimating and addressing America's food losses. *Food Rev.*, 20: 3-11. <http://www.ers.usda.gov/Publications/FoodReview/Jan1997/Jan97a.pdf>.

Kerdudo A., Kerdudo A., De O., Kerdudo A., Antipolis N.S. & Directeur C. (2015). Optimisation de la conservation des cosmétiques : impact de la formulation, recherche de nouveaux conservateurs naturels, encapsulation. *Thèse*.

Kerry, J.P., Kerry J.F. & Ledward D. (2002). *Meat processing: Improving quality*. Woodhead Publishing Series in Food Science, *Technology and Nutrition*. Édition Elsevier.

Kęska P., Stadnik J., Zielińska D. & Kołożyn-Krajewska D. (2017). Potential of bacteriocins from lab to improve microbial quality of dry-cured and fermented meat products. *Acta Scientiarum Polonorum, Technologia Alimentaria*, 16(2): 119–126

Khan A., Gallah H., Riedl B., Bouchard J., Safrany A. & Lacroix M. (2016). Genipin cross-linked antimicrobial nanocomposite films and gamma irradiation to prevent the surface growth of bacteria in fresh meats. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 35: 96-102

Khan A, Vu K.D., Riedl B. & Lacroix M. (2015). Optimization of the antimicrobial activity of nisin, Na-EDTA and pH against gram negative and gram-positive bacteria. *LWT Food Science and Technology*, 61: 124–129

Khan M.I., Arshad M.S., Anjum F.M., Sameen A., Rehman A. & Gill W.T. (2011). Meat as a functional food with special reference to probiotic sausages. *Food Research International*, 44(10): 3125-3133. Available from: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996911004819>>. Accessed: May 15, 2013.

Kim J., Marshall M.R. & Vei C. (1995). Antimicrobial activity of some essential oil components against five foodborne pathogens. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43: 2839-2845.

Klaenhammer T.R. (1993). Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 12(1-3): 39-85.

Koo S.P., Bayer A.S. & Yeaman M.R. (2001). «Diversity in anti staphylococcal mechanisms among membrane-targeting antimicrobial peptides. » *Infection and immunity* 69: 4916-4922.

Kramer N.E., Van H.S.A., Knol J., Kok J. & Kuipers O.P. (2006). «Transcriptome analysis reveals mechanisms by which *Lc. lactis* acquires nisin resistance. » *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50: 1753-1761.

Kraus D. & Peschel A. (2006). " Molecular mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial peptides." *Current Topics in microbiology and immunology*, 306: 231-250.

- Kuwahara K & Osako K. (2003). Effect of sodium gluconate on gel formation of Japanese common squid muscle. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 69:637-42. ISSN: 0021-5392.
- Kyung K.H. (2011). Antimicrobial properties of *Allium* species. *Current Opinion in Biotechnology*, 23(2): 142-147.
- Labadie J. (1999). Consequences of packaging on bacterial growth. Meat is an ecological niche. *Meat Science*, 52: 299-305.
- Lambert R.J.W., Skandamis P.N., Coote P. & Nychas G.-J.E. (2001). A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacol. *Journal of Applied Microbiology*, 91: 453-462.
- Leal-Sanchez M.V. *et al.* (2002). Optimization of bacteriocin production by batch fermentation of *L. plantarum* LPCO10. *Applied and Environmental Microbiology*, 68: 4465-4471.
- Lebret B., Lefaucheur L., Mourot J. & Bonneau M. (1996). Influence des facteurs d'élevage sur la qualité de la viande de porc. Journées Rech. Porcine en France, 28: 137-156.
- Lefebvre N. (1990). Essai d'amélioration de la salubrité et de la période de conservation du bœuf haché à l'aide de rayonnements ionisants. M. Sc. Thesis; Institut Armand-Frappier, Université du Québec, Laval, PQ.
- Leistner L. (2000). Basic aspects of food preservation by hurdle technology. *International Journal of Food Microbiology*, 55: 181-186
- Leistner L. (1995). In: Gould G.W., ed. Principles and applications of hurdle technology, new methods of food preservation. London: *Blackie Academic & Professional*, 1.
- Leistner L. (1978). Hurdle effect and energy saving. In: Downey W.K., ed. *Food quality and nutrition*. London: *Applied Science Publishers*, 553-557.
- Leroy F., De Winter T., Adriany T. Neysens P. & De Vuyst L. (2006). Sugars relevant for sourdough fermentation stimulate growth of and bacteriocin production by *L. amylovorus* DCE 471. *International Journal of Food Microbiology*, 12: 102-111.
- Liao C.H. (2006). Food spoilage microorganisms. In: Blackburn, C.W. (Ed.), *Pseudomonas and related genera*. Woodhead Publishing Limited, Cambridge, pp. 213-286.
- Liu Q., Lanari M.C. & Schaefer D.M. (1995). A review of dietary vitamin E supplementation for improvement of beef quality. *Journal of Animal Science*, 73: 3131-3140.
- Lv W., Zhang, X. & Cong W. (2005). Modelling the production of nisin by *Lactococcus lactis* in fed-batch culture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 68, 322-326.
- Mahrour A., Caillet S., Nketsia-Tabiri J. & Lacroix M. (2003). Microbial and sensory quality of marinated and irradiated chicken. *Journal of Food Protection*, 66: 2156-2159

