



# STRATÉGIES NOVATRICES POUR DÉVELOPPER DES ALIMENTS PLUS SAINS





# STRATÉGIES NOVATRICES POUR DÉVELOPPER DES ALIMENTS PLUS SAINS

FOODSME-HOP TECHNOLOGY BOOK

ÉDITEUR

Jean-David Leao



## REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient le Fonds Européen de Développement Régional (FEDER), par l'intermédiaire du Programme de Coopération Interrégionale de la zone du Sud-ouest européen (Interreg SUDOE IVB), pour le financement du projet FOODSME-HOP (SOE/P1/E299), dont ce livre est issu.

Nous sommes reconnaissants à l'ensemble des partenaires du projet FOODSME-HOP qui ont rendu possible la publication de ce document, ainsi qu'aux entreprises qui ont collaboré aux projets de démonstration.

---

### STRATÉGIES NOVATRICES POUR DÉVELOPPER DES ALIMENTS PLUS SAINS

© 2013 de l'édition d'origine :

Chapitre 1 : IPVC

Chapitre 2 : ITERG

Chapitre 3 : IRTA et AINIA

© 2013 de la traduction Française :

Chapitre 1 / chapitre 3

ADI, AINIA, IPVC, IRTA, ITERG, FUNDECYT-PCTEX, Agencia Andaluza del Conocimiento

Édité par l'ITERG :

11 rue Monge - Parc Industriel Bersol II

33600 PESSAC

FRANCE

Coordination éditoriale :

blueBOARD

Còrsega 453, 1er 3a

08037 Barcelone

00 34 934 575 832

Correction orthotypographique et de style :

LACONIC SANS SCP

Mise en page :

Concepte Gràfic

ISBN 13 : 978-84-940022-3-6.

Dépôt légal : B.8974-2013

Imprimé en Espagne par :

MEDIAactive

# CHAPITRE 1

## BIOPRÉSERVATION DES ALIMENTS TRADITIONNELS PAR L'AJOUT DE BACTÉRIES ACIDO-LACTIQUES ET LEURS BACTÉRIOCINES

Jácome SL<sup>1</sup>, Todorov S D<sup>2</sup>, Fonseca SC<sup>1</sup>, Pinheiro R<sup>1</sup>, Guerreiro JS<sup>1</sup>, Monteiro V<sup>1</sup>, Fernandes P<sup>1</sup>, Noronha L<sup>3</sup>, Almeida G<sup>3</sup>, Gomes A M<sup>3</sup>, Pintado MM<sup>3</sup>, Silva CLM<sup>3</sup>, Morais AMMB<sup>3</sup>, Silva J<sup>3</sup>, Teixeira P<sup>3</sup>, Vaz Velho M<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Escola Superior de Tecnologia e Gestão – Instituto Politécnico de Viana do Castelo  
Avenida do Atlântico s/n, 4900-348 Viana do Castelo (Portugal)

<sup>2</sup>Departamento de Alimentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 14, 05508-900 São Paulo (Brasil)

<sup>3</sup>Escola Superior de Biotecnologia – Universidade Católica Portuguesa, Rua Dr. António Bernardino de Almeida, 4200-072 Porto (Portugal)

# Index

<b>1. INTRODUCTION .....</b>	<b>10</b>
1.1 Produits alimentaires traditionnels et développement rural	10
1.2 Additifs synthétiques conservateurs dans les produits de salaison fumés .....	10
1.3 Biopréservation des aliments .....	12
1.3.1 Les Bactéries Acido-Lactiques .....	13
1.3.2 Méthodologies et exigences dans l'application des Bactéries Acido-Lactiques .....	15
<b>2. ÉTUDE DE DÉMONSTRATION: SUBSTITUTION D'ADDITIFS SYNTHÉTIQUES PAR DES CULTURES DE BACTÉRIES ACIDO-LACTIQUES DANS UN PRODUIT SALÉ/FUMÉ TRADITIONNEL.....</b>	<b>16</b>
2.1 Définition du Produit .....	16
2.2 Objectifs.....	17
2.3 Développement Expérimental .....	18
2.4 Résultats .....	19
<b>3. CONCLUSIONS.....</b>	<b>21</b>
<b>4. REMERCIEMENTS.....</b>	<b>21</b>
<b>5. RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>22</b>

## 1. INTRODUCTION

### 1.1 PRODUITS ALIMENTAIRES TRADITIONNELS ET DÉVELOPPEMENT RURAL

“  
**À l'heure où les frontières politiques et économiques se sont estompées, les éléments qui différencient et identifient un aliment deviennent particulièrement importants, aussi bien pour les producteurs que pour les consommateurs.**  
 ”

À l'heure où les frontières politiques et économiques se sont estompées, les éléments qui différencient et identifient un produit sont devenus particulièrement importants, pour les producteurs et les consommateurs. Dans chaque pays, les ressources locales, notamment représentées par les produits alimentaires traditionnels, peuvent avoir un impact économique considérable. Cependant, , il est important de créer des schémas de production qui permettent d'exploiter non seulement la diversité et la complémentarité des produits alimentaires traditionnels, mais aussi les savoir-faire qui permettent l'optimisation des marges et des bénéfices des producteurs[1].

La définition de produit traditionnel n'est ni claire, ni facile, et fait l'objet de plusieurs interprétations selon les auteurs [2]. D'après certains, les produits traditionnels sont des produits uniques qui proviennent de matières premières spécifiques et d'un savoir-faire reliés à des techniques de production et de distribution, ainsi qu'une consommation associée à des dénominations de produit local, traditionnel, artisanal ou régional [2]. D'une manière générale, les produits identifiés par leur origine géographique, par le processus de production ou les caractéristiques intrinsèques qui les lient à une coutume, à un savoir-faire ou à une époque et qui les différencient d'autres produits sont également appelés produits traditionnels [3].

Par ailleurs, la tendance croissante à la consommation d'aliments plus sains et la préférence de produits spécifiques et d'origines déterminées, permet une forte revalorisation des produits traditionnels dans les zones de consommation urbaine. Il est ainsi essentiel que les pays du sud-ouest européen qui ont un patrimoine important de produits agricoles et agroalimentaires, parient sur la différenciation de ceux-ci, en augmentant leur valeur, en préservant les coutumes anciennes et les modes de production, afin de les transmettre aux générations futures dans une optique de développement économique durable.[5].

Les viandes de salaison fumées, surtout de porc, ont un énorme impact sur l'économie du Sud-ouest de l'Europe. Il est donc important de développer de nouveaux concepts et technologies qui permettent d'augmenter la valeur commerciale de ces produits avec pour objectif de dynamiser le secteur, sans délaissé la typicité des processus de production, du territoire et des personnes qui y sont associés.

À l'exception de certains pays en voie de développement, où la chaîne du froid n'est pas largement établie, fumer ou sécher un aliment a pour objectif principal, aujourd'hui, de lui apporter des caractéristiques organoleptiques différentes, selon le mode de production, la culture alimentaire ou le territoire où il est fabriqué. Donner au produit salé/fumé un goût caractéristique, qui séduise le consommateur, est aujourd'hui, un des principaux buts de cette industrie traditionnelle. L'effet conservateur de ces techniques est, dans certains cas, minimal, c'est pourquoi l'utilisation d'additifs chimiques pour garantir la sécurité microbiologique peut, ainsi, affecter la sécurité chimique [1].

### 1.2 ADDITIFS SYNTHÉTIQUES CONSERVATEURS DANS LES PRODUITS DE SALAISON FUMÉS

Les additifs alimentaires sont des substances naturelles ou de synthèses, ajoutées intentionnellement aux aliments, dans un but technologique ou organoleptique, au cours de la production. Les additifs et leurs sous-produits deviennent alors des composants de ces derniers. Ils peuvent avoir, ou pas, une valeur nutritive, mais ne sont ni consommés comme aliments, ni utilisés comme ingrédients. L'utilisation de ces substances est très ancienne. Les égyptiens utilisaient déjà des colorants et des arômes. L'usage du nitrate de potassium et d'épices avec pour objectif de conserver et d'améliorer l'apparence des aliments, remonte

à la Rome antique [6].

