

Université du Québec
INRS- Institut Armand-Frappier

**Études d'immobilisation de bactéries lactiques et de leurs
métabolites comme moyen de contrôle de microorganismes
pathogènes dans les viandes.**

Par

Mathieu Millette

Mémoire présenté

pour l'obtention

du grade de Maître ès sciences (M. Sc.)

en Microbiologie appliquée

© droits réservés de Mathieu Millette, 2003

À mes parents, Alain et Louise, pour leur support
et leur présence.

Table des matières

Résumé.....	v
Abréviations.....	vii
Liste des tableaux.....	ix
Liste des figures.....	xi
Introduction.....	1
Chapitres	
I. Revue de littérature	3
1. Le bœuf haché.....	3
1.1. Définition.....	3
1.2. Qualité nutritionnelle du bœuf haché.....	3
1.3. Aspects économiques liés au bœuf haché.....	3
2. La microbiologie du bœuf haché.....	4
2.1. Flore microbienne initiale retrouvée dans le bœuf.....	4
2.2. Sources de contamination.....	5
2.2.1. Contamination primaire ou endogène.....	5
2.2.2. Contamination secondaire ou exogène.....	6
2.3. Normes microbiennes en vigueur.....	8
2.4. Bactéries pathogènes et pathogénicité.....	10
2.5. Coûts engendrés par la contamination bactérienne.....	11
3. La conservation de la viande.....	12
3.1. Durée de conservation du bœuf haché.....	12
3.2. Facteurs qui influencent la durée de conservation du bœuf haché.....	12
3.3. Méthodes de conservation ancestrales.....	12
3.4. Appert, 1809.....	13
3.5. La révolution nommée Louis Pasteur.....	14
4. Probiotiques.....	15
4.1. Définition.....	15
4.2. Quelques exemples de bactéries probiotiques pour l'homme.....	16
4.3. Effet des bactéries probiotiques.....	17
4.3.1. Inhibition des pathogènes microbiens.....	17
4.4. Bactéries lactiques comme probiotique.....	18
4.4.1. Description des bactéries lactiques.....	18

4.4.2. Substances antimicrobiennes produites par les bactéries lactiques.....	25
4.4.2.1. Les bactériocines.....	29
4.4.2.1.1. La nisine.....	31
4.4.2.2. Facteurs qui affectent l'action des bactériocines.....	38
4.4.2.2.1. Facteurs intrinsèques des aliments.....	38
4.4.2.2.2. Température.....	38
4.4.2.2.3. pH.....	39
4.4.2.2.4. Résistance aux bactériocines.....	39
5. Encapsulation des bactéries acide lactique.....	40
5.1. Méthodes d'immobilisation.....	45
5.2. Techniques d'encapsulation.....	46
5.2.1. Gélification ionotropique.....	47
5.2.1.1. Alginate de calcium.....	47
5.2.1.2. Chitosane.....	48
5.2.1.3. Pectines.....	49
5.2.2. Gélification thermique.....	50
5.2.2.1. Agar et agarose.....	51
5.2.2.2. carrageenan.....	51
5.2.2.3. Gomme gellan.....	53
5.2.2.4. Alcool polyvinylique (PVA).....	54
5.2.3. Billes enrobées.....	55
6. Emballage actif à base de nisine.....	55
Hypothèse, objectifs et moyens pour atteindre les objectifs	57
II. Matériel et méthodes.....	60
III. Résultats.....	72
1. Mise au point des formulations de billes.....	72
1.1. Concentration optimale d'alginate.....	73
1.2. Concentration optimale de lactosérum.....	82
2. Tests antimicrobiens.....	90
2.1. Test « Agar spot ».....	90
2.2. Temps minimal requis afin de produire une zone d'inhibition.....	91
2.3. Inhibition des bactéries Gram négatives.....	95
3. Destruction de <i>S. aureus</i> dans du bœuf haché par <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> ATCC 11454 encapsulé.....	97

3.1. Incubation du bœuf haché à la température de 35°C.....	97
3.2. Incubation à la température de 7°C.....	105
4. Destruction de <i>S. aureus</i> dans du bœuf haché par <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> ATCC 11454 microencapsulé.....	113
4.1. Incubation à la température de 35°C.....	113
4.1. Incubation à la température de 7°C.....	122
5. Inhibition de <i>S. aureus</i> par des films d'alginate modifié contenant de la nisine appliqués sur des échantillons de bifteck de ronde conservés à 7°C.....	130
6. Inhibition de <i>S. aureus</i> par des billes d'alginate activé contenant de la nisine appliquées sur des échantillons de bœuf haché conservés à 7°C.....	135
IV. Discussion.....	140
1. Détermination de la concentration optimale d'alginate et de WPC entrant dans la fabrication des billes.....	142
2. Tests d'inhibitions <i>in vitro</i>	146
3. Destruction de <i>S. aureus</i> dans du bœuf haché par <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> ATCC 11454 encapsulé.....	149
4. Immobilisation de nisine.....	153
Conclusion.....	157
Remerciements.....	159
Références bibliographiques.....	160

Résumé

En 1996, l'industrie de la viande et des produits carnés était la plus grande de toutes les industries de transformation alimentaire du Canada avec un chiffre d'affaires de 10.2 milliards de dollars. Cependant, les intoxications alimentaires rendent malades environ 76 millions de personnes annuellement aux États-Unis, dont 325 000 nécessitant une hospitalisation, et provoquant 5 000 morts. Afin de prévenir ces empoisonnements, l'utilisation des bactéries lactiques (BAL) a été envisagée. Les BAL sont des microorganismes utilisés couramment dans l'industrie alimentaire, entre autre pour la fabrication de yogourt, de lait acidulé, de saucissons, de choucroute. Depuis de nombreuses années, les propriétés des BAL ont été étudiées. Elles aident à améliorer la dégradation du lactose, à prévenir la diarrhée du voyageur et surtout, elles possèdent un puissant pouvoir antimicrobien.

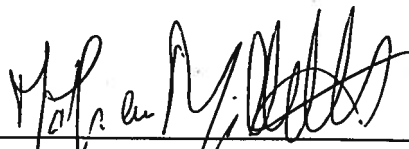
Nous avons encapsulé la bactérie *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 dans une matrice biodégradable et comestible d'alginate de calcium et de protéines laitières. Une modification du « agar spot test » a été apportée afin de vérifier la capacité antimicrobienne *in vitro* des billes contenant des BAL contre diverses souches indicatrices bactériennes. De plus, une cinétique de la production de nisine a été effectuée à l'aide de ce test. Cette étude a démontré que *Lactococcus lactis* sous-espèce *lactis* ATCC 11454 encapsulée conservait sa capacité de produire de la nisine alors que son spectre d'inhibition est demeuré inchangé. L'activité de la bactériocine contre les souches indicatrices à l'essai ne se trouvait pas non plus diminuée. Il a aussi été démontré que seulement 4 heures d'incubation sont nécessaires à des BAL immobilisées et incubées à 35°C pour produire une quantité suffisante de nisine afin d'inhiber la croissance de *Staphylococcus aureus*.

Des billes de *Lactococcus lactis* ont aussi été ajoutées dans des échantillons de bœuf haché contaminé par *S. aureus*. L'étude a démontré clairement qu'il est possible de protéger le bœuf haché d'une contamination opportuniste pouvant survenir dans le cas de fluctuation de température, c'est-à-dire lorsque la température de réfrigération n'est pas

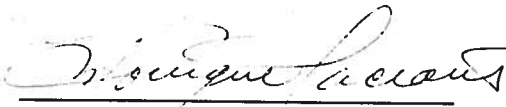
maintenue entre 2°C et 4°C, mais qu'elle est supérieure (7°C). En effet, la croissance de *S. aureus* fut beaucoup ralentie par la présence d'une culture de départ composée de *L. lactis* autant libres qu'encapsulées. De plus, il fut aussi possible de ralentir la croissance de ce même pathogène à 35°C. Des essais de microencapsulation ont permis de ralentir la croissance de *S. aureus* autant à 35°C qu'à 7°C. Il a même été observé que les BAL microencapsulées permettaient une plus forte inhibition que les BAL libres à 7°C.

La nisine a été immobilisée dans des films et des billes d'alginate à diverses concentrations afin d'éliminer le pathogène *S. aureus* dans le bœuf. Lors des essais sur des échantillons de bifteck de ronde, les films contenant de la nisine ont permis une réduction de 1.86 log₁₀ UFC g⁻¹ de la quantité de *S. aureus* après 7 jours d'entreposage au réfrigérateur. L'immobilisation de nisine dans des billes d'alginate a permis de réduire cette même flore bactérienne de 1.42 log₁₀ UFC g⁻¹ dans des échantillons de bœuf haché après 14 jours de conservation à 4°C.

L'étude de nouvelles matrices permettant d'obtenir un microenvironnement imperméable aux métabolites externes avec diffusion contrôlée des actifs pourrait résulter à des solutions à court terme. À plus long terme, la découverte d'une souche de BAL productrice de bactériocine à large spectre d'inhibition, provenant de la flore normale du bœuf et capable de croître à des températures de réfrigération sans altérer le goût de la viande serait l'objectif visé.



Mathieu Millette, étudiant



Monique Lacroix, directrice de recherche

Abréviations

ACOA : Aliment Cru d'Origine Animale
ATCC : American Type Culture Collection
 A_w : Activité de l'eau
BAL : Bactérie acide lactique
BHI: Brain Heart Infusion
cm : centimètre
CMI: Concentration minimale inhibitrice
CRDA: Centre de Recherche et de Développement des Aliments
DHA : Déhydroalanine
DHB: Déhydrobutyrine
EDTA : Éthylenediamine tetraacetic acid
FDA: Food and Drug Administration
GRAS: Generally Recognized As Safe
HACCP: Hazard Analysis and Critical Control Point
HTST: High Temperature Short Time
kg: Kilogramme
kGy: Kilogray
 kGy h^{-1} : Kilogray par heure
LSPQ: Laboratoire de Santé Publique du Québec
 Mol L^{-1} : Mole par Litre
MRS: milieu de culture de Mann, Rogosa et Sharpe
M\$: Millions de dollars
NIZO: Netherlands Institute of Dairy Research
pH: Potentiel Hydrogène
PLA: Poly-Lactic Acid
PVA : Polyvinyl Alcool
p/v: poids sur volume
sp: sous-espèce
TIC: Technologie Immobilisation des Cellules

UFC: Unité Formatrice de Colonies

UHT: Ultra Haute Température

μL: microlitre

v/v: Volume/Volume

WPC: “Whey Protein Concentrate”

Liste des tableaux

1. Normes d'acceptabilité de la viande hachée	9
2. Pouvoir antimicrobien des BAL dans des bouillons ou des aliments	23
3. Effets antimicrobiens de la nisine seule ou utilisée en combinaison avec d'autres traitements	27
4. Exemples d'utilisation de l'immobilisation des bactéries lactiques dans l'industrie	44
5. Souches bactériennes, leur origine et le milieu de culture servant à leur croissance	61
6. Groupes expérimentaux utilisés lors des manipulations de destruction de <i>S. aureus</i> dans le bœuf haché	68
7. Groupes expérimentaux utilisés afin de déterminer l'efficacité du film antimicrobien contenant ou non de la nisine	70
8. Groupes expérimentaux utilisés afin de déterminer l'efficacité antimicrobienne des billes contenant de la nisine	71
9. Influence de la concentration en alginate entrant dans la formulation des billes sur la croissance de <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> ATCC 11454 retrouvés dans le surnageant	76
10. Influence de la concentration en alginate entrant dans la formulation des billes sur la croissance de <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> ATCC 11454 piégés à l'intérieur des billes	78
11. Évolution du pH d'un surnageant d'eau peptonée contenant <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> ATCC 11454 encapsulés dans des billes possédant diverses concentrations d'alginate	80
12. Influence de la concentration en lactosérum entrant dans la formulation des billes sur la croissance de <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> ATCC 11454 retrouvés dans le surnageant	84
13. Influence de la concentration en lactosérum entrant dans la formulation des billes sur la croissance de <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> ATCC 11454 retrouvés à l'intérieur des billes	86
14. Évolution du pH d'un surnageant d'eau peptonée contenant <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> ATCC 11454 encapsulés dans des billes possédant diverses concentrations de lactosérum	88
15. Activité antimicrobienne de <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> ATCC 11454 contre	92

diverses souches indicatrices

16. Cinétique des surfaces d'inhibition de <i>S. aureus</i> formées par différentes formulations d'encapsulation de <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> ATCC 11454	93
17. Zone d'inhibition produite par <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> ATCC 11454 encapsulés contre des bactéries gram négative en présence d'EDTA	96
18. Croissance de <i>S. aureus</i> dans du bœuf haché inoculé avec <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> ATCC 11454 incubé à 35°C	99
19. Croissance de <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> ATCC 11454 dans du bœuf contaminé par <i>S. aureus</i> incubé à 35°C	101
20. pH du bœuf haché contaminé avec <i>S. aureus</i> et <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> ATCC 11454 incubé à 35°C	103
21. Croissance de <i>S. aureus</i> dans du bœuf haché inoculé avec <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> ATCC 11454 incubé à 7°C	107
22. Croissance de <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> ATCC 11454 dans du bœuf contaminé avec <i>S. aureus</i> incubé à 7°C	109
23. pH du bœuf haché contaminé avec <i>S. aureus</i> et <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> ATCC11454 incubé à 7°C	111
24. Croissance de <i>S. aureus</i> dans du bœuf haché inoculé avec <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> ATCC 11454 microencapsulés et incubé à 35°C	116
25. Croissance de <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> ATCC 11454 microencapsulés dans du bœuf contaminé par <i>S. aureus</i> incubé à 35°C	118
26. pH du bœuf haché contaminé avec <i>S. aureus</i> et <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> ATCC 11454 microencapsulés incubé à 35°C	120
27. Croissance de <i>S. aureus</i> dans du bœuf haché inoculé avec <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> ATCC 11454 microencapsulés et incubé à 7°C	124
28. Croissance de <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> ATCC 11454 microencapsulés dans du bœuf haché contaminé par <i>S. aureus</i> incubé à 7°C	126
29. pH du bœuf haché contaminé avec <i>S. aureus</i> et <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> ATCC 11454 microencapsulés et incubé à 7°C	128
30. Destruction de <i>S. aureus</i> présent à la surface de bifteck de ronde conservées à 4°C par des films d'alginate modifié contenant de la nisine	133
31. Inhibition de <i>S. aureus</i> dans des échantillons de bœuf haché mi-maigre traités avec de la nisine libre ou encapsulée	137

Liste des figures

1. Visualisation de certaines méthodes d'immobilisation de cellules vivantes	44
2. Alignement des blocs G et M dans une molécule d'alginate	47
3. Structures chimiques de la chitine et du chitosane	49
4. Structure chimique tridimensionnelle de la pectine	50
5. Structure chimique d'un monomère composant l'agar	51
6. Transformation de la μ -carrageenan en κ -carrageenan	52
7. Structure chimique de la gomme gellan acylée	53
8. Structure chimique d'un monomère composant l'alcool polyvinylique	54
9. Schématisation du montage utilisé lors de la fabrication des microbilles	66
10. Photographie de billes d'alginate de calcium	75
11. Influence de la concentration en alginate entrant dans la formulation des billes sur la croissance de <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> ATCC 11454 retrouvés dans le surnageant	77
12. Influence de la concentration en alginate entrant dans la formulation des billes sur la croissance de <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> ATCC 11454 piégés à l'intérieur des billes	79
13. Évolution du pH d'un surnageant d'eau peptonée contenant <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> ATCC 11454 encapsulés dans des billes possédant diverses concentrations d'alginate	81
14. Influence de la concentration en lactosérum entrant dans la formulation des billes sur la croissance de <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> ATCC 11454 retrouvés dans le surnageant	85
15. Influence de la concentration en lactosérum entrant dans la formulation des billes sur la croissance de <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> ATCC 11454 retrouvés à l'intérieur des billes	87
16. Évolution du pH d'un surnageant d'eau peptonée contenant <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> ATCC 11454 encapsulés dans des billes possédant diverses concentrations de lactosérum	89
17. Cinétique des zones d'inhibition formées par différentes formulation d'encapsulation de <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> ATCC 11454	94

18. Croissance de <i>S. aureus</i> dans du bœuf haché inoculé avec <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> ATCC 11454 incubé à 35°C	100
19. Croissance de <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> ATCC 11454 dans du bœuf contaminé par <i>S. aureus</i> incubé à 35°C	102
20. pH du bœuf haché contaminé avec <i>S. aureus</i> et <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> ATCC 11454 incubé à 35°C	104
21. Croissance de <i>S. aureus</i> dans du bœuf haché inoculé avec <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> ATCC 11454 incubé à 7°C	108
22. Croissance de <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> ATCC 11454 dans du bœuf contaminé avec <i>S. aureus</i> incubé à 7°C	110
23. pH du bœuf haché contaminé avec <i>S. aureus</i> et <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> ATCC11454 incubé à 7°C	112
24. Observation de microbilles d'alginate de calcium effectuée à l'aide d'un microscope optique doté d'un grossissement 50X	115
25. Croissance de <i>S. aureus</i> dans du bœuf haché inoculé avec <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> ATCC 11454 microencapsulés et incubé à 35°C	117
26. Croissance de <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> ATCC 11454 dans du bœuf contaminé par <i>S. aureus</i> incubé à 35°C	119
27. pH du bœuf haché contaminé avec <i>S. aureus</i> et <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> ATCC11454 incubé à 35°C	121
28. Croissance de <i>S. aureus</i> dans du bœuf haché inoculé avec <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> ATCC 11454 incubé à 7°C	125
29. Croissance de <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> ATCC 11454 dans du bœuf contaminé avec <i>S. aureus</i> incubé à 7°C	127
30. pH du bœuf haché contaminé avec <i>S. aureus</i> et <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> ATCC11454 incubé à 7°C	129
31. Photos démontrant le pouvoir antimicrobien contre <i>Lactobacillus sake</i> d'une formulation de film biodégradable contenant de la nisine.	132
32. Destruction de <i>S. aureus</i> présent à la surface de bifteck de ronde conservées à 4°C par des films d'alginate modifié contenant de la nisine.	134
33a. Inhibition de <i>S. aureus</i> inoculé dans des échantillons de bœuf haché mi-maigre traités avec 500 UI/g de nisine libre ou encapsulée.	138
33b. Inhibition de <i>S. aureus</i> inoculé dans des échantillons de bœuf haché mi-maigre traités avec 1000 UI/g de nisine libre ou encapsulée.	139

Introduction

Chaque année, la contamination bactérienne des viandes entraîne environ 500 millions de dollars de dépenses en frais de santé, au Canada. Plusieurs cas d'empoisonnements, dont celles causées par *Escherichia coli* O157:H7, sont déclarées dans les différentes provinces et de nombreux consommateurs sont touchés.

Vers la fin des années '80, l'industrie, de concert avec le milieu scientifique et le gouvernement, se sont mobilisés et ont cherché des moyens novateurs afin d'assurer la qualité et la salubrité de la viande et ainsi rehausser la confiance des consommateurs. Parmi ces moyens, le système « hazard Analysis and Critical Control Point » (HACCP), qui tente de prévoir et de prévenir les points critiques de contamination et de réagir rapidement en cas de problèmes, s'est grandement généralisé dans la filière viande. Les lois deviennent de plus en plus sévères et les contrôles de plus en plus serrés: rien n'est laissé au hasard. Au Canada, c'est la tolérance zéro!

Un autre moyen pour prévenir les empoisonnements alimentaires est de contrôler la charge microbienne de la viande. Pour ce faire, plusieurs techniques sont déjà existantes comme la réfrigération ou les agents de conservation (nitrites, acides organiques, etc) ou encore, la pasteurisation. Cela ne semble pourtant pas suffisant puisque le 3 octobre 1999, une fillette de 6 ans mourrait de la fameuse "maladie du Hamburger", suite à une épidémie qui a causé 11 hospitalisations. En 1998, 330 cas d'intoxications à la vérotoxine d'*E. coli* O157:H7 furent recensés au Québec (Moffet, 1999).

Depuis longtemps, les nombreuses propriétés des bactéries probiotiques sont évaluées. Elles améliorent le métabolisme du lactose chez les personnes souffrant d'incapacité à digérer le lactose, préviennent la diarrhée du voyageur, aident probablement à prévenir certains types de cancers, mais surtout, les bactéries probiotiques ont un puissant pouvoir antimicrobien. À l'aide d'acides lactique, acétique et formique, de peroxyde d'hydrogène, de diacétyles et des bactériocines, des antibiotiques non

peptidiques, elles compétitionnent contre les bactéries responsables de l'altération de la viande, mais aussi contre les bactéries pathogènes. De plus, en éliminant les microorganismes nuisibles, donc en prenant le contrôle de la flore microbienne retrouvée sur la viande, les probiotiques pourront croître jusqu'à des niveaux qui permettront d'améliorer l'état de santé des consommateurs.

Pourtant, un autre problème persiste. La plupart du temps, les agents de conservation sont ajoutés en surface de la viande. Or, la diffusion du produit est rapide et quasi instantanée. L'effet antimicrobien se fait sentir immédiatement après l'application. Si quelques bactéries survivent à ce traitement, elles pourront croître encore plus rapidement à cause de l'absence de compétition et provoquer peut-être plus de dommages. Par contre, si la substance est piégée dans une matrice de polysaccharides ou de protéines d'origine agricole et qu'une dose minimale est en contact durant un plus grand temps avec les microbes, ceux-ci auront plus de difficultés à survivre et donc, la viande se conservera plus longtemps. De même, les bactéries probiotiques peuvent être encapsulées en présence d'un milieu de culture favorisant leur croissance et sécréter leurs métabolites qui diffuseront au travers la matrice et agiront sur les bactéries responsables de l'altération de la viande. Ces bactéries probiotiques pourraient aller jusqu'à se nourrir de cette matrice, ce qui leur permettrait de coloniser la viande au détriment des microorganismes pathogènes.

Chapitre I

Revue de littérature

1. Le bœuf haché

1.1. Définition

Le bœuf haché est un aliment cru d'origine animale (ACOA). En fait, ce type d'aliment doit être de la viande de bœuf finement hachée et doit contenir au plus 30 % de gras de bœuf. C'est ainsi qu'est défini le bœuf haché dans la Loi sur les aliments et drogues administrée par Santé Canada ainsi que par la FDA américaine.

1.2. Qualité nutritionnelle du bœuf haché

Chimiquement parlant, un muscle de bœuf maigre est constitué de 75% d'eau, de 18% de protéines, de 3% de lipides, d'environ 1% de sucres et de 3% d'autres substances (sodium, potassium, fer, zinc, thiamine, riboflavine, niacine, vitamines B6 et B12) (Anonyme, 2001). La viande hachée maigre doit posséder un maximum de 17% de gras, la viande hachée mi-maigre 23% et le bœuf haché normal, un maximum de 30% de matières grasses. La viande crue possède un A_w de 0.99, ce qui est très favorable à la croissance de la grande majorité des microorganismes. Le pH du bœuf haché cru se situe quelque part entre 6.5 et 7.0 (Silliker *et al.*, 1980).

1.3. Aspects économiques liés au bœuf haché

En 1996, l'industrie de la viande et des produits de la viande était la plus grande de toutes les industries de transformation alimentaire du Canada avec des valeurs de ventes de l'ordre de 10.2 milliards de dollars. Elle se situait donc au cinquième rang parmi les grandes industries manufacturières au Canada (Statistiques Canada, 1998).

En 1997, les exportations canadiennes de bœuf ont augmenté de 19% (328 554 tonnes). Ce sont principalement les clients situés aux États-Unis et au Japon qui ont contribué le plus directement à cette croissance. L'exportation du bœuf a rapporté 1.04 milliards de dollars (Agriculture et Agroalimentaire Canada, 1998).

En 1998, la production de bœuf au Canada a connu une hausse de 9% (1 126 300 tonnes métriques). La consommation de bœuf par habitant était aussi en hausse (31.8 kg/personne).

En 1999, la consommation de viande rouge au Canada était en croissance se situant alors à 62.3 kg/personne. Le bœuf représente alors près de la moitié de cette masse (31 kg bœuf/personne). C'est tout de même en deçà des quantités enregistrées au début des années '90 (9% de moins). Ces données représentent les aliments qui sont disponibles pour la consommation (Statistiques Canada, 2000a). Toujours en 1999, les recettes du bétail ont atteint des sommets jusqu'alors inégalés de 15.2 milliards de dollars. Cette hausse est due en très grande partie à la nette progression des recettes des bovins et des veaux (augmentation de 8.8% par rapport à l'année précédente) ainsi que de la croissance ininterrompue de la demande de bœuf en Amérique du Nord et à l'étranger (Statistiques Canada, 2000b).

2. La microbiologie du bœuf haché

2.1. Flore microbienne initiale retrouvée dans le bœuf

Il est remarqué que, chez un gros bœuf adulte et en bonne santé, les tissus qui sont destinés à être transformés en viande et autres produits carnés sont stériles (Ouattara, 1998). En outre, l'aponévrose conjonctive, sorte d'enveloppe recouvrant les muscles des carcasses, est une première barrière que traversent très difficilement les microorganismes. C'est à partir des étapes subséquentes à l'abattoir (opérations d'éviscération, de désossage-découpage, parage et tranchage) que la contamination survient (Gill et Greer, 1993; Ouattara, 1998; Silliker *et al.*, 1980) et elle se poursuit au cours de toutes les étapes

de transformation qui préparent la viande pour la consommation (Stringer *et al.* 1969). C'est la mise en présence des tissus internes de l'animal avec l'environnement externe qui crée les contacts avec les microorganismes. La surface des carcasses forme un excellent substrat pour d'innombrables bactéries (on peut en retrouver quelques millions par centimètre carrés) et autres envahisseurs en leur fournissant de multiples substances nutritives ainsi que des valeurs de A_w et de pH adéquates. Ainsi, leur multiplication se voit accélérée. Cette croissance effrénée favorise donc la détérioration des aliments (Emswiler *et al.*, 1976; Ouattara, 1998; Prieto *et al.*, 1991) et le développement de souches bactériennes pathogènes pour l'humain (Ouattara, 1998). Les principaux microorganismes responsables de l'altération de la viande sont les *Pseudomonas*, les *Enterobacteriaceae* et certaines espèces de bactéries lactiques (*Lactobacillus sake*, *L. plantarum*, *L. curvatus*) (Roberts et Weese, 1998).

2.2. Sources de contamination

La quantité de bactéries présente dans le bœuf haché dépend du niveau de contamination initial aussi bien que de différents facteurs environnementaux. Avec l'implantation du système HACCP dans l'industrie de nombreux pays, qui préconise l'anticipation et la prévention des problèmes (ICMSF, 1998 ; MFSC, 1992), les nombreuses sources de contamination de la viande sont maintenant bien documentées (Gill et Greer, 1993; Ouattara, 1998; Prieto *et al.*, 1991). Elles sont donc catégorisées en deux types.

2.2.1. Contamination primaire ou endogène

L'ensemble des microorganismes qui entrent dans cette catégorie proviennent de l'animal vivant. Par exemple, immédiatement après le dépeçage du bœuf, la carcasse sera contaminée par les bactéries vivant sur la peau de l'animal ainsi que plusieurs autres provenant du sol ou de la végétation dans l'environnement du bétail et même de ses matières fécales (Gill et Greer, 1993; Newton *et al.*, 1978; Ouattara, 1998). Plusieurs genres de bactéries psychrotrophes tels *Achromobacter*, *Microbacterium*, *Micrococcus*,

Flavobacterium et *Pseudomonas* (Newton *et al.*, 1978) sont retrouvés sur la carcasse immédiatement après le dépeçage. Quelques espèces mésophiles appartiennent aussi de cette flore: *Staphylococcus spp.* et *Bacillus spp.* (Gill et Greer, 1993).

L'éviscération est une autre source de contamination potentielle puisqu'il est fréquent de couper le tube digestif de l'animal au cours de cette manipulation. Les *Enterobacteriaceae* peuvent être alors mis en contact avec la viande destinée à la consommation humaine. Les autres organes internes comme les ganglions lymphatiques, les poumons, le foie et la vessie sont autant de sources de contamination possibles (Ouattara, 1998).

2.2.2. Contamination secondaire ou exogène

La contamination secondaire, quant à elle, est causée par les microorganismes qui sont étrangers à l'animal. C'est durant les différentes manipulations qui amènent la viande de l'abattoir aux points de vente (abattoir, coupe, transport) que les microorganismes qui souillent les lames des couteaux et les autres accessoires (scies, gants, crochets, murs des réfrigérateurs, etc.) seront transférés à la viande. Par exemple, Stringer *et al.* (1969) démontrent que les murs et les plateaux de coupe dans les salles de désossement sont des sources de contamination potentielles de la viande. Plus tard, Newton *et al.* (1978) démontrent que le sol des réfrigérateurs est aussi une importante source de contamination. Même si la viande ne vient pas directement en contact avec le plancher, les particules de poussières sont porteuses des différents microbes et c'est ce qui contaminera les produits carnés (Newton *et al.*, 1978). Afin de continuer dans cette veine, des études furent effectuées dans différents abattoirs qui démontrent que l'air est une source de contamination (Rahkio et Korkeala, 1997). En absence de précautions, les mouvements aériens peuvent facilement transporter les bactéries d'un endroit souillé vers un lieu qui doit être normalement propre, amenant ainsi la contamination de la viande.

L'accroissement de cette contamination peut être grandement prévenue (mais non inhibée) si la température ambiante est maintenue entre 1,5°C et 5°C pour la durée des

manipulations. Emswiler *et al.* (1976) ont démontré que la durée de conservation du bœuf haché peut être significativement augmentée si toutes les opérations se font à une température n'excédant jamais $-1,7^{\circ}\text{C}$. Les mains souillées des travailleurs vont contribuer à l'augmentation de la flore mésophile et les équipements mal stérilisés seront responsables de l'apport de microorganismes psychrotrophes (Gill et Greer, 1993).

De plus, les endroits humides qui viennent en contact avec d'autres sources de contamination (comme le cou) sont plus fortement contaminés que les parties plus sèches, par exemple l'échine. Les bactéries se multiplient plus rapidement lorsque le A_w est élevé (Stringer *et al.*, 1969).

Si de bonnes conditions hygiéniques sont respectées pour l'ensemble de la chaîne de production, le nombre moyen de bactéries sur le bœuf sera moins de 10^3 UFC/cm² avec une flore constituée de moins de 5% d'organismes responsables de la putréfaction de la viande. Par contre, le bœuf haché est dans une situation particulière. Il est manipulé beaucoup plus que les autres types de coupe (surlonge, filet mignon). Le hachoir, composé de plusieurs lames (autant de sources de contamination potentielles), réduit le bœuf en très petits morceaux, donc la surface d'exposition aux lames est grandement augmentée ce qui cause une plus grande contamination. Il n'est donc pas rare d'échantillonner 10^6 - 10^7 UFC g⁻¹ bactéries dans le bœuf haché (Gill et Greer, 1993).

La flore microbienne du bœuf haché, lorsque mis en vente dans les supermarchés, est fortement composée par des bactéries responsables de l'altération de la viande. Cette flore sera principalement constituée par l'espèce qui se reproduit le plus rapidement dans les conditions de conservation du bœuf. Lorsque celui-ci est conservé à l'air libre et à une température froide (environ 4°C), *Pseudomonas sp.* dominera généralement la flore microbienne, mais il y aura aussi quelques *Acinetobacter* et *Moraxella*. Les entérobactéries (anaérobies facultatifs) et *Brochothrix themosphacta* (microaérophiles) sont susceptibles d'être retrouvés si la viande est malencontreusement en contact avec ces espèces au cours des manipulations. La flore microbienne aérobique causant le périssement du bœuf assure sa croissance en utilisant les composés de faible poids

moléculaire de la viande. Par exemple, *Pseudomonas* utilise le glucose. Lorsque la charge microbienne est devenue trop importante et que le glucose est entièrement consommé, *Pseudomonas* changera de substrat et se tournera vers les acides aminés. Ce sont les produits de dégradation de ceux-ci qui causent les odeurs nauséabondes, signe que le bœuf haché est fortement contaminé (Gill et Greer, 1993).

Si le bœuf haché est conservé sans oxygène, la flore microbienne sera modifiée. Les *Lactobacillus*, *Leuconostoc* et *Carnobacterium* seront les populations dominantes. Encore une fois, les entérobactéries, *Brochothrix thermosphacta* et *Shewanella putrefaciens* pourront être retrouvés. Les trois groupes dominants acidifieront le milieu jusqu'à environ pH 5 tandis que les autres, en quantité moindre, causeront l'apparition de produits de dégradation très nocifs (Gill et Greer, 1993).

2.3. Normes microbiennes en vigueur

Des normes microbiologiques sévères servent à décider si une viande est bonne pour la consommation ou non. Ces normes, émises par le CUMAIRA (Comité sur l'uniformisation des méthodes d'analyses et l'interprétation des résultats analytiques) en 1995 à la demande du MAPAQ (Ministère de l'agriculture, des Pêcheries et de l'alimentation du Québec), sont recensées dans un recueil de méthodes microbiologiques. Le tableau 1 présente les normes relatives à la viande hachée.

Tableau 1 : Normes d'acceptabilité de la viande hachée.

Bactéries	n	c	m	M
Numération aérobie mésophile	5	3	$1,0 \times 10^7$	$1,0 \times 10^8$
<i>E. coli</i>	5	2	$1,0 \times 10^2$	$1,0 \times 10^2$
<i>S. aureus</i>	5	2	$1,0 \times 10^3$	$1,0 \times 10^4$
<i>Salmonella</i>	5	0	absence	-

Note : Critères exprimés en bactéries/gramme à l'exception de *Salmonella* exprimé par 25 grammes.

n : nombre d'échantillons analysés

c : nombre maximal d'échantillons pouvant présenter des valeurs se situant entre m et M

m : échantillon acceptable si le résultat est égal ou inférieur à cette valeur

M : seuil limite d'acceptabilité, aucun échantillon ne doit dépasser cette valeur

2.4. Bactéries pathogènes et pathogénécité

Ce sont surtout les entérobactéries qui causent les principaux problèmes de pathogénécités. Les *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni*, *Vibrio* et *Yersinia* sont la plupart du temps inoffensives chez l'animal, mais sources de maladies pour l'homme.

Le principal symptôme d'une infection bactérienne est sans aucun doute la diarrhée suivi d'une déshydratation. Selon la pathogénécité de la bactérie responsable de la contamination ainsi que de l'état de santé et de la résistance de l'hôte, cette diarrhée sera aiguë ou, dans les cas plus sérieux, chronique et pouvant même mener à des séquelles plus graves. Les personnes les plus à risque sont les très jeunes enfants, les gens âgés et les immunodéprimés ou les individus souffrant de certaines maladies (cirrhose, hépatite, etc).

Les intoxications alimentaires aux Staphylocoques sont une des plus communes aux Etats-Unis (Doyle *et al.*, 1988). C'est sans doute parce que *S. aureus* est retrouvé dans le nez et la gorge, sur la peau et les cheveux de plus de 50% des humains sains mais aussi sur la peau et la fourrure des animaux, qu'une contamination croisée peut se produire assez aisément et qu'ainsi la bactérie se retrouve dans le système digestif des humains. De plus, la croissance de *S. aureus* est assurée dans les aliments riches en protéines comme les viandes et les produits carnés, la volaille, les poissons, le lait et les produits laitiers, les salades de toutes sortes et plusieurs pâtisseries (Doyle *et al.*, 1988). Il est important de savoir que *S. aureus* est un mauvais compétiteur et que cette bactérie est habituellement éliminée par la flore normale des aliments crus. De plus, l'acidité (de la mayonnaise par exemple) élimine ce pathogène. Par contre, une fois mélangée dans une salade, l'effet tampon de l'aliment annulera l'action inhibitrice d'un pH acide contre cette bactérie. *S. aureus* peut résister à de fortes concentrations de sel (10-20%) et de sucres (50-60%). Ce microorganisme est aussi tolérant au nitrite. Sa température optimale de croissance se situe entre 35 et 37°C, mais il peut croître à une température aussi élevée

que 47.5°C et aussi faible que 6-7°C. Sa croissance est même possible à un A_w de 0.86 et dans une atmosphère dont la teneur en oxygène est réduite (Doyle *et al.*, 1988).

D'une part, plusieurs espèces de Staphylocoques ont la capacité de produire des toxines thermostables (A, B, C, C₂, D et E). Ces toxines sont responsables de gastro-entérites sévères. D'autre part, la période d'incubation de ce pathogène est très courte variant entre 30 minutes et 8 heures après la consommation de viandes contaminées. Les principaux symptômes de l'infection sont l'apparition de nausées, des vomissements, crampes abdominales, transpiration, un pouls faible, état de choc, respiration superficielle et des températures sous la normale. La croissance d'un million de bactéries serait nécessaire à l'obtention d'une quantité de toxines suffisante pour induire les symptômes énumérés ci-haut (Doyle *et al.*, 1988; Plaut, 2000).

2.5. Coûts engendrés par la contamination bactérienne

Statistiques Canada a recensé 69 143 cas de campylobactériose durant les années 1993 à 1997 tandis que le nombre de cas de salmonellose se chiffrait à 32 432. Entre janvier et septembre 2000, 6 948 cas de campylobactériose et 3 423 cas de salmonellose furent détectés au Canada alors que 1 116 personnes furent infectées par des *E. coli* vérotoxigènes (Santé Canada, 2000).

Dans un numéro spécial du magazine Québec Science traitant de l'alimentation (Dubé, 2001), 2 564 Québécois auraient été affectés par une intoxication alimentaire en 1999, tandis qu'en 2000, 4 896 cas ont été recensés (dont 3 décès). En outre, le ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec estime que seulement 5% des cas d'intoxications alimentaires sont en réalité signalés aux autorités concernées.

Pendant ce temps, aux États-Unis, un consortium scientifique formé par l'Institut des Technologistes Alimentaires, estime le nombre de cas d'intoxications alimentaires entre 24 et 81 millions annuellement engendrant des dépenses variant entre 5 et 17 milliards de dollars en soins médicaux ainsi qu'en perte de productivité. Un autre groupe de

chercheurs d'Atlanta (Mead *et al.*, 1999) ont estimé que les intoxications alimentaires causent annuellement aux Etats-Unis environ 76 millions de malades, dont 325 000 nécessitant une hospitalisation, et 5000 mortalités. Il y a plus de 1 400 000 des cas qui sont causés par *Salmonella* sp., plus de 2 450 000 cas occasionnés par *Campylobacter* sp., plus de 185 000 cas résultant d'une contamination par *Staphylococcus* sp. et plus de 269 000 cas contaminations par *E. coli*.

3. La conservation de la viande

3.1. Durée de conservation du bœuf haché

Le bœuf haché frais a une durée de vie d'à peine deux jours lorsqu'il est conservé dans un réfrigérateur conventionnel et dans une atmosphère aérobie. Cette rapide détérioration est causée par les microorganismes responsables de l'altération retrouvée dans la viande de bœuf (Robert et Weese, 1998). Au Canada, le périssement des viandes occasionne des pertes économiques de l'ordre de 200 M\$ aux détaillants.

3.2. Facteurs qui influencent la durée de conservation du bœuf haché

Plusieurs facteurs influencent la durée de conservation du bœuf haché. Le principal est sans doute la charge microbienne retrouvée initialement sur le morceau de viande. Plus la flore microbienne sera importante, plus courte en sera la durée de conservation (Robert et Weese, 1998). La température et l'atmosphère de conservation de la viande sont d'autres facteurs très importants à considérer.

3.3. Méthodes de conservation ancestrales

Durant la préhistoire, l'espèce humaine, encore à ses premiers pas, se rapprochait plus de l'animal que de l'Homme tel qu'on le connaît maintenant. L'instinct dictait donc à

cet homme primitif d'être en quête continue de nourriture afin d'assurer sa subsistance et celle de ses semblables. Sa principale occupation était donc de chasser ou de partir à la recherche de quelques petits fruits. Il devait manger rapidement toute sa récolte s'étant vite aperçu que les restes pourrissaient, sentaient mauvais et n'étaient plus agréables au goût dès le lendemain. Avec l'évolution de l'espèce et surtout l'avènement de l'agriculture et de la sédentarité des populations, *Homo sapiens* a dû développer différentes méthodes pour préserver les aliments.

Aucun écrit ne relate les débuts de la conservation de la viande et du poisson par fumage ou séchage solaire. Cependant, le principe de ces techniques était déjà connu lorsque le sel fut utilisé pour la première fois en 3000 av. J-C au Moyen-Orient comme méthode de conservation de la viande. Les fromages et le lait caillé virent aussi le jour. Au cours des siècles suivants, malgré tous les efforts investis dans cette optique, aucune découverte ne vint améliorer les conditions de conservation alimentaire.

3.4. Appert, 1809

Pendant ce temps, la population connaissait une croissance assez impressionnante principalement due aux nombreux progrès technologiques. Les grands chefs d'états décidèrent donc de partir à la conquête de nouveaux territoires. Ces coins de pays à conquérir étant éloignés, les troupes devaient partir durant de nombreux mois, mais les moyens de conservation de la nourriture à cette époque n'étaient pas suffisamment efficaces pour permettre de tels voyages. En 1795, le gouvernement français, face à un problème d'approvisionnement de ses troupes, pensa à récompenser l'inventeur d'une méthode permettant la conservation de la fraîcheur et des qualités nutritives de la viande et des légumes durant plusieurs mois. Nicolas Appert, un brasseur et vignoble, se demanda s'il était possible de garder la nourriture dans une bouteille comme il le faisait avec le vin. Après 15 années d'expérimentations, soit en 1809, il réussit enfin à démontrer qu'en entassant de la nourriture partiellement cuite dans des bouteilles en verre scellées par un bouchon de liège et en laissant ces bouteilles dans de l'eau bouillante durant un certain temps, il était possible de conserver cette nourriture durant de nombreux

mois. L'empereur Napoléon Bonaparte en personne lui remit le prix de 12 000 francs attribué au vainqueur. En 1810, Peter Durand, un anglais, émet un brevet en améliorant la méthode d'Appert. Son idée était simple: comme le verre est dispendieux, lourd et cassable, il doit être possible de conserver les produits alimentaires dans des récipients en étain qui sont pratiquement incassables et beaucoup moins encombrants. C'est donc ce qu'il démontra et les premières boîtes de conserve firent leur apparition (Prescott *et al.*, 1995).

3.5. La révolution nommée Louis Pasteur

C'est encore ce même gouvernement français qui demanda à Louis Pasteur (1822-1895) d'effectuer des recherches afin de découvrir les causes de l'altération du vin au cours de sa fermentation. Pasteur réussit à démontrer que la croissance de germes parasites lors de la fermentation du vin ou du lait occasionnent ces malencontreux problèmes. Il s'emploie donc à trouver une solution et met au point une technique permettant de réduire le niveau de contamination initial par chauffage à 55-60°C durant quelques minutes en l'absence d'oxygène. Ce sont les premiers pas de la pasteurisation (Prescott *et al.*, 1995 ; Schwartz, 2001).

Par la suite, beaucoup de recherches furent réalisées afin de développer les innovations d'Appert et de Pasteur. L'industrialisation du cannage et les nouvelles procédures faisant appel à la température pour assurer l'innocuité des aliments comme le UHT (ultra haute température) et le HTST (high temperature short time) sont des exemples des progrès effectués dans ce domaine. La déshydratation, l'ajout de substances chimiques, l'irradiation, l'application de fortes pressions, l'inoculation des aliments par des bactéries lactiques ou leurs métabolites (par exemple les bactériocines), les enrobages à diffusion contrôlée et les emballages intelligents (emballages permettant entre autre d'enregistrer le couple temps-température durant le transport d'un aliment afin d'assurer aux consommateurs des produits de première qualité) sont des méthodes plus ou moins récentes de conservation des aliments (Ouattara *et al.*, 2002; Prescott *et al.*, 1995). Récemment, beaucoup de travaux de recherches ont été effectués pour comprendre et

élucider les mécanismes d'action des bactéries probiotiques qui sont non seulement utilisées pour assurer la salubrité alimentaire mais aussi afin de préserver la santé humaine.

4. Probiotiques

4.1. Définition

On raconte qu'au XVI^e siècle, le roi de France alors François I^{er}, souffrant de diarrhée persistante, avait essayé plusieurs traitements sans succès lorsqu'un médecin turc lui fut envoyé. Il avait avec lui des brebis et une recette secrète: celle du yogourt! Le roi fut rapidement guéri de son infection intestinale (Saloff-Coste, 1997).

Le mot probiotique provient du grec pro et bios et signifie « pour la vie ». Ce terme a néanmoins prit plusieurs connotations au fil du temps. En 1965, Lilley et Stillwell ont été les premiers à utiliser l'appellation probiotique afin de décrire les substances produites par un protozoaire pouvant induire une stimulation de la croissance chez un autre. Un peu plus tard, Sperti (1971) employa le mot probiotique pour dénommer les extraits de tissus pouvant stimuler la croissance microbienne. En 1974, Parker décida d'appeler probiotique les différents suppléments alimentaires, c'est-à-dire toutes substances ou organismes possédant un effet bénéfique sur son hôte en contribuant à maintenir la balance de sa flore intestinale. Cependant, l'introduction du mot substance dans cette définition tend à élargir celle-ci à une vaste variété de composés comme les antibiotiques par exemple. En 1989, Fuller redéfinit les probiotiques comme étant des "suppléments alimentaires formés de bactéries actives qui créent un impact bénéfique sur l'hôte en améliorant la balance de sa flore intestinale". Cette nouvelle définition souligne l'importance des microorganismes comme composant essentiel d'un produit probiotique. Finalement, en 1994, Huis in't Veld *et al.* (1994) ont proposé que la définition précédente ne tenait compte que des suppléments pour animaux alors que celle-ci devrait pouvoir s'étendre également à une application pour l'être humain. Ainsi, ils ont affiné la définition du terme probiotique comme suit : une culture de microorganismes (uniforme ou mixte) qui, une fois ingérée soit par un animal ou par un être humain (sous forme de

cellules sèches ou de produits fermentés) provoque un effet bénéfique chez l'hôte en améliorant les propriétés de sa flore intestinale.

Cette définition comporte malgré tout quelques restrictions. Elle se restreint aux produits qui :

- contiennent des microorganismes vivants (actifs)
- améliorent l'état de santé général de l'hôte
- peuvent avoir un effet au niveau de la bouche, du tractus gastro-intestinal (par ingestion de capsules ou sous forme de nourriture), du tractus respiratoire supérieure ou dans le tractus uro-génital (par application locale) (O'Sullivan, 1994)

4.2. Quelques exemples de bactéries probiotiques pour l'homme

Le récipiendaire du Prix Nobel Elie Metchnikoff est considéré comme le père des probiotiques. Vers la fin du 19^e siècle, Metchnikoff démontre que l'inoculation d'une souche de choléra et de bacilles favorables (maintenant connus sous le nom de *Lactobacillus*) chez un animal ne provoque pas de symptômes pathologiques chez l'hôte. Ainsi, il postule que la présence de microorganismes antagonistes dans l'intestin de certains animaux ou personnes peut prévenir une infection chez ces derniers. De plus, en étudiant les interactions hôte-microorganismes, il établit que les toxines produites par ces microorganismes semblaient être la principale cause de mortalité de l'homme. Après avoir effectué des recherches extensives sur l'estomac et le gros intestin, Metchnikoff observe que l'acide lactique produit par des bacilles peut inhiber la croissance de bactéries pathogènes *in vitro* et que certaines populations, comme les Bulgares, ont une durée de vie plus importante du fait d'un régime riche en produits laitiers fermentés contenant ces bacilles. Il suggère alors qu'en utilisant des bactéries lactiques comme les lactobacilles dans diverses préparations alimentaires la santé et la durée de vie d'un individu vont s'améliorer.

