

## Chapitre 6 : Bio conservation (utilité des bactéries lactiques et leurs métabolites secondaires)

### - Microorganismes dans l'industrie agroalimentaire

Les bactéries, les virus, les levures, les moisissures et les parasites sont tous des microorganismes rencontrés dans l'industrie agroalimentaire. Il existe trois types de microorganismes : les bons, les mauvais et les dangereux.

- Les bons microorganismes sont utiles en industrie agroalimentaire pour produire des aliments et des boissons (par exemple le fromage, le yaourt) et pour fabriquer des médicaments (comme la pénicilline) exemple : les bactéries lactiques.
- Les mauvais microorganismes (ou micro-organismes d'altération) ne présentent aucun risque sanitaire pour le consommateur. Toutefois, ils affectent la qualité organoleptique en donnant aux aliments un aspect, une odeur ou un goût repoussant, exemple : les moisissures.
- Les microorganismes dangereux (pathogènes) sont responsables de certaines pathologies et peuvent avoir un effet létal, exemple : les virus, bactériophages.

#### 1. Les bactéries lactiques

Les bactéries lactiques sont des microorganismes largement utilisés en industrie alimentaire, dans une grande variété de fermentations.

##### 1.1. Les caractéristiques générales des bactéries lactiques

Elles sont à Gram positif, généralement immobiles, asporulées, catalase négative, oxydase négative généralement nitrate réductase négative, ce sont des bactéries anaérobies facultatives. Elles rassemblent un certain nombre de genres qui se caractérisent par la production, liée à un métabolisme exclusivement fermentaire, de quantités importantes d'acide lactique à partir des sucres. La fermentation est dite :

- Homolactique si l'acide lactique produit constitue plus de 90 % des produits de fermentation,
- Hétérolactique facultatives si elles produisent de l'acide lactique et de l'acide acétique.
- Hétérolactique stricte si elles produisent de l'acide lactique, de l'acide acétique ou de l'éthanol et du CO<sub>2</sub>.

La division des BL se déroule sur un seul plan à l'exception des genres : *Pediococcus*, *Aerococcus*, et *Tetragenococcus*. Pour se développer, elles ont besoin de sources de carbone organique (glucides fermentescibles) et de nombreuses bactéries lactiques ont des exigences nutritionnelles complexes en ce qui concerne les acides aminés ou les peptides, les vitamines et les acides gras.

##### 1.2. Taxonomie et classification des bactéries lactiques

L'élaboration de la taxonomie est basée sur un large ensemble de critères regroupant les caractéristiques écologiques, phénotypiques, biochimiques et génétiques, le mode de fermentation du glucose, la croissance à différentes températures, l'isomère de l'acide lactique produit et la fermentation des différents hydrates de carbone (**Tableau 01**).

**Tableau 01** : Les différents genres de bactéries lactiques et leurs principales caractéristique.

Genre	Morphologie	Fermentation	Caractéristiques	Habitats
<i>Lactobacillus</i>	Bacilles	Homofermentaire Hétérofermentaires	Thermophiles Mésophiles	Homme, carnés Produits laitiers, végétaux ....
	Coques	Homofermentaire	Thermophiles	Produit laitiers
<i>Enterococcus</i>	Coques	Homofermentaire	Mésophiles croissance à 45 °C Thermorésistante	l'intestin de l'homme et des animaux, produit laitiers.
<i>Leuconostoc</i>	Coques	Hétérofermentaires	Mésophiles	Produit végétaux

### 1.3. Utilisation et application des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques ont été utilisées par l'homme depuis le néolithique pour fabriquer des aliments fermentés. Leur production d'acide lactique permet d'acidifier le substrat et par là d'inhiber la prolifération de germes pathogènes ou d'agents indésirables provoquant des altérations organoleptiques. La fermentation du lait par des bactéries lactiques est à l'origine de plus de milliers de produits différents, chacun avec ses caractéristiques spécifiques d'arôme, de texture et de qualité. Les bactéries lactiques sont également utilisées dans l'industrie chimique (production d'acide lactique), dans le domaine médical (notamment pour le traitement de dysfonctionnements intestinaux) et dans l'industrie des additifs alimentaires (production d'exopolysaccharides et de mannitol).