Malheiros P.S., Cuccovia I.M. & Franco B.D.G.M. (2016). "Inhibition of *Listeria monocytogenes* in vitro and in goat milk by liposomal nanovesicles containing bacteriocins produced by *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* 2a." *Food Control*, 63: 158-164.

Margaret A.R. & John E.W. (2002). «Bacteriocins: Evolution, ecology, and application» *Annual Review of Microbiology*, 56: 117–137.

Martinez R.C.R., Staliano C.D., Vieira A.D.S., Villarreal M.L.M., Todorov S.D., Saad S.M.I. & Franco B.D.G.M. (2015). "Bacteriocin production and inhibition of *Listeria monocytogenes* by *Lactobacillus sakei* subsp. *Sakei* 2a in a potentially synbiotic cheese spread." *Food Microbiology*, 48: 143-152.

Mataragas M., Drosinos E.H., Tsakalidou E. & Metaxopoulos J. (2004). Influence of nutrients on growth and bacteriocin production by *Leuconostoc mesenteroides* L124 and *L. curvatus* L442. *Antonie van Leeuwenhoek*, 85: 191-198.

Mataragas M., Metaxopoulos J., Galiotou M. & Drosinos E.H. (2003). Influence of pH and temperature on bacteriocin production by *Leuconostoc mesenteroides* L124 and *L. curvatus* L442. *Meat Science*, 64: 265-271.

Mattick A.T.R & Hirsch A. (1947). «Further observations on an inhibitory substance (nisin) from lactic streptococci» *Lancet*, 2: 5–7.

Mazzotta A.S., Crandall A.D. & Montville T.J. (1997). "Nisin resistance in *Clostridium botulinum* spores and vegetative cells." *Applied and Environmental Microbiology*, 63: 2654-2659.

McAuliffe O. & Hill C. (2001). Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action. *FEMS Microbiology Reviews*, 25: 285-308.

McAuliffe O., O'Keeffe T., Hill C. & Ross R.P. (2001). "Regulation of immunity to the two-component lantibiotic, lactacin 3147, by the transcriptional repressor LtnR." *Molecular Microbiology*, 39: 982-993.

Mello S.S., Luciano F.B., Fronza N., Cunha J.A., Scheuermann G.N. & Vieira C.R. (2014). Chemical composition and antibacterial activity of *Laurus nobilis* essential oil towards foodborne pathogens and its application in fresh Tuscan sausage stored at 7° C. *LWT-Food Science and Technology*.

Messens W., Verluyten J., Leroy, F. & De Vuyst L. (2003). Modelling growth and bacteriocin production by *L. curvatus* LTH1174 in response to temperature and pH values used for European sausage fermentation processes. *International Journal of Food Microbiology*, 81: 41-52

Milles S, Stanton I.C., Hill C. & Ross R.P. (2011). "New developments and applications of bacteriocins and peptides in foods." *Annu. Rev. Food Sci. Technol* 2: 299-329.

Millette M, Dupont C, Archambault D & Lacroix M (2007a) Partial characterization of bacteriocins produced by human *Lactococcus lactis* and *Pediococcus acidilactici* isolates. *Journal of Applied Microbiology*, 102: 274–282.

Millette M, Tien CL, Smoragiewicz W & Lacroix M (2007b) Inhibition of *Staphylococcus aureus* on beef by nisin containing modified films and beads. *Food Control*, 18(8):878–884

Min B. & Ahn D.U. (2005). Mechanism of lipid peroxidation in meat and meat products – A review. *Food Science and Biotechnology*, 14: 152-163.