Les probiotiques potentiellement bénéfiques à la santé contiennent principalement des souches bactériennes appartenant aux genres *Bifidobacterium* et *Lactobacillus*, cependant d'autres souches comme *Saccharomyces boulardii* et *Enterococcus faecium* ont aussi été utilisées. Les probiotiques pouvant servir chez l'humain sont répertoriés en deux grands groupes : les produits laitiers et les préparations pharmaceutiques. Les produits à base laitière incluent la crème sûre, les crèmes glacées, le beurre, le lait en poudre, les yaourts et les desserts glacés. Les produits laitiers fermentés, quant à eux comprennent le lait acidophile, le yaourt-ACO (en Suisse), l'acidophile doux (aux USA), le biograde (en Allemagne), et le yakult (au Japon). Il existe aussi une large variété de suppléments alimentaires et de préparations pharmaceutiques contenant des bactéries probiotiques. Ces suppléments sont généralement des préparations bactériennes asséchées et délivrées sous forme de capsules ou comprimés, certaines sont utilisées comme traitement des désordres gastro-intestinaux, alors que d'autres sont prescrits dans le cas d'infections urogénitales causées par *Candida albicans* et *Gardnerella vaginalis*.

4.3. Effets des bactéries probiotiques

Plusieurs applications thérapeutiques peuvent être attribuées aux probiotiques :

- 1) Le soulagement de la constipation
- 2) L'inhibition des bactéries pathogènes
- 3) La prévention des infections uro-génitales
- 4) Le traitement des problèmes de peau comme les ulcères et les brûlures dues aux rayons solaires
- 5) La prévention des désordres gastro-intestinaux
- 6) La réduction des effets secondaires produits par l'encéphalopathie hépatique
- 7) L'immunostimulation

4.3.1. Inhibition des pathogènes microbiens :

La capacité que possèdent les bactéries lactiques et les bifidobactéries de produire une ample variété de substances antimicrobiennes *in vitro* a déjà été bien établie (Al-Sheddy *et al.*, 1999; Araya-Kojima *et al.*, 1995; Gibson et Wang, 1994; Lee *et al.* 1999; Zavaglia *et al.*, 1998). Le terme substance désigne : les métabolites de l'oxygène (ex. le peroxyde d'hydrogène et les radicaux libres) - les divers produits finaux du catabolisme des acides organiques (acides lactique, acétique et formiques), des diacétyles, acétaldéhydes, des acides aminés - les bactériocines - les antibiotiques non peptidiques.

Il est à noter que certaines lactobacilles et bifidobactéries possèdent la faculté de déconjuguer les acides biliaries. La forme libre de ces derniers a une activité inhibitrice accrue par rapport à la forme conjuguée. Les microorganismes les plus sensibles face à ces diverses substances sont : *Salmonella thyphimurium*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Clostridium difficile*, *Gardnerella vaginalis*, *Enterococcus* sp. et *Candida albicans* . Des préparations contenant des probiotiques, comme *Lactobacillus casei* GG, ont été recommandées pour la prévention des diarrhées qu'elles soient infantiles, induites par la prise d'antibiotiques ou que ce soit le syndrome du voyageur.

4.4. Bactéries lactiques comme probiotique

Règne : Monères
Embranchement : Bactéries
Classe : Firmicutes
Ordre : Bacillus/Clostridium
Famille : Streptococcaceae

En général, les bactéries lactiques les plus couramment citées dans les études sur les probiotiques font parties des genres *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*,

Leuconostoc, *Pediococcus*, *Bifidobacterium*, *Propionibacterium*, *Streptococcus* (Holzapfel *et al.*, 2001).

4.4.1. Description des bactéries lactiques

Le terme "bactérie lactique" nomme un ensemble de bactéries Gram positives ayant en commun la production d'acide lactique comme produit final de la fermentation. Pour cette raison, elles sont aussi appelées "bactérie acide lactique". Les genres *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* ainsi que *Lactobacillus* appartiennent à cette catégorie. Les bactéries lactiques ne produisent pas de spores et sont dans la très grande majorité des cas non mobiles. Comme elles ne possèdent pas de cytochrome, ces bactéries ne tirent pas leur énergie de la respiration mais plutôt par phosphorylation du substrat au cours de la fermentation des sucres. Les bactéries lactiques se développent aussi bien en présence d'oxygène qu'en son absence et sont donc classées comme des anaérobies aérotolérantes (Prescott *et al.*, 1995).

Les BAL jouent un rôle important dans la majorité des fermentations alimentaires (Nettles et Barefoot, 1993) et de nombreuses souches sont quotidiennement utilisées comme ferments autant dans l'industrie laitière, des produits carnés, du conditionnement des légumes et des produits de boulangeries. La qualité principale de ces microorganismes est d'augmenter la durée de vie des produits fermentés (Abee *et al.*, 1995). Isolés du grain, des plantes vertes, des légumes fermentés, des produits laitiers et carnés ainsi que de la muqueuse intestinale des animaux, ces microorganismes produisent divers composés qui permettent d'augmenter la durée de vie des aliments. Ces composés incluent les bactériocines, les diacétyls, les acides organiques et le peroxyde d'hydrogène (Nettles et Barefoot, 1993).

Plusieurs groupes de recherches ont tenté de contrôler les bactéries nuisibles retrouvées dans les aliments par l'ajout de bactéries lactiques. En 1975, Gilliland et Speck ont ajouté une souche de *Lactobacillus bulgaricus* à de la viande hachée

contaminée afin de contrôler *Pseudomonas fragi*; il en est résulté une inhibition de 6-7 \log_{10} UFC g^{-1} de l'espèce nuisible. Une autre étude préparée pour le Agriculture Canada (Gusew-Chartrand *et al.*, 1977) a démontré que la qualité microbiologique et organoleptique du bœuf haché inoculé par *Lactococcus lactis* et *Leuconostoc citrovorum* est supérieure à celle du bœuf haché non inoculé par cette bactérie. Plus récemment, Leisner *et al.* (1996) ont réussi à démontré l'effet inhibiteur contre *Lactobacillus sake* d'un ferment lactique constitué de *Leuconostoc gelidum* UAL187 lors de l'entreposage de bœuf haché. Ensuite, Bretholt *et al.* (1999) ont artificiellement inoculé des souches de *Listeria monocytogenes* dans des échantillons de jambon et de saucisses et les ont conservés sous différentes atmosphères à 8°C durant 4 semaines. Tout au long de cette conservation, ils ont suivi la croissance des bactéries pathogènes. Ce groupe a ensuite isolé les bactéries lactiques dans les échantillons où il n'y avait aucune croissance de *Listeria monocytogenes*. Cinq souches de BAL (présumées *Lactobacillus sake*) ont été retenues pour leur capacité à détruire autant *Listeria monocytogenes* que *Escherichia coli* O157:H7. Lonvaud-Funel et Joyeux (1993) ont réussi à démontrer que des souches de *Lactobacillus plantarum* Lp et de *Pediococcus pentosaceus* Yq 791 retrouvées dans le vin sécrètent une substance possédant la capacité de ralentir fortement la croissance de plusieurs souches de *Leuconostoc oenos*. Bonestroo *et al.* (1993) ont démontré, quant à eux, que l'addition d'un ferment lactique à de la salade de choux avait la capacité d'inhiber ou de ralentir la croissance de *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes* et *Staphylococcus aureus*. Dunne *et al.* (1999) ont isolé une souche de BAL, *Lactobacillus salivarius* UCC118, possédant la capacité d'inhiber *in vitro* la croissance de nombreuses bactéries pathogènes, mais non celle des autres BAL. De plus, les auteurs ont démontré que cette bactérie a résisté à l'acidité gastrique et a colonisé efficacement l'intestin. Une autre étude, cette fois réalisée par Khalil et Mansour (1998), a démontré que l'addition de deux souches de bifidobactéries permettait de réduire de 20 fois la quantité des moisissures et des levures totales retrouvée dans de la mayonnaise après 16 semaines d'entreposage à 5°C. Parfois, la simple addition de bactéries ne suffit pas à obtenir l'effet recherché; un traitement subséquent doit être effectué afin d'obtenir une synergie. C'est le cas de l'étude réalisée par Al-Sheddy *et al.* (1999). En effet, ils ont dû traiter de la viande de chameau avec des agents chimiques (acétate de sodium et

sorbate de potassium) en plus d'une souche de bifidobactérie pour obtenir une synergie du potentiel antimicrobien contre les bactéries psychrotrophes de cette viande. La co-culture de *Bifidobacterium breve* BB536, une souche isolée de l'intestin humain, dans un milieu synthétique a permis de démontrer le très fort potentiel antimicrobien contre plusieurs espèces pathogènes : *Clostridium perfringens* et *Clostridium clostridiiforme*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* et 4 souches de *Bacteroides*. De plus, les enzymes nuisibles produites lors de la croissance des bactéries étaient aussi éliminées lors des co-cultures (Araya-Kojima, 1995). Un autre exemple provient de la recherche effectuée par Kim *et al.* (1995). Ces derniers ont démontré qu'en inoculant des filets de poisson conservés au réfrigérateur avec des bifidobactéries et de l'acétate de sodium, il était possible d'en augmenter la durée de conservation d'au moins trois jours. Une autre étude démontre le potentiel d'inhibition de *Carnobacterium* sp. contre *Listeria monocytogenes* dans du poisson fumé conservé au réfrigérateur. En effet, le pathogène est complètement éradiqué après aussi peu que 4 jours de contact avec *Carnobacterium divergens* V41 (Duffes *et al.*, 1999). Schillinger et Holzapfel (1990) ont aussi isolé des souches de *Carnobacterium* sp. et ont remarqué que plusieurs de ces souches possédaient un pouvoir inhibiteur sur des espèces semblables de même que contre *Listeria monocytogenes*. Kang et Fung (1999) ont démontré la capacité de *Pediococcus acidilactici* à inhiber *Escherichia coli* O157:H7 durant la fermentation du salami. Ils ont aussi remarqué que lorsque les Pédicoques étaient stimulés par la présence de $MnSO_4$ et d'oxyrase, la mortalité d'*Escherichia coli* était plus grande. Une autre étude conduite sur du salami a démontré que l'addition de *Lactobacillus plantarum* MCS permettait de détruire la flore de *Listeria monocytogenes* (Campanini *et al.*, 1993). Une recherche réalisée par Cai *et al.* (1997) a démontré que l'ajout d'une souche de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* HPB 1688 dans une salade César contaminée par le pathogène *Listeria monocytogenes* était capable de réduire cette flore pathogène de $1.4 \log_{10}$ UFC g^{-1} après 10 jours d'incubation à 7°C. Une autre étude portant sur la salade a été réalisée par l'équipe de Vescovo *et al.* (1996). Ces derniers ont réussi à isoler quelques souches de BAL ayant un pouvoir antimicrobien contre *Aeromonas hydrophila*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium* et *Staphylococcus aureus*. Une souche en particulier était efficace à inhiber la croissance des pathogènes durant 6 jours à 8°C, ce

qui pourrait permettre de conserver les salades sans ajout de substances chimiques. Par la suite, Audisio *et al.* (1999) ont démontré la capacité de la souche *Enterococcus faecium* J96 à inhiber *in vitro* diverses souches de Salmonelles autant humaines qu'aviaires. Ils ont aussi prouvé que la BAL produisait une bactériocine bactéricide contre les bactéries Gram -. Raccach et Geshell (1993) ont démontré que 4 souches de *Pediococcus* sp. avaient la capacité d'inhiber et même de détruire *Listeria monocytogenes* dans du lait à 4.5 et 32°C. L'inoculation de *Lactobacillus gasseri* JCM1131 dans des saucisses a permis de réduire de 2 log la concentration de *S. aureus* (Arihara *et al.*, 1998). Béliard *et al.* (1989) ont réussi à retarder la croissance des *Pseudomonas* et des *Brochothrix* par l'inoculation d'un ferment lactique dans de la viande hachée fraîche permettant ainsi la conservation des qualités sensorielles jusqu'à cinq jours.

Le tableau 2 présente un résumé des résultats d'études dans lesquelles différents aliments étaient co-inoculés de BAL afin de déterminer le pouvoir antimicrobien des BAL. La souche de BAL est présentée de même que les bactéries antagonistes, les effets obtenus et le type d'aliments ou de milieu supportant la croissance des microorganismes.

Tableau 2 : Pouvoir antimicrobien des BAL dans des bouillons ou des aliments.

BAL	Bactéries antagonistes	Effets	Matrice	référence
<i>L. sake</i> isolés saucisses et jambon	<i>L. monocytogenes</i> <i>E. coli</i> <i>Y. enterocolitica</i>	Bactériostatique contre 10 ³ cellules pathogènes Pas changement sensoriel	Viande cuite, tranchée, conservée sous-vide	Bredholt <i>et al.</i> , 1999
<i>L. plantarum</i> Lp <i>P. pentosaceus</i> Yq 791	<i>Lc. oenos</i>	Diminution de la croissance de <i>Lc. oenos</i>	Bouillon Carr	Lonvaud-Funel et Joyeux, 1993
<i>Lactobacillus</i> sp.	A) <i>K. pneumoniae</i> B) <i>B. cereus</i> C) <i>L. monocytogenes</i> D) <i>S. aureus</i>	A) pH qui inhibe B) inhibition C) inhibition D) inhibition	Salade de chou	Bonestroo <i>et al.</i> , 1993
<i>L. salivarius</i> UCC118	Bcp Gram + <i>E. coli</i> <i>L. monocytogenes</i> <i>P. putida</i> <i>S. typhimurium</i> <i>S. aureus</i>	Cette souche n'altère pas la croissance des BAL mais seulement celle des pathogènes (Gram + Gram-)	Agar spot test	Dunne <i>et al.</i> , 1999
<i>B. infantis</i> 4038 <i>B. bifidum</i> DI	Moisissures et levures totales	↓ 1½ log g ⁻¹	Mayonnaise	Khalil <i>et al.</i> , 1998
<i>B. breve</i> NCFB2258	bactéries psychrotrophes	↓ 3½ log g ⁻¹	Viande chameau	Al-Sheddy <i>et al.</i> , 1999
<i>B. longum</i> BB536	Diverses bactéries intestinales	Inhibition de 8 espèces dans les 24 heures, ↓ de l'ammoniac produite	Bouillon GAM + glucose	Araya-Kojima <i>et al.</i> , 1995
<i>B. longum</i> ATCC 15707, <i>B. infantis</i> ATCC 15697, <i>B. adolescentis</i> 9H	Flore mésophile aérobie totale (FAM)	↑ 3 jrs durée de vie ↓ 2 log FAM g ⁻¹ ↑ temps de génération	Filets poisson	Kim <i>et al.</i> , 1995
<i>Carnobacterium piscicola</i> LV61	Plusieurs espèces	Seulement les bactéries d'espèces semblables sont sensibles	Agar well diffusion	Schillinger et Holzapfel, 1990

BAL	Bactéries antagonistes	Effets	Matrice	référence
Plusieurs souches BAL	Pathogènes du lait	↓ de la croissance des pathogènes et ↑ durée de vie	Lait	Champagne <i>et al.</i> , 1994
<i>P. acidilactici</i>	<i>E. coli</i> O157 :H7	↓ 3.5 log lorsque <i>P. acidilactici</i> est en présence de 0.005% MnSo ₄ et de 0.3/ml oxyrase	salami	Kang et Fung, 1999
<i>L. plantarum</i> MCS	<i>L. monocytogenes</i>	Inhibition quasi totale	salami	Campanini <i>et al.</i> , 1993
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> HPB 1688	<i>L. monocytogenes</i>	Inhibition totale dans MRS tamponné après 2 heures à 10°C ↓ 2 log dans salade César	MRS tamponné + salade César	Cai <i>et al.</i> , 1997
<i>Carnobacterium divergens</i> V41; <i>C. piscicola</i> V1; <i>C. piscicola</i> SF668	<i>L. monocytogenes</i>	V41 et V1 permettent élimination totale après 4 jrs et SF668 après 13 jrs	Saumon fumé	Duffes <i>et al.</i> , 1999
<i>L. bulgaricus</i> NCS1	<i>Ps. fragi</i>	Inhibition	Bœuf haché à 7°C	Gilliland et Speck, 1975
<i>E. faecium</i> J96	<i>Salmonella</i> sp. du poulet et humain	↓ croissance <i>Salmonella</i>	Bouillon CAM	Audisio <i>et al.</i> , 1999
<i>Lc. gelidum</i> UAL187	<i>L. sake</i> 1218	Retarde la putréfaction à 8 semaines	Bœuf haché sous-vide, 2°C	Leisner <i>et al.</i> , 1996
<i>L. casei</i> IMPCLC34	<i>A. hydrophila</i> <i>S. aureus</i> <i>S. typhimurium</i>	Inhibition totale après 6 jrs	MRS, salade et jus	Vescovo <i>et al.</i> , 1996
<i>L. acidophilus</i> LB	<i>B. cereus</i> , <i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. typhimurium</i> , <i>S. flexneri</i> , <i>S. aureus</i>	Inhibe tous les pathogènes à différents niveaux mais n'affecte pas les BAL et les bifidobactéries	Radial-diffusion sur différents agar	Coconnier <i>et al.</i> , 1997
<i>Pediococcus</i> spp.	<i>L. monocytogenes</i>	↓ 5 log en 6 jrs	lait	Raccach et Geshell, 1993
<i>L. casei</i> GG	<i>S. typhimurium</i> C5	Contact 1 h entre BAL et <i>S. typhimurium</i> empêche l'invasion des cellules Dans les souris : retarde la mort 15 jrs contre 9 jrs	Cellules Caco-2 et souris C3H/He/Oujco	Hudault <i>et al.</i> , 1997

4.4.2. Substances antimicrobiennes produites par les bactéries lactiques

D'une part, comme présenté plus haut, de très nombreuses études tendent à démontrer le pouvoir inhibiteur des bactéries lactiques et/ou probiotiques sur les différents pathogènes. D'autre part, plusieurs recherches démontrant le pouvoir antimicrobien de la nisine, appliquée seule ou en combinaison avec divers traitements chimiques ou physiques, ont été publiées. Par exemple, Choi et Park (2000) ont étudié la possibilité de contrôler la croissance des lactobacilles lors de la fermentation du kimchi, un plat de légumes coréen, par l'addition de 100 UI ml⁻¹ de nisine afin d'en prévenir le mûrissement. Terebiznik *et al.* (2000) ont étudié l'effet antimicrobien combiné de la nisine et de champs électriques pulsés contre *Escherichia coli* dans du lait écrémé. Il a été démontré dans cette étude que la bactérie peut être inactivée par 1000 UI ml⁻¹ de nisine en présence de 3 pulsations à 11.25 kV cm⁻¹. Scanell *et al.* (1997) ont démontré qu'une combinaison de lactate de sodium (2%) et de nisine (500 UI g⁻¹) avait un effet antimicrobien synergique contre *Staphylococcus aureus* dans des saucisses de porc. Par la suite, Pol et Smid (1999) ont révélé que l'action antimicrobienne de la nisine contre *Bacillus cereus* était plus importante lorsque la bactérie était cultivée à 8°C qu'à 20°C. De plus, une synergie a été observée entre le carvacrol et la nisine. Bell et De Lacy (1987) ont réalisé une étude démontrant la capacité de la nisine, de l'acide sorbique et de monolaurine à préserver des viandes cuites. En effet, l'addition de 500 UI g⁻¹ de nisine, d'acide sorbique (0.125%) et de lauricidine (0.5%) étaient les concentrations minimales nécessaires pour empêcher le périment de la viande durant dix jours. Chung *et al.* (1989) ont démontré très tôt que la nisine avait la capacité de ralentir fortement la croissance des bactéries gram positives attachées à des échantillons de bœuf conservés au réfrigérateur. Cutter et Siragusa (1994) ont travaillé sur la décontamination des carcasses entières de bœuf par vaporisation de diverses concentrations de nisine afin d'éliminer les flores de *Brochothrix thermosphacta*, *Listeria innocua* et *Clostridium divergens*. Ils ont conclu qu'une vaporisation de 5000 UA ml⁻¹ permet de détruire plus de 3 log₁₀ cm⁻² des espèces bactériennes. Quelques années plus tard, Cutter et Siragusa (1998) ont incorporé de la nisine dans du Fibrimex (un agent liant de la viande). Cette combinaison a permis de conserver la viande exempte de *Brochothrix thermosphacta* durant les 7 jours

d'entreposage des échantillons de bœuf. Ariyapitipun *et al.* (1999) ont réalisé des expériences afin de démontrer l'efficacité de la nisine en combinaison avec l'acide lactique ou l'acide polylactique à contrôler la croissance de diverses flores microbiennes retrouvées naturellement (psychrophile, mésophile, *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* et *Lactobacillus*) dans des échantillons de bœuf conservés sous-vide. La destruction thermique des microorganismes est le principal traitement effectué pour pasteuriser les boîtes de conserves de homard. Malheureusement, ce procédé est très coûteux. Budu-Amoako *et al.* (1999) ont démontré que l'addition de 25 mg kg⁻¹ suivi d'un chauffage plus léger a permis de réduire la flore de *Listeria monocytogenes* de 3 à 5 log₁₀ g⁻¹ en plus de réduire énormément les pertes économiques. Il est connu que la nisine ne peut pas détruire les bactéries Gram négatives. Par contre, Stevens *et al.* (1992) ont démontré qu'en présence d'un agent chélateur, soit l'EDTA, il était possible d'inhiber fortement la croissance de *Escherichia coli* et de diverses espèces de *Salmonella*. Une autre étude permettant l'inhibition de *Escherichia coli* par la nisine a été effectuée par Cerrutti *et al.* (2001), mais cette fois en utilisant le pH et l'activité de l'eau comme traitements de perméabilisation de la membrane de lipopolysaccharides. En vérité, un effet synergique a été observé entre l'activité de l'eau à 0.97, un pH de 5.5 et une concentration de nisine de 1000 UI ml⁻¹ ce qui a permis d'obtenir une réduction de 4 à 5 log₁₀ UFC. Une autre étude ayant permis l'inhibition des bactéries Gram négatives (*Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*) a été réalisée par Gill et Holley (2000). En effet, ils ont utilisé du lysozyme et de l'EDTA afin de permettre à la nisine de détruire les bactéries pathogènes dans des échantillons de jambon et de bologne. Finalement, Boziaris et Adams (2001) ont utilisé un stress thermique afin de perméabiliser la membrane des bactéries Gram - (*Salmonella Enteritidis* et *Pseudomonas aeruginosa*). Ils ont conclu qu'une forte température a permis d'endommager temporairement la couche externe ce qui ouvre la voie à l'entrée de la nisine. Par contre, lorsque la température revient normale, la membrane retrouve sa conformation et empêche la nisine de perforer la membrane interne. Le tableau 3 trace un résumé des études récentes dans lesquelles différents aliments étaient soumis à des doses de nisine afin de lutter contre la prolifération de germes pathogènes ou responsable de la détérioration des aliments. Le traitement et la concentration sont présentés de même

que les bactéries antagonistes, les effets obtenus et le type d'aliments ou de milieu dans lequel l'étude a été réalisée.

Tableau 3 : Effets antimicrobiens de la nisine seule ou utilisée en combinaison avec d'autres traitements.

Sous-produit des BAL	[nisine]	Bactérie antagoniste	Effets	aliments	référence
Nisine	100 UI ml ⁻¹	<i>Lactobacillus</i> sp.	Retarde croissance BAL 1 à 3 jrs	Kimchi	Choi et Park, 2000
Nisine A + champs électriques pulsés	1000 UI ml ⁻¹ (7.15µM) + 3 pulsations 11.25 kV cm ⁻¹	<i>E. coli</i>	↓ 4 log	Lait ultrafiltré	Terebiznik et al., 2000
Nisine, Nacitrate, Nalactate	Nisine 500 UI g ⁻¹ 1.5% SL 1.5% SC	Flore aérobie, <i>Staphylococcus</i> , <i>Salmonella</i>	En combinaison avec ac. organiques = forte ↓ flore aérobie Légère ↓ <i>Staphylococcus</i> et <i>salmonella</i>	Saucisse porc	Scanell et al., 1997
Nisine + Carvacrol	Nisine 5.3 µg ml ⁻¹ Carvacrol: 1.3 mM	1) <i>L. monocytogenes</i> 2) <i>B. cereus</i>	1) ↓ 3 log en 25 min en synergie 2) ↓ 3.5 log en 25 min en synergie	Tampon HEPES pH 7	Pol et Smid, 1999
Nisine	0 à 100 U ml ⁻¹	<i>L. monocytogenes</i> scott A	50 U ml ⁻¹ : ↓ 5 log; % de gras ↑ résistance	BHI, lait écrémé	Jung et al., 1992
Vaporisation de nisine	5000 AU ml ⁻¹	A) <i>B. thermosphacta</i> B) <i>L. innocua</i> C) <i>C. divergens</i>	MIC A: 5 AU ml ⁻¹ MIC B: 5000 AU ml ⁻¹ MIC C: 5000 AU ml ⁻¹ ↓ 1.97 log à 3.60 log après 1 jour	Carcasse boeuf	Cutter et Siragusa, 1994
Nisine + (Fibrimex)	10 µg ml ⁻¹	<i>B. thermosphacta</i>	Inhibition totale durant 7 jrs de conservation aérobie et 2.4 log ↓ suite à conservation de 14 jrs sous-vide	Carcasse boeuf maigre	Cutter and Siragusa, 1998
Nisine	10 ⁴ UI ml ⁻¹	A) <i>S. aureus</i> B) <i>L. monocytogenes</i>	A) ↓ 1 log après 4 sem B) ↓ 1.5 log après 4 sem	Muscle boeuf maigre	Chung et al., 1989
Nisine + chaleur	25 mg kg ⁻¹ + 60°C 65°	<i>L. monocytogenes</i>	↓ 3 à 5 log tandis que la nisine seule ↓ de 1 à 3 log	Conserves de homard froid	Budu- Amoako et al., 1999
Nisine + PLA +LA	Nisine 200 UIml ⁻¹ PLA: 2% LA 2%	sp. dans la viande	↓ de 0.68 log à 2.59 log selon l'espèce	Haut ronde de boeuf sous-vide	Ariyapitipun et al., 1999

Sous-produit des BAL	[nisine]	Bactérie antagoniste	Effets	aliments	référence
Nisine + pression	Nisine : 12.5 ppm à 200 ppm Pression : 350-450 MPa	Mésophiles Psychrotrophes	↓ de 3.44 – 5.38 log mésophiles ↓ jusqu'à 7.5 log psychrophiles durée de vie de 30 jrs froid	Viande de poulet recouverte mécaniquement (MRPM)	Yuste <i>et al.</i> , 1998
Nisine + acide sorbique + monolaurin	Nisine :500 UI g ⁻¹ AS: 0.125% Lauricidin: 0.5% Lauribic:0.25%	<i>B. licheniformis</i>	Chaque composé prévient le pérississement durant 10 jrs	Viande cuite	Bell et De Lacy, 1987
Nisine + agents chélateurs	Nisine:50 µg ml ⁻¹ chélateurs: 0.20 mM	<i>E. coli</i> <i>S. infantis</i> <i>S. choleraesuis</i> <i>S. flexneri</i> <i>E. aerogenes</i>	EDTA est le meilleur : ↓6.6 log ↓5.3 log ↓6.6 log ↓6.7 log ↓5.4 log	Tampon: 50 mM tris-HCl, pH 7.2 + 1 mM MgSO ₄ + 4 mM CaCl ₂ + 0.1 M NaCl 0.1 gelatin 37°C; 60 min	Stevens <i>et al.</i> , 1992
Nisine Pediocin AcH + stress (chaleur, froid ou acide)	4000 UA ml ⁻¹	<i>A. hydrophila</i> <i>S. typhimurium</i> <i>Y. enterocoliti</i> <i>E.coli</i> <i>Ps. Putida</i>	↓ jusqu'à la non détection selon le traitement	Bouillon TSY	Kalchayanand <i>et al.</i> , 1992
surmageant	10 mg ds 150 g Kimchi	<i>L. monocytogenes</i> Scott A	Bactériostatique durant 16 jrs	Kimchi	Choi et Beuchat, 1994

4.4.2.1. Les bactériocines

Les bactériocines forment un groupe hétérogène défini comme des peptides antimicrobiens, produits par certaines espèces bactériennes (dont les bactéries lactiques), qui inhibent les bactéries compétitrices (Abee *et al.*, 1995; de Vos *et al.*, 1995; Nettles et Barefoot, 1993). À l'exception de quelques unes dont la microcin B17 et la colicine V qui sont produites par des entérobactéries, la plupart des bactériocines sont produites par des bactéries gram positive (de Vos *et al.*, 1995). Elles sont habituellement riches en résidus cystéine en plus d'être hydrophobes (de Vos *et al.*, 1995). Le spectre d'inhibition de la plupart des bactériocines est habituellement assez étroit, ne s'attaquant qu'aux espèces apparentées et Gram + (Abee *et al.*, 1995; de Vos *et al.*, 1995). Généralement stables à la chaleur, ne provoquant pas de réactions allergiques, elles sont rapidement dégradées par les enzymes protéolytiques dans le tractus intestinal humain.

Les bactériocines se divisent en 4 grandes classes (Abee *et al.*, 1995). Voici un résumé de ces classes avec quelques exemples de bactériocines :

(I) lantibiotiques (classe de bactériocines comportant des acides aminés déshydratés)

- carnocin UI49
- epidermin
- lacticin 481
- lactocin S
- nisine
- Subtilin

(II) les petits peptides stables à la chaleur dont le mécanisme d'action se situe sur les membranes bactériennes et qui forment des hélices amphiphiliques ou des feuilletts beta; absence de résidus d'acide aminé déhydro ou de ponts lanthionine.

(IIa) peptides actifs contre *Listeria* possédant une séquence consensus sur l'extrémité N-terminale (-Tyr-Gly-Asn-Gly-Val-)

- Pediocin PA-1 (ou AcH)
- Sakacin A et P, 674
- Lactocin A, B, G et M
- Curvacin A
- Lactacin F
- Leucocin A
- Carnobacteriocin A, BM1 et B2 (Allison *et al.*, 1995)

(IIb) Complexes formant des pores par des oligomères provenant de deux peptides différents :

- Brochocin-C (Gao *et al.*, 1999)

(III) les grosses protéines sensibles à la chaleur :

- Acidophilucin A (Zamfir *et al.*, 1999)

(IV) les protéines complexes dont l'activité demande une association avec des hydrates de carbone ou des résidus lipidiques :

- Lactacin B (Zamfir *et al.*, 1999)

Les bactériocines ont au moins un point en commun: elles sont synthétisées par les ribosomes et possèdent une extension N-terminale non conforme à la séquence signal consensus *sec*-dépendante, mais faisant plutôt appel aux transporteurs ABC (de Vos *et al.*, 1995). Une propriété importante permettant de différencier les bactériocines est leur degré de modification intramoléculaire post-traductionnelle qui va au-delà des ponts disulfures rencontrés habituellement. Par exemple, les lantibiotiques forment une classe inhabituelle de peptides biologiquement actifs puisqu'ils contiennent des acides aminés déshydratés et des résidus lanthionines qui forment des anneaux thioéther intramoléculaire (de Vos *et al.*, 1995). Ces ponts "monosulfides" déterminent les caractéristiques des structures polycycliques des lantibiotiques et leur position intra

chaîne fut utilisée afin de regrouper ces peptides antimicrobiens en lantibiotiques linéaire (groupe A) et circulaire (groupe B).

4.4.2.1.1. La nisine

La nisine, une bactériocine produite par *Lactococcus lactis ssp. lactis*, a reçu l'approbation GRAS (generally recognized as safe) par la FDA et peut être utilisée comme préservatif antibotulisme dans les fromages pasteurisés (Chung *et al.*, 1989 ; Siragusa *et al.*, 1999) ainsi que dans les ingrédients à base d'œuf liquide (Siragusa *et al.*, 1999). Par contre, dans les autres régions du monde, l'utilisation de la nisine est beaucoup plus répandue comme préservatif alimentaire, par exemple dans les sauces et vinaigrettes pour salade (Modi *et al.*, 2000) ou encore dans les boîtes de conserve (Choi *et al.*, 2000). De plus, la nisine est stable à la température du réfrigérateur ce qui constitue un avantage supplémentaire pour son utilisation dans la préservation des viandes (Cutter et Siragusa, 1998). Par contre, il semble que la nisine soit relativement insoluble et instable lorsque le pH est supérieur à 5, ce qui limite son utilisation comme préservatif alimentaire (Pol et Smid, 1999 ; Scanell *et al.*, 1997). D'autres études démontrent la grande influence du pH sur la stabilité de la nisine. Par exemple, Liu et Hansen (1990) démontrent que la nisine est si stable à un pH de 2 que les auteurs ont pu l'autoclaver sans la dénaturer, mais à un pH supérieur à 4, la nisine était désactivée. Certaines grosses protéines protègent la nisine diminuant ainsi l'influence des facteurs extrinsèques sur la stabilité de la bactériocine (Delves-Broughton, 1990). Un autre désavantage est le fait que *Lactococcus lactis* est une bactérie mésophile, ce qui empêche la production *in situ* de nisine lorsque la viande est conservée aux températures de réfrigération (Scanell *et al.*, 1997). La nisine serait aussi inactivée par de faibles quantités de glutathion retrouvé dans le bœuf haché cru (Rose *et al.*, 1999).

L'encapsulation des bactéries lactiques ou l'immobilisation de la nisine pourrait fournir un microenvironnement qui protégerait la nisine du milieu externe défavorable.

La nisine fait partie de la classe des lantibiotiques. Découverte il y a plus de cinquante ans, la nisine est composée de 34 acides aminés et possède une masse moléculaire de 3510 Da (Abee *et al.*, 1995; Delves-Broughton, 1990; de Vos *et al.*, 1995; Liu et Hansen, 1990; Moll *et al.*, 1997). Cinq anneaux intramoléculaires sont retrouvés dans sa conformation: les trois premiers sont dans le domaine N-terminal du polypeptide (a.a. 3 à 19) tandis que les deux derniers anneaux sont dans le domaine C-terminal (a.a. 22 à 29). Ses deux domaines sont amphipatiques (Moll *et al.*, 1997).

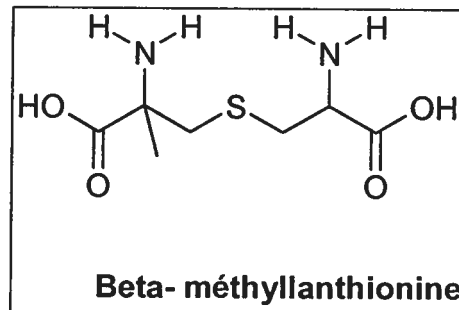
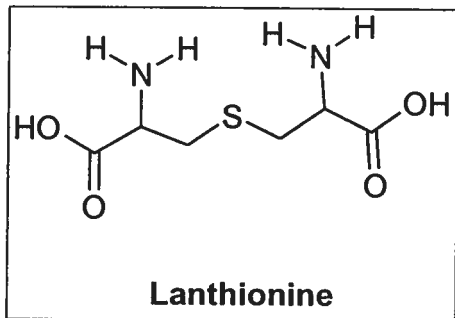
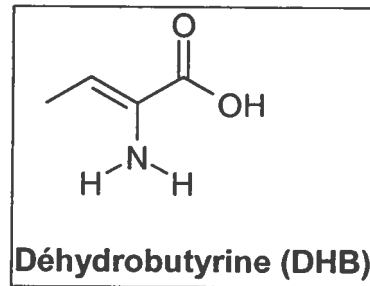
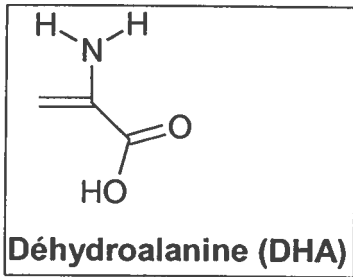
Séquence leader

pré-nisine

NisA MSTKDFNLDLVS---VSKKDSG-ASPR ITSISLCTPGCKTGALMGCNMKTATC**H**CSIHVSK

NisZ MSTKDFNLDLVS---VSKKDSG-ASPR ITSISLCTPGCKTGALMGCNMKTATC**N**CSIHVSK

La particularité des lantibiotiques est qu'ils contiennent des acides aminés spéciaux introduits suite aux modifications post-traductionnelles de la pré-nisine. En fait, il semble que 13 des 34 acides aminés subissent des changements lors de ces modifications. Les sérines, thréonines et cystéines sont modifiées résultant en la formation de la déhydroalanine (DHA), la déhydrobutyrine (DHB) ainsi que la lanthionine et la β -méthyllanthionine (Abee *et al.*, 1995; Liu et Hansen, 1990). Ces résidus particuliers sont retrouvés chez un groupe hétéroclite de bactéries et leur conservation dans le temps démontrent qu'elles proviendraient donc toutes d'un ancêtre commun. L'homologie des séquences confirme aussi cette hypothèse (Liu et Hansen, 1990).



À ce jour, il existe deux variants naturels de la nisine: la nisine A et la nisine Z (ce dernier fut isolé pour la première fois de *L. lactis* subsp. *lactis* NIZO 22186, mais il est maintenant retrouvé chez plusieurs souches). Les variants diffèrent à l'acide aminé 27 (histidine pour la nisine A et asparagine pour la nisine Z) et leurs gènes de structure respectifs, *nisA* et *nisZ*, furent caractérisés (Abee *et al.*, 1994; De Vos *et al.*, 1993). Le gène code pour un peptide d'une longueur de 57 acides aminés appelé pré-nisine. Celui-ci contient la partie N-terminale "leader" de 23 acides aminés (qui est absente de la nisine mature) et le résidu C-terminal formé de 34 acides aminés nommé pro-nisine. Plusieurs études semblent démontrer que la séquence leader ne subit pas de transformations suite à la traduction, à l'exception de l'enlèvement occasionnel de la méthionine N-terminale. Il semblerait donc que la séquence leader aurait un rôle à jouer dans les modifications post-traductionnelles de la pro-nisine. Ces séquences leader hydrophiles, hautement chargées contiennent souvent un résidu chargé à la suite de la méthionine de départ. Au contraire de la pro-région, la séquence leader est dénuée de cystéine. Ces séquences sont encore séparées en deux classes soit AI et AII. La séquence leader de la nisine fait partie de la première catégorie. La sérine, en position 6, est un acide aminé conservé qui est essentiel au bon fonctionnement de la modification et de la sécrétion de la nisine mature. Le

clivage de la séquence leader de la nisine est catalysé par une sérine protéase extracellulaire dans la dernière étape de la biosynthèse de la nisine. De plus, des expériences de mutagenèse dirigée démontrent que l'acide aminé (chargé positivement) en position -1 ainsi qu'un petit résidu hydrophobe en -4 sont essentiels pour le bon clivage de la séquence leader.

L'analyse chromosomique indique clairement que la production de la nisine, l'immunité à celle-ci et la capacité de fermenter le sucrose sont situés sur un élément génétique instable identifié comme étant un transposon (70 kb) dans la souche bactérienne *L. lactis* NIZO R5. Voici un schéma de l'organisation de l'opéron polycistronique (Abee *et al.*, 1995; de Vos *et al.*, 1995; Engelke *et al.*, 1994):



- A: gène de structure
- B, C: enzymes modifiantes
- T: exportation
- I: immunité
- P: peptidase leader
- R, K: régulation de l'opéron
- F, E et G: accessoire d'auto-protection

Les gènes *nisABTCIPR* sont essentiels pour la production de la nisine. Les gènes *nisBC* sont apparemment impliqués dans la modification de la nisine. Des études de mutations suggèrent que les gènes *nisBC* seraient essentiels pour la production d'un antibiotique fonctionnel et pourraient être impliqués dans la déshydratation et la formation du lien thioéther.

Le gène *nisT* code pour une protéine très semblable aux exporteurs ABC. Contenant 600 résidus protéiques et montrant une forte homologie pour les exporteurs ABC, ces deux groupes ont en commun un motif de liaison de l'ATP dans la moitié C-terminale et le domaine d'enjambement de la membrane dans l'autre moitié, suggérant que l'hydrolyse de l'ATP comme source d'énergie est nécessaire pour la sécrétion de la nisine. *NisI*, 245 acides aminés, code pour une lipoprotéine probablement ancrée dans la membrane avec l'extrémité C-terminale du côté externe de la cellule et qui est impliquée dans l'immunité à la nisine. *NisP* code pour une sérine protéase impliquée dans le traitement de la séquence leader. Il contient une séquence signal N-terminale et une ancre membranaire en C-terminal suggérant la sécrétion de séquence leader suivi de son ancrage à la membrane cellulaire. Les gènes *nisRK* codent pour un système régulateur à deux composantes formé d'une histidine kinase et d'un régulateur de réponse. La cible la plus probable du régulateur de réponse est le promoteur du gène de structure et la production de nisine serait régulée par la nisine elle-même. Finalement, des mutations dans les gènes *nisFEG* montrent une augmentation de la sensibilité de la bactérie à de la nisine exogène, indiquant un rôle dans l'auto immunité contre la nisine.

Suite à cette description exhaustive des divers gènes qui contrôlent la formation de la nisine activée, voici un bref résumé de la voie de maturation de ce polypeptide tel que proposée par de Vos *et al.* (1995). Au tout début, le signal inducteur active le promoteur *nisA* (étape 1). Suite à cette activation, il y a donc traduction de la pré-nisine qui adopte une conformation en hélice- α (étape 2). Par la suite, la pré-nisine est dirigée, hypothétiquement par un peptide leader, sur un complexe membranaire d'enzymes modifiantes : *nisB* qui est possiblement impliquée dans la déshydratation et *nisC* qui formerait un lien thioether (étape 3). À ce niveau, le leader maintiendrait le polypeptide dans une forme inactive. Ensuite, la pré-nisine est amenée par l'exporteur ABC *nisT* suite à l'hydrolyse d'ATP (étape 4). Au cours de la dernière étape, la pré-nisine devient active suite au clivage protéolytique réalisé par la protéase extracellulaire *nisP* (étape 5). La destinée de la séquence leader reste un mystère, mais il est possible de croire qu'elle peut être simplement dégradée ou qu'elle servirait pour une autre fonction.

Spectre d'activité de la nisine

La nisine possède un spectre d'inhibition bactérien très large, mais seulement contre des bactéries gram positive (Pol et Smid, 1999; Rada et Dlabal, 1998). Elle est caractérisée par un fort pouvoir bactéricide contre plusieurs espèces : *Bacillus aureus*, *Bifidobacterium sp.*, *Brochothrix thermosphacta*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium divergens*, *Corynebacterium sp.*, *Enterobacter*, plusieurs espèces de lactobacilles (*L. helveticus*, *L. acidophilus*, *L. casei.*, etc), *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Listeria innocua*, *Listeria monocytogenes*, *Micrococcus*, *Pediococcus*, *Staphylococcus aureus* et même des actinomycètes (De Vos *et al.*, 1993; Rada et Dlabal, 1998). Dans une étude réalisée en 1994, Cutter et Siragusa ont déterminé la concentration minimale inhibitrice (CMI) de la nisine sur quelques bactéries retrouvées sur des carcasses de bœuf. Seulement 5 UA/ml permettait d'inhiber la croissance de *Brochothrix thermosphacta* tandis qu'il a fallu 5000 UA/ml pour venir à bout de *Listeria innocua* et de *Clostridium divergens*. Rada et Dlabal (1998) ont réalisé une étude qui visait à déterminer les CMI de la nisine sur plusieurs souches de bifidobactéries. Les résultats, qui variaient énormément selon la souche à l'étude, indiquent des doses allant de 4.88 UI/ml jusqu'à 10 000 UI/ml. La CMI de la nisine contre *Listeria monocytogenes* est de 10 µg/ml (autant à 20°C qu'à 8°C) tandis qu'elle est de 10 µg/ml contre *Bacillus cereus* à 20°C et de 5 µg/ml à 8°C (Pol et Smid, 1999).

Malgré toutes les expériences démontrant que seules les bactéries Gram positives soient affectées par la nisine, Chihib *et al.* (1999) ont pu démontrer qu'en présence de plus 500 UI/ml, une augmentation du temps de latence ainsi qu'une diminution du taux de croissance de *Pectinus frisingensis* étaient observées.

Il n'y a pas de différences entre les spectres d'inhibitions de la nisine A ou Z, les mêmes espèces bactériennes étant inhibées par les deux variantes. Par contre, la nisine Z provoque une plus grande zone d'inhibition lors de bio essais de diffusion sur agar. Ceci serait causé par une plus grande solubilité de la molécule (DeVos *et al.*, 1993).

Mode d'action de la nisine

Dans les cellules végétatives, la cible première de la nisine est la membrane cytoplasmique (Pol et Smid, 1999), plus précisément les phospholipides anioniques de cette membrane (Moll *et al.*, 1997). Celle-ci est perméabilisée par la formation de pores résultant en un relâchement rapide des petites molécules. La formation de pores, qui affecte principalement le gradient de pH (ΔpH) et le potentiel électrique membranaire ($\Delta\psi$) (Bruno *et al.*, 1992; Moll *et al.*, 1997), provoquera aussi une perturbation de la membrane et une réorientation des molécules pH-dépendantes. L'efflux des constituants cellulaires (ions, acides aminés et ATP) cause un effondrement de la force protomotrice (Bruno *et al.*, 1992; Chihib *et al.*, 1999; de Vos *et al.*, 1995; Moll *et al.*, 1997; Pol et Smid, 1999). La nisine forme aussi des pores dans les liposomes et les protéoliposomes (Moll *et al.*, 1997).

La membrane cellulaire des bactéries Gram négative est aussi sensible à la nisine, mais elle est très bien protégée par la couche de lipopolysaccharides (LPS) (Scanell *et al.*, 1997). En effet, les ions divalents comme Mg^{2+} sont importants parce qu'ils forment des ponts cationiques entre les phosphates des LPS (Chihib *et al.*, 1999) et aussi parce qu'ils permettent de diminuer les répulsions électrostatiques ce qui permet d'éloigner les molécules hydrophiles, hydrophobes et amphiphiliques (Nettles et Barefoot, 1993). Par contre, plusieurs études démontrent que l'ajout d'agents chélateurs (EDTA; 0.1-20 mM) ou même un traitement préalable ou simultané avec des champs électriques pulsés (Terebiznik *et al.*, 2000) permet l'entrée de différents antibiotiques dans les bactéries Gram négatives, habituellement imperméables à ces produits (Stevens *et al.*, 1992). Il semble que ces agents chélatent les ions magnésium et calcium présents dans la membrane de LPS, ce qui contribue à sa déstabilisation et en une augmentation de la perméabilité membranaire.

Selon Liu et Hansen (1990), les résidus DHA et DHB auraient un grand rôle à jouer dans le pouvoir antibiotique de la nisine et des lantibiotiques en général. En effet, il est démontré que la nisine cause une modification dans les groupements sulfhydryques sur

les enveloppes des spores ce qui suit la logique des accepteurs de Michael envers ces mêmes groupes sulfhydriques.

4.4.2.2. Facteurs qui affectent l'action des bactériocines

4.4.2.2.1. Facteurs intrinsèques de la nourriture

Le potentiel d'action des bactériocines est influencé par de nombreuses caractéristiques de la nourriture elle-même. Le pH, la concentration cellulaire, le contenu en lipides, les enzymes protéolytiques et le système liquide contre solide sont des facteurs qui peuvent faire fortement varier l'efficacité des bactériocines. Les ions libres présents dans la nourriture peuvent aussi modifier la charge globale des bactériocines ou des phospholipides membranaires, empêchant ainsi les interactions électrostatiques entre les protagonistes inhibant l'adhésion des bactériocines sur la membrane (Abee *et al.*, 1995).

Plusieurs études démontrent que l'activité de la nisine est diminuée dans les aliments contenant du gras ou des agents émulsifiants (Abee *et al.*, 1995; Champagne *et al.*, 1994) . Par contre, le contraire se produit dans une étude réalisée par Jung *et al.* (1992). En effet, ce dernier dénote une augmentation de l'activité de la nisine dans du lait en présence d'acyle de glycérol. Les auteurs de cette étude démontrent donc que l'effet inhibiteur du gras peut être contourné en présence de Tween-80 ; l'activité de la nisine s'en trouve ainsi augmentée dans le lait.

4.4.2.2.2. Température

La température démontre une très grande influence quant à l'efficacité de la nisine contre *L. monocytogenes*. Lorsque la température est basse, la fluidité membranaire diminue, ce qui peut diminuer les interactions bactériocines-membranes. Par contre, les bactéries bien adaptées au froid conservent leur fluidité membranaire et par conséquent leur sensibilité face aux bactériocines (Abee *et al.*, 1995). De plus, il existe un effet synergique entre la nisine et la chaleur. En effet, la nisine diminue les valeurs D- et Z- ce

qui permet de fournir moins de chauffage et ainsi préserver l'intégrité des aliments (Modi *et al.*, 2000). Une autre étude, cette fois menée sur le homard en conserve, démontre une fois de plus la synergie existant entre le chauffage et la nisine. Ces chercheurs concluent en une économie de plusieurs millions de dollars pour l'industrie de la pêche simplement en diminuant le chauffage requis pour éliminer *L. monocytogenes*, grâce à l'ajout de nisine dans les boîtes de conserve (Budu-Amoako *et al.*, 1999).

