

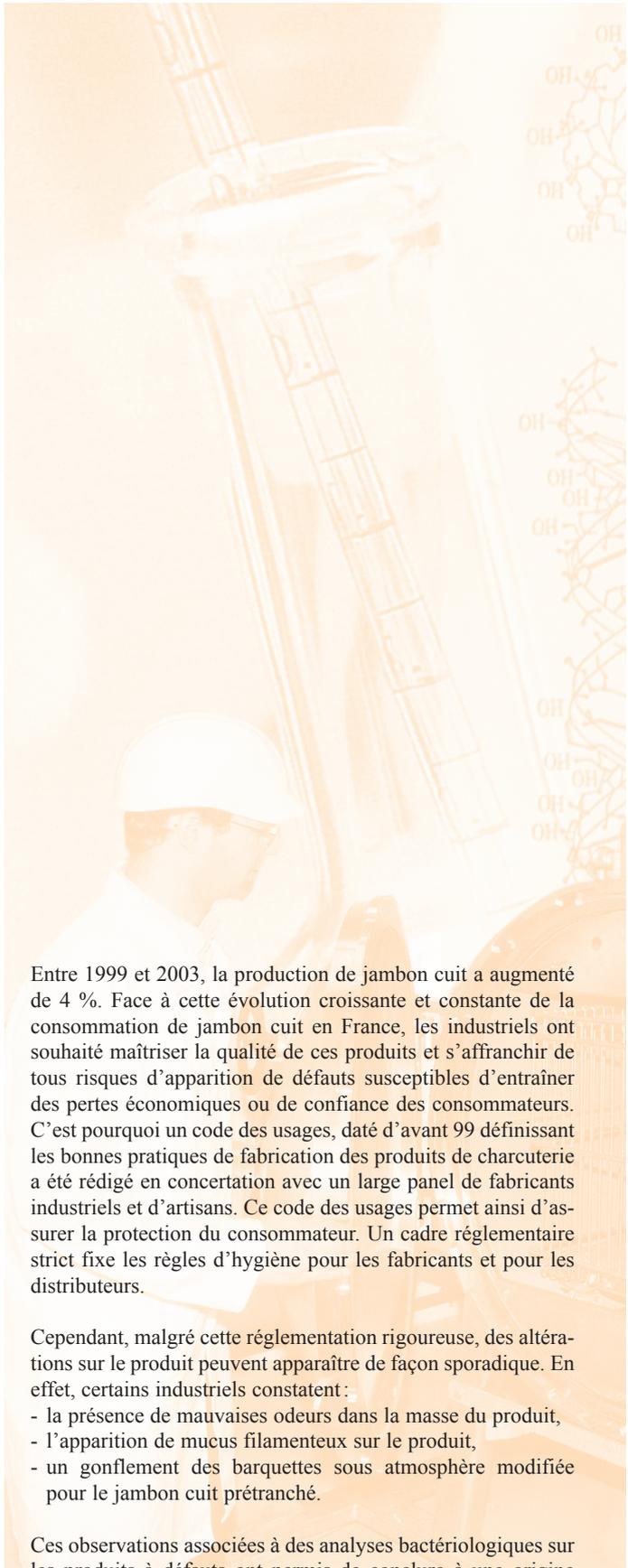
Jambon cuit supérieur

Identification des micro-organismes impliqués dans l'apparition des défauts

Les cahiers des charges mis en place par les salaisonniers pour maîtriser la qualité de leur production de jambon cuit fixent des règles d'hygiène drastiques pour les fabricants et les distributeurs. Cette réglementation rigoureuse n'empêche pas cependant l'apparition sporadique de défauts sur ces produits. Des analyses bactériologiques ont permis de conclure à une origine microbienne du phénomène d'altérations.

COPPET V.

ADIV
2 rue Chappe
63039 Clermont- Ferrand Cedex 2



Entre 1999 et 2003, la production de jambon cuit a augmenté de 4 %. Face à cette évolution croissante et constante de la consommation de jambon cuit en France, les industriels ont souhaité maîtriser la qualité de ces produits et s'affranchir de tous risques d'apparition de défauts susceptibles d'entraîner des pertes économiques ou de confiance des consommateurs. C'est pourquoi un code des usages, daté d'avant 99 définissant les bonnes pratiques de fabrication des produits de charcuterie a été rédigé en concertation avec un large panel de fabricants industriels et d'artisans. Ce code des usages permet ainsi d'assurer la protection du consommateur. Un cadre réglementaire strict fixe les règles d'hygiène pour les fabricants et pour les distributeurs.