Mokhtar M., Mostafa G.A., Eldeeb G.S. & Taha R.A. (2016). Effect of bacteriocins (from *Bifidobacterium* spp.) on prevalence of some *Aeromonas* and *Pseudomonas* species in minced meat during cold storage. *Journal of Food and Nutritional Disorders*, 5(1).

Molin G., Ternstrom A. & Ursing J. (1986). *Pseudomonas lundensis*. A new bacterial species isolated from meat. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 36: 339-342.

Montville T.J. & Chen Y. (1998). "Mechanistic action of pediocin and nisin: recent progress and unresolved questions." *Applied Microbiology and Biotechnology* 50: 511-519.

Morales M.T., Luna G. & Aparicio R. (2006). Changes Induced by UV Radiation during Virgin Olive Oil Storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54:4790- 4794.

Morency H., Mota-Meira M., LaPointe G., Lacroix C. & Lavoie M.C. (2001). Comparison of the activity spectra against pathogens of bacterial strains producing a mutacin or a lantibiotic. *Canadian Journal of Microbiology*, 47: 322-331.

Moretro T., Aasen I.M., Storro I. & Axelsson L. (2000). Production of sakacin P by *L. sakei* in a completely defined medium. *Journal of Applied Microbiology*, 88(3): 536-545.

Mytle N., Anderson G.L., Doyle M.P. & Smith M.A. (2006). Antimicrobial activity of clove (*Syzygium aromaticum*) oil in inhibiting *Listeria monocytogenes* on chicken frankfurters. *Food control*, 17: 102-107.

Naghmouchi K., Kheadr E., Lacroix C. & Fliss, I. (2007). "Class I/ class IIa bacteriocin cross resistance phenomenon in *L. monocytogenes*." *Food Microbiology*, 24: 718-727.

Nazzaro F., Orlando P., Fratianni F. & Coppola R. (2012). Microencapsulation in food science and biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*, 23(2): 182-186. Available from: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0958166911006847>>. Accessed: Jul. 02, 2012.

Neetoo H., Ye M. & Chen H. (2010) Bioactive alginate coatings to control *Listeria monocytogenes* on cold-smoked salmon slices and fillets. *International Journal of Food Microbiology*, 136: 326–331

Nel H.A., Bauer R., Vandamme E.J. & Dicks L.M. (2001). Growth optimization of *Pediococcus damnosus* NCFB1832 and the influence of pH and nutrients on the production of pediocin PD-1. *Journal of Applied Microbiology*, 91: 1131-1138.

Nes I.F., Yoon S.S. & Diep D.B. (2007). «Ribosomally synthesized antimicrobial peptides (bacteriocins) in lactic acid bacteria. » *Review Food Science and Biotechnology*, 16: 675-690.

Nicholls D.J. & Ferguson S.J. (1992). Bioenergetics: Chemiostatic energy transduction. 2. Edited by D.G Nicholls, & S.J Ferguson. London: Académie Press.

Nigutova K., Morovsky M., Pristas P., Teather R.M., Holo H. & Javorsky P. (2007). Production of enterolysin A by rumen *Enterococcus faecalis* strain and occurrence of enlA homologues among ruminal Gram+ cocci. *Journal of Applied Microbiology*, 102(2): 563-569.

Nilsen T., Nes I.F. & Holo H. (2003). Enterolysin A, a cell wall-degrading bacteriocin from *Enterococcus faecalis* LMG2333. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(5): 2975- 2984.

Nychas G.-J.E., Drosinos E.H. & Board R.G. (1998). Chemical changes in stored meat. In R. G. Board & A. R. Davies (Eds.), *The Microbiology of Meat and Poultry* (pp. 288–326). London, UK: Blackie Academic and Professional.

Nychas G.-J.E. & Skandamis P. (2005). Fresh meat spoilage and modified atmosphere packaging (MAP). In J. N. Sofos (Ed.), *Improving the Safety of Fresh Meat* (pp. 461–502). Cambridge, UK: CRC/Woodhead Publishing Limited.

Nychas G.J.E., Skandamis P.N., Tassou C.C. & Koutsoumanis K.P. (2008). Meat spoilage during distribution. *Meat Science*, 78: 77-89.