4.4.2.2.3. pH

Le pH du milieu de culture dans lequel baigne la nisine est un facteur affectant l'efficacité de la nisine car la solubilité et la stabilité sont deux éléments importants dépendant du pH (Huot *et al.*, 1996). Par contre, chaque bactériocine réagit différemment aux variations de pH. Par exemple, dans l'expérience de Huot *et al.* (1996), il est démontré que la nisine perd 23% de son activité à un pH de 6.4 tandis qu'aucune perte d'activité n'est observée en ce qui concerne la bactériocine J46. Généralement, les bactériocines sont plus efficaces dans des milieux acides (Champagne *et al.*, 1994).

4.4.2.2.4. Résistance aux bactériocines

Certaines bactéries (*Bacillus* sp.) synthétisent la nisinase, une enzyme qui inactive la nisine. Un autre mécanisme implique l'adaptation des cellules à de fortes concentrations de bactériocines. Des changements seraient survenus dans l'intégrité membranaire des souches résistantes, c'est-à-dire qu'elles seraient désormais composées d'un plus fort pourcentage de chaînes d'acides gras et d'un plus faible pourcentage d'acide gras ramifiés ce qui cause une diminution de la fluidité membranaire et donc une diminution de l'efficacité de formation de pores membranaires par la bactériocine (Abee *et al.*, 1995).

5. Encapsulation des BAL

Vers la fin des années 70, une nouvelle technologie pleine de promesses fit une incursion dans la filière lait: l'encapsulation. Prévost *et al.* (1985) importèrent cette technologie amplement utilisée dans l'industrie pharmaceutique et tentèrent d'encapsuler *Lactobacillus bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus* (souches industrielles servant à la fabrication de yogourt) dans des billes d'alginate afin d'augmenter la performance de la fermentation en continu ainsi que le procédé d'inoculation dans la production de yoghurt. Quelques années plus tard, Prévost et Diviès (1988) optimisèrent leur procédé et conclurent en une diminution du temps d'incubation et une économie en espace de réservoir. Cette technologie permet d'obtenir des cultures en continu stables malgré le fait qu'elles aient des taux de croissance différents. Les mêmes auteurs (Prévost et Diviès, 1987) ont utilisé l'encapsulation des bactéries lactiques pour contrôler les qualités organoleptiques du fromage avec succès.

Un autre avantage de l'encapsulation des bactéries lactiques est la protection des cultures bactériennes contre leurs phages. En effet, Steenson *et al.* (1987) et Champagne *et al.* (1992a) démontrèrent l'inefficacité des bactériophages à diminuer le taux d'acidification du lait lorsque des bactéries lactiques sont encapsulées dans des bille d'alginate.

Par la suite, l'encapsulation des bactéries lactiques fut de en plus étudiée et en 1990, Kearney *et al.* ont réalisé une étude sur l'encapsulation des bactéries lactiques dans la fermentation des viandes. Ils conclurent en une amélioration du taux d'acidification de 29%. Ceci est expliqué par le fait que lors de la réhydratation des bactéries lactiques encapsulées, celles-ci sont dans un environnement contrôlé favorable riche en nutriments (par exemple, le lait écrémé).

Tout récemment, Champagne *et al.* (2000) ont encapsulé des BAL lyophilisées afin d'augmenter le taux d'acidification. De plus, l'équipe de Scannell (2000) ont démontré que les bactéries lactiques, lors d'une fermentation en continu, produisaient

beaucoup plus de bactériocines que les mêmes bactéries libres. En effet, la production de nisine et de lacticin par les bactéries encapsulées reste stable jusqu'à la fin de l'expérience tandis que le rendement des bactéries libres chute drastiquement après 80 heures.

Les bactéries encapsulées envahissent maintenant le monde alimentaire. Autant la bière (Masschelein *et al.*, 1994), le vin (Diviès *et al.*, 1994), la production d'éthanol et autres métabolites microbiens (Scannell *et al.*, 2000) utilisent maintenant la technologie des cultures encapsulées. L'encapsulation présentent de nombreux avantages (McLoughlin et Champagne, 1994; Champagne *et al.*, 1994):

- Utilisation continue d'une même souche de départ
- Stabilité des caractères plasmidiques
- Prévention de l'inactivation interfaciale
- Stimulation de la production et de l'excrétion des métabolites secondaires
- Protection des cultures contre un environnement agité
- Augmentation de la vitesse de fermentation
- Fortes concentrations microbiennes constantes
- Protection des cultures contre leurs bactériophages
- Stabilité des cultures de départ
- Protection des bactéries lactiques contre l'oxygène
- Facilité pour récupérer les bactéries lactiques

De multiples méthodes d'encapsulation furent développées durant les vingt dernières années. L'encapsulation de nombreux types cellulaires, d'origines animale et végétale, de bactéries, de levures et de moisissures, fut réalisée pour tenter de combler toute sorte de besoins : fermentation accrue, protection des bactériophages, stabilité cellulaire et plasmidique. Dans l'industrie alimentaire, l'encapsulation d'arômes, d'enzymes, de pigments, d'antioxydants et d'agents antimicrobiens est aussi souvent rencontrée (Groboillot *et al.*, 1994; McLoughlin et Champagne, 1994).

L'adhésion de surface ou l'encapsulation sont couramment utilisées comme moyens pour immobiliser les cellules. L'adhésion fait appel aux interactions ioniques ou covalentes entre les cellules et la matrice d'attache. L'adhésion entre deux cellules peut se faire naturellement ou en présence d'agents chimiques. Cette technique est très peu dispendieuse mais son efficacité est faible parce que le relâchement est souvent observé. L'encapsulation emprisonne les cellules dans une matrice protectrice, réduisant ainsi le relâchement cellulaire. Par contre, cette méthode diminue aussi le transfert des masses. Un très gros avantage de l'immobilisation cellulaire est l'augmentation de la productivité par des opérations continues ou la réutilisation des cellules (Groboillot *et al.*, 1994). Prévost et Divies (1987) ont démontré les principes d'une souche de départ encapsulée dans des billes d'alginate de calcium et une réduction de 50% du temps de fermentation pour faire du fromage. Kearney *et al.* (1990a) ont démontré que l'encapsulation de bactéries dans des billes d'alginate de calcium pouvait servir à les protéger lors du procédé de lyophilisation. Au cours d'une autre étude, Kearney *et al.* (1990b) ont cette fois démontré que l'encapsulation de *Lactobacillus plantarum* permettait de fermenter plus rapidement la viande que les bactéries libres. Par la suite, Yoo *et al.* (1996) ont encapsulé *Lactobacillus casei* dans des billes d'alginate de calcium afin d'obtenir une production maximale d'acide lactique. Malheureusement, la matrice était instable. Ces auteurs ont dû remplacer le calcium par du baryum et du chitosane afin d'obtenir des billes stables. Champagne *et al.* (2000) ont encapsulé *Streptococcus thermophilus* dans des billes d'alginate de calcium. Ils ont remarqué un taux d'acidification du lait plus élevé, un pH final plus acide et une diminution du temps auquel le taux d'acidification était le plus fort. Adhikari *et al.* (2000) ont étudié la viabilité des bifidobactéries encapsulés avec du carrageenan dans du yogourt. Lorsque *Bifidobacterium longum* B6 n'était pas encapsulé, une mortalité de 78% était observée. Par contre, l'encapsulation a permis de préserver la totalité des bactéries. Sheu et Marshall (1993) ont piégé des BAL à l'intérieur de microbilles d'alginate de calcium afin d'en conserver la viabilité durant l'entreposage de lait glacé. Ils ont démontré que les lactobacilles survivaient mieux dans des billes que les BAL libres. Selmer-Olsen *et al.* (1999) ont démontré l'effet protecteur de billes d'alginate de calcium comme cryoprotectant lors de la lyophilisation. Larisch *et al.* (1994) ont encapsulé des lactocoques dans des billes d'alginate et poly-L-lysine. Les

résultats ont montré une augmentation de 17% du temps d'acidification lorsque les BAL sont encapsulées. Groboillot *et al.* (1993) ont aussi encapsulé des lactocoques, mais, cette fois, dans des billes de chitosane réticulé. La perte d'activité d'acidification due à l'encapsulation peut être compensée par une succession de fermentation avec les mêmes billes. Le tableau 4 présente un résumé de diverses matrices d'encapsulation de cellules vivantes ainsi que le produit final sécrété par ces cellules.

Tableau 4 : Exemples d'utilisations de l'immobilisation des bactéries lactiques dans l'industrie

Souches	Matrice d'immobilisation	Produit final	Références
<i>Lactobacillus</i> sp.	Gel de silice	L-lactate	Groboillot <i>et al.</i> , 1994
<i>B. longum</i>	Gomme gellan	L-acide lactique	Groboillot <i>et al.</i> , 1994
Bifidobactéries	Membranes de cellulose acetate phtalate	Cellules	Groboillot <i>et al.</i> , 1994
<i>L. casei</i>	Carrageenan et gomme de caroube	Yogourt	Lacroix <i>et al.</i> , 1990
<i>Pr. acidipropionici</i>	« Matrice spiral wound »	Acide propionique	Groboillot <i>et al.</i> , 1994
<i>St. lactis</i> <i>St. lactis</i> subsp. <i>diacetylactis</i> <i>St. cremoris</i>	Billes Ca-alginate	Production de fromage en continu	Prévost et Divies, 1987
<i>L. plantarum</i> <i>P. pentosaceus</i>	Billes Ca-alginate	Fermentation de bœuf et porc	Kearney <i>et al.</i> , 1990 (a)
<i>L. plantarum</i>	Billes Ca-alginate	Lyophilisation des souches	Kearney <i>et al.</i> , 1990 (b)
<i>L. casei</i>	Billes Ba-alginate	Production d'acide lactique	Yoo <i>et al.</i> , 1996
<i>B. longum</i>	microcapsules κ -carrageenan	Production de yogourt	Adhikari <i>et al.</i> , 2000
<i>St. thermophilus</i>	Billes Ca-alginate	Lyophilisation des souches	Champagne <i>et al.</i> , 2000
<i>L. bulgaricus</i>	Microbilles Ca-alginate	Survie des souches dans les desserts froids	Sheu et Marshall, 1993
<i>L. helveticus</i> , <i>L. delbruckii</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. casei</i>	Billes Ca-alginate	Entreposage des souches	Selmer-Olsen <i>et al.</i> , 1999
<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	Microbilles Ca-alginate enrobées membrane de poly-L-lysine	Viabilité des souches	Larisch <i>et al.</i> , 1994
<i>L. lactis cremoris</i>	Microbilles de chitosan	Fermentation de lait écrémé	Groboillot <i>et al.</i> , 1993

5.1. Méthodes d'immobilisation

La figure 1 représente schématiquement les différentes formes d'immobilisation de cellules sur des matrices. Il est ainsi possible de visualiser l'adsorption, l'adhésion, l'encapsulation et le confinement des cellules.

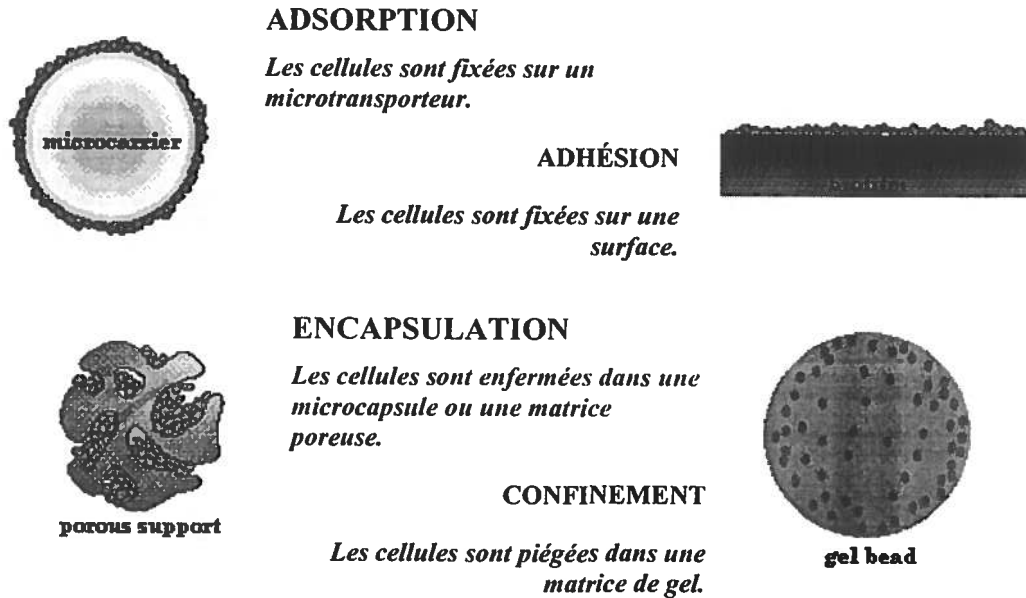


Figure 1: Visualisation de certaines méthodes d'immobilisation de cellules vivantes

L'adsorption :

Les cellules peuvent être attachées naturellement à une surface par les interactions électrostatiques (forces de Van der Waals, ioniques et par les ponts hydrogènes). Les supports peuvent être des copeaux de bois, du sable, des résines échangeuses d'ions, et du matériel organique comme la cellulose, et le charbon activé. Afin d'augmenter le pouvoir d'adhésion des supports, des matrices sont utilisées. Ce type d'immobilisation se produit directement dans le fermenteur en ajoutant le support aux cellules. C'est donc une technique simple, peu coûteuse et très douce pour les cellules mais dont les liens

d'attache sont très faibles ce qui la rend un peu moins efficace. Elle est très utilisée dans l'industrie du traitement des eaux usées (Groboillot *et al.*, 1994).

Liaisons covalentes :

Par contre si des liens covalents sont créés entre les cellules et le support, la perte cellulaire sera beaucoup moins grande et le procédé plus efficace. Des supports chimiquement modifiés sont utilisés pour avoir ce type de liens : la gélatine réticulée, les billes de chitosan réticulée et des céramiques prétraités avec polyéthylèneimine. Par contre, le risque de d'endommager les membranes des cellules, donc de réduire la viabilité cellulaire, rend cette méthode un peu moins intéressante (Groboillot *et al.*, 1994).

5.2. Techniques d'encapsulation

Le profil des capsules est décrit par de nombreux facteurs notamment : capacité de diffusion des molécules encapsulées, les caractéristiques des billes (propriétés de la matrice, homogénéité de la matrice, son diamètre, sa sphéricité) et les caractéristiques microbiennes (la densité, la morphologie et l'activité de la biomasse). Le relâchement cellulaire est influencé par : les caractéristiques du polymère utilisé, le procédé de gélification, les caractéristiques des billes, l'activité de la biomasse et le macro environnement (pH, température, enzymes, etc.) (McLoughlin et Champagne, 1994).

5.2.1. Gélification ionotropique

De nombreux polymères chargés forment des gels lorsque mis en présence d'une solution contenant des ions multivalents. Les avantages de cette technique résident en sa simplicité, le faible coût du procédé et les conditions douces qui n'affecteront pas la viabilité des cellules ou bactéries encapsulées (Poncelet *et al.*, 1999).

De nombreux polymères chargés forment des gels lorsque mis en présence d'une solution contenant des ions multivalents. Les avantages de cette technique résident en sa simplicité, le faible coût du procédé et les conditions douces qui n'affecteront pas la viabilité des cellules ou bactéries encapsulées (Poncelet *et al.*, 1999).

5.2.1.1. Alginate de calcium

L'alginate est le polymère le plus utilisé pour faire l'encapsulation de cellules. L'alginate est le sel de l'acide alginique; c'est un hétéropolysaccharide non-ramifié constitué d'unités d'acide L-guluronique et d'acide D-mannuronique provenant de diverses algues.

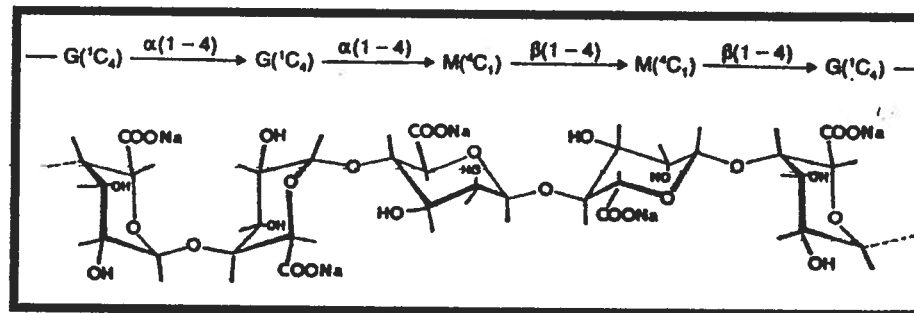


Figure 2: Alignement des blocs G et M dans une molécule d'alginate (adapté de Smidsrod et Skjak-Braek, 1990).

La composition en blocs G et M varie selon la provenance du polysaccharide. Après traitement, l'alginate de sodium est soluble dans l'eau. La gélification se produit lorsque le polyélectrolyte est mis en présence d'ions multivalents (Ca^{2+} , Al^{3+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , Ba^{2+} , Fe^{2+} ou Fe^{3+}). Ces derniers vont se lier principalement aux blocs G. Donc, plus la concentration en groupements guluroniques de l'alginate est élevée, plus le gel ainsi formé est résistant. D'autre part, la résistance du gel est aussi proportionnelle à la longueur de la séquence continue en blocs G (Poncelet *et al.*, 1999).

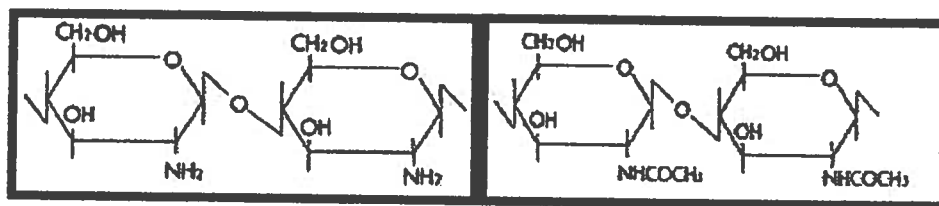
Des billes d'alginate sont formées lorsqu'une solution aqueuse d'alginate (1-4%) est versée goutte-à-goutte dans une solution de CaCl_2 (20 à 100 mM). Par contre, les billes n'auront pas une concentration homogène en alginate. En effet, cette concentration

augmente du centre des billes (1%) vers la surface (10%). De plus, des petits chemins sont formés dans la bille reliant la surface et le centre (Poncelet *et al.*, 1999). Il est possible de contrevenir à ce problème par la formation de microbilles, c'est-à-dire par la formation de billes microscopiques d'à peine quelques dizaines de micromètres de diamètre (50-200 μ m). Pour ce faire, du CaCO_3 , insoluble dans l'eau, est ajouté dans la solution d'alginate avant l'émulsion. La libération des Ca^{2+} est initiée par l'addition d'un acide soluble dans l'huile (acide acétique), ce qui réduit le pH de 7.5 à 6.5. Cette technique est appelée gélification émulsion/interne (Poncelet *et al.*, 1999). Un autre moyen de produire des microbilles est de vaporiser de l'alginate dans une solution de CaCl_2 . La vaporisation crée des microbilles d'alginate qui, lorsqu'elles entrent en contact avec le sel, gélifient immédiatement sous forme de petites gouttelettes emprisonnant alors les bactéries ou autres microorganismes qu'elles contiennent.

Cette gélification ionotropique est réversible en ajoutant les billes dans du tampon citrate (50mM) ou phosphate à pH 7.0 (Groboillot *et al.*, 1994; McLoughlin et Champagne, 1994). En fait, les billes sont sensibles à tous les agents chélateurs de calcium comme EDTA, lactate ou autres cations pouvant prendre la place de ce calcium. En remplaçant l'agent responsable de la gélification des billes (calcium) par des ions baryum ou aluminium, il est possible d'augmenter la stabilité des billes (Groboillot *et al.*, 1994; McLoughlin et Champagne, 1994; Poncelet *et al.*, 1999).

5.2.1.2. Chitosane

Le chitosane est un polysaccharide linéaire obtenu suite à la déacétylation de la chitine extraite des carapaces de crustacés marins et des insectes (Poncelet *et al.*, 1999).



CHITOSANE

CHITINE

Figure 3: Structures chimiques de la chitine et du chitosane

Le chitosane peut être dissout dans une solution acide (pH inférieur à 6). Comme c'est un poly cation avec des groupements amines, il peut être réticulé par des cations ou des poly cations (poly-phosphates, $(\text{Fe}(\text{CN})_6)^{4-}$, $(\text{Fe}(\text{CN})_6)^{3-}$). La procédure pour obtenir des billes de chitosane est similaire à celle utilisée dans la gélification de l'alginate. La culture cellulaire est introduite à une solution de chitosan-acétate (1.6-2.4% p/v) et le tout est ajouté goutte-à-goutte dans une solution de sodium-tripoly-phosphate (1.5%p/v; pH 5.5) et mélangé doucement. Finalement, le durcissement des billes s'effectue dans une solution de sodium-tripolyphosphate de pH 8.5 durant 30 minutes. L'avantage de ces billes réside dans leur stabilité en présence d'agents chélateurs. Par contre, le chitosane n'est soluble dans l'eau que sous un pH de 6.5 et démontre aussi un effet inhibiteur sur différents types de cellules, comme les BAL (Groboillot *et al.*, 1994; Poncelet *et al.*, 1999).

5.2.1.3. Pectines

La pectine est un polysaccharide issue des parois cellulaires des plantes. Formés par un polymère linéaire d'acide galacturonique liés entre eux par des liens α -1,4-glycosidiques pour devenir l'acide polygalacturonique, les groupements carboxyles de la pectine sont partiellement estérifiés avec du méthanol.

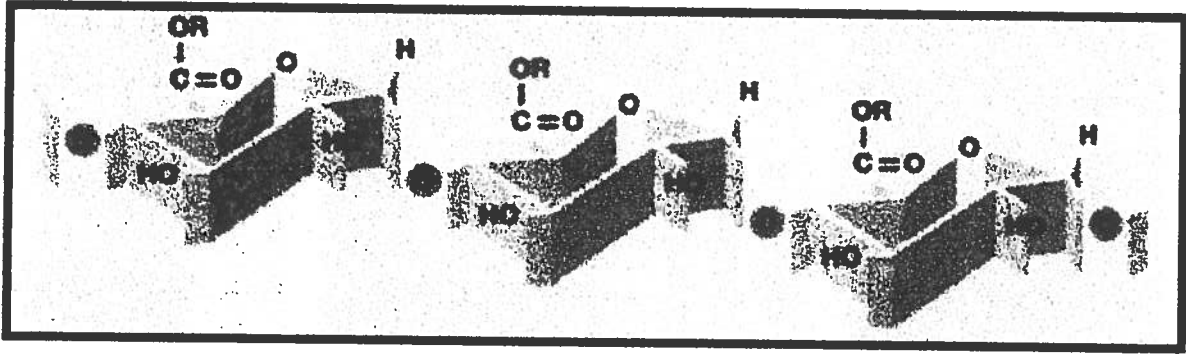


Figure 4: Structure chimique tridimensionnelle de la pectine.

La pectine forme un gel lorsqu'on la met en présence d'ions calcium ou aluminium. Comme dans le cas de l'alginate, il s'agit tout simplement de laisser tomber goutte-à-goutte la solution de pectine dans une solution riche en ions multivalents. Les billes de pectates de calcium sont beaucoup plus stables que les billes d'alginate en présence d'agents chélateurs (Poncelet *et al.*, 1999).

5.2.2. Gélification thermique

Cette technique très simple fait appel aux caractéristiques physiques de certains polysaccharides, c'est-à-dire leur état qui est soit solide soit liquide à différentes températures. Il s'agit en fait de laisser tomber une solution aqueuse d'un quelconque polymère dans de l'eau froide. Au contact de l'eau froide, celui-ci changera d'état en formant un gel qui est beaucoup moins sensible aux ions chélateurs que la gélification ionotropiques. Par contre, la nécessité de chauffer le polymère diminue son utilité pour encapsuler des cellules vivantes. De plus, cette technique ne pourrait pas être appliquée pour la fermentation mésotrophique parce que les billes seraient rapidement dissoutes dû aux hautes températures (Poncelet *et al.*, 1999).

5.2.2.1. Agar et agarose

L'agar provient des algues rouges. C'est une suite polymérisée de monomères de D-galactopyranose liés β -1,3 et de D-galactopyranose liés α -1,4. La structure du gel est

principalement donnée par les liaisons hydrogènes (Poncelet *et al.*, 1999). L'agarose est obtenue par séparation et purification de l'agar.

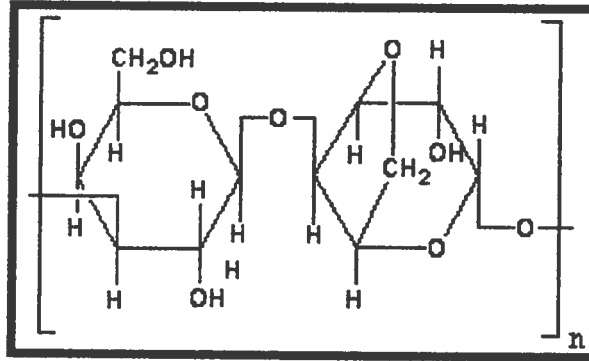


Figure 5: Structure chimique d'un monomère composant l'agar.

La gélification de l'agar est induite par une diminution de température tandis que l'immobilisation de cellules est obtenue en dissolvant 1 à 4% d'agar dans l'eau à 100°C et en refroidissant à 50°C pour permettre la survie des cellules. Le mélange est finalement refroidi à température pièce pour la gélification. Avec ce polymère, seules les cellules thermotolérantes pourront être immobilisées. Des îlots de Langherans furent immobilisés avec succès dans un gel d'agarose. Les propriétés des gels d'agar et d'agarose sont moins bonnes que l'alginate ou les carrageenans mais la méthode est fort simple. Groboillot *et al.* (1994) rapportent que ce polysaccharide fut utilisé pour encapsuler *Lactobacillus casei*.

5.2.2.2. Carraghénanes

Polysaccharide sulfaté naturel dont l'unité de base est le galactose (D-galactose liés β -1,4) (Budavari *et al.*, 1996), il est, lui aussi, extrait des algues rouges et est communément utilisé comme additif alimentaire. Le carraghénane est subdivisé en trois types soit λ , κ et τ (κ donne des gels plus résistants) (Poncelet *et al.*, 1999).

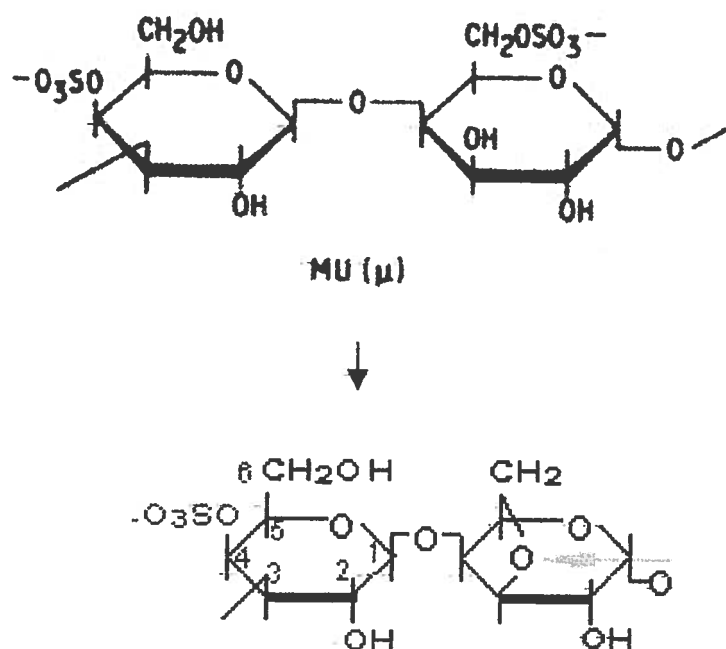


Figure 6: Transformation de la μ -carrageenan en κ -carrageenan.

Takata (1977) fut le premier à utiliser les carraghénanes pour immobiliser des cellules. De hautes températures (60 à 80°C) sont nécessaires pour dissoudre le polymère à des concentrations variant entre 2 et 5 % dans de l'eau saline (0.9% NaCl). Les cellules sont ajoutées à la solution de polymère stérile (concentration maximale = 3×10^{-2} mg poids sec ml^{-1}). La gélification s'obtient en refroidissant à la température de la pièce. Des ions potassium sont ajoutés pour augmenter la stabilité du gel.

L'utilisation d'ions monovalents tels K^+ , Rb^+ , Cs^+ et NH_4^+ permet d'augmenter la force des gels. L'ajout de gomme de caroube (2 :1), de galactomannanes ou de taragum permet d'augmenter la force des gels. Il est possible de créer des billes en laissant tomber goutte-à-goutte une suspension cellules/polymère tiède (3-4 % p/v) dans une solution de KCl (2 %).

Il est aussi possible de créer des microbilles ajoutant de l'huile végétale stérile à la suspension cellules/polymère. L'émulsion est refroidie. Les billes de gel sont récoltées dans du KCl (0.3M) et conservées durant 2 heures (Groboillot *et al.*, 1994).

5.2.2.3. Gomme gellan

La gomme gellan est un polysaccharide anionique extracellulaire et non toxique sécrété suite à une fermentation par *Pseudomonas elodea*. Il consiste en un homopolymère contenant des unités répétées de tétrasaccharides (deux β -D- glucose, un β -D- acide guluronique et un résidu α -L-rhamnose selon un ration 2:1:1).

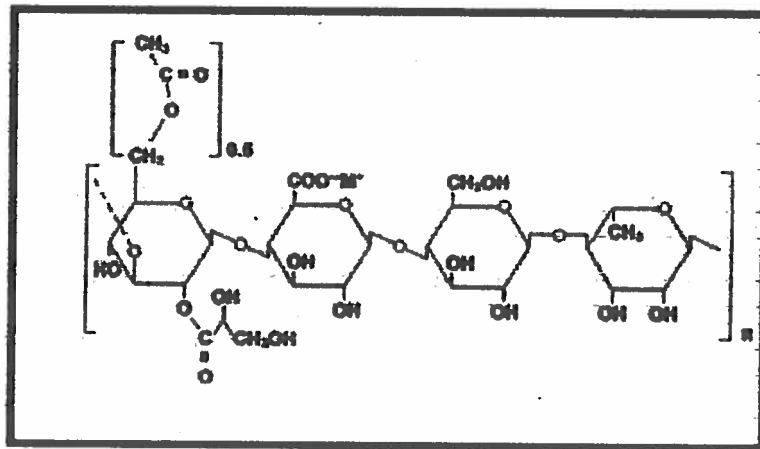


Figure 7: Structure chimique de la gomme gellan acylée.

Les résidus d'acide guluronique confèrent au polymère une charge anionique ce qui lui donne des propriétés de gélification semblables à celles de l'alginate. Une diminution de température en présence d'ions divalents provoque la gélification (35-50°C). Ce polysaccharide réticule une large variété d'ions; il est donc très difficile de prévoir les propriétés rhéologiques des gels à cause de la multitude d'ions introduit par le bouillon nutritif des cellules. De toute façon, Ca^{2+} et Mg^{2+} démontrent une bonne efficacité. *B. longum* a déjà été immobilisé avec succès dans des billes de gomme gellan.

Il a par contre fallu supplémenter le milieu de fermentation parce que l'acide lactique déstabilisait les capsules (Groboillot *et al.*, 1994; Poncelet *et al.*, 1999).

5.2.2.4. Alcool polyvinylique (PVA)

L'alcool polyvinylique est un polymère très peu dispendieux et non-toxique. Il est obtenu par hydrolyse (40°C) de l'acétate de polyvinyle dans l'alcool et en présence de catalyseurs d'acide sulfurique ou de potasse alcoolique (Budavari *et al.*, 1996).

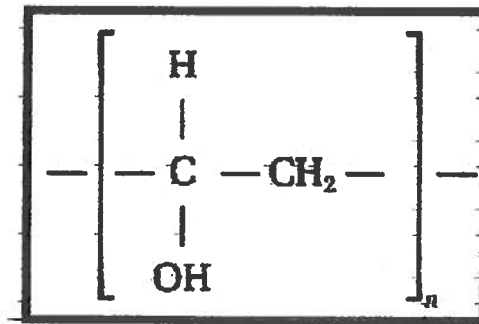


Figure 8: Structure chimique d'un monomère composant l'alcool polyvinylique (Budavari *et al.*, 1996)

Le polyvinyle alcool peut être réticulé par les rayons UV et former un gel. Malheureusement, plusieurs heures d'irradiation sont nécessaires et la mort cellulaire est très souvent inévitable. Des gels de PVA sont aussi obtenus avec de l'acide borique (qui est toxique pour les microorganismes). Finalement, le PVA peut se gélifier lorsque soumis à des cycles répétitifs de congélation - décongélation. En effet, le PVA se concentre au cours de ces cycles parce qu'il est exclu des cristaux de glace. Cette forte concentration de PVA lui donne la faculté de former un réseau tridimensionnel continu. L'addition d'agents cryoprotectants (glycérol, lait écrémé) permet d'assurer la viabilité des cellules (Groboillot *et al.*, 1994; Poncelet *et al.*, 1999).

5.2.3. Billes enrobées

Les billes et autres capsules permettent une grande diffusion des molécules au travers des parois parce que les gels qui les composent sont souvent poreux. De plus, il est parfois nécessaire d'isoler complètement les cellules procaryotes ou eucaryotes de leur environnement immédiat. Parfois encore, les billes sont quelquefois sensibles à leur environnement (par exemple, l'alginate qui se dissout dans le tampon phosphate). Un autre problème souvent rencontré est le relargage des cellules qui peut causer une diminution de l'efficacité de la fermentation. Une technologie fut donc développée pour augmenter la stabilité des billes soit celle de l'enrobage des billes, c'est-à-dire recouvrir les billes à l'aide d'une membrane.

Par exemple, la poly-L-lysine fut utilisée avec succès (Champagne *et al.*, 1992b; Groboillot *et al.*, 1994; Larisch *et al.*, 1994; Poncelet *et al.*, 1999). Des doubles couches d'alginate peuvent aussi être réalisées (Champagne *et al.*, 1992b), les billes d'alginate peuvent être recouvertes d'une membrane de chitosane (Overgaard *et al.*, 1991). Groboillot *et al.* (1994) rapportent que *S. cerevisiae* a été encapsulé dans des billes d'alginate et ces billes ont été recouvertes d'une membrane de résine de polyacrylamide sans diminuer l'activité métabolique des levures tout en diminuant le relargage des cellules.

6. Emballage actif à base de nisine

Cutter et Siragusa (1996) proposaient l'addition de gel d'alginate contenant de la nisine afin de réduire la charge microbienne (*Brochothrix thermosphacta*) à la surface d'une carcasse de bœuf. S'étant aperçu que la vaporisation ou l'ajout simple de la nisine dans de la viande crue était plutôt inefficace à long terme, ces auteurs ont protégé l'agent antimicrobien (100 µg/ml) par un gel biodégradable qui a permis une diffusion contrôlée du composé dans le produit carné résultant en une plus forte diminution de la croissance microbienne (3-4 log) comparativement à l'utilisation de la nisine seule. De plus, l'activité de la bactériocine est demeurée plus élevée sur toute la durée de l'expérience

pour les échantillons contenant le gel que les échantillons ne contenant que la nisine. Les mêmes auteurs renchérirent l'année suivante (Cutter et Siragusa, 1997). Cette fois ci, du bœuf haché à été utilisé comme produit carné. Une diminution significative de *Brochothrix thermosphacta* a été obtenue jusqu'au jour 7 de l'expérience. Encore une fois, l'activité de la nisine a été plus élevée pour les échantillons dont la nisine était protégée par le gel d'alginate.

Siragusa *et al.* (1999) ont incorporé la nisine (0.1% p/p) dans une pellicule de polyéthylène à basse densité (LDPE) afin de préserver des carcasses de bœuf contaminées avec *Brochothrix thermosphacta*. L'emballage dans une pellicule contenant la nisine a permis de maintenir la teneur en *Brochothrix thermosphacta* plus basse que les échantillons non recouverts durant les 20 jours de l'expérience (tous les échantillons furent conservés sous-vide). Natrajan et Sheldon (2000a, b) ont démontré l'efficacité de différentes formulations de films (PVC, LDPE, nylon, calcium-alginate et agar) contenant de la nisine à inhiber une souche de *Salmonella typhimurium* résistante à un antibiotique sur des pilons de poulet. Une concentration de 500 µg/ml de nisine semblait fournir une excellente inhibition (4 à 5 log après 72 heures) en présence d'acide citrique (3%), d'EDTA (5.0 mM) et de Tween-80 (0.5%). Ouattara (1998) a utilisé une formulation de films biodégradables à base de chitosane contenant des huiles essentielles ou des acides organiques sur la bologne, le jambon et le pastrami. Cet auteur a démontré l'efficacité des divers films à inhiber complètement la croissance des *Enterobacteriaceae* et de *Serratia liquefaciens* sur les viandes dont l'activité de l'eau est plus faible tel que le bologne. Il est aussi intéressant de noter que les lactobacilles à l'étude n'étaient pratiquement pas affectés par les films contenant des huiles essentielles.

Hypothèse

L'hypothèse de ce travail est : l'immobilisation d'agents bioactifs dans des billes et des films à base d'alginate et de protéines laitières pourrait permettre un meilleur contrôle de la qualité microbiologique de la viande en inhibant la croissance de pathogènes tel que *Staphylococcus aureus* dans des conditions favorables (35°C) et défavorables (7°C).

Objectifs

Les objectifs de cette recherche sont :

- 1- Optimiser les conditions d'encapsulation de *L. lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 dans un milieu pauvre d'eau peptonée
- 2- Déterminer le potentiel antimicrobien de ces BAL encapsulées contre diverses bactéries
- 3- Effectuer une cinétique d'inhibition de *S. aureus* par *L. lactis* encapsulés sur gélose
- 4- Vérifier la concentration minimale d'EDTA qui permettra une inhibition de bactéries Gram négatives sélectionnées
- 5- Vérifier la destruction de *S. aureus* par *L. lactis* encapsulés ou microencapsulés dans du bœuf haché conservé à 7°C et à 35°C
- 6- Mettre au point une méthode de fabrication de films insolubles et biodégradables contenant de la nisine
- 7- Vérifier le pouvoir antimicrobien de ces films contre *S. aureus* inoculé dans des échantillons de bifteck de ronde de bœuf à 7°C
- 8- Mettre au point une méthode de fabrication de billes pour immobiliser de la nisine
- 9- Vérifier le pouvoir antimicrobien de ces billes contre *S. aureus* inoculé dans des échantillons de bœuf haché à 7°C.

Moyens pour atteindre les objectifs

- 1-) L'optimisation de l'encapsulation des BAL sera effectuée en vérifiant la concentration d'alginate et de WPC qui permet d'obtenir une forte concentration de BAL piégées au cœur des billes, relâchées dans le milieu d'eau peptonée et qui permet d'acidifier le plus possible le surnageant.
- 2-) Le potentiel antimicrobien *in vitro* des BAL encapsulées sera effectué sur les bactéries indicatrices suivantes : *L. curvatus*, *L. sake*, *E. faecalis*, *E. faecium*, *M. varians*, *P. acidilactici*, *S. aureus*, *E. coli*, *P. putida* et *S. typhi*. Celles-ci ont été choisies parce qu'elles représentent un large éventail d'espèces bactériennes démontrant ainsi le large spectre d'inhibition de la nisine. La méthode utilisée est une modification du « agar spot test » mis au point par Fleming *et al.* (1975).
- 3-) La cinétique de destruction de *S. aureus* par *L. lactis* encapsulé sera effectuée après 24 heures d'incubation à 35°C dans une gélose BHI. Le choix de *S. aureus* se justifie parce que c'est un pathogène opportuniste des produits carnés.
- 4-) La sensibilisation des bactéries Gram – à la nisine sécrétée par *L. lactis* encapsulé sera testée en mélangeant diverses concentration d'EDTA à environ 10^7 UFC ml⁻¹ de , *S. aureus*, *E. coli*, *P. putida* et *S. typhi*. La même méthode modifiée de Fleming *et al.* (1975) sera utilisée à des fins comparatives.
- 5-) La destruction de *S. aureus* dans le bœuf haché par la présence de *L. lactis* encapsulés ou microencapsulés sera démontré en co-inoculant le pathogène et les BAL dans des échantillons de bœuf haché à 7°C et 35°C. Les dénombrements de *S. aureus* seront effectués sur gélose Baird-Parker et les boîtes de Pétri seront incubées à 35°C durant 48 heures tandis que les dénombrements de *L. lactis* seront effectuées sur géloses Lactobacilli MRS durant 48 heures à 35°C. La mesure du pH des échantillons de viande

sera aussi effectuée afin de vérifier si l'acidification peut être la cause de la mortalité des pathogènes.

6-) Les films biodégradables de nisine seront fabriquées à partir d'une solution d'alginate, de polycaprolactone, de glycérol, de WPI et de nisine et insolubilisés par un traitement dans le chlorure de calcium.

7-) Les films seront déposés sur des échantillons de bifteck de ronde inoculés de 10^4 UFC g^{-1} de *S. aureus* et entreposés pour la durée de l'expérience à 4°C. Les dénombrements de *S. aureus* seront effectués sur gélose Baird-Parker et les boîtes de Pétri seront incubées à 35°C durant 48 heures.

8-) Les billes contenant la nisine seront fabriquées à partir d'une solution d'alginate activée et de nisine pour être mise goutte-à-goutte dans une solution de chlorure de calcium.

9-) Les billes de nisine seront mélangées dans des échantillons de bœuf haché inoculés de 10^3 UFC g^{-1} de *S. aureus* et entreposés pour la durée de l'expérience à 4°C. Les dénombrements de *S. aureus* seront effectués sur gélose Baird-Parker et les boîtes de Pétri seront incubées à 35°C durant 48 heures.

Chapitre II

Matériel et méthodes

Origine et entreposage des souches bactériennes

Les souches de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454, *Lactobacillus curvatus* ATCC 25601, *Lactobacillus sakei* ATCC 15521, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 et *Salmonella typhi* ATCC 19439 proviennent de l'American Type Culture Collection (Rockville, USA) (tableau 5). Les souches d'*Enterococcus faecium* LSPQ 3550 et *Enterococcus faecalis* LSPQ 2724 furent achetées du Laboratoire de Santé Publique du Québec (Sainte-Anne-de-Bellevue, Canada). La souche de *Pseudomonas putida* CRDA V376 est un généreux don du Centre de Recherche et de développement sur les Aliments (St-hyacinthe, Canada). Les souches de *Micrococcus varians* et *Pediococcus acidilactici* furent isolées à partir d'un ferment à saucisson commercial. Les tests de coloration simple et gram, de catalase et d'oxydase ont permis d'identifier les bactéries. Les tests api50CH (Biomérieux, Montréal, Canada) ont permis de confirmer les résultats obtenus suite aux analyses visuelles et biochimiques.

Toutes les souches ont été cultivées et additionnées de glycérol stérile (10% v/v). Les bouillons furent par la suite distribués dans des cryovials et congelés à -80°C .

Avant chaque expérience, un cryovial fut décongelé et activé par deux cycles de croissance de 18 heures à 35°C dans des tubes contenant 9 ml de leur milieu de culture soit Lactobacilli MRS Broth (Difco, Détroit, USA) pour les BAL et *Pediococcus acidilactici* et BHI (Difco, Détroit, USA) pour toutes les autres bactéries à l'étude. Le tableau 5 résume les souches bactériennes utilisées, leur provenance et leur milieu de culture.

Tableau 5 : Souches bactériennes, leur origine et le milieu de culture servant à leur croissance

Souches	Origine	Milieu de culture
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	ATCC 11454	MRS
<i>Lactobacillus curvatus</i>	ATCC 25601	MRS
<i>Lactobacillus sake</i>	ATCC 15521	MRS
<i>Enterococcus faecalis</i>	LSPQ 2724	BHI
<i>Enterococcus faecium</i>	LSPQ 3550	BHI
<i>Micrococcus varians</i>	Ferment commercial	BHI
<i>Pediococcus acidilactici</i>	Ferment commercial	MRS
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 29213	BHI
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	BHI
<i>Pseudomonas putida</i>	CRDA V376	BHI
<i>Salmonella typhi</i>	ATCC 19430	BHI

Détermination de la concentration optimale d'alginate

Immobilisation des souches bactériennes

L'alginate de sodium (Sigma-Aldrich, Oakville, Canada) a été solubilisé dans de l'eau distillée à des concentrations finales de 1%, 1.5% et 2%. Les solutions ont été stérilisées à 121°C durant 15 minutes. Par la suite, une culture active de *L. lactis* (10% v/v), préalablement lavée deux fois dans de l'eau saline (0,85%) avec une centrifugation entre chaque lavage (5 000 x g; 4°C), a été ajoutée à la solution d'alginate et doucement homogénéisée. Le mélange bactérien a été expulsé goutte-à-goutte d'une seringue de 50 cc équipée d'une aiguille 20G1 (Beckton-Dickinson, Cockeysville, USA) dans une solution de CaCl₂ (0.05 mol l⁻¹) (Laboratoires Mat, Beauport, Canada) stérile avec une agitation douce et constante. Les billes obtenues ont été laissées dans la solution de CaCl₂ durant 30 minutes afin compléter la réaction de gélification. Les billes ont été récupérées dans un tamis métallique puis rincées avec de l'eau distillée stérile (60 secondes) et placées dans un plat de Pétri stérile à la température de réfrigération soit 4°C.

Détermination de la concentration optimale de lactosérum

Immobilisation des souches bactériennes

L'alginate de sodium a été solubilisé dans de l'eau distillée afin d'avoir une concentration finale de 1,5%. Les solutions ont été stérilisées à 121°C durant 15 minutes. Afin d'observer l'effet des protéines laitières sur la croissance de *L. lactis*, du concentré de lactosérum en poudre (WPC) (Les Fromages Saputo Ltée, St-Hyacinthe, Canada) contenant 76.27% de protéines laitières (p/p base sèche) a été stérilisé au Centre d'Irradiation du Canada (Laval, Canada) par irradiation (15 kGy) dans un appareil Underwater Calibrator équipé d'une source de ⁶⁰Cobalt (MDS Nordion, Kanata, Canada) dont le débit de dose est de 38.1 kGy h⁻¹. Après irradiation, la poudre (0.5, 1; 2 ou 4%) a été ajoutée dans la solution d'alginate et homogénéisée doucement toute la nuit à 20°C. Par la suite, une culture active de *L. lactis* a été ajoutée (10% v/v) à la solution d'alginate-WPC et doucement mélangée. Le mélange bactérien a été expulsé goutte-à-goutte d'une seringue de 50 cc équipée d'une aiguille 20G1 dans une solution de CaCl₂ (0.05 mol l⁻¹) stérile avec une agitation douce et constante. Les billes résultantes ont été laissées dans la solution de CaCl₂ durant 30 minutes afin de permettre la gélification ionotropique complète. Elles ont été récupérées à l'aide d'un tamis métallique puis rincées avec de l'eau distillée stérile (60 secondes) et placées dans un plat de Pétri stérile à 4°C.

Préparation des échantillons en vue de l'optimisation d'alginate et du lactosérum

Dix grammes (environ 75 billes) de chaque formulation de billes ont été ajoutés dans un erlenmeyer contenant 100 mL d'eau peptonée (0.1%) stérile (121°C durant 15 minutes). Les échantillons ont été placés à 35°C pour la durée de l'expérience.

Analyses microbiologiques

Des dénombrements de BAL dans le surnageant et à l'intérieur des billes ont été effectués pendant 5 jours. Afin d'analyser le surnageant, un aliquot de 1 mL a été prélevé, dilué en série et 1 ml de chaque dilution a été étalé en profondeur dans du Lactobacilli MRS agar (Difco; Détroit, USA). La croissance des bactéries lactiques à

l'intérieur d'une bille a été évaluée après récupération avec des pinces stériles et dissolution dans un tube contenant du tampon phosphate (0.1 mol l^{-1}) stérile. Des dilutions successives ont été effectuées dans des tubes d'eau peptonée et 1 mL de chaque dilution a été étalée en profondeur dans une gélose Lactobacilli MRS.