Cependant, malgré cette réglementation rigoureuse, des altérations sur le produit peuvent apparaître de façon sporadique. En effet, certains industriels constatent :

- la présence de mauvaises odeurs dans la masse du produit,
- l'apparition de mucus filamenteux sur le produit,
- un gonflement des barquettes sous atmosphère modifiée pour le jambon cuit prétranché.

Ces observations associées à des analyses bactériologiques sur les produits à défauts ont permis de conclure à une origine microbienne du phénomène.

L'objectif de cette étude, en partenariat avec sept entreprises, a été d'identifier les germes responsables des défauts rencontrés par les industriels et de déterminer s'il existe une diversité des espèces microbiennes mises en cause dans ces altérations.

LES PRÉLÈVEMENTS ONT ÉTÉ ORGANISÉS SELON DEUX PÉRIODES

Au printemps :

de mai à juillet 2003.

En automne :

de septembre à novembre 2003.

Chaque entreprise a expédié cinq sachets de jambon cuit supérieur tranché dès leur fabrication et sous conditions réfrigérées.

Dès réception des produits et jusqu'à leur DLC, les échantillons ont été stockés à 8 °C, température correspondant à un réfrigérateur ménager ou à une chaîne du froid mal maîtrisée. Ceci dans le but de faire apparaître les défauts et d'analyser les germes développés.

Dans le cadre de cette étude, seule la flore lactique hétérofermentaire est recherchée rassemblant les *Lactobacillus* hétérofermentaires et les *Leuconostoc*.

LES ANALYSES BACTÉRIOLOGIQUES

Les échantillons et la suspension mère ont été préparés selon la norme Afnor NFV08-0102. Vingt-cinq grammes de chaque échantillon ont été prélevés de façon stérile et dilués au dixième dans de l'eau peptonnée tamponnée puis homogénéisés à l'aide d'un broyeur à palettes stomacher pendant 1 min à température ambiante.

La suspension mère ainsi obtenue a servi pour la réalisation d'une gamme de dilutions sérielles.

L'ensemencement sur boîte de Pétri est ensuite effectué selon les exigences imposées par la norme Afnor V 08-030. Les ensemencements sont réalisés sur une gélose Man, Rogosa et Sharpe en utilisant les dilutions décimales obtenues à partir de la suspension mère. Les boîtes de Pétri sont incubées à 30 °C pendant 48 à 72 h.

Après isolement des colonies d'aspects morphologiques différents (taille, couleur, surface, profondeur...), les tests d'hétérofermentation sont lancés sur cinq colonies pour distinguer les bactéries lactiques homofermentaires des bactéries lactiques hétérofermentaires.

Par définition, l'hétérofermentation est la capacité des bactéries lactiques à produire des molécules différentes du lactate telles que le CO₂, l'acétate, l'éthanol... à partir du sucre.

Ces tests consistent à repiquer une colonie donnée dans un tube de bouillon MRS contenant au préalable une cloche de Durham. Après ensemencement de la colonie, le bouillon est recouvert de

paraffine et l'ensemble est mis à incuber à 30 °C. Les tubes sont observés pendant 3 à 5 jours en fonction de l'aspect du milieu (trouble), le décollement de la paraffine, et le dégagement gazeux dans la cloche.

Les souches qui ont donné un résultat positif à ces observations ont été retenues.

Elles ont été repiquées sur milieu MRS afin de s'assurer de la pureté des cultures pour ensuite constituer une échantillonnage. La conservation de ces souches se fait sur cryobilles qui sont conservées à -20 °C avant leur analyse moléculaire.

Chaque souche, conservée à -20 °C, est décongelée, repiquée sur milieu MRS liquide. Les extractions d'ADN sont réalisées sur colonne de silice. Les extraits d'ADN ainsi purifiés permettront d'effectuer :

- le typage moléculaire par REP-PCR (Polymerase Chain Reaction) en présence d'amorces consensuelles, homologues d'éléments répétés des génomes. Les empreintes ont été comparées par analyse bio-informatique. Ainsi, 267 empreintes ont été obtenues et comparées en utilisant l'algorithme UPGMA (Unweighted Pair Group Method using Arithmetic Averages), associé au coefficient de Pearson. Ces isolats à identifier ont été sélectionnés selon un seuil de 80 % d'homologie entre les empreintes ;

- les identifications par séquençage du gène codant pour l'ARN ribosomique 16S (ADNr) avec une comparaison des séquences obtenues aux banques de données internationales. Au total, 189 identifications ont été réalisées.

L'APPARITION DES DÉFAUTS SUIT UNE CERTAINE CHRONOLOGIE

Les conditions de stockage définies précédemment sont synonymes de conditions accélérées de vieillissement. Ce mode de stockage a permis d'observer différentes altérations avec une certaine chronologie entre la date de fabrication et la DLC du produit, c'est-à-dire jusqu'à 35 jours de stockage, les défauts suivants ont été observés :

- J5 à J7 : apparition d'exsudation,
- J8 à J12 : apparition sur le produit de reflets roses, verts ou nacrés,
- J12 : début du gonflement des sachets,
- J13 : apparition d'un jus clair,
- J14 à J25 : apparition de tâches blanches en surface du produit,

- J26 à J35 : accroissement du gonflement des sachets, de l'exsudation et le jus clair devient laiteux.

Ces défauts recensés dans cette étude présentent des similitudes avec les accidents de fabrication et/ou les produits altérés couramment reçus dans les laboratoires d'analyses.

Bien que les conditionnements sous-vide ou sous atmosphère modifiée soient communément utilisés pour permettre aux produits frais à base de viande une meilleure durée de vie (5), ils permettent le développement de micro-organismes qui peuvent être à l'origine de défauts.

ISOLEMENT DES BACTÉRIES RESPONSABLES DES DÉFAUTS : UNE DIVERSITÉ CONFIRMÉE

Les travaux de Borch et al. (1) recensent les bactéries capables de se développer et d'entraîner une altération des viandes ou des produits à base de viande (de bœuf ou de porc) cuite ou crue quelque soit le mode de conditionnement utilisé (sous-vide, sous atmosphère modifiée...).

Le nombre et la nature des espèces lactiques isolées des produits à défauts sont variables. La contamination indésirable peut être liée à une seule espèce bactérienne mais dans la plupart des cas, un mélange de *Lactobacillus spp* et de *Leuconostoc spp* est retrouvé. Cette diversité des bactéries, isolées des produits altérés, a été confirmée par plusieurs travaux (2, 3 et 4).

Dans cette étude, dès l'apparition des défauts, la flore lactique a été dénombrée sur milieu sélectif. Au total, 250 analyses ont été effectuées pour la première période de prélèvements et 161 pour la seconde période. Les dénombrements respectifs obtenus sont présentés dans les figures ci-après.

Les analyses effectuées après les deux campagnes de prélèvements, printemps et automne, montrent une contamination homogène en flore lactique pour chaque entreprise. Le facteur saison ne semble pas jouer un rôle sur le nombre total de cette flore, car à la DLC des produits et quelle que soit la période de prélèvement, la concentration en flore lactique varie entre 10⁷ et 10⁸ germes par gramme de jambon stockés à +8 °C (figure 1).

Après le dénombrement, l'isolement des colonies caractéristiques de *Lactobacillus* sur milieu MRS ainsi que les tests d'hétérofermentation ont été réalisés. Les résultats obtenus sont illus-



Science et
Technique



trés dans la figure 2. Ils montrent une hétérogénéité des pourcentages de *Lactobacillus* hétérofermentaires obtenus pour chaque entreprise et en fonction des saisons.

La figure 3 confirme cette observation où deux groupes d'entreprises se démarquent en fonction des deux périodes de campagne de prélèvements. Le premier groupe recense les entreprises A, E et F où on observe une augmentation des pourcentages des *Lactobacillus* hétérofermentaires en automne. Le second groupe rassemble les entreprises B, C et D où contrairement au premier groupe, les pourcentages diminuent en automne.

Quant à l'entreprise G, qui forme un groupe à part, seuls cinq sachets de jambons cuits ont été envoyés lors de la première campagne de mesures. Les résultats obtenus n'ont pu être exploités et sont donnés à titre indicatif.

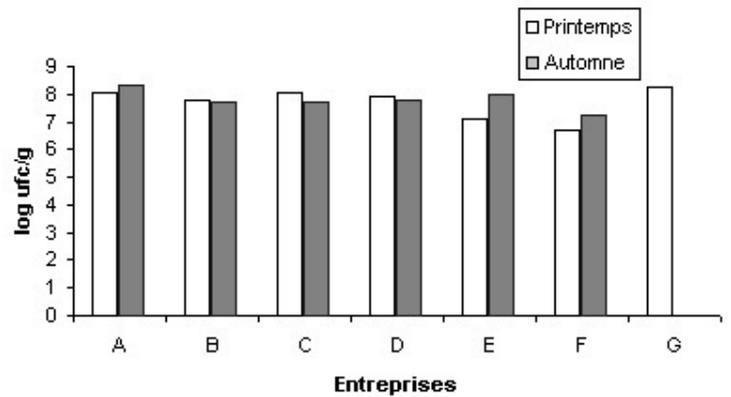
Cette phase de dénombrement et d'isolement a permis de confirmer que c'est la flore lactique hétérofermentaire qui se trouve être majoritaire dans ce type de produit, si les conditions de stockage et de conservation ne sont pas respectées. Cette étape d'isolement a donc permis de définir deux groupes d'entreprises. Compte tenu du caractère saisonnier des dénombrements, ces groupes laissent supposer l'existence d'au moins deux ou plusieurs espèces d'altérations. Cette diversité sera confirmée par les analyses moléculaires effectuées dans la seconde partie de l'étude.

IDENTIFICATION DES ESPÈCES INCRIMINÉES: LE GENRE *LEUCONOSTOC* PRÉDOMINE

Le tableau 1 résume la proportion de souches identifiées toutes entreprises et toutes saisons confondues. Il montre que 70 % des souches isolées appartiennent au genre *Leuconostoc*. Les *Lactobacillus* représentent moins de 10 % des souches identifiées et les 18,9 % s'apparentent à d'autres espèces non identifiées par la méthode moléculaire employée. Des résultats similaires ont été observés par d'autres auteurs (5 et 6). Parmi les *Leuconostoc* majoritairement isolés, deux espèces ont été identifiées comme étant les espèces d'altération majoritaires dans les jambons analysés. Il s'agit de *Leuconostoc carnosum* (49 %) et de *Leuconostoc mesenteroides* (18 %).

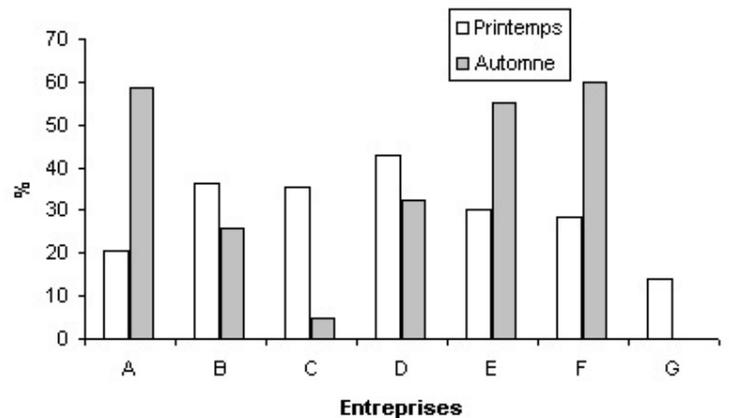
Cette étude montre que le genre/espèce de bactéries lactiques responsables des altérations dépend de la composition du produit et de l'entreprise (7). Les résultats