Oliveira M.N., Sivieri K., Alegro J.H.A. & Saad S.M.I. (2002). Aspectos tecnológicos de alimentos funcionais contendo probióticos. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 38(1): 1-21. Available from: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1516\\_93322002000100002&lang=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516_93322002000100002&lang=pt)>. Accessed: May 17, 2013.

Ouattara B., Simard R.E., Holley R.A., Piette G.J-P. & Bégin. A. (1997). Inhibitory effect of organic acids upon meat spoilage bacteria. *Journal of Food Protection*, 60: 246-253.

Ouattara B., Giroux M., Smoragiewicz W., Saucier L. & Lacroix M. (2002). Combined effect of gamma irradiation, ascorbic acid, and edible coating on the improvement of microbial and biochemical characteristics of ground beef. *Journal of Food Protection*, 65(6): 981–987.

Oussalah, M. (2007). L'effet antimicrobien des fils biodégradables à base d'huiles essentielles et mécanisme d'action de trois huiles essentielles sur les bactéries Gram-positif et Gram-négatif. Mémoire présenté pour l'obtention du grade de Maîtres en science, M.Sc en Microbiologie. Université du Québec, Institut National de la Recherche Scientifique-Institut Armand-Frappier.

Oussalah M., Caillet S., Saucier L. & Lacroix, M. (2007). Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157:H7, *Salmonella Typhimurium*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. *Food Control*, 18: 414-420.

Oussalah M., Caillet S. & Lacroix M. (2006). Mechanism of action of Spanish oregano, Chinese cinnamon, and savory essential oils against cell membranes and walls of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*, 69(5): 1046–1055.

Pablo T.da S., Leadir L.M.F., de Menezes C.R., Holkem A.T., Schwan C.L., Wigmann É.F., Bastos J. de O. & da Silva C. de B. (2014). Microencapsulation: Concepts, mechanisms, methods, and some applications in food technology. *Ciência Rural*, 44(7): 1304-1311.

Papagianni M. (2003). Ribosomally synthesized peptides with antimicrobial properties: biosynthesis, structure, function and applications. *Biotechnology Advances*, 21(6): 465- 499.

Parente E. & Ricciardi A. (1999). Production, recovery and purification of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 52: 628-638.

Patrzykat A., Friedrich C.L., Zhang L., Mendoza V. & Hancock R.E. (2002). "Sublethal concentrations of pleurocidin-derived antimicrobial peptides inhibit macromolecular synthesis in *Escherichia coli*." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 46: 605-614.

Pattarasiroj K., Kaewprachu P. & Rawdkuen S. (2020). Properties of rice flour-gelatine-nanoclay film with catechin-lysozyme and its use for pork belly wrapping. *Food Hydrocolloids* 107: 105951.

Pedro H.R.A., Lopes A.P. & de Conto C.L. (2019). Microencapsulation and Its Uses in Food Science and Technology: A Review. *Microencapsulation - Processes, Technologies and Industrial Applications*.

Pennacchia C., Ercolini D. & Villani F., 2011. Spoilage-related microbiota associated with chilled beef stored in air or vacuum pack. *Food Microbiology* 28: 84-93.

Pereira K.C, Ferreira D.C.M, Alvarenga G.F, Pereira M.S.S, Barcelos M.C.S, Costa J.M.G. (2018). Microencapsulation and release controlled by the diffusion of food ingredients produced by spray drying: A review. *Brazilian Journal of Food Technology*; 211: -2017083.

Pérez G.N., Fajardo P.B., Agrasar A.T., Macias C.L. & Castro L.P. (2005). Fed-batch pediocin production by *Pediococcus acidilactici* NRRL B-5627 on whey. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 42: 17-23.

Perricone M., Arace E., Corbo M.R., Sinigaglia M. & Bevilacqua A. (2015). Bioactivity of essential oils: a review on their interaction with food components. *Frontiers Microbiology*, 6: 1-7.

Peschel A. (2002). "How do bacteria resist human antimicrobial peptides?" *Trends in microbiology*, 10: 179-186.

Pharmacopée Européenne, 2010. 7<sup>ème</sup> édition, Strasbourg : Conseil de l'Europe.