Mesure du pH

Afin de mesurer l'activité métabolique de *L. lactis*, dans ce cas-ci la transformation des sucres en acide lactique durant la croissance bactérienne, le pH des surnageants d'eau peptonée contenant les diverses formulations de billes et BAL libres a été mesuré. Pour ce faire, des aliquots de 5 mL de chaque erlenmeyer ont été prélevés dans des bouteilles. Le pH a ensuite été mesuré à l'aide d'un pHmètre Orion modèle 420A.

Tests antimicrobiens de *L. lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 *in vitro*

« Agar spot test »

Le « agar spot test » a été réalisé selon la méthode de Fleming *et al.* (1975) avec quelques modifications. Un volume de cinq μL d'une culture activée et lavée de *L. lactis* a été déposé à la surface une gélose molle de BHI (0.75% d'agar au lieu de 1.5% afin d'améliorer la diffusion des métabolites) ou de Lactobacilli MRS (selon la souche indicatrice utilisée) et incubée à 35°C pour la nuit. Le lendemain, 5 mL d'une gélose molle de BHI ou Lactobacilli MRS contenant 100 μL d'une souche indicatrice (Tableau 1) ont été versés par dessus la première gélose. Le plat de Pétri a été incubé à 35°C jusqu'à l'apparition d'un tapis bactérien. Une inhibition positive survient lorsqu'une zone claire d'au moins 0.5 mm de rayon est observée autour de la goutte. Pour comparer l'effet bactéricide de *L. lactis* encapsulé, les mêmes procédures décrites ci-haut ont été réalisées à la seule différence que la goutte provenant du bouillon bactérien a été remplacée par une bille immergée dans la gélose molle.

Afin de vérifier si l'inhibition est produite par la sécrétion d'une bactériocine, le test a été répété en présence d'un mélange de protéases produites par *Streptomyces griseus* type XIV (1 mg mL⁻¹) (Sigma-Aldrich, Oakville, Canada).

Influence de la formulation des billes sur la diffusion de la bactériocine dans un milieu de culture semi-ferme

Des billes composées de 1%, 1.5% et 2% d'alginate de sodium et une formulation contenant 1.5% alginate et 2% WPC (concentrations optimales déterminées suite aux premières expériences) ont été préparées afin d'évaluer la diffusion de la bactériocine dans la gélose. Pour ce faire, une bille lavée a été placée dans chaque section d'un plat de Pétri (90 mm X 15 mm) comportant 4 sections (Phoenix Biomedical, Mississauga, Can) et de la gélose molle de BHI a été coulée dans chaque section jusqu'à ce que les billes soient recouvertes. Par la suite, les plats de Pétri ont été placés à 35°C pour 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22 et 24 h. Toutes les deux heures, un mL provenant d'un tube de

cinq mL inoculé avec 100 μ L de *S. aureus* a été ajouté à la surface d'une section. Le rayon d'inhibition à partir d'un côté de la bille jusqu'à l'extrémité de la zone d'inhibition représentait l'amplitude du pouvoir antimicrobien des billes contenant des BAL.

Inhibition des bactéries Gram négatives par *L. lactis* encapsulés

Les billes ont été placées dans des plats de Pétri (90 mm X 15 mm) comportant 4 sections et de la gélose molle de BHI a été coulée dans chaque section jusqu'à ce que les billes soient recouvertes. Les plats de Pétri ont été placés à 35°C durant 24 heures. Cent μ L des souches indicatrices (*E. coli*, *S. typhi*, *Ps. putida*) ont été mélangés à 5 mL de gélose molle de BHI additionnée de différentes concentrations d'EDTA (0 à 0.1 mol l⁻¹). Un mL de chaque tube a été coulé à la surface des sections contenant des billes. Les plats de Pétri ont été placés à l'incubateur jusqu'à ce qu'un tapis bactérien soit visible. Le témoin positif de cette expérience consistait à utiliser *S. aureus* comme souche indicatrice parce qu'il est bien connu que la nisine inhibe facilement les bactéries Gram + (Stevens *et al.*, 1992) et le témoin négatif était constitué de bille sans bactérie.

Afin de faciliter la rencontre entre l'EDTA et les parois bactériennes, les géloses contenant les bactéries et l'EDTA ont été gardées en phase liquide à différents temps (0 à 10 min).

Destruction de *Staphylococcus aureus* dans du bœuf haché par *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 (encapsulé et microencapsulé)

Microencapsulation de L. lactis

L'alginate de sodium a été solubilisée dans de l'eau distillée afin d'avoir une concentration finale de 1.5%. Les solutions ont été stérilisées à 121°C durant 15 minutes. Le WPC stérile (2% p/v) a été ajouté dans la solution d'alginate et homogénéisé doucement durant une heure. Par la suite, une culture active de *L. lactis* a été lavée deux fois dans l'eau saline (0.9% NaCl), ajoutée (10% v/v) à la solution d'alginate-WPC et doucement mélangée avant d'être ajoutée dans une seringue de 50 cc équipée d'une aiguille 20G1. Un jet d'air stérile a été utilisé afin de vaporiser la solution d'alginate-WPC inoculée par *L. lactis* dans du CaCl_2 (0.05 mol l⁻¹) stérile (figure 1).

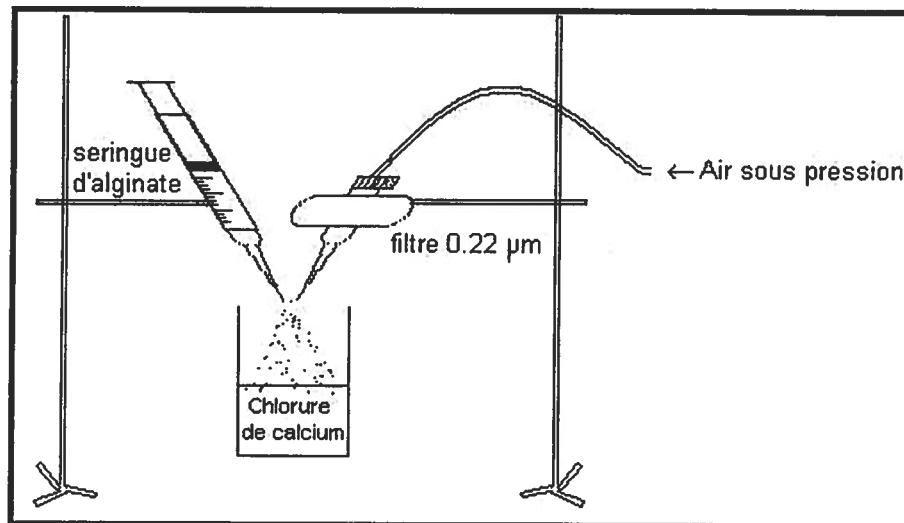


Figure 9. Schématisation du montage utilisé lors de la fabrication des microbilles

Les microbilles ont été formées lorsque les gouttes étaient en contact avec le CaCl_2 . Suite à une décantation des microbilles durant quelques heures à 4°C, le surnageant a été retiré par un système de pompe. Les microbilles ont été conservées à 4°C.

Préparation des lots pour les tests dans le bœuf haché

Du bœuf haché mi-maigre (20% de matières grasses) frais a été emballé sous-vide au supermarché (IGA, Laval, Canada) et amené directement au laboratoire. Il a été immédiatement congelé à -80°C avant d'être stérilisé (25 kGy) dans un appareil Underwater Calibrator équipé d'une source de ⁶⁰Cobalt (MDS Nordion, Kanata, Canada) avec un débit de dose de 38.1 kGy h⁻¹. La veille de l'expérience, le bœuf haché stérile a été décongelé à 4°C.

Des échantillons de 200 grammes de bœuf haché ont été pesés dans des béchers. Cinq grammes de billes ou de microbilles (selon le cas) contenant *L. lactis* ATCC 11454 (10⁵ UFC/g) et préparé avec les concentrations optimales d'alginate et de WPC ont été ajoutés à la viande et bien mélangés avec une cuillère stérile. Ensuite, le bœuf haché a été déposé sur une barquette stérilisée (par irradiation à une dose de 25 kGy). La barquette a été placée dans un sac Stomacher stérile (Fisher Scientific, Montréal, Canada). Les échantillons de bœuf haché ensemencés ont été conservés à 7°C et 35°C. La même procédure a été appliquée avec les bactéries *L. lactis* libres. Afin de vérifier la croissance de *S. aureus* en présence des BAL, les cellules pathogènes ont été ajoutées dans le bécher et bien mélangées à la viande. Le dénombrement de *L. lactis* et la mesure du pH ont été effectués sur des échantillons de bœuf haché pour chaque lot ainsi préparé (tableau 6) et à chaque intervalle d'analyse.

Tableau 6 : Groupes expérimentaux utilisés lors des manipulations de destruction de *S. aureus* dans le bœuf haché

Expérience	Lot	<i>L. lactis</i> encap.	<i>L. lactis</i> libre	<i>S. aureus</i>
No.1	A	10 ⁵ UFC/g	-	10 ⁴ UFC/g
	B	-	10 ⁵ UFC/g	10 ⁴ UFC/g
	C	-	-	10 ⁴ UFC/g

Analyses microbiologiques

Les lots ont été préparés en triplicata et les populations de *L. lactis* et de *S. aureus* dénombrées aux intervalles désirés soit à chaque 24 heures pour les échantillons conservés à 35°C et toutes les 48 heures en ce qui concerne les échantillons entreposés à 7°C. Pour les analyses microbiologiques, 10 grammes de chaque échantillon de bœuf hachéensemencé de *L. lactis* seulement ou *L. lactis* et *S. aureus* ont été pesés dans un sac Stomacher stérile. Un volume de 90 ml de tampon phosphate (0.1 mol l⁻¹) stérile (121°C durant 15 minutes) à été ajouté à la viande. Ensuite, la viande et les billes ont été broyées dans un appareil Stomacher LabBlender 400 (Seward Medical UAC House, Londres, Angleterre) durant environ 60 secondes afin de permettre l'éclatement des billes. Les dilutions sériées ont été effectuées dans des tubes d'eau peptonée (0.1% p/v) stérile et étalées en duplicata sur gélose Lactobacilli MRS pour le dénombrement de *L. lactis* suivi d'une incubation de 48 heures à 35°C ou étalées sur gélose Baird-Parker (Difco, Détroit, USA) pour le dénombrement de *S. aureus* suivi d'une incubation de 24 heures à 35°C.

Mesure du pH

Afin de mesurer l'activité métabolique de *L. lactis*, dans ce cas-ci la transformation des sucres en acide lactique durant la croissance bactérienne, des mesures de pH ont été prises sur des échantillons de bœuf haché. Dix grammes d'échantillons de chaque lot ont été pesés dans un sac Stomacher stérile. Un volume de 90 mL d'eau distillée stérile a été ajouté dans le sac. Ensuite, la viande et les billes ont été broyées dans un appareil Stomacher durant environ 60 secondes. Le pH a été mesuré à l'aide d'un pH mètre Orion équipé d'une sonde modèle 420A.

Inhibition bactérienne par la nisine immobilisée dans des films d'alginate modifié

Préparation des films

La solution filmogène a été réalisée en préparant une solution contenant 3% (p/v) d'alginate modifié, 1.2% (p/v) de polycaprolactone (Laboratoires Mat, Beauport, Canada), 2% (p/v) de glycérol et 0.5% (p/v) de WPI (Les Fromages Saputo, St-Hyacinthe, Canada). Par la suite, la concentration désirée de nisine a été ajoutée et bien solubilisée. Un volume de 5 mL de la solution d'alginate modifié contenant de la nisine a été déposé uniformément sur le fond et sur le couvercle d'un plat de Pétri d'un diamètre de 50 x 9 mm (Falcon, VWR, Ville Mont-Royal, Canada). Les films ont été séchés durant 24 heures. Par la suite, 1 mL d'une solution de 10% CaCl₂, de 0.5% chitosane (viscosité 1% = 190 cps; 89.48% de désacétylation) (Les Pêcheries Marinard, Rivière-aux-Renards, Canada) et de 5 % glycérol a été déposé sur le film durant 10 minutes. Les films ont été séchés environ 60 min. et stérilisés par irradiation à 25 kGy (38.1 kGy h⁻¹).

Préparation des échantillons

Du bœuf haché a été acheté au supermarché IGA, rapidement acheminé dans les laboratoires et immédiatement congelé à -80°C. La stérilisation de la viande a été obtenue par irradiation à une dose de 25 kGy (38.1 kGy h⁻¹). La veille de l'expérience, le bœuf haché a été décongelé à 4°C. La viande a ensuite été contaminée par 4 log₁₀ UFC g⁻¹ de *S. aureus* et 10 g de ce bœuf haché contaminé ont été placés dans les plats de Pétri contenant les films.

Tableau 7 : Groupes expérimentaux utilisés afin de déterminer l'efficacité du film antimicrobien contenant ou non de la nisine.

Film	Concentration nisine (UI ml ⁻¹ film)	Concentration <i>S. aureus</i> (UFC g ⁻¹)
Viande seule	-	1 x 10 ⁴
Viande + film	0	1 x 10 ⁴
Viande + film	100	1 x 10 ⁴
Viande + film	250	1 x 10 ⁴
Viande + film	500	1 x 10 ⁴
Viande + film	1000	1 x 10 ⁴

Chaque groupe comportait 3 échantillons conservés à 4°C durant toute la durée d'analyse.

Inhibition bactérienne par de la nisine immobilisée dans des billes d'alginate activé

Préparation des billes

La poudre de nisine a été ajoutée directement dans 50 ml de la solution d'alginate activée (4%; pH 7.5) et agitée doucement durant 12 heures à 4°C. Par la suite, la solution a été complétée à 100 mL avec de l'eau distillée et 2g d'alginate non activé ont été dissous dans le mélange. La solution a été transférée dans une seringue de 50 cc équipée d'une aiguille 20G1½ et égouttée dans une solution de CaCl₂ (10% p/v) stérile sous agitation douce. Afin d'assurer une gélification uniforme, les billes ont trempé dans le CaCl₂ durant 30 minutes avant d'être récupérées, transférées dans une solution de chitosane (0.25%) durant 30 minutes et rincées à l'eau distillée. Elles ont été stérilisées par irradiation à une dose de 25 kGy (38.1 kGy h⁻¹).

Préparation des échantillons

Du bœuf haché a été acheté au supermarché IGA, rapidement acheminé dans les laboratoires et immédiatement congelé à -80°C. La stérilisation de la viande a été obtenue par irradiation à une dose de 25 kGy (38.1 kGy h⁻¹). La veille de l'expérience, le bœuf haché a été décongelé à 4°C. Le bœuf haché a été séparé en six lots de 550g : un

lot servant de témoin de croissance de *S. aureus* ($3 \log_{10}$ UFC g^{-1}), un lot contenant des billes d'alginate sans nisine, deux lots contenant *S. aureus* et la nisine libre (500 et 1000 UI/g viande) et deux derniers lots contenant la bactérie pathogène et la nisine encapsulée (100g de solution donnant environ 5000 billes de nisine contenant 500 et 1000 UI/g). Chaque lot a finalement été placé dans des plats de Pétri (25 g/ Pétri).

Tableau 8 : Groupes expérimentaux utilisés afin de déterminer l'efficacité antimicrobienne des billes contenant de la nisine.

Film	Concentration nisine (UI ml^{-1} film)	Concentration <i>S. aureus</i> (UFC g^{-1})
Viande	-	1×10^3
Viande + billes	-	1×10^3
Viande + nisine libre	500 UI g^{-1}	1×10^3
Viande + nisine libre	1000 UI g^{-1}	1×10^3
Viande + nisine encapsulée	500 UI g^{-1}	1×10^3
Viande + nisine encapsulée	1000 UI g^{-1}	1×10^3

Chaque groupe comportait 3 échantillons conservé à 4°C durant toute la durée d'analyse.

Tests statistiques

Les concentrations bactériennes obtenues tout au long de cette étude représentent les moyennes de deux répétitions en triplicata. Pour chaque répétition, trois échantillons ont été analysés. Lorsqu'une expérience était composée de plus de deux groupes expérimentaux, le test statistique de Duncan permettant l'analyse des variances (ANOVA) a été réalisé avec le programme de statistique SPSS. Par contre, lorsque seulement deux groupes expérimentaux (par exemple la croissance des lactobacilles dans le bœuf haché) étaient à l'étude, le test de *t* de Student a été effectué avec le même programme. Les différences étaient significatives lorsque $P \leq 0.05$.

Chapitre III

Résultats

1- Mise au point des formulations de billes

La première étape du projet consistait à optimiser les concentrations des substances servant à la fabrication des billes. L'alginate, un polysaccharide possédant la capacité de gélification ionotropique, a servi de matrice de base dans la procédure tandis que le WPC a été ajouté afin de fortifier cette matrice tout en servant d'agent prébiotique pour les BAL. Les mêmes paramètres ont servi à déterminer, en premier lieu, la concentration optimale d'alginate et, en second lieu, à déterminer la concentration optimale de WPC à incorporer dans la recette de fabrication des billes. Ces trois paramètres étaient :

- 1) la mesure de la concentration de *L. lactis* piégés à l'intérieur des billes,
- 2) la mesure de la concentration de BAL dans le surnageant d'eau peptonée dans lequel baignait les billes,
- 3) la mesure du pH de ce surnageant.

En effet, il est important que la quantité de BAL immobilisées à l'intérieur des billes soit constante ou en progression démontrant ainsi que les microorganismes immobilisés conservent leur capacité de reproduction. De plus, la quantité de BAL dans le surnageant doit augmenter démontrant ainsi le relâchement des bactéries à l'extérieur des billes. La mesure du pH a servi à démontrer la production d'acide lactique par les BAL, un indicateur de leur bon métabolisme. Comme le milieu était de l'eau peptonée (un milieu pauvre en nutriments défavorable à la croissance des BAL), une croissance des BAL indiquait donc la métabolisation probable de l'alginate ou du WPC. Les paramètres ont été étudiés quotidiennement durant 4 jours.

1.1. Concentration optimale d'alginate

La figure 10 montre une photographie des billes d'alginate contenant *L. lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454. Il est ainsi possible de constater que les billes, relativement sphériques, possédaient un diamètre variant entre 2 et 3 mm. La quantité de lactocoques dénombrés dans le surnageant des échantillons contenant des billes, est présentée dans le tableau 9 et la figure 11. Les résultats ont montré que l'encapsulation des BAL a causé une diminution du nombre de bactéries dénombrées dans le surnageant. En effet, au jour 0, la concentration de BAL libres était de $6.05 \pm 0.07 \log \text{ UFC ml}^{-1}$ tandis qu'ils étaient de $1.15 \pm 0.25 \log \text{ UFC ml}^{-1}$ et $1.28 \pm 0.26 \log \text{ UFC ml}^{-1}$ pour les billes d'alginate (1% et 2% respectivement). Après 24 heures d'incubation, la figure 11 indique que les surnageants dans lesquels baignaient les billes composées de 1% d'alginate possédaient une concentration de BAL significativement supérieure ($P \leq 0.05$) comparativement aux autres groupes expérimentaux. En effet, après une incubation de 24 heures, un compte bactérien de $7.78 \pm 0.09 \log \text{ UFC ml}^{-1}$ a été observé dans le surnageant des billes (1% d'alginate), comparativement à $7.47 \pm 0.12 \log \text{ UFC ml}^{-1}$ pour les BAL libres, $7.66 \pm 0.10 \log \text{ UFC ml}^{-1}$ pour le groupe à base de 1.5% d'alginate et de $7.63 \pm 0.12 \log \text{ UFC ml}^{-1}$ pour les billes composées de 2% d'alginate. Par la suite, la concentration bactérienne du surnageant contenant les BAL libres a diminué progressivement jusqu'à 96 heures tandis que les concentrations de BAL des surnageants contenant des billes (1%, 1.5% et 2% d'alginate) ont diminué après 48 heures avant de se stabiliser ($P \geq 0.05$) à $6.69 \log \text{ UFC ml}^{-1}$, $6.75 \log \text{ UFC ml}^{-1}$ et $6.59 \log \text{ UFC ml}^{-1}$ respectivement après 96 heures d'incubation.

La figure 12 et le tableau 10 permettent de suivre l'évolution de la concentration de bactéries piégées à l'intérieur des billes. Des concentrations initiales de BAL variant entre 5.52 et $5.60 \log_{10} \text{ UFC ml}^{-1}$ ont été dénombrés à l'intérieur des billes et ce, pour toutes les formulations. Après 24 heures d'incubation, les résultats ont montré une augmentation significative ($P \leq 0.05$) de la concentration en BAL à l'intérieur des billes fabriquées à partir de toutes les formulations. Les billes fabriquées à partir des solutions d'alginate 1% et 1.5% ont démontré une concentration significativement supérieure ($P \leq 0.05$) de BAL que les billes composées de 2% d'alginate ($7.38 \pm 0.11 \log_{10} \text{ UFC ml}^{-1}$),

$7.48 \pm 0.10 \log_{10} \text{ UFC ml}^{-1}$ et $7.16 \pm 0.20 \log_{10} \text{ UFC ml}^{-1}$). Après 48 heures, il a été possible d'observer une diminution significative de $1.19 \log_{10} \text{ UFC ml}^{-1}$ du contenu en BAL des billes de 1% d'alginate, de $1.94 \log_{10} \text{ UFC ml}^{-1}$ dans les billes de 1.5% et une baisse de $1.66 \log_{10} \text{ UFC ml}^{-1}$ dans les billes faites de 2% d'alginate. Finalement, après 96 heures d'incubation, la concentration en BAL immobilisées à l'intérieur des différentes formulations de billes était de $5.89 \log_{10} \text{ UFC ml}^{-1}$, de $5.43 \log_{10} \text{ UFC ml}^{-1}$ et de $5.30 \log_{10} \text{ UFC ml}^{-1}$ pour les formulations contenant 1%, 1.5% et 2% d'alginate respectivement.

La figure 13 et le tableau 11 montrent l'évolution du pH des surnageants d'eau peptonée inoculés de BAL encapsulées dans diverses concentration d'alginate. Le tableau 11 démontre que le pH des surnageants contenant des billes d'alginate a diminué légèrement après 24 heures d'incubation à 35°C alors qu'en absence de d'alginate, il y a eu une augmentation du pH. Le pH des billes faites de 1% d'alginate est passé de 7.28 ± 0.03 à 7.16 ± 0.02 au cours des 24 premières heures. Celui des billes composées de 1.5% de polysaccharides était de pH 7.28 ± 0.02 au temps 0 et de 7.12 ± 0.03 après 24 heures. Le pH des billes de 2% d'alginate a varié de 7.29 ± 0.02 à 7.12 ± 0.03 . Au cours de cette même période de 96 heures, le pH de l'eau peptonée inoculée de BAL libres a augmenté significativement ($P \leq 0.05$) de pH 7.23 ± 0.04 à un pH de 7.54 ± 0.03 . Entre 24 et 72 heures, une augmentation du pH a été observée pour tous les traitements. En fait, après 72 heures d'incubation, le pH de l'échantillon contenant les BAL libres était de 7.90 ± 0.05 , le pH du surnageant contenant des billes faite de 1% d'alginate était de 7.76 ± 0.08 , celui de 1.5% d'alginate est de 7.91 ± 0.19 et le pH de l'échantillon 2% d'alginate était de 7.75 ± 0.02 . Aucune différence significative ($P > 0.05$) n'a été notée entre les traitements. Après 96 heures d'incubation, une diminution significative a été notée pour tous les traitements. Il n'y a, par contre, aucune différence significative entre les échantillons contenant des billes quelque soit la concentration d'alginate utilisée. Le pH était d'environ 7.59 pour les échantillons de surnageants contenant les billes et de 7.68 pour les surnageants d'eau peptonée contenant des BAL libres.

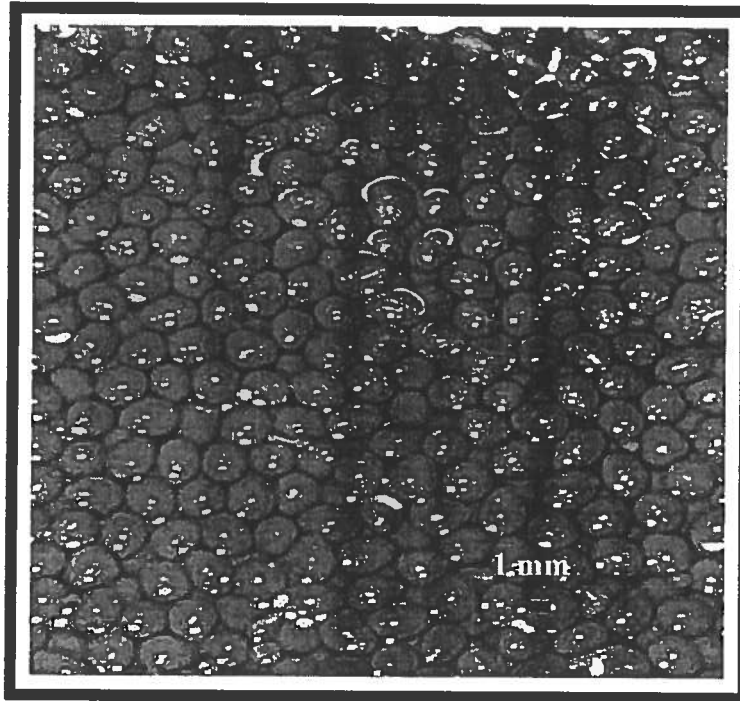


Figure 10 : Photographie de billes d'alginate de calcium.

Tableau 9 : Influence de la concentration en alginate entrant dans la formulation des billes sur la croissance de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 (log UFC mL⁻¹) retrouvés dans le surnageant.

Heures	% d'alginate			
	0%	1%	1.5%	2%
0	6.05 ± 0.07 ^a ₍₂₎	1.15 ± 0.25 ^b ₍₁₎	1.24 ± 0.26 ^b ₍₁₎	1.28 ± 0.26 ^b ₍₁₎
24	7.47 ± 0.12 ^a ₍₅₎	7.78 ± 0.09 ^b ₍₃₎	7.66 ± 0.10 ^c ₍₃₎	7.63 ± 0.12 ^c ₍₃₎
48	6.33 ± 0.16 ^a ₍₄₎	6.80 ± 0.09 ^b ₍₂₎	6.72 ± 0.08 ^b ₍₂₎	6.71 ± 0.14 ^b ₍₂₎
72	6.16 ± 0.04 ^a ₍₃₎	6.69 ± 0.08 ^b ₍₂₎	6.72 ± 0.19 ^b ₍₂₎	6.55 ± 0.06 ^c ₍₂₎
96	5.90 ± 0.05 ^a ₍₁₎	6.69 ± 0.06 ^b ₍₂₎	6.75 ± 0.12 ^b ₍₂₎	6.59 ± 0.06 ^c ₍₂₎

^{a-c} Des lettres non identiques sur une même ligne indiquent une différence significative entre les résultats des groupes expérimentaux ($P \leq 0.05$)

¹⁻³ Des chiffres non identiques sur une même colonne indiquent une différence significative entre les résultats obtenus à divers temps ($P \leq 0.05$)

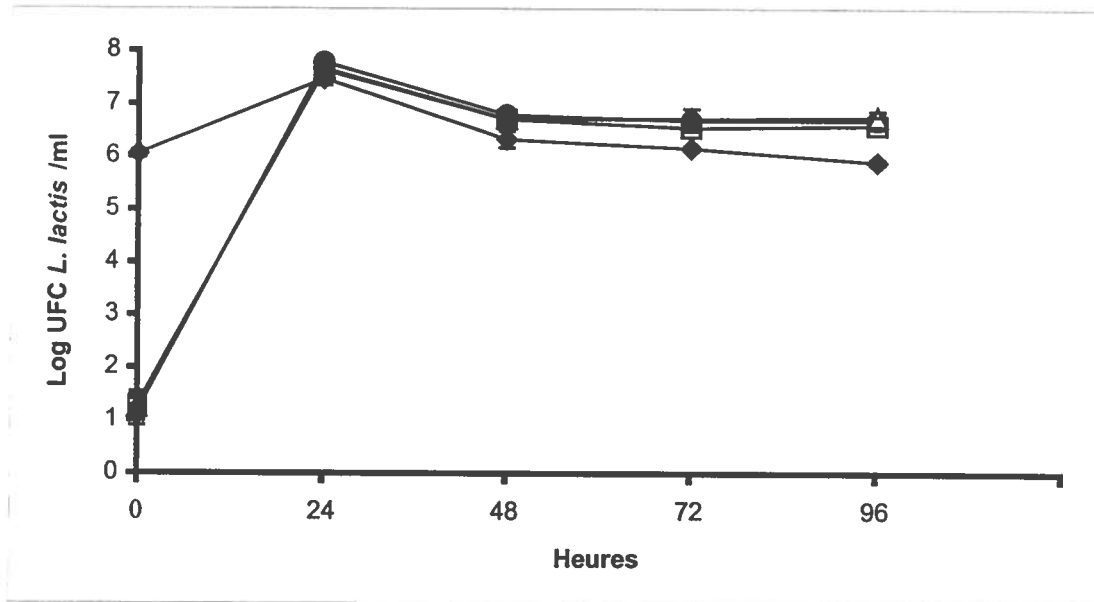


Figure 11 : Influence de la concentration en alginate entrant dans la formulation des billes sur la croissance de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 retrouvés dans le surnageant. % d'alginate: (◆) 0%; (●) 1%; (△) 1.5%; (□) 2%

Tableau 10 : Influence de la concentration en alginate entrant dans la Formulation des billes sur la croissance de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 (log UFC mL⁻¹) piégés à l'intérieur des billes.

Heures	% d'alginate		
	1%	1.5%	2%
0	5.52 ± 0.10 ^a ₍₁₎	5.57 ± 0.12 ^a ₍₂₎	5.60 ± 0.13 ^a ₍₃₎
24	7.38 ± 0.11 ^a ₍₄₎	7.48 ± 0.10 ^a ₍₄₎	7.16 ± 0.20 ^b ₍₄₎
48	6.19 ± 0.10 ^a ₍₃₎	5.54 ± 0.14 ^b ₍₂₎	5.50 ± 0.10 ^b _(2,3)
72	5.97 ± 0.09 ^a ₍₂₎	5.74 ± 0.07 ^b ₍₃₎	5.41 ± 0.13 ^c _(1,2)
96	5.89 ± 0.15 ^a ₍₂₎	5.43 ± 0.08 ^b ₍₁₎	5.30 ± 0.12 ^c ₍₁₎

^{a-c} Des lettres non identiques sur une même ligne indiquent une différence significative entre les résultats des groupes expérimentaux ($P \leq 0.05$)

¹⁻⁴ Des chiffres non identiques sur une même colonne indiquent une différence significative entre les résultats obtenus à divers temps ($P \leq 0.05$)

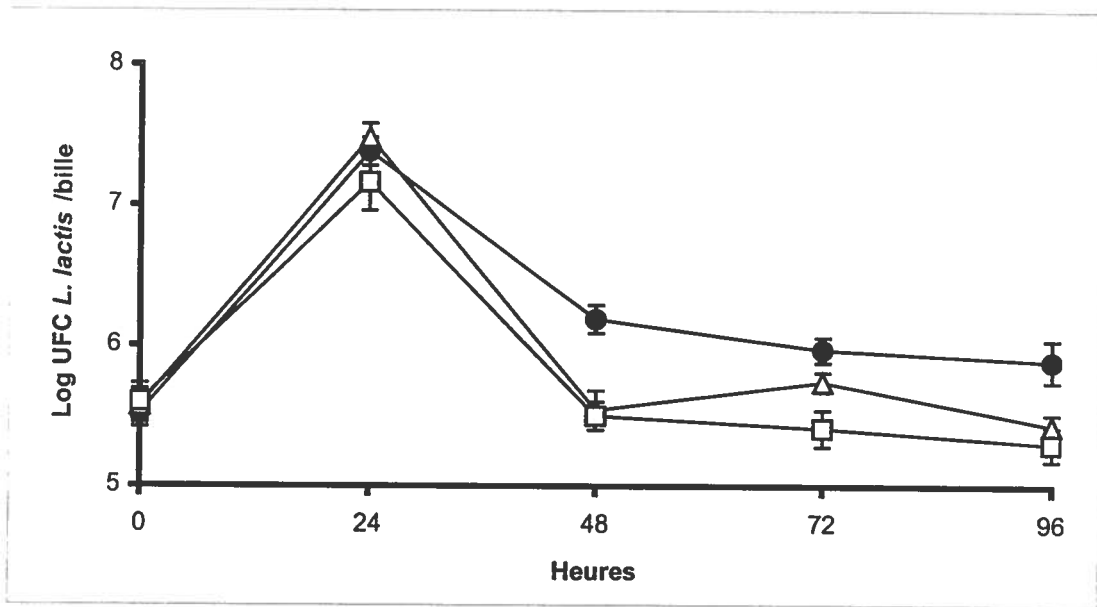


Figure 12 : Influence de la concentration en alginate entrant dans la formulation des billes sur la croissance de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 piégés à l'intérieur des billes. % d'alginate: (●) 1%; (Δ) 1.5%; (□) 2%

Tableau 11 : Évolution du pH d'un surnageant d'eau peptonée contenant *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 encapsulés dans des billes possédant diverses concentrations d'alginate.

Heures	% d'alginate			
	0%	1%	1.5%	2%
0	7.23 ± 0.04 ^a ₍₁₎	7.28 ± 0.03 ^b ₍₂₎	7.28 ± 0.02 ^b ₍₂₎	7.29 ± 0.02 ^b ₍₂₎
24	7.54 ± 0.03 ^a ₍₂₎	7.16 ± 0.02 ^b ₍₁₎	7.12 ± 0.03 ^b ₍₁₎	7.12 ± 0.03 ^b ₍₁₎
48	7.64 ± 0.03 ^a ₍₃₎	7.45 ± 0.04 ^b ₍₃₎	7.41 ± 0.02 ^b ₍₃₎	7.41 ± 0.03 ^b ₍₃₎
72	7.90 ± 0.05 ^a ₍₄₎	7.76 ± 0.08 ^a ₍₅₎	7.91 ± 0.19 ^a ₍₅₎	7.75 ± 0.02 ^a ₍₅₎
96	7.68 ± 0.02 ^a ₍₃₎	7.58 ± 0.03 ^b ₍₄₎	7.59 ± 0.03 ^b ₍₄₎	7.59 ± 0.02 ^b ₍₄₎

^{a-b} Des lettres non identiques sur une même ligne indiquent une différence significative entre les résultats des groupes expérimentaux ($P \leq 0.05$)

¹⁻⁵ Des chiffres non identiques sur une même colonne indiquent une différence significative entre les résultats obtenus à divers temps ($P \leq 0.05$)

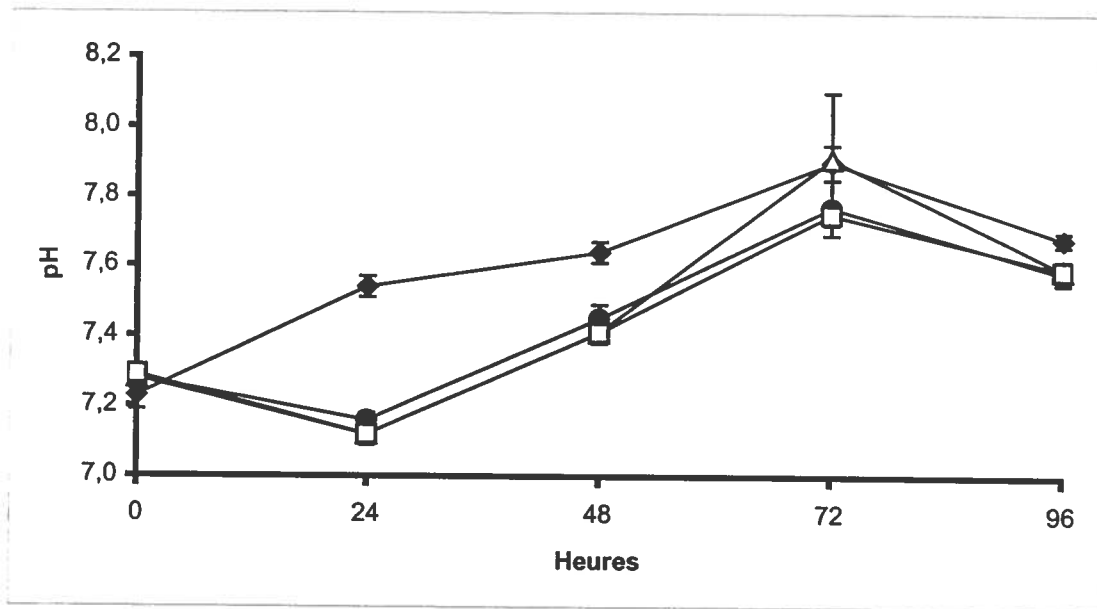


Figure 13 : Évolution du pH d'un surnageant d'eau peptonée contenant *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 encapsulés dans des billes possédant diverses concentrations d'alginate. % d'alginate: (◆) 0%; (●) 1%; (△) 1.5%; (□) 2%

1.2. Concentration optimale de lactosérum

La concentration optimale de lactosérum entrant dans la formulation des billes a été déterminée selon les trois critères qui ont précédemment servi à déterminer la concentration optimale de l'alginate. Premièrement, la figure 14 et le tableau 12 permettent de visualiser la croissance des BAL dans des surnageants contenant des billes incorporant diverses concentrations de lactosérum. Il est à remarquer que la vitesse de croissance est proportionnelle à la concentration de lactosérum. Une augmentation de la concentration de BAL a été observée pour tous les traitements à l'étude. Cependant, plus la concentration de WPC était importante et plus la quantité de BAL était élevée. Le tableau 12 indique des différences significatives ($P \leq 0.05$) entre les différents groupes à l'étude. Après 48 heures d'incubation, les concentrations de BAL étaient respectivement de 2.5, 3.5, 4.5 et 5.5 \log_{10} UFC mL^{-1} pour les billes contenant 0.5%, 1%, 2% et 4% de WPC. De plus, la concentration de BAL a été significativement plus élevée ($P \leq 0.05$) dans le cas du groupe 4% WPC. Entre 48 et 96 heures, une diminution significative ($P \leq 0.05$) de 2.77 à 1.94 \log UFC mL^{-1} a été observée dans le cas des échantillons contenant des billes faites de 0.5% de WPC. Après 96 heures, le contenu en BAL dans le surnageant était de 1.94 \log_{10} UFC mL^{-1} dans le cas des échantillons contenant des billes de 0.5% WPC. La concentration de *L. lactis* dans le surnageant des billes contenant 1% WPC était de 4.22 \log_{10} UFC mL^{-1} , de 5.00 \log_{10} UFC mL^{-1} pour le groupe 2% WPC et 5.20 \log_{10} UFC mL^{-1} dans le cas des billes contenant 4% WPC. De plus, il a été possible de voir que la concentration de BAL des échantillons de billes contenant 4% WPC était significativement supérieure ($P \leq 0.05$) aux dénombrements obtenus pour les échantillons 0.5, 1 et 2% WPC.

La figure 15 et le tableau 13 représentent les courbes de viabilité des BAL piégées dans des billes fabriquées à partir de diverses concentrations de lactosérum. Le contenu en BAL piégées varie légèrement au cours des 24 premières heures d'incubation. En ce qui concerne les billes contenant 0.5% et 1% de WPC, une diminution significative a été observée tandis que la concentration de BAL contenues dans les billes des groupes 2% et 4% a augmenté significativement ($P \leq 0.05$) à 6.66 \log_{10} UFC mL^{-1} et 6.57 \log_{10} UFC

mL⁻¹ respectivement. Il a aussi été possible de remarquer une diminution significative ($P \leq 0.05$) des BAL dénombrées à l'intérieur des billes après 48 heures d'incubation pour tous les traitements. Par contre, cette diminution a été beaucoup plus prononcée dans le cas des billes composées de 0.5% de lactosérum (3.98 log₁₀ UFC mL⁻¹). Les billes contenant 2% de lactosérum ont semblées relâcher moins rapidement les bactéries qu'elles contiennaient, c'est-à-dire que le nombre de BAL encapsulées a été plus élevé dans les billes contenant 2% de WPC que les autres formulations. En ce qui concerne les billes contenant 0.5% de WPC, il y a eu une diminution de 3.98 log₁₀ UFC mL⁻¹ de BAL à 2.34₁₀ log UFC mL⁻¹ entre 48 et 96 heures. En présence de concentrations supérieures à 1% de WPC, le contenu en BAL a été significativement supérieur ($P \leq 0.05$). En effet, après 96 heures d'incubation, des comptes microbiens de 5.03 log₁₀ UFC mL⁻¹, de 5.10 log₁₀ UFC mL⁻¹ et de 4.61 log₁₀ UFC mL⁻¹ ont été dénombrés pour les billes incorporant 1%, 2% et 4% de WPC respectivement.

La figure 16 et le tableau 14 montrent l'évolution des pH des surnageants d'eau peptonée contenant diverses formulations de billes (concentrations en lactosérum variant entre 0.5% et 4%). Lors de l'analyse des pH des surnageants, seulement les billes formulées à partir de 1% et 2% de lactosérum ont permis une réduction significative ($p \leq 0.05$) de ce pH après 12 heures d'incubation (tableau 14). En effet, le surnageant s'est acidifié en passant d'un pH de 6.89 à pH 6.64 en 12 heures d'incubation pour les billes contenant 1% de WPC. Le pH initial du surnageant des billes formulées à partir de 2% WPC était de 6.89 et a diminué à 6. Les résultats ont démontré qu'il n'y a pas une acidification significative ($P > 0.05$) pour les échantillons contenant les billes de 4% de WPC. À partir de 12 heures, il y a une augmentation du pH et le maximum a été obtenu à 72 heures d'incubation. Les valeurs à ce stade étaient de 7.22, 7.53, 7.48 et 7.47 pour les échantillons contenant des billes formulées de 0.5%, 1%, 2% et 4% de WPC respectivement. À 96 heures d'incubation, les valeurs de pH étaient de 7.22 pour les échantillons contenant les billes de 0.5% WPC, de 7.48 pour les billes de 1% WPC et 7.57 et 7.44 respectivement pour les surnageants contenant les billes formulées de 2% et 4% WPC. En général, après 12 heures d'incubation, toutes les formulations de billes ont causé une augmentation du pH du milieu d'eau peptonée.

Tableau 12 : Influence de la concentration en lactosérum entrant dans la formulation des billes sur la croissance de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 (log UFC mL⁻¹) retrouvés dans le surnageant.

Heures	% lactosérum			
	0.5%	1%	2%	4%
0	0.68 ± 0.19 ^a ₍₁₎	0.78 ± 0.31 ^{a,b} ₍₁₎	0.99 ± 0.24 ^b ₍₁₎	1.32 ± 0.19 ^c ₍₁₎
12	2.30 ± 0.13 ^a ₍₃₎	3.29 ± 0.14 ^b ₍₂₎	3.64 ± 0.38 ^c ₍₂₎	4.09 ± 0.10 ^d ₍₂₎
24	2.72 ± 0.07 ^a ₍₄₎	3.88 ± 0.11 ^b ₍₄₎	4.71 ± 0.09 ^c ₍₃₎	5.22 ± 0.03 ^d ₍₃₎
48	2.77 ± 0.06 ^a ₍₄₎	4.43 ± 0.11 ^b ₍₆₎	5.44 ± 0.04 ^c ₍₅₎	6.06 ± 0.04 ^d ₍₄₎
72	2.28 ± 0.09 ^a ₍₃₎	3.66 ± 0.11 ^b ₍₃₎	4.94 ± 0.04 ^c ₍₄₎	5.20 ± 0.06 ^d ₍₃₎
96	1.94 ± 0.18 ^a ₍₂₎	4.22 ± 0.10 ^b ₍₅₎	5.00 ± 0.10 ^c ₍₄₎	5.20 ± 0.06 ^d ₍₃₎

^{a-d} Des lettres non identiques sur une même ligne indiquent une différence significative entre les résultats des groupes expérimentaux ($P \leq 0.05$)

¹⁻⁶ Des chiffres non identiques sur une même colonne indiquent une différence significative entre les résultats obtenus à divers temps ($P \leq 0.05$)

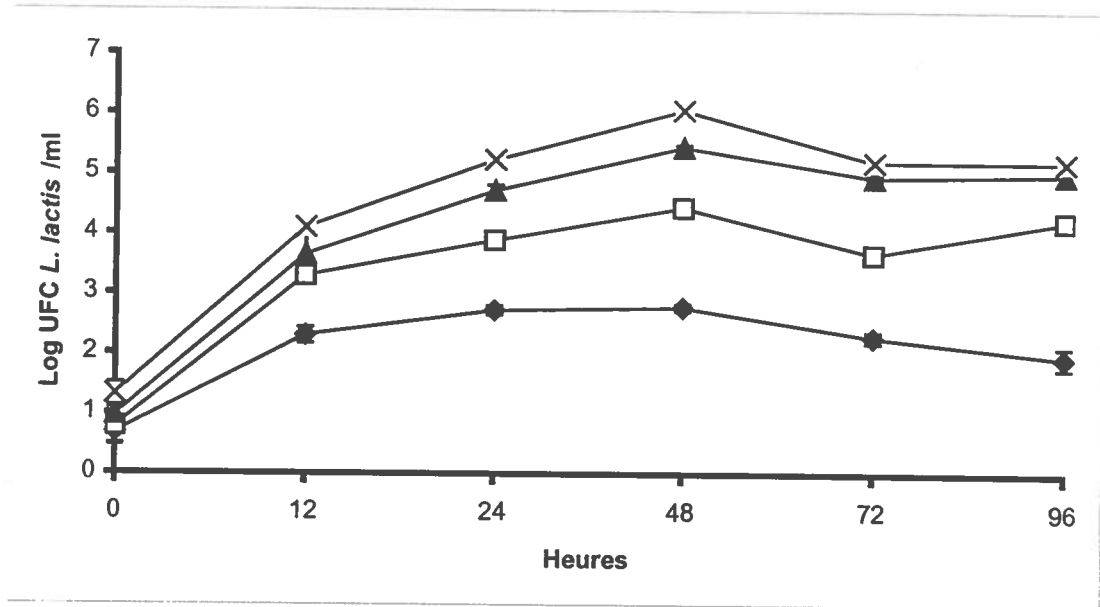


Figure 14 : Influence de la concentration en lactosérum entrant dans la formulation des billes sur la croissance de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 retrouvés dans le surnageant. % de lactosérum: (◆) 0.5%; (□) 1%; (▲) 2%; (×) 4%

Tableau 13 : Influence de la concentration en lactosérum entrant dans la formulation des billes sur la croissance de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 (log UFC mL⁻¹) retrouvés à l'intérieur des billes.

