INSFA (Institut National Supérieur de Formation Agroalimentaire)
65, rue de St Brieuc - CS 84215 - 35042 RENNES Cedex
Tél. : 02.23.48.54.92
Fax : 02.23.48.54.90
Courriel : insfa@agrocampus-rennes.fr

CIRAD - PAA
Maison Régionale des Sciences et de la Technologies
100, route de la Rivière des pluies
97490 Sainte Clotilde - LA REUNION
Tél. : 02.62.92.24.98 Fax : 02.62.52.24.31

RAPPORT DE STAGE EN ENTREPRISE

Etude de la fermentation d'une viande maigre après un traitement de Déshydratation – Imprégnation par Immersion

Julie Quaranta
15ème promotion INSFA
2006/2007

Août 2006 - Janvier 2007
Date de soutenance : 28 mars 2007

Remerciements

Je souhaite remercier particulièrement Elodie Arnaud pour son encadrement ainsi que ces conseils scientifiques sa disponibilité, son organisation, sa rigueur et ses conseils rédactionnels qui m'ont beaucoup appris et apporté.

Je remercie également Eric Cardinale, responsable du pôle Agroalimentaire, pour son accueil au sein de son équipe, son enthousiasme et sa gentillesse.

Je tiens aussi à remercier Antoine Collignan, directeur de l'ENSIA SIARC, Thierry Goly, chercheur au CIRAD Montpellier et Thomas Petit, enseignant chercheur en microbiologie industrielle à l'IUT de Saint Pierre, pour leurs investissements dans mon travail, et leurs conseils.

Je remercie également Sunita Santchurn, étudiante en thèse au pôle Agroalimentaire qui m'a formé au début de mon stage.

Merci aussi à Monsieur Mondon, directeur de la DGCCRF, ainsi qu'à tout son personnel sympathique et plus particulièrement à Alexin Pajaniaye qui m'a beaucoup appris sur l'HPLC mais aussi sur la culture créole.

J'adresse enfin tous mes remerciements à toute l'équipe du pôle agroalimentaire qui a rendu mon stage très agréable grâce à sa sympathie et son enthousiasme au quotidien : Aurélie Pedarrieu, Adeline Vion, Emmanuelle Vulcain, Florence Braun, Jérôme Minier, Jacques Joas et Jean Yves Lecompte.

Etude de la fermentation de la viande maigre après une Déshydratation Imprégnation par Immersion

Résumé : L'élevage du cerf Rusa représente un important marché économique dans les îles des Mascareignes. L'essentiel de la venaison est vendu en frais. Aussi la recherche d'autres voies de valorisation par la transformation pourrait être un facteur supplémentaire du développement de la filière cervine.

Le projet dans lequel s'est inséré mon travail a pour objectif de développer un procédé de salaison adapté aux conditions tropicales. Il combine une étape de salage séchage par déshydratation-imprégnation par immersion (DII) et une opération de fermentation.

Lors de mon stage un plan d'expérience a été mis au point ayant pour objectif de modéliser l'effet de la concentration en sel et du temps d'immersion sur le gain en sel et la perte en eau lors de l'étape de DII.

Pour comprendre l'influence de la DII sur la fermentation de la viande, des essais ont été réalisés avec des formulations de DII différentes. Cela nous a permis de confirmer qu'il était possible de fermenter une viande traitée préalablement par DII. On observe une croissance des microorganismes, une baisse du pH, une production d'acide D lactique et une consommation du glucose.

Si on pousse la déshydratation de la viande lors de la DII nous ne retrouvons pas cette fermentation. Il y a augmentation de la flore totale, une légère baisse du pH mais pas de production d'acide lactique.

Mots clés : Viande, venaison, transformation, salage, séchage, fermentation, déshydratation –imprégnation par immersion, ferments lactiques.

Sommaire

REMERCIEMENTS .....

SOMMAIRE .....

INTRODUCTION 1

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE 2

I. LA DESHYDRATATION IMPREGNATION PAR IMMERSION (DII) 2

1. LES GRANDS PRINCIPES DE L'OPERATION 2
2. OBJECTIFS ET INTERETS DE L'OPERATION 3
3. VARIABLES DU PROCEDE 3
4. APPLICATIONS INDUSTRIELLES 4
5. LES PROBLEMES POSES PAR LA GESTION DES SOLUTIONS 4
6. ESSAIS DE DII SUR DE LA VIANDE MAIGRE 4

II. LES PRODUITS FERMENTES ET LEUR FABRICATION 5

1. LA MATIERE PREMIERE 5
2. CARACTERISTIQUES MICROBIOLOGIQUES DE LA VIANDE 5
3. LA FERMENTATION 6

III. MECANISMES DE FERMENTATION 8

1. VOIES FERMENTAIRES 8
2. MICROORGANISMES IMPLIQUES DANS LA FERMENTATION DE LA VIANDE 8

MATERIELS ET METHODES 11

I. METHODOLOGIE EXPERIMENTALE 11

II. ANALYSES PHYSICO-CHIMIQUES 12

1. DETERMINATION DE LA PERTE EN POIDS AU COURS DE LA DII DES OPERATIONS DE DII ET DE FERMENTATION 12
2. DETERMINATION DE LA TENEUR EN EAU ET CALCUL DE LA PERTE EN EAU AU COURS DES OPERATIONS DE DII ET DE FERMENTATION 12
3. DETERMINATION DE LA TENEUR EN SEL ET CALCUL DU GAIN EN SEL AU COURS DES OPERATIONS DE DII ET DE FERMENTATION 13
4. CALCUL DU GAIN EN SUCRE AU COURS DES OPERATIONS DE DII ET DE FERMENTATION PAR LE BILAN MATIERE 13

5. DOSAGE DE L'ACIDE LACTIQUE 14
6. DETERMINATION DU pH 15
6. MESURE DE L'ACTIVITE DE L'EAU (AW) 15
7. DOSAGE DES SUCRES 15
8. DOSAGE DES ACIDES ORGANIQUES 17
III. ANALYSES MICROBIOLOGIQUES 18
1. PREPARATION DE LA SOLUTION MERE ET DES DILUTIONS SUCCESSIVES 18
2. TECHNIQUES DE DENOMBREMENT ET D'IDENTIFICATION 18
3. TECHNIQUES D'IDENTIFICATION 18
IV. CONSTRUCTION DU PLAN D'EXPERIENCES EN RESEAU DE DOEHLERT 19
1. PRINCIPE 19
2. DOMAINE EXPERIMENTAL 20
3. PLAN EN RESEAU DE DOEHLERT 20