Plummer S., Weaver M.A., Harris J.C., Dee P. & Hunter J. (2004). *Clostridium difficile* pilot study: effects of probiotic supplementation on the incidence of *C. difficile* diarrhoea. *International Microbiology*, 7: 59-62

Ponce E., Pla R., Sendra E., Guamis B. & Mor-Mur M. (1998). Combined effect of nisin and high hydrostatic pressure on destruction of *L. innocua* and *E. coli* in liquid whole egg. *International Journal of Food Microbiology*, 43: 15-19

Pongtharangkul T. & Demirci A. (2006). Evaluation of culture medium for nisin production in a repeated-batch biofilm reactor. *Biotechnology Progress*, 22: 217-224.

PPCP PB REST )2008-2009). Les méthodes de conservation du XIXe siècle à nos jours.  
[https://www.doc-developpement-durable.org/file/Conservation-Graines-Semences\\_Vegetaux-Legumes-Refrigeration/methodes-de-conservation-des-aliments.pdf](https://www.doc-developpement-durable.org/file/Conservation-Graines-Semences_Vegetaux-Legumes-Refrigeration/methodes-de-conservation-des-aliments.pdf)

Prashar A., Hili P., Veness R.G. & Evans, C.S. (2003). Antimicrobial action of palmarosa oil (*Cymbopogon martini*) on *Saccharomyces cerevisiae*. *Phytochemistry*, 63: 569-575.

Ray B. (2004). *Fundamental food microbiology* (3<sup>rd</sup> Edition). CRC Press, FL, pp.439-534. ISBN: 0-8493-1610-3.



Raharjo S. & Sofos J.N. (1993). Methodology for measuring malonaldehyde as a product of lipid peroxidation in muscle tissues: A review. *Meat Science*, 35: 145-169.

Remenant B., Jaffres E., Dousset X., Pilet M.F. & Zagorec M. (2015). Bacterial spoilers of food: behavior, fitness and functional properties. *Food Microbiology*, 45: 45-53.

Richard C., Canon R., Nagmouchi K., Bernard D., Prévost H. & Drider D. (2006). Evidence on correlation between number of disulfide bridge and toxicity of class IIa bacteriocins. *Food Microbiology*, 23(2): 175-183.

Roberts D.D. & Taylor A.J. (2000). Flavor release. Washington: American Chemical Society. 496 p.

Rock E. (2002). Les apports en micronutriments par la viande. Viande et produits carnés. Revue des instituts de recherche et des centres techniques des filières viandes et produits carnés. Journées des Sciences du Muscle et des Technologies de la Viande. 15-16/10/2002.

Rodriguez E., Martinez M.I., Horn N. & Dodd H.M. (2003). "Heterologous production of bacteriocins by Lactic Acid Bacteria." *International Journal of Food Microbiology* 80: 101-116.

Rogers L.A. (1928). "The inhibiting effect of *Streptococcus lactis* on *Lactobacillus bulgaricus*". *Journal of Bacteriology*, 5: 161-168.

Sanguansri P. & Augustin M.A. (2006). Nanoscale materials development. A food industry perspective. *Trends in Food Science and Technology*, 17(10): 547-556. Available from: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924224406001919>>. Accessed: Dec. 12, 2012.

Saucier L. (2016). Microbial spoilage, quality, and safety within the context of meat sustainability. *Meat Science*, 120: 78-84.

Saucier L. (1999). Meat safety: challenges for the future. *Outlook on Agriculture*, 28: 77-82.

SC (2009). Food available for consumption in Canada- 2008. Statistics Canada. Retrieved on 1st June 2010, from <http://www.statcan.gc.ca/adsannonces/23f0001x/hl-fs-eng.htm>.

Scannell A.G. *et al.* (2000). Continuous production of lacticin 3147 and nisin using cells immobilized in calcium alginate. *Journal of Applied Microbiology*, 89, 573-579.

Settanni L. & Corsetti A. (2008). Application of bacteriocins in vegetable food biopreservation. *International Journal of Food Microbiology*.121: 123-138.

Seyed F.H., Masoud R., Mojgan Z. & Farhid F.G. (2016). Effect of fish gelatin coating enriched with oregano essential oil on the quality of refrigerated rainbow trout fillet. *Journal of Aquatic Food Product Technology*.

Shahidi F. (1994). Assessment of lipid oxidation and off-flavor development in meat and meat products. In: Flavor of meat and meat products. Chapman and Hall, London, U.K, pp: 247-266. ISBN: 0-7514-0484-5.

Sikkema J., De Bont J.A. & Poolman B. (1995). Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiological Reviews*, 59: 201-222.