Heures	% lactosérum			
	0.5%	1%	2%	4%
0	6.27 ± 0.05 ^a ₍₆₎	6.29 ± 0.09 ^a ₍₄₎	6.34 ± 0.06 ^a ₍₃₎	6.31 ± 0.07 ^a ₍₄₎
12	6.43 ± 0.15 ^a ₍₅₎	6.44 ± 0.14 ^a ₍₅₎	6.69 ± 0.06 ^b ₍₄₎	6.50 ± 0.18 ^a ₍₅₎
24	5.90 ± 0.16 ^a ₍₄₎	6.29 ± 0.13 ^b ₍₄₎	6.66 ± 0.07 ^c ₍₄₎	6.57 ± 0.06 ^c ₍₅₎
48	3.98 ± 0.08 ^a ₍₃₎	5.57 ± 0.10 ^b ₍₃₎	5.75 ± 0.19 ^c ₍₂₎	6.15 ± 0.03 ^d ₍₃₎
72	2.76 ± 0.08 ^a ₍₂₎	3.84 ± 0.06 ^b ₍₁₎	5.20 ± 0.04 ^d ₍₁₎	4.86 ± 0.07 ^c ₍₂₎
96	2.34 ± 0.11 ^a ₍₁₎	5.03 ± 0.11 ^c ₍₂₎	5.10 ± 0.06 ^c ₍₁₎	4.61 ± 0.13 ^b ₍₁₎

^{a-d} Des lettres non identiques sur une même ligne indiquent une différence significative entre les résultats des groupes expérimentaux ($P \leq 0.05$)

¹⁻⁶ Des chiffres non identiques sur une même colonne indiquent une différence significative entre les résultats obtenus à divers temps ($P \leq 0.05$)

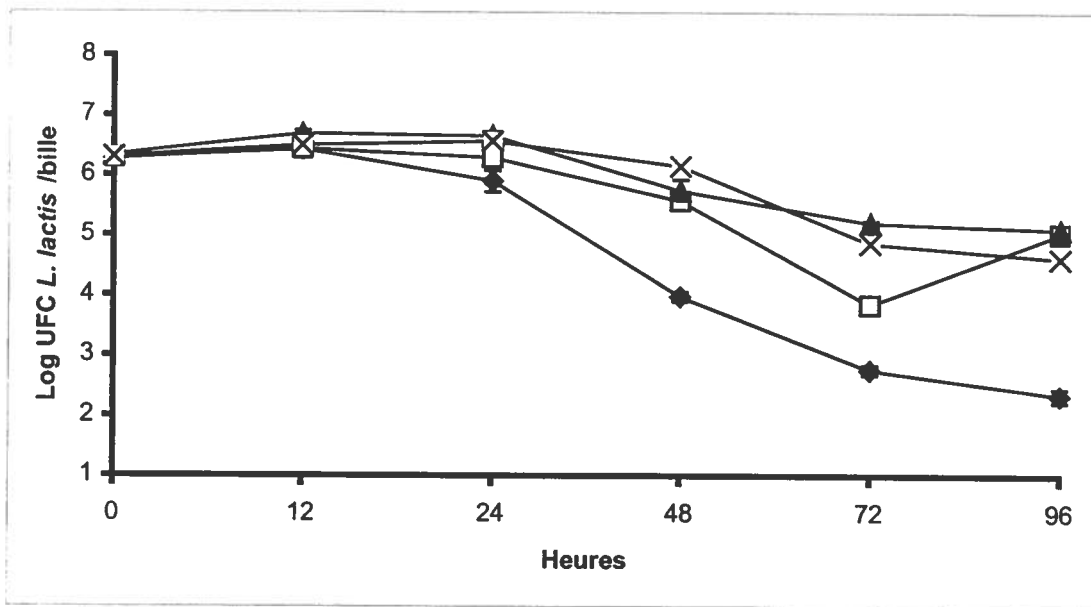


Figure 15 : Influence de la concentration en lactosérum entrant dans la formulation des billes sur la croissance de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 retrouvés à l'intérieur des billes. % de lactosérum : (◆) 0.5%; (□) 1%; (▲) 2%; (×) 4%

Tableau 14 : Évolution du pH d'un surnageant d'eau peptonée contenant *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 encapsulés dans des billes possédant diverses concentrations de lactosérum.

Heures	% lactosérum			
	0.5%	1%	2%	4%
0	6.93 ± 0.04 ^a ₍₁₎	6.89 ± 0.10 ^a ₍₂₎	6.89 ± 0.04 ^a ₍₂₎	6.93 ± 0.06 ^a ₍₁₎
12	6.96 ± 0.13 ^a ₍₁₎	6.64 ± 0.10 ^b ₍₁₎	6.66 ± 0.12 ^b ₍₁₎	6.84 ± 0.06 ^a ₍₁₎
24	7.03 ± 0.08 ^a ₍₁₎	7.06 ± 0.08 ^a ₍₃₎	7.06 ± 0.11 ^a ₍₂₎	7.17 ± 0.18 ^a ₍₂₎
48	7.04 ± 0.08 ^a ₍₁₎	7.23 ± 0.05 ^b ₍₄₎	7.25 ± 0.16 ^b ₍₃₎	7.39 ± 0.07 ^b ₍₃₎
72	7.22 ± 0.10 ^a ₍₂₎	7.53 ± 0.08 ^b ₍₅₎	7.48 ± 0.15 ^b ₍₄₎	7.47 ± 0.14 ^b ₍₃₎
96	7.22 ± 0.04 ^a ₍₂₎	7.48 ± 0.03 ^b ₍₅₎	7.57 ± 0.02 ^c ₍₄₎	7.44 ± 0.10 ^b ₍₃₎

^{a-c} Des lettres non identiques sur une même ligne indiquent une différence significative entre les résultats des groupes expérimentaux ($P \leq 0.05$)

¹⁻⁵ Des chiffres non identiques sur une même colonne indiquent une différence significative entre les résultats obtenus à divers temps ($P \leq 0.05$)

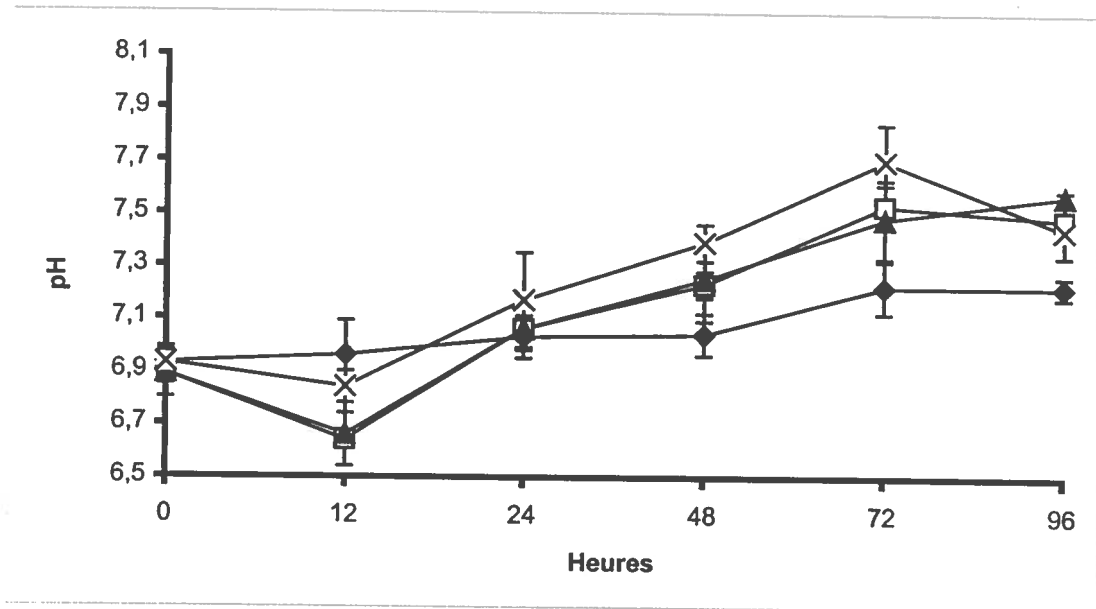


Figure 16 : Évolution du pH d'un surnageant d'eau peptonée contenant *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 encapsulés dans des billes possédant diverses concentrations de lactosérum. % de lactosérum : (◆) 0.5%; (×) 1%; (▲) 2% lactosérum; (□) 4%

2. Tests antimicrobiens

Les résultats précédents ont démontré que la formulation à base de 1.5% (p/v) d'alginate permettait de conserver une bonne viabilité des BAL, une légère acidification d'un milieu pauvre tout en offrant d'excellentes qualités structurales (solidité et uniformité) ainsi qu'une bonne facilité de préparation des billes. Le choix de 2% WPC était justifié parce qu'à cette concentration, la croissance des BAL à l'extérieur des billes ainsi que le relargage modéré de *L. lactis* vers l'extérieur des billes étaient supérieurs. Afin de démontrer que *L. lactis* immobilisé a conservé sa capacité à produire la nisine, les tests *in vitro*, rapides et efficaces, ont été réalisés en premier. Les expériences d'inhibition de pathogènes en milieu carné, plus longues et délicates, ont suivi.

2.1. Test « Agar spot »

La première expérience avait comme objectif d'évaluer le pouvoir antimicrobien de *L. lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 sous forme de cellules libres et encapsulées. Un test « agar spot » a été choisi pour évaluer le pouvoir antimicrobien de *L. lactis* contre des bactéries autant Gram positives que Gram négatives. Les bactéries choisies ont été : *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Escherichia*, *Pseudomonas* et *Salmonella*. Le tableau 15 démontre clairement que toutes les bactéries Gram positives ont été effectivement inhibées autant par *L. lactis* libre qu'encapsulé. L'étude faite avec les cellules libres montre une zone d'inhibition ≥ 11 mm contre *Lactobacillus sake*. Des zones d'inhibition variant entre 6 et 10 mm ont été observées contre *Lactobacillus curvatus*, *Micrococcus varians*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Pedococcus acidilactici* et *Staphylococcus aureus*. Aucune inhibition n'a été notée lorsque les souches indicatrices étaient des bactéries Gram négatives. Dans le cas de *Lactococcus lactis* encapsulés, une zone d'inhibition (≥ 11 mm) de la croissance de *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus sake* et *Pediococcus acidilactici* et des zones claires témoignant de l'inhibition de croissance variant entre 6 et 10 mm ont été mesurées dans le cas de *Micrococcus varians*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* et *Staphylococcus aureus*. Ainsi, *L. lactis* a conservé son pouvoir antimicrobien même

lorsque les bactéries ont été immobilisées à l'intérieur de billes d'alginate. De plus, les résultats ont démontré que *L. sake* était la souche indicatrice la plus sensible aux substances antimicrobiennes produites par *L. lactis* (autant libre qu'encapsulé). Afin de vérifier si l'inhibition était causée par la production et la sécrétion de nisine par *L. lactis*, les géloses ont été additionnées d'enzymes protéolytiques. Les résultats consignés dans le tableau 15 démontrent clairement que l'inhibition était causée par une bactériocine.

2.2. Temps minimal requis afin de produire une zone d'inhibition

Une cinétique de destruction du pathogène alimentaire *Staphylococcus aureus* a été réalisée afin de connaître à quel moment la nisine commençait à être produite et sécrétée par *L. lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 encapsulé. Par cette expérience, il était aussi important de prendre connaissance de la durée de sécrétion de la nisine dans un milieu semi-ferme. L'inhibition de croissance était visible par l'apparition de zone claire indiquant l'absence de croissance du pathogène sur une gélose. Les concentrations d'alginate de 1%, 1.5% et 2% ainsi que la formulation de bille optimisée (1.5% alginate et 2% WPC) ont été testées afin de vérifier l'influence de la formulation des billes sur la cinétique de destruction de *S. aureus*. La figure 17 et le tableau 16 indiquent clairement que le temps minimal requis pour produire une zone d'inhibition visible est entre 4 et 8 heures. De plus, la surface d'inhibition a augmenté proportionnellement avec le temps d'incubation (35°C) jusqu'à un maximum qui a été atteint après 24 heures pour toutes les formulations testées. Une autre constatation était que la formulation des billes a semblé jouer un rôle important dans la superficie des zones claires indiquant l'inhibition. En effet, il est possible de remarquer que les billes à base d'alginate 1.5% ont formé des zones d'inhibition avec une plus vaste superficie. Les billes formulées à base de 2% d'alginate et celles possédant les concentrations optimales en polysaccharide (1.5%) et en WPC (2%) étaient pratiquement identiques pour la durée de l'analyse. Finalement, les billes composées de 1% d'alginate ont semblé produire la plus petite superficie d'inhibition tout au cours de l'expérience.

Tableau 15 : Activité antimicrobienne de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 contre diverses souches indicatrices

Souches indicatrices	Coloration gram	Cellules libres				Cellules encapsulées	
		Rayon d'inhibition ^a				sans protéase	avec protéase
		sans protéase		avec protéase			
<i>Micrococcus varians</i>	+	++	-	++	-		
<i>Lactobacillus curvatus</i>	+	++	-	+++	-		
<i>Lactobacillus sake</i>	+	+++	-	+++	-		
<i>Enterococcus faecalis</i>	+	++	-	++	-		
<i>Enterococcus faecium</i>	+	++	-	++	-		
<i>Pediococcus acidilactici</i>	+	++	-	+++	-		
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	++	-	++	-		
<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-	-		
<i>Pseudomonas putida</i>	-	-	-	-	-		
<i>Salmonella typhi</i>	-	-	-	-	-		

^a+ : entre 1 et 5 mm de rayon d'inhibition; ++ : entre 6 et 10 mm de rayon d'inhibition; +++ : 11 mm et plus de rayon d'inhibition ; - pas d'inhibition

Tableau 16 : Cinétique d'inhibition de la croissance de *S. aureus* provoquée par différentes formulations d'encapsulation de *L. lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454

Temps d'incubation (heures)	Surface d'inhibition (mm ²)			
	Alginate 1%	Alginate 1.5%	Alginate 1.5%	Alginate 1.5% + WPC 2%
0	0	0	0	0
2	0	0	0	0
4	2.54 ± 0.16 ^a ₍₁₎	5.94 ± 0.20 ^c ₍₁₎	3.14 ± 0 ^b ₍₁₎	3.98 ± 0.72 ^b ₍₁₎
6	12.57 ± 0 ^c ₍₂₎	11.04 ± 0.20 ^b ₍₂₎	9.08 ± 0.24 ^a ₍₂₎	8.04 ± 2.12 ^a ₍₂₎
8	19.63 ± 0 ^b ₍₃₎	40.72 ± 0.16 ^c ₍₃₎	14.19 ± 0.20 ^a ₍₃₎	15.90 ± 0.79 ^a ₍₃₎
10	40.72 ± 0.16 ^c ₍₄₎	52.81 ± 0.16 ^d ₍₄₎	26.42 ± 0.16 ^a ₍₄₎	28.27 ± 0 ^b ₍₄₎
12	63.62 ± 0 ^c ₍₅₎	81.71 ± 0.16 ^d ₍₅₎	43.01 ± 0.24 ^a ₍₅₎	58.09 ± 0.24 ^b ₍₅₎
14	75.43 ± 0.55 ^b ₍₆₎	91.61 ± 0.55 ^c ₍₆₎	55.42 ± 0.24 ^a ₍₆₎	75.43 ± 0.16 ^b ₍₆₎
16	84.95 ± 0.24 ^b ₍₇₎	105.68 ± 0.63 ^d ₍₇₎	72.38 ± 0.24 ^a ₍₇₎	88.25 ± 0.24 ^c ₍₇₎
18	102.07 ± 0.24 ^a ₍₈₎	124.95 ± 0.24 ^c ₍₈₎	91.61 ± 0.55 ^a ₍₈₎	102.07 ± 0.63 ^b ₍₈₎
20	109.36 ± 0.94 ^c ₍₉₎	128.68 ± 0.55 ^d ₍₉₎	95.03 ± 0.39 ^a ₍₉₎	102.07 ± 0.63 ^b ₍₈₎
22	124.69 ± 0.63 ^c ₍₁₀₎	149.57 ± 0.16 ^d ₍₁₀₎	120.76 ± 0.24 ^b ₍₁₀₎	116.90 ± 0.16 ^a ₍₉₎
24	145.27 ± 0.24 ^c ₍₁₁₎	153.54 ± 0 ^d ₍₁₁₎	127.68 ± 0.20 ^a ₍₁₁₎	141.03 ± 0.24 ^b ₍₁₀₎

^{a-d} Des lettres non identiques sur une même ligne indiquent une différence significative entre les résultats des groupes expérimentaux ($P \leq 0.05$)

¹⁻¹¹ Des chiffres non identiques sur une même colonne indiquent une différence significative entre les résultats obtenus à divers temps ($P \leq 0.05$)

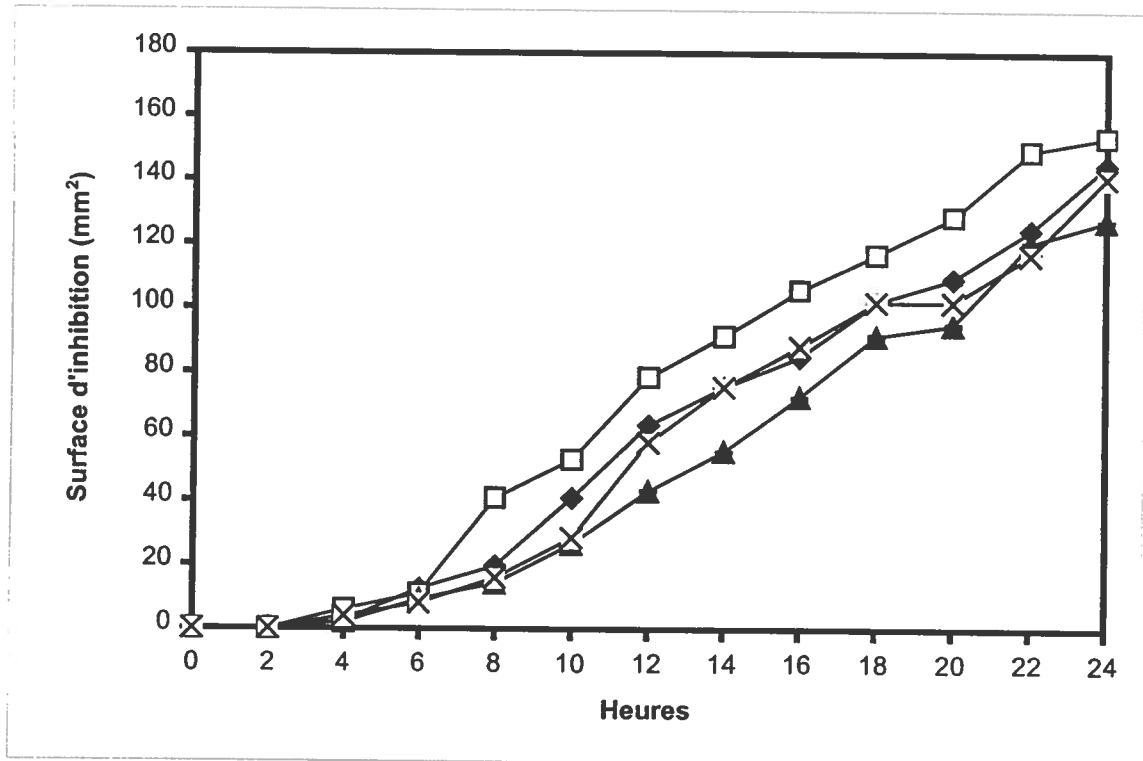


Figure 17 : : Cinétique d'inhibition de la croissance de *S. aureus* provoquée par différentes formulations d'encapsulation de *L. lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454. Formulations: (◆)1% alginate, (□) 1.5% alginate, (▲) 2% alginate, (×) 1.5% alginate + 2% WPC.

2.3. Inhibition des bactéries Gram négatives

À la suite des premières expériences antimicrobiennes, l'incapacité de *L. lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 à inhiber les bactéries Gram négatives a été remarqué. Stevens *et al.* (1992) ont démontré que l'ajout d'un agent chélateur à la nisine avait permis l'inhibition de certaines espèces bactériennes. Donc, l'effet antimicrobien de billes de *L. lactis* en présence d'EDTA, le meilleur agent chélateur accepté par la FDA, a été vérifié contre diverses souches microbiennes gram négatives.

Le tableau 17 montre l'efficacité de *L. lactis* encapsulés à inhiber la croissance d'*Escherichia coli*, un bacille Gram négatif, en combinaison avec différentes concentrations d'un composé chélateur (EDTA). Différents temps de contact entre les souches indicatrices et l'EDTA dans la gélose liquide furent aussi testés afin de faciliter la rencontre du chélateur avec les parois bactériennes. Le témoin positif, une bactérie Gram positive (*S. aureus*), a été utilisé comme comparaison avec les microorganismes Gram négatifs.

L'EDTA n'a pas d'effet synergique sur la croissance de *S. aureus*. En effet, pour toutes les concentrations testées, l'agent responsable de la chélation n'a pas augmenté la zone d'inhibition lorsque *S. aureus* était utilisé comme souche indicatrice. Cette zone d'inhibition se situait entre 6 et 10 mm. D'autre part, la croissance d'*Escherichia coli* a été inhibée avec l'ajout d'aussi peu que 0.01 mol L^{-1} d'EDTA, ce qui n'était pas le cas en absence d'EDTA. La zone d'inhibition se situait entre 1 et 5 mm de rayon. De plus, la fragilisation de la paroi de ce coliforme ne semblait pas nécessiter de temps de contact en milieu liquide puisque la zone d'inhibition a été observée même sans temps de contact en milieu liquide.

Par contre, le tableau 17 montre aussi l'incapacité pour *L. lactis* à empêcher la croissance de *Pseudomonas putida* et de *Salmonella typhi* et ce dans le cas de toutes les concentrations d'EDTA à l'étude et de tous les temps de contact en milieu liquide testés. Ceci implique donc que les concentrations d'EDTA testées sont inefficaces pour percer la paroi de ces bactéries.

Tableau 17 : Surface d'inhibition^a produite par *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 encapsulés contre des bactéries Gram négative en présence d'EDTA.

Souches indicatrices	EDTA (mol L ⁻¹)	Temps de contact avec l'EDTA en milieu liquide (minutes)					
		0	2	4	6	8	10
<i>Staphylococcus aureus</i> (témoin)	0	++	++	++	++	++	++
	0.01	++	++	++	++	++	++
	0.03	++	++	++	++	++	++
	0.05	++	++	++	++	++	++
	0.10	++	++	++	++	++	++
	0.15	++	++	++	++	++	++
<i>Escherichia coli</i>	0	-	-	-	-	-	-
	0.01	+	+	+	+	+	+
	0.03	+	+	+	+	+	+
	0.05	+	+	+	+	+	+
	0.10	+	+	+	+	+	+
	0.15	+	+	+	+	+	++
<i>Pseudomonas putida</i>	0	-	-	-	-	-	-
	0.01	-	-	-	-	-	-
	0.03	-	-	-	-	-	-
	0.05	-	-	-	-	-	-
	0.10	-	-	-	-	-	-
	0.15	-	-	-	-	-	-
<i>Salmonella typhi</i>	0	-	-	-	-	-	-
	0.01	-	-	-	-	-	-
	0.03	-	-	-	-	-	-
	0.05	-	-	-	-	-	-
	0.10	-	-	-	-	-	-
	0.15	-	-	-	-	-	-

^a+ : entre 1 et 5 mm de rayon d'inhibition; ++ : entre 6 et 10 mm de rayon d'inhibition; +++ : 11 mm et plus de rayon d'inhibition ; - pas d'inhibition

3. Destruction de *S. aureus* dans du bœuf haché par *L. lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 encapsulé.

Les expériences précédentes ont permis de faire la démonstration que *L. lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 encapsulé conservait sa capacité à produire la nisine. Les résultats des tests *in vitro* ont aussi montré que cette nisine était excrétée à l'extérieur des billes et qu'elle pouvait empêcher la croissance d'un pathogène alimentaire (*Staphylococcus aureus*) dans un milieu semi-ferme (gélose nutritive). Cette technologie a par la suite été appliquée dans le bœuf haché afin d'en assurer l'innocuité. La première partie de l'expérience a été réalisée à la température optimale de croissance des BAL (35°C) afin de s'assurer de la capacité de *L. lactis* à pouvoir inhiber ou ralentir la croissance de *S. aureus*.

3.1. Incubation du bœuf haché à la température de 35°C

La figure 18 et le tableau 18 montrent la croissance de la bactérie pathogène *S. aureus* dans du bœuf haché à 35°C. Le suivi de la viabilité de *S. aureus* a été effectué afin de servir de témoin. La croissance de *S. aureus* a été suivie lorsque le bœuf haché était co-inoculé avec *S. aureus* et *L. lactis* libres ou *L. lactis* encapsulés.

Le tableau 18 montre les résultats obtenus à 35°C. La croissance de *S. aureus* dans les échantillons de bœuf haché a été ralentie en présence de BAL libres durant les jours 2 et 3 par rapport au témoin ne contenant que *S. aureus*. En effet, entre le jour 2 et le jour 3, une diminution moyenne significative ($P \leq 0.05$) de $1.03 \log_{10} \text{ UFC g}^{-1}$ a été observée. Par la suite, il n'y a plus de différence significative entre les groupes expérimentaux ($P > 0.05$). Par contre, les concentrations de *S. aureus* dans les échantillons témoin ont augmentées jusqu'au jour 2 avant de se stabiliser. Il n'y a eu pas de différence significative ($P > 0.05$) entre le groupe témoin et le groupe co-inoculé avec les BAL encapsulées quelque soit le jour d'analyse. Les concentrations finales de *S. aureus*, soit au jour 5, étaient de 7.69, 7.33 et 7.86 pour les groupes témoin, BAL libres et BAL encapsulées respectivement. Une différence significative ($P \leq 0.05$) a été observée dans le groupe BAL libres par rapport aux deux autres groupes.

En parallèle, dans les mêmes échantillons, le dénombrement des BAL a été analysé. Les résultats sont montrés dans la figure 19 et le tableau 19. En ce qui à trait aux échantillons témoins, c'est-à-dire les échantillons ne contenant pas de BAL, mais seulement contaminés par *S. aureus*, aucune BAL n'a été dénombrée tel que prévu. Dans le cas des échantillons de bœuf haché co-inoculés avec *L. lactis* libres ou encapsulés, une concentration initiale de BAL d'environ $5.42 \log_{10} \text{ UFC g}^{-1}$ a été mesurée. La concentration en BAL a rapidement augmenté à $7.74 \pm 0.07 \log_{10} \text{ UFC g}^{-1}$ et $7.79 \pm 0.06 \log_{10} \text{ UFC g}^{-1}$ dans les échantillons contenant les BAL libres et encapsulées respectivement au jour 2. Par la suite, les concentrations ont augmenté très légèrement jusqu'à la fin de l'expérience pour atteindre $7.95 \pm 0.11 \log_{10} \text{ UFC g}^{-1}$ et $8.03 \pm 0.09 \log_{10} \text{ UFC g}^{-1}$ respectivement au jour 5.

Le pH des échantillons a été mesuré pendant les 5 jours d'entreposage. Dans les échantillons témoins (contenant seulement *S. aureus*), une légère diminution du pH a été remarquée après 24 heures d'incubation signe de l'activité métabolique de *S. aureus* (figure 20). Cette diminution a été inversement proportionnelle à la concentration de *S. aureus* dans la viande. Par la suite, et ce jusqu'à la fin des manipulations, aucune variation significative ($P > 0.05$) du pH n'a été observée (tableau 20). Dans les échantillons contaminés avec *S. aureus* et les BAL libres, une forte diminution du pH a été observée après 24 heures d'incubation. En effet, le pH a passé de 6.03 ± 0.02 à 5.40 ± 0.03 . Aucune variation n'a été observée le jour suivant ($P > 0.05$) avant de remonter légèrement aux jours 4 et 5. Il n'y a pas eu de différence significative entre les échantillons co-inoculés par les BAL encapsulées et le témoin au cours des deux premiers jours d'incubation tandis qu'une augmentation forte et constante a été mesurée durant les jours suivants. À la fin de l'expérience, le pH des échantillons contenant des BAL encapsulées était de 6.17 ± 0.08 comparativement à 5.65 et 5.78 respectivement pour les groupes témoin et BAL libres. L'analyse statistique a révélée que le pH du groupe BAL encapsulées était significativement supérieur ($P \leq 0.05$) que les échantillons témoin et BAL libres.

Tableau 18 : Croissance de *S. aureus* (log UFC g⁻¹) dans du bœuf haché inoculé avec *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 incubé à 35°C.

Jours	Témoin	BAL libres	BAL encapsulées
1	3.29 ± 0.06 ^a ₍₁₎	3.31 ± 0.06 ^a ₍₁₎	3.32 ± 0.05 ^a ₍₁₎
2	7.18 ± 0.05 ^a ₍₂₎	6.15 ± 0.07 ^b ₍₂₎	7.19 ± 0.04 ^a ₍₂₎
3	7.60 ± 0.10 ^a ₍₃₎	6.56 ± 0.05 ^b ₍₃₎	7.65 ± 0.05 ^a ₍₃₎
4	7.06 ± 0.05 ^a ₍₂₎	7.14 ± 0.04 ^b ₍₄₎	7.18 ± 0.03 ^b ₍₂₎
5	7.69 ± 0.38 ^b ₍₃₎	7.33 ± 0.05 ^a ₍₅₎	7.86 ± 0.04 ^b ₍₄₎

^{a-b} Des lettres non identiques sur une même ligne indiquent une différence significative entre les résultats des groupes expérimentaux ($P \leq 0.05$)

¹⁻⁵ Des chiffres non identiques sur une même colonne indiquent une différence significative entre les résultats obtenus à divers temps ($P \leq 0.05$)

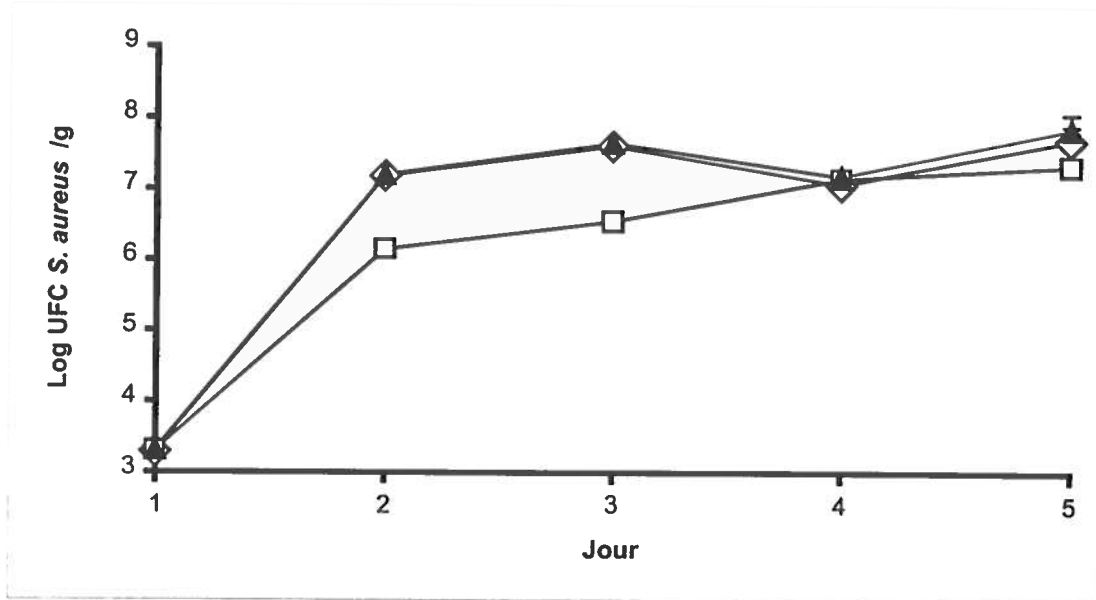


Figure 18 : Croissance de *S. aureus* dans du bœuf haché inoculé avec *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 incubé à 35°C. Formulations : (◇) témoin; (□) BAL libres; (▲) BAL encapsulées

Tableau 19 : Croissance de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 (log UFC g⁻¹) dans du bœuf contaminé par *S. aureus* incubé à 35°C.

Jours	BAL libres	BAL encapsulées
1	5.42 ± 0.06 ^a ₍₁₎	5.42 ± 0.07 ^a ₍₁₎
2	7.74 ± 0.07 ^a ₍₂₎	7.79 ± 0.06 ^a ₍₂₎
3	7.72 ± 0.08 ^a ₍₂₎	7.91 ± 0.06 ^b ₍₃₎
4	7.78 ± 0.07 ^a ₍₂₎	7.79 ± 0.10 ^a ₍₂₎
5	7.95 ± 0.11 ^a ₍₃₎	8.03 ± 0.09 ^a ₍₄₎

^{a-b} Des lettres non identiques sur une même ligne indiquent une différence significative entre les résultats des groupes expérimentaux ($P \leq 0.05$)

¹⁻⁴ Des chiffres non identiques sur une même colonne indiquent une différence significative entre les résultats obtenus à divers temps ($P \leq 0.05$)

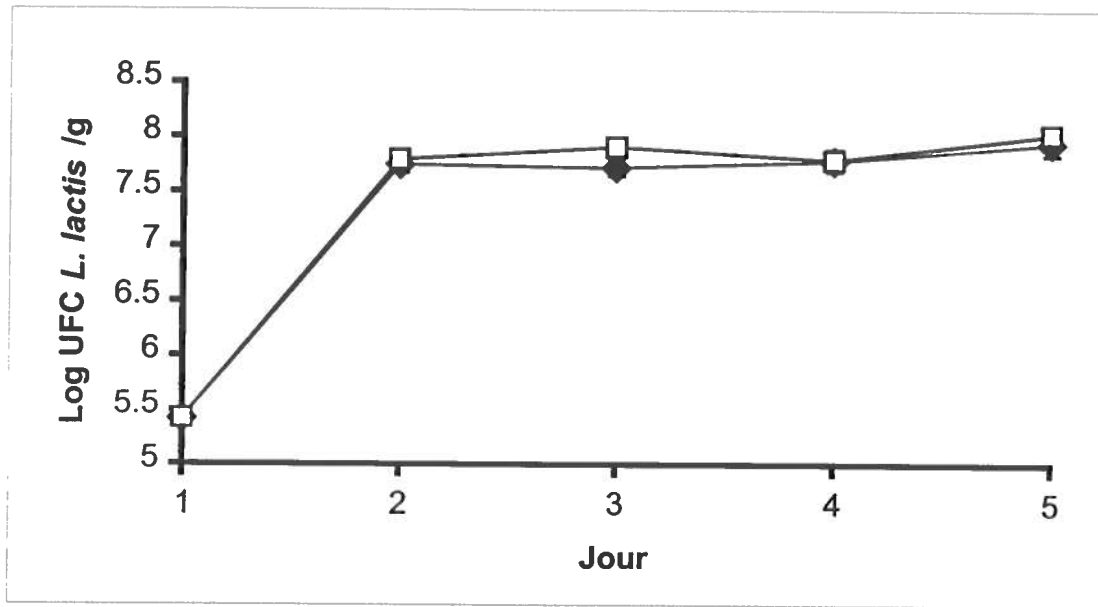


Figure 19 : Croissance de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 dans du bœuf contaminé par *S. aureus* incubé à 35°C. Formulations : (◆) BAL libres; (□) BAL encapsulées

Tableau 20 : pH du bœuf haché contaminé avec *S. aureus* et *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 incubé à 35°C.

Jours	Témoin	BAL libres	BAL encapsulées
1	5.90 ± 0.06 ^a ₍₁₎	6.03 ± 0.02 ^b ₍₄₎	6.05 ± 0.02 ^b ₍₃₎
2	5.63 ± 0.03 ^a ₍₂₎	5.40 ± 0.03 ^b ₍₁₎	5.61 ± 0.11 ^a ₍₁₎
3	5.63 ± 0.06 ^a ₍₂₎	5.43 ± 0.06 ^b ₍₁₎	5.83 ± 0.11 ^c ₍₂₎
4	5.65 ± 0.14 ^a ₍₂₎	5.62 ± 0.06 ^a ₍₂₎	6.01 ± 0.07 ^b ₍₃₎
5	5.65 ± 0.03 ^a ₍₂₎	5.78 ± 0.13 ^b ₍₃₎	6.17 ± 0.08 ^c ₍₄₎

^{a-c} Des lettres non identiques sur une même ligne indiquent une différence significative entre les résultats des groupes expérimentaux ($P \leq 0.05$)

¹⁻⁴ Des chiffres non identiques sur une même colonne indiquent une différence significative entre les résultats obtenus à divers temps ($P \leq 0.05$)

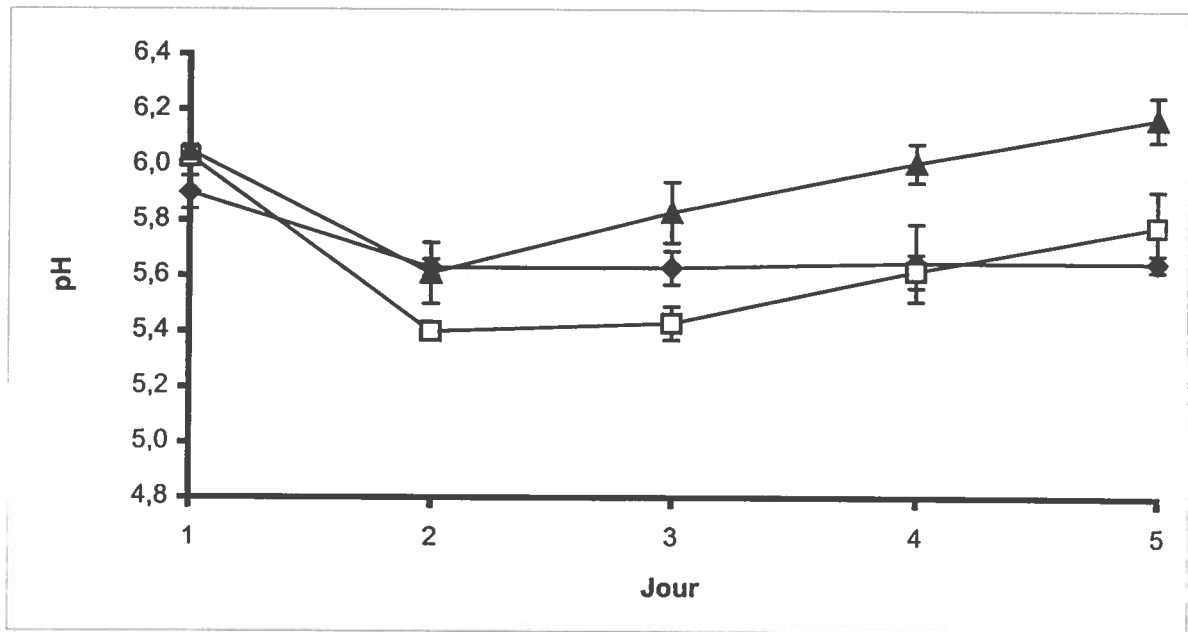


Figure 20 : pH du bœuf haché contaminé avec *S. aureus* et *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 incubé à 35°C. Formulations : (◆) témoin; (□) BAL libres; (▲) BAL encapsulées

3.2. Incubation à la température de 7°C

La figure 21 et le tableau 21 montrent les résultats du dénombrement de *S. aureus* dans des échantillons de bœuf haché conservés à 7°C et co-inoculés ou non par *L. lactis* libres ou encapsulés. Il est possible de remarquer dans le tableau 21 que la population de Staphylocoques des échantillons témoin n'a pas varié pas significativement pour la durée des analyses ($P > 0.05$). La concentration moyenne était de $3.65 \log_{10}$ UFC g^{-1} . Par contre, les groupes expérimentaux contenant des BAL se sont comportés de la même façon l'un par rapport à l'autre, en ce sens qu'ils ont causé tous deux la mortalité de *S. aureus* après 3 jours de conservation et que cette mortalité s'est poursuivie jusqu'à la fin de l'expérience. Pour toute la durée de l'expérience, les concentrations en *S. aureus* ont été significativement plus basses ($P \leq 0.05$) dans les groupes contenant des BAL que dans les groupes témoins. En effet, des diminutions significatives ($P \leq 0.05$) de $0.38 \log_{10}$ UFC g^{-1} (BAL libres) et de $0.35 \log_{10}$ UFC g^{-1} (BAL encapsulées) ont été mesurées après 3 jours de conservation à 7°C. Après 10 jours, la concentration de *S. aureus* dans le groupe témoin était de $3.78 \pm 0.05 \log_{10}$ UFC g^{-1} . L'analyse statistique a montré une différence significative ($P \leq 0.05$) entre les échantillons de viande contenant des BAL encapsulées ou non et le groupe témoin ce qui signifie que l'ajout de BAL a diminué effectivement la concentration de *S. aureus* dans le bœuf haché. La concentration de *S. aureus* était de $3.00 \pm 0.48 \log_{10}$ UFC g^{-1} pour les échantillons co-inoculés avec des BAL libres et de $2.92 \pm 0.16 \log_{10}$ UFC g^{-1} pour les échantillons co-inoculés avec des BAL encapsulées. Une mortalité du pathogène de presque $1 \log_{10}$ UFC g^{-1} a été mesurée après un entreposage de 10 jours du bœuf haché à 7°C inoculés par une culture protectrice de *L. lactis* encapsulés ou non.

Les résultats présentés dans la figure 22 et le tableau 22 montrent la croissance des BAL libres et encapsulées. Au début de l'expérience, des concentrations initiales de BAL ont été inoculées (environ $5.5 \log_{10}$ UFC g^{-1}) dans les échantillons de bœuf haché (tableau 22). Après 3 jours d'incubation à 7°C, la concentration des BAL encapsulées a augmenté légèrement ($5.79 \pm 0.11 \log_{10}$ UFC g^{-1}), tandis que la concentration de BAL

libre stagnait ($5.51 \pm 0.13 \log_{10} \text{ UFC g}^{-1}$). La concentration en BAL du groupe BAL libres est restée stable jusqu'au jour 10 tandis que la concentration de microorganismes acido-lactique du groupe BAL encapsulées a augmenté de manière significative jusqu'au jour 10. À la fin de l'expérience, la concentration de BAL libres était de $5.55 \pm 0.07 \log_{10} \text{ UFC g}^{-1}$ tandis que la concentration de BAL encapsulées a atteint $7.06 \pm 0.07 \log_{10} \text{ UFC g}^{-1}$ ($P \leq 0.05$).

Le pH des échantillons de bœuf haché a été mesuré. Le tableau 23 indique que le pH initial des groupes contenant les BAL libres (6.05 ± 0.01) et les BAL encapsulées (6.05 ± 0.02) a été significativement supérieurs ($P \leq 0.05$) au pH du groupe témoin où le pH est de 5.92 ± 0.06 . Au jour 3, une acidification significative est observée pour le groupe expérimental contenant des BAL libres (5.99 ± 0.01) ainsi que les échantillons contenant des BAL encapsulées (5.96 ± 0.05) tandis qu'aucune variation significative n'est mesurée pour le groupe témoin ($P > 0.05$). Par contre, les pH des trois groupes mesurés au jour 3 ne démontrent aucune différence significative ($p > 0.05$). Par la suite, le pH des différents groupes à l'étude a augmenté jusqu'à la fin de l'expérience. Une légère baisse significative ($P \leq 0.05$) du pH au jour 10 des échantillons co-inoculés de *S. aureus* et de BAL encapsulées a été remarquée. Cette baisse peut s'expliquer par la poussée de croissance des BAL durant cette période.

Tableau 21 : Croissance de *S. aureus* (log UFC g⁻¹) dans du bœuf haché inoculé avec *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 et incubé à 7°C.

Jours	Témoin	BAL libres	BAL encapsulées
1	3.67 ± 0.21 ^a ₍₁₎	3.70 ± 0.37 ^a ₍₃₎	3.74 ± 0.21 ^a ₍₃₎
3	3.60 ± 0.08 ^a ₍₁₎	3.32 ± 0.10 ^b ₍₂₎	3.39 ± 0.11 ^b ₍₂₎
5	3.65 ± 0.15 ^a ₍₁₎	3.46 ± 0.18 ^b _(2,3)	3.21 ± 0.16 ^b ₍₂₎
7	3.64 ± 0.17 ^a ₍₁₎	3.16 ± 0.31 ^b _(2,1)	3.27 ± 0.17 ^b ₍₂₎
10	3.78 ± 0.05 ^a ₍₁₎	3.00 ± 0.48 ^b ₍₁₎	2.92 ± 0.16 ^b ₍₁₎

^{a-b} Des lettres non identiques sur une même ligne indiquent une différence significative entre les résultats des groupes expérimentaux ($P \leq 0.05$)

¹⁻³ Des chiffres non identiques sur une même colonne indiquent une différence significative entre les résultats obtenus à divers temps ($P \leq 0.05$)

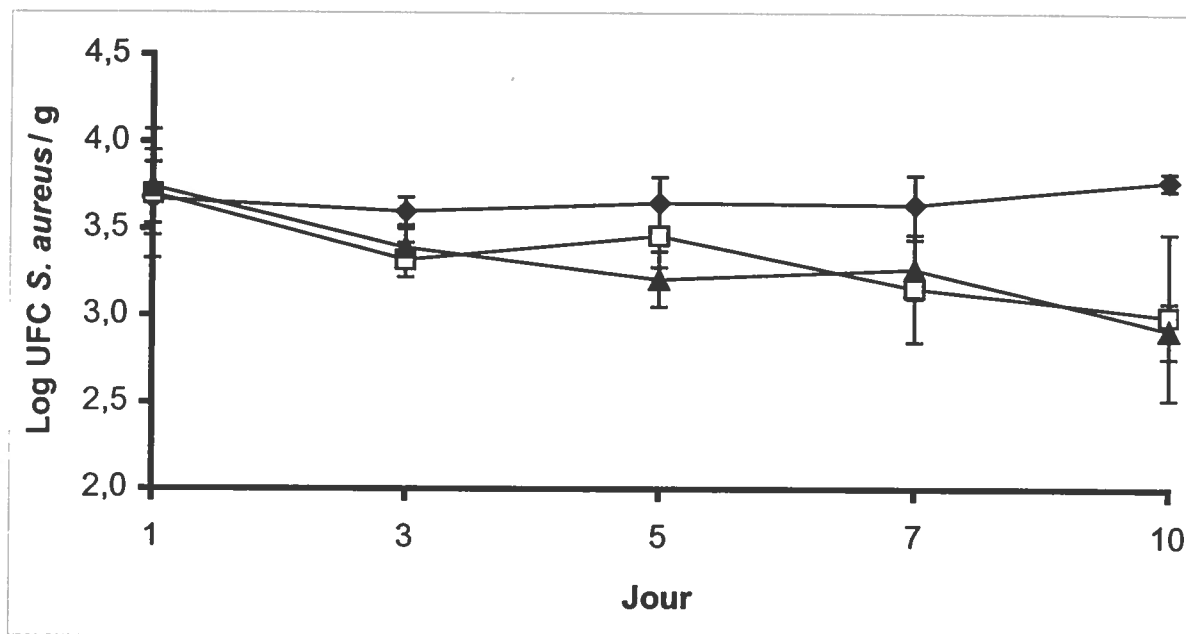


Figure 21 : Croissance de *S. aureus* dans du bœuf haché inoculé avec *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 incubé à 7°C. Formulations : (◆) témoin; (□) BAL libres; (▲) BAL encapsulées

Tableau 22 : Croissance de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 (log UFC g⁻¹) dans du bœuf contaminé avec *S. aureus* incubé à 7°C.

Jours	BAL libres	BAL encapsulées
1	5.54 ± 0.17 ^a ₍₁₎	5.49 ± 0.14 ^a ₍₁₎
3	5.51 ± 0.13 ^a ₍₁₎	5.79 ± 0.11 ^b ₍₂₎
5	5.49 ± 0.15 ^a ₍₁₎	6.88 ± 0.14 ^b ₍₃₎
7	5.43 ± 0.17 ^a ₍₁₎	6.97 ± 0.19 ^b ₍₃₎
10	5.55 ± 0.07 ^a ₍₁₎	7.06 ± 0.07 ^b ₍₄₎

^{a-b} Des lettres non identiques sur une même ligne indiquent une différence significative entre les résultats des groupes expérimentaux ($P \leq 0.05$)

¹⁻⁴ Des chiffres non identiques sur une même colonne indiquent une différence significative entre les résultats obtenus à divers temps ($P \leq 0.05$)

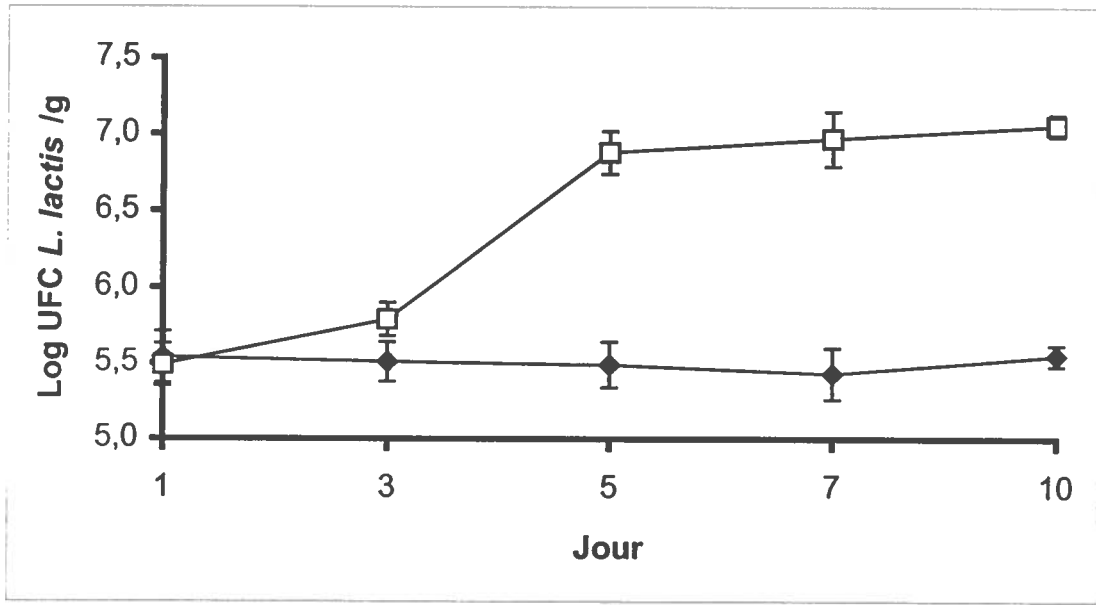


Figure 22 : Croissance de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 dans du bœuf contaminé avec *S. aureus* incubé à 7°C. Formulations : (◆) BAL libres; (□) BAL encapsulées

Tableau 23 : pH du bœuf haché contaminé avec *S. aureus* et *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC11454 incubé à 7°C.

