



L'objectif majeur du projet européen Tradisauusage (<http://www.clermont.inra.fr/tradisauusage>) était d'évaluer puis d'améliorer la sécurité des saucissons secs fermiers tout en préservant leur typicité. L'amélioration de la sécurité passe par l'obtention de produits répondant aux normes sanitaires et par une diminution de la quantité d'amines biogènes, souvent présentes naturellement dans les produits fermentés. Le maintien de la typicité des produits suppose de ne pas modifier leurs qualités sensorielles. La sécurité du produit est liée à l'absence d'une microflore pathogène et à la limitation de la microflore d'altération. La qualité sensorielle est liée à la présence de la microflore d'intérêt technologique. Leroy et al. (2006b) ont identifié des microflores d'intérêt technologique différentes selon les ateliers. Néanmoins, les espèces majoritairement isolées étaient *Lactobacillus sakei*, *Staphylococcus succinus* et *Staphylococcus equorum*.

Avec l'objectif d'améliorer la sécurité et de maintenir la typicité, nous avons choisi de fabriquer des saucissons secs en ajoutant dans la mûlée des ferments isolés de l'atelier lui-même. Ainsi, trois souches appartenant aux trois espèces, *L. sakei*, *S. succinus* et *S. equorum*, ont été ajoutées comme ferments lors d'une fabrication en condition réelle dans l'atelier fermier. Une fabrication témoin sans ferment a été préparée avec la même mûlée afin d'observer les modifications liées à la présence des ferments.

Saucissons secs fermiers du Massif central

Développement d'un ferment indigène pour améliorer la sécurité et maintenir la typicité des saucissons

La fabrication d'un saucisson fermier a été modifiée par l'ajout de trois ferments (*Lactobacillus sakei*, *Staphylococcus succinus* et *Staphylococcus equorum*) isolés de l'atelier. Les deux objectifs fixés ont été atteints : (1) amélioration des qualités sanitaires en réduisant la microflore pathogène et les entérocoques, en diminuant la teneur en amines biogènes et l'oxydation des lipides ; (2) maintien des qualités sensorielles et de la typicité des produits.

LEBERT I. ⁽¹⁾, LEROY S. ⁽¹⁾, LEBECQUE A. ⁽²⁾,
CHACORNAC J.-P. ⁽¹⁾, TALON R. ⁽¹⁾

⁽¹⁾ INRA, Centre de Clermont-Ferrand Theix, Unité de Microbiologie, 63122 SAINT-GENÈS CHAMPANELLE, France

⁽²⁾ Enita de Clermont-Ferrand, UR Typicité des produits alimentaires, 63 370 LEMPDES, France

MATÉRIEL ET MÉTHODES

L'étude a été réalisée dans l'atelier fermier F08 situé dans le Massif central. Cet atelier est épisodiquement contaminé par *Listeria monocytogenes*. L'évaluation des microflores microbiennes présentes dans les produits de cet atelier ainsi que le procédé de fabrication ont été présentés dans l'étude de Lebert et al. (2006).

La mêlée a été divisée en deux lots. La fermentation du premier lot témoin a été menée de façon traditionnelle, c'est-à-dire, à partir de la microflore présente dans la mêlée. Dans le deuxième lot ensemencé, du saccharose à 5 g/kg et des ferments ont été ajoutés. L'ajout de saccharose avait pour but de stimuler le développement des ferments. Les ferments étaient composés d'un mélange de trois souches *Lactobacillus sakei* F08F202, *Staphylococcus equorum* F08bF15 et *Staphylococcus succinus* F08bF19, qui ont été isolées des saucissons fermiers produits dans l'atelier F08. Chaque souche a été ajoutée à une concentration de 10^6 bactéries par gramme de mêlée. Les deux lots ont subi une fermentation deux jours à 20 °C et un séchage de 52 jours à 12 °C, selon le procédé habituellement suivi par l'atelier.

Les trois produits (mêlée, produit fermenté et produit final) de chaque lot ont été analysés pour la microflore pathogène et les six microflores (*Staphylococcus* et *Kocuria*, bactéries lactiques, entérobactéries, *Pseudomonas*, levures/moisissures et entérocoques). Les méthodes et les milieux de dénombrements ont été présentés par Lebert et al. (2006).

Suivi de l'implantation des ferments

Pour contrôler la présence des ferments, aux trois stades de fabrication, 30 colonies bactériennes ont été prélevées sur le milieu gélosé MRS (bactéries lactiques) et 30 sur le milieu MSA (*Staphylococcus* et *Kocuria*). Dans un premier temps, les colonies ont été identifiées au niveau de l'espèce par PCR spécifiques de *S. equorum* (Blaiotta et al., 2004), de *S. succinus* (Leroy et al. 2006a) et de *L. sakei* (Berthier et Ehrlich, 1998). Dans un deuxième temps, une fraction des souches a été caractérisée par PFGE (électrophorèse en champ pulsé) selon le protocole décrit par Morot-Bizot et al. (2003).

Analyses biochimiques

L'analyse des amines biogènes a été réalisée sur les échantillons aux trois stades de fabrication sur les deux lots de viande avec la méthode de Hernández-Jover et al. (1996). Chaque échantillon a été également analysé pour l'oxydation des lipides (oxydation des acides gras et du cholestérol), la composition en acides gras, les teneurs en NaCl, en eau, en azote, en protéine et en cendres.

Analyse sensorielle

Les saucissons des deux lots ont été analysés par un jury comprenant neuf assesseurs. Ces derniers ont généré 26 descripteurs pour caractériser les saucissons : 4 pour l'apparence des tranches, 9 pour l'odeur, 7 pour la flaveur et 6 pour la texture. L'intensité des descripteurs a été notée sur une échelle de 0 à 9. Chaque produit final a été évalué 4 fois par le jury.

RÉSULTATS

Une amélioration des qualités microbiologiques tout en maintenant les caractéristiques de pH et d'Aw

Dans le lot témoin, la microflore d'intérêt technologique (bactéries lactiques et staphylocoques) avait un niveau initial de 4,0 log UFC/g (tableau 1). La population a augmenté jusqu'à 5,5 log UFC/g pendant la fermentation puis 6,6 log UFC/g en fin de séchage.

Dans la mêlée du lot ensemencé, la population de bactéries lactiques et de staphylocoques était conforme à l'inoculât, c'est-à-dire 6,0 log UFC/g. Les bactéries lactiques ont

ensuite augmenté de 2,0 log pendant la fermentation et de 1,0 log pendant le séchage. Les staphylocoques ont augmenté de 1,0 log pendant la fermentation pour revenir à leur niveau initial en fin de séchage.

Les entérobactéries ont augmenté pendant la fermentation puis diminué de 2,5 log UFC/g pendant le séchage, le niveau final étant plus bas dans le lot ensemencé (tableau 1). Les *Pseudomonas* ne se sont pas développés pendant la fermentation en restant à un niveau entre 4,5-5,0 log UFC/g, leur quantité a diminué de plus de 1,0 log pendant le séchage. Les entérocoques n'ont pas cessé de croître dans le lot témoin et leur niveau est passé de 2,0 à 6,2 log UFC/g entre

la mêlée et le produit final. L'ajout de ferments a fortement inhibé la croissance des entérocoques pendant la fermentation. Toutefois, pendant le séchage, leur niveau a augmenté mais sans dépasser 4,2 log UFC/g (tableau 1). *L. monocytogenes* n'a pas été dénombrée dans la mêlée des deux lots. Dans le lot témoin, *L. monocytogenes* a atteint un niveau supérieur à la norme autorisée qui est fixée à 2,0 log UFC/g. Par contre son niveau est resté stable dans le deuxième lot sans dépasser la norme.

Le pH et l'Aw du produit final étaient similaires dans les deux lots.

TABLEAU 1
L'AJOUT DE SACCHAROSE ET DES FERMENTS ISOLÉS DE L'ATELIER F08 AMÉLIORE LA QUALITÉ HYGIÉNIQUE ET LIMITE LE DÉVELOPPEMENT DE *L. MONOCYTOGENES*

Lot	Stade	Temps (j)	LM	LACT	STAPH	ENTC	ENTB	PSEU	<i>L. monocytogenes</i>	pH	Aw
Témoin	Mêlée	0	3,7	4,1	3,5	2,0	3,0	4,5	< 1,0	5,6	0,966
	Fermenté	2	4,2	5,1	5,5	3,1	5,1	4,6	1,1	5,9	0,962
	Final	52	4,2	6,6	6,6	6,2	2,8	3,0	2,7	6,9	0,841
Ensemencé	Mêlée	0	4,2	6,3	6,3	2,0	3,1	4,6	< 1,0	5,6	0,964
	Fermenté	2	4,3	8,0	6,9	1,2	4,6	4,9	1,0	5,6	0,966
	Final	52	4,1	8,8	6,1	4,2	2,0	3,5	1,1	6,7	0,867

Données exprimées en log UFC/g (Unité Formant Colonie): limite de détection pour *L. monocytogenes*: 1,0 log UFC/g
LM, Levures et moisissures; LACT, bactéries lactiques; STAPH, *Staphylococcus* et *Kocuria*; ENTC, *Enterococcus*; ENTB, *Enterobacteriaceae*; PSEU, *Pseudomonas*.

Tableau 2
LES FERMENTS ISOLÉS DE L'ATELIER F08 S'IMPLANTENT BIEN DANS LE PRODUIT
JUSQU'AU STADE FINAL

Lot	Stade	Nombre de staphylocoques isolés	Nombre de staphylocoques identifiés par PCR (1)		Nombre de bactéries lactiques isolés	Nombre de bactéries lactiques identifiées par PCR (2)
			<i>S. equorum</i>	<i>S. succinus</i>		
Témoin	Mêlée	29	17	0	30	0
	Fermenté	26	20	6	16	0
	Final	30	13	15	30	0
Ensemencé	Mêlée	30	24	6	30	30
	Fermenté	30	22	7	24	24
	Final	30	23	6	30	30

(1) par rapport au nombre de staphylocoques isolés.

(2) par rapport au nombre de bactéries lactiques isolées.

Une bonne implantation des ferments ajoutés dans le lot ensemencé

L'identification par PCR a montré la présence de *S. equorum* et *S. succinus* dans les deux lots pendant tout le procédé de fabrication (tableau 2). L'espèce *S. equorum* domine généralement l'espèce *S. succinus*. Le ratio *S. equorum*/*S. succinus* reste stable avec 4 *S. equorum* pour 1 *S. succinus* dans le lot ensemencé. Aucun *L. sakei* n'a été isolé dans le lot témoin aux trois stades de fabrication. Par contre, cette espèce s'est bien implantée dans le lot ensemencé puisqu'elle est présente jusqu'au stade final (tableau 2).

Pour s'assurer que les souches identifiées par PCR étaient bien celles inoculées dans la mûlée, des profils de PFGE ont été réalisés sur chacune des souches (tableau 3). Les quatre isolats de *L. sakei* aux trois stades de fabrication avaient un profil similaire à celui de la souche ensemencée, ce qui confirme que la souche ensemencée était dominante pendant le procédé. Les souches des deux espèces de staphylocoques ensemencées ont bien été isolées dans la mûlée et dans le produit fermenté. Par contre, dans le produit final, toutes les souches ne correspondaient pas aux souches ensemencées, puisque quelques souches avaient un profil PFGE différent.

L'ajout de ferments contribue à diminuer la teneur en amines biogènes et l'oxydation des lipides

Les saucissons produits dans cet atelier montrent, comme dans l'étu-

Tableau 3
LES PROFILS PFGE ONT ÉTÉ RÉALISÉS
SUR CHACUNE DES SOUCHES

Ferments	Mêlée	Produit fermenté	Produit final
<i>L. sakei</i>	4a/4b	4 / 4	4 / 4
<i>S. equorum</i>	4 / 4	4 / 4	2 / 4
<i>S. succinus</i>	4 / 4	4 / 4	3 / 4

Les profils PFGE confirment l'implantation de *L. sakei* jusqu'au stade final et des deux *Staphylococcus* jusqu'au stade fermenté

^a nombre d'isolats ayant le même profil PFGE que la souche inoculée.

^b nombre d'isolats étudiés.

Tableau 4
L'AJOUT DE FERMENTS ISOLÉS DE L'ATELIER A PERMIS DE
DIMINUER LES TENEURS EN AMINES BIOGÈNES

Lot	Tyramine	Putrescine	Cadavérine	Histamine
Témoin	58,8	26,3	313,0	6,3
Ensemencé	7,7	19,2	203,0	3,9

Teneur en amine biogène exprimée en mg/kg matière sèche

de Lebert et al. (2006), des teneurs élevées en cadavérine qui sont liées à des populations fortes en entérobactéries. L'ajout de ferments a réduit la quantité de cadavérine (réduction de 35 %) et de la putrescine (réduction de 27 %) dans les produits finaux (tableau 4). L'ajout de ferments a été utile pour contrôler la microflore productrice de tyramine, puisque l'accumulation de cette amine a été réduite de 87 % par rapport au lot témoin. Ces résultats montrent l'importance des pratiques d'hygiène et le contrôle de la microflore d'altération pendant le procédé.

La composition en acide gras (saturés, monoinsaturé et polyinsaturés) était similaire entre les deux lots. Une réduction de l'oxydation

des lipides est observée dans le lot ensemencé, et en particulier l'oxydation du cholestérol qui est réduite de 23 % (tableau 5). Peu de différences ont été observées sur les analyses biochimiques (tableau 5).

L'ajout de ferments isolés de l'atelier maintient la typicité du produit

La typicité des saucissons fermiers est associée à l'odeur et à la saveur du produit. La présence de ferments a modifié la texture, elle se traduit par des saucissons ayant une meilleure tenue de tranche, moins cassants et moins "troués". L'ajout de ferment n'a pas eu d'effet sur la typicité du produit puisque les caractéristiques de saveur et d'odeur sont similaires entre les deux lots (figure 1).

Tableau 5 : L'AJOUT DE FERMENTS DIMINUE L'OXYDATION DES LIPIDES

Analyse	Témoin	Ensemencé
Analyses biochimiques		
Humidité (%)	32,9 ± 0,2	39,2 ± 0,3
Protéines (%)	35,4 ± 0,5	32,6 ± 1,0
Gras (%)	24,7 ± 0,2	22,3 ± 0,4
Cendre (%)	8,6 ± 0,1	7,21 ± 0,04
NaCl (%)	6,7 ± 0,5	5,3 ± 0,6
Oxydation des lipides		
TBARS (mgMDA/kg)	0,714 ± 0,014	0,614 ± 0,052
Cholestérol (mg/100g)	162 ± 10	124 ± 8
7βhydroxy (mg/kg)	0,50 ± 0,10	0,30 ± 0,13
5,6 αepoxy (mg/kg)	1,19 ± 0,45	n.d.
7keto (mg/kg)	2,88 ± 0,60	0,57 ± 0,05
25-hydroxy (mg/kg)	0,19 ± 0,05	0,08 ± 0,01
Total cholestérol oxides (mg/kg)	4,75 ± 0,85	0,95 ± 0,10
% cholestérol oxydé	0,30 ± 0,06	0,08 ± 0,01

Moyenne ± écart-type. n.d. = inférieur aux limites de détection.
En orange, valeurs significativement différentes

L'AJOUT DES FERMENTS ISOLÉS DE L'ATELIER A RÉPONDU À L'OBJECTIF FIXÉ

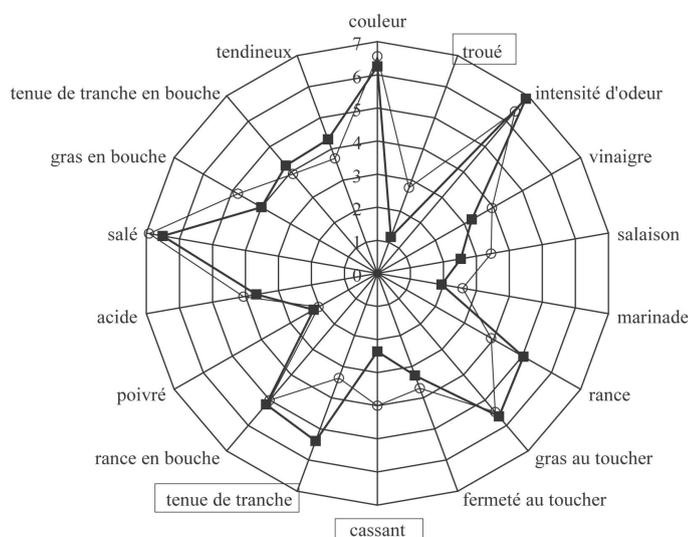
L'objectif de ce travail était de valider un procédé pour améliorer la qualité sanitaire des produits en l'appliquant à un producteur fermier. La stratégie retenue dans cette étude a été d'inoculer la mèche avec des ferments préalablement isolés de l'atelier.

L'ajout des ferments a répondu aux deux objectifs fixés :

- l'amélioration des qualités sanitaires par une réduction de la microflore pathogène et des entérocoques et par une diminution de la teneur en amines biogènes et de l'oxydation des lipides ;
- le maintien des qualités sensorielles du saucisson sec par le maintien de leur typicité.

L'ajout de ferments isolés et spécifiques d'un atelier est une technique applicable aux ateliers fermiers. Elle suppose néanmoins une étude préalable d'identification des espèces bactériennes majoritairement présentes dans l'atelier et de caractérisation des souches.

Figure 1
L'AJOUT DE FERMENTS ISOLÉS DE L'ATELIER N'A PAS MODIFIÉ LA TYPICITÉ DU SAUCISSON FERMIER



(-o-) Lot témoin ; (-■-) Lot ensemencé.
Les attributs encadrés correspondent à une différence significative entre les deux lots ($p < 0.005$)

Remerciements

Ce travail a bénéficié d'un financement dans le cadre d'un programme européen Tradisusage QLK1-CT2002-02240. Les travaux d'analyses microbiologiques ont été réalisés à l'Inra Clermont-Ferrand Theix. Nous remercions l'équipe espagnole de l'Université de Barcelone pour l'analyse des amines biogènes, l'équipe italienne de l'Université de Parme pour l'analyse des acides gras et de l'oxydation des lipides.

BIBLIOGRAPHIE

BERTHIER F., EHRlich. S.D., 1998. Rapid species identification within two groups of closely related lactobacilli using PCR primers that target the 16S/23S rRNA spacer region. FEMS Microbiol. Lett. 161, 97-106.

BLAIOTTA G., ERCOLINI D., MAURIELLO G., SALZANO G., VILLANI F., 2004. Rapid and reliable identification of Staphylococcus equorum by a species-specific PCR assay targeting the sodA gene. Syst. Appl. Microbiol. 27, 696-702.

HERNÁNDEZ-JOVER T., IZQUIERDO-PULIDO M., VECIANA-NOGUÉS M.T., VIDAL-CAROU M.C., 1996. Ion-pair high-performance liquid chromatographic determination of biogenic amines in meat and meat products. J. Agric. Food Chem. 44, 2710-2715.

LEBERT I., LEROY S., CHACORNAC J.P., TALON R., 2006. Saucissons secs fermiers du Massif central : Ecosystèmes microbiens des saucissons et de l'environnement. Viandes et Produits Carnés 25(5), 165-170.

LEROY S., GIAMMARINARO P., TALON R., 2006a. Development of specific PCR assay for a rapid and reliable identification of Staphylococcus succinus and application for its detection in meat. J. Appl. Microbiol. (soumis pour publication).

LEROY S., LEBERT I., CHEVALLIER I., CHACORNAC J.P., TALON R., 2006b. Saucissons secs fermiers du Massif central. Identification et caractérisation de la flore d'intérêt technologique : bactéries lactiques et staphylocoques à coagulase négative. Viandes et Produits Carnés 25(5), 171-175.

MOROT-BIZOT S., TALON R., LEROY-SETRIN S., 2003. Development of specific PCR primers for a rapid and accurate identification of Staphylococcus xylosum, a species used in food fermentation. J. Microbiol. Methods 55, 279-286.