Singh B., Falahee M.B. & Adams M.R. (2001). Synergistic inhibition of *Listeria monocytogenes* by nisin and garlic extract. *Food Microbiology*, 18(2): 133–139.

Silliker J.H., Eliot R.P., Baird-Parker A. & Bryan F. (1980). Microbial ecology of foods. *Academic press*, London. Dafoe QR 115 M45 v2.

Simitzis P.E. & Deligeorgis S.G. (2010). Lipid oxidation of meat and use of essential oils as antioxidants in meat products.  
[http://www.scitopics.com/Lipid\\_Oxidation\\_of\\_Meat\\_and\\_Use\\_of\\_Essential\\_Oils\\_as\\_Antioxidants\\_in\\_Meat\\_Products.html](http://www.scitopics.com/Lipid_Oxidation_of_Meat_and_Use_of_Essential_Oils_as_Antioxidants_in_Meat_Products.html).

Sindelar J.J. & Houser T.A. (2009). Alternative curing systems. In: *Ingredients in meat products: Properties, functionality and applications*. Tarte, R. (Ed.) Springer Science and Business Media, NY, pp: 379-405.

Sindelar J.J. & Milkowski A.L. (2011). Sodium nitrite in processed meat and poultry meats: A review of curing and examining the risk/benefit of its use. American Meat Science Association White Paper Series, 1-14.

Solomakos N., Govaris A., Koidis P. & Botsoglou N. (2008a) The antimicrobial effect of thyme essential oil, nisin and their combination against *Escherichia coli* O157:H7 in minced beef during refrigerated storage. *Meat Science*, 80: 159–166

Solomakos N., Govaris A., Koidis P. & Botsoglou N. (2008b) The antimicrobial effect of thyme essential oil, nisin, and their combination against *Listeria monocytogenes* in minced beef during refrigerated storage. *Food Microbiology* 25: 120–127

Solórzano-Santos F. & Miranda-Novales M. (2012). Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents. *Current Opinion in Biotechnology* 23: 136-141.

Stanbridge L.H. & Davies A.R. (1998). The microbiology of meat and poultry. In: Davies, A.R., Board, R.G. (Eds.), *The Microbiology of Chill Stored Meat*. Blackie Academic and Professional, London, pp. 174-219.

Suave J., Dallagnol E.C., Pezzin A.P.T., Silva D.A.K., Meier M.M. & Soldi V. (2006). Microencapsulação: inovação em diferentes áreas. *Revista Saúde e Ambiente*, 7(2): 12-20. Available from: <<http://periodicos.univille.br/index.php/RSA/article/view/86/136>>. Accessed: Jul. 05, 2012.

Tauro P., Kapoor K.K. & Yadav K.S. (1986). *An introduction to microbiology*, 1st Edn., New Age International Publisher. New Delhi, India. pp: 364. ISBN: 085-226-878-5.

THSUS (2010). Farm animal statistics: Meat consumption. The humane society of the United States.  
[http://www.humanesociety.org/news/resources/research/stats\\_meat\\_consumption.html](http://www.humanesociety.org/news/resources/research/stats_meat_consumption.html).

Todorov S.D. & Dicks L.M. (2004). Influence of growth conditions on the production of a bacteriocin by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ST34BR, a strain isolated from barley beer. *Journal of Basic Microbiology*, 44: 305-316.

Tsigarida E., Skandamis P.N. & Nychas G.J.E. (2000). Behaviour of *Listeria monocytogenes* and autochthonous flora on meat stored under aerobic, vacuum and modified atmosphere packaging conditions with or without the presence of oregano essential oil at 5 °C. *Journal of Applied Microbiology*, 89: 901-909.

Turgis M., Stotz V., Dupont C., Salmieri S., Khan R.A. & Lacroix M. (2012a). Elimination of *Listeria monocytogenes* in sausage meat by combination treatment: radiation and radiation-resistant bacteriocins. *Radiation Physics and Chemistry*, 81: 1185-1188.

Turgis M., Khanh D.V., Dupont C. & Lacroix M. (2012b). Combined antimicrobial effect of essential oils and bacteriocins against foodborne pathogens and food spoilage bacteria. *Food Research International*, 48(2): 696–702

Turgis M., Vu K.D., Millette M., Dupont C. & Lacroix M. (2016). Influence of environmental factors on bacteriocin production by human isolates of *Lactococcus lactis* MM19 and *Pediococcus acidilactici* MM33. *Probiotics Antimicrob Proteins*, 8(1): 53–59.