RESULTATS 21

I. INFLUENCE DES CONDITIONS DE TRAITEMENT SUR LA DESHYDRATATION ET LE GAIN EN SEL AU COURS DE L'OPERATION DE DII 21
1. ESSAIS PRELIMINAIRES 21
2. RESULTATS DU PLAN D'EXPERIENCES 23
3. OPTIMISATION DU PLAN 25
II. INFLUENCE DE LA DII SUR LES CARACTERISTIQUES PHYSICO-CHIMIQUES ET LA QUALITE MICROBIOLOGIQUE DE LA VIANDE 26
1. EFFET DU TRAITEMENT DE DII SUR LES CARACTERISTIQUES PHYSICO-CHIMIQUES DE LA VIANDE 26
2. EFFET DU TRAITEMENT DE DII SUR LA QUALITE MICROBIOLOGIQUE DE LA VIANDE 27
III. ETUDE DES EFFETS DE LA DESHYDRATATION PAR DII SUR LA FERMENTATION 28
1. ETUDE DE LA FERMENTATION APRES UNE DII PROVOQUANT UNE PERTE EN EAU DE 20% 28
2. EFFET D'UNE DESHYDRATATION PLUS IMPORTANTE PAR DII (PE = 30%) SUR LA FERMENTATION 30

DISCUSSION 32

I. INFLUENCE DES CONDITIONS DE DII SUR LA DESHYDRATATION ET L'IMPREGNATION EN SEL 32
II. QUELLE EST L'EVOLUTION DE LA QUALITE MICROBIOLOGIQUE DE LA VIANDE PENDANT LE TRAITEMENT DII ? 32
III. LA FERMENTATION EST-ELLE POSSIBLE APRES UNE DESHYDRATATION DE 20% 33
IV. LA FERMENTATION EST-ELLE POSSIBLE APRES UNE DESHYDRATATION PLUS POUSSEE DE 30% ... 34

CONCLUSION ET PERSPECTIVES 35

ANNEXES…….

1. PHOTOS AU COURS DU PROTOCOLE
2. FICHE FERMENT
3. FICHE DELVOCID
4. CONDITIONS EXPERIMENTALES DE L'ANALYSE HPLC
5. ANALYSE DE LA SOLUTION D'ENSEMENCEMENT
6. CHROMATOGRAMMES D'ACIDE ORGANIQUE
7. DOSAGE DES ACIDES ORGANIQUES
8. EVOLUTION DES ACIDES ORGANIQUES AU COURS DE LA FERMENTATION

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES……

Introduction

Introduction

Les produits d'origine animale, quand ils ne sont pas consommés à l'état frais, sont généralement transformés par une large gamme de techniques traditionnelles, notamment le salage, le séchage, la cuisson, le fumage, la fermentation/maturation.

Dans les pays du Sud, les procédés de transformation utilisés sont de préférence rapides et basés sur l'utilisation, combinée ou non, d'opérations de salage, séchage, cuisson, fumage et marinage. Ces procédés bénéficient d'un savoir faire ancestral et restent empiriques. Les traitements sont généralement longs et mal maîtrisés et la qualité des produits n'est pas garantie.

La fermentation/maturation est essentiellement pratiquée dans les pays tempérés où les conditions climatiques et économiques permettent aisément sa mise en œuvre. En effet, la fermentation est un procédé long, réalisé de préférence à température basse et nécessitant des cellules à atmosphère contrôlée. Elle est donc difficilement transférable en l'état actuel aux pays tropicaux en raison du climat et des coûts qu'elle engendrerait.

La venaison, viande de gibier, est une viande que l'on retrouve dans plusieurs pays de la zone de l'Océan Indien (île Maurice, Réunion). A l'heure actuelle, l'essentiel de la venaison est vendu à l'état frais et la mise sur le marché d'un produit de diversification avec de bonnes qualités sanitaires et sensorielles permettraient d'ouvrir une nouvelle voie de développement pour la filière cervidés dans les Mascareignes.

Ce constat a amené le CIRAD à développer un nouveau procédé de salaison de la viande adapté à une viande maigre et aux conditions tropicales (matériel peu coûteux, traitement court, utilisation de solutés disponibles et efficaces), en s'inspirant des procédés traditionnels de salaison. L'objectif est d'aboutir à un produit de type biltong (produit salé, séché et aromatisé traditionnellement fabriqué à partir de viande de bœuf ou de gibier, couramment consommé en Afrique australe).

Le procédé combinera la déshydratation-imprégnation par immersion (DII) pour saler et pré-sécher simultanément la viande, et une étape de séchage-fermentation pour améliorer la stabilité, la qualité organoleptique et sanitaire du produit fini.

Le premier objectif de ce stage consiste à confirmer l'aptitude d'une viande de bœuf maigre à fermenter lorsque celle-ci est préalablement traitée par DII dans des conditions permettant une déshydratation moyenne de la viande.

Dans un 2^{éme} temps, l'objectif est de savoir dans quelle mesure il est possible de pousser la déshydratation pendant l'opération de DII tout en obtenant une viande apte à être fermentée. En effet l'objectif est de pré - stabiliser au maximum la viande avant fermentation pour éviter les risques de contaminations lors de cette opération.

Etude Bibliographique

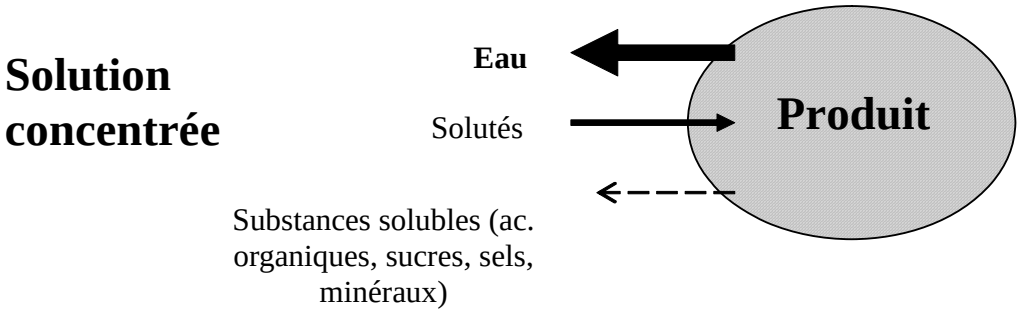


Figure 1 : Représentation schématique des transferts de matière au cours d'un traitement d'immersion en solution concentrée (d'après Raoult-Wack et Guibert, 1990 ; Raoult-Wack, 1994)

Etude Bibliographique

Le procédé mis en œuvre pour transformer la viande de bœuf combine une déshydratation imprégnation par immersion (DII) et une fermentation. Ainsi, la 1ére partie de cette étude bibliographique porte sur la première opération (la DII).