Elles sont aussi utilisées pour la production de bactériocines et pourraient être impliquées dans la production de protéines thérapeutiques ou comme vecteurs de vaccins. La fermentation améliore la conservation et modifie la saveur des aliments. On trouve des bactéries lactiques dans les produits laitiers (yaourts, fromages), les légumes fermentés (olives, cornichons, choucroute), les boissons alcooliques fermentées (vin, bière, cidre), la charcuterie (jambon, saucissons) et le pain au levain (**Tableau 02**). Etant des probiotiques, les bactéries lactiques apportent des bénéfices à l'hôte en conférant une balance de la microflore intestinale, en jouant également un rôle important dans la maturation du système immunitaire. Différentes études ont démontré le rôle préventif aussi bien que curatif de ces bactéries sur plusieurs types de diarrhées.

**Tableau 02:** Principaux produits issus de la fermentation des bactéries lactiques.

famille	Genre	substrat	Exemple
<i>Lactobacillaceae</i>	<i>Lactobacillus</i>	Lait	laits fermentés, yaourts, kéfirs, la plupart des fromages
		Viande	saucissons secs, jambons secs
		poissons	nuoc mam
		végétaux	choucroute, olives, "yaourts" au lait de soja
	<i>Pediococcus</i>	céréales	pain au levain, bières
		végétaux	choucroute, ensilage
		Viande	saucisses semi-séchées, saucissons secs
		poissons	nuoc mam
<i>Streptococcaceae</i>	<i>Lactococcus</i>	Lait	fromages blancs, à pâte molle ou pressée non cuite, kéfirs
	<i>Streptococcus</i>	Lait	yaourts, laits fermentés, fromages à pâte pressée cuite
<i>Enterococcaceae</i>	<i>Tetragenococcus</i>	végétaux	sauce de soja,
		poissons	saumure d'anchois, sauce de poisson, nuoc mam
<i>Leuconostocaceae</i>	<i>Leuconostoc</i>	végétaux	choucroute, olives, vin, cidre
		Lait	fromages, kéfirs
	<i>Oenococcus</i>	végétaux	Vin
<i>Bifidobacteriaceae</i>	<i>Bifidobacterium</i>	Lait	laits fermentés

## 2. Rôle des bactéries lactiques dans la bioconservation

La bioconservation consiste à inoculer un produit par des bactéries sélectionnées pour leur aptitude à inhiber le développement de germes indésirables, sans modifier les qualités organoleptiques et

sanitaires de ce produit. Les bactéries lactiques sont de bons candidats pour cette technologie car elles produisent souvent une large gamme de composés inhibiteurs (acides organiques, peroxyde d'hydrogène, diacétyl, bactériocines, réutéline ...). Dans ce type de procédé, le rôle conservateur des bactéries lactiques est principalement lié à leur compétitivité, qui leur permet de croître et dominer aux dépens des autres espèces. Parmi les substances antimicrobiennes produites par les BL, on peut citer :

➤ **Les acides organiques**

Les acides organiques (acide lactique, acide acétique, acide formique et acide propionique) conduisent à l'abaissement du pH extérieur et cytoplasmique. Cette acidification inhibe l'activité de la majorité des enzymes cytoplasmiques. Une fois accumulés dans le milieu de culture, ces acides s'associent aux phospholipides de la membrane entraînant ainsi un dysfonctionnement des systèmes de transports membranaires.

➤ **Le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)**

Il permet l'oxydation des groupements sulfhydryles des enzymes cellulaires, menant ainsi à la dénaturation puis à la perte de l'activité enzymatique. Le peroxyde d'hydrogène est aussi le précurseur principal des groupements superoxydes (O<sup>-2</sup>) et des groupements hydroxyles (OH) qui provoquent des dommages irréversibles dans l'ADN bactérien.

➤ **Le dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>)**

Issu de la fermentation hétérolactique de certaines BL, il peut provoquer un environnement anaérobique, toxique pour certains microorganismes alimentaires aérobies par son action sur les lipides des membranes cellulaires et sa capacité à réduire le pH intérieur et extérieur.

➤ **Le diacétyl**

Est un produit issu du métabolisme du citrate par plusieurs BL : *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Pediococcus* et *Lactobacillus*. Les bactéries à Gram négatif, les levures et les moisissures sont plus sensibles au diacétyl que les bactéries à Gram positif et son mode d'action serait dû à une interférence avec l'utilisation de l'arginine. Le diacétyl est rarement présent dans les fermentations alimentaires à des niveaux suffisants pour apporter une contribution majeure à l'activité antibactérienne.

➤ **La réutéline (β-hydroxypropionaldéhyde)**

C'est un composé produit durant la phase stationnaire de la croissance anaérobie du *Lactobacillus reuteri* sur un mélange de glucose et glycérol ou glycéraldéhyde. Elle a un large spectre antimicrobien affectant en général aussi bien les virus, les protozoaires que les bactéries. Son activité serait due à l'inhibition de la ribonucléotide réductase. L'utilisation de la réutéline pour contrôler les germes pathogènes à Gram positif et à Gram négatif a été étudiée dans le lait, ses dérivés et les produits carnés.

➤ **Les bactériocines**

Outre les mécanismes suscités, les propriétés antimicrobiennes des BL sont aussi associées à leur capacité de synthétiser les bactériocines. Ces peptides de faible poids moléculaire interagissent avec la membrane plasmique de la bactérie cible par des interactions électrostatiques. Ces liaisons conduisent à la formation de pores dans la membrane de la bactérie cible. Le spectre des bactériocines est plutôt étroit, limité aux espèces taxonomiquement proches du producteur. Toutes les bactériocines produites par des BL décrites jusqu'à présent, ont une activité dirigée contre les

bactéries à Gram positif aucune contre les bactéries à Gram négatif. Ces substances représentent un intérêt dans la conservation des denrées alimentaires par leur capacité à réguler la microflore existant dans les produits fermentés et inhibe la croissance des germes pathogènes.

Parmi ces bactériocines on peut citer **la plantarcine J** produite par *Lactobacillus plantarum*, **l'entéroccine L50** produite par *Enterococcus faecium* L50, **la lactococcine A**, **la lactococcine B** et **la lactococcine M** produites par *Lactococcus lactis*, **la mésentéroccine Y105** produite par *Leuconostoc mesenteroides*, **la thermophiline A** et **la bovicine 255** produites respectivement par, *Streptococcus thermophilus* ST134 et *Streptococcus gallolyticus* LRC0255, **la carnobactériocine A** et **la piscicoline 61** synthétisées respectivement par, *Carnobacterium piscicola* LV17A et *Carnobacterium piscicola*.

En agro-alimentaire seule la nisine synthétisée par *Lactococcus lactis* est utilisée comme additif alimentaire afin d'inhiber la croissance des espèces nuisibles responsables des intoxications alimentaires. La nisine est efficace contre les germes pathogènes tels que *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium tyrobutyricum*.

## 2.1. Méthodes de l'application des bactéries lactiques en bioconservation

La bioconservation peut être appliquée aux aliments par 4 méthodes d'ajout :

### 2.1.1. Méthodes in situ

#### ➤ Culture pure

L'ajout d'une culture pure et viable de bactéries lactiques avec une aptitude avérée à produire des substances antimicrobiennes dépend de la capacité de la culture à croître et à produire ces métabolites dans des conditions environnementales et technologiques spécifiques. La culture doit être en mesure de rivaliser avec la microflore naturelle, ne doit pas influencer sur les propriétés physico-chimiques et organoleptiques des aliments, ne pas produire de gaz ou d'exopolysaccharides pour éviter le gonflement de l'emballage.

#### ➤ Bactéries lactiques mésophiles

L'ajout de bactéries lactiques mésophiles, permettant ainsi de préserver leur viabilité face à une température excessive durant le processus de fabrication. La souche doit être ajoutée à une concentration initiale connue et dans des conditions de refroidissement spécifiques. Lorsque la température du procès est excessive, la souche se développera en compétition avec la bactérie pathogène.

### 2.1.2. Méthodes ex situ

#### ➤ Préparation de bactériocines

L'ajout de préparations de bactériocines dans un extrait brut, en solutions concentrées obtenues à partir de la culture des bactéries lactiques pour vérifier leur production dans l'extrait complexe/aliment. Cette technique évite l'utilisation de composés purifiés qui peuvent nécessiter de se référer à la réglementation en vigueur et générer un coût de production plus élevé liée à la purification du composé.

#### ➤ Substances pures antagonistes ou semi pure

Cette méthode est particulièrement intéressante dans la mesure où il est possible de connaître avec précision la dose ajoutée et donc de fiabiliser le résultat. Des recherches ont été réalisées afin de normaliser la production de la bactériocine jusqu'à ce qu'il soit possible d'en garantir sa reproductibilité et de cette façon assurer la quantité adéquate dont l'ajout permettra une inhibition

suffisante. L'application de ce type de technologies oblige indiscutablement à contrôler les variables technologiques, dont dépendent ces cultures.

Les deux premières méthodes de bioconservation sont considérées comme des techniques *in situ*, étant donné que tout le processus se réalise de façon autonome dans les aliments. Les deux dernières méthodes sont considérées comme des techniques d'ajout *ex situ*, étant donné que les cultures protectrices sont produites dans des conditions contrôlées et sont ajoutées dans un second temps à la matrice alimentaire.

Pour pouvoir mettre en œuvre les techniques *ex situ*, il faut isoler complètement les microorganismes producteurs de bactériocines, assurer l'existence d'équipement et de moyens de culture spécifiques, garantir l'activité de chaque extrait, déterminer la concentration minimale inhibitrice face aux pathogènes et normaliser la technique pour garantir les quantités d'inoculum avec l'effet antagoniste souhaité.

### **2.1.3. Bioconservation par l'utilisation des bactériocines**

Les bactéries productrices de bactériocines peuvent être ajoutées comme starter dans des produits fermentés ou comme culture protectrice. Elles doivent être capables de croître et de produire des bactériocines dans l'aliment à conserver. La composition du produit et les conditions de stockage doivent donc permettre la croissance et la production de bactériocines.

Les bactériocines peuvent être appliquées sous une forme purifiée, semi-purifiée ou sous la forme d'un concentré obtenu après fermentation d'un substrat alimentaire. Les bactéries productrices peuvent également être appliquées dans les produits alimentaires, la bactériocine sera alors produite *in situ*.

#### **➤ Bactériocines purifiées ou semi purifiées**

Les bactériocines purifiées ou semi purifiées sont appliquées après production en fermenteur, purification ou semi purification et conditionnement par les techniques adéquates, qui peuvent être relativement coûteuses.

#### **➤ Bactériocines concentrées**

Les bactériocines peuvent également être appliquées sous la forme d'un concentré obtenu après fermentation par la souche productrice et atomisation d'un substrat alimentaire tel que le lait. Cette préparation sera considérée comme un ingrédient fermenté. Elle contiendra la bactériocine mais également d'autres métabolites microbiens tels que l'acide lactique. La pédiocine, une bactériocine de classe IIa, est commercialisée sous cette forme sous le nom ALTA 2341.

#### **➤ Bactériocines immobilisées**

Un autre mode d'application des bactériocines consiste en leur immobilisation sur les cellules productrices, dans des gels ou des films telle que l'alginate de calcium, la gélatine, la cellulose, les protéines de soja, des films de polysaccharides. La bactériocine sera alors libérée dans le produit au cours de la conservation.

### **2.1.4. Fermentation des aliments**

La fermentation était un procédé essentiellement destiné à la conservation des aliments. Qu'il s'agisse de la fermentation de la viande en saucisson, du lait en fromage ou du chou en choucroute. Un élément commun est l'implication de bactéries lactiques qui vont dégrader les sucres présents dans le produit frais pour conduire à la production d'acide lactique qui entraîne une baisse de pH ralentissant le développement de nombreux microorganismes et assurant ainsi la conservation d'un produit microbiologiquement sain. On peut donc considérer que la fermentation fait partie des procédés de bioconservation. Dans le concept d'utilisation de cultures protectrices à des fins de bioconservation, l'effet recherché est d'assurer la qualité microbiologique sans modification organoleptique de la matrice alimentaire.