Twomey D., Ryan M., Meaney B. & Hill C. (2002). Lantibiotics produced by lactic acid bacteria: structure, function and applications. *Antonie van Leeuwenhoek*, 82: 165-185.

Ukuku D.O., Zhang H. & Huang L. (2009).” Growth parameters of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, and aerobic mesophilic bacteria of apple cider amended with nisin-EDTA”. *Foodborne Pathogens and Disease*, 6: 487–94.

Ultee A., Slump R.A., Steging G. & Smid E.J. (2000). Antimicrobial activity of carvacol toward *Bacillus cereus* on rice. *Journal of Food. Protection*, 63: 620-624.

Van de Venet F.J., Van den Hooven H.W., Konings R.N. & Hilbers C.W. (1991). "NMR studies of lantibiotics. The structure of nisin in aqueous solution." *European journal of biochemistry / FEBS* 202: 1181-1188.

Velasco V. & Williams P. (2011). Improving meat quality through natural antioxidant. *Chilean Journal of Agricultural Research*, 71: 313-322.

Venkata N.N.J., Muthu P.P., Suhas N.S., Surya K.P., Seetha P.R. & Srawan G.Y. (2010). Microencapsulation techniques, factors influencing encapsulation efficiency. *Journal of Microencapsulation*, 2010; 27(3): 187–197

Verluyten J., Leroy F. & De Vuyst, L. (2004). Influence of complex nutrient source on growth of and curvacin A production by sausage isolated *L. curvatus* LTH 1174. *Applied and Environmental Microbiology*, 70: 5081-5088.

Villegas R., O'Connor, T.P., Kerry, J.P. & Buckley, D.J. (1999). Effect of gelatin dip on the oxidative and colour stability of cooked ham and bacon pieces during frozen storage. *International Journal Food Science Technology*, 34(4): 385–389.

Woraprayote W., Kingcha Y., Amonphanpokin P., Kruenate J., Zendo T., Sonomoto K., Benjakul S. & Visessanguan W. (2013). "Anti-listeria activity of poly(lactic acid)/sawdust particle biocomposite film impregnated with pediocin PA-1/AcH and its use in raw sliced pork." *International Journal of Food Microbiology*, 167: 229-235.

Yeo Y., Baek N. & Park K. (2001). Microencapsulation methods. *Biochemical and Bioprocess Engineering*, 6: 213-230.

Yost C.K. & Nattress F.M. (2002). Molecular typing techniques to characterize the development of a lactic acid bacteria community on vacuum-packaged beef. *International Journal of Food Microbiology* 72: 97-105.

Zacharof M.P. & Lovitt R.W. (2012). "Bacteriocins produced by lactic acid bacteria." *Review Article APCBEE Procedia* 2: 50-56.

Zhang H., Wu J. & Guo X. (2016). Effects of antimicrobial and antioxidant activities of spice extracts on raw. *Food Science and Human Wellness*, 5: 39-48.

Zhang H., Liang Y., Li X. & Kang H. (2020). Effect of chitosan-gelatin coating containing nano-encapsulated tarragon essential oil on the preservation of pork slices. *Meat science*, 166, 108137.

Zhou G.H., Xu X.L. & Liu Y. (2010). Preservation technologies for fresh meat – A review. *Meat Science*, 86: 119-128.

[https://www.mapaq.gouv.qc.ca/fr/Publications/Cuisson\\_lente\\_sous\\_vide.pdf](https://www.mapaq.gouv.qc.ca/fr/Publications/Cuisson_lente_sous_vide.pdf)

[http://tuac.ca/index.php?option=com\\_content&view=article&id=32096:en-chiffres-la-production-et-la-consommation-de-viande-au-canada&catid=10004&Itemid=6&lang=fr](http://tuac.ca/index.php?option=com_content&view=article&id=32096:en-chiffres-la-production-et-la-consommation-de-viande-au-canada&catid=10004&Itemid=6&lang=fr)

<https://www.planetoscope.com/elevage-viande/1235-consommation-mondiale-de-viande.html>

<https://www.canada.ca/fr/sante-canada/services/aliments-nutrition/salubrite-aliments/irradiation-aliments/irradiation-viande-hachee-resume-processus-soumission.html>