L'utilisation de ces substances est régie par une législation spécifique au niveau européen. Pour pouvoir utiliser un additif dans l'industrie alimentaire, ce dernier doit faire partie des listes de l'annexe II du Règlement n° 1129/2011 de la CEE qui complète le Règlement 1333/2008. Ces listes incluent tous les additifs alimentaires autorisés, le cahier des charges, les conditions d'utilisation et les quantités maximales permises.

L'autorisation de mise sur le marché d'un nouvel additif est faite une fois qu'il a été démontré qu'il est inoffensif pour la santé du consommateur. Le Règlement (CE) n° 1331/2008 du Parlement Européen et du Conseil, du 16 décembre 2008, établit une procédure d'autorisation commune aux additifs, enzymes et arômes alimentaires. Par conséquent, quiconque souhaite mettre un additif non autorisé sur le marché ou étendre les conditions d'un additif autorisé doit présenter une demande en conformité avec ce Règlement, ainsi que le guide de l'EFSA correspondant [6].

Certaines conditions environnementales, comme les changements de température, l'oxydation ou l'exposition à la pollution peuvent modifier la composition initiale des aliments. Les additifs alimentaires sont des agents importants, dans la mesure où ils aident à maintenir la qualité et les caractéristiques sensorielles des produits alimentaires, tout en contribuant à leur sécurité sanitaire. Ils permettent également d'augmenter de manière significative la date limite d'utilisation optimale (DLUO) ou la date limite de consommation (DLC) des aliments. Les additifs alimentaires utilisés correctement sont considérés comme ne mettant pas la santé des consommateurs en danger. Cependant, un abus de ces substances, que ce soit par l'utilisation de quantités excessives ou par l'ajout d'additifs non déclarés, non réglementés, pourrait compromettre la sécurité du consommateur.

Dans le cas des viandes salées et fumées, l'industrie a recours à l'utilisation de nitrates de potassium (E-252), pendant le séchage, pour garantir les caractéristiques sensorielles typiques de ces produits de prédominance culturelle, et pour inhiber au cours de la conservation la croissance de microorganismes pathogènes, principalement *Clostridium botulinum* et la formation de sa toxine. La couleur rouge produite vient d'une réaction chimique entre le pigment de la viande, la myoglobine (Mb), et l'ion nitrite (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) résultat lui-même de la transformation de l'ion nitrate (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) sous l'action de certains microorganismes durant le processus de séchage [7]. Cependant, le nitrite de sodium (E-250), normalement utilisé avec le nitrate de potassium, présente un risque pour le consommateur s'il n'est pas utilisé conformément aux conditions d'application du Règlement qui le régit. En effet, il est capable de se lier à la myoglobine du sang de la même façon qu'il s'unit à la myoglobine de la viande, entraînant la formation de méthémoglobine, substance toxique qui ne peut transporter d'oxygène [7]. Un autre risque concerne la formation de substances cancérigènes, les nitrosamines, soit directement dans le produit, soit par le corps lui-même après ingestion. Dans le premier cas, le risque est limité aux produits qui subissent des températures élevées pendant le traitement, tels que le lard salé / fumé ou aux produits qui sont riches en amines nitrosables, comme dans le cas du poisson et de certains produits fermentés. Dans le second cas, les nitrosamines peuvent se former, au niveau de l'estomac, par des réactions entre le NO<sub>2</sub><sup>-</sup> et les amines secondaires et tertiaires dues à la dégradation de la viande [1].

La quantité initiale de nitrites et/ou de nitrates ajoutée durant le processus n'est pas égale à celle trouvée dans le produit final. En effet, ceux sont des substances assez instables et réactives, ce qui conduit à une diminution importante de leur concentration dans les produits, avant consommation. Pour réduire le risque de formation de nitrosamines, en plus de la diminution importante de l'utilisation de nitrites et de nitrates, que nous défendons, diverses techniques sont utilisées, comme par exemple l'ajout conjoint aux nitrates, d'agents qui bloquent les mécanismes de formation des nitrosamines. Ces agents sont l'acide ascorbique (E-330) et ses dérivés, les tocophérols alpha, gamma et delta (E-306–E-309), particulièrement efficaces respectivement dans les milieux aqueux et gras. Aux États-Unis, il est obligatoire d'ajouter à la fois les nitrates et l'acide ascorbique durant le process. Avec



**L'utilisation d'additifs alimentaires est réglementée par une législation de type européenne.**



le même objectif, l'Union européenne a imposé l'obligation, lorsque du nitrite de sodium est ajouté, de l'ajout conjoint de chlorure de sodium dans le mélange, afin d'éviter une intoxication aiguë des consommateurs « assidus » de ce type de produits alimentaires [7].

L'usage de sucre comme agent de séchage est également important. Toutefois, les concentrations utilisées de 0,5 à 1,0% ne permettent pas une action conservatrice, mais influent sur le goût, offrant une combinaison de sucré / salé qui adoucit la saveur dérivée des épices tout en masquant parfois le goût amer du nitrite [8]. En plus de cette première fonction, il en existe une seconde qui revêt une importance particulière dans la production de charcuterie sèche. Le sucre est utilisé comme source d'énergie par les bactéries responsables de la réduction des nitrates et permet le développement ultérieur de bactéries acido-lactiques responsables de la diminution du pH, ce qui affecte indirectement le processus de conservation de ces produits [8].

L'ajout de nitrates et de nitrites aux produits carnés secs et/ou fumés est une décision basée sur le rapport risque/bénéfice. D'un côté, il existe le risque de formation de nitrosamines et d'intoxication par une ingestion excessive et de l'autre, le risque de ne pas contrôler la croissance de *Clostridium botulinum* et la formation de la toxine botulique. La réglementation accepte l'utilisation de nitrates et de nitrites en les considérant nécessaires pour assurer la sécurité microbiologique de certains aliments. Cependant, elle impose des limites maximales de concentration de ces composés ainsi que l'utilisation conjointe d'inhibiteurs de formation de nitrosamines. Au Portugal, l'ajout de nitrates et de nitrites n'est pas utilisé dans la formulation de viandes avec l'Appellation d'Origine Protégée ou l'Indication Géographique Protégée. Notre point de vue est que cela doit rester ainsi, mais pour ce faire, il est indispensable d'étudier des technologies alternatives qui augmentent la sécurité microbiologique, en conservant les caractéristiques organoleptiques du produit et son mode de production traditionnel.

### 1.3 BIOPRÉSERVATION DES ALIMENTS

Durant les dernières décennies, une forte demande de produits naturels a vu le jour et l'intérêt des consommateurs pour les produits traditionnels, sans additifs chimiques, a augmenté. Les nouveaux procédés de fabrication et la demande constante de produits peu transformés nécessitent le développement de nouvelles stratégies visant à prolonger la durée de vie des aliments.

La biopréservation des aliments, grâce à l'ajout de substances naturelles, se présente comme une alternative intéressante pour augmenter la durée de vie du produit, garantir la sécurité microbiologique, diminuer l'usage d'additifs synthétiques, sans modifier les caractéristiques sensorielles et nutritionnelles des produits périssables.

La biopréservation (non réglementée par la législation européenne) est une technique de conservation alimentaire largement utilisée aux États-Unis, où elle est réglementée par la FDA (Food and Drug Administration), [9].

Les bénéfices liés à l'utilisation de ce type de technologie sont nommés ci-après [9]:

- C'est une solution sûre présentant moins de limitations que les conservateurs chimiques, au vu de la présence de substances naturelle dans les matrices alimentaires;
- Aucune résistance n'est connue et l'impact sur l'environnement est minime, car elles sont rapidement éliminées par la chaîne alimentaire;
- Elles ont un spectre d'action très précis, leur activité est renforcée par le pH et elles ont un effet synergique avec d'autres agents antimicrobiens métaboliques;
- Leur utilisation est compatible avec l'étiquetage de produit biologique, étant donné que la conservation se fait sans produits chimiques ni conservateurs synthétiques.

En cherchant les inconvénients de l'utilisation de cette technologie, nous pouvons citer les suivants [9]:

- L'absence d'une réglementation européenne commune qui la protège et la difficulté à obtenir une autorisation pour son application industrielle;
- L'altération possible des propriétés sensorielles des aliments et les coûts élevés de production et de développement.