Jours	Témoin	BAL libres	BAL encapsulées
1	5.92 ± 0.06 ^a ₍₁₎	6.05 ± 0.01 ^b ₍₃₎	6.05 ± 0.02 ^b _(2,3)
3	5.95 ± 0.01 ^a ₍₁₎	5.99 ± 0.01 ^a ₍₂₎	5.96 ± 0.05 ^a ₍₁₎
5	5.92 ± 0.02 ^a ₍₁₎	5.96 ± 0.01 ^{a,b} ₍₁₎	6.04 ± 0.11 ^b _(1,2)
7	5.98 ± 0.05 ^a ₍₁₎	6.06 ± 0.03 ^b ₍₃₎	6.15 ± 0.09 ^c ₍₄₎
10	6.07 ± 0.02 ^a ₍₂₎	6.17 ± 0.02 ^b ₍₄₎	6.07 ± 0.02 ^a ₍₃₎

^{a-c} Des lettres non identiques sur une même ligne indiquent une différence significative entre les résultats des groupes expérimentaux ($P \leq 0.05$)

¹⁻⁴ Des chiffres non identiques sur une même colonne indiquent une différence significative entre les résultats obtenus à divers temps ($P \leq 0.05$)

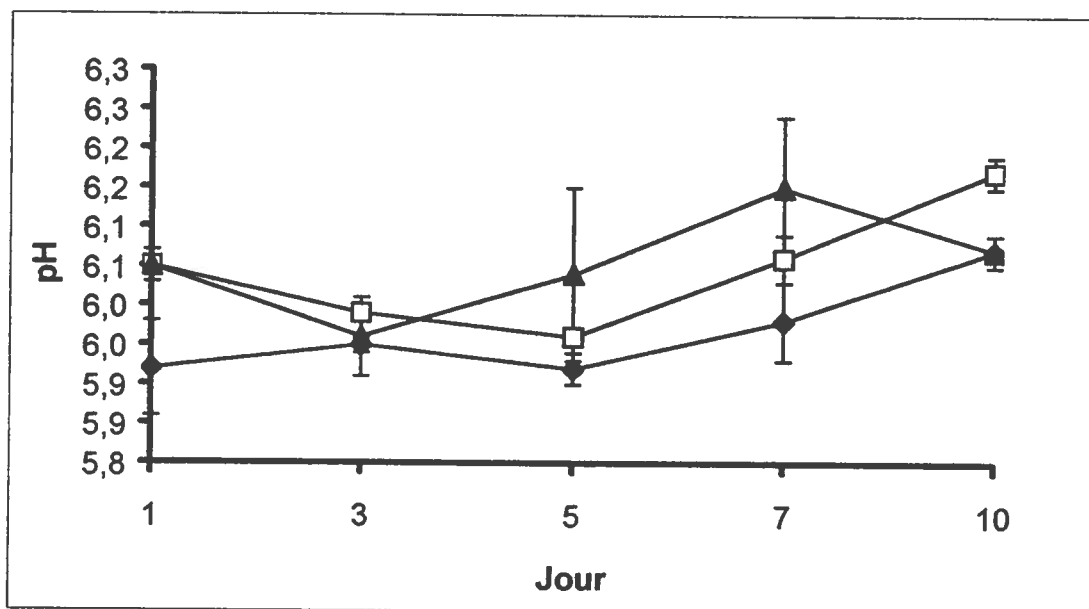


Figure 23 : pH du bœuf haché contaminé avec *S. aureus* et *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC11454 incubé à 7°C. Formulations : (◆) témoin; (□) BAL libres; (▲) BAL encapsulées

4. Destruction de *S. aureus* dans du bœuf haché par *L. lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 microencapsulé.

4.1. Incubation à la température de 35 °C

Le bœuf haché a, par la suite, été conservé à 35° et 7°C et inoculé avec *L. lactis* microencapsulés. Contrairement à l'expérience précédente dans laquelle les billes de bactéries avaient un diamètre d'environ 2 mm, ces microbilles ne sont pas visibles à l'œil nu. En effet, elle avaient des formes et des tailles très variables. Elles avaient un diamètre d'environ 50 µm à 250 µm (figure 24). Cette expérience a été réalisée afin de permettre une distribution plus homogène des BAL dans les échantillons de bœuf haché. Les mêmes procédures ont été exécutées afin de déterminer si les microbilles contenant des BAL possédaient un pouvoir antibactérien accru. *S. aureus* a été inoculé seul à une concentration de 3.00 log₁₀ UFC g⁻¹ dans des échantillons de bœuf haché afin de servir de témoin permettant ainsi d'en vérifier la croissance en absence de BAL ajoutées. Ensuite, les BAL libres ou microencapsulées ont été co-inoculées avec *S. aureus*. Les trois groupes ont été placés à 35°C et comparés entre eux.

La figure 25 et le tableau 24 montrent l'évolution de la croissance de *S. aureus* à 35°C en présence ou non de BAL. Il est ainsi possible de remarquer que l'ajout de *L. lactis* a ralenti la croissance du pathogène durant 3 jours. L'analyse statistique montre qu'il n'y a aucune différence significative ($P > 0.05$) entre le contenu en *S. aureus* des trois groupes lorsque débute l'expérience (environ 3.2 log₁₀ UFC g⁻¹). Au jour 2, le groupe témoin possédait une concentration de 7.47 ± 0.24 log₁₀ de *S. aureus* UFC g⁻¹. La concentration de pathogène mesurée dans les échantillons de bœuf contenant des BAL libres était de 6.26 ± 0.30 log₁₀ UFC g⁻¹ tandis que les échantillons du groupe BAL microencapsulées possédaient une concentration de 5.96 ± 0.30 log₁₀ de *S. aureus* UFC g⁻¹. Au jour 3, la concentration des témoins a augmenté à 7.96 ± 0.26 log₁₀ de *S. aureus* UFC g⁻¹, la concentration du groupe BAL libres était de 7.46 ± 0.14 log₁₀ de *S. aureus* UFC g⁻¹ et celle des BAL microencapsulées a augmenté à 7.13 ± 0.22 log₁₀ de *S. aureus*

UFC g⁻¹. Il est à remarquer que les échantillons contenant des BAL microencapsulées avaient des concentrations de *S. aureus* significativement plus basses ($P \leq 0.05$) aux jours 2 et 3 que le groupe BAL libres.

Parallèlement aux dénombrements de *S. aureus* dans les échantillons de bœuf haché, le dénombrement des BAL a été effectué afin d'analyser la croissance de *L. lactis*. L'évolution de la flore lactique est présentée dans la figure 26 et le tableau 25. Tel que prévu, aucune BAL n'a été dénombrée dans le groupe témoin (résultats non présentés). Les résultats montrent qu'au jour 1, c'est-à-dire au moment de l'inoculation, il y a eu une différence significative ($P \leq 0.05$) d'environ 1 log₁₀ de BAL entre les échantillons de bœuf haché inoculés par des BAL libres et des BAL microencapsulées. En effet, il y avait 1.09 log₁₀ UFC *L. lactis* g⁻¹ de moins pour les échantillons contenant des BAL microencapsulées. Ceci a été causé par la méthode de préparation des microbilles impliquant plusieurs étapes dans lesquels il y a dilution de la souche initiale. Au jour 2, cette différence n'était plus que de 0.26 log₁₀ UFC *L. lactis* g⁻¹ en faveur des BAL libres. Ensuite, cette différence s'est estompée de jour en jour et au jour 5 de l'expérience, les concentrations de BAL n'ont pas présenté de différence significative ($P > 0.05$) entre les deux groupes inoculés de BAL et la concentration est d'environ 7.7 log₁₀ UFC g⁻¹.

Le pH a été mesuré à chaque jour d'analyse. Le suivi de ces mesures est présenté dans la figure 27 et dans le tableau 26. Au jour 1, le pH des échantillons contenant des BAL microencapsulées a été légèrement plus acide que celui des autres groupes soit pH 5.68 contre 5.92 en ce qui concerne le groupe témoin et 5.93 dans le cas du groupe BAL libres. Au jour 2, les résultats ont démontré que la présence de BAL libres ou microencapsulées a engendré une diminution significative ($P \leq 0.05$) du pH qui est passé à 5.22 ± 0.05 et 5.30 ± 0.12 respectivement. Le pH du groupe témoin était de 5.81 ± 0.14 et n'a pas varié de manière significative avant le jour 4. Pendant les trois premiers jours de l'étude, le pH des groupes contenant des BAL libres ou microencapsulées était significativement inférieur ($P \leq 0.05$) à celui du groupe témoin. Au jour 5 de l'étude, les valeurs de pH étaient de 6.13 ± 0.25 , 6.44 ± 0.13 et 6.52 ± 0.09 pour les groupes témoin, BAL libres et BAL microencapsulées respectivement.

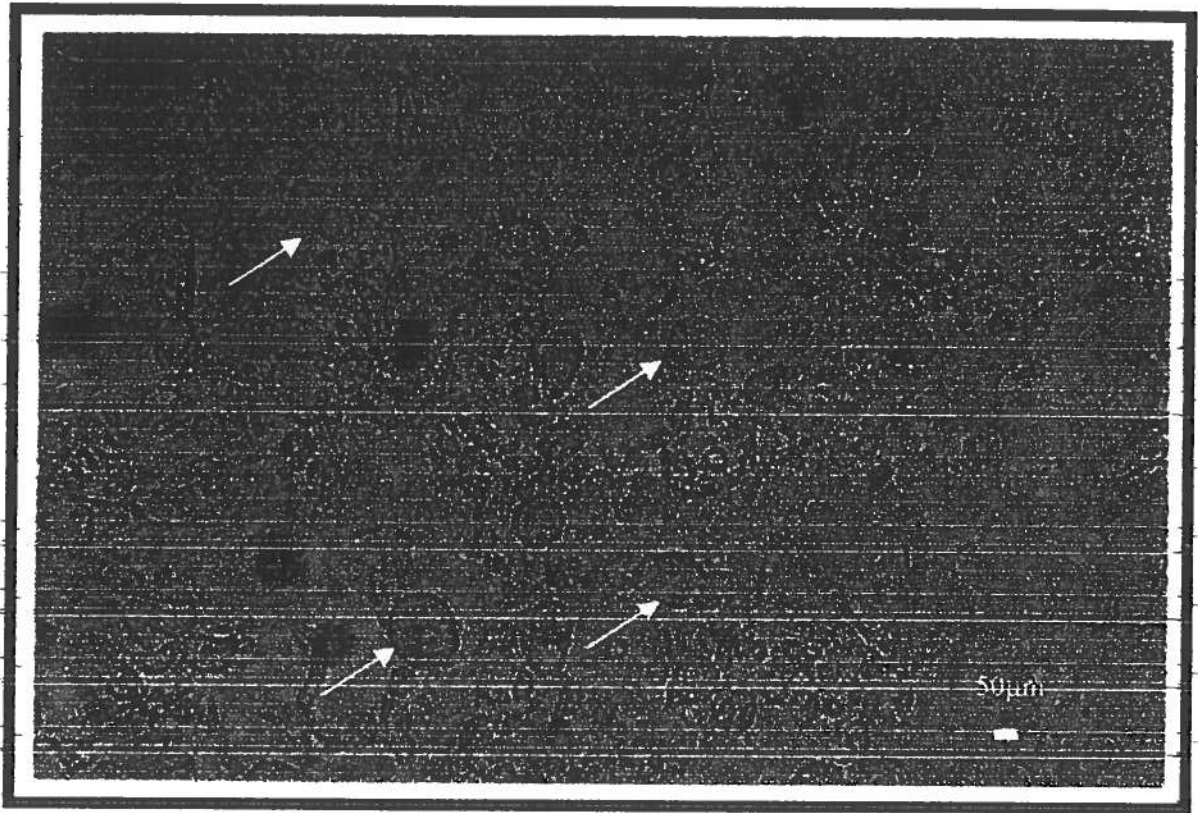


Figure 24 : Photographie de microbilles d'alginate de calcium effectuées à l'aide d'un microscope optique doté d'un grossissement de 50x.

Tableau 24 : Croissance de *S. aureus* (log UFC g⁻¹) dans du bœuf haché inoculé avec *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 microencapsulés et incubé à 35°C.

Jours	Témoin	BAL libres	BAL microencapsulées
1	3.26 ± 0.16 ^a ₍₁₎	3.23 ± 0.25 ^a ₍₁₎	3.12 ± 0.13 ^a ₍₁₎
2	7.47 ± 0.24 ^a ₍₂₎	6.26 ± 0.30 ^b ₍₂₎	5.96 ± 0.30 ^c ₍₂₎
3	7.96 ± 0.26 ^a ₍₄₎	7.46 ± 0.14 ^b ₍₃₎	7.13 ± 0.22 ^c ₍₃₎
4	7.99 ± 0.23 ^a ₍₄₎	7.77 ± 0.20 ^b ₍₄₎	7.70 ± 0.20 ^b ₍₄₎
5	7.69 ± 0.11 ^a ₍₃₎	7.98 ± 0.10 ^b ₍₅₎	7.84 ± 0.08 ^{a,b} ₍₄₎

^{a-c} Des lettres non identiques sur une même ligne indiquent une différence significative entre les résultats des groupes expérimentaux ($P \leq 0.05$)

¹⁻⁵ Des chiffres non identiques sur une même colonne indiquent une différence significative entre les résultats obtenus à divers temps ($P \leq 0.05$)

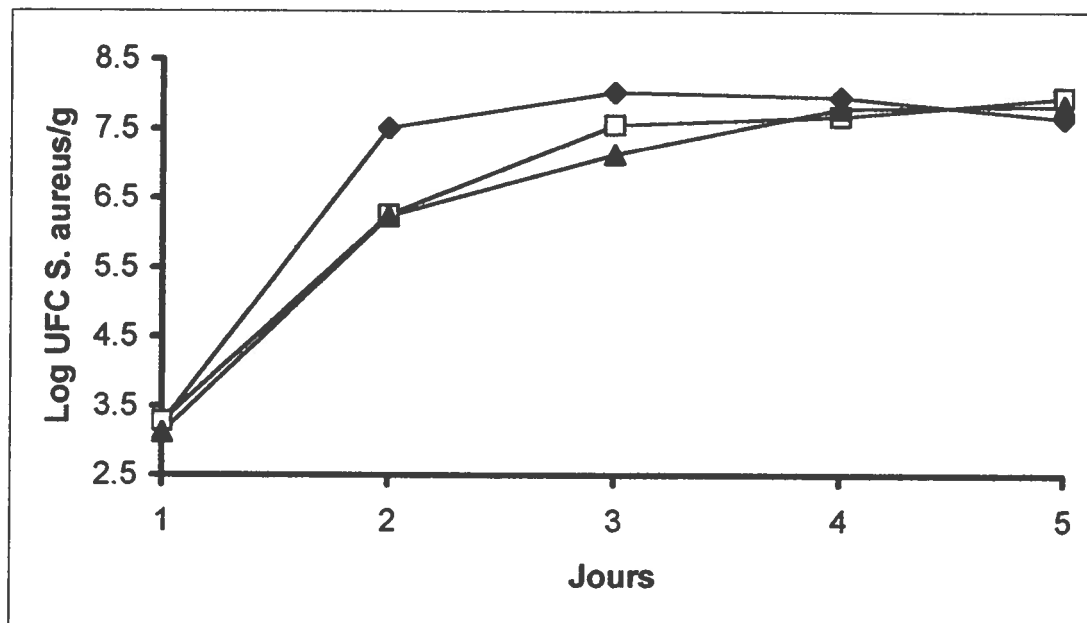


Figure 25 : Croissance de *S. aureus* dans du bœuf haché inoculé avec *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 microencapsulés et incubé à 35°C. Formulations : (◆) témoin; (□) BAL libres; (▲) BAL microencapsulées.

Tableau 25 : Croissance de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 (log UFC g⁻¹) microencapsulés dans du bœuf haché contaminé par *S. aureus* incubé à 35°C.

Jours	BAL libres	BAL microencapsulées
1	6.16 ± 0.19 ^a ₍₁₎	5.06 ± 0.07 ^b ₍₁₎
2	7.79 ± 0.14 ^a ₍₂₎	7.53 ± 0.08 ^b ₍₂₎
3	7.81 ± 0.13 ^a ₍₂₎	7.58 ± 0.08 ^b ₍₂₎
4	7.79 ± 0.17 ^a ₍₂₎	7.61 ± 0.10 ^b ₍₂₎
5	7.77 ± 0.17 ^a ₍₂₎	7.77 ± 0.14 ^a ₍₃₎

^{a-b} Des lettres non identiques sur une même ligne indiquent une différence significative entre les résultats des groupes expérimentaux ($P \leq 0.05$)

¹⁻³ Des chiffres non identiques sur une même colonne indiquent une différence significative entre les résultats obtenus à divers temps ($P \leq 0.05$)

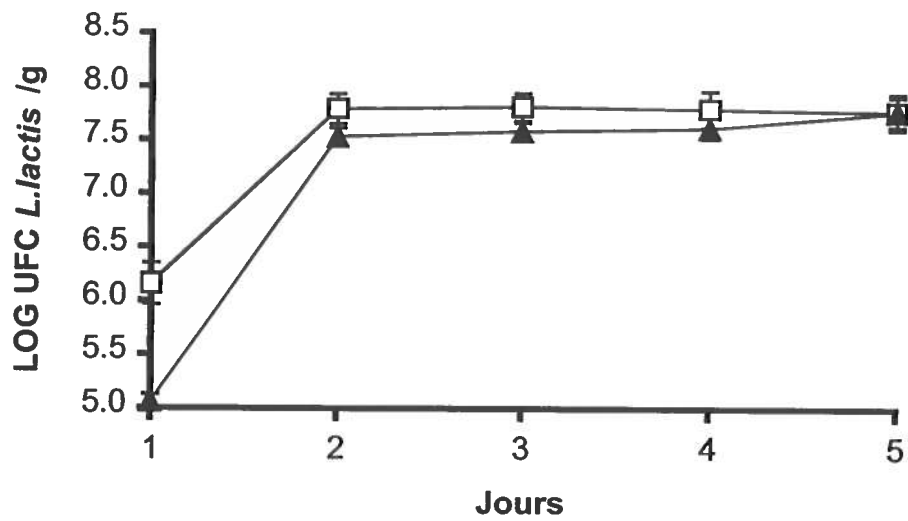


Figure 26 : Croissance de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 dans du bœuf contaminé par *S. aureus* incubé à 35°C. Formulations : (□) BAL libres; (▲) BAL microencapsulées.

Tableau 26 : pH du bœuf haché contaminé avec *S. aureus* et *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC11454 microencapsulées et incubé à 35°C.

Jours	Témoin	BAL libres	BAL microencapsulées
1	5.92 ± 0.09 ^b ₍₂₎	5.93 ± 0.13 ^b ₍₄₎	5.68 ± 0.01 ^a ₍₂₎
2	5.81 ± 0.14 ^b _(1,2)	5.22 ± 0.05 ^a ₍₁₎	5.30 ± 0.12 ^a ₍₁₎
3	5.72 ± 0.05 ^b _(1,2)	5.47 ± 0.30 ^a ₍₂₎	6.02 ± 0.02 ^c ₍₄₎
4	5.70 ± 0.12 ^a ₍₁₎	5.69 ± 0.08 ^a ₍₃₎	5.82 ± 0.05 ^a ₍₃₎
5	6.13 ± 0.25 ^a ₍₃₎	6.44 ± 0.13 ^b ₍₅₎	6.52 ± 0.09 ^b ₍₅₎

^{a-c} Des lettres non identiques sur une même ligne indiquent une différence significative entre les résultats des groupes expérimentaux ($P \leq 0.05$)

¹⁻⁵ Des chiffres non identiques sur une même colonne indiquent une différence significative entre les résultats obtenus à divers temps ($P \leq 0.05$)

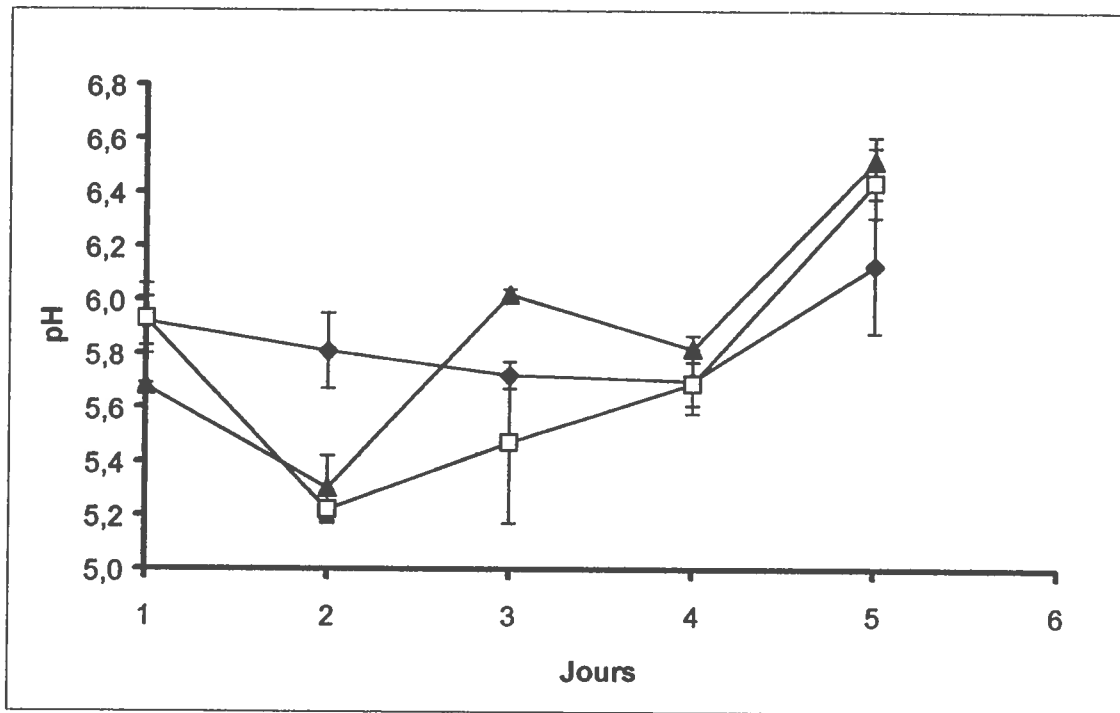


Figure 27 : pH du bœuf haché contaminé avec *S. aureus* et *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC11454 incubé à 35°C. Formulations : (◆) témoin; (□) BAL libres; (▲) BAL microencapsulées

4.2. Incubation à la température de 7°C

La dernière partie de cette étude consistait à vérifier la cinétique de destruction de *S. aureus* dans des échantillons de bœuf haché conservés à 7°C. Des BAL libres ou microencapsulées ont été ajoutées aux échantillons ($5.00 \log_{10}$ UFC g⁻¹).

La figure 28 et le tableau 27 présentent le dénombrement de *S. aureus* dans le temps. Pour la durée de l'étude, la quantité de pathogènes a été significativement plus faible ($P \leq 0.05$) lorsque des BAL (libres ou microencapsulées) ont été ajoutées aux échantillons de bœuf haché (tableau 26). En effet, la concentration de staphylocoques dorés contenus dans le groupe témoin a commencé à diminuer significativement ($P \leq 0.05$) après le jour 7 tandis qu'en présence de BAL cette diminution a été remarquée dès le jour 3. En outre, du jour 3 au jour 7, la concentration de *S. aureus* a été significativement plus faible ($P \leq 0.05$) lorsque les échantillons ont été inoculés par des BAL microencapsulées qu'en présence de BAL libres. Aux jours 7 et 10, il n'y a pas eu de différence significative entre les deux groupes ($P > 0.05$) et par la suite, le groupe contenant des BAL libres a détruit légèrement plus la flore de staphylocoques que le groupe contenant des BAL microencapsulées. Au jour 17, la concentration en staphylocoques du groupe témoin était de $2.47 \pm 0.09 \log_{10}$ UFC g⁻¹ tandis que la concentration du groupe BAL libres était de $1.90 \pm 0.18 \log_{10}$ UFC g⁻¹ et de 2.26 ± 0.06 log₁₀ UFC g⁻¹ en ce qui concernait les BAL microencapsulées. Le contenu en *S. aureus* du groupe BAL libres est significativement inférieur ($P \leq 0.05$) au groupe BAL microencapsulées qui est à son tour significativement inférieur ($P \leq 0.05$) au groupe témoin.

La figure 29 et le tableau 28 présentent l'évolution de la croissance des BAL dans les échantillons inoculés de BAL libres ou microencapsulées. Aucune croissance de BAL n'a été observée dans le groupe témoin (résultat non présenté). En ce qui a trait aux groupes contenant des BAL libres ou microencapsulées, il n'y a pas eu de différence significative ($P > 0.05$) dans le dénombrement des BAL au jour 1, tel que démontré dans le tableau 28. En ce qui concernait les échantillons co-inoculés par des BAL

microencapsulées, une augmentation progressive de la concentration des BAL a été mesurée jusqu'à la fin de l'étude. La concentration initiale en BAL de ce groupe était de $5.15 \log_{10} \text{ UFC g}^{-1}$ et a augmentée, après 17 jours d'entreposage à 7°C , à une concentration de $6.36 \log_{10} \text{ UFC g}^{-1}$. Pendant ce temps, la concentration en BAL des échantillons contenant des BAL libres a été stable à $5.5 \log_{10} \text{ UFC g}^{-1}$ jusqu'au jour 10 avant d'augmenter brusquement au jour 17 à $6.64 \pm 0.1 \log \text{ UFC g}^{-1}$.

L'évolution du pH des échantillons de bœuf haché contenant *S. aureus* et co-inoculées ou non par des BAL libres ou microencapsulées a été mesurée et est présentée dans la figure 30. Pour ce qui est du pH du groupe témoin, le tableau 29 indique qu'aucune variation significative n'a été observée pour la durée de l'expérience ($p > 0.05$). Le pH des échantillons de contenant *L. lactis* libres a augmenté sensiblement jusqu'au jour 5 avant de diminuer significativement ($P \leq 0.05$) à partir du jour 7 et de se stabiliser jusqu'à la fin de l'étude. Le pH des échantillons inoculés avec des BAL microencapsulées a augmenté drastiquement dès le jour 3 passant d'une valeur de 6.47 ± 0.01 pour atteindre, au jour 5, un pH de 5.89 ± 0.03 et de se stabiliser jusqu'au jour 17 à un pH de 5.88 ± 0.06 .

Tableau 27 : Croissance de *S. aureus* (log UFC g⁻¹) dans du bœuf haché inoculé avec *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 microencapsulées et incubé à 7°C.

Jours	Témoin	BAL libres	BAL microencapsulées
1	3.12 ± 0.09 ^a ₍₄₎	3.10 ± 0.08 ^a ₍₅₎	3.10 ± 0.07 ^a ₍₄₎
3	3.16 ± 0.12 ^a ₍₄₎	2.95 ± 0.10 ^b ₍₄₎	2.80 ± 0.07 ^c ₍₃₎
5	3.11 ± 0.10 ^a ₍₄₎	2.88 ± 0.14 ^b ₍₄₎	2.59 ± 0.10 ^c ₍₃₎
7	2.94 ± 0.11 ^a ₍₃₎	2.70 ± 0.19 ^b ₍₃₎	2.59 ± 0.11 ^b ₍₂₎
12	2.82 ± 0.10 ^a ₍₂₎	2.43 ± 0.21 ^b ₍₂₎	2.35 ± 0.24 ^b ₍₁₎
17	2.47 ± 0.09 ^a ₍₁₎	1.90 ± 0.18 ^b ₍₁₎	2.26 ± 0.06 ^c ₍₁₎

^{a-c} Des lettres non identiques sur une même ligne indiquent une différence significative entre les résultats des groupes expérimentaux ($P \leq 0.05$)

¹⁻⁵ Des chiffres non identiques sur une même colonne indiquent une différence significative entre les résultats obtenus à divers temps ($P \leq 0.05$)

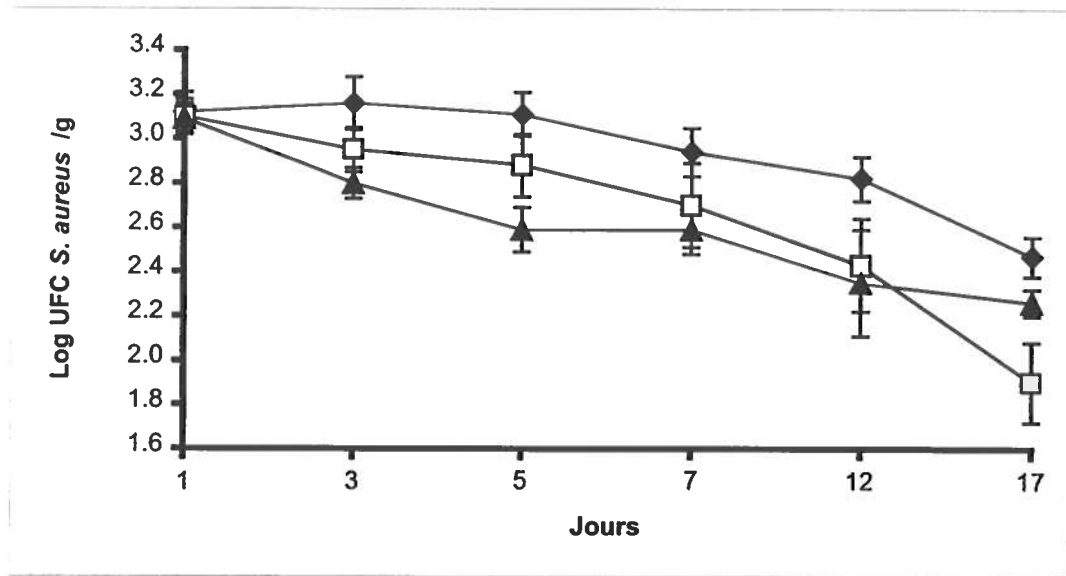


Figure 28 : Croissance de *S. aureus* dans du bœuf haché inoculé avec *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 et incubé à 7°C. Formulations : (◆) témoin; (□) BAL libres; (▲) BAL microencapsulées.

Tableau 28 : Croissance de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 (log UFC g⁻¹) dans du bœuf contaminé avec *S. aureus* et incubé à 7°C.

Jours	BAL libres	BAL microencapsulées
1	5.23 ± 0.13 ^a ₍₁₎	5.15 ± 0.09 ^a ₍₁₎
3	5.57 ± 0.10 ^b ₍₃₎	5.12 ± 0.12 ^a ₍₁₎
5	5.56 ± 0.16 ^a ₍₃₎	5.49 ± 0.20 ^a ₍₂₎
7	5.36 ± 0.18 ^a ₍₂₎	5.73 ± 0.12 ^b ₍₂₎
12	5.34 ± 0.07 ^a ₍₂₎	6.16 ± 0.07 ^b ₍₃₎

^{a-b} Des lettres non identiques sur une même ligne indiquent une différence significative entre les résultats des groupes expérimentaux ($P \leq 0.05$)

¹⁻³ Des chiffres non identiques sur une même colonne indiquent une différence significative entre les résultats obtenus à divers temps ($P \leq 0.05$)

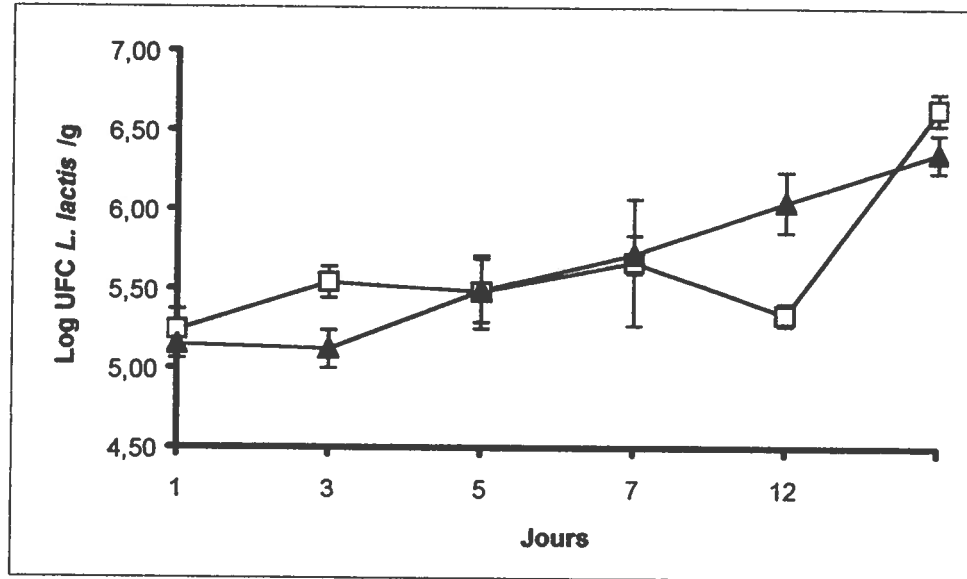


Figure 29 : Croissance de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 dans du bœuf contaminé avec *S. aureus* et incubé à 7°C. Formulations : (□) BAL libres; (▲) BAL microencapsulées

Tableau 29 : pH du bœuf haché contaminé avec *S. aureus* et *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC11454 et incubé à 7°C

Jours	Témoin	BAL libres	BAL microencapsulées
1	5.97 ± 0.09 ^a ₍₁₎	5.99 ± 0.12 ^a _(2,3)	5.84 ± 0.02 ^a ₍₁₎
3	6.04 ± 0.04 ^a ₍₁₎	6.04 ± 0.02 ^a ₍₃₎	6.47 ± 0.01 ^c ₍₂₎
5	6.16 ± 0.04 ^a ₍₁₎	6.15 ± 0.03 ^a ₍₃₎	5.89 ± 0.03 ^c ₍₁₎
7	6.08 ± 0.40 ^{a,b} ₍₁₎	5.79 ± 0.03 ^a ₍₁₎	6.38 ± 0.01 ^b ₍₃₎
12	6.16 ± 0.03 ^a ₍₁₎	5.86 ± 0.19 ^b _(1,2)	5.90 ± 0.06 ^b ₍₁₎
17	6.14 ± 0.04 ^a ₍₁₎	5.74 ± 0.09 ^b ₍₁₎	5.88 ± 0.06 ^{b,c} ₍₁₎

^{a-c} Des lettres non identiques sur une même ligne indiquent une différence significative entre les résultats des groupes expérimentaux ($P \leq 0.05$)

¹⁻⁴ Des chiffres non identiques sur une même colonne indiquent une différence significative entre les résultats obtenus à divers temps ($P \leq 0.05$)

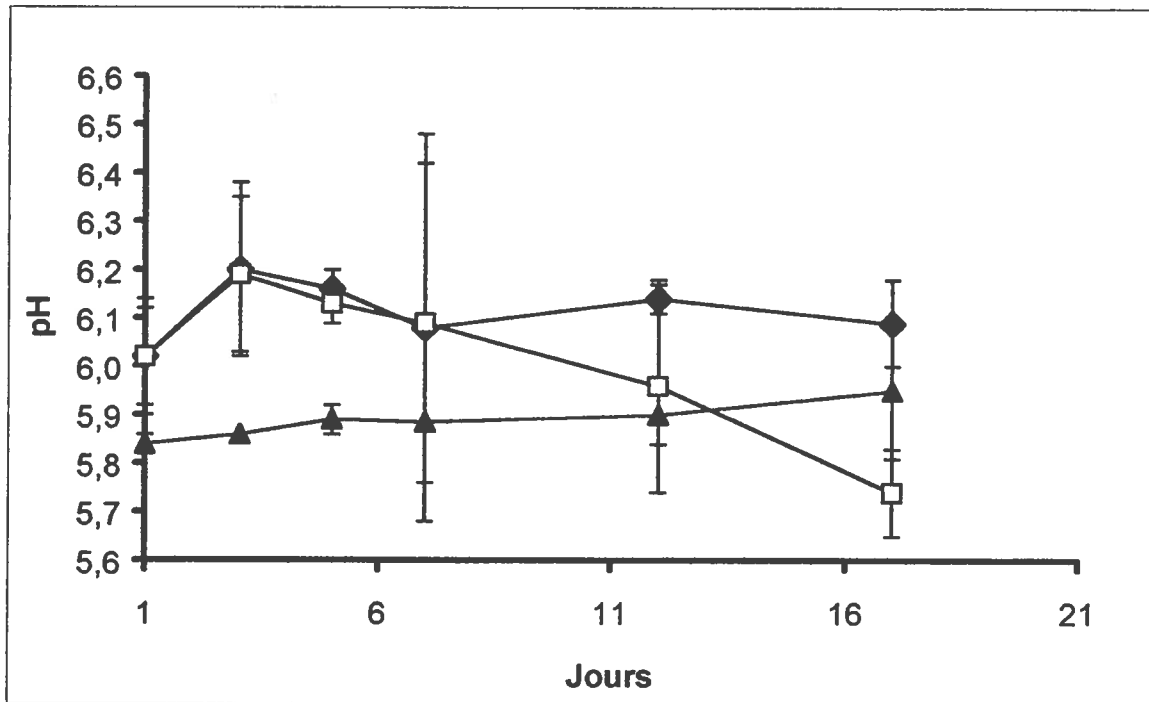


Figure 30 : pH du bœuf haché contaminé avec *S. aureus* et *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC11454 et incubé à 7°C. Formulations : (◆) témoin; (□) BAL libres; (▲) BAL microencapsulées

5.1. Inhibition de *S. aureus* par des films d'alginate modifié contenant de la nisine appliqués sur des échantillons de bifteck de ronde conservés à 7°C

L'immobilisation de nisine pure a été réalisée sous la forme d'une pellicule biodégradable et le pouvoir antimicrobien de ce film a été testé sur gélose contre la souche bactérienne indicatrice démontrée comme étant la plus sensible lors des tests « agar spot » soit *L. sake* (tableau 15). Les résultats obtenus suite à cette expérience ont démontré qu'un film biodégradable d'alginate contenant de la nisine possédait la capacité d'inhiber *L. sake in vitro*. La figure 31 laisse voir qu'un film contenant 1000 UI ml⁻¹ de nisine appliquée sur une gélose Lactobacilli MRS sans protéase et contaminée par *L. sake* avait la capacité de créer une zone claire d'inhibition autour du film. La figure 31 montre aussi que lorsque le film contenant de la nisine a été placé sur une gélose enrichie de protéases, aucune zone claire d'inhibition n'a été visible. De plus, les films biodégradables à base d'alginate sans nisine n'ont pas semblé posséder la capacité d'empêcher la croissance de *L. sake*.

La figure 32 et le tableau 30 présentent les résultats d'inhibition de *S. aureus* obtenus suite à l'application d'un film biodégradable contenant de la nisine sur des échantillons de bifteck de ronde. Les films incorporant 1000 UI ml⁻¹ ont provoqué une diminution significative ($P \leq 0.05$) de 0.22 log₁₀ UFC g⁻¹ après 24 heures d'incubation à la température de réfrigération. Les films contenant 500 UI ml⁻¹ ont causé une mortalité significative ($P \leq 0.05$) de 0.18 log₁₀ UFC g⁻¹ durant la même période de temps. Une faible diminution a aussi été remarquée dans le groupe témoin, mais cette diminution était de 0.09 log₁₀ UFC g⁻¹. Aucune variation n'a été observée dans le groupe film sans nisine. Après 5 jours d'entreposage, la concentration de *S. aureus* dans le groupe film de nisine 1000 UI ml⁻¹ a significativement chuté à 3.23 log₁₀ UFC g⁻¹, tandis que celle du groupe film de nisine 500 UI ml⁻¹ a aussi diminué significativement ($P \leq 0.05$) à 3.41 log₁₀ UFC g⁻¹. La concentration de pathogènes dans les groupes témoin et film sans nisine a aussi diminué à 3.72 log₁₀ UFC g⁻¹ et 3.64 log₁₀ UFC g⁻¹ respectivement. À la fin de l'étude, soit au jour 7, la concentration en staphylocoques des échantillons de bœuf recouvert d'une membrane contenant 1000 UI ml⁻¹ était de 2.15 log₁₀ UFC g⁻¹, la concentration

retrouvée dans le groupe film 500 UI ml⁻¹ était de 3.13 log₁₀ UFC g⁻¹ et celles des groupes expérimentaux film sans nisine et témoin étaient de 3.58 et 3.51 log₁₀ UFC g⁻¹ respectivement.

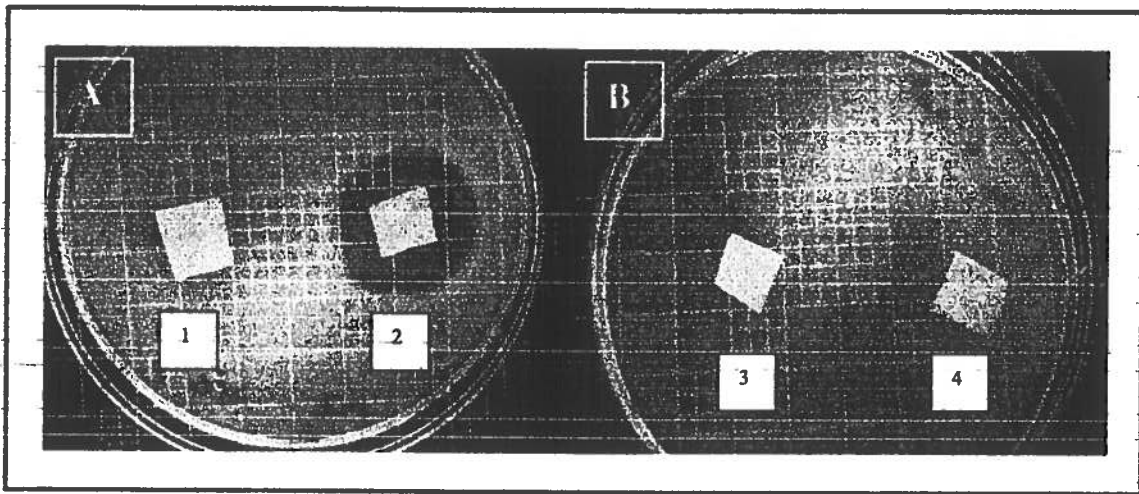


Figure 31 : Photos démontrant le pouvoir antimicrobien contre *Lactobacillus sake* d'une formulation de film biodégradable contenant de la nisine. (A) gélose ne contenant pas de protéase; (B) gélose additionnée de protéases; (1 et 3) 0 UI ml⁻¹ de nisine; (2 et 4) 1000 UI ml⁻¹ de nisine.

Tableau 30 : Inhibition de la croissance de *S. aureus* (log UFC g⁻¹) présent sur du bifteck de ronde conservé à 4°C par des films d'alginate modifié contenant de la nisine.

Jours	Témoin	Film (0 UI/ml)	Film (500 UI/ml)	Film (1000 UI/ml)
0	4.19 ± 0.13 ^b ₍₅₎	4.09 ± 0.10 ^a ₍₂₎	4.04 ± 0.12 ^a ₍₅₎	4.01 ± 0.08 ^a ₍₄₎
1	4.10 ± 0.05 ^c ₍₄₎	4.10 ± 0.06 ^c ₍₂₎	3.86 ± 0.08 ^b ₍₄₎	3.79 ± 0.07 ^a ₍₃₎
3	3.93 ± 0.10 ^c ₍₃₎	4.03 ± 0.12 ^d ₍₂₎	3.57 ± 0.10 ^a ₍₃₎	3.79 ± 0.05 ^b ₍₃₎
5	3.72 ± 0.15 ^c ₍₂₎	3.64 ± 0.13 ^c ₍₁₎	3.41 ± 0.07 ^b ₍₂₎	3.23 ± 0.17 ^a ₍₂₎
7	3.51 ± 0.13 ^c ₍₁₎	3.58 ± 0.14 ^c ₍₁₎	3.13 ± 0.16 ^b ₍₁₎	2.15 ± 0.17 ^a ₍₁₎

^{a-d} Des lettres non identiques sur une même ligne indiquent une différence significative entre les résultats des groupes expérimentaux ($P \leq 0.05$)

¹⁻⁵ Des chiffres non identiques sur une même colonne indiquent une différence significative entre les résultats obtenus à divers temps ($P \leq 0.05$)

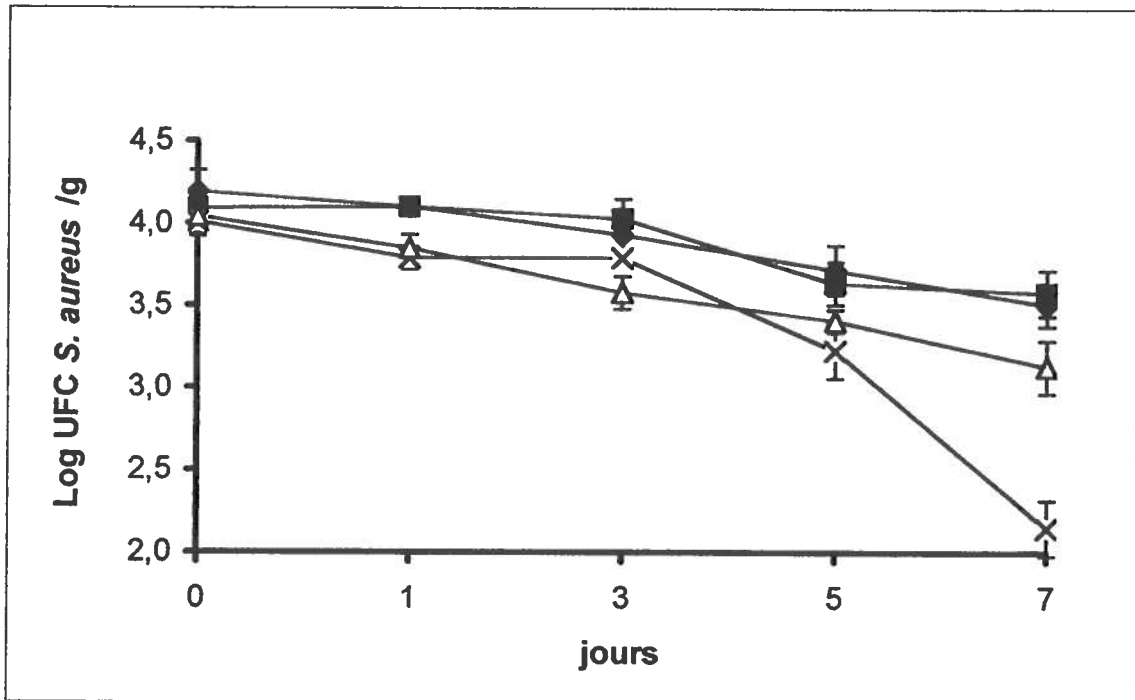


Figure 32 : Inhibition de la croissance de *S. aureus* présent sur du bifteck de ronde conservé à 4°C par des films d'alginate modifié contenant de la nisine. (◆) Témoin; (■) 0 UI/ml nisine; (△) 500 UI/ml nisine; (×) 1000 UI/ml nisine.

5.2. Inhibition de *S. aureus* par des billes d'alginate activé contenant de la nisine appliquées sur des échantillons de bœuf haché conservés à 7°C.

Les figures 33a et 33b ainsi que le tableau 31 présentent les résultats d'inhibition de *S. aureus* obtenus suite à l'ajout de nisine libre ou de nisine piégée à l'intérieur de billes d'alginate activé dans des échantillons de bœuf haché mi-maigre et entreposé à la température de réfrigération. Au début de l'expérience, chaque échantillon contenait $3 \log_{10}$ UFC g^{-1} de *S. aureus*. L'ajout de nisine libre a entraîné une forte mortalité du pathogène dans les 24 premières heures. En effet, une concentration bactérienne de $1.96 \log_{10}$ UFC g^{-1} a été mesurée lorsque $1000 \text{ UI } g^{-1}$ de nisine ont été ajoutés dans la viande, un compte de $2.38 \log_{10}$ UFC g^{-1} par l'ajout de $500 \text{ UI } g^{-1}$, tandis que la concentration de pathogènes dans le groupe témoin était de $2.81 \log_{10}$ UFC g^{-1} . Lorsque la nisine a été piégée à l'intérieur des billes, les comptes microbiens étaient de $2.70 \log_{10}$ UFC g^{-1} pour le groupe billes $1000 \text{ UI } g^{-1}$, de $2.65 \log_{10}$ UFC g^{-1} pour le groupe billes $500 \text{ UI } g^{-1}$ et de $2.78 \log_{10}$ UFC g^{-1} pour le groupe billes sans nisine. Après 3 jours d'entreposage, les concentrations de *S. aureus* de tous les groupes expérimentaux ont diminué significativement ($P \leq 0.05$). Le groupe billes nisine $1000 \text{ UI } g^{-1}$ est celui qui a connu la plus grande diminution de concentration bactérienne en passant de 2.70 à $2.30 \log_{10}$ UFC g^{-1} . Au jour 5, la concentration de *S. aureus* dans le groupe témoin a significativement diminué à $2.49 \log_{10}$ UFC g^{-1} . La concentration des groupes nisine libre $1000 \text{ UI } g^{-1}$ et billes sans nisine n'a pas varié significativement ($P > 0.05$). La quantité de pathogènes dans le groupe nisine libre a diminué à $1.99 \log_{10}$ UFC g^{-1} , celle du groupe billes nisine $500 \text{ UI } g^{-1}$ était de $2.35 \log_{10}$ UFC g^{-1} et celle de billes de nisine $1000 \text{ UI } g^{-1}$ de $2.10 \log_{10}$ UFC g^{-1} . Au jour 7 de l'étude, les concentrations bactériennes de chacun des groupes ont diminué de façon significative ($P \leq 0.05$). Au jour 9, les groupes expérimentaux présentant les plus fortes concentrations de nisine ont vu leur concentration en *S. aureus* plafonner à $1.26 \log_{10}$ UFC g^{-1} pour le groupe nisine libre $1000 \text{ UI } g^{-1}$ et $1.67 \log_{10}$ UFC g^{-1} pour le groupe nisine encapsulée $1000 \text{ UI } g^{-1}$. La concentration microbienne dans les deux groupes servant de témoins, groupe témoin et groupe billes sans nisine, a diminué significativement pour atteindre 2.15 et $2.16 \log_{10}$ UFC g^{-1} respectivement. Les groupes

nisine libre et nisine encapsulée 500 UI g⁻¹ ont vu leur concentration diminuer significativement ($P \leq 0.05$) à 1.49 et 1.81 log₁₀ UFC g⁻¹ respectivement. À la fin de l'étude, soit après 14 jours d'entreposage, les concentrations de pathogènes étaient de 1.32 et 0.72 log₁₀ UFC g⁻¹ pour les groupes nisine libre 500 et 1000 UI g⁻¹ et de 2.03, 1.76 et 1.58 log₁₀ UFC g⁻¹ respectivement pour les groupes billes sans nisine, billes 500 UI g⁻¹ et billes 1000 UI g⁻¹.

Tableau 31 : Inhibition de la croissance de *S. aureus* (log UFC g⁻¹) dans des échantillons de bœuf haché mi-maigre traités avec de la nisine libre ou encapsulée.

Jours	Témoin	Nisine libre (500 UI/ml)	Nisine libre (1000 UI/ml)	Billes (0 UI/ml)	Billes (500 UI/ml)	Billes (1000 UI/ml)
0	3.00 ± 0.00 ₍₆₎	3.00 ± 0.00 ₍₇₎	3.00 ± 0.00 ₍₅₎	3.00 ± 0.00 ₍₆₎	3.00 ± 0.00 ₍₆₎	3.00 ± 0.00 ₍₆₎
1	2.81 ± 0.08 ^c ₍₅₎	2.38 ± 0.12 ^b ₍₆₎	1.94 ± 0.15 ^a ₍₄₎	2.78 ± 0.06 ^c ₍₅₎	2.65 ± 0.08 ^{d,c} ₍₅₎	2.70 ± 0.10 ^c ₍₅₎
3	2.61 ± 0.05 ^c ₍₄₎	2.14 ± 0.07 ^b ₍₅₎	1.68 ± 0.10 ^a ₍₃₎	2.59 ± 0.05 ^c ₍₄₎	2.50 ± 0.03 ^d ₍₄₎	2.30 ± 0.06 ^c ₍₄₎
5	2.49 ± 0.09 ^c ₍₃₎	1.99 ± 0.10 ^b ₍₄₎	1.65 ± 0.13 ^a ₍₃₎	2.53 ± 0.06 ^c ₍₄₎	2.35 ± 0.06 ^d ₍₃₎	2.10 ± 0.06 ^c ₍₃₎
7	2.30 ± 0.08 ^d ₍₂₎	1.71 ± 0.10 ^b ₍₃₎	1.31 ± 0.14 ^a ₍₂₎	2.30 ± 0.08 ^d ₍₃₎	1.94 ± 0.06 ^c ₍₂₎	1.67 ± 0.10 ^b ₍₂₎
9	2.15 ± 0.05 ^c ₍₁₎	1.49 ± 0.08 ^b ₍₂₎	1.26 ± 0.13 ^a ₍₂₎	2.16 ± 0.08 ^c ₍₂₎	1.81 ± 0.06 ^d ₍₁₎	1.67 ± 0.09 ^c ₍₂₎
14	ND	1.32 ± 0.13 ^b ₍₁₎	0.72 ± 0.19 ^a ₍₁₎	2.03 ± 0.10 ^c ₍₁₎	1.76 ± 0.08 ^d ₍₁₎	1.58 ± 0.13 ^c ₍₁₎

^{a-e} Des lettres non identiques sur une même ligne indiquent une différence significative entre les résultats des groupes expérimentaux ($P \leq 0.05$)

¹⁻⁷ Des chiffres non identiques sur une même colonne indiquent une différence significative entre les résultats obtenus à divers temps ($P \leq 0.05$)

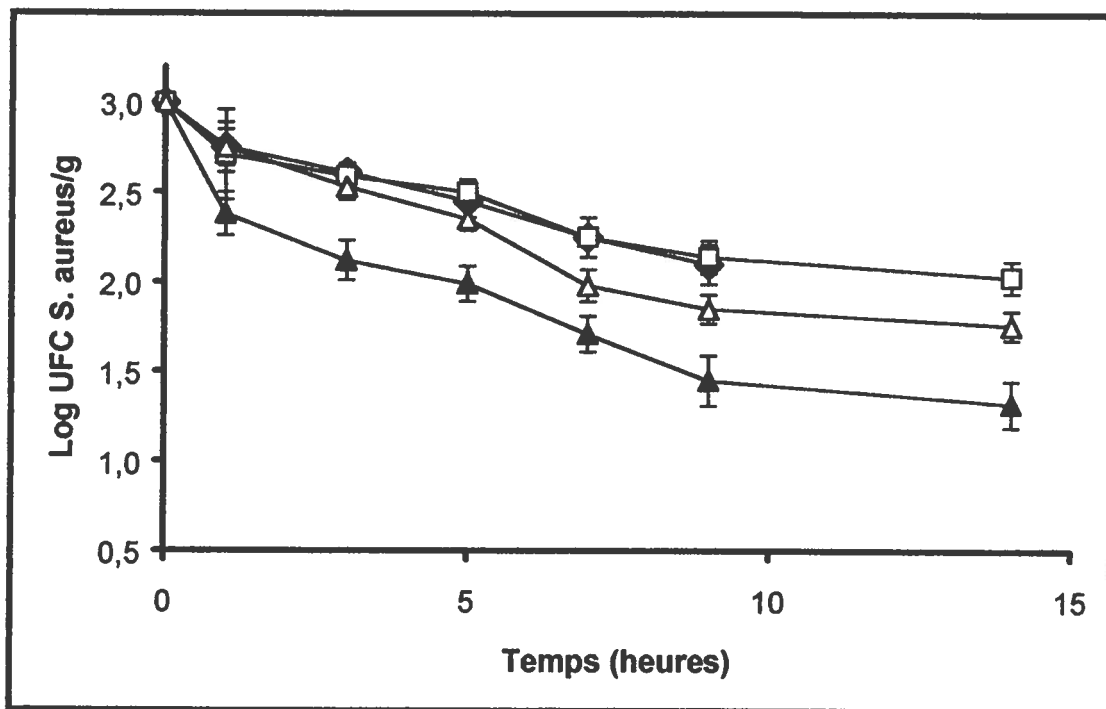


Figure 33a : Inhibition de la croissance de *S. aureus* inoculé dans des échantillons de bœuf haché mi-maigre traités avec 500 UI/g de nisine libre ou encapsulée. (◆) *S. aureus* seul; (□) Billes sans nisine; (▲) nisine libre (500 UI/g); (△) nisine encapsulée (500 UI/g).

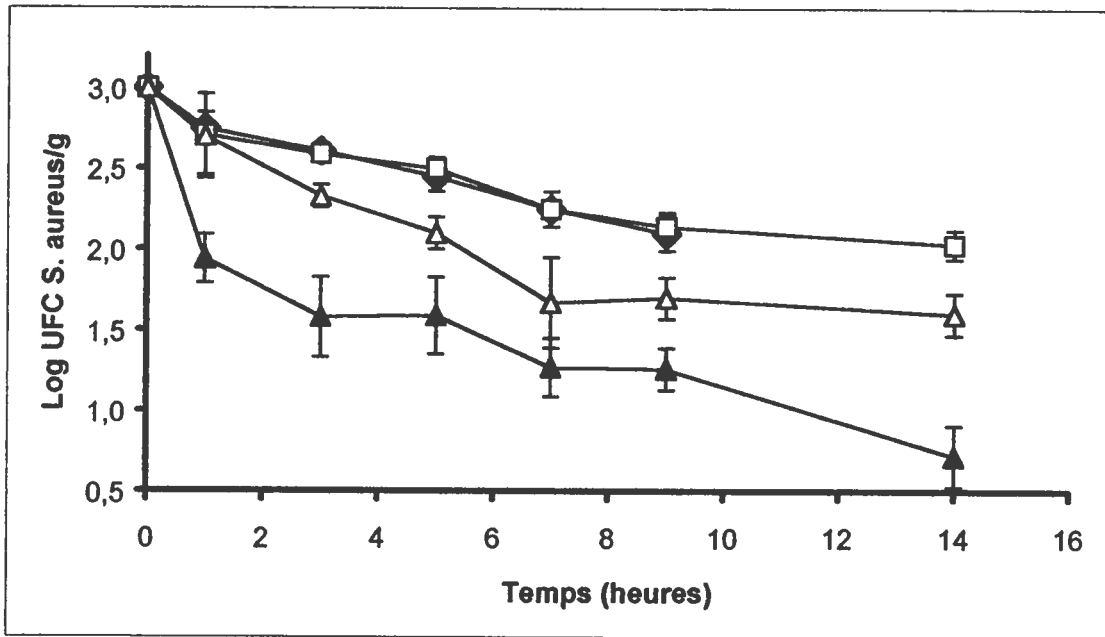


Figure 33b : Inhibition de la croissance de *S. aureus* inoculé dans des échantillons de bœuf haché mi-maigre traités avec 1000 UI/g de nisine libre ou encapsulée. (◆) *S. aureus* seul; (□) Billes sans nisine; (▲) nisine libre (1000 UI/g); (△) nisine encapsulée (1000 UI/g).

Chapitre IV

Discussion

Depuis des millénaires, la fermentation est un moyen utilisé afin de conserver les aliments. La flore microbienne indigène ou exogène occasionne des changements organoleptiques qui sont recherchés tels des arômes, des saveurs, des textures et des odeurs. Parmi les produits fermentés, on retrouve le yogourt, les fromages, le champagne, les bières, beaucoup de végétaux, du poisson, mais aussi des viandes. À titre d'exemples de produits carnés fermentés, il y a le jambon fumé, les saucissons et salamis, tous fermentés par des espèces bactériennes diverses (Hammes et Hertel 1998, Prescott *et al.* 1995, Prochaska *et al.* 1998, Speck 1981). Les bactéries lactiques ont la capacité de donner des qualités sensorielles intéressantes aux produits carnés fermentés par la production de diacétyls, d'acides organiques (lactique et acétique), d'acétoïne ou de 2,3-butylène glycol (Arihara *et al.* 1998, Bacus et Brown 1981, Bredholt *et al.* 1999, Hammes et Hertel 1998, Hugas *et al.* 1998, Juven *et al.* 1998, Leroy et DeVuyst 1999, Marya-Makinen et Bigret, 1993; Reddy *et al.* 1970, Schillinger et Lucke 1990, Winkowski *et al.* 1993). Ces auteurs ont également démontré la capacité des BAL à préserver l'innocuité de ces produits ainsi qu'à augmenter leur durée de vie, ce que Stiles (1996) a nommé biopréservation. C'est, entre autre, par la capacité des BAL à produire des bactériocines qui leur vaut toute cette attention des dernières années car elles auraient alors la possibilité de prévenir la détérioration de la viande, mais surtout d'éliminer la flore pathogène (Hugas, 1998). La nisine, première bactériocine à être étudiée et surtout la seule à ce jour acceptée par la FDA comme additif alimentaire, est produite par *Lactococcus lactis*.

D'un autre côté, la technologie d'immobilisation cellulaire (TIC) a fait son apparition dans l'industrie laitière au début des années '80 afin de favoriser la production d'acides organiques (Linko et Linko, 1981 ; Prévost *et al.*, 1985 ; Divies and Prévost, 1987). Depuis lors, plusieurs autres avantages en faveur de la TIC ont été démontrés (voir revue de littérature). Au cours des dernières années, de nombreux polymères ont

été utilisés avec plus ou moins de succès afin d'encapsuler des cellules vivantes (Stevens *et al.*, 1992), mais la technique la plus utilisée est sans aucun doute le piégeage des microorganismes dans des billes d'alginate de calcium. Plusieurs raisons militent en faveur de cette méthode, particulièrement le fait qu'elle soit très douce pour les bactéries, mais aussi parce qu'elle est simple à réaliser et se fait en une étape qui ne demande pas de chauffage dispendieux (Smidsrod et Skjak-Braek, 1990). Par contre, certaines recherches démontrent que l'acide lactique pourrait déstabiliser la matrice puisque l'acide lactique chélate les ions calciums ce qui brise le réseau d'alginate et démantèle les billes (Smidsrod et Skjak-Braek, 1990). Afin de prévenir cet inconvénient, Onwulata *et al.* (1999) ont démontré que l'ajout de lactosérum (WPC) pouvait contribuer à maintenir la stabilité des billes par l'inclusion des protéines dans la matrice d'alginate de calcium. De plus, le WPC pourrait stimuler la croissance des BAL (Bury *et al.*, 1998).

Plusieurs études ont été réalisées traitant de BAL encapsulées. Elles avaient comme objectifs d'évaluer la viabilité des BAL piégées (Stenson *et al.*, 1987; Champagne *et al.*, 1992; Champagne *et al.*, 1994b; Selmer-Olsen *et al.*, 1999), leur capacité à produire de fortes quantités d'un métabolite particulier (Champagne *et al.*, 1994a), d'obtenir une fermentation plus efficace (Champagne *et al.*, 2000) ou encore la possibilité de produire des bactériocines dans un milieu liquide durant une fermentation continue (Huang *et al.*, 1996; Scannell *et al.*, 2000). D'autres études ont démontré la capacité de gels d'alginate, de films ou de polymères de plastique contenant de la nisine à prévenir la croissance de bactéries pathogènes ou responsables de la détérioration des aliments (Cutter et Siragusa, 1996; Cutter et Siragusa, 1997; Siragusa *et al.*, 1999; Natrajan et Sheldon, 2000). Cependant, aucune étude ne fait mention du potentiel antimicrobien de *L. lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 encapsulés sur des bactéries pathogènes contenues dans un milieu solide tel le bœuf haché.

1. Détermination de la concentration optimale d'alginate et de WPC entrant dans la fabrication des billes

Le premier objectif de cette étude consistait à déterminer la concentration optimale d'alginate dans la solution servant à la fabrication des billes. La méthodologie d'encapsulation faisant appel à l'alginate de sodium et au chlorure de calcium (gélification ionotropique) a été utilisée parce qu'elle est simple, peu coûteuse et très douce pour les bactéries (Kearney *et al.*, 1990 ; McLoughlin et Champagne, 1994 ; Smidsrod et Skjak-Braek, 1990 ; Wan *et al.*, 1995). Cette gélification résulte d'interactions fortes et spécifiques entre les ions calcium et les groupes d'acide guluronique de l'alginate (Braccini et Pérez, 2001). Il était très important que les formulations et la méthode utilisées lors de la fabrication de ces billes ne soient pas nocives pour les bactéries immobilisées afin d'obtenir un rendement maximal de croissance et de production de nisine. Afin de vérifier la viabilité bactérienne, des dénombrements de *L. lactis* piégés dans une bille ont été effectués. Sachant que les billes peuvent gonfler dans un milieu liquide (Champagne *et al.*, 1992b ; Smidsrod et Skjak-Braek, 1990), les bactéries risquent de sortir des billes. La concentration de BAL dans le milieu de culture a donc aussi été mesurée. Les mesures de pH ont permis de vérifier l'activité du métabolisme bactérien. En effet, il est bien connu que les BAL sécrètent des acides organiques comme produit final de respiration (Prescott *et al.*, 1995). Or, si l'activité métabolique est normale, *L. lactis* devrait produire de l'acide lactique et ainsi diminuer le pH du milieu. De plus, le milieu de culture utilisé était pauvre (composé seulement de peptone 0.1 % p/v), parce que ne possédant aucune source de carbone, mais seulement d'azote. Ce milieu de culture a été choisi afin de vérifier si les bactéries allaient utiliser soit l'alginate des billes soit le lactose contenu dans le lactosérum comme source de carbone. Donc, en privilégiant un milieu pauvre en sucres fermentescibles, il devenait facile de vérifier si les lactocoques ont utilisé la matrice pour assurer leur nutrition. En effet, en se nourrissant de la matrice, les BAL auraient une croissance plus rapide que les bactéries pathogènes ou responsables de la détérioration alimentaire à éliminer ce qui procurerait un avantage compétitif intéressant pour la flore lactique.

Il est important de mentionner que les billes formées avec une solution d'alginate 1% ne possédaient pas une très grande force de rupture, elles étaient molles et facilement dissoutes. Par contre, les billes formées à partir d'alginate 1.5% et 2% étaient facilement manipulables, possédaient une bonne force de rupture, étaient bien rondes et uniformes. La solubilité de 2% (p/v) d'alginate dans un milieu aqueux étant assez difficile, c'est pour cette raison que des concentrations supérieures n'ont pas été étudiées.

Tout le long de l'expérience, l'encapsulation a semblé protéger les BAL ou à tout le moins, il paraissait y avoir plus de BAL produites dans les billes et expulsées à l'extérieur de ces billes puisque pour tous les temps d'analyse, la concentration de BAL dans le milieu externe a été plus grande pour les échantillons contenant des microorganismes encapsulés que pour les BAL libres. Pour ce qui est de la concentration à l'intérieur d'une bille, l'étude a démontré un pic de croissance après 24 heures suivie d'une diminution de la quantité de BAL. Cette diminution est par contre moins prononcée avec les billes formées de 1% d'alginate. Suite à l'observation de ces résultats, les BAL ont eu une croissance plus rapide lorsqu'elles ont été encapsulées et ce pour toutes les concentrations d'alginate. En effet, les BAL libres contenues dans les erlenmeyers d'eau peptonée avaient une concentration initiale de $6.05 \log_{10} \text{ UFC ml}^{-1}$. Après 24 heures d'incubation, une croissance d'environ $1.5 \log_{10} \text{ UFC ml}^{-1}$ a été observée. Pendant ce temps, les échantillons contenant des bactéries encapsulées avaient une croissance de plus de $6 \log_{10} \text{ UFC ml}^{-1}$. À l'intérieur des billes, la concentration initiale était d'environ $5.5 \log_{10} \text{ UFC ml}^{-1}$ et après 24 heures d'incubation, cette concentration avait augmenté à $7.38 \log_{10} \text{ UFC ml}^{-1}$ pour les billes fabriquées à partir de 1% d'alginate, de $7.48 \log_{10} \text{ UFC ml}^{-1}$ et de $7.16 \log_{10} \text{ UFC ml}^{-1}$ pour les billes produites à partir d'alginate 1.5% et 2% respectivement. En résumé, une augmentation de $6 \log_{10} \text{ UFC ml}^{-1}$ a été observée dans le surnageant de milieu de culture des échantillons de BAL encapsulées et une augmentation de croissance d'environ 1.5 à $2 \log_{10} \text{ UFC ml}^{-1}$ a été observée en ce qui a trait à la population bactérienne interne des billes. Il est donc permis de conclure que la matrice d'alginate stimule fortement la croissance de *L. lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454. De plus, la population bactérienne des échantillons contenant les BAL encapsulées était beaucoup plus stable durant l'expérience que les BAL libres.

Scannell *et al.* (2000) ont obtenu des résultats similaires. En utilisant deux espèces de *L. lactis*, ils ont observé aussi une plus grande stabilité de la population bactérienne encapsulée comparativement aux bactéries libres. Cette stabilité de population a permis aux auteurs de remarquer un maintien de la production de nisine produite par les BAL immobilisées tandis qu'une diminution drastique a été observée lors de la fermentation avec les BAL libres.

En outre, une légère acidification de l'eau peptonée a été observée lorsque les BAL ont été encapsulées comparativement à une augmentation du pH après 24 heures d'incubation de BAL libres. Cette information tend à corroborer les résultats précédents de croissance bactérienne, malgré le fait que l'acidification ait été très légère. La forte alcalinisation du surnageant peut être expliquée en sachant qu'un excès d'azote (provenant du catabolisme des protéines et des acides aminés dérivés du peptone) sera excrété sous forme d'ions ammonium, ce qui aura pour conséquence d'augmenter le pH du milieu de culture (Prescott *et al.*, 1995). L'hypothèse envisagée pour expliquer ce phénomène est la suivante : les BAL ont épuisé les minces réserves de carbone pouvant exister dans ce milieu pauvre durant les 24 premières heures. Par la suite, la grande quantité de protéines (peptone) présente permet aux bactéries de survivre, mais le catabolisme des protéines entraîne la production d'un métabolite (ion ammonium) qui est rejeté dans le milieu externe ce qui fait augmenter le pH. La mortalité bactérienne est facilement expliquée par le pH trop basique pour la croissance des BAL (pH optimal des BAL étant d'environ 5.8 à 6.6). Il aurait été intéressant de mesurer le pH des solutions à quelques reprises au cours des 24 premières heures de la fermentation ce qui aurait été utile afin d'élucider ce phénomène.

La formulation à base de 1.5% (p/v) d'alginate a permis une bonne viabilité des BAL, une légère acidification d'un milieu pauvre tout en offrant d'excellentes qualités structurelles (solidité et uniformité) ainsi qu'une bonne facilité de préparation.

Les études ont également démontré que l'ajout de WPC dans les billes accélère la croissance bactérienne durant les 48 premières heures d'incubation. Un minimum de 1%

de WPC a été nécessaire afin d'obtenir une croissance raisonnable. Bury *et al.* (1998) ont obtenu des résultats similaires. Dans leur étude, la croissance de deux souches de BAL était stimulée alors que ces souches étaient cultivées dans un milieu de lactosérum réhydraté contenant un minimum de 1% de WPC. Lorsque la concentration de WPC était augmentée à 2%, la croissance des lactobacilles augmentait également.

L'ajout de WPC dans la formulation servant à fabriquer des billes, a permis de diminuer le relargage bactérien à l'extérieur des billes. En effet, il a été remarqué que lorsqu'au moins 1% de WPC a été ajouté dans la solution de billes, la concentration de *L. lactis* était près de 500 fois plus élevée suite à cinq jours d'incubation que des billes composées de 0.5% de WPC. Par contre, lorsqu'une trop grande quantité de WPC (4% p/v) était ajoutée, une légère diminution de bactéries a été dénombré à l'intérieur des billes. Ceci peut être expliqué par la plus grande porosité des billes riches en WPC.

Le pH du surnageant a été aussi affecté par la concentration interne de WPC. Lorsque des concentrations de 1% et 2% de WPC ont été ajoutées à la formulation de billes, une acidification du surnageant a été mesuré suite à 12 heures d'incubation. Cette chute de pH a été sans doute causée par la conversion du lactose contenu dans le WPC en acide lactique (Prescott *et al.*, 1995). Cette diminution du pH était inversement proportionnelle à la croissance bactérienne. Par la suite, le pH est devenu alcalin jusqu'à la fin de l'expérience. Le manque de source de carbone et du catabolisme des acides aminés peuvent être responsables de ce phénomène.

La suite des expériences a été réalisée avec des billes contenant 2% de WPC. À cette concentration, la croissance des BAL à l'extérieur des billes ainsi que le relargage modéré de *L. lactis* vers l'extérieur des billes étaient supérieures. L'acidification du milieu peptoné pauvre en source de carbone était intéressante. En réponse au premier objectif du projet, des concentrations d'alginate (1.5% p/v) et de WPC (2% p/v) optimales ont été déterminées.

2. Tests d'inhibitions *in vitro*

Les premiers tests d'inhibition ont été effectués avec des billes d'alginate (1.5% p/v) et de WPC (2% p/v). Ces tests ont été effectués premièrement dans des plats de Pétri *in vitro*.

Les résultats discutés dans cette section ont permis de conclure que *L. lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 encapsulé conserve sa capacité antimicrobienne contre diverses espèces microbiennes dans un milieu solide. Comme démontré par plusieurs auteurs, *L. lactis* sécrète de la nisine, un métabolite protéique possédant un large spectre d'inhibition envers les bactéries gram positives (Natrajan et Sheldon 2000b; Siragusa *et al.* 1999). Dans cette recherche préliminaire, le "agar spot test" a confirmé que la souche ATCC 11454 productrice de nisine a permis de supprimer la croissance des genres bactériens *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Micrococcus* et *Staphylococcus* sur gélose BHI. Comme il n'y a pas de zone d'inhibition lorsque la gélose est additionnée d'enzymes protéolytiques (tableau 12), ces résultats confirment que le composé antimicrobien efficace contre ces bactéries est une bactériocine.

Jusqu'ici aucune étude n'a été réalisée afin de vérifier le pouvoir antimicrobien de BAL encapsulées contre divers microorganismes dans des milieux solides. Afin d'en faire la démonstration, une méthode modifiée du "agar spot test" (avec la différence que la BAL testée est encapsulée) a été réalisée. Les résultats obtenus ont démontré clairement que les BAL encapsulées sécrètent effectivement de la nisine et que cette nisine diffuse au travers des billes afin d'aller exercer leur effet bactéricide sur toutes les bactéries Gram positives qui ont servis de souches indicatrices dans cette étude. Aucune zone d'inhibition n'a été observée lorsque le milieu de culture était traité par des protéases, ce qui permet de conclure que l'agent bactéricide est une bactériocine, dans ce cas la nisine. Avec l'utilisation de la technique de l'agar spot test, les souches indicatrices les plus sensibles aux bactériocines ont été caractérisées par une zone d'inhibition plus large. Ceci peut facilement être expliqué par la diffusion progressive de la nisine dans l'agar, servant d'agent de gélification de la gélose. En effet, les résultats

ont montré que la concentration de nisine était inversement proportionnelle à la distance de la bille, c'est-à-dire que plus on s'éloigne de la bille, moins la concentration de nisine est élevée. Le diamètre du halo était également fonction de la solubilité de la nisine (Prescott *et al.* 1995). Les résultats ont montré que l'inhibition de *S. aureus* a débuté après 4 heures d'une incubation préalable à l'ajout de la souche indicatrice de *L. lactis* encapsulé à 35°C dans une gélose BHI et ce pour toutes les formulations de billes testées. L'utilisation d'une souche plus sensible à la nisine (par exemple *Lactobacillus sake*) pour effectuer le test aurait mené à l'apparition plus rapide d'une zone d'inhibition car une quantité moindre de nisine aurait été nécessaire afin d'inhiber cette souche (Fleming *et al.*, 1975).

Le rayon d'inhibition a varié, au cours de l'étude, de 0.5 mm (2% alginate) à 1.5 mm (1.5% alginate). Les différentes zones d'inhibition obtenues avec les formulations 1 et 2 peuvent être expliquées par la concentration de BAL à l'intérieur des billes. En effet, les billes fabriquées à partir d'alginate 1.5% contenaient 275% de plus de BAL vivantes que les billes faites de 1% d'alginate (résultats non présentés); il était donc normal que ces billes produisaient plus rapidement plus de nisine. Par contre, les billes produites à partir d'une solution d'alginate de 2% contenaient plus de cellules vivantes mais démontraient une zone d'inhibition plus étroite que les billes à 1.5% d'alginate. Il est possible d'expliquer ce phénomène. Selon Smidsrod et Skjak-Braek (1990), les billes fabriquées avec une forte concentration d'alginate engendrent la formation de petits pores à la surface de la matrice. Cette étude a démontré que la taille des pores de cette matrice pouvait varier de 5 nm à 200 nm selon la concentration en alginate diminuant par contre la vitesse de diffusion de la nisine à l'extérieur des billes. Par contre, les billes contenant du WPC (1%) avaient une concentration d'alginate de 1.5% mais contenaient une plus petite quantité de bactéries que les billes fabriquées seulement d'alginate 1.5%, c'est donc ce qui explique la plus lente formation d'une zone d'inhibition.

Il est connu depuis longtemps que la croissance des bactéries Gram positives est inhibée par la nisine (Fleming *et al.*, 1975; Mayra-Makinen et Bigret, 1993; Tagg *et al.* 1976). Cependant, les bactéries Gram négatives possèdent une membrane externe riche

en lipopolysaccharides (LPS), imperméable à plusieurs antibiotiques (Prescott *et al.* 1995) ce qui rend inefficace l'effet létal des bactériocines (Alakomi *et al.* 2000, Gao *et al.* 1999). Certains composés sont capables de causer le relâchement des LPS de la membrane externe ce qui résulte en une perméabilité accrue de cette barrière. L'EDTA est un agent chélateur efficace, en plus d'être reconnu GRAS (generally recognized as safe) par le FDA. Plusieurs auteurs ont déjà utilisé l'EDTA en combinaison avec la nisine afin de supprimer efficacement la croissance des bactéries Gram négatives tel *E. coli* et *Salmonella* (Boziaris et Adams 1999, Gill et Holley 2000, Natrajan et Sheldon 2000b, Stevens *et al.* 1992). L'acide lactique, un sous-produit majeur de la fermentation des BAL, semble posséder la même capacité de réduction de l'intégrité de la membrane externe des bactéries gram négatives (Alakomi *et al.* 2000).

Des zone d'inhibition ont été obtenues dans cette étude suite à la production de nisine par *L. lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 encapsulés en combinaison avec diverses molarités d'EDTA dans une gélose BHI contre diverses souches indicatrices Gram négatives. Les souches indicatrices à l'étude étaient *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Pseudomonas putida* et, comme contrôle positif, *Staphylococcus aureus*. De plus, différents temps de contact entre l'EDTA et les souches indicatrices encore dans une gélose liquide, afin de faciliter la rencontre de l'agent chélateur avec les membranes externes bactériennes, ont été testés. Les résultats ont montré que seul *Escherichia coli* a été inhibé par les billes ; un halo d'inhibition variant entre 2 et 5 mm est observé. Une faible concentration d'EDTA a été suffisante afin d'empêcher la croissance du coliforme, ce qui est en accord avec la littérature. En effet, Stevens *et al.* (1992) ont utilisé une concentration de 0.20 mM d'EDTA pour supprimer la croissance de plusieurs bactéries Gram négatives dans des milieux liquides. L'EDTA n'a pas nécessité de contact dans un milieu liquide afin d'exercer son action. Cependant, l'augmentation de la concentration d'EDTA n'a pas entraîné une augmentation du diamètre d'inhibition. De plus, l'ajout d'EDTA dans la gélose contenant *Staphylococcus aureus* comme souche indicatrice n'a eu aucun effet synergique sur l'inhibition de cette bactérie par la nisine puisque la zone d'inhibition n'a pas varié. D'un autre côté, *Salmonella typhi* et *Pseudomonas putida* semblaient nécessiter une plus forte production de nisine afin d'être inhibées puisqu'en

présence ou en absence d'EDTA, aucune inhibition de ces espèces n'a été observée. D'autres auteurs ont démontré l'inhibition de ces bactéries par une combinaison de nisine et d'un agent chélateur (Stevens *et al.* 1992, Ariyapitipun *et al.* 1999). Une plus longue incubation des billes, ce qui augmenterait la concentration de nisine dans la gélose, devrait être effectuée afin de confirmer cette inhibition.

3. Destruction de *S. aureus* dans du bœuf haché par *L. lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 encapsulé.

Un objectif de cette étude était de démontrer la capacité de *L. lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 à détruire la flore pathogène (*S. aureus* ATCC 29213) potentiellement retrouvée dans des échantillons de bœuf haché à 2 températures soit 7°C et 35°C. Le choix de ces températures s'explique ainsi : 7°C afin de simuler la température de conservation des viandes lorsque la chaîne de froid est brisée et 35°C afin d'optimiser la température de croissance de *L. lactis* et ainsi accélérer les manipulations. De plus, les températures de fermentation des viandes (saucissons, salami) se rapprochent de cette valeur ; il pourrait ainsi être possible d'établir des extrapolations quant à d'autres utilisations de cette culture protectrice. D'une part, l'inhibition *in vitro* de *S. aureus* par la nisine a été démontrée par plusieurs auteurs (Arihara *et al.*, 1998; Bierbaum et Sahl, 1985; Giacometti *et al.*, 2000; Masschalk *et al.*, 2001). L'inhibition de *S. aureus* et autres bactéries Gram positives par de la nisine incorporée à diverses matrices a aussi été démontrée dans de nombreuses études (Coma *et al.*, 2001; Cutter et Siragusa, 1996; Haines et Harmon, 1973; Hoffman *et al.*, 2001; Padgett *et al.*, 1998; Siragusa *et al.*, 1999). Plusieurs recherches ont aussi permises de démontrer que l'inoculation de *L. lactis* dans de la viande permettait de contrôler des populations microbiennes variées (Coffey *et al.*, 1998; Scanell *et al.*, 2001; Reddy *et al.*, 1970; Wessels et Huss, 1996). Par contre, aucune étude n'a démontré le ralentissement de la croissance de *S. aureus* dans du bœuf haché par l'ajout d'une culture de départ encapsulée. D'autre part, Kearney *et al.* (1990a) ont démontré que les BAL encapsulées possédaient une capacité de fermentation des viandes accrue comparativement à des BAL libres. À la lueur de ces études, il est donc possible de proposer comme hypothèse que l'encapsulation de *L. lactis*

subsp. *lactis* ATCC 11454 aurait un effet antimicrobien plus puissant afin de protéger des échantillons de bœuf haché contaminé par *S. aureus* que ne le ferait des BAL libres. De plus, l'ajout d'un ingrédient prébiotique (WPC) dans les billes stimule la croissance de *L. lactis* dans un milieu pauvre tel que démontré plus tôt dans cette étude.

Une étude récente réalisée par Wessels et Huss (1996) a démontré le pouvoir protecteur d'une culture de *L. lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 dans des tranches de saumon fumé. Cette étude met en évidence un ralentissement de la croissance de *Listeria monocytogenes* d'environ 1 log₁₀ UFC/g après 2 jours de co-culture à 10°C. Après 21 jours d'entreposage, la concentration de pathogènes a augmenté d'environ 1 log₁₀ UFC/g passant de 10⁴ UFC/g initialement à 10⁵ UFC/g à la fin de l'étude. Malgré tout, l'écart de 1 log₁₀ UFC/g était maintenu entre la quantité de *Listeria monocytogenes* cultivé seul et la concentration de *L. monocytogenes* co-cultivé en présence de *L. lactis*.

Dans le cadre de l'expérience en cours, lorsque cultivé dans du bœuf haché mi-maigre à 35°C et en présence de *L. lactis* ATCC 11454, la concentration de *S. aureus* a augmenté graduellement. Par contre, durant les 3 premiers jours d'entreposage, cette concentration a été plus faible que les échantillons non-inoculés par *L. lactis*. Des différences d'environ 1 log₁₀ UFC g⁻¹ ont été mesurées au cours de cette période. Afin d'éviter de grands écarts entre les différentes journées d'analyse, un seul lot de bœuf haché a été initialement contaminé par les bactéries et les dénombrements ont été effectués sur ce morceau pour la durée de l'expérience. En tout, six échantillons de viande hachée ont été analysés pour chaque groupe à l'étude.

La température de réfrigération n'étant pas propice à la croissance de *L. lactis* (Tansil, 1984), la mortalité de *S. aureus*, a été moins efficace, c'est-à-dire qu'une diminution de croissance de 0.28 log₁₀ UFC g⁻¹ a été mesurée au jour 2 de l'étude. Cette différence était de 0.78 log₁₀ UFC g⁻¹ après 10 jours d'entreposage. En fait, lorsque les échantillons de bœuf haché ont été contaminés par *S. aureus* et *L. lactis* et conservés à 7°C, les concentrations en pathogènes de la viande ont diminué à tous les jours d'analyses, tandis que lorsque la viande ne contenait pas de BAL, les dénombrements de

S. aureus ne variaient pas. Cette constatation permet donc d'affirmer qu'il pourrait être possible de préserver des échantillons de bœuf haché de contaminations par des pathogènes survenant suite à des abus de température en inoculant une culture protectrice, en l'occurrence *L. lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454. Des concentrations plus importantes en BAL pourraient être appliquées au départ afin d'augmenter l'efficacité de la protection.

Il est connu dans la littérature que *S. aureus* peut résister à un pH aussi bas que 5.0 à 5.2 (Tansil, 1984). Il devient alors possible de supposer comme hypothèse que l'inhibition de la croissance du pathogène peut être provoquée par l'effet de compétition de *L. lactis* ou la production *in situ* de nisine. Comme stratégie pour assurer une quantité de nisine suffisante dans la viande afin de la préserver des risques de contaminations subséquentes à un abus de température, l'ajout d'une culture de départ de *L. lactis* est préférable à une addition de nisine purifiée parce que cette dernière est rapidement inactivée dans les produits carnés frais par le glutathion (Rose *et al.*, 1999). En effet, cette équipe a démontré que l'activité de la protéine antimicrobienne serait inhibée par un couplage enzymatique du glutathion avec une molécule de nisine. Il y aurait formation d'un lien thioéther entre un atome de carbone électrophile et le glutathion. Rose *et al.* (1999) amène une information suffisante pouvant expliquer les résultats controversés d'études antérieures démontrant l'inefficacité de la nisine à préserver des produits carnés frais à des concentrations qui auraient normalement dû être bactéricides (Chung *et al.*, 1989; Mahadeo et Tattini, 1994; Rayman *et al.*, 1983). La nisine étant produite continuellement par des BAL vivantes, le glutathion est donc en quantité insuffisante pour inactiver les molécules de nisine nouvellement métabolisée par les BAL durant l'entreposage. En effet, il a été démontré que de la viande fraîche contient seulement entre 156 et 627 nmol g⁻¹ de glutathion (Wierbicka *et al.*, 1989).

L'étude effectuée sur le bœuf haché entreposé à 7°C a montré que la concentration en *L. lactis* n'était jamais supérieure à 5.5 log₁₀ UFC g⁻¹. Afin d'obtenir une meilleure inhibition de *S. aureus*, il serait intéressant d'accélérer le taux de croissance des BAL au cours de l'entreposage. Comme les muscles des mammifères

contiennent à peine 0.3% de glucose (% poids humide ; Davies et Board, 1998), il devient important d'ajouter une source de carbone à cette viande. L'encapsulation de *L. lactis* semble un moyen plus qu'intéressant d'accélérer la croissance des BAL. En plus de leur fournir un environnement favorable à leur reproduction, c'est-à-dire un environnement libres de tous contaminants, les billes contiennent aussi des ingrédients prébiotiques soit les protéines laitières et du lactose. Lorsque les échantillons de viande ont été inoculés par *S. aureus* et *L. lactis* encapsulés, l'encapsulation a permis d'obtenir une densité de BAL aussi élevée que $7.09 \log_{10}$ UFC g^{-1} après 10 jours d'entreposage à 7°C. L'accroissement de population pourrait être due par un environnement plus favorable pour la croissance des lactocoques. Wessels et Huss (1996) ont démontré que la croissance de *L. lactis* subsp. *lactis* à une température aussi froide que 5°C était possible dans un bouillon de culture. Il est normal qu'à 7°C, le taux de croissance soit ralenti par rapport à 35°C et que des densités microbiennes aussi hautes ($8 \log_{10}$ UFC g^{-1}) ne soient pas atteintes en si peu de temps. L'étude a démontré néanmoins que l'encapsulation semble accélérer et augmenter la croissance comparativement aux BAL libres. À 35°C, l'encapsulation a augmenté sensiblement la densité microbienne après trois jours d'entreposage mais par la suite il n'y a plus de différences significatives entre les BAL libres et les BAL encapsulées.

Malheureusement, malgré la plus forte croissance de *L. lactis* encapsulés dans les échantillons de bœuf haché à 7°C, la mortalité de *S. aureus* n'est pas significativement plus importante qu'en présence de *L. lactis* libres. Ceci peut s'expliquer par la difficulté de la nisine à diffuser sur une grande distance à l'extérieur des billes d'alginate. En effet, les BAL étant concentrées dans des billes d'alginate, elles ont accès à une moins grande surface de contact que les BAL libres ce qui implique que la disponibilité de la nisine est restreinte. Afin de corriger ce problème, une autre approche a été utilisée pour ralentir la croissance de *S. aureus* dans le bœuf haché, soit la microencapsulation de *L. lactis*.

La microencapsulation des BAL a été effectuée afin d'en vérifier la capacité antimicrobienne contre *S. aureus* dans des échantillons de bœuf haché conservés à 35°C

et 7°C. Suite à cette expérience, il a été démontré que malgré une plus faible concentration de départ en *L. lactis*, les BAL microencapsulées possédaient un pouvoir inhibiteur supérieur que les BAL libres contre *S. aureus* autant à 35°C qu'à 7°C. En effet, durant les trois premiers jours, la concentration de pathogènes dans les groupes inoculés de *L. lactis* microencapsulées était plus basse qu'en présence de *L. lactis* libres. De plus, la présence de BAL dans les échantillons de bœuf haché a permis un ralentissement de la croissance du pathogène comparativement au groupe témoin. À température de réfrigération, la quantité de Staphylocoques était plus basse pour les groupes BAL microencapsulées durant les 5 premiers jours de l'étude. À la lueur de ces résultats, la microencapsulation a donc permis de ralentir la croissance de *S. aureus* autant à 35°C qu'à 7°C.

Il est maintenant possible de comparer les résultats d'inhibition obtenus entre les BAL encapsulées et microencapsulées. Ces résultats démontrent que la microencapsulation a été plus efficace que l'encapsulation à retarder le développement des bactéries pathogènes au moins durant les trois premiers jours d'entreposage à 35°C. À 7°C, les résultats d'inhibition de *S. aureus* par les BAL microencapsulées ont indiqué trois baisses significatives tandis que les BAL encapsulées ont permis deux baisses significatives. Après 7 jours d'entreposage, une réduction de $0.76 \log_{10} \text{ UFC g}^{-1}$ a été observée lorsque les échantillons de bœuf haché étaient additionnés de BAL microencapsulées. Ce phénomène est essentiellement dû à une meilleure dispersion des BAL dans l'ensemble du bœuf haché ce qui a permis une meilleure diffusion de la nisine.

4. Immobilisation de nisine

Les résultats de cette recherche démontrent clairement que la nisine conserve son activité lorsqu'elle est immobilisée dans une formulation de film insoluble biodégradable à base d'alginate modifié. Les conditions de fabrication et de stérilisation des films (irradiation) n'ont pas éliminé le pouvoir antimicrobien de la bactériocine. Des études précédentes présentaient l'utilisation de bactériocines pour inhiber les bactéries à la

nisine adsorbée à la surface d'une matrice (Bower *et al.*, 1995; Daeschel et McGuire, 1995; Ming *et al.*, 1997). Quelques autres ont présenté le pouvoir antimicrobien de la nisine piégée à l'intérieur d'une matrice non biodégradable (Siragusa *et al.*, 1999). Cependant, de récentes études ont démontré l'activité antimicrobienne d'emballages biodégradables incorporant de la nisine (Coma *et al.*, 2001; Natrajan et Sheldon, 2000a; Natrajan et Sheldon, 2000 b; Padgett *et al.*, 1998). Un des problèmes avec les emballages biodégradables est leur solubilité. Dans cette recherche, l'utilisation d'alginate modifié et de polycaprolactone a permis de produire des films à base de nisine qui ont conservé leur pouvoir antimicrobien. Une des principales caractéristiques de ces films est leur grande hydrophobicité. En fait, l'intégrité physique de la pellicule placée sur la viande a été conservée pour la durée de l'expérience, c'est-à-dire 1 semaine. À la fin de cette semaine, il a été facile de recueillir la pellicule d'alginate sans la briser. Des études sont en cours dans les laboratoires afin de déterminer avec précision les propriétés rhéologiques de cette matrice sous forme de film.

La capacité de contrôler les pathogènes au cours d'applications alimentaires a été réalisée dans un modèle formé d'échantillons minces de bifteck de ronde contaminés en surface par *S. aureus*. Afin d'exercer un effet inhibiteur, la nisine doit être relâchée à la surface de la viande. Les études *in vitro* ont démontré que la nisine a diffusé effectivement à l'extérieur du film dans la gélose. À la fin de l'étude d'immobilisation de nisine dans des films d'alginate modifiée, soit au jour 7, une différence de concentration de $1.36 \log_{10} \text{ UFC g}^{-1}$ a été observée entre les films contenant 1000 UI ml^{-1} et le témoin. Cette variation ne peut être due qu'à la nisine contenue dans le film puisqu'un film sans nisine n'a pas occasionné de différences significatives de concentration bactérienne à la fin de l'étude. Lorsqu'une plus faible quantité de nisine a été piégée dans les films, la différence de concentration avec le groupe témoin n'était plus que de $0.38 \log_{10} \text{ UFC g}^{-1}$. Certains auteurs ont obtenu des résultats de mortalité plus élevés, mais les expériences étaient conduites avec des souches indicatrices, des matrices filmogènes et des conditions différentes. Siragusa *et al.* (1999) ont obtenu un peu plus de $2 \log_{10} \text{ UFC g}^{-1}$ d'inhibition de *Brochothrix thermosphacta* après 20 jours d'application d'un film de polyéthylène sur des échantillons de carcasse de bœuf comparativement aux échantillons non-emballés. La

de *Brochothrix thermosphacta* après 20 jours d'application d'un film de polyéthylène sur des échantillons de carcasse de bœuf comparativement aux échantillons non-emballés. La solubilité de la nisine et sa diffusion (influencée entre autre par la quantité d'eau de la viande et l'hydrophobicité du milieu externe) hors de la matrice d'immobilisation sont des paramètres très importants sur le pouvoir antimicrobien du peptide antimicrobien. Des tests de relargage contrôlé *in vitro* de la nisine seront effectués afin de vérifier le taux de diffusion selon la matrice utilisée. Un projet en cours au laboratoire de Professeur Monique Lacroix tente de faire la mise au point de cette méthode.

Les applications pratiques des films d'emballage contenant de la nisine ne sont réalisables que pour éliminer la contamination de surface. En effet, il devient très difficile à une pellicule à la surface d'une boulette de bœuf haché d'inhiber les bactéries contaminant le cœur de la viande. Afin de palier à ce problème, l'immobilisation de nisine a été réalisée dans des billes d'alginate activé. Ces billes ont ensuite été mélangées dans des échantillons de bœuf haché mi-maigre contaminés par la bactérie pathogène *S. aureus*. La nisine a donc été distribuée partout autant à l'intérieur qu'en surface de la viande comme dans le cas de l'immobilisation de BAL dans des billes d'alginate. Par contre, dans cette expérience, la nisine a été attachée par une liaison imine (Base de Schiff) aux molécules d'alginate afin de contrôler la libération du peptide vers l'extérieur. Cette recherche a permis de démontrer que l'ajout de billes contenant de la nisine (1000 UI g⁻¹) avait effectivement un pouvoir antimicrobien car une différence de diminution d'environ 0.5 log₁₀ UFC g⁻¹ a été observée comparativement au groupe témoin non traité pendant la grande majorité de l'étude. Par contre, la nisine libre semble beaucoup plus efficace que la nisine immobilisée puisque qu'à la fin de l'étude, l'ajout de nisine libre à une concentration de 1000 UI g⁻¹ de viande a permis une diminution de plus de 2 log₁₀ UFC g⁻¹ tandis que la diminution causée par la nisine encapsulée a été de près de 1.5 log₁₀ UFC g⁻¹ soit pratiquement le même niveau de contamination obtenu par l'ajout de nisine libre (500 UI g⁻¹). Cette différence pourrait provenir du fait que la concentration de nisine immobilisée au début de l'expérience était plus basse que la valeur théorique ajoutée de 1000 UI g⁻¹. En effet, il apparaît possible que des pertes aient pu se produire au cours de la fabrication des billes. Il semble très fréquent d'obtenir de telles pertes

puisque dans la littérature, Hari *et al.* (1996) ont observé des pertes initiales de 95% lors de l'encapsulation de la nitrofurantoin, une drogue antiseptique. Les auteurs ont expliqué cette situation par le fait que la drogue était très soluble dans l'eau et qu'elle possédait un faible poids moléculaire ce qui aurait favorisé son relargage instantané. Dans une autre étude, Bashan (1986) a remarqué une très forte perte alors qu'il encapsulait des bactéries vivantes dans des billes d'alginate ($< 10^2$ UFC g^{-1} a été dénombré). Malheureusement, l'auteur n'a pas émis d'hypothèse pour expliquer cette perte. Willmott *et al.* (1992) ont mesuré un rendement d'encapsulation d'à peine 11.6%. Ils ont encapsulé une drogue, la doxorubicin, dans des microbilles protéiques. Ils ont expliqué cette perte par le fait que la doxorubicin serait liée de façon covalente à la matrice de caséine ce qui aurait empêché sa détection. Des études supplémentaires devront être effectuées afin de confirmer cette hypothèse. Il s'agira simplement de doser la concentration de nisine dans le gel d'alginate avant la gélification dans le $CaCl_2$ et après le piégeage à l'intérieur des billes.

Ce modèle d'inhibition a permis d'obtenir les résultats anticipés, mais il semblerait tout de même important d'apporter quelques ajustements. Par exemple, il serait intéressant de vérifier la diffusion de la nisine dans un appareil de mesure de diffusion. Malgré que le milieu externe serait liquide et non solide, comme dans le cas des viandes, il serait alors plus facile de vérifier le relargage de la nisine à l'extérieur des différentes matrices à l'essai. Il serait possible d'établir une relation entre l'inhibition des pathogènes et les propriétés rhéologiques des matrices dans lesquelles serait piégée la nisine. D'autres pathogènes devraient également être à l'étude. Étant donné que la viande hachée conservée à température de réfrigération n'est pas un environnement favorable à la croissance de *S. aureus*, le choix d'une espèce alternative devrait être envisagé. Par exemple, l'utilisation *Listeria monocytogenes* ou *Brochothrix thermosphacta*, deux genres bactériens pathogènes dont la croissance à température légèrement supérieure à 4°C est possible, permettrait sûrement d'obtenir de meilleurs résultats d'inhibition.

Conclusion

Le premier objectif de ce travail était d'optimiser les concentration d'alginate et de WPC entrant dans la formulation servant à fabriquer les billes. Suite aux résultats obtenus, il a été démontré qu'une concentration d'alginate de 1.5% était optimale afin d'assurer la survie de *L. lactis* dans un milieu peptoné pauvre en source de carbone. De plus, cette concentration d'alginate permettait l'obtention de billes bien rondes, uniformes et rigides d'environ 2 mm de diamètre. Par la suite, il a été démontré que l'ajout de WPC à un niveau minimal de 2% a permis de stimuler la croissance de *L. lactis* ainsi que l'activité métabolique de la bactérie encore dans ce milieu peptoné pauvre en source de carbone

Cette étude a démontrée que *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 encapsulé dans une matrice d'alginate et de protéines laitières conservait non seulement sa capacité de produire de la nisine, mais que son spectre d'inhibition restait aussi le même. L'activité de la bactériocine ne se trouve pas non plus diminuée contre les souches indicatrices à l'essai. Il a aussi été démontré que seulement 4 heures d'incubation sont nécessaires à des BAL immobilisées et incubées à 35°C pour produire une quantité suffisante de nisine afin d'inhiber la croissance de *Staphylococcus aureus*. Par la suite, cette étude a permis de démontrer qu'il était possible d'inhiber la croissance de *Escherichia coli*, une souche bactérienne Gram négative, par des billes d'alginate contenant *L. lactis* et de l'EDTA, un puissant agent chélateur.

L'étude réalisée a démontrée qu'il est possible de protéger le bœuf haché d'une contamination opportuniste pouvant survenir dans le cas d'abus de température (7°C). En effet, la croissance de *S. aureus* a été significativement ralentie par la présence d'une culture de départ composée de *L. lactis* autant libres qu'encapsulés. De plus, il a aussi été possible de ralentir la croissance de ce même pathogène à des températures de fermentation, soit 35°C. Des essais de microencapsulation ont permis de ralentir la croissance du staphylocoque doré présents dans la viande autant à 35°C qu'à 7°. Il a

même été observé que les BAL microencapsulées permettaient une plus forte inhibition que les BAL libres à la température de réfrigération.

À la suite de cette étude, il a aussi été démontré que la nisine immobilisée dans des films biodégradables et hydrophobes à base d'alginate modifié possédait la capacité d'inhiber *L. sake*. Lors des essais sur des échantillons de bifteck de ronde, les films contenant de la nisine ont permis une réduction de $1.86 \log_{10} \text{ UFC g}^{-1}$ de la quantité de *S. aureus* après 7 jours d'entreposage au réfrigérateur. L'immobilisation de nisine dans des billes d'alginate activé a permis de réduire cette même flore bactérienne de $1.42 \log_{10} \text{ UFC g}^{-1}$ dans des échantillons de bœuf haché après 14 jours de conservation à 4°C.

Il est connu que la concentration initiale d'un microorganisme pathogène dans un aliment est un facteur très important dans l'initiation de la pathologie. Les résultats présentés dans ces études ont permis de diminuer la charge initiale et de ralentir la croissance de *S. aureus* dans du bœuf. Malgré les nouvelles technologies expérimentées, la santé publique s'améliorera en responsabilisant et en sensibilisant toujours plus les consommateurs aux bonnes pratiques de cuisson dans leur cuisine. En effet, malgré la plus faible quantité de microorganismes dans leur bœuf haché, les consommateurs devront toujours s'assurer d'une cuisson uniforme et complète. Par le ralentissement de la croissance de bactéries contaminantes, l'ajout d'une culture protectrice de BAL permettra de conserver plus longtemps les produits carnés sur les tablettes. Les pertes financières de l'industrie alimentaire seront ainsi diminuées.

Le choix et l'utilisation de nouvelles matrices de microbilles permettant d'obtenir un microclimat imperméable aux métabolites externes mais permettant tout de même le relargage de la nisine ou bien l'utilisation d'ingrédients prébiotiques plus performants pourraient être des solutions à envisager à court terme. À plus long terme, la découverte d'une souche de BAL productrice de bactériocine à large spectre d'inhibition, provenant de la flore normale du bœuf et capable de croître à des températures de réfrigération sans altérer le goût de la viande serait un objectif à atteindre.

Remerciements

Ce travail est le fruit de la collaboration de nombreuses personnes qu'il est très important de remercier.

Tout d'abord, le Professeur Monique Lacroix, ma directrice de recherche qui, dès le début, m'a fait confiance en me proposant un projet que personne n'avait encore abordé. Merci pour ses conseils, sa rigueur et surtout de m'avoir enseigné la persévérance.

Merci aussi à ma co-directrice, Professeur Wanda Smoragiewicz dont la bonne humeur et l'enthousiasme sont contagieux. Elle a été la première à me donner une chance de faire partager mes quelques connaissances à des étudiants, une expérience que j'ai beaucoup appréciée.

Merci au Docteur Blaise Ouattara pour son agréable compagnie. Son incroyable expérience en microbiologie alimentaire, sa capacité d'analyse et son jugement m'ont été d'un très grand secours. Bon succès dans ta carrière.

Merci à tous les membres du laboratoire qui m'ont côtoyé durant ces années de maîtrise, m'ont inspiré, aidé, conseillé, dynamisé, bref qui ont mis de l'atmosphère entre les quatre murs de béton.

Merci à Andrea Villegas, ma fiancée, qui m'a soutenu et souvent encouragé dans les périodes creuses. Je t'aime « à l'éppafo » !

Je remercie la fondation Armand-Frappier et la compagnie Bio-K+ pour leur support financier au cours des deux années qu'ont duré les expériences.

Références

- ABEE, T., F. M. Rombouts, J. Hugenholtz, G. Guihard et L. Letellier. 1994. Mode of action of nisin Z against *Listeria monocytogenes* Scott A grown at high and low temperatures. Applied and Environmental Microbiology, vol. 60. p. 1962-1968.
- ABEE, T., L. Krockel et C. Hill. 1995. Bacteriocins : modes of action and potentials in food preservation and control of food poisoning. Food Microbiology, vol.28. p. 169-185.
- ADHIKARI, K., A. Mustapha, I. U. Grun et L. Fernando. 2000. Viability of microencapsulated bifidobacteria in set yogurt during refrigerated storage. Journal of Dairy Science, vol. 83. p. 1946-1951.
- ALAKOMI, H. L., E. Skytta, M. Saarela, T. Mattila-Sandholm, K. Latva-Kala et I. M. Helander. 2000. Lactic acid permeabilizes gram-negative bacteria by disrupting the outer membrane. Applied and Environmental Microbiology, vol. 66. p. 2001-2005.
- ALLISON, G. E., R. W. Worobo, M. E. Stiles et T. R. Klaenhammer. 1995. Heterologous expression of the lactacin F peptides by *Carnobacterium piscicola* LV17. Applied and Environmental Microbiology, vol. 61. p. 1371-1377.
- AL-SHEDDY, I., M. Al-Dagal et W. A. Bazaraa. 1999. Microbial and sensory quality of fresh camel meat treated with organic acid salts and/or bifidobacteria. Journal of Food Science, vol. 64. p. 336-339.
- ANONYME. 2001. Valeurs nutritives du bœuf haché canadien. Centre d'information sur le bœuf.
- ARAYA-KOJIMA, T., T. Yaeshima, N. Ishibashi, S. Shimamura et H. Hayasawa. 1995. Inhibitory effects of *Bifidobacterium longum* BB536 on harmful intestinal bacteria. Bifidobacteria Microflora, vol. 14. p. 59-66.
- ARIHARA, K., H. O. Itoh, Y. Kondo, T. Sameshima, H. Yamanaka, M. Akimoto, S. Kanai et T. Miki. 1998. *Lactobacillus acidophilus* group lactic acid bacteria applied to meat fermentation. Journal of Food Science, vol. 63. p. 544-547.
- ARIYAPITIPUN, T., A. Mustapha et A. D. Clarke. 1999. Microbial shelflife determination of vacuum-packaged fresh beef treated with polylactic acid, lactic acid, and nisin solutions. Journal of Food protection, vol. 62. p. 913-920.
- AUDISIO, M. C., G. Oliver et M. C. Apella. 1999. Antagonistic effect of *Enterococcus faecium* J96 against human and poultry pathogenic *Salmonella* spp. Journal of Food Protection, vol. 62. p. 751-755.
- BACUS, J. N. et W. L. Brown. 1981. Use of microbial cultures : meat products. Food Technology, vol. p. 74-79.

- BASHAN, Y. 1986. Alginate beads as synthetic inoculant carriers for slow release of bacteria that affect plant growth. Applied and Environmental Microbiology, vol. 51. p. 1089-1098.
- BÉLIARD, E., B. Abgrall et C. M. Bourgeois. 1989. Sélection de souches de bactéries lactiques inhibitrices de *Pseudomonas putida*. Sciences des aliments, vol. 9. p. 665-684.
- BELL, R. G., et K. M. De Lacy. 1987. The efficacy of nisin, sorbic acid and monolaurin as preservatives in pateurized cured meat products. Food Microbiology, vol. 4. p. 277-283.
- BIERBAUM, G. et H. G. Sahl. 1985. Induction of autolysis of staphylococci by the basis peptide antibiotics Pep 5 and nisin and their influence on the activity of autolytic enzymes. Archives of Microbiology, vol. 141. p. 249-254.
- BONESTROO, M. H., B. J. M. Kusters, J. C. de Wit et F. M. Rombouts. 1993. The fate of spoilage and pathogenic bacteria in fermented sauce-based salads. Food Microbiology, vol. 10. p. 101-111.
- BOWER, C. K., J. McGuire et M. A. Daeschel. 1995. Suppression of *Listeria monocytogenes* following adsorption of nisin onto silica surfaces. Applied and Environmental Microbiology, vol. 61. p. 992-997.
- BOZIARIS, I. S. et M. R. Adams. 2001. Temperature shock, injury and transient sensitivity to nisin in gram negatives. Journal of Applied Microbiology, vol. 91. p. 715-724.
- BOZIARIS, I. S. et M. R. Adams. 1999. Effect of chelators and nisin produced in situ on inhibition and inactivation of gram negatives. International Journal of Food Microbiology, vol. 53. p. 105-111.
- BRACCINI, I. et S. Pérez. 2001. Molecular basis of Ca²⁺-induced gelation in alginates and pectins: the egg-box model revisited. Biomacromolecules, vol. 2. p. 1089-1096.
- BREDHOLT, S., T. Nesbakken et A. Hølek. 1999. Protective cultures inhibit growth of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 in cooked, sliced, vacuum- and gas-packaged meat. International Journal of Food Microbiology, vol. 53. p. 43-52.
- BRUNO, M. E. C., A. Kaiser et T. J. Montville. 1992. Depletion of proton motive force by nisin in *Listeria monocytogenes* cells. Applied and Environmental Microbiology, vol. 58. p. 2255-2259.
- BUDAVARI, S., M. J. O'neil, A. Smith, P. E. Heckelman et J. F. Kinneary (Éd.). 1996. The Merck Index: an encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals, 12^{ème} édition. Merck Research Laboratories, Whitehouse Station, NJ, p. 1913.

BUDU-AMOAKO, E., R. F. Ablett, J. Harris et J. Delves-Broughton. 1999. Combined effect of nisin and moderate heat on destruction of *Listeria monocytogenes* in cold-pack lobster meat. Journal of Food Protection, vol. 62. p. 46-50.

BURY, D., P. Jelen et K. Kimura. 1998. Whey protein concentrate as a nutrient supplement for lactic acid bacteria. International Dairy Journal, vol. 8. p. 149-151.

CAI, Y., L. -K. Ng et J. M. Farber. 1997. Isolation and characterization of nisin-producing *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* from bean-sprouts. Journal of Applied Microbiology, vol. 83. p. 499-507.

CAMPANINI, M. I. Pedrazonni, S. Barbuti et P. Baldini. 1993. Behavior of *Listeria monocytogenes* during the maturation of naturally and artificially contaminated salami: effect of lactic-acid bacteria starter cultures. International Journal of Food Microbiology, vol. 20. p. 169-175.

CERRUTTI, P., M. R. Terebiznik, M. S. de Huergo, R. Jagus et A. M. R. Pilosof. 2001. Combined effect of water activity and pH on the inhibition of *Escherichia coli* by nisin. Journal of Food Protection, vol. 64. p. 1510-1514.

CHAMPAGNE, C. P., N. Morin, R. Couture, C. Gagnon, P. Jelen et C. Lacroix. 1992a. The potential of immobilized technology to produce freeze-dried, phage-protected cultures of *Lactococcus lactis*. Food Research International, vol. 25. p. 419-427.

CHAMPAGNE, C. P., C. Gaudy, D. Poncelet et R. J. Neufeld. 1992b. *Lactococcus lactis* release from calcium alginate beads. Applied and Environmental Microbiology, vol. 58. p. 1429-1434.

CHAMPAGNE, C. P., C. Lacroix et I. Sodini-Gallot. 1994. Immobilized cell technologies for the dairy industry. Critical Reviews in Biotechnology, vol. 14. p. 109-134.

CHAMPAGNE, C. P., N. J. Gardner, L. Soullignac et J. P. Innocent. 2000. The production of freeze-dried immobilized cultures of *Streptococcus thermophilus* and their acidification properties in milk. Journal of Applied Microbiology, vol. 88. p. 124-131.

CHIHIB, N.-E., L. Monnerat, J. M. Membré et J. -L. Tholozan. 1999. Nisin, temperature and pH effects on growth and viability of *Pectinus frisingensis*, a gram-negative, strictly anaerobic beer-spoilage bacterium. Journal of Applied Microbiology, vol. 87. p. 438-446.

CHIKINDAS, M. L., M. J. Garcia-Garcera, A. J. M. Driessen, A. M. Ledebøer, J. Nissen-Meyer, I. F. Nes, T. Abee, W. N. Konings et G. Venema. 1993. Pediocin PA-1, a bacteriocin from *Pediococcus acidilactici*, forms hydrophilic pores in the cytoplasmic membrane of target cells. Applied and Environmental Microbiology, vol. 59. p. 3577-3584.

CHOI, H.-J., C. -I. Cheigh, S. B. Kim et Y. -R. Pyun. 2000. Production of a nisin-like bacteriocin by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* A164 isolated from kimchi. Journal of Applied Microbiology, vol. 88. p. 563-571.

CHOI, M. H. et Y. H. Park. 2000. Selective control of lactobacilli in kimchi with nisin. Letters in Applied Microbiology, vol. 30. p. 173-177.

CHOI, S. Y. et L.R. Beauchat. 1994. Growth inhibition of *Listeria monocytogenes* by a bacteriocin of *Pediococcus acidilactici* M during fermentation of kimchi. Food Microbiology, vol. 11. p. 301-307.

CHUNG, K. T., J. S. Dickson et J. D. Crouse. 1989. Effects of nisin on growth of bacteria attached to meat. Applied and Environmental Microbiology, vol. 55. p. 1329-1333.

COCONNIER, M. -H., V. Liévin, M. -F. Bernet-Camard, S. Hudault et A. L. Servin. 1997. Antibacterial effect of the adhering human *Lactobacillus acidophilus* strain LB. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, vol. 41. p. 1046-1052.

COFFEY, A., M. Ryan, R. P. Ross, C. Hill, E. Arendt et G. Schwarz. 1998. Use of a broad-host-range bacteriocin-producing *Lactococcus lactis* transconjugant as an alternative starter for salami manufacture. International Journal of Food Microbiology, vol. 43. p. 231-235.

COMA, V., I. Sebti, P. Pardon, A. Deschamps et F. H. Pichavant. 2001. Antimicrobial edible packaging based on cellulosic ethers, fatty acids, and nisin incorporation to inhibit *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*. Journal of Food Protection, vol. 64. p. 470-475.

CUMAIRA-MAPAQ. 1995. Critères microbiologiques pour l'interprétation des resultants en analyse alimentaire. Québec. p. 25.

CUTTER, C. N. et G. R. Siragusa. 1994. Decontamination of beef carcass tissue with nisin using a pilot scale model carcass washer. Food Microbiology, vol. 11. p. 481-489.

CUTTER, C. N. et G. R. Siragusa. 1997. Growth of *Brochothrix thermosphacta* in ground beef following treatments with nisin in calcium alginate gels. Food Microbiology, vol. 14. p. 425-430.

CUTTER, C. N. et G. R. Siragusa. 1996. Reduction of *Brochothrix thermosphacta* on beef surfaces following immobilization of nisin in calcium alginate gels. Letters in Applied Microbiology, vol. 23. p. 9-12.

CUTTER, C. N. et G. R. Siragusa. 1998. Incorporation of nisin in a meat binding system to inhibit bacteria on beef surfaces. Letters in Applied Microbiology, vol. 27. p. 19-23.

- DAESCHEL, M. A. et J. McGuire. 1995. Bactericidal surfaces and articles with attached bacteriocins. U.S. Patent No. 5 451 369.
- DAVIES, A. et R. Board. 1998. The microbiology of meat and poultry. Blackie Academic & Professional, New York, p. 346.
- DELVES-BROUGHTON, J. 1990. NISIN and its uses as a food preservative. Food Technology, vol. 44. p. 100-117.
- DE VOS, W. M., J. W. M. Mulders, R. J. Siezen, J. Hugenholtz et O. P. Kuipers. 1993. Properties of nisin Z and distribution of its gene, *nisZ*, in *Lactococcus lactis*. Applied and Environmental Microbiology, vol. 59. p. 213-218.
- DE VOS, W. M., O. P. Kuipers, J. R. Van der Meer et R. J. Siezen. 1995. Micro Review Maturation pathway of nisin and other lantibiotics: post-translationally modified antimicrobial peptides exported by Gram-positive bacteria. Molecular Microbiology, Vol. 17. p. 427-437.
- DIVIÈS, C., RR. Cachon, J. F. Cavin et H. Prévost. 1994. Immobilized cell technology in wine production. CRC Critical Reviews in Biotechnology, vol. 14. p. 135-153.
- DOYLE, M. P., R. S. Flowers, J. F. Frank, R. G. Labbe, J. Lovett, J. M. Madden, R. L. Newsome, M. D. Pierson et N. R. Reddy. 1988. Bacteria associated with foodborne diseases. Food Technology, vol. 42. p. 181-200.
- DUBÉ, C. 2001. Votre alimentation, votre santé: ce que disent les récentes recherches en nutrition. Québec Science, vol. 40. guide pratique, p. 11-13.
- DUFFES, F., F. Leroi, P. Boyaval et X. Dousset. 1999. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by *Carnobacterium* spp. strains in a simulated cold smoked fish system stored at 4°C. International Journal of Food Microbiology, vol. 47. p. 33-42.
- DUNNE, C., L. Murphy, S. Flynn, L. O'Mahony, S. O'Halloran, M. Feeney, D. Morrissey, G. Thornton, G. Fitzgerald, C. Daly, B. Kiely, E. M. Quigley, G. C. O'Sullivan, F. Shanahan et J. K. Collins. 1999. Probiotics: from myth to reality. Demonstration of functionality in animal models of disease and in human clinical trials. Antonie Van Leeuwenhoek, vol. 76. p. 279-292.
- EMSWILER, B. S., C. J. Pierson et A. W. Kotula. 1976. Bacteriological quality and shelf life of ground beef. Applied and Environmental Microbiology, vol. 31. p. 826-830.
- ENGELKE, G., Z. Gutowski-Eckel, P. Kiesau, U. Siegers, M. Hammelmann et K. -D. Entian. 1994. Regulation of nisin biosynthesis and immunity in *Lactococcus lactis* 6F3. Applied and Environmental Microbiology, vol. 60, no.3. p. 814-825.

FLEMING, H. P., J. L. Etchells, et R. N. Costilow. 1975. Microbial inhibition by an isolate of *Pediococcus* from cucumber brines. Applied and Environmental Microbiology, vol. 30. p. 1040-1042.

FULLER, R. 1989. Probiotics in man and animals. Journal of Applied Bacteriology, vol. 66. p. 365-378.

GAO, Y., M. J. Van Belkum et M. E. Stiles. 1999. The outer membrane of gram-negative bacteria inhibits antibacterial activity of brochocin-C. Applied and Environmental Microbiology, vol. 65. p. 4329-4333.

GIACOMETTI, A., O. Cirioni, F. Barchiesi et G. Scalise. 2000. *In-vitro* activity and killing effect of polycationic peptides on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and interactions with clinically used antibiotics. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, vol. 38. p. 115-118.

GIBSON, G. R. et X. Wang. 1994. Regulatory effects of bifidobacteria on the growth of other colonic bacteria. Journal in Applied Bacteriology, vol. 77. p. 412-420.

GILL, C. O. et G. G. Greer. 1993. "Enumeration and identification of meat spoilage bacteria". Technical Bulletin 1993-8E, Lacombe Technical Bulletin No. 6. p. 5-25.

GILL, A. O. et R. A. Holley. 2000. Surface application of lysozyme, nisin, and EDTA to inhibit spoilage and pathogenic bacteria on ham and bologna. Journal of Food Protection, vol. 63. p. 1338-1346.

GILLILAND, S. E. et M. L. Speck. 1975. Inhibition of psychrotrophic bacteria by lactobacilli and pediococci in nonfermented refrigerated foods. Journal of Food Science, vol. 40. p. 903-905.

GROBOILLOT, A. F., C. P. Champagne, G. D. Darling, D. Poncelet et R. J. Neufeld. 1993. Membrane formation by interfacial cross-linking of chitosan for microencapsulation of *Lactococcus lactis*. Biotechnology and Bioengineering, vol. 42. p. 1157-1163.

GROBOILLOT, A., D. K. Boadi, D. Poncelet et R. J. Neufeld. 1994. Immobilization of cells for application in the food industry. Critical Reviews in Biotechnology, vol. 14, no.2. p. 75-107.

GUSEW-CHARTRAND, N., H. Beaumier et R. Charbonneau. 1977. Étude de l'inoculation de la viande par des microorganismes non-pathogènes dans le but d'inhiber le développement des bactéries indésirables. Rapport de recherche présenté au Ministère de l'agriculture du Canada, Montréal, 42 pages.

HAINES, W. C. et L. G. Harmon. 1973. Effect of selected lactic acid bacteria on growth of *Staphylococcus aureus* and production of enterotoxin. Applied Microbiology, vol. 25. p. 436-441.

- HAMMES, W. P. et C. Hertel. 1998. New developments in meat starter cultures. Meat Science, vol. 49, suppl. 1, p. S125-S138.
- HARI, P. R., T. Chandy et C. P. Sharma. 1996. Chitosan/calcium alginate microcapsules for intestinal delivery of nitrofurantoin. Journal of Microencapsulation, vol. 13. p. 319-329.
- HEELAN, B. A. et O. I. Corrigan. 1997. *In vitro* analysis of the release of incorporated agents from sodium caseinate microspheres. Journal of Microencapsulation, vol. 14. p. 63-78.
- HEELAN, B. A. et O. I. Corrigan. 1998. Preparation and evaluation of microspheres prepared from whey protein isolate. Journal of Microencapsulation, vol. 15. p. 93-105.
- HOFFMAN, K. L., I. Y. Han et P. L. Dawson. 2001. Antimicrobial effects of corn zein films impregnated with nisin, lauric acid, and EDTA. Journal of Food Protection, vol. 64. p. 885-889.
- HOLZAPFEL, W. H., P. Haberer, R. Geisen, J. Björkroth et U. Schillinger. 2001. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food nutrition. American Journal of Clinical Nutrition, vol. 73. suppl. P. 361S-364S.
- HUDAULT, S., V. Lievin, M. F. Bernet-Camard et A. L. Servin. 1997. Antagonistic activity exerted in vitro and in vivo by *Lactobacillus casei* (strain GG) against *Salmonella typhimurium* C5 infection. Applied and Environmental Microbiology, vol. 63. p. 513-518.
- HUGAS, M. 1998. Bacteriocinogenic lactic acid bacteria for the biopreservation of meat and meat products. Meat Science, vol. 49, suppl. 1, p. S139-S150.
- HUGAS, M., F. Pages, M. Garriga et J. M. Monfort. 1998. Application of the bacteriocinogenic *Lactobacillus sakei* CT494 to prevent the growth of *Listeria* in fresh and cooked meat products packed with different atmospheres. Food Microbiology, vol. 15. p. 639-650.
- HUIS IN'T VELD, J. H., R. Havenaar et P. Marteau. 1994. Establishing a scientific basis for probiotic R&D. Trends in Biotechnology, vol 12. p. 6-8.
- HUOT, E., C. Barrena-Gonzalez et H. Petitdemange. 1996. Comparative effectiveness of nisin and bacteriocin J46 at different pH values. Letters in Applied Microbiology, vol. 22. p. 76-79.
- INTERNATIONAL commission on microbiological specifications for goods (ICMSF) working group on microbial assessment. 1998. Potential application of risk assessment techniques to microbiological issues related to international trade in food and food products. Journal of Food Protection, vol. 61. p. 1075-1086.

JUNG, D.-S., F. W. Bodyfelt et M. A. Daeschel. 1992. Influence of fat and emulsifiers on the efficacy of nisin in inhibiting *Listeria monocytogenes* in fluid milk. Journal of Dairy Science, vol. 75. p. 387-393.

JUVEN, B. J., S. F. Barefoot, M. D. Pierson, L. H. McCaskill et B. Smith. 1998. Growth and survival of *Listeria monocytogenes* in vacuum-packaged ground beef inoculated with *Lactobacillus alimentarius* FloraCarn L-2. Journal of Food Protection, vol. 61. p. 551-556.

KANG, D. H. et D. Y. C. Fung. 1999. Reduction of *Escherichia coli* O157:H7 by stimulated *Pediococcus acidilactici*. Letters in Applied Microbiology, vol. 29. p. 206-210.

KEARNEY, L., M. Upton et A. McLoughlin. 1990a. Meat fermentations with immobilized lactic acid bacteria. Applied Microbiology and Biotechnology, vol. 33. p. 648-651.

KEARNEY, L. M., M. Upton et A. Mc Loughlin. 1990b. Enhancing the viability of *Lactobacillus plantarum* inoculum by immobilizing the cells in calcium-alginate beads incorporating cryoprotectants. Applied and Environmental Microbiology, vol. 56. p. 3112-3116.

KHALIL, A. H. et E. H. Mansour. 1998. Alginate encapsulated Bifidobacteria survival in mayonnaise. Journal of Food Science, vol. 63. p. 702-705.

KIM, C. R., J. O. Hearnberger, A. P. Vickery, C. H. White et D. L. Marshall. 1995. Sodium acetate and bifidobacteria increase shelf-life of refrigerated catfish fillets. Journal of Food Science, vol. 60. p. 25-27.

LACROIX, C., C. Paquin et J. P. Arnaud. 1990. Batch fermentation with entrapped growing cells of *Lactobacillus casei*. Applied and Environmental Microbiology, vol. 32. p. 403.

LARISCH, B. C., D. Poncelet, C. P. Champagne et R. J. Neufeld. 1994. Microencapsulation of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*. Journal of Microencapsulation, vol. 11. p. 189-195.

LEE, Y. -K., K. Nomoto, S. Salminen et S. L. Gorbach. 1999. "Handbook of probiotics". John Wiley and Sons, Toronto.

LEISNER, J. J., G. G. Greer, B. D. Dilts et M. E. Stiles. 1995. Effect of growth of selected lactic acid bacteria on storage life of beef stored under vacuum and in air. International Journal of Food Microbiology, vol. 26. p. 231-243.

LEISNER, J.J., G. G. Greer et M. E. Stiles. 1996. Control of beef spoilage by a sulfide-producing *Lactobacillus sake* with bacteriocinogenic *Leuconostoc gelidum* UAL187

during anaerobic storage at 2°C. Applied and Environmental Microbiology, vol. 62. p. 2610-2614.

LEROY, F. et L. DeVuyst. 1999. Temperature and optimal pH conditions that prevail during fermentation of sausages are optimal for production of the antilisterial bacteriocin Sakacin K. Applied and Environmental Microbiology, vol. 65. p. 974-981.

LILLEY, D. M. et R. H. Stillwell. 1965. Probiotics. Growth promoting factors produced by micro-organisms. Science, vol. 147. p. 747-748.

LINKO, P. et Y. Y. Linko. 1981. Industrial applications of immobilized cells. CRC Critical Reviews in Biotechnology, vol. 1. p. 289-338.

LIU, W. et J. N. Hansen. 1990. Some chemical and physical properties of nisin, a small-protein antibiotic produced by *Lactococcus lactis*. Applied and Environmental Microbiology, vol. 56. p. 2551-2558.

LONVAUD-FUNEL, A. et A. Joyeux. 1993. Antagonism between lactic acid bacteria of wines : inhibition of *Leuconostoc oenos* by *Lactobacillus plantarum* and *Pediococcus pentasocceus*. Food Microbiology, vol. 10. p. 411-419.

MAHADEO, M. et S. R. Tattini. 1994. The potential use of nisin to control *Listeria monocytogenes* in poultry. Letters in Applied Microbiology, vol. 18. p. 323-326.

MASSCHALK, B., R. Van Houdt et C. W. Michiels. 2001. High pressure increases bactericidal activity and spectrum of lactoferrin, lactoferricin and nisin. International Journal of Food Microbiology, vol. 64. p. 325-332.

MASSCHELEIN, C. A., D. S. Ryder et J. P. Simon. 1994. Immobilized cell technology in beer production. CRC Critical Reviews in Biotechnology, vol. 14. p. 155-177.

MAYRA-MAKINEN, Annika et Marc Bigret. 1993. "Industrial use and production of lactic acid bacteria". In S. Salminen et A. von Wright, (éd.). *Lactic acid bacteria*. New York, N.-Y.: Marcel Dekker, 1993, p. 65-89.

MCLOUGHLIN, A. J. et C. P. Champagne. 1994. Immobilized cells in meat fermentation. CRC Critical Reviews in Biotechnology, vol. 14. p. 179-192.

MEAD, P. S., L. Slutsker, V. Dietz, L. F. McCaig, J. S. Bresee, C. Shapiro, P. M. Griffin et R. V. Tauxe. 1999. Synpses: Food-related illness and death in the United States. Emerging Infectious Disease, vol. 5. p. 607-625.

MICROBIOLOGY and food safety committee (MFSC) of the national food processors association. 1992. HACCP and total quality management—winning concepts for the 90's: a review. Journal of Food Protection, vol. 55. p. 459-462.

MING, X., G. H. Weber, J. W. Ayres et W. E. Sandine. 1997. Bacteriocins applied to food packaging materials to inhibit *Listeria monocytogenes* on meats. Journal of Food Science, vol. 62. p.413-415.

MODI, K. M., M. L. Chikindas et T. J. Montville. 2000. Sensitivity of nisin-resistant *Listeria monocytogenes* to heat and the synergistic action of heat and nisin. Letters in Applied Microbiology, vol. 30. p. 249-253.

MOFFET, G. 1999. La maladie du Hamburger tue une fillette de six ans. Le journal de Montréal, 3 octobre 1999. p. 3.

MOLL, G. N., J. Clark, W. C. Chan, B. W. Bycroft, G. C. K. Roberts, W. N. Konings et A. J. M. Driessen. 1997. Role of transmembrane pH gradient and membrane binding in nisin pore formation. Journal of Bacteriology, vol. 179. p. 135-140.

NATRAJAN, N., et B. W. Sheldon. 2000a. Efficacy of nisin-coated polymer films to inactivate *Salmonella typhimurium* on fresh broiler skin. Journal of Food Protection, vol. 63. p.1189-1196.

NATRAJAN, N., et B. W. Sheldon. 2000b. Inhibition of *Salmonella* on poultry skin using protein- and polysaccharide-based films containing a nisin formulation. Journal of Food Protection, vol. 63. p. 1268-1272.

NETTLES, C. G. et S. F. Barefoot. 1993. Biochemical and genetic characteristics of bacteriocins of food-associated lactic acid bacteria. Journal of Food Protection, vol. 56. p. 338-356.

NEWTON, K. G., J. C. L. Harrison et A. M. Wauters. 1978. Sources of psychrotrophic bacteria on meat at the abattoir. Journal of Applied Bacteriology, vol. 45. p. 75-82.

NIELSEN, J. W., J. S. Dickson et J. D. Crouse. 1990. Use of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici* to inhibit *Listeria monocytogenes* associated with fresh meat. Applied and Environmental Microbiology, vol. 56. p. 2142-2145.

ONWULATA, C. I., R. P. Konstance et V. H. Holsinger. 1999. The use of milk protein and alginate beads as carriers for linoleic acid. Conference of Food Engineers, présentation à l'American Institute of chemical engineers (AIChE) Annual Meeting, 31 octobre au 5 novembre, T3004, Dallas, Texas, USA.

OUATTARA, B. 1998. « Développement d'un emballage antimicrobien pour les viandes et les produits carnés ». Thèse présentée pour l'obtention d'un grade de Ph.D. en Science et Technologie des aliments à l'Université Laval, Québec, Canada, p. 1-50.

OUATTARA, B., M. Giroux, W. Smoragiewicz, L. Saucier et M. Lacroix. 2002. Combined effect of γ -irradiation, ascorbic acid and edible coating on the improvement of microbial and biochemical characteristic of ground beef. Journal of Food Protection, vol. 65. p. 981-987.

- OVERGAARD, S., J. M. Scharer, M. Moo-Young et N. C. Bols. 1991. Immobilization of hybridoma cells in chitosan alginate beads. Canadian Journal of Chemical Engineering, vol. 69. p. 439.
- PADGETT, T., I. Y. Han et P. L. Dawson. 1998. Incorporation of food-grade antimicrobial compounds into biodegradable packaging films. Journal of Food Protection, vol. 61. p. 1330-1335.
- PARKER, R. B. 1974. Probiotics, the other half of the antibiotic story. Animal Nutrition and Health, vol. 29. p. 4-8.
- PLAUT, A. G. 2000. Clinical pathology of foodborne diseases: notes on the patient with foodborne gastrointestinal illness. Journal of Food Protection, vol. 63. p. 822-826.
- POL, I. E. et E. J. Smid. 1999. Combined action of nisin and carvacrol on *Bacillus cereus* and *Listeria monocytogenes*. Letters in Applied Microbiology, vol. 29. p. 166-170.
- PONCELET, D., C. Dulieu et R. J. Neufeld. 1999. Encapsulation and immobilization techniques. In "Handbook of Encapsulated Cell Technology and Therapeutics" Kühnreiter, WM., R.P. Lanza and W.L. Chick (Eds.), Birkhauser/Springer Verlag, Boston, Chap. 1: p. 1-17.
- PRESCOTT, L., J. P. Harley et D. A. Klein. 1995. Microbiologie. Université De Boeck, Belgique, chapitres 3-7-22-43, p. 41-68, 133-144, 450-466, 866-886.
- PRÉVOST, H., C. Diviès et E. Rousseau. 1985. Continuous yoghurt production with *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* entrapped in ca-alginate. Biotechnology Letters, vol. 7. p. 247-252.
- PRÉVOST, H. et C. Diviès. 1987. Fresh fermented cheese production with continuous pre-fermented milk by a mixed culture of mesophilic lactic streptococci entrapped in ca-alginate. Biotechnology Letters, vol. 9. p. 789-794.
- PRÉVOST, H. et C. Diviès. 1988. Continuous pre-fermentation of milk by entrapped yoghurt bacteria. II. Data for optimization of the process. Milchwissenschaft, vol. 43. p. 716-719.
- PRIETO, M., M. L. Garcia, M.R. Garcia, A. Otero et B. Moreno. 1991. Distribution and evolution of bacteria on lamb carcasses during aerobic storage. Journal of Food Protection, vol. 54. p. 945-949.
- PROCHASKA, J. F., S. C. Ricke et J. T. Keeton. 1998. Meat fermentation research opportunities. Food Technology, vol. 52. p. 52-57.

- RACCACH, M. et D. J. Geshell. 1993. The inhibition of *Listeria monocytogenes* in milk by pediococci. Food Microbiology, vol. 10. p. 181-186.
- RADA, V. et J. Dlabal. 1998. Susceptibility of bifidobacteria to nisin. Letters in Applied Microbiology, vol. 26. p. 123-125.
- RADOMYSKI, T., E. A. Murano, D. G. Olson et P. S. Murano. 1994. Elimination of pathogens of significance in food by low-dose irradiation: a review. Journal of Food Protection, vol. 57. p. 73-86.
- RAHKIO, T. M. et H. J. Korkeala. 1997. Airborne bacteria and carcass contamination in slaughterhouses. Journal of Food Protection, vol. 60. p. 38-42.
- RAYMAN, K., N. Malik et A. Hurst. 1983. Failure of nisin to inhibit outgrowth of *Clostridium botulinum* in a model cured meat system. Applied Environmental Microbiology, vol. 46. p. 1450-1452.
- REDDY, S. G., R. L. Henrickson et H. C. Olson. 1970. The influence of lactic cultures on ground beef quality. Journal of Food Science, vol. 35. p. 787-791.
- ROBERTS, W. T. et J. O. Weese. 1998. Shelf life of ground beef patties treated by gamma radiation. Journal of Food Protection, vol. 61. p. 1387-1389.
- ROSE, N. L., P. Sporns, M. E. Stiles et L. M. McMullen. 1999. Inactivation of nisin by glutathione in fresh meat. Journal of Food Science, vol. 64. p. 759-762.
- SALOFF-COSTE, C. J. 1997. "Le point sur les bienfaits santé des laits fermentés et des probiotiques". http://www.danonenewsletter.fr/fr/news_15.
- SANTÉ CANADA. 2000. Les actualités en bref pour les maladies infectieuses. Septembre 2000. <http://www.hc-sc.gc.ca>
- SCANNELL, A. G. M., C. Hill, D. J. Buckley et E. K. Arendt. 1997. Determination of the influence of organic acids and nisin on shelf-life and microbiological safety aspects of fresh pork. Journal of Applied Microbiology, vol. 83. p. 407-412.
- SCANNELL, A. G. M., C. Hill, R. P. Ross, S. Marx, W. Hartmeier et E. K. Arendt. 2000. Continuous production of lacticin 3147 and nisin using cells immobilized in calcium alginate. Journal of Applied Microbiology, vol. 89. p. 573-579.
- SCANNELL, A. G. M., G. Schwarz, C. Hill, R. P. Ross et E. K. Arendt. 2001. Pre-inoculation enrichment procedure enhances the performance of bacteriocinogenic *Lactococcus lactis* meat starter culture. International Journal of Food Microbiology, vol. 64. p. 151-159.
- SCHWARTZ, M. 2001. The life and work of Louis Pasteur. Journal of Applied Microbiology, vol. 91. p. 597-601.

- SCHILLINGER, U. et W. H. Holzapfel. 1990. Antibacterial activity of carnobacteria. Food Microbiology, vol. 7. p. 305-310.
- SCHILLINGER, U. et F.K. Lucke. 1990. Lactic acid bacteria as protective cultures in meat products. Fleischwirtsch., vol. 70. p. 1296-1299.
- SELMER-OLSEN, E., S.- E. Birkeland et T. Sorhaug. 1999. Effect of protectives solutes on leakage from and survival of immobilized *Lactobacillus* subjected to drying, storage and rehydration. Journal of Applied Microbiology, vol. 87. p. 429-437.
- SHEU, T. Y. et R. T. Marshall. 1993. Microentrapment of lactobacilli in calcium alginate gels. Journal of Food Science, vol. 54. p. 557-561.
- SILLIKER, J. H., R. P. Elliott, A. C. Baird-Parker, F. L. Bryan, J. H. B. Christian, D. S. Clark, J. C. Olson, Jr. et T. A. Roberts. 1980. "Microbial food ecology volume II: food commodities". Academic Press, Toronto, p. 333-407.
- SIRAGUSA, G. R., C. N. Cutter et J. L. Willet. 1999. Incorporation of bacteriocin in plastic retains activity and inhibits surface growth of bacteria on meat. Food Microbiology, vol. 16. p. 229-235.
- SMIDSROD, O. et G. Skjak-Braek. 1990. Alginate as immobilization matrix for cells. Trends in Biotechnology, vol. 8. p. 71-78.
- SPECK, M. L. 1981. Use of microbial cultures: dairy products. Food Technology, vol. p. 71-73.
- SPERTI, G. S. 1971. "Probiotics". AVI Publishing Co, West Point, USA.
- STEENSON, L. R., T. R. Klaenhammer et H. E. Swaisgood. 1987. Calcium alginate-immobilized cultures of lactic streptococci are protected from bacteriophages. Journal of Dairy Science, vol. 70. p. 1121-1127.
- STEVENS, K. A., B. W. Sheldon, N. A. Klapes et T. R. Klaenhammer. 1992. Effect of treatment conditions on nisin inactivation of gram-negative bacteria. Journal of Food Protection, vol. 55. p. 763-766.
- STILES, M. E. 1996. Biopreservation by lactic acid bacteria. Antonie Van Leeuwenhoek, vol. 70. p. 331-345.
- STRINGER, W. C., M. E. Bilskie et H. D. Naumann. 1969. Microbial profiles of fresh beef. Food Technology, vol. 23. p. 97-102.
- STATISTIQUES CANADA. 2000a. Le Quotidien, 5 juin 2000.

- STATISTIQUES CANADA. 2000b. Revenu agricole net et recettes monétaires agricoles. Le Quotidien, 25 mai 2000.
- TAGG, R., A. S. Dajani et L. W. Wannamaker. 1976. Bacteriocins of Gram-positive bacteria. Bacteriological Reviews, vol. 40. p.722-756.
- TANSIL, B. E. (Éd.). 1984. Bergey's Manual of systematic bacteriology, volume 3. Williams and Wilkins company, Baltimore, Maryland.
- TEREBIZNIK, M. R., R. J. Jagus, P. Cerrutti, M. S. de Huergo et A. M. R. Pilosof. 2000. Combined effect of nisin and pulsed electric fields on the inactivation of *Escherichia coli*. Journal of Food Protection, vol. 63. p. 741-746.
- VESCOVO, M. S. Torriani, C. Orsi, F. Macchiarolo et G. Scolari. 1996. Application of antimicrobial-producing lactic acid bacteria to control pathogens in ready-to-use vegetables. Journal of Applied Bacteriology, vol. 81. p. 113-119.
- WAN, J., M.W. Hickey et M. J. Coventry. 1995. Continuous production of bacteriocins, brevicin, nisin and Pediocin, using calcium alginate-immobilized bacteria. Journal of Applied Bacteriology, vol. 79. p. 671- 676.
- WESSELS, S. et H. H. Huss. 1996. Suitability of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 as a protective culture for lightly preserved fish products. Food Microbiology, vol. 13. p. 323-332.
- WIERBICKA, G. T., T. M. Hagen et D. P. Jones. 1989. Glutathione in food. Journal Food Composition and Analysis, vol. 2. p. 327-337.
- WILLMOTT, N., Y. Chen, J. Goldberg, C. McArdle et A. T. Florence. 1989. Biodegradation rate of embolized protein microspheres in lung, liver and kidney of rats. Journal of Pharmacy and Pharmacology, vol. 41. p. 433-438.
- WILLMOTT, N., G. A. Magee, J. Cummings, G. W. Halbert et J. F. Smyth. 1992. Doxorubicin-loaded casein microspheres: protean nature of drug incorporation. Journal of Pharmacy and Pharmacology, vol. 44. p. 472-475.
- WINKOWSKI, K., A. D. Crandall et T. J. Montville. 1993. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by *Lactobacillus bavaricus* MN in beef systems at refrigeration temperatures. Applied and Environmental Microbiology, vol. 59. p. 2552-2557.
- YOO I.-K., G. H. Seong, H. N. Chang et J. K. Park. 1996. Encapsulation of *Lactobacillus casei* cells in liquid-core alginate capsules for lactic acid production. Enzyme and Microbial Technology, vol. 19. p. 428-433.
- YUSTE, J., M. Mor-Mur, M. Capellas, B. Guamis et R. Pla. 1998. Microbiological quality of mechanically recovered poultry meat treated with high hydrostatic pressure and nisin. Food Microbiology, vol. 15. p. 407-414.

ZAMFIR, M., R. Callewaert, P. C. Cornea, L. Savu, I. Vatafu et L. De Vuyst. 1999. Purification and characterization of a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* IBB 801. Journal of Applied Microbiology, vol. 87. p. 923-931.

ZAVAGLIA, A. G., G. Kociubinski, P. Perez et G. De Antoni. 1998. Isolation and characterization of *Bifidobacterium* strains for probiotic formulation. Journal of Food Protection, vol. 61. p. 865-873.