Figure 1 : LE FACTEUR SAISON A PEU D'INFLUENCE SUR LA FLORE LACTIQUE

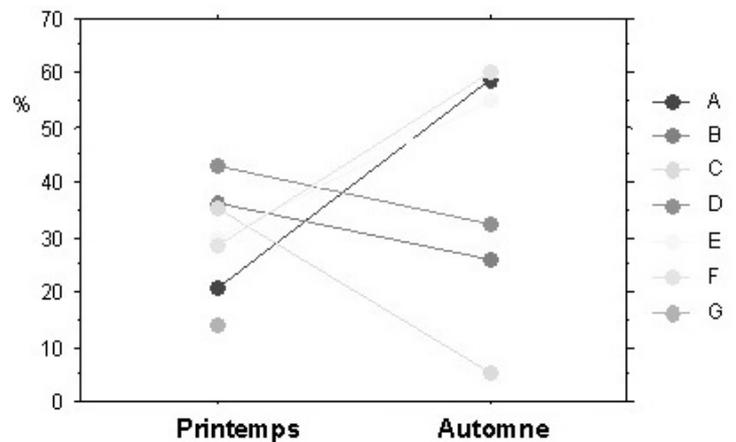


Dénombrement de la flore lactique sur milieu MRS (log ufc/g) par entreprises

Figures 2 ET 3 : DEUX GROUPES D'ENTREPRISES SE DÉMARQUENT EN FONCTION DE DEUX PÉRIODES DE PRÉLÈVEMENTS



Pourcentage des lactobacilles hétérofermentaires isolés



Contamination des jambons cuits par les *Lactobacillus* hétérofermentaires dans les différentes entreprises en fonction des saisons



Tableau 1 : 70% DES SOUCHES ISOLÉES APPARTIENNENT AU GENRE *LEUCONOSTOC*

Entreprises	Saisons	<i>Leuconostoc</i>				<i>Lactobacillus</i>			<i>Hafnia alvei</i>	Souches identifiées	Souches non identifiées	Total
		<i>Lc carnosum</i>	<i>Lc mesenteroides</i>	<i>Lc citreum</i>	<i>Lc gasomitatum</i>	<i>Lb sakei</i>	<i>Lb brevis</i>	<i>Lb paraplantarum</i>				
A	Printemps	6	4			1				11	0	11
	Automne	22		1		2				25	0	25
B	Printemps	25	23	2	1	6				57	4	61
	Automne	19	3			1				23	5	28
C	Printemps	4				1				5	0	5
	Automne					1				1	2	3
D	Printemps	25	4			6				35	1	36
	Automne	8								8	1	9
E	Printemps		1			1	2	1		5	1	6
	Automne	3	2	4					1	10	7	17
F	Printemps	2	4							6	6	12
	Automne	1								1	15	16
G	Printemps				1	1				2	2	4
	Automne									0	0	0
Total		115	41	7	2	20	2	1	1	189	44	233
%		49,35	17,59	3	0,85	8,60	0,85	0,43	0,43	81,1	18,9	100
% (par espèces identifiées)				70,80			9,87		0,43		18,9	100

Récapitulatif des identifications moléculaires (en nombre d'identification) pour chaque entreprise et en fonction des saisons

tats montrent une diversité inter-spécifique restreinte dont de nombreux isolats présentent des profils REP-PCR différents et appartenant à l'espèce *Leuconostoc carnosum* (tableau 1).

Une étude de Cai et al. (6) s'est orientée sur l'origine bactérienne des altérations des jambons cuits où les différents micro-organismes isolés s'apparentaient à des bactéries hétérofermentaires, capables de se développer à de basses températures. De plus, l'analyse des séquences de l'ADNr 16S a montré que ces organismes sont principalement représentés par *Leuconostoc carnosum*, base de l'arbre phylogénique. Dans cette même étude, les hybridations ADN-ADN obtenues attestent que tous les groupes de *Leuconostoc* issus du jambon présentent 88,8 % d'homologie de l'ADN, démontrant ainsi que ces groupes composent une seule espèce assignée à *Leuconostoc gelidium*, identifiée en tant qu'espèce dominante d'altération des produits.

Au cours de notre programme, *Leuconostoc carnosum* (49 %) a été identifié comme étant l'organisme majeur de l'altération des jambons. *Leuconostoc mesenteroides* est également impliqué dans les altérations des jambons, à 18 % (tableau 1). Ces résultats

vont dans le même sens que ceux obtenus par Cai et al. et aussi par d'autres études. Ainsi dans une étude réalisée par Björkroth et al. (5), où *Leuconostoc carnosum* a également été identifié comme étant le germe responsable des altérations des jambons cuits, conditionnés, ici, sous vide.

Ces mêmes auteurs se sont intéressés comme nous à la contamination des entreprises et ont pu constater que *Leuconostoc carnosum* de type A est la bactérie dominante de la microflore des matières premières de porc.

Par ailleurs, les *Leuconostoc spp* sont des micro-organismes d'altération spécifiques des produits transformés à base de viande (bœuf, porc, volaille) ou de poissons. Les études précédemment citées ainsi que les résultats obtenus au cours de ce programme ont conclu à une contamination du jambon cuit, donc du porc, par *Leuconostoc carnosum* et *Leuconostoc gelidium* taxonomiquement très proches.

UNE DIVERSITÉ DES ESPÈCES

Les figures 4a et 4b illustrent la proportion (%) des espèces dominantes identifiées pour chaque entreprise et en fonction des saisons.

Les deux figures 4a et 4b montrent que l'espèce *Leuconostoc carnosum* est majoritaire au printemps et à l'automne. Quant à *Leuconostoc mesenteroides*, elle est présente au printemps mais pas pour toutes les entreprises. Cette dernière est minoritaire en automne.

Le typage moléculaire a permis de mettre en évidence une conservation des séquences « répétées » au sein d'une même espèce avec cependant des variations infra-spécifiques.

Ainsi la comparaison des séquences obtenues aux banques de données internationales a montré une diversité inter-spécifique restreinte où les isolats appartiennent pour 49 % à l'espèce *Leuconostoc carnosum* et pour 18 % à l'espèce *Leuconostoc mesenteroides*.

Ces deux espèces *Leuconostoc carnosum* et *Leuconostoc mesenteroides* sont majoritairement représentées, mais différemment selon les saisons. En effet, pour les entreprises A, B, C, D et F, *Leuconostoc carnosum* est majoritaire au printemps, mais se retrouve majoritaire à l'automne uniquement pour les entreprises A, B et D. De même, pour *Leuconostoc mesenteroides*, on la retrouve au printemps pour les entreprises B, D, E et F; mais apparaît uni-

quement en automne dans les entreprises B et E. (figures 4 a et b). Les figures 4a et 4b montrent qu'il existe une diversité entre les entreprises plus marquée au printemps par rapport à l'automne où *Leuconostoc carnosum* reste majoritaire.

CONCLUSION

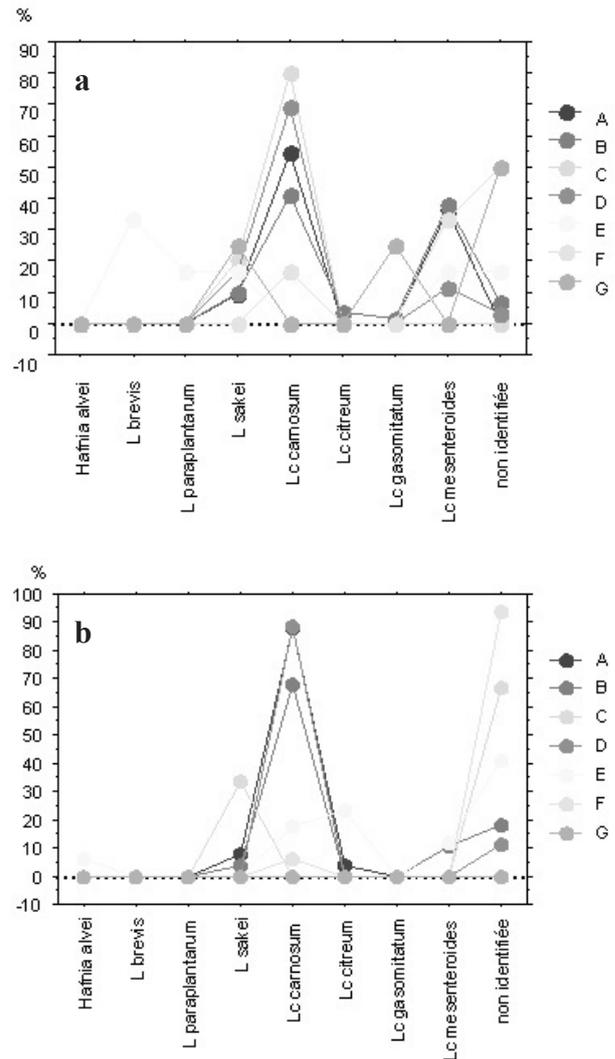
Le principal objectif de cette étude a été d'identifier les bactéries responsables des défauts observés sur les jambons cuits en les plaçant dans des conditions favorables au développement bactérien (stockage régulé à +8 °C). Cette étude nous a permis de confirmer le rôle des bactéries lactiques hétérofermentaires dans l'altération du produit et surtout d'identifier les espèces majoritaires. Ce travail a en effet permis de mettre en évidence que les *Leuconostoc* sont impliquées dans l'altération des jambons cuits, plus particulièrement les espèces *Leuconostoc carnosum* et *Leuconostoc mesenteroides*.

Grâce à ces identifications, il semblerait intéressant de compléter les résultats obtenus. En effet, afin de s'assurer et de garantir la responsabilité des *Leuconostoc* et, notamment des deux espèces *Leuconostoc carnosum* et *Leuconostoc mesenteroides*, il serait intéressant de compléter cette étude en reproduisant les défauts par ensemencement de deux souches isolées, sur des cubes de jambon cuit stériles soumis à un stockage sous vide à +8 °C.

L'origine de la contamination pourrait être recherchée en effectuant des prélèvements sur les produits aux différentes étapes du process, des prélèvements de surface sur les matériels et les opérateurs, également des prélèvements d'intrants, c'est-à-dire l'eau, l'air, la saumure, les additifs... Ainsi les données obtenues permettraient de connaître plusieurs éléments concernant ces deux germes d'altération étudiés soit :

- l'origine de la contamination (matière

Figures 4a et b : *LEUCONOSTOC CARNOSUM* PRÉDOMINE AU PRINTEMPS ET EN AUTOMNE. X PÉRIODES DE PRÉLÈVEMENTS



Pourcentage des espèces identifiées en fonction des entreprises et des saisons : printemps (a) et automne (b)

- re première, matériel, personnel...),
- les facteurs technologiques d'apparition (corrélation au process),
- a thermorésistance.

En effet, face aux accidents technologiques, deux cas de figure peuvent se présenter :

- soit la ou les bactéries sont thermorésistantes et la contamination

- peut avoir lieu avant cuisson,
- soit la ou les bactéries ne sont pas thermorésistantes et la contamination se déroule au cours des étapes de déballage/reconditionnement.

B I B L I O G R A P H I E

BORCH E., KANT-MUERMANS M.L., BLIXT Y., 1996. Bacterial spoilage of meat and cured meat products. *Int. J. Food Microbiol.* 33, 103-120.

KORKEALA H., ALANKO T., MÄKELÄ P., LINDROTH S. 1989. Shelf-life of vacuum-packed cooked ring sausages at different chill temperatures. *Int. J. Food Microbiol.* 9, 237-247.

VON HOLY A., CLOETE T., HOLZAPFEL W., 1991. Quantification and characterization of microbial population associated with spoiled vacuum-packaged vienne sausages. *Food Microbiol.* 8, 95-104.

YANG R., RAY B., 1994. Prevalence and biological control of bacteriocine-producing psychotropic *Leuconostoc* associated with spoilage of vacuum-packaged processed meats. *J. Food Prot.* 57, 209-217.

BJÖRKROTH J., VANDAMME P., KORKEALA H., 1998. Identification and characterization of *Leuconostoc carnosum* associated with production and spoilage of vacuum-packaged, sliced, cooked ham. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 3313-3319.

CAI Y., BENNO Y., TAKEDA A., YOSHIDA T., ITAYA T., NAKASA T., 1998. Characterization of *Leuconostoc* species isolated from vacuum-packaged ham. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 44, 153-159.

KORKEALA H., MÄKELÄ P., 1989. Characterization of lactic acid bacteria isolated from vacuum-packed cooked ring sausages. *Int. J. Food. Microbiol.* 9, 33-43.