La fermentation, les mécanismes de fermentation, et les microorganismes impliqués seront ensuite présentés.

I. La déshydratation imprégnation par immersion (DII)

Traditionnellement, l'élimination d'eau d'un produit alimentaire est obtenue soit par voie mécanique (centrifugation, filtration, pressage), soit par voie thermique (ébullition, entraînement).

Pour les produits alimentaires solides, une troisième voie peut être utilisée : il s'agit de l'élimination d'eau par déshydratation imprégnation par immersion ou déshydratation osmotique. Cette technique consiste à mettre l'aliment entier ou découpé en morceaux en contact avec une solution fortement concentrée en solutés (souvent du sel ou du sucre) (Ponting, 1973).

De nombreux procédés de transformation des aliments riches en eau sont basés sur l'immersion de l'aliment entier ou découpé dans les solutions très concentrées en sucre ou en sel. Il s'agit par exemple du saumurage ou marinage de viandes et poissons et du confisage des fruits. Ces techniques traditionnelles consistent à favoriser l'imprégnation du soluté dans l'aliment et à limiter le phénomène de déshydratation afin de ne pas diminuer les rendements de production. En revanche, lors de la déshydratation osmotique on cherche à favoriser le départ d'eau et limiter l'entrée de solutés.

1. Les grands principes de l'opération

La déshydratation imprégnation par immersion, est un procédé d'élimination d'eau et d'imprégnation en solutés par différence de concentration. Cette technique, souvent utilisée pour les fruits et légumes est désormais employée pour traiter d'autres types de produits tels que les produits carnés ou poissons.

L'aliment est immergé dans une solution concentrée et il s'en suit alors des transferts de matière simultanés, à contre courant (figure 1) :

- Une sortie d'eau du produit vers la solution
- Une entrée de soluté de la solution concentrée vers le produit
- Une fuite de solutés propres vers la solution. Cependant, cette perte est quantitativement négligeable par rapport aux deux autres transferts (Bohuon, 1995)

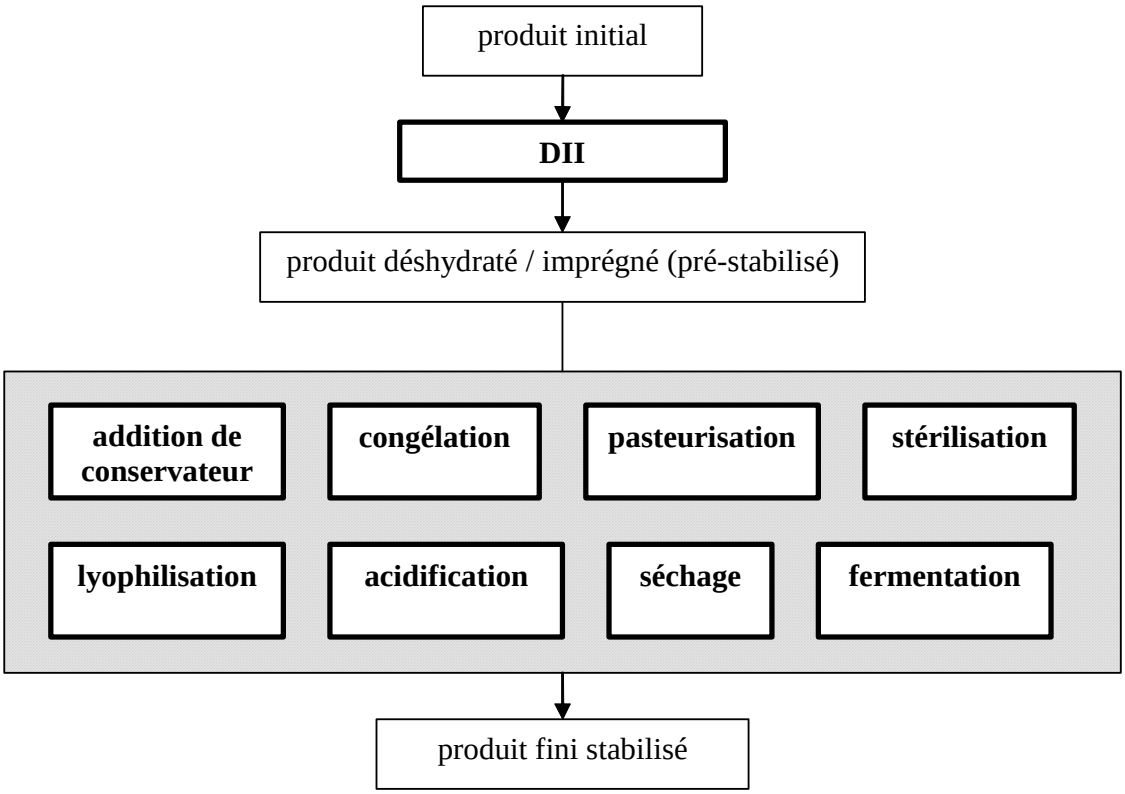


Figure 2 : Traitements complémentaires suite à une déshydratation osmotique.

Dans le cas des produits carnés, l'utilisation d'une solution ternaire composée d'eau, de sel, et de sucres (Islam et Flink, 1982 ; Collignan et Raoult-Wack,, 1992) permettent de fortes pertes en eau tout en limitant l'imprégnation en sel grâce à l'utilisation de sucres de fortes masse molaire (Collignan et Raoult-Wack, 1992).

La DII n'entraînant pas un produit stable, elle doit être associée à des étapes supplémentaires répertoriés dans la figure 2. Dans le cadre de ce projet la seconde opération de stabilisation est une fermentation.

2. Objectifs et intérêts de l'opération

Par ce traitement DII, on peut extraire jusqu'à 70% d'eau environ. Cette eau correspond à l'eau « libre » du produit, et sa diminution n'abaisse que très peu l'Aw (Ponting, 1973 ; Islam et Flinck, 1982).

Les avantages de l'introduction d'un procédé de DII dans un procédé technologique classique sont de divers ordres :

- **Une amélioration des qualités organoleptiques et nutritionnelles des produits obtenus**. Ceci peut être attribué aux températures de traitement modérées qui limitent les dommages cellulaires comparés à des techniques utilisant une température élevée. De plus la perte en solutés propres du produit est quantitativement faible, donc essentielle pour la conservation des pigments, des vitamines, des minéraux, des arômes, et il n' y a pas d'oxydation.
- **Une économie d'énergie** (Le Maguer, 1988 ; Collignan *et al.*, 1992) car l'eau est enlevée du produit sans changement de phase et les coefficients d'échange de chaleur et de matière sont généralement meilleurs en phase liquide qu'en phase gazeuse.
- **Une économie de temps**. En effet, la maîtrise des paramètres en DII permet une optimisation qui conduit à des déshydratations très rapides.
- **Une possibilité de coupler simultanément à la DII des traitements complémentaires :** coloration en faisant pénétrer des molécules colorantes, aromatisation, texturation, formulation de produits à l'aide d'ingrédients et d'additifs de salaison.

3. Variables du procédé

On peut orienter la DII en agissant sur un certain nombre de facteurs :

- **le temps d'immersion** : plus la durée est longue, plus la déshydratation et l'imprégnation sont importantes
- **la concentration de la solution de déshydratation** (solutés, présence d'ions) : une forte concentration en soluté augmente la déshydratation et permet de réduire la perte en solutés hydrosolubles
- **la composition de la solution concentrée** : l'imprégnation est favorisée par des solutés à faible poids moléculaire. L'utilisation d'un mélange de plusieurs solutés peut combiner certains avantages de chacun, mais les interactions sont souvent complexes en fonction des concentrations de chacun, de la viscosité, de la formation de couche superficielle, etc

Tableau 1 : Microorganismes présents dans les viandes (d'après J-L Jouve, 1996)

Nom	Habitats	T°C optimale	Caractéristiques
Salmonella	Cuir Tractus digestif de l'animal	Bactérie mésophile. Les conditions de conservation à des températures de réfrigération ou de congélation n'entraînent pas la destruction de cette bactérie.	Espèce bactérienne. Bactérie pathogène
Listeria monocytogenes	Cuir Tractus digestif de l'animal Carcasse après abattage	Bactéries pshychrotrophes capable de se développer aux températures de travail et de conservation des viandes.	Espèce bactérienne Bactéries pathogène
Staphylococcus aureus	Cuir Tractus digestif de l'animal Carcasse après abattage	Bactérie mésophile. Les conditions de conservation à des températures de réfrigération ou de congélation n'entraînent pas la destruction de cette bactérie.	Espèce bactérienne Bactéries pathogène
Clostridium perfringens	Cuir Tractus digestif de l'animal	Bactérie mésophile	Espèce bactérienne Bactéries pathogène Anaérobie stricte
Escherichia coli	Cuir Tractus digestif de l'animal Carcasse après abattage	Bactéries mésophile. Les conditions de conservation à des températures de réfrigération ou de congélation n'entraînent pas la destruction de cette bactérie.	Espèce bactérienne Bactéries dont certains types sérologiques sont pathogènes
Pseudomonas	Cuir Tractus digestif de l'animal Carcasse après abattage	Pshychrotrophe	Aérobie stricte Responsable de l'altération du substrat viande par protéolyse
Enterobacteriaceae	Cuir Tractus digestif de l'animal		Famille bactérienne
Bactéries lactiques	Cuir Tractus digestif de l'animal	Pshychrotrophe sans action néfaste sur le substrat viande	Groupe bactérien Bactéries non pathogène d'intérêt technologique

- **le mode de découpe des produits** : un rapport surface/masse des morceaux rend la déshydratation plus rapide
- **la température** : plus elle est élevée, plus la perte en eau est favorisée

La perte en eau et le gain en solutés en DII dépendent aussi des propriétés des tissus. La très grande variabilité observée dans les comportements des divers produits, au cours de la déshydratation osmotique, est généralement attribuée aux différences tissulaires. En effet, de très nombreuses études, menées essentiellement sur fruits et légumes, montrent que les échanges d'eau et de solutés sont probablement influencés en particulier par la présence des membranes cellulaires, mais aussi par la compacité des tissus, le taux initial en matières insolubles, l'importance relative des espaces intercellulaires, la nature des solutés propres et les activités enzymatiques des produits traités.

4. Applications industrielles

Le procédé de déshydratation osmotique est déjà appliqué depuis quelques dizaines d'années à grande échelle dans des industries d'Asie du Sud-Est à des fruits, et en Europe avec les fruits méditerranéens (Spieß et behsnilian, 1998). On peut aussi l'étendre à un grand nombre de légumes, viandes et poissons. Les perspectives d'applications industrielles sont nombreuses.

Les produits obtenus sont destinés à être consommés en l'état (produits de grignotage de type « Aperifruits »), incorporés dans les pâtisseries industrielles, céréales, produits laitiers (yaourt, fromage blanc), plats cuisinés, ou produits congelés à décongélation rapide (salades de fruits, crèmes glacées) ou encore réhydratés.

5. Les problèmes posés par la gestion des solutions

Le coût et la gestion des solutions concentrées sont des points fondamentaux pour la viabilité technico économique du procédé. En cours de DII, des transfert de matières croisés se produisent, ce qui a pour conséquence une dilution de la solution et l'apparition de solutés propres du produit et d'impuretés. Il est alors indispensable de réajuster la concentration de la solution et les proportions entre les solutés.

6. Essais de DII sur de la viande maigre

La viande de cervidés présente certaines caractéristiques spécifiques comme une faible teneur en graisse (<2%), une tendreté remarquable et des arômes subtils de gibier. De plus, les nombreux muscles de petites tailles, commercialisés en frais, pourraient être valorisés comme produits de grignotage (salés, séchés, aromatisés).

Cependant, bien que ces caractéristiques peuvent être considérés comme des atouts, les quelques essais de transformation par salage, séchage et /ou fumage qui ont été conduits n'ont pas donné satisfaction et ce pour plusieurs raisons. Cette viande particulièrement maigre, s'imprègne beaucoup trop en sel lorsqu'elle est soumise aux conditions classiques de salaison. D'autre part, les arômes de gibier qui la caractérisent ont tendance à disparaître au cours du procédé et la viande développe des odeurs désagréables après traitement (ammoniac et

peptone qui témoignent d'une dégradation des protéines) (Collignan et Deumier, 2001)

L'immersion d'une pièce de viande maigre (bœuf) dans une solution concentrée eau/sel/sirop de glucose permet un séchage important (38%) et une imprégnation en sel et en sucres relativement faibles (4% et 2% respectivement) (Santchurn *et al*, 2007).

Des essais ont également été réalisés sur de la viande de daim (Deumier, 1993)

Le sirop de glucose est un produit issu de l'hydrolyse partielle de l'amidon de maïs et est constitué de glucose, de maltose et de polysaccharides de glucose de degré de polymérisation allant de 3 à plus de 9.

Les travaux réalisés au CIRAD notamment dans le cadre de la thèse de S. Santchurn ont permis de mieux comprendre le rôle des sucres de différentes masses molaires. D'autre part, le potentiel de la mélasse et de l'amidon de maïs comme soluté de remplacement du sirop de glucose a été évalué. La mélasse est un sous produit peu coûteux de l'industrie sucrière et renferme 45% de saccharides de faible masse molaire et l'amidon de maïs est une source de polysaccharide de masse molaire très élevée. En comparaison avec le sirop de glucose, la mélasse s'avère être un soluté intéressant puisqu'elle permet un séchage plus important et un salage identique, donc une pré stabilisation plus poussée de la viande. Cependant, elle présente l'inconvénient d'imprégner plus fortement la viande en sucres, d'ou le risque d'une saveur sucrée détectable et indésirable de la viande ainsi traitée (Santchurn *et al.*, 2007).

II. Les produits fermentés et leur fabrication

1. La matière première

La chair des animaux constitue depuis toujours une des bases de l'alimentation humaine. L'industrie de la viande représente un des principaux secteurs de l'industrie alimentaire. La viande et consommée de plus en plus, et sous des formes de plus en plus diverses.

La viande est considérée comme un aliment de choix en fonction de sa valeur nutritive. Sa richesse en protéines et la nature de celle-ci en font un aliment difficilement irremplaçable. Cependant, en raison même de ses qualités nutritionnelles, la viande constitue un terrain très favorable à la plupart des contaminations microbiennes (principalement les organismes protéolytiques). Il s'agit donc d'une denrée fragile, périssable avec une courte durée de conservation avant la vente si aucune technique de conservation n'a été appliquée. Juste après abattage la viande fraîche nécessite un certain délai de conservation pour acquérir certaines qualités organoleptiques (tendreté, couleur) : c'est le phénomène de maturation.

2. Caractéristiques microbiologiques de la viande

Après l'abattage, le muscle est exempt de microorganismes (la viande d'un animal sain est en principe stérile). On dénombre un germe pour 10 à 100g de chair. (Bourgeois et Leveau, 1991)

La contamination bactérienne de la viande a deux origines principales : la flore de l'animal vivant et les contaminations lors de l'abattage ainsi que de la découpe.

En effet les germes susceptibles d'être rencontrés dans la viande proviennent de l'intestin par franchissement de la barrière intestinale. Puis sont véhiculés par le sang. Ils peuvent être a l'origine de contaminations élevées. Certains d'entre eux sont les bactéries psychrotrophes capables d'altérer la viande par putréfaction avec ou sans modification de la couleur ou par formation d'acides gras à odeurs désagréables. De plus les animaux peuvent être porteurs sains de bactéries pathogènes comme Salmonella, Listeria monocytogenes. La surface de la carcasse, quant à elle, porte toujours un nombre important de germes divers. Ce nombre varie avec l'emplacement sur l'animal et les conditions d'hygiène à l'abattoir.

La viande peut aussi être polluée par le manipulateur lui-même qui transporte avec ses mains et ces outils des bactéries présentes dans l'environnement. Il peut également apporter des bactéries pathogènes s'il est porteur sain.

Les genres ou familles bactériennes dominant sur les viandes fraîches sont *Pseudomonas, Acinetobacter, Micrococcacae, Enterobacteries, Flavobacterium, Microbacterium, Lactobacillus*. Les microorganismes présents sur la viande sont présentés dans le tableau 1.

La plupart de ces groupes présents dans la viande sont responsables d'altération : putréfaction, verdissement, sûrissement, lipolyse.

D'autres germes peuvent être présents de façon aléatoire : Bacillus, Streptococcus, Aeromonas, Clostridium, etc.

3. La fermentation

La fermentation est une opération ayant pour but la stabilisation des produits et la modification de leurs propriétés organoleptiques par action des microorganismes et des enzymes, endogènes ou exogènes.

Lors de la fermentation de bonnes bactéries au détriment d'autres se développent en grand nombre.

Les techniques de fabrication sont multiples, s'associent parfois et se complétent. Il n'est donc pas facile de classifier les viandes fermentées. Le Code des usages de la charcuterie, de la salaison et des conserves de viande (CTSCCV, 1997) définie 16 catégories de produits.

La catégorie 2, pièces crues maturées/séchées (ex : jambon cru, de pays), et la catégorie 5, saucisses et saucissons secs, sont celles qui se rapprochent le plus de notre protocole.

A la viande, parfois hachée, des sucres, du sel, des nitrates et nitrites sont ajoutés. La fabrication de ces produits s'accompagne d'une maturation qui leur confère leurs qualités sensorielles. Cette étape de fermentation en elle-même a aussi un rôle de stabilisation (préservation) grâce à plusieurs facteurs :

- une acidification résultant de la production d'acide lactique par les microorganismes
- un effet barrière des ferments présents dans la viande qui empêchent d'autres microorganismes, éventuellement pathogènes de se développer
- une diminution de l'activité de l'eau (Aw) : qui devient limitante en dessous de 0,95 pour certains germes
- une diminution du potentiel d'oxydoréduction par la consommation d'oxygène par les microorganismes, qui pénalise les microorganismes aérobies

Tableau 2 : Caractéristiques physicochimiques et microbiologiques de biltong d'Afrique du Sud

Echantillons analysés	**Analyses physicochimiques**						**Analyses microbiologiques**		
	Teneur en eau (%)	Aw	Teneur en sel (%)	Teneur en acide L-lactique (%)	Teneur en acide D-lactique (%)	pH	Flore totale (ufc/g)	Flore lactique (log ufc/g)	Levure (log ufc/g)
Valeur minimum	21,5	0,65	1,9	nd	nd	5	1.10^{6}	1.10^{5}	<10
Valeur maximum	42,8	0,89	7,9	1,5	0,9	6,2	1.10^{9}	1.10^{7}	1.10^{7}

nd : non détectable

a) Exemple de produits fermentés et de leurs technologies de fabrication

La fermentation est l'un des procédés les plus anciens pour la conservation de la viande. En Europe les produits concernés par ce traitement sont le saucisson sec, le salami, les saucisses séchées, le jambon sec, la viande séchée des Grisons etc. sont des produits dont on suppose une fermentation dans leurs technologies de fabrication. Dans les pays du Sud, on retrouve peu de viande fermentées bien que des travaux récents indiquent que le « Biltong », le « Jerked Beff » le « Charqui », produits salés et séchés pourraient être des produits fermentés (Petit *et al., 20*06 ; Pinto *et al*., 2002)

Le but de la cuisson est d'assurer le maximum de cohésion entre les constituants, en limitant les transferts d'eau et de lipides. A contrario pour la fabrication des produits secs l'objectif est de faciliter les transferts en eau, et d'éliminer au maximum l'eau pour assurer une bonne conservation du produit fini (Girard, l988).

- **Le saucisson sec**

Le saucisson sec est une préparation de charcuterie crue, fermentée et séchée, composé d'environ 2/3 de maigre et 1/3 de gras. A ces deux principaux éléments sont adjoints un certain nombre d'additifs : chlorure de sodium, salpêtre et/ou nitrites, sucres, épices ou aromates. La première étape dans la fabrication de ce produit est le broyage qui s'effectue à basse température. Le pré salage précède parfois cette opération, il facilite la solubilisation des protéines. Le mélange du maigre, du gras et des ingrédients se fait au cours de l'étape de malaxage. Puis la mêlée est embossée, après un éventuel repos, en boyau artificiel ou naturel. Un égouttage peut s'effectuer puis intervient l'étape d'étuvage, d'une durée de 1 à 5 jours, à des températures comprises entre 20 et 28°C sous une hygrométrie de 90%. Cette étape permet avant tout une explosion microbienne et d'amorcer la déshydratation. L'opération ultime est le séchage, sous hygrométrie de 75 à 85% et une température de 12-16°C. Tout au long du séchage, se produisent des réactions de maturation et de dessiccation, dont le but est de conférer au produit fini ses caractéristiques.

- **Le biltong**

Le biltong est un produit carné cru séché salé consommé un peu partout en Afrique du Sud et préparé a partir de muscle d'antilope ou de bovins.

Le biltong ressemble au produit carné déshydraté tel que le « charque » que l'on retrouve en Amérique du Sud ou encore au jerky présent dans certaines régions d'Amérique du nord. Il a une activité en eau d'environ 0,80 (Petit *et al.*, 2006).

Pour mieux comprendre la nature du biltong, des analyses physicochimiques et microbiologiques ont été effectuées sur du biltong provenant d'Afrique du Sud. Les viandes utilisées pour leur fabrication étaient issues du bœuf, du kuddu ou du springbok. Les résultats révèlent une grande variabilité tant au niveau physicochimique qu'au niveau microbiologique (tableau 2).

Cette variabilité pourrait s'expliquer d'une part par la qualité de la matière première et d'autre part par des méthodes de fabrication différentes (ingrédients, techniques et durée de salage et de séchage). La flore microbienne du biltong est comprise entre 10^5 et 10^7 ufc/g avec comme groupe prédominant, les micrococcaceae.

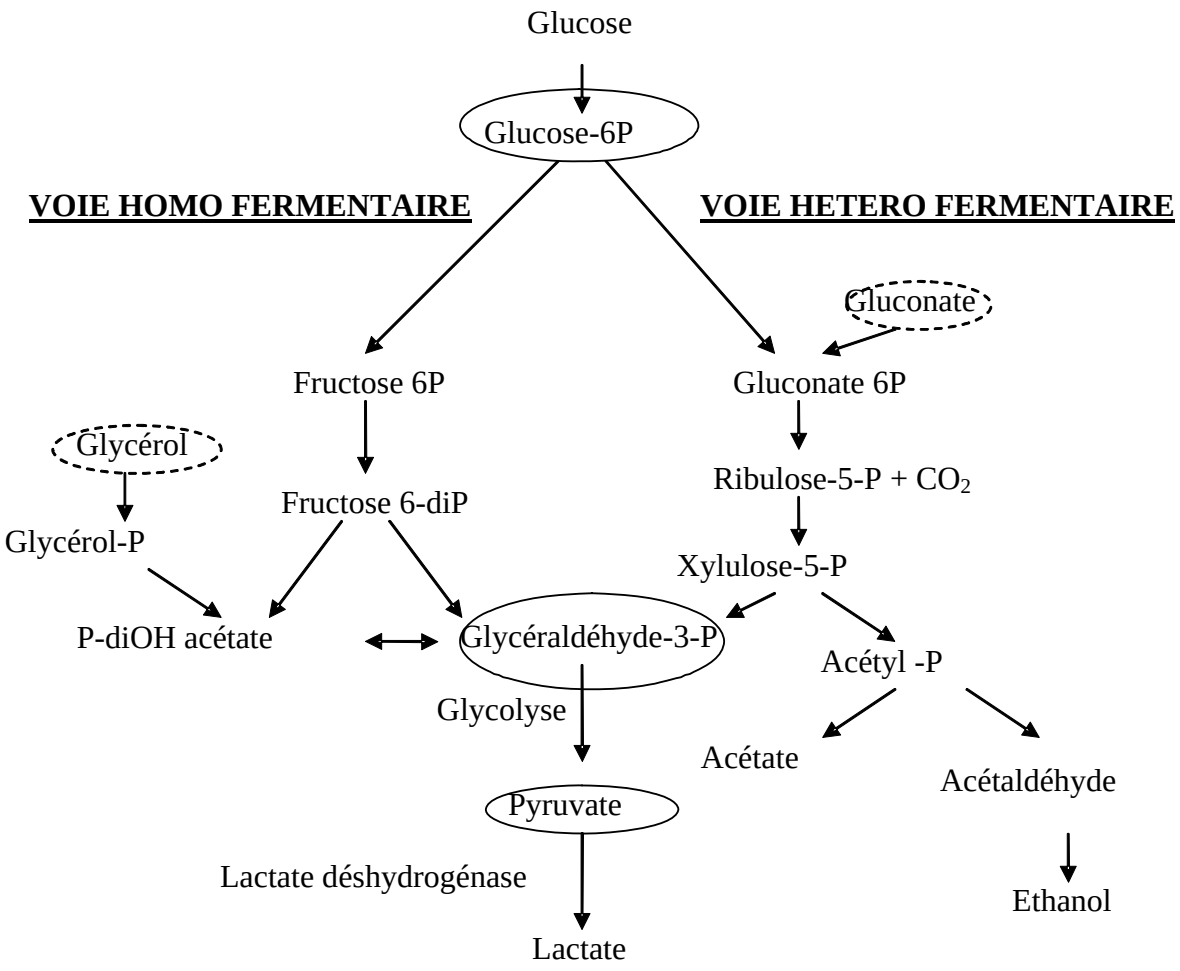


Figure 3 : Métabolisme du glucose et du pyruvate chez les bactéries lactiques homo et hétéro fermentaires (adapté de Durand, 1999 et Girard, 1988)

Par la présence de ces microorganismes, on suppose que ce produit pourrait avoir subi une forme de fermentation naturelle au cours du séchage (Santchurn, 2005).

Par ailleurs sachant que la viande fraîche est dépourvue d'acide D lactique, les teneurs en acide D lactique relativement élevées de certains biltongs, couplées à une flore lactique importante laissent penser qu'une fermentation lactique a probablement eu lieu de manière spontanée au cours du séchage (Petit *et al*, soumis à publication ; Santchurn, 2005).

III. Mécanismes de fermentation

1. Voies fermentaires

La conversion des sucres en acide lactique est la principale voie métabolique fournissant l'énergie aux bactéries lactiques.

Cette conversion est également impliquée dans la production de différents composés participant aux propriétés organoleptiques des produits fermentés.

Deux voies métaboliques ont été décrites pour la fermentation du glucose chez les bactéries lactiques. Celles ci sont schématisées figure 3.

- **la voie homofermentaire** (voie d'Emben Meyerhof Parnas ou glycolyse) qui conduit dans un premier temps à la formation de deux moles de pyruvate à partir d'une mole de glucose. Par la suite, grâce à une activité de la lactate-déshydrogénase, le pyruvate est métabolisé en lactate (D) et/ou (L). Ce dernier peut être converti en isomère (D). Cette voie conduit à une production d'acide lactique représentant plus de 90% des produits élaborés. Les bactéries concernées par cette voie sont les lactobacilles homofermentaires, les *Enterococcus*, les *Pediococcus*, etc.
- **la voie hétérofermentaire** (voie des pentoses) est davantage le fait des lactobacilles hétérofermentaires ou des leuconostocs. On aboutit à la production d'acide lactique et un mélange des produits d'excrétion : le dioxyde de carbone, l'éthanol et l'acide acétique.

Il faut signaler d'autres métabolismes des glucides.

- Une fermentation alcoolique des levures (production massive d'éthanol)
- Une fermentation gluconique par *Escherichia spp* ou *Pseudomonas spp (*oxydation du glucose en gluconate)
- le métabolisme aérobie du pyruvate par les microorganismes aérobies stricts, surtout des moisissures en produisant des dérivés du cycle de Krebs ce qui augmente l'acidité du produit

2. Microorganismes impliqués dans la fermentation de la viande

Les principaux microorganismes de la viande sont :

- les lactobacilles : leurs principales caractéristiques sont qu'elles fermentent rapidement les hexoses

(voie homofermentaire) et relativement lentement les polyosides, avec un bon effet inhibiteur vis-à-vis des Gram négatifs principalement et quelques Gram positifs

- les microcoques : nombreux en fin de maturation ; ils participent légèrement à la fermentation (voie homofermentaire), possèdent des capacités protéolytiques et lipolytiques. Ils jouent un rôle primordial dans la formation de la couleur en réduisant les nitrates en nitrites. Le nitrite réagit avec la myoglobine et stabilise les pigments durant la conservation

On trouve aussi :

- des streptocoques : homofermentaires mais progressivement inhibés par la croissance des lactobacilles lors de la fermentation
- des entérobactéries : protéolytiques et acidifiantes, par fermentation « acides-mixtes » donnant naissance à un grand nombre d'acides organiques courts tels que l'acide formique, acétique, lactique, succinique. Elles sont présentes en quantité relativement importante en début de fermentation. Elles disparaissent progressivement au cours de l'étuvage (inhibées par les lactobacilles)
- des pseudomonas : protéolytiques et inhibés par les lactobacilles
- des levures : presque toujours présentes en surfaces, elles sont avant tout lipolytiques et conduisent à la formation de composés aromatiques
- des moisissures : leur développement est souvent la conséquence d'accidents de séchage

Pour le saucisson sec, parmi tous les microorganismes présents, les plus dominants sont les lactobacilles et microcoques.

Pour la fermentation des viandes on utilise des starters cultures, ce sont des microorganismes viables ajoutés directement dans la viande et qui améliorent les qualités organoleptiques et hygiéniques. L'ajout de ces starters permet une baisse du pH du produit après fermentation.

Le but est de favoriser le développement des microorganismes souhaités, ayant un rôle dans la production d'acides organiques et de composés aromatiques, avec un effet inhibiteur sur les germes indésirables.

Le mélange lactobacilles -microcoques, constitue l'essentiel de l'équilibre microbien, grâce aux avantages combinés de ces deux microorganismes. C'est pour cela qu'il est souvent utilisé en starter de fermentation.

a) Les bactéries lactiques (Bourgeois et *Leveau,* 1991)

On peut en retrouver dans la plupart des produits alimentaires, soit comme germe d'altération ou responsable de fermentation pour exploiter ses effets bénéfiques, comme dans les fromages, saucissons secs ou choucroute.

Les bactéries lactiques sont ajoutées dans le but d'accélérer le processus de fermentation et ainsi améliorer

Tableau 3 : Caractéristiques de Lactobacillus sakei

(d'après Bourgeois C.M et J.Y Leveau, 1991 ; Durand, 1999)

Morphologie	Gram+, non sporulées
Mobilité	Immobile pour la plupart.
Température de culture	Mésophile : croissance optimale entre 15°C et 25°C, incapable de se développer à 45°C.
pH minimal de culture	Entre 3 et 4 unités pH
Type respiratoire	Dépourvu de cytochromes. De ce fait elles sont incapables de respirer mais peuvent sont capable de métabolisme fermentaire. - anaérobie
Voie de fermentation des sucres	Homofermentaire,produit de l'acide L- lactique et peut le transformer en D-lactique par une racemase
Quelques composés fermentés	Glucose, saccharose, lactose, acide gluconique, D-ribose
Quelques composés non fermentés	Maltose, amidon
Forme	Bâtonnet, regroupement par pair ou courte chaîne
Aw minimale pour la multiplication dans la viande	0,94
Bactériocines produites	Sakacin A, Sakacin P et Lactocin S (suivant les souches)
Production d'amines	Histamine, tyramine, phényléthylamine, putricine. Faible ou inexistante

la qualité organoleptique et réduire les accidents de fabrication

Les bactéries lactiques formant un groupe hétérogène. Leur principale fonction métabolique est d'excréter l'acide lactique D(-) ou L(+) ou un mélange de D et de L. Leurs capacités de synthèse sont faibles mais elles présentent de nombreuses qualités. Elles sont utilisées car elles rivalisent avec des bactéries endogènes, produisent en quantité importante de l'acide lactique, sont résistantes au sel, à la température. De plus elles ne sont pas protéolytiques pour ne pas produire une quantité d' H_2O_2 et améliorent la flaveur.

Le genre Lactobacillus comprend 44 espèces.

Il est essentiel de distinguer les bactéries sphériques (Lactococcus, Staphylococcus, Leuconostoc, Streptococcus..) des bactéries cylindriques (Lactobacillus)

b) Lactobacillus sakei

Lactobacillus sakei (ou *sake*) appartient au groupe II du genre des Lactobacillus, qui correspond au genre Streptobacterium de l'ancienne classification d'Orla Jensen (1919). Ce groupe rassemble les lactobacillus mésophiles, donnant une homofermentation du glucose et une hétérofermentation des pentoses et du gluconate.

Le tableau 3 rassemble les principales caractéristiques de *Lactobacillus sakei*.

Ces bactéries ont été trouvées en 1er lieu sur les produits alcool de riz = sakei mais on les retrouve surtout sur les produits carnés et produits à base de poisson cru.

Les bactéries Lactobacillus sakei sont bénéfiques pour la conservation de la viande et sont utilisées couramment pour la fermentation des produits carnés.

Dans le cadre de notre projet nous nous sommes limités pour l'instant à l'utilisation d'un starter contenant exclusivement *Lactobacillus sakei* (TRADI 313). Des essais avec un starter contenant un mélange de bactéries pourront être menés ultérieurement

Matériels et Méthodes

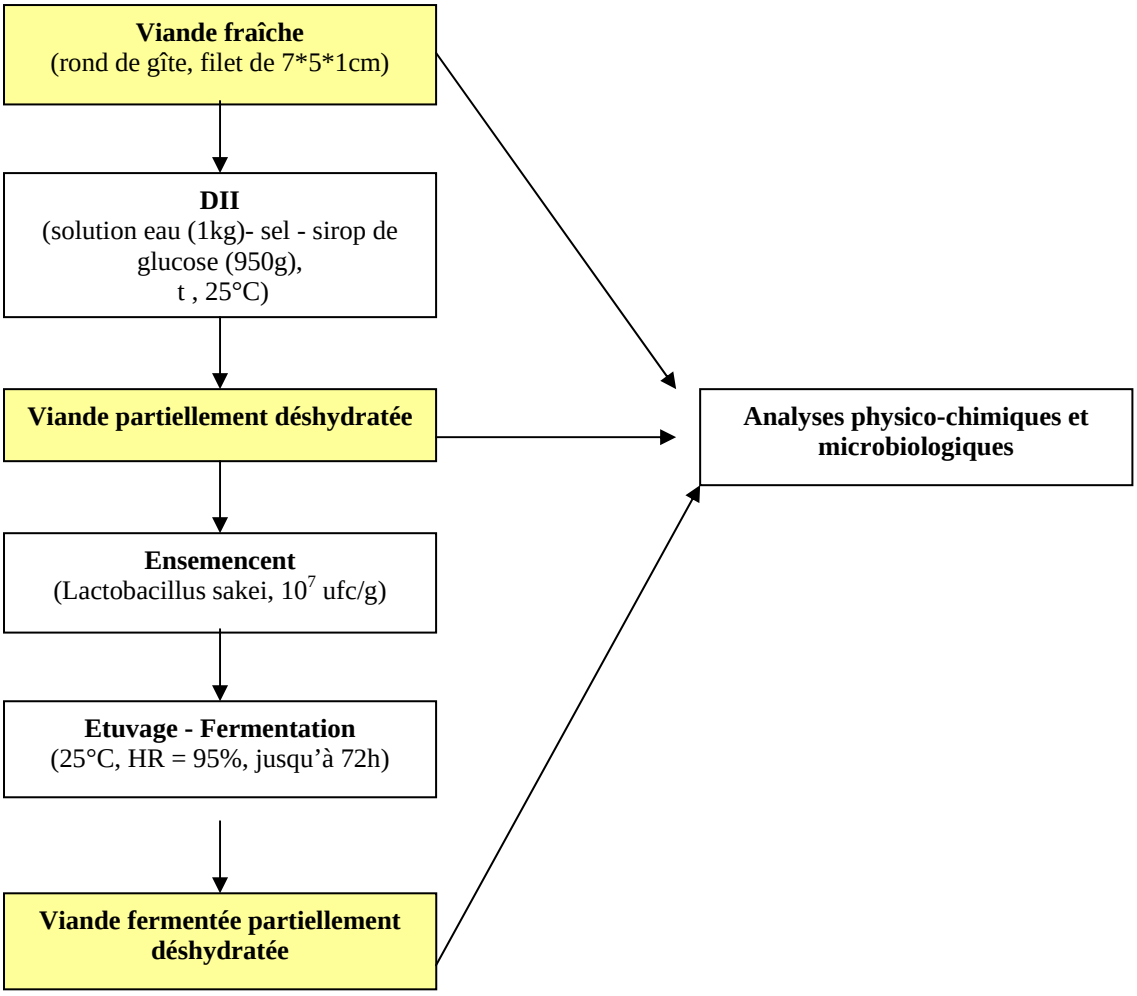


Figure 4 : Les étapes des essais de DII + fermentation de la viande

Matériels et méthodes

I. Méthodologie expérimentