

Les  
**publications**  
de la Direction de l'innovation  
et des technologies

# Compte rendu

**N° 21**

**Colloque**  
**«La bioconservation**  
**des produits marins»**  
Québec, 4 et 5 mai 2004

Michel Desbiens

## Colloque sur la bioconservation des produits marins

**Coordination** : Michel Desbiens (CTPA - MAPAQ)

**Édition** : Direction de l'innovation et des technologies (DIT)

Francis Coulombe, éditeur  
Micheline Fournier, secrétaire au CTPA  
Nancy Godin, secrétaire au bureau d'édition

**Comité organisateur :**

Michel Desbiens (CTPA – MAPAQ)  
Ismail Fliss (STELA - Université Laval)  
Louise Tremblay (STELA - Université Laval)

**Secrétaires d'atelier :**

Imane Tahiri (STELA - Université Laval)  
Sharon Thibault (CTPA - MAPAQ)

**Animateurs :**

Claude Champagne (CRDA)  
Michel Desbiens (CTPA - MAPAQ)  
Gisèle LaPointe (INAF - Université Laval)  
Françoise Leroi (IFREMER)

**Commanditaires :**

Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec (MAPAQ)  
Centre de recherche en sciences et technologies du lait (STELA - Université Laval)  
Fumoir Grizzly  
Pôle Québec Chaudière-Appalaches

ISBN (pdf) : 978-2-550-49865-0

ISBN : 2-551-22626-0

Dépôt légal – Bibliothèque nationale du Québec, 2005

On doit citer cette publication comme suit :

Desbiens, M., Fliss, I. et Tremblay, L. *Colloque sur la bioconservation des produits marins*, Québec, 4 et 5 mai 2004, ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec, 30 p. (compte rendu n° 21).

## **NOTE AUX LECTEURS**

Les textes présentés sont ceux soumis par les conférenciers. Toutefois, les commentaires reproduits constituent une synthèse des principales interventions et ne correspondent pas nécessairement aux termes exacts employés lors des conférences.

L'utilisation ultérieure de l'information communiquée dans ce document demeure l'entière responsabilité des utilisateurs et n'engage en aucune façon le MAPAQ et l'Université Laval.

Pour des raisons de publication et afin d'harmoniser la présentation, une mise en forme des chapitres ainsi qu'une révision linguistique ont été effectuées.



## TABLE DES MATIÈRES

	<u>Page</u>
REMERCIEMENTS .....	II
RÉSUMÉ – MOTS CLÉS .....	III
ABSTRACT – KEY WORDS.....	IV
COLLOQUE SUR LA BIOCONSERVATION DES PRODUITS MARINS .....	1
PROGRAMME DU COLLOQUE .....	2
NOUVEAUX PROCÉDÉS DE PRODUCTION ET DE PURIFICATION DE BIO-INGRÉDIENTS À BASE DE BACTÉRIOCINES DE BACTÉRIES LACTIQUES .....	5
LES PRINCIPES DE LA BIOPRÉSERVATION ET PANORAMA DES BACTÉRIOCINES D'ORIGINE BACTÉRIENNE.....	7
MAÎTRISE DE LA QUALITÉ ET DE LA SÉCURITÉ DES PRODUITS MARINS FUMÉS PAR UNE STRATÉGIE DE BIOPRÉSERVATION .....	9
BIOCONSERVATION DE LA CREVETTE NORDIQUE ( <i>PANDALUS BOREALIS</i> ) PAR UTILISATION DE BACTÉRIOCINES DE BACTÉRIES LACTIQUES .....	13
BIOCONSERVATION : APPLICATION INDUSTRIELLE ET SPECIFICITES RÉGLEMENTAIRES.....	15
EXEMPLE D'APPLICATION INDUSTRIELLE .....	15
RÉGLEMENTATION .....	16
BIOCONSERVATION: UNE OPTION À LA RESCOUSSE DE L'INDUSTRIE DES PRODUITS MARINS .....	17
PLÉNIÈRE DU 4 MAI 2004 : PROBLÉMATIQUE DES PRODUITS MARINS PRÊTS-À-CONSOMMER ET POTENTIEL DES SOUCHES BACTÉRIOCINOGENÈS ET/OU BACTÉRIOCINES DANS L'INDUSTRIE ALIMENTAIRE .....	19
PLÉNIÈRE DU 5 MAI 2004 : AVENIR DE LA BIOCONSERVATION DES PRODUITS MARINS, APPLICATIONS ET RÉGLEMENTATION.....	21
SYNTHÈSE DES SESSIONS PLÉNIÈRES .....	23
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....	27
ANNEXE I : LISTE DES PARTICIPANTS .....	29

## REMERCIEMENTS

Le colloque sur la bioconservation des produits marins s'est déroulé sous la responsabilité du Centre de recherche STELA de l'Université Laval, et du Centre technologique des produits marins du MAPAQ. Le comité organisateur était formé du Dr Ismail Fliss et Mme Louise Tremblay de l'Université Laval, et de M. Michel Desbiens du MAPAQ à Gaspé. Le comité désire remercier chaleureusement Dre Gisèle Lapointe de l'Université Laval, Dre Françoise Leroi de l'IFREMER à Nantes, Dr Claude Champagne du CRDA de St-Hyacinthe, et Dr Paul Paquin de l'INAF pour l'animation des sessions et des plénières.

Différents organismes ont apporté un soutien financier ou logistique à la tenue du colloque. Le comité organisateur désire souligner la contribution de l'Institut des nutraceutiques et des aliments fonctionnels, du ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec, de Pôle Québec Chaudière-Appalaches et de Fumoirs Grizzly inc.

## RÉSUMÉ

Les produits marins prêts à consommer sont en forte demande au Québec et à l'étranger. Le marché de ces produits transformés assure l'opération d'une industrie québécoise bien implantée, d'autant plus importante pour le secteur des pêches que la valorisation des espèces traditionnelles qui est en péril suite à l'effondrement des stocks de poissons de fond.

L'une des problématiques de l'industrie est d'augmenter la durée de conservation des produits prêts-à-consommer en ayant recours à des procédés non-thermiques. Du fait que leur préparation à domicile n'implique pas de cuisson pouvant détruire d'éventuelles bactéries pathogènes, ce type de produit comporte un facteur de risque supplémentaire. En outre, les tendances du marché incitent les producteurs à réduire substantiellement le recours à des barrières microbiologiques classiques tel l'ajout de sel ou d'additifs. En effet, les consommateurs recherchent davantage des produits à faible taux de sel et sont plus préoccupés par la présence d'additifs. Par conséquent, l'industrie des produits marins a tout intérêt à rechercher des méthodes de conservation non classiques qui rejoindraient les préoccupations des consommateurs.

Pour ce faire, une des options qui s'offrent est la bioconservation. Déjà utilisée avec succès dans d'autres types d'aliments, elle apparaît comme une solution innovatrice. Le recours à des bactéries lactiques, à des peptides antimicrobiens ou d'autres barrières microbiologiques est attrayant. Cependant, les méthodes de bioconservation doivent passer par des étapes cruciales de nature technologiques et réglementaires avant d'atteindre le stade industriel.

C'est dans ce contexte qu'il est apparu opportun d'organiser ce colloque visant à préparer le terrain à la mise au point de procédés de bioconservation des produits marins. Il s'agissait d'une première occasion de mettre en commun les connaissances des équipes qui oeuvrent dans le domaine de la bioconservation, et à intéresser les industriels à cette voie de valorisation. Une cinquantaine de personnes intéressées par le domaine de la bioconservation se sont réunies à Québec, les 4 et 5 mai 2004, pour entendre les communications des chercheurs et partager les différents points de vue au cours des séances plénières. Les lecteurs trouveront ici les textes résumant la plupart des présentations faites au colloque.

**Mots clés** : bioconservation, produits marins, microflore, bactériocines, conservation, peptides-antimicrobiens, réglementation

## ABSTRACT

Ready-to-eat marine products are in great demand in Québec and elsewhere. The market for these processed products ensures operations for a well established industry here in Québec, and constitutes a development of greater import for the fisheries sector than the enhancement of traditional species, threatened since the collapse of groundfish stocks.

One problem facing the industry is how to increase the shelf life of ready-to-eat products through nonthermal processing. Because their preparation in the home does not involve cooking – which would destroy any harmful bacteria that might be present – this type of product carries an additional risk factor. Also, market trends are motivating producers to substantially reduce their use of classic microbiological barriers as the salt or additives addition . In fact, consumers increasingly seek products with low salt content and are more concerned about additives. Consequently, the marine product industry has every interest in seeking non classic preservation methods that would address consumer concerns.

One option that offers this possibility is biopreservation. Already used successfully for other types of foods, it appears to be an innovative solution. The use of lactic bacteria, antimicrobial peptides, or other microbiological barriers is attractive. However, biopreservation methods must first undergo crucial technological and regulatory phases before being used industrially.

Given this context, it seemed appropriate to organise this symposium, the purpose of which is to prepare the way for developing marine product biopreservation processes. This is a first opportunity for teams working in the field of biopreservation to pool their knowledge, and to bring this type of development to the attention of industrialists. Some fifty people with an interest in the field of biopreservation gathered in Québec City on May 4 and 5, 2004 to hear presentations by researchers and share a variety of viewpoints during the plenary sessions. The following abstracts provide an overview of the presentations made during the symposium.

**Key words:** biopreservation, marine products, micro flora, bacterins, preservation, antimicrobial peptides, regulatory measures

## **COLLOQUE SUR LA BIOCONSERVATION DES PRODUITS MARINS**

**4 et 5 mai 2004**

**Pavillon de l'Institut des nutraceutiques et des aliments fonctionnels  
Université Laval, Québec**

Cette activité a été organisée conjointement par le Centre STELA de l'Université Laval (Québec), et le Centre technologique des produits aquatiques du MAPAQ (Gaspé)

### **Comité organisateur :**

Louise Tremblay (STELA - Université Laval)  
Ismail Fliss (STELA - Université Laval)  
Michel Desbiens (CTPA – MAPAQ)

### **Collaborateurs :**

Ginette Gagnon (STELA - Université Laval)  
Imane Tahiri (STELA - Université Laval)  
Sharon Thibault (CTPA – MAPAQ)

## PROGRAMME DU COLLOQUE

### **MARDI 4 MAI**

#### Avant-midi

Mot de bienvenue (Dr Paul Paquin, Université Laval)

Mot d'ouverture (Dr Ismail Fliss, STELA)

#### **Session sur le potentiel des bactéries lactiques pour la bioconservation des produits marins prêts à consommer.**

Au centre des procédés de bioconservation, l'utilisation de bactéries lactiques est le principal sujet des recherches publiées. Plusieurs souches d'intérêt ont été isolées. Les chercheurs disposent maintenant d'un arsenal assez vaste, mais le choix des souches les plus performantes demande à être mieux défini. La plupart des travaux ont porté sur les expérimentations *in vitro*, et sur l'établissement des spectres d'activité.

Les molécules actives permettant l'inhibition de flores microbiennes indésirables et/ou pathogènes doivent faire l'objet d'étapes de purification pour procéder à leur caractérisation et aussi pour pouvoir les utiliser lors des essais expérimentaux. Les protocoles analytiques sont souvent complexes et donnent des rendements variables.

Présidente de session : Dre Gisèle LaPointe, INAF

- Dr Djamel Drider, maître de conférences au Département des sciences et aliments, ÉNITIAA, Nantes, France :

*Les principes de la biopréservation et le panorama des bactériocines d'origine bactérienne.*

- Dre Françoise Leroi, chercheuse au Département de valorisation des produits de la mer, IFREMER, France :

*Maîtrise de la qualité et de la sécurité des produits marins fumés par une stratégie de biopréservation.*

- Dr Ismail Fliss, chercheur au Centre STELA, Université Laval, Québec :

*Nouveaux procédés de production et de purification de bioingrédients à base de bactériocines de bactéries lactiques.*

## Après-midi

### **Session d'atelier**

- M. Michel Desbiens, MAPAQ :

*Plénière, suivie d'une visite des installations de l'usine pilote et des laboratoires de l'INAF*

## **MERCREDI 5 MAI**

### Avant-midi

### **Session sur les applications dans les produits et sur les aspects réglementaires des procédés**

Le point sera fait sur les tentatives d'applications, et on cherchera à préciser des moyens de surmonter les obstacles technologiques qui freinent les applications industrielles. Le point de vue d'industriels présents sera examiné.

Les chercheurs sont unanimes sur la nécessité de faire le point sur les considérations réglementaires inhérentes à l'utilisation de nouvelles souches bactériennes et molécules inhibitrices dans les aliments, ce qui influencera la portée des travaux, par exemple quant aux procédés d'incorporation des additifs.

Présidente de session: Dre Françoise Leroi, IFREMER

- Mme Hélène Lauzon, chef de projet, Icelandic Fisheries Laboratories, Islande (visioconférence) :

*Bioconservation de la crevette nordique (*Pandalus borealis*) par utilisation de bactéricines de bactéries lactiques.*

- M. Frédéric Bousquié, laboratoire d'études technico-réglementaires, Dép. Valorisation des produits de la mer, IFREMER, France :

*Aspects réglementaires touchant la bioconservation des aliments en France.*

- Dr Luc Bourbonnière, évaluateur scientifique, Bureau des dangers microbiens, Santé Canada, Ottawa :

*Aspects réglementaires touchant la bioconservation au Canada.*

- Dr Patrice Daniel, BIOCÉANE, France :

*Réalité d'une application industrielle de la bioconservation et conformité aux spécifications réglementaires européennes.*

- Dre Lynn McMullen, CanBiocin, professeure agrégée, microbiologie alimentaire, université d'Alberta :

*Applications of bacteriocins to meats : from bench-top to commercialization.*

#### Après-midi

##### **Session d'atelier**

- Dr Claude Champagne, CRDA :

*Échanges entre les participants et les conférenciers.*

Mot de fermeture (Dr Ismail Fliss)

Cocktail

## NOUVEAUX PROCÉDÉS DE PRODUCTION ET DE PURIFICATION DE BIO-INGRÉDIENTS À BASE DE BACTÉRIOCINES DE BACTÉRIES LACTIQUES

Ismail Fliss, Ph.D

Institut des nutraceutiques et des aliments fonctionnels, INAF

Cette présentation porte sur la nisine Z, une bactériocine produite par une souche naturelle de *Lactobacillus diacetylactis* UL719 isolée au sein du centre de recherche STELA à partir d'un fromage au lait cru. Dans un premier temps, un procédé de fermentation basé sur l'immobilisation cellulaire a été développé. Ce procédé, original sur plusieurs plans, offre l'avantage d'atteindre une productivité de l'ordre de 140 mg/L.h alors que les valeurs minimales rapportées dans la littérature se situent aux alentours de 10 mg/L.h.

Dans un deuxième temps, différentes approches immunologiques performantes de purification et de détection de la nisine Z ont été développées. À cette fin, des anticorps poly- et monoclonaux, hautement spécifiques, ont été produits, caractérisés et utilisés dans différents tests immuno-enzymatiques pour la détection spécifique de la nisine Z dans plusieurs matrices alimentaires. Un système d'immuno-affinité utilisant les anticorps monoclonaux anti-nisine Z a été également développé pour la purification en une seule étape de la nisine Z. Cette stratégie s'est avérée particulièrement efficace comme le démontre la pureté de la molécule atteignant 95 %, le rendement élevé (> 80 %), et la grande stabilité lors d'utilisations répétées. Un système d'encapsulation utilisant des liposomes a été également développé et a permis un taux d'encapsulation de la nisine Z de l'ordre de 35-47 %. Ce taux d'encapsulation dépendait d'une part de la concentration initiale en nisine Z (l'optimum étant de 5 mg/mL), et d'autre part du pH (des pH supérieurs à 5.6 entraînant une diminution considérable du taux d'encapsulation). Afin de déterminer la localisation spatiale de la nisine Z dans les liposomes, des tests immuno-cytochimiques ont été réalisés sur des coupes ultra-fines de liposomes traitées avec l'anticorps anti-nisine Z. L'examen en microscopie électronique à transmission suggérait la présence de récepteurs spécifiques. La mise au point d'approches expérimentales destinées à produire, purifier et encapsuler des quantités importantes de nisine Z s'avérait un pré-requis essentiel à l'étude ultérieure des mécanismes cytomoléculaires impliqués dans l'activité antimicrobienne de la molécule contre des souches bactériennes pathogènes telles *Listeria* et des bactéries lactiques telles les lactobacilles ou les lactocoques.

Ces études ont révélé, entre autres, des différences d'efficacité de la nisine Z en fonction de l'agent bactérien à l'étude. Alors que l'action pouvait, dans certains cas, se traduire par une simple déstabilisation de la membrane plasmique, elle semblait plus sévère dans d'autres cas, entraînant la formation de pores et la libération de l'intégrité cellulaire. Enfin, des travaux à grande échelle ont été réalisés pour évaluer l'impact de l'ajout de nisine Z sur les caractéristiques microbiologiques, rhéologiques et organoleptiques d'un fromage de type Cheddar. De manière générale l'ajout de nisine Z a permis d'obtenir une activité anti-*Listeria* plus importante et durable de même qu'une accélération assez marquée des paramètres de maturation.



## LES PRINCIPES DE LA BIOPRESERVATION ET PANORAMA DES BACTÉRIOCINES D'ORIGINE BACTÉRIENNE

Dr Djamel Drider  
Laboratoire de microbiologie alimentaire et industrielle  
ENITIAA, rue de la Géraudière, BP 82225  
44322 Nantes Cedex, France  
Tél : +33 2 51785542  
Fax : +33 2 51785520  
Courriel : [dridr@enitiaa-nantes.fr](mailto:dridr@enitiaa-nantes.fr)

Les bactéries lactiques ont été traditionnellement utilisées dans la conservation de nombreux aliments et jouent un rôle important dans la fabrication des fromages et des produits fermentés. Ces bactéries présentent des propriétés inhibitrices envers la flore d'altération et la flore pathogène, grâce à la production de métabolites (acides organiques, peroxyde d'hydrogène), à la production de bactériocines ou à leur compétition écologique vis-à-vis des nutriments (compétition nutritionnelle).

Les bactéries du genre *Carnobacterium* isolées des produits de la mer, et sélectionnées pour leurs capacités à inhiber *Listeria monocytogenes* dans le saumon fumé lors de sa conservation réfrigérée semble être une voie prometteuse. Plus particulièrement, la souche de *Carnobacterium divergens* V41 isolées des viscères de poisson (Pilet et al., 1995) semble intéressante à considérer pour une utilisation en biopreservation car elle produit une bactériocine de classe IIa, la divercine V41 ayant une forte activité anti-*Listeria*. Les souches bioprotectrices pressenties comme de bonnes candidates à la biopréservation du saumon appartiennent au genre *Carnobacterium*. Des expériences menées dans notre laboratoire ont permis de démontrer que *Carnobacterium divergens* V41 inhibe d'une manière efficace la croissance de *L. monocytogenes* dans le saumon fumé (Duffes et al., 1999) et que cette inhibition est due à l'action de la divercine V41 et non à un phénomène de compétition nutritionnelle (Richard et al., 2003). Par ailleurs, des outils moléculaires comme la PCR-ITS et RFLP-ITS permettant de suivre l'implantation des *Carnobacterium divergens* V41 dans le saumon fumé ont été développés (Kabadjova et al., 2002).

Cependant, les bactéries du genre *Carnobacterium* sont capables de produire des amines biogènes, notamment la tyramine dont l'ingestion en grande quantité pourrait s'avérer nocive pour la santé des consommateurs. Les travaux effectués par Connil et colls (2002) ont montré que *C. divergens* V41 s'implante bien parmi la flore lactique totale du saumon fumé et l'inoculation du saumon fumé stérile par cette souche n'entraînait pas une surproduction d'amines biogènes dans le produit, notamment la tyramine, seule amine biogène apparemment produite par la bactérie.



## MAÎTRISE DE LA QUALITÉ ET DE LA SÉCURITÉ DES PRODUITS MARINS FUMÉS PAR UNE STRATÉGIE DE BIOPRÉSERVATION

Dre Françoise Leroi  
IFREMER  
BP 21105, 44311 Nantes Cedex 03, France  
Tél. : 33 (0)2 40 37 41 72  
Courriel : [fleroi@ifremer.fr](mailto:fleroi@ifremer.fr)

Le salage, fumage du saumon, est une activité de premier ordre dans l'industrie française de transformation des produits de la mer. Avec 20 000 tonnes de produit fini par année, la France est le premier producteur mondial de saumon fumé. Traditionnellement utilisé pour la conservation, ce procédé est désormais surtout appliqué à des fins organoleptiques et voit les traitements de plus en plus allégés, avec des taux en sel généralement compris entre 2.5 et 3.5 % et en phénols inférieurs à 1 mg/100g. Cette tendance entraîne une dénaturation précoce des qualités organoleptiques du saumon fumé au cours de sa conservation, caractérisée notamment par l'apparition d'odeurs désagréables liées à l'activité microbienne. Des études sur la flore du saumon fumé ont montré que celle-ci était très complexe, composée de bactéries marines à Gram négatif comme *Shewanella putrefaciens*, *Photobacterium phosphoreum*, *Vibrio* spp. ou d'entérobactéries (*Serratia liquefaciens*, *Hafnia* ...) et de bactéries à gram positif comme des lactobacilles (*Lactobacillus sakei*, *curvatus*, *alimentarius* ...), des carnobactéries (*Carnobacterium piscicola*, *divergens*), *Brochothrix thermosphacta* et même des levures. Parmi ces flores, seules certaines espèces participeraient activement à l'altération sensorielle. C'est particulièrement le cas de certains lactobacilles, de *Brochothrix thermosphacta*, de *Serratia liquefaciens* et de *Photobacterium phosphoreum*. Concernant la recherche d'indices de qualité, certains travaux indiquent que l'altération sensorielle du saumon fumé est fortement corrélée à la teneur en azote basique volatil total (ABVT) au nombre de lactobacilles.

En ce qui concerne la sécurité alimentaire, les différents dangers microbiologiques liés à la consommation de saumon fumé ont longuement été débattus ces dernières années. La plupart des bactéries pathogènes indigènes ou de recontamination sont incapables de se multiplier dans un produit maintenu à température réfrigérée (<5°C), s'il contient plus de 3.5 % de sel en phase aqueuse (ce qui correspond à 2.1 g/100 g de chair, valeur inférieure au taux recommandé dans la norme AFNOR). En revanche, *Listeria monocytogenes* est une bactérie ubiquitaire capable de se développer à basses températures, en présence de fortes concentrations en sel et dans une large gamme de pH. Elle est responsable de la listériose humaine, maladie rare, mais à létalité élevée (30 %) touchant principalement des personnes à risques comme les femmes enceintes et leur fœtus, les nouveaux-nés et les personnes âgées ou immunodéficientes. Selon les études, 10 à 30 % des lots de saumon fumé seraient contaminés par *L. monocytogenes*, heureusement à des taux toujours très faibles (<10/g). La contamination peut se faire par la matière première elle-même ou par contact avec des surfaces et équipements souillés. Comme le procédé de transformation (salage, séchage, fumage) n'inclut pas d'étape listéricide, que la croissance de *L. monocytogenes* est possible au cours de la conservation réfrigérée (en France, la DLC pour les produits sous vide est en général de 4 semaines) et que le produit est consommé sans cuisson, le saumon fumé est considéré comme un aliment à risque.

L'étude présentée ici consiste à développer une stratégie de bio-préservation du saumon fumé vis-à-vis du risque *L. monocytogenes* par l'utilisation raisonnée de bactéries lactiques du genre *Carnobacterium* isolées de produits marins et productrices de bactériocines. Trois souches, *Cb. piscicola* SF668 et V1, et *Cb. divergens* V41 (collection ENITIAA-IFREMER), ont servi de base à l'étude, ainsi que 57 souches de *L. monocytogenes* (collection ASEPT) isolées du saumon fumé et de plusieurs ateliers de production français.

Dans un premier temps, des tests d'inhibition de *L. monocytogenes* par les trois souches de *Carnobacterium* ont été réalisés par la technique des halos d'inhibition sur boîte de Pétri. Les 57 souches de *L. monocytogenes* sont toutes sensibles aux trois carnobactéries et il n'y a pas de différence significative entre le pouvoir inhibiteur de *Cb. piscicola* V1 et *Cb. piscicola* SF668 alors que *Cb. divergens* V41 a un pouvoir inhibiteur toujours bien supérieur aux deux autres, quelle que soit la souche de *L. monocytogenes* considérée. Ces expériences ont également permis d'appréhender la biodiversité du comportement des *L. monocytogenes* vis-à-vis des 3 carnobactéries et de les classer en 3 catégories : souches très sensibles à chacune des 3 carnobactéries (14 %), souches de sensibilité intermédiaire (19 %), et souches très sensibles à *Cb. divergens* V41 et de sensibilité intermédiaire à *Cb. piscicola* SF668 et V1 (67 %).

Dans un deuxième temps, 3 pools de 5 souches de *L. monocytogenes*, représentant les 3 catégories citées, ont été retenus. Des dés de saumon fumé stériles ont été fabriqués selon la méthode de Joffraud *et al.* (1998), puis inoculés par chacun des pools de *L. monocytogenes* (témoins) ou par les associations "pool de *L. monocytogenes*-*Carnobacterium*" à des concentrations initiales respectives de 20 et 10<sup>5</sup> ufc/g. Après emballage sous vide, les échantillons ont été stockés pendant 28 jours, 1/3 du temps à 4°C puis 2/3 du temps à 8°C avec une rupture de 2 h à 20°C au bout de 2/3 du temps. Les résultats ont montré que tous les pools de *L. monocytogenes* s'implantent très bien sur le saumon fumé (passage de 20 à 10<sup>5</sup> ufc/g en fin de conservation) ainsi que les 3 carnobactéries (taux maximal de 10<sup>7-8</sup> ufc/g atteint dès 21 j), avec un avantage néanmoins pour *Cb. divergens* V41. En terme d'inhibition, l'effet de *Cb. piscicola* SF668 est faible (réduction maximum 1 à 2 log de la population de *L. monocytogenes*). *Cb. piscicola* V1 a un effet bactéricide sur les souches de *L. monocytogenes* qui lui sont très sensibles, en revanche, elle permet juste un maintien de la population de *L. monocytogenes* au seuil réglementaire de 100 ufc/g pour les souches qui lui sont moyennement sensibles. Enfin, *Cb. divergens* V41 présente le plus fort pouvoir inhibiteur puisqu'il permet de maintenir le nombre de *L. monocytogenes* à un seuil inférieur à 50 ufc/g pendant toute la durée de stockage et ce quel que soit le pool de *Listeria* considéré.

Pour que le procédé de biopréservation puisse être développé à un stade utilisable en industrie, il faut vérifier que les souches bioprotectrices n'altèrent pas la qualité du produit. De la même façon que pour les tests d'inhibition de *L. monocytogenes*, des dés de saumon fumé stériles ont été inoculés par chacune des 3 souches de *Carnobacterium* à des concentrations initiales de 10<sup>4-5</sup> ufc/g. Aucune production d'ABVT ni acidification du pH n'ont été détectées au cours des 4 semaines de conservation. Au niveau sensoriel, le jury (14 juges entraînés notant 19 critères d'odeur) n'a pas perçu d'effets d'altérations notoires dus aux 3 souches par comparaison au témoin nonensemencé. La souche de *Cb. divergens* V41 ayant donné les meilleurs résultats pour l'inhibition de *L. monocytogenes* et n'ayant pas présenté de caractère altérant sur des dés de saumon fumé stériles a donc été sélectionnée pour une application au stade pré-pilote, sur des lots naturellement contaminés.

Quatre lots de saumon fraîchement fumés provenant de quatre usines différentes ont étéensemencés par pulvérisation des tranches (recto verso) avec la souche *Cb. divergens* V41 (taux initial de  $10^{4-5}$  ufc/g). Toutes les semaines au cours du stockage (mêmes conditions que précédemment), différentes flores pertinentes pour évaluer la qualité du saumon fumé ont été dénombrées et des analyses sensorielles sur le goût, l'odeur, l'aspect et la texture ont été menées parallèlement (en tout 34 descripteurs). Deux cas ont été observés : 1<sup>er</sup> cas, les flores initiales des lots de saumon étaient inférieures à 20 ufc/g, et *Cb. divergens* V41 s'implantait bien ( $10^{7-8}$  ufc/g dès la 2<sup>e</sup> semaine), un effet sur les flores endogènes était perçu au bout de 21 jours avec une légère inhibition (1 à 2 log de moins) des *Lactobacillus*, des entérobactéries et des levures. Au niveau organoleptique, l'ajout de la souche de *Cb. divergens* V41 était perçue par le jury (goût et odeur) mais avec une intensité toujours très faible, et les échantillons n'étaient jamais jugés comme altérés. Dans le 2<sup>e</sup> cas, les flores des lots de saumon en sortie usine étaient de  $10^{4-5}$  ufc/g (*Lactobacillus*, entérobactéries, *Brochothrix* et levures dans des proportions variables selon l'usine) et il devenait plus difficile d'évaluer si *Cb. divergens* V41 s'implantait correctement (nombre de bactéries lactiques dans l'essai ensemencé équivalent à celui du témoin non ensemencé). Aucun effet sur les flores endogènes n'était observé ( $10^{7-8}$  ufc/g dès 14 jours pour certains lots). Au niveau organoleptique, on observait peu de différence entre les essais et les témoins, les lots étant tous jugés très altérés par le jury dès la deuxième semaine de conservation.

Le procédé de biopréservation du saumon fumé vis-à-vis du risque *L. monocytogenes* par l'utilisation de la souche de *Cb. divergens* V41 est donc très prometteur. L'inoculation de saumon fumé permet d'inhiber très sélectivement le développement des *L. monocytogenes* sans modifier les autres flores endogènes et sans altérer les qualités organoleptiques du produit. L'utilisation de cette technologie est à combiner avec le respect des bonnes pratiques d'hygiène et de transformation, les bactéries lactiques inoculées sur le produit ne permettant pas de réduire une flore banale initiale trop élevée. Certains travaux complémentaires comme l'optimisation des conditions d'utilisation de la souche de *Cb. divergens* V41 (niveau d'inoculation, résistance aux facteurs technologiques tels que sel, fumée, etc.), la validation de l'efficacité sur des produits naturellement contaminés par *L. monocytogenes* et un test sensoriel mené par un jury de consommateur seraient nécessaires pour finaliser l'utilisation de cette technologie.



## BIOCONSERVATION DE LA CREVETTE NORDIQUE (*PANDALUS BOREALIS*) PAR UTILISATION DE BACTÉRIOCINES DE BACTÉRIES LACTIQUES

Mme Hélène L. Lauzon, chef de projet  
Icelandic Fisheries Laboratories, IFL à Reykjavik, Islande

Dû aux développements technologiques, aux habitudes alimentaires changeantes ainsi qu'aux besoins et exigences des consommateurs, des changements ont été apportés aux procédés de fabrication et/ou à la formulation d'aliments. C'est pourquoi la recherche de préservatifs naturels a été initiée depuis quelques décennies visant à satisfaire les consommateurs tout en assurant la qualité et sécurité des aliments, plus spécifiquement pour le contrôle des pathogènes psychrotrophes. Les agents de bioconservation sont généralement des antimicrobiens provenant de différentes sources (végétale, animale ou microbienne). Les bactéries lactiques et leurs bactériocines ont été le sujet de plusieurs travaux de recherche, tandis que leur application en milieu alimentaire est encore principalement au niveau de R&D. Aussi des restrictions législatives ont retardé le développement de préservatifs naturels. Le IFL (Icelandic Fisheries Laboratories), un institut de recherches indépendant sous l'auspice du ministère des Pêcheries d'Islande, a participé à trois importants projets couvrant le sujet de la bioconservation de produits marins. Le premier fut fondé par des fonds nordiques et islandais (Bioconservation: 1990-1993) et les 2 autres par des fonds européens et islandais : FAIR CT96-1207 Quality and Safety of Cold-Smoked Fish (1996-1999) et actuellement un projet intégré : Seafoodplus (2004-2008), qui inclut Hurdletech touchant différentes techniques afin d'assurer la qualité et sécurité de produits marins.

La bioconservation de la crevette nordique (*Pandalus borealis*) par l'utilisation de bactériocines de bactéries lactiques a été étudiée lors du premier projet nordique. Le rôle de IFL était de vérifier l'applicabilité de bactériocines, isolées par d'autres participants nordiques, dans des produits marins. La crevette en saumure fut choisie, étant un excellent exemple d'un produit prêt-à-consommer basé sur un système préservatif composé n'assurant pas nécessairement une action anti-*Listeria* totale. Trois essais de stockage furent conduits à 4-5°C. Trois bactériocines (nisine Z, bavaricine A et carnocine U149) furent testées en premier lieu. La nisine Z était la bactériocine plus prometteuse, car la durée de vie était augmentée de 2 semaines en comparaison au contrôle (10 jours sans préservatif). Cependant, l'utilisation de benzoate/sorbate (1000/1000 ppm) prolongea la durée de vie microbiologique d'au moins 7 semaines tout en causant la décoloration de la crevette. Au 2<sup>e</sup> essai, on étudia l'effet du taux de sel sur l'activité anti-*Listeria* de la nisine Z et benzoate/sorbate. L'effet bactéricide de la nisine Z sur *Listeria innocua* (ajouté volontairement) était influencé par le taux de sel, tandis que celui du benzoate/sorbate n'était que bactériostatique. Au dernier essai, l'effet de différents préservatifs et acides organiques (citrique vs. lactique) sur le développement de la flore d'altération et de *Listeria innocua* dans la crevette en saumure furent étudiés. L'effet bactériostatique du benzoate/sorbate envers *Listeria innocua* dura plus longtemps avec l'acide citrique. Aussi, un gain de durée de vie de 7 jours fut réalisé pour la combinaison acide citrique et nisine Z, en plus de ralentir le développement de *Listeria innocua*. La combinaison benzoate/sorbate, nisine Z et acide citrique offrit une bonne maîtrise de la flore d'altération, avec une durée de vie d'au moins 10 semaines, tout en inhibant *Listeria innocua* totalement. Ce travail démontre l'importance de bien déterminer les associations/paramètres favorables à l'activité antibactérienne de préservatifs. Ainsi, il est possible de développer des méthodes de bioconservation, et en les basant sur la combinaison d'éléments traditionnels et naturels, une action synergique peut être accomplie assurant ainsi la qualité et sécurité du produit marin.



## **BIOCONSERVATION : APPLICATION INDUSTRIELLE ET SPECIFICITES REGLEMENTAIRES**

M. Aurélien Bouillet, **M. Patrice Daniel**, Mme Marie Hennard et Mme Sylvie Lorre  
BIOCEANE<sup>1</sup>  
Pôle Bio-Ouest  
rue du moulin de la Rousselière, 44800 Saint Herblain, France

Le ferment LLO® est d'ores et déjà commercialisé par Biocéane en Europe pour la bio-préservation des produits de la mer. Cette souche a été isolée à partir de poisson, elle se développe sous vide ou sous atmosphère protectrice sur chair de poisson à basse température, ne se développe pas à 30°C et est neutre sur le plan organoleptique. En se développant à la surface de l'aliment, le ferment LLO® présente la particularité de retarder le développement des flores d'altération. Parmi près de 500 germes fréquemment rencontrés sur les produits de la mer, la grande majorité s'est montrée sensible au ferment LLO. Cette activité inhibitrice du ferment LLO® ne serait pas due à une production de bactériocine. Effectivement, aucune molécule de ce type n'a été mise en évidence selon les techniques d'investigation classiques. Ce ferment est commercialisé sous forme lyophilisée et fait l'objet d'un brevet international.

En limitant le développement des flores d'altération, le ferment LLO® va permettre d'allonger la DLC (durée limite de conservation) du produit tout en préservant ses qualités sensorielles. Par ailleurs une action anti-*Listeria* a été observée sur plusieurs types de produits (poissons fumés, viande crue).

Le procédé de bioconservation est commercialisé sur crevette décortiquée cuite et filet de poisson pré-cuit, d'autres applications sont en développement, concernant en particulier les poissons fumés, les filets frais, des produits élaborés. Une application viande est par ailleurs à l'étude.

### **Exemple d'application industrielle :**

La société Miti commercialise depuis l'été 2002 une gamme de crevettes décortiquées cuites conditionnées sous atmosphère protectrice. La totalité de la production de cette entreprise est bioconservée. Les DLC ont ainsi pu être portées à plus de 15 jours (au lieu de 8 habituellement) tout en conservant des qualités sensorielles irréprochables en l'absence totale de conservateurs chimiques.

Le ferment est appliqué par pulvérisation, un tunnel de brumisation a été spécifiquement développé par un équipementier. Dans le cas de produits en sauce, le ferment est simplement rajouté dans le mélangeur après réactivation.

La bioconservation permet ainsi d'améliorer de façon très significative la qualité et la durée de vie des produits traités. Toutefois, cette action n'est réellement efficace que lorsque des conditions d'hygiène irréprochables sont respectées. La bioconservation ne peut en aucun cas masquer de médiocres conditions de production (matière première et processus de transformation).

---

<sup>1</sup> La société Biocéane est localisée près de Nantes en France, elle a été créée en 2001 par Mme Sylvie Lorre et M. Patrice Daniel. Ses activités sont le développement et la commercialisation des ferments de bioconservation.

### **Réglementation :**

En France, un nouveau ferment mis sur le marché doit faire l'objet d'une demande auprès de la DGCCRF (Direction Générale de la Consommation de la Concurrence et de la Répression des Fraudes). Cette autorisation est conditionnée par un certain nombre de points : innocuité du micro-organisme (liste GRAS), non OGM, efficacité prouvée, respect des normes microbiologiques en vigueur. La production de bactériocine est un aspect capital. En l'absence de production de bactériocine, la souche est alors considérée comme un ingrédient avec une réglementation plus souple. Par contre, si l'effet « bioconservateur » est dû à une production d'une bactériocine, le ferment et la bactériocine doivent faire l'objet d'une demande d'autorisation, la bactériocine entrant elle-même dans la catégorie des additifs.

En terme d'étiquetage, le ferment lactique doit apparaître dans la liste des ingrédients et la mention « produit biopréservé » ne peut apparaître que si elle est suivie d'une courte explication du procédé.

## **BIOCONSERVATION : UNE OPTION À LA RESCousse DE L'INDUSTRIE DES PRODUITS MARINS**

### **Introduction à la session plénière**

Michel Desbiens, microbiologiste  
Ministère de l'Agriculture, Pêcheries et Alimentation du Québec  
Centre technologique des produits aquatiques  
96, montée de Sandy Beach, bureau 1.07  
Gaspé (Québec) G4X 2V6

Les produits marins transformés présents sur le marché québécois sont souvent vendus à l'état congelé. Dans la perspective où les producteurs désirent satisfaire une clientèle qui s'intéresse de plus en plus aux produits élaborés à l'état frais, des mesures s'imposent pour à la fois assurer une conservation optimale et aussi rencontrer certains objectifs sanitaires régis par les textes réglementaires. Les procédés de bioconservation représentent une option fort valable pour l'industrie des produits marins, aux prises avec l'occurrence aléatoire de certains microorganismes pathogènes. Les produits visés sont surtout des aliments prêts-à-consommer, qui ne subissent pas de traitement thermique avant d'être servis, qui ont un taux de sel modéré (< 6 % ph. aq.) et un pH au-dessus de 5.0. On compte le saumon fumé, la crevette saumurée et des produits de chair de crabe dans cette catégorie. Ce type de produit pose un défi pour les entreprises; les plans HACCP indiquent certains points critiques dont le contrôle est problématique (ex. température restreignant le développement de *Clostridium botulinum*) ou parfois inapplicable sans provoquer l'altération de la qualité (ex. inactivation de *Listeria monocytogenes*). Ce à quoi s'ajoute l'impact des barrières microbiologiques (« hurdles ») sur les qualités sensorielles des produits.

Le poisson fumé représente un cas d'espèce. Le procédé de fabrication le plus répandu est le fumage à froid, c'est-à-dire à des températures habituellement inférieures à 30°C pendant quelques heures. Le procédé inclut une étape de salage, qui peut se faire par immersion, injection par salage à sec. Les produits vendus en Europe ont un taux de sel relativement plus élevés (4 à 6 % sel ph. aq.) qu'au Québec (1 à 3 % sel ph. aq.). Ainsi, les microflores naturelles du produit demeurent pratiquement intactes. Il en va de même pour les pathogènes qui peuvent atteindre les produits après une post-recontamination.

Récemment, à la demande de la FDA aux Etats-Unis, un groupe d'experts de l'Institute of Food Technologists a produit un rapport très élaboré sur les paramètres requis pour contrôler les bactéries pathogènes dans le poisson fumé. Les auteurs concluent que parmi les principaux facteurs de risque figurent *L. monocytogenes* et *C. botulinum*. Il semble irréaliste d'espérer éliminer totalement *L. monocytogenes* dans les aliments prêts-à-consommer, mais les bonnes pratiques industrielles peuvent contribuer à limiter sa présence à moins de 1 cellule/g à la sortie de l'atelier. Pour ce faire, il n'est pas possible de prévenir complètement la croissance avec uniquement des combinaisons de réfrigération et de sel. Toutefois, la croissance peut être limitée par l'utilisation de cultures microbiennes protectrices.

Le rapport mentionne également l'occurrence de souches de *C. botulinum* protéolytiques en faibles quantités dans les produits. Le risque de toxigénèse peut être contrôlé en appliquant un contrôle strict de température à moins de 3.3 °C tout en maintenant un taux de sel minimal de 3.5 % ph. aq. sous atmosphère réduite en oxygène.

À titre de rappel pour éclairer les discussions, mentionnons certains articles réglementaires qui s'appliquent au poisson fumé. Le règlement B.21.025 de la Loi canadienne sur les Aliments et Drogues indique que la vente d'animaux marins ou d'eau douce fumés en emballage étanche à l'air est interdite sauf si :

- le contenant subit un traitement thermique détruisant les spores de *C. botulinum*;
- la teneur en sel est de > 9 %;
- les produits sont cuits avant consommation;
- les produits sont gardés congelés jusqu'à consommation.

Plus spécifiquement, la réglementation appliquée par l'Agence canadienne d'inspection des aliments mentionne que les produits peuvent être gardés réfrigérés pour une durée d'au plus 14 jours si les emballages ont une perméabilité à l'oxygène de plus de 2000 cc/m<sup>2</sup>/24h mesurée à 24°C.

Enfin, soulignons les travaux de Dufresne et al. sur la toxigénèse botulique dans la truite fumée. L'étude mentionne que la conservation à 4°C n'a pas permis le développement de toxine sur une période de 28 jours, mais qu'en situation d'abus de température, la toxine avait été détectée quel que soit le type d'emballage (sous vide ou non). L'emballage perméable ne retardait pas la toxigénèse. Toutefois, l'altération microbienne précédait la production de toxine.

En conclusion, le concept de bioconservation est une opportunité pour l'industrie. Des questions apparaissent : Peut-on améliorer la conservation des produits grâce à des flores sélectionnées? L'arsenal actuel des bactéries protectrices est-il suffisant? Les procédés sont-ils assez efficaces ou doivent-ils être utilisés en combinaison avec d'autres? Faut-il mettre l'accent sur la recherche de nouvelles souches, de nouvelles bactériocines, ou des méthodes plus performantes de purification/production des peptides antimicrobiens?

## PLÉNIÈRE DU 4 MAI 2004 :

### PROBLÉMATIQUE DES PRODUITS MARINS PRÊTS-À-CONSOMMER ET POTENTIEL DES SOUCHES BACTÉRIOCINOÈNES ET/OU BACTÉRIOCINES DANS L'INDUSTRIE ALIMENTAIRE

Le sujet principal abordé dans le cadre de la première plénière portait essentiellement sur la problématique des produits marins et les risques associés à la contamination par *Listeria monocytogenes*. En effet, le contexte actuel de commercialisation des produits marins suit une tendance vers des produits de préférence frais, donc non congelés et peu transformés. De ce fait, les barrières physico-chimiques sont insuffisantes pour empêcher la croissance de *L. monocytogenes* (pH élevé, conditionnement, fumage à froid). Ainsi, les industries visent une amélioration de la conservation des produits marins tout en préservant leurs qualités organoleptiques et en assurant leur innocuité.

D'autre part, bien que les facteurs de virulence des différentes souches de *L. monocytogenes* soient déterminées, les connaissances scientifiques concernant la dose minimale infectieuse demeurent peu connues. On estime cependant qu'avec une concentration microbienne en *L. monocytogenes* allant jusqu'à 100 cfu/g, les risques de contracter la maladie sont faibles. D'ailleurs, les normes européennes tolèrent cette concentration. Dans l'état actuel des connaissances, toute souche de *L. monocytogenes* doit être considérée comme potentiellement dangereuse quelque soit son sérotype.

Un autre aspect soulevé durant cette plénière portait sur le mode d'addition et l'étape d'incorporation d'une souche productrice de bactériocine durant la transformation d'un produit en question tel que le saumon fumé par exemple. Une proposition d'ajout d'une souche biopréservatrice (exemple : *Carnobacterium* spp.) serait de faire circuler les tranches de saumon fumé sous un nuage de ferment préalablement réhydraté. Qu'en est-il de la survie de la souche si celle-ci est incorporée avant fumage? Les carnobactéries résistent aussi bien avant salage qu'avant fumage, avec pulvérisation ou par injection dans la chair. Il peut y avoir une perte de 1 log environ mais les carnobactéries résistent assez bien et font partie de la flore dominante des produits marins (saumon fumé) en fin de période de conservation.

Concernant la contamination par *L. monocytogenes* durant la transformation des saumons fumés, l'étape de tranchage est une étape critique car elle présente un risque élevé de contamination. Si un filet est contaminé, toutes les tranches le deviennent. Une solution à ce problème serait d'utiliser des lames rotatives qui seraient préalablement vaporisées de souches biopréservatrices. Ceci a d'ailleurs déjà été tenté en France et a démontré des résultats concluants.



## PLÉNIÈRE DU 5 MAI 2004 :

### AVENIR DE LA BIOCONSERVATION DES PRODUITS MARINS, APPLICATIONS ET RÉGLEMENTATION.

Durant la deuxième plénière du colloque sur la bioconservation des produits marins, l'avenir et l'aspect réglementaire des bactériocines et des souches bactériocinogènes dans les aliments ont été soulevés. Bactérie ou bactériocine? Quel est le point de vue des autorités réglementaires et celui des industriels? Que pensent ces derniers du potentiel de l'utilisation des souches bactériocinogènes et/ou des bactériocines? Les consommateurs dans tout ça? Où se placent-ils?

Nous avons tous pu remarquer les divergences sur le plan réglementaire du Canada (tolérance 0) par rapport à l'Europe (tolérance jusqu'à 100 cfu de *L. monocytogenes* par gramme de produit). Pour Santé Canada, dès que l'on parle d'allongement de la durée de vie d'un produit (DLC), toute substance permettant d'arriver à cette fin est regroupée dans la catégorie des additifs alimentaires. C'est donc le cas pour les souches bactériocinogènes et/ou les bactériocines.

Pourquoi réglementer l'utilisation de telles souches alors qu'elles font naturellement partie du saumon et que, finalement, la biopréservation n'est qu'une reproduction de ce qui existe déjà dans la nature? Pour les autorités réglementaires, du moment que l'isolement est intentionnel, toute souche ou bactériocine doit être sujette à réglementation et suivre une procédure normale d'analyse de toxicité. Les procédures sont du ressort des entreprises qui veulent commercialiser leurs produits mais les coûts et les démarches semblent décourager. Il faudrait que des entreprises se regroupent pour financer ce genre d'études et déposer un dossier pour réglementation.

Aussi, les industriels sont très intéressés par la bio-préservation comme nous l'avons vu dans le cas de Biocéane. Il semblerait que l'approche soit toujours positive auprès des industriels notamment concernant l'utilisation de ferments. De plus, il y a une bonne perception pour les produits biopréservés et notamment, de la part des consommateurs français. Dans le cas du ferment LLO® (Biocéane), il n'y a eu aucune approche marketing auprès du consommateur et le succès d'un tel produit est passé indirectement par l'étiquetage qui indiquait que le produit était biopréservé. Cela est dû au fait qu'en France, il y a déjà eu beaucoup de vulgarisation sur la biopréservation et d'une façon générale, le ferment lactique est très bien perçu. Mais au Canada, il va falloir informer aussi bien les consommateurs que les industriels. Il faut déjà définir le terme de bioconservation avec Santé Canada et l'Agence Canadienne d'Inspection des Aliments. Il y a donc toute une démarche d'information qui doit être mise en place.

Il y a aussi un réel problème éthique car bon nombre de personnes utilisent des souches productrices de substances antimicrobiennes sans le mentionner et arrivent à contourner la législation.

Quel est l'avenir de la bio-conservation des produits marins? D'une part, il semble y avoir encore beaucoup de chemin à faire pour faire approuver l'utilisation de souches bactériocinogènes ou de leurs bactériocines dans les produits marins prêts-à-consommer. D'autre part, il y a un décalage entre la recherche et les applications des bactériocines dans les produits alimentaires comme dans le cas de la nisine par exemple. Cela est dû aux propriétés propres

des bactériocines (sensibilité aux protéases), aux coûts liés à la purification mais aussi aux freins réglementaires.

En conclusion, on peut dire qu'il y a une réelle volonté pour les industriels de commercialiser des produits "bioconservés" et les potentiels d'utilisation de souches bactériocinogènes et/ou de leurs bactériocines (purifiées ou sous forme de bio-ingrédients) sont très prometteurs. Le cas Biocéane le prouve. Le chemin entre la recherche et l'application est encore long mais la volonté des législateurs de permettre à la bioconservation de faire partie des produits marins de demain est présente.

## SYNTHÈSE DES SESSIONS PLÉNIÈRES

Les applications des bactériocines et des flores lactiques dans les aliments non fermentés ne sont pas encore très répandues, mais on constate une intention de l'industrie à prospecter les avantages que peuvent représenter ce type de technologie. Actuellement, les produits fumés québécois sont pratiquement tous vendus congelés, car des dispositions réglementaires limitent la conservation à l'état réfrigéré à 14 jours sous pellicule perméable à l'air. Les producteurs se déclarent toutefois très intéressés à offrir des produits frais réfrigérés si la durée de conservation pouvait être allongée au-delà des 2 semaines actuellement autorisées en emballage perméable à l'oxygène.

De toute évidence, les industriels se disent soucieux de la réponse des consommateurs face aux procédés de bioconservation. Plusieurs émettent l'avis que le consommateur, bien que peu au fait des différents aspects scientifiques que cela comporte, est généralement réceptif aux innovations en autant que de l'information pertinente et facilement accessible lui est fournie; la communication avec la clientèle est un instrument essentiel au succès de la démarche. En partant du principe que le consommateur accepte d'emblée la présence de ferments lactiques dans les aliments, comme c'est le cas d'aliments très répandus, l'acceptabilité des flores protectrices dans les produits marins n'apparaît pas comme un problème a priori. Dans le cas du ferment LLO® de Biocéane (France), il n'y a eu aucune approche marketing et le succès peut être lié à la mention sur l'étiquette précisant que le produit est bioconservé. Du reste, les procédés de bioconservation représentent plus un avantage concurrentiel pour les entreprises, qu'une valeur ajoutée souhaitée par le marché.

Les deux facteurs de risque principalement visés par les procédés de bioconservation sont les bactéries pathogènes *Listeria monocytogenes* et *Clostridium botulinum*, en dépit du fait qu'aucun cas de botulisme et/ou de listériose impliquant le poisson fumé n'aient été signalés au Canada. Dans le cas de *Listeria monocytogenes*, les taux de sel retrouvés dans les aliments ne peuvent permettre d'en limiter la prolifération. Il ne semble pas envisageable de restreindre l'analyse de risque aux seuls sérotypes de *L. monocytogenes* considérés fortement hémolytiques, les autres sérotypes pouvant également se révéler pathogènes selon l'hôte. Les connaissances scientifiques concernant la dose minimale infectieuse demeurent encore insuffisantes. Du point de vue des limites acceptables, la réglementation française impose une limite de 100 cellules de *Listeria monocytogenes* par gramme aux produits à la fin de la période de conservation prévue; les « challenges tests » réalisés par les producteurs sont requis pour en faire la démonstration. Au Canada, on parle plutôt de tolérance zéro. Cependant, une limite de 100 cellules par gramme s'applique aux aliments pouvant soutenir la croissance de *Listeria monocytogenes* et dont la durée de conservation est de moins de 10 jours.

Bien que beaucoup d'études scientifiques aient porté sur l'effet protecteur des souches lactiques et des peptides antimicrobiens, peu d'applications alimentaires en ont découlé. Les verrous sont d'abord d'ordre technologique. L'introduction de bactéries lactiques dans des produits non fermentés pose certains problèmes. L'efficacité des peptides antimicrobiens peut être très altérée par des protéases naturelles du produits. D'ailleurs, les différentes réglementations en vigueur ont un impact sur les applications.

Les bactéries du genre *Carnobacterium*, souvent mentionnées dans les études, font partie de la flore lactique naturellement présente dans les produits fumés, et dominent parfois les autres flores. Une proportion assez élevée des souches y produisent des peptides

antimicrobiens. Il n'y a pas de pathologies connues provenant de ce genre microbien, qui se montre généralement sensible à la plupart des antibiotiques.

Le volet réglementaire relatif à la bioconservation a beaucoup retenu l'intérêt des participants. Pour Santé Canada, lorsqu'il s'agit d'allongement de la durée de conservation d'un produit, toute substance permettant d'arriver à cette fin est placée dans la catégorie des additifs alimentaires.

Les industriels se disent préoccupés par le processus d'homologation de procédés faisant appel à l'utilisation de souches microbiennes et/ou de peptides antimicrobiens dans les aliments. Toutefois, Santé Canada se déclare en mesure d'assister les promoteurs dans leurs démarches, et insiste sur la nécessité d'être avisé dès le début du processus entrepris pour pouvoir les conseiller efficacement.

Sur l'utilisation de ferments lactiques, des appellations génériques sont prévues aux réglementations française et canadienne qui encadrent la question de l'étiquetage des ingrédients, et leur introduction dans les aliments peut être envisagée si certaines conditions sont rencontrées. Il faut aussi différencier les flores protectrices des ferments probiotiques, le rôle fonctionnel des ces derniers étant tout à fait distinct.

Faut-il réglementer l'utilisation de souches microbiennes naturellement présentes dans les produits transformés? Pour les autorités, du fait que l'isolement du microorganisme et sa réintroduction sont volontaires, toute souche doit suivre une procédure normale d'analyse d'innocuité. Si une bactérie isolée d'un aliment se révèle sans risque dans un substrat donné, il faut procéder à certaines vérifications pour établir que sa réintroduction dans un autre type d'aliment ne génère pas de risque supplémentaire. Un historique d'exposition préalable sera évidemment un argument significatif servant l'homologation d'une utilisation nouvelle d'une souche connue. Si les évaluations scientifiques des deux pays sont comparables, il est même possible d'autoriser au Canada des ferments disponibles commercialement en France. En effet, quelques entreprises en France mettent déjà en marché des produits auxquels sont inoculés un ferment lactique visant la conservation prolongée de produits alimentaires, dont des produits marins.

Le cas de bactéries productrices de substances antimicrobiennes est considéré avec quelques nuances. Les flores bactériocinogènes sont classées au cas par cas dans la catégorie « additifs » ou dans celle des « aliments » en vertu des réglementations canadiennes; ceci influence grandement le processus d'homologation et les coûts qui y sont associés. À noter que les additifs de contact ajoutés aux matériaux d'emballage font l'objet d'une réglementation distincte.

Quant aux bactériocines purifiées, il s'agit d'additifs tels que définis dans les législations canadienne (loi sur les aliments et drogues) et française. La démonstration de l'innocuité des substances antimicrobiennes doit donc être clairement faite pour pouvoir l'introduire dans des applications alimentaires spécifiques. Les études scientifiques publiées sur ces substances et les avis émis par d'autres organismes officiels de référence peuvent servir à appuyer les demandes d'homologation.

L'efficacité des ferments/bactériocines ajoutés aux aliments doit bien entendu être démontrée par des mesures fiables supportant les allégations annoncées pour les produits en question.

Le concept de matrice (combinaisons de différentes barrières microbiologiques) est sans doute une option des plus stratégiques pour viser la meilleure efficacité des procédés de bioconservation. L'effet de synergie, voulant que l'efficacité globale d'une combinaison soit supérieure à la somme des effets de chacune des composantes, est probablement un gage de succès.

La question des modes d'inoculation des ferments lactiques protecteurs a été soulevée. Apparemment, des méthodes plutôt simples telles l'aspersion en bruine des *inoculums* lyophilisés puis réhydratés, semblent tout à fait réalisables en usine; des équipements sont déjà disponibles. L'inoculation par pulvérisation sur les lames de tranchage a aussi été tentée avec succès en France. Des adaptations aux méthodes sont toutefois à faire. Il faut viser des conditions qui permettent aux bactéries de s'implanter, de croître et de survivre. Par exemple, il y a une réduction notable de la concentration et de survie de ferment si les étapes de salage et de fumage sont réalisées après l'introduction des bactéries dans le produit. L'inoculation du produit a plus de chance de succès si elle est réalisée après ces étapes. Apparemment, les *Carnobacterium* résistent bien au salage et au fumage, avec pulvérisation ou par injection dans la chair. Il peut y avoir une perte d'environ 1 log, mais les survivants montrent une bonne résistance. Il est aussi mentionné que les flores microbiennes intrinsèques varient beaucoup d'une usine de transformation à l'autre, et que des essais préalables sont nécessaires pour chaque type de produit avant de passer à l'échelle pilote.

Les industriels présents ont rappelé qu'ils vivent constamment avec le spectre de contaminations par *Listeria monocytogenes* dans les produits mis en marché, et font part de leur intérêt manifeste pour disposer de technologies qui leur permettraient de s'affranchir de cette contrainte de manière aussi efficace que possible. Ainsi, la biopréservation leur apparaît comme une possible solution innovatrice et prometteuse. Mais dans un objectif de retour sur l'investissement, le développement de procédés de bioconservation semble, pour les petites et moyennes entreprises du Québec, difficile à mettre en œuvre compte tenu des pré-requis et des efforts de recherche nécessaires. Des regroupements d'entreprises pourraient financer ce genre d'études et déposer un dossier pour la réglementation. Les entreprises de transformation peuvent en revanche « acheter » des procédés déjà homologués et disponibles sur le marché et les incorporer dans leur plan d'affaires. Et s'il n'a été question dans ce colloque que d'applications alimentaires, il faut aussi considérer que les bactériocines peuvent déboucher sur des applications médicales et vétérinaires, et constituent un domaine de recherche d'importance.

Tous les participants s'entendent sur le fait que la biopréservation n'est pas un substitut aux bonnes pratiques industrielles, à l'hygiène et à l'assainissement efficace en usine. On peut parler de contrôler le développement de bactéries pathogènes, mais il est illusoire de penser à atteindre le risque zéro.



## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- CONNIL N., PRÉVOST H. and DOUSSET X. 2002, Production of biogenic amines and divergicin V41 in cold smoked salmon inoculated with *Carnobacterium divergens* V41, and specific detection of this strain by multiplex-PCR, *Journal of Applied Microbiology*, 92: 611-617.
- DUFFES F., LEROI F., BOYAVAL P. and DOUSSET X. ,1999b, Inhibition of *Listeria monocytogenes* by *in situ* produced and semipurified bacteriocins of *Carnobacterium* spp. on vacuum-packed, refrigerated cold-smoked salmon, *Journal of Food Protection*. 62 : 1394-1403.
- DUFRESNE I., SMITH J.P., LIU J.N., TARTE I., BLANCHFIELD B. and AUSTIN J.W., 2000, Effect of headspace oxygen and films of different transmission rate on toxin production by *Clostridium botulinum* type E in rainbow trout fillets stored under modified atmospheres., *Journal of Food Safety*, 20 : 157-175.
- COLL., 2001, Processing parameters needed to control pathogens in cold-smoked fish, *Journal of Food Science*, 66 (7) suppl. S1055-1115.
- KABADJOVA P., DOUSSET X., LE CAM V. and PRÉVOST H.,2002,. Differentiation of Closely related *Carnobacterium* food based on 16S-23S ribosomal intergenic spacer region polymorphism, *Applied and Environmental Microbiology*, 68 : 5358-5366.
- PILET M.F., DOUSSET X., BARRE R., NOVEL G., DESMAZEAUD M. and PIARD J.C., 1995, Evidence for two bacteriocins produced by *Carnobacterium piscicola* and *Carnobacterium divergens* isolated from fish and active against *Listeria monocytogenes*, *Journal of Food Protection*, 58 : 266-262.
- RICHARD C., BRILLET A., PILET M.F., PRÉVOST H. and DRIDER D.,2003, Evidence on *Listeria monocytogenes* by divergicin V41 action, *Letters in Applied Microbiology*, 36 : 288-292.



**LISTE DES PARTICIPANTS AU COLLOQUE :**  
**« Bioconservation des produits marins »**  
**4 et 5 mai 2004**

Atkins, James H. (Atkins & Frères)	<a href="mailto:atkinsfreres_james@globetrotter.net">atkinsfreres_james@globetrotter.net</a>
Banville, Sophie (INAF)	<a href="mailto:sophie.banville@inaf.ulaval.ca">sophie.banville@inaf.ulaval.ca</a>
Barthe, Christine (MAPAQ)	<a href="mailto:christine.barthe@mapaq.gouv.qc.ca">christine.barthe@mapaq.gouv.qc.ca</a>
Beaulieu, Lucie (CNRC)	<a href="mailto:lucie.beaulieu@cnrc-nrc.qc.ca">lucie.beaulieu@cnrc-nrc.qc.ca</a>
Benabbou, Rajâa (STELA)	<a href="mailto:rajbenabbou@yahoo.fr">rajbenabbou@yahoo.fr</a>
Benyagoub, Mohammed (CQVB)	<a href="mailto:mohammed.benyagoub@cqvb.qc.ca">mohammed.benyagoub@cqvb.qc.ca</a>
Bourbonnière, Luc (Santé Canada)	<a href="mailto:Luc_Bourbonniere@hc-sc.gc.ca">Luc_Bourbonniere@hc-sc.gc.ca</a>
Bourdages, Julie (ACIA)	<a href="mailto:bourdagesj@inspection.qc.ca">bourdagesj@inspection.qc.ca</a>
Bousquié, Frédérick (IFREMER, France)	<a href="mailto:frederick.bousquie@ifremer.fr">frederick.bousquie@ifremer.fr</a>
Cayouette, Bernard (Université McGill)	<a href="mailto:bernardcayouette@hotmail.com">bernardcayouette@hotmail.com</a>
Cormier, Paryse G. (ACIA)	<a href="mailto:cormierpg@inspection.qc.ca">cormierpg@inspection.qc.ca</a>
Daniel, Patrice (Biocéane, France)	<a href="mailto:contact@bioceane.com">contact@bioceane.com</a>
Deguire, Sylvie (ACIA)	<a href="mailto:deguires@inspection.qc.ca">deguires@inspection.qc.ca</a>
Desbiens, Michel (MAPAQ)	<a href="mailto:michel.desbiens@mapaq.gouv.qc.ca">michel.desbiens@mapaq.gouv.qc.ca</a>
Desnoyers, Christine (FQRNT)	<a href="mailto:christine-desnoyers@fqrnt.gouv.qc.ca">christine-desnoyers@fqrnt.gouv.qc.ca</a>
Dridier, Djamel (ENITIAA, France)	<a href="mailto:dridier@enitiaa-nantes.fr">dridier@enitiaa-nantes.fr</a>
Dubé, Caroline (MAPAQ)	<a href="mailto:caroline.dube@mapaq.gouv.qc.ca">caroline.dube@mapaq.gouv.qc.ca</a>
Dufresne, Isabelle (Santé Canada)	<a href="mailto:isabelle_dufresne@hc-sc.gc.ca">isabelle_dufresne@hc-sc.gc.ca</a>
Fliss, Ismaïl (STELA)	<a href="mailto:ismail.fliss@aln.ulaval.ca">ismail.fliss@aln.ulaval.ca</a>
Fontaine, Andrée (Fumoir Grizzly)	<a href="mailto:af@grizzly.qc.ca">af@grizzly.qc.ca</a>
Fontaine, Pierre (Furmoir Grizzly)	<a href="mailto:pf@grizzly.qc.ca">pf@grizzly.qc.ca</a>
Gagnon, Ginette (STELA)	<a href="mailto:ginette.gagnon@aln.ulaval.ca">ginette.gagnon@aln.ulaval.ca</a>
Guillou, Alain (CRBM)	<a href="mailto:alain_guillou@crbm-mbrc.com">alain_guillou@crbm-mbrc.com</a>
Houle, André (Gestion Sovar)	<a href="mailto:ahoule@sovar.com">ahoule@sovar.com</a>
Kheadr, Ehab (STELA)	<a href="mailto:ehab.kheadr@aln.ulaval.ca">ehab.kheadr@aln.ulaval.ca</a>
Lapierre, Patrick (Gestion de projet GICI)	<a href="mailto:gestiongici@bellnet.ca">gestiongici@bellnet.ca</a>
LaPointe, Gisèle (STELA)	<a href="mailto:gisele.lapointe@aln.ulaval.ca">gisele.lapointe@aln.ulaval.ca</a>
Lauzon, Hélène (Iceland Fisheries Lab)	<a href="mailto:helene@rfisk.is">helene@rfisk.is</a>

Leclerc, Luc (MAPAQ)	<a href="mailto:luc.leclerc@agr.gouv.qc.ca"><u>luc.leclerc@agr.gouv.qc.ca</u></a>
Leroi, Françoise (IFREMER, France)	<a href="mailto:francoise.leroi@ifremer.fr"><u>francoise.leroi@ifremer.fr</u></a>
Mathieu, Jean-Robert (Fumoir Grizzly)	<a href="mailto:jrm@grizzly.qc.ca"><u>jrm@grizzly.qc.ca</u></a>
McMullen, Lynn (CanBiocin, U. Alberta)	<a href="mailto:lynn.mcmullen@ualberta.ca"><u>lynn.mcmullen@ualberta.ca</u></a>
Michaud, Renée (INAF)	<a href="mailto:renee.michaud@inaf.ulaval.ca"><u>renee.michaud@inaf.ulaval.ca</u></a>
Paquin, Paul (Université Laval)	<a href="mailto:paul.paquin@fsaa.ulaval.ca"><u>paul.paquin@fsaa.ulaval.ca</u></a>
Paradis, François (Domaine Orléans)	<a href="mailto:iparadis@domainesorleans.com"><u>iparadis@domainesorleans.com</u></a>
Picard, Gaston (Dept. ALN, U. Laval)	<a href="mailto:gaston.picard@aln.ulaval.ca"><u>gaston.picard@aln.ulaval.ca</u></a>
Proulx, Daniel (Dept. sc. animales)	<a href="mailto:daniel.proulx@san.ulaval.ca"><u>daniel.proulx@san.ulaval.ca</u></a>
Sauvé, Gilbert (ACIA)	<a href="mailto:sauveg@inspection.qc.ca"><u>sauveg@inspection.qc.ca</u></a>
Smith, James P. (Université McGill)	<a href="mailto:james.p.smith@mcgill.ca"><u>james.p.smith@mcgill.ca</u></a>
Tahiri, Imane (STELA)	<a href="mailto:imane_tahiri@yahoo.fr"><u>imane_tahiri@yahoo.fr</u></a>
Tessier, Michèle (Fumoir Grizzly)	<a href="mailto:mt@grizzly.qc.ca"><u>mt@grizzly.qc.ca</u></a>
Thibault, Sharon (MAPAQ)	<a href="mailto:sharon.thibault@mapaq.gouv.qc.ca"><u>sharon.thibault@mapaq.gouv.qc.ca</u></a>
Tremblay, Louise (STELA)	<a href="mailto:louise.tremblay@aln.ulaval.ca"><u>louise.tremblay@aln.ulaval.ca</u></a>
Vitté-Mony, Isabelle (Gestion Sovar)	<a href="mailto:ivitte-mony@sovar.com"><u>ivitte-mony@sovar.com</u></a>
Zouhir, Badelmajid (STELA)	<a href="mailto:Zouheir.abd@caramail.com"><u>Zouheir.abd@caramail.com</u></a>



**Agriculture, Pêcheries  
et Alimentation**

**Québec** 

04-0150