### 1.3.1 Les bactéries acido-lactiques

L'usage de micro-organismes et de leurs produits métaboliques pour la conservation des aliments est très ancien. Les bactéries acido-lactiques ont été utilisées empiriquement et de façon artisanale dans la fermentation du lait, de la viande et des légumes, pour obtenir des produits avec une durée de vie prolongée.

Les bactéries acido-lactiques regroupent un grand nombre de microorganismes Gram-positif, non sporulés, anaérobies, aérotolestants et tolérants aux acides. Elles présentent une morphologie, un métabolisme et une physiologie commune. Elles ont un métabolisme énergétique exclusivement fermentaire, en produisant de l'acide lactique à partir d'hydrates de carbone. Elles incluent les cocci de type: *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* et bacilles de genres *Lactobacillus* et *Carnobacterium* [10].

Les bactéries acido-lactiques sont le groupe le plus abondant de bactéries et sont largement distribuées dans la nature en grande partie, parce qu'elles possèdent la capacité de se développer sur une grande variété de substrats et dans de nombreuses conditions biologiques. Le groupe *Lactobacillus* est le plus important et le plus hétérogène (Figure 1). Les bactéries acido-lactiques ne nécessitent pas d'oxygène pour se développer, elles tolèrent la présence de dioxyde de carbone, de nitrites, de fumée, de concentrations relativement élevées en sels et des valeurs basses de pH.

Les bactéries acido-lactiques font partie de la flore microbienne typique des produits salés / fumés, soit par leur présence naturelle, soit par leur apport comme *starter*. Les bactéries acido-lactiques entrent en concurrence avec d'autres microorganismes pour les nutriments et les habitats. Leur pouvoir vient en grande partie de l'effet antagoniste qu'elles provoquent en générant des substances antimicrobiennes.

Mis à part leur rôle technologique, les bactéries acido-lactiques sont aussi responsables d'apporter aux produits fermentés une série de caractéristiques sensorielles et nutritionnelles, appréciées par le consommateur, telles que la couleur, le goût, la texture, la digestibilité et la qualité nutritionnelle spécifique de ces produits [11,12, 13, 14].

Les bactéries acido-lactiques sont responsables du goût « piquant » de la charcuterie grâce aux petites quantités d'acide acétique, d'acide propionique, d'éthanol, d'acétone, de dioxyde de carbone et d'acide pyruvique produites lors de la fermentation. La quantité et les types de composés formés dépendent du starter appliqué, des hydrates de carbone présents dans le substrat, des sources de protéines de la matrice alimentaire et des additifs utilisés [15].

La diminution du pH est la conséquence de la formation d'acide lactique, qui peut être suffisant, à lui seul, pour s'opposer au développement de nombreux organismes, y compris de *Listeria monocytogenes*. Les acides acétiques et propioniques agissent d'une manière similaire à l'acide lactique. Ces acides organiques jouent un rôle important dans certains aliments fermentés, et il est connu que l'acide acétique a un effet synergique, antimicrobien, en présence d'acide lactique.

Les bactéries lactiques, comme il a déjà été indiqué ci-dessus, sont responsables d'apporter aux produits fermentés une série de caractéristiques chimiques, nutritionnelles et sensorielles uniques, en grande partie grâce aux mécanismes de survie déclenchés en présence d'une flore microbienne concurrentielle. Les exemples de mécanismes de survie



**La biopréservation des aliments, grâce à l'ajout de substances naturelles, se présente comme une option intéressante pour augmenter la durée de vie du produit, garantir sa sécurité microbiologique et réduire l'utilisation d'additifs de synthèse, sans modifier les caractéristiques sensorielles.**

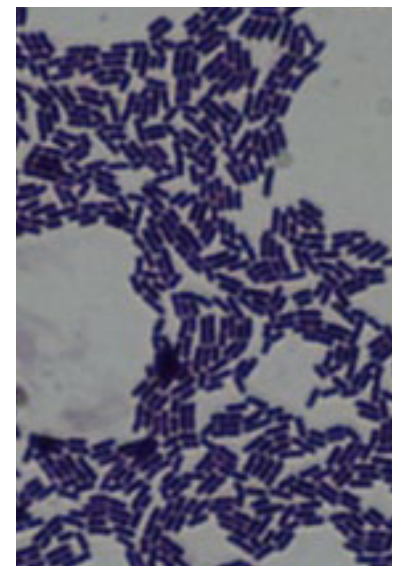


Figure 1 : *Lactobacillus plantarum*  
(Microscopie Optique, coloration de Gram, agrandissement10X100)

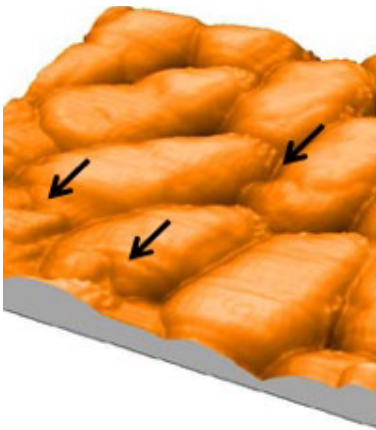


Figure 2 : Visualisation par Microscopie à Force Atomique de la °déformation cellulaire en *L. ivanoviisubsp. ivanovii* ATCC19119 par l'action de la bactériocine ST5Ha [45]

les plus habituels sont la compétition pour l'oxygène, la compétition pour les sites de liaison et la compétition pour la production de substances antagonistes, telles que la diacétyle, le peroxyde d'hydrogène, de l'acétaldéhyde, les composés non protéiques de faible poids moléculaire comme la reutérine, la reutéricycline et l'acide pyroglutamique, et par la production de bactériocines [16,17,18,19,20,21].

Ces dernières années, il y a été constaté un intérêt croissant pour l'utilisation de bactéries acido-lactiques dans la conservation alimentaire. Plusieurs études publiées démontrent la viabilité de ces micro-organismes dans le contrôle de la croissance de micro-organismes pathogènes et de contaminants. Diverses bactéries lactiques comme *Lactobacillus acidophilus* [22], *Lactobacillus gasserii* [23], *Lactobacillus rhamnosus* [24], *Lactobacillus plantarum* [25,26], *Lactobacillus casei* [27], *Lactobacillus paracasei*[28] ont été citées pour leur capacité à inhiber les agents pathogènes. Les interactions ont été étudiées in vitro contre des bactéries entéropathogènes gram-négatives, telles que *Escherichia coli* [23, 27,29], *Salmonella entérica* [28,30,31], *Helicobacter pylori* [32] et *Shigellasonnei* [33]. Par ailleurs, des effets antagonistes des bactéries lactiques ont aussi été décrits face à la croissance d'agents pathogènes gram-positifs, comme c'est le cas de *Bacillus cereus* [34] et de *Listeria monocytogenes* [35].

On sait maintenant que ces organismes unicellulaires sont responsables de la production d'une grande variété de métabolites antimicrobiens, comme le diacétyle (produit de fermentation) ou le peroxyde d'hydrogène, l'acétaldéhyde, les acides organiques, les composés non protéiques de faible poids moléculaire (reutérine, reutéricycline et acide pyroglutamique) et les bactériocines, qui représentent un grand potentiel dans le cadre de la biopréservation des aliments [18,19,20,21]. Ces composés sont synthétisés sur le ribosome et présente un large spectre d'action, en fonction des espèces ciblées.

Durant la dernière décennie, une grande variété de bactériocines a été caractérisée et identifiée (peptides de bactéries acido-lactiques), représentant une avancée considérable pour la recherche en agroalimentaire. Plusieurs études ont montré les capacités antimicrobiennes de divers bactériocines qui ont été jugées comme d'excellents conservateurs, utilisées seuls ou en mélange [20,36,37,38,39, 40, 41,42,43,44]. Sur la Figure 2, on constate l'action bactéricide de la bactériocine ST5Ha de la bactérie acido-lactique *Enterococcusfaecium* ST5Ha, provoquant la lyse et l'effondrement des cellules de *L. ivanoviisubsp. ivanovii* ATCC19119 [45].

Des auteurs comme Ruiz-Moyano et al, [46] ont isolés 363 souches de bactéries acido-lactiques du lomo ibérique, et 30% présentent un fort potentiel technologique pour une utilisation, comme cultures probiotiques capable de croître et de se développer correctement à pH acide et en présence de concentrations significatives de NaCl. Albano et al, [47] ont évalué le potentiel de la bactériocine PA-1 produite par *Pediococcusacidilactici* comme biopréservateur de « l'alheira » (charcuterie avec de la viande de bœuf, de porc et de volailles). Cette bactérie lactique a été capable d'inhiber un ensemble de souches de *Listeria innocua*, durant le processus de production et tout au long de la durée de vie du produit, en diminuant l'agent pathogène à des niveaux de détection inférieurs à 1,5 UFC/g, sans affecter le bon développement de la flore microbienne naturelle, ni le pH, et sans que le produit ne souffre d'altérations organoleptiques perceptibles par un groupe de testeurs qualifiés.

Bien que dans certains pays la bactériocine *pédiocine* soit permise comme conservateur alimentaire, dans l'Union européenne et aux États-Unis l'unique bactériocine permise pour l'incorporation directe dans les aliments est la *nisine*. Découverte en 1928, la *nisine* a reçu le statut GRAS (Generally Regarded As Safe) en 1988, et son utilisation a été approuvée dans les produits alimentaires, par l'US Food and Drug Administration (FDA) [48]. En 1995, l'usage de la nisine (E234) a été autorisé dans les aliments, dans l'Union européenne, par la Directive 95/2/EC. Actuellement, son application est régie par le Règlement 1129/2011.



**Ces dernières années, un intérêt croissant pour l'utilisation de bactéries acido-lactiques ou de bactériocines d comme procédé de conservation des produits alimentaires a été constaté.**



De même que pour la *nisine*, les autres bactériocines étudiées se dégradent rapidement à cause des protéases du tractus gastro-intestinal. C'est pourquoi, le statut de GRAS pourrait s'étendre à d'autres bactériocines largement testées *in vitro* et *in vivo* [49].

### 1.3.2 Méthodologies et exigences dans l'application des Bactéries Acido-Lactiques

La biopréservation peut être appliquée aux aliments, en particulier aux produits salés et/ou fumés, par 4 méthodes d'ajout [50,51]:

1. Ajout d'une culture pure et viable de bactéries lactiques avec une aptitude avérée à produire des bactériocines. Son succès dépend de la capacité de la culture à croître et à produire ces métabolites dans des conditions environnementales et technologiques spécifiques (température, pH, Aw, additifs et autres). 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.
2. Ajout de bactéries lactiques mésophiles, permettant ainsi de préserver leur viabilité face à une possible température excessive durant le processus de fabrication. La souche bioprotectrice doit être ajoutée à une concentration initiale connue et dans des conditions de refroidissement spécifiques. Lorsque la température du process est excessive, la souche se développera en compétition avec la bactérie pathogène .
3. Ajout de préparations de bactériocines dans un extrait brut, en liqueur fermentée ou en solutions concentrées obtenues à partir de la croissance 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.
4. Ajout de substances pures antagonistes ou semi-pures, comme les bactériocines. 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. Cette technique de biopréservation est limitée à la législation existant dans chaque pays, en particulier en ce qui concerne l'ajout d'additifs. Il est important, d'abord, 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 biopréservation 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 micro-organismes 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 (détermination des courbes de croissance et d'inactivation) et ultérieurement normaliser la technique pour garantir les quantités d'inoculum et l'effet souhaité .

## 2. ÉTUDE DE DÉMONSTRATION: SUBSTITUTION D'ADDITIFS SYNTHÉTIQUES PAR DES CULTURES DE BACTÉRIES ACIDO-LACTIQUES DANS UN PRODUIT SALÉ/FUMÉ TRADITIONNEL

### 2.1 DÉFINITION DU PRODUIT

Cette étude est basée sur les résultats préliminaires du projet *Biofumados: Tradição vs Qualidade*.

L'utilisation de cultures souches de départ à la place de fermentations menées par la flore autochtone présente de nombreux avantages. Par exemple, une croissance maîtrisée de l'inoculum, un risque réduit de contamination croisée, une uniformité dans la production d'acide lactique, la limitation de la production de saveurs indésirables, la prévision de la valeur finale du pH et la diminution du risque de développement de bactéries pathogènes. Les autres avantages incluent l'accélération du temps de fermentation, l'augmentation de la productivité et la diminution de produits présentant des défauts de goût et de texture, attribués au développement des bactéries homo-fermentaires.

Ainsi, ce projet vise à produire de la charcuterie et des produits fumés traditionnels de manière plus sécurisée, grâce à l'utilisation de micro-organismes autochtones, isolés de cette même charcuterie et de ses bactériocines. L'utilisation de micro-organismes à haute valeur technologique qui peuvent générer *in situ* des conditions défavorables à la croissance d'agents pathogènes est certainement une ligne novatrice dans le domaine de la charcuterie et des produits fumés traditionnels.

L'objectif est toujours de choisir la méthode la plus appropriée d'ajout de cultures bioprotectrices de départ et de leurs bactériocines dans le process de transformation de charcuterie traditionnelle salée et /ou fumée, par l'intégration directe tant au niveau du produit qu'à celui de l'emballage. La méthode d'ajout choisie sera celle qui démontre avoir le plus de potentiel dans la capacité de préservation et de maintien des caractéristiques organoleptiques de ces produits traditionnels. Pour cette étude, une charcuterie traditionnelle du Nord-ouest du Portugal – l'Alheira a été choisie.

L'Alheira est une charcuterie traditionnelle portugaise, cuite, salée et légèrement fumée. Son origine remonte à la fin du XVe siècle et est associée à la présence de communautés juives dans la région de Tras-os-Montes au nord du Portugal [52]. C'est un produit composé d'un mélange de viande de bœuf, de poulet, de porc, de pain et de condiments. Elle est marron clair et a une forme cylindrique, rappelant un fer à cheval, d'environ 20 à 25 cm de longueur (figure 3). Le boyau ne doit pas présenter de ruptures et être bien unie à la pâte. Les extrémités sont attachées avec un fil en coton [52]. C'est un produit alimentaire qui a besoin d'être recuit avant d'être consommé, ce qui peut être fait par cuisson dans de l'huile ou au four. Le produit a une durée de vie de 60 jours, conservé à une température entre 0 et 5°C et emballé sous atmosphère modifiée (80 % N<sub>2</sub> et 20 % CO<sub>2</sub>). Le poids varie entre 150 et 200 grammes. Au niveau sensoriel, il a un léger goût fumé, agréable, soulignant le goût de l'ail, de l'huile et une légère acidité typique.



Figure 3 : Alheira

	Minimum	Maximum	Moyenne	Déviati on standard
<b>pH</b>	4,5	6,3	5,1	0,5
<b>% NaCl</b>	1,0	1,8	1,3	0,3
<b>% d'humidité</b>	43,3	57,2	52,3	4,3
<b>% de graisse</b>	10,9	29,6	18,4	4,7
<b>% de protéines total</b>	6,9	15,5	11,4	2,8
<b>% d'hydrates de carbone</b>	10,2	20,9	15,2	3,6
<b>Énergie (Kcal/100gr)</b>	220	369	274,4	39,7

Tableau 1 : Minimum, maximum, moyenne et déviation standard de certains paramètres physico-chimiques et nutritionnels de l'alheira. Tableau adapté de Ferreira et al. [53]

## 2.2 OBJECTIFS

Ce projet divisé en 4 parties a pour but de:

1. Développer des études préliminaires et rechercher les brevets dans le domaine des produits carnés salés ou fumés;

Réalisation de l'enquête relative aux informations concernant les brevets existants déjà sur le marché international dans le domaine de la biopréservation des produits de charcuterie et des produits fumés et qui serviront à posteriori à soutenir le développement et l'innovation prévus des tâches ultérieures.

2. Réduire les risques potentiels durant la transformation de produits carnés traditionnels portugais et valider les diagrammes de flux *in locu*;

Validation du diagramme de flux de production de charcuterie et de produits fumés et identification ultérieure des variables du processus et des dangers potentiels pour identifier les étapes de la transformation durant lesquelles l'utilisation d'agents bioprotecteurs peut représenter une valeur ajoutée pour la qualité et la sécurité du produit final.

3. Isoler et sélectionner les cultures de départ bactériocinogéniques à appliquer comme bioprotecteurs dans la transformation de charcuterie et de produits fumés traditionnels portugais;

Isolement des différentes bactéries acido-lactiques et réalisation d'analyse d'activité antimicrobienne et bactériocinogénique dans les divers produits contre différentes bactéries pathogènes, selon les dangers identifiés à l'étape n° 2. Des aspects comme l'absence de facteurs intrinsèques de virulence, l'origine des produits; la résistance aux conditions opératoires, concrètement le pH, la température, le sel et les composants de la matrice alimentaire, ont été considérés.

4. Évaluer les paramètres de qualité des produits représentatifs de la technologie appliquée;

Caractérisation de la charcuterie et des produits fumés au cours de leur durée de vie, fabriqués avec et sans ajout de cultures de départ bioprotectrices, permettant ainsi d'évaluer l'impact de la technologie sur la qualité finale du produit. Pour cette caractérisation, des techniques d'analyses physico-chimique, microbiologique et sensorielle des aliments ont été utilisées.



**Dans cette étude, la durée de vie des produits de charcuterie fumée produits avec et sans ajout de cultures de démarrage bioprotectrices a été évaluée.**



Par la suite, une méthode innovante d'ajout de cultures bioprotectrices sera étudiée, ajout qui pourra avoir lieu durant la phase de préparation et de repos de la pâte, immédiatement avant le remplissage et à la fin du processus, par immersion ou par pulvérisation. Dans le cas de produits laminés, la possibilité d'ajout de cultures par pulvérisation, brossage et immersion avant la fermeture de l'emballage sera également évaluée. Des études seront menées pour évaluer l'impact des différentes technologies d'emballage isolées et combinées pour développer un emballage optimisé pour chaque type de produit et sa forme de présentation respective (par unité ou coupé en tranches), qui maintienne la qualité et la sécurité du produit, en augmentant, si possible, sa durée de vie. Les technologies à évaluer seront les emballages et/ou les recouvrements bioactifs imprégnés dans des agents antimicrobiens, l'emballage sous atmosphère modifiée et l'emballage sous vide. Finalement, une application des cultures de départ bioprotectrices sera développée à l'échelle industrielle (*scale-up*), afin de valider la technologie et de la mettre à disposition de l'industrie.

Les résultats présentés dans le sous-chapitre suivant se concentrent uniquement sur l'ajout de cultures de départ bioprotectrices, *Lactobacillus plantarum* et *Lactobacillus sakei*, isolés des produits salés/fumés traditionnels, respectivement « Beloura » et « Salpicão », durant le processus de fabrication d'une autre charcuterie traditionnelle, « l'Alheira ».

### 2.3 DÉVELOPPEMENT EXPÉRIMENTAL

Durant l'étape n°3 du projet, mentionnée ci-dessus, - Isoler et sélectionner les cultures de départ bactériocinogéniques à appliquer comme bioprotecteurs durant la transformation de la charcuterie et de produits fumés traditionnels portugais - ont été développés plusieurs essais, dont les techniques et les résultats sont présentés au chapitre suivant.

Des essais d'isolement de bactéries acido-lactiques de produits carnés secs et fumés ont été réalisés. 6 souches ont été isolées, 2 de *Lactobacillus plantarum*, 3 de *Lactobacillus sakei* et 1 de *Enterococcus faecium* avec capacité bactériocinogénique. Des résultats d'optimisation et de production de bactériocines par plusieurs de ces souches [54], concrètement sur l'optimisation de la production de bactériocine ST153ch produite par la souche *Lactobacillus sakei* et isolée de « Salpicão », et le *Lactobacillus plantarum* et sa bactériocine ST202ch isolés du « Beloura », produits tous deux de viande salée et fumée, ont été publiés.

Après les études d'isolement et de sélection des cultures, en fonction de leur pouvoir antimicrobien, leur application a été réalisée à l'échelle industrielle dans l'entreprise *Minho Fumeiro - Enchidos e Fumados à Moda de Ponte de Lima Lda*. La souche, dont les résultats étaient les meilleurs, le *Lactobacillus sakei*ST153ch., a été incorporée au processus de fabrication de « l'alheira ».

Après incorporation de la culture au mélange de viandes, le processus normal de fabrication a suivi son cours, en plusieurs étapes, jusqu'au produit final, emballé sous vide et sous atmosphère modifiée. Le produit a été soumis à des conditions identiques de séchage, de fumage, d'emballage et de température de stockage. Après l'emballage, les unités ont été envoyées à des laboratoires de microbiologie et d'analyse sensorielle, où ont été évaluées l'activité antimicrobienne et les caractéristiques sensorielles du produit traité en comparaison avec le produit standard.

Des analyses sensorielles ont été menées simultanément par un groupe de 9 testeurs qualifiés pour détecter des défauts dans les produits carnés salés et fumés. Des sessions précédentes avaient été réalisées pour discuter conjointement des attributs sensoriels les plus importants, des échelles, des limites. Puis, la « fiche d'essai », composée de 17 points de description sensorielle, a été remplie.

Une analyse de variance a été réalisée (ANOVA) en utilisant le *software* Statistica (version7, Statsoft, Inc), afin de comparer et de détecter quels attributs évalués par le groupe, présentaient des différences statistiquement significatives entre les deux types de produits: celui de contrôle (échantillon commercial) et « l'alheira » avec la souche ajoutée, au jour 0.

Puis, des études ont été menées à 30, 45, 60 et 90 jours, pour comprendre si l'effet bactéricide se maintient au long de la durée de vie des produits (60 jours) sans altérations importantes au niveau sensoriel et/ou si éventuellement nous pourrions prolonger cette durée, qui est un des autres objectifs de ce projet. Enfin, une étude a été réalisée auprès du consommateur, dans le but d'évaluer l'acceptabilité du nouveau produit.

## 2.4 RÉSULTATS

L'activité antimicrobienne et bactériocinogénique du *Lactobacillus plantarum*, producteur de la bactériocine ST202ch et du *Lactobacillus sakei*, producteur de la bactériocine ST153ch face à la *Listeria monocytogenes* B296a a été démontrée. Des études ont été réalisées pour comparer l'efficacité et la croissance des bactéries acido-lactiques directement sur « l'alheira » et en compétition avec d'autres organismes pour simuler les conditions réelles du produit et de sa flore microbienne. La capacité de croissance des bactéries lactiques, objet de cette étude, inoculées avec différents micro-organismes a été démontrée. Ultérieurement, une étude préliminaire a été effectuée en milieu industriel, avec la production d'alheiras inoculées avec le *Lactobacillus sakei* producteur de la bactériocine ST153ch.

Comme il a déjà été indiqué, parmi les bactéries acido-lactiques isolées, des souches ont été identifiées avec une activité microbienne et bactériocinogénique. Durant le suivi réalisé, il a été constaté que cette activité s'est produite, grâce à la compétition directe entre espèces ou sous l'effet de la production d'acide lactiques, entraînant la diminution du pH du milieu de culture.

Comme indiqué précédemment, uniquement deux souches autochtones bactériocinogéniques, le *Lactobacillus plantarum* ST202ch isolé du « Beloura » et le *Lactobacillus sakei* ST153 isolé du « salpicão » ont été ultérieurement utilisées. L'activité anti listeria, des souches de *Lactobacillus plantarum*, productrice de la bactériocine ST202ch et de *Lactobacillus sakei*, productrice de la bactériocine ST153ch, a été évaluée initialement dans des échantillons de viande de porc stérilisée, étant donné que son comportement *in situ* n'est pas connu.

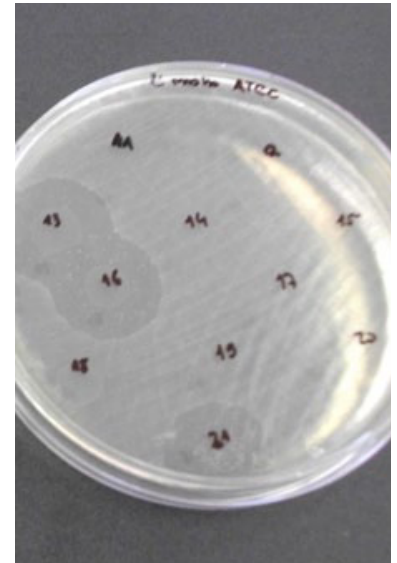
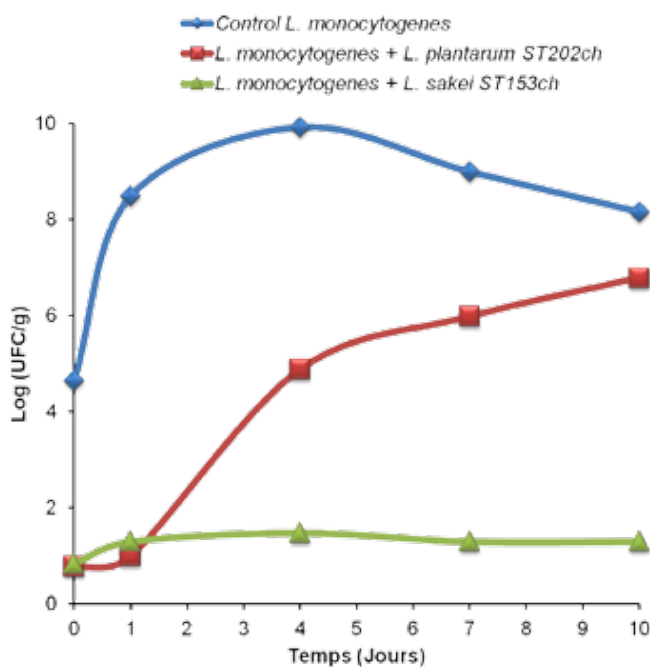


Figure 4 : Plaque avec halo d'inhibition dû à l'action du *Lactobacillus sakei* ST153ch face au *L. monocytogenes*



Graphique 1 : Comptages de *L. monocytogenes* dans la viande stérile en présence de ST202ch (*L. plantarum* ST202ch) et de ST153ch (*L. sakei* ST153ch) (Contrôle *L. monocytogenes* – croissance de *L. monocytogenes* dans la viande; *L. monocytogenes* + *L. plantarum* ST202ch – croissance de *L. monocytogenes* dans la viande avec mélange de ST202ch; *L. monocytogenes* + *L. sakei* ST153ch – croissance de *L. monocytogenes* dans la viande avec mélange de ST153ch)

Une inhibition de *L. monocytogenes* a été observée, en présence de ST 153ch (halo d'inhibition- Figure 4) durant les 10 jours d'étude, à une température d'incubation de 30 °C. Aucune inhibition n'a été observée de l'agent pathogène indicateur avec la ST202ch au cours de l'étude, cependant, la période de latence a augmenté (24 heures) (Graphique 1).

Ces résultats mettent en évidence que la souche *Lactobacillus sakei*, productrice de la bactériocine ST153ch, a été plus efficace pour contrôler la croissance du micro-organisme indicateur, *Listeria monocytogenes* B296, que la souche *Lactobacillus plantarum* ST202ch.

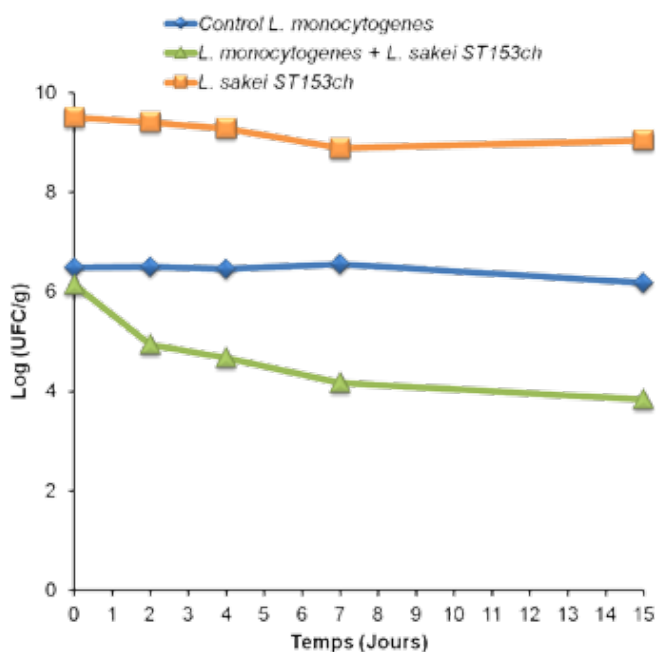
Sur le Graphique 2, il peut être constaté que le *Lactobacillus. sakei* ST153ch a inhibé la croissance de la *L. monocytogenes*, avec une réduction de 2 cycles logarithmiques face au contrôle durant les 15 jours de stockage et à une température de réfrigération de 5°C.

L'analyse sensorielle, menée le jour 0, révèle que le groupe de 9 testeurs a été cohérent dans leur réponse ( $p > 5\%$ ) concernant les attributs qui présentent des différences importantes, « l'Odeur Caractéristique », « la Dureté de la Pâte », « le Goût Caractéristique », « le goût Acide » et « le Goût Amer » ( $p < 5\%$ ). Cela signifie que le groupe a détecté des différences de perception de ces attributs, en comparant « l'alheira » inoculée et « l'alheira » commerciale, non inoculée.

Aucune différence significative n'a été trouvée entre « l'alheira » emballée sous vide et sous atmosphère modifiée (80% N<sub>2</sub> et 20% CO<sub>2</sub>) pour les attributs analysés. Cependant, le groupe n'a pas été cohérent dans sa réponse ( $p < 5\%$ ) concernant l'attribut « Goût Acide » et « Goût Amer », ce qui ne permet pas de déterminer l'influence du type d'emballage par rapport à la perception de ces deux attributs. L'analyse ultérieure des produits au cours de leur durée de vie permettra d'évaluer si l'emballage affecte ou non, de manière importante, la perception sensorielle de certains de ces attributs.

L'ajout d'une suspension saline de 500 ml par 10 kg de pâte inoculée, qui a probablement acidifié l'échantillon, en produisant plus d'acide lactique, a également augmenté l'humidité du produit et a altéré sa texture, et ces deux conditions sont, sûrement responsables de cette perception sensorielle relative à la dureté, à l'odeur et au goût détectée par le groupe. Par la suite, cette influence sera étudiée par comparaison avec un produit de contrôle, auquel 500 ml d'une solution saline sans inoculum sont ajoutés. D'autres études d'ajout d'inoculum ont également été effectués aussi bien sur la pâte que sur l'emballage. Ces analyses sensorielles permettront de comprendre si les différents types d'emballage sous

**Graphique 2 :** Comptages de *L. monocytogenes* dans « l'alheira » en présence du *L. sakei* ST153ch (Contrôle *L. monocytogenes* – croissance de *L. monocytogenes* en « l'alheira » *L. monocytogenes* + *L. sakei* ST153ch – croissance de *L. monocytogenes* dans « l'alheira » avec mélange de ST153ch; *L. sakei* ST153ch – croissance du *L. sakei* ST153ch dans « l'alheira »)



atmosphère modifiée (usage commercial) et sous vide influent sur les caractéristiques sensorielles du produit tout au long de sa durée de vie, et à 90 jours, à la fois sur le groupe de contrôle (échantillon commercial) et sur le groupe auquel a été ajoutée la culture.

### 3. CONCLUSIONS

Tout comme cela a été fait dans ce travail, plusieurs auteurs ont démontré le pouvoir des bactéries acido-lactiques pour inhiber la croissance de micro-organismes pathogènes dans les produits à base de viandes salées et fumées [47,54,55,56].

À l'avenir, ce type de « cultures fonctionnelles » permettra de protéger les consommateurs d'intoxications alimentaires, par des souches pathogènes ou par l'ingestion de ses toxines, grâce à une rapide acidification des aliments ou par la production de métabolites antimicrobiens, comme les bactériocines [49]. Cependant, il est important, lors des essais pour déterminer l'activité antimicrobienne de nouvelles souches, de tenir compte des risques connexes, tels que la formation d'amines biogènes et le développement de la résistance des bactéries aux antibiotiques [49].

D'après Bonomo *et al.*, [57] il a été possible de démontrer avec cette étude la capacité antimicrobienne élevée du *Lactobacillus sakei*, dans le but de normaliser le processus, de préserver les caractéristiques organoleptiques et sensorielles, et même de les améliorer. La non utilisation de conservateurs synthétiques, remplacés par des cultures vivantes autochtones, capables de garantir la qualité sanitaire du produit, aussi bien d'un point de vue microbiologique que chimique a été validé. La biopréservation par l'ajout de bactéries acido-lactiques est une option viable par rapport aux additifs synthétiques qui garantit la sécurité chimique et microbiologique du produit, tout en maintenant ses caractéristiques organoleptiques et son mode de production traditionnelle, est un exemple de ce qui a été désigné par « Innover dans la Tradition ».

Les bactériocines sont des métabolites secondaires facilement dégradés par les protéases des enzymes du tractus gastro-intestinal humain [42] et, par conséquent, comme la *nisine*, l'ensemble des substances GRAS (Generally regarded as Safe) devrait être étendu, afin de fournir une plus grande possibilité de biopréservation, soit par l'ajout de Bactéries Acido-lactiques, soit par l'addition directe de ses bactériocines, à condition qu'il existe des essais et études spécifiques *in vivo* qui en valident ses avantages [49].

### 4. REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient le Programme COMPETE – Programa Operacional Factores de Competitividade du Gouvernement du Portugal pour le financement du projet n° 13338 *Biofumados: Tradição vs Qualidade, et au promoteur Minhofumeiro – Enchidos e Fumados à Moda de Ponte de Lima Lda.*, l'Institut Polytechnique de Viana do Castelo et l'Université Catholique Portugaise. Les études présentées ici sont le résultat du travail de divers chercheurs des deux dernières institutions, ainsi que de la collaboration du Dr. Svetoslav Todorov, de l'Université de S. Paulo, Brésil.

Les auteurs remercient également le fonds FEDER (Fonds Européen de Développement Régional) à travers le programme de coopération interrégionale de la zone du sud-ouest européen (Interreg SUDOE IVB) et tous les partenaires du projet FOODSME-HOP pour avoir rendu possible la publication de ce document technique dirigé aux entreprises agroalimentaires.



**La biopréservation par l'ajout de bactéries acido-lactiques est une option viable, par rapport aux conservateurs de synthèse, garantissant la sécurité biotique et abiotique du produit, et en maintenant ses caractéristiques sensorielles.**



## 5. RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Vaz-Velho M. Smoked foods production. En: Caballero B, Trugo L, Finglas PM, editores. Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition. 2nd ed. Amsterdam: Elsevier-Academic Press; 2003. p. 5302-9.
- Ribeiro M, Martins, C. La certificación como estrategia de valorización de productos agroalimentarios tradicionales: la alheira, un embutido tradicional de Trás-os-Montes. Agricultura y Sociedad 1996;80-81:313-34.
- Caldentey P, Gómez, A. Productos típicos, territorio y competitividad. Agricultura y Sociedad 1996;80-81:57-82.
- Soeiro A. Estratégias para a valorização dos produtos tradicionais portugueses: o caso particular das proteções das denominações de origem, das indicações geográficas e dos nomes específicos. 1as Jornadas de Queijos e Enchidos; 3 Abril 1998; Porto, Portugal. p. 19-22.
- Règlement (UE) N° 1129/2011 DE LA COMMISSION du 11 novembre 2011 qui modifie l'annexe II du Règlement (CE) n° 1333/2008 du Parlement Européen et du Conseil pour établir une liste d'additifs alimentaires de l'Union Journal Officiel de l'Union européenne L 295 du 12.11.2011.
- Règlement (CE) n° 1333/2008 du Parlement Européen et du Conseil, du 16 décembre 2008, sur les additifs alimentaires. Disponible sur: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2008:354:0016:0016:FR:PDF>
- Freitas AC, Figueiredo P. Inibidores de Alterações químicas e Biológicas. En: Conservação de Alimentos. Lisboa; 2000. p. 50-2.
- Wirth F. La reducción y el no empleo de las sustancias de curado en los productos cárnicos. Fleischwirtsch 1993;1:3-9.
- Freire R. Informe Bioconservação de Alimentos. Proyecto Bioemprende, financiado por el programa POCTEP (Programa de Cooperação Transfronteiriça Espanha-Portugal 2007-13); 2010.
- Santoch VD. Evaluación de la calidad y composición química de la carne de res proveniente de animales de dos grupos de edad en Puerto Rico [tesis Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos]. Recinto universitario de Mayagüez (Puerto Rico): Univ Puerto Rico; 2006.
- Daeschel MA. Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservatives. Food Technol 1989;43:164-7.
- Klaenhammer TR. Bacteriocins of lactic acid bacteria. Biochimie 1988;70:337-49.
- Schillinger U, Lücke FK. Lactic acid bacteria as protective cultures in meat products. Fleischwirtsch 1990;70:1296-9.
- Smith JL, Palumbo SA. Use of starter cultures in meat. J Food Prot 1983;46:997-1006.
- Aymerich T, Martin B, Garriga M, Hugas, M. Microbial quality and direct PCR identification of lactic acid bacteria and nonpathogenic staphylococci from artisanal low-acid sausages. Appl Environ Microbiol 2003;69:4583-94.
- García T, Martín R, Sanz B, Hernández, PE. Extensión de la vida útil de la carne fresca. Sur: Envasado en atmósfera modificada y utilización de bacterias acidolácticas y bacteriocinas. Rev Española de Ciencia y Tecnología 1995;35(1):1-18.
- Vignolo G, Fadda S, Kairuz MN, Holgado AR, Oliver G. Control of *Listeria monocytogenes* in ground beef by lactocina 705, a bacteriocin produced by *Lactobacillus casei* CRL705. Int J Food Microbiol 1996;29:397-402.
- Chen H, Hoover DG. Bacteriocins and their food applications. Compr Rev Food Sci Food Saf 2003;22:82-100.
- Leroy F, De Vuyst L. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. Trends Food Sci Technol 2004;15:67-78.
- Gálvez A, Abriouel H, Lucas López R, Ben Omar N. Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. Int J Food Microbiol 2007;120:51-70.
- Bello BD, Rantsiou K, Belliob A, Zeppaa G, Ambrosolia R, Civerab T et al. Microbial ecology of artisanal products from North West of Italy and antimicrobial activity of the autochthonous populations. LWT Food Sci Technol 2010;43:1151-9.
- Sheman PM, Johnson-Henry KC, Yeung HP, Ngo PSC, Goulet J, Tomkins TA. Probiotics Reduce Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and Enteropathogenic *E. coli* O127:H6-Induced Changes in Polarized T84 Epithelial Cell Monolayers by Reducing Bacterial Adhesion and Cytoskeletal Rearrangements. Infect Immun 2005;73(8):5183-8.
- Fernández MF, Boris S, Barbés C. Probiotic properties of human lactobacilli strains to be used in the gastrointestinal tract. J App Microbiol 2003;94(3):449-55.
- Lee Y-K, Puong K-Y, Ouwehand AC, Salminen SJ. Displacement of bacterial pathogens from mucus and Caco-2 cell surface by lactobacilli. J Med Microbiol 2003;52:925-30.
- Hugo AA, Kakisu E, De Antoni GL, Pérez PF. Lactobacilli antagonize biological effects of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* in vitro. Lett J Appl Microbiol 2008;46(6):613-9.
- Ramiah K, Van Reenen CA, Dicks LMT. Surface-bound proteins of *Lactobacillus plantarum* 423 that contribute to adhesion of Caco-2 cells and their role in competitive exclusion and displacement of *Clostridium sporogenes* and *Enterococcus faecalis*. Res Microbiol 2008;159:470-5.
- Ingrassia I, Leplingard A, Darfeuille-Michaud A. *Lactobacillus casei* DN-114 001 inhibits the ability of adherent-invasive *Escherichia coli* isolated from Crohn's disease patients to adhere to and to invade intestinal epithelial cells. Appl Environ Microbiol 2005;71(6):2880-7.
- Jankowska A, Laubit D, Antushevich H, Zabielski R, Grzesiuk E. Competition of *Lactobacillus paracasei* with *Salmonella enterica* for adhesion to Caco-2 cells. J Biomed Biotechnol 2008;357964.
- Candela M, Perna F, Carnevali P, Vitali B, Ciati R, Gionchetti P et al. Interaction of probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains with human intestinal epithelial cells: adhesion properties, competition against enteropathogens and modulation of IL-8 production. Int J Food Microbiol 2008;125:286-92.

30. Golowczyc MA, Mobili P, Garrote GL, Abraham AG, De Antoni GL. Protective action of *Lactobacillus* kefir carrying S-layer protein against *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *Int J Food Microbiol* 2007;118:264-73.
31. Maragkoudakis PA, Zoumpopoulou G, Miaris C, Kalantzopoulos G, Pot B, Tsakalidou E. Probiotic potential of *Lactobacillus* strains isolated from dairy products. *Int Dairy J* 2006;16:189-99.
32. Collado MC, González A, González R, Hernández M, Ferrús MA, Sanz Y. Antimicrobial peptides are among the antagonistic metabolites produced by *Bifidobacterium* against *Helicobacter pylori*. *Int J Antimicrob Agents* 2005; 25:385-91.
33. Spinler JK, Taweechoitpatr M, Rognerud CL, Ou CN, Tumwasorn S, Versalovic J. Human-derived probiotic *Lactobacillus reuteri* demonstrate antimicrobial activities targeting diverse enteric bacterial pathogens. *Anaerobe* 2008;14:166-71.
34. Yang Y, Tao W-Y, Liu Y-J, Zhu F. Inhibition of *Bacillus cereus* by lactic acid bacteria starter cultures in rice fermentation. *Food Control* 2008;19:159-61.
35. Ghalfi H, Thonart P, Benkerroum N. Inhibitory activity of *Lactobacillus curvatus* CWBI-B28 against *Listeria monocytogenes* and ST2-verotoxin producing *Escherichia coli* O157. *Afr J Biotechnol* 2006;22:2303-6.
36. Todorov SD, Ho P, Vaz-Velho M. Optimisation of bacteriocin ST153Ch production by *Lactobacillus sakei* ST153Ch, strain isolated from salpicão, a traditional pork product from the north-west of Portugal. *J Biotechnol* [Internet] 2008;1(136):S735. Disponible sur: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2008.07.1752>
37. Todorov SD, Vaz-Velho M. Isolation and characterization of plantaricin ST8SH a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* ST8SH, strain isolated from Bulgarian salami. *J Biotechnol Supplement* [Internet];1(136):S735. Disponible sur: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2008.07.1751>
38. Todorov SD, Ho P, Franco BDGM, Vaz-Velho M. Effect of medium composition on the production of bacteriocin ST216Ch a strain of *Lactobacillus plantarum* isolated from Portuguese Chouriço. *Higiene Alimentar* 2009;23(170-171):352-3.
39. Todorov SD, Dicks LMT. *Lactobacillus plantarum* isolated from molasses produces bacteriocins active against Gram negative bacteria. *Enz Microbial Tech* 2005;36:318-26.
40. Gyoł SH, Min CY, Kyoung KH, Chul RY, Hoon LS, Chul KB. Tenderization and fragmentation of myofibrillar proteins in bovine longissimus dorsi muscle using proteolytic extract from *Sarcodon aspratus*. *LWT Food Sci Technol* 2008;41:1389-95.
41. Oliete B, Moreno T, Carballo JA, Monserrat L, Sánchez L. Estudio de la calidad de la carne de ternera de raza Rubia Gallega a lo largo de la maduración al vacío. *Arch Zootecnia* 2006;55(209):3-14.
42. Holzapfel WH, Geisen R, Schillinger U. Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes. *Int J Food Microbiol* 1995;24(3):343-62.
43. Rybka-Rodgers S. Improvement of food safety design of cook-chill foods. *Food Res Int* 2001;34(5):449-55.
44. Vignolo G, Fadda S. Starter cultures: Bioprotective cultures. En: Toldrá F, Hui Y, Astiasarán I, Nip W, Sebranek J, Silveira E et al, editores. *Handbook of fermented meat and poultry*. Oxford: Blackwell Publishing; 2007. p. 147-57.
45. Todorov SD, Franco BDGM, Tome E, Vaz-Velho M. Mode of action of bacteriocin ST5Ha on *Listeria ivanovii* subsp. *ivanovii* ATCC19119. CIBIA VII. Congreso Iberoamericano de Ingeniería de Alimentos. Integrando la Ingeniería de Alimentos con el Bienestar; 6-9 de septiembre 2009, Bogotá, Colombia. Comunicación oral. Book of Abstracts, Programa, Sección Biopreservación.
46. Ruiz-Moyano S, Martín A, Benito MJ, Nevado FP, Córdoba M de G. Screening of lactic acid bacteria and bifidobacteria for potential probiotic use in Iberian dry fermented sausages. *Meat Sci* 2008;80:715-21.
47. Albano H, Pinho C, Leite D, Barbosa J, Silva J, Carneiro L et al. Evaluation of a bacteriocin-producing strain of *Pediococcus acidilactici* as a biopreservative for Alheira a fermented meat sausage. *Food Control* 2009;20:764-70.
48. Sindt, RH, attorney. GRAS notice-exemption claim for specified uses of nisin [Internet]. Diciembre 2000 [cité 27 Juillet 2012]. Disponible sur: [http://www.accessdata.fda.gov/scripts/fcn/gras\\_notices/jrnoo65.pdf](http://www.accessdata.fda.gov/scripts/fcn/gras_notices/jrnoo65.pdf)
49. Todorov SD, Franco BDGM, Vaz-Velho M. Bacteriocin Producing Lactic Acid Bacteria From and for Production of Salami-like Products. *International Review of Food Science and Technology* 2009;57-61.
50. Vásquez SM, Héctor SM, Sandra ZB. Use of Antimicrobial Substances Produced by Acid Lactic Bacterias on Meat Conservation. *Rev Chil Nutr* 2009;36(1):64-71.
51. Moreira Do S, Wagner L. Aislamiento y caracterización parcial de una bacteriocina producidas por *pediococcus* sp 347 de origen cárnico [tesis doctoral]. Madrid, España: Departamento de Nutrición y Bromatología III, Univ Complutense de Madrid, Facultad de veterinaria; 1993.
52. Câmara Municipal de Mirandela [Internet]. Mirandela (Portugal): Câmara Municipal de Mirandela; 2012 [le 22 Juin 2012]. Disponible sur: [www.cm-mirandela.pt](http://www.cm-mirandela.pt)
53. Ferreira V, Barbosa J, Vendeiro S, Mota A, Silva F, Monteiro MJ et al. Chemical and microbiological characterization of alheira: A typical Portuguese fermented sausage with particular reference to factors relating to food safety. *Meat Sci* 2006;73:570-5.
54. Todorov SD, Ho P, Vaz-Velho M, Dicks LMT. Characterization of bacteriocins produced by two strains of *Lactobacillus plantarum* isolated from Beloura and Chouriço, traditional pork products from Portugal. *Meat Sci* 2010;84:334-43.
55. Ammor MS, Mayo B. Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as functional starter cultures in dry sausage production: An up-date. *Meat Sci* 2007;76:138-46.
56. Urso R, Rantsiou K, Cantoni C, Comi G, Coccolin L. Technological characterization of a bacteriocin-producing *Lactobacillus sakei* and its use in fermentation sausages production. *Int J Food Microbiol* 2006;110:232-9.
57. Bonomo MG, Ricciardi A, Zotta T, Parente E, Salzano G. Molecular and technological characterization of lactic acid bacteria from traditional fermented sausages of Basilicata region (Southern Italy). *Meat Sci* 2008;80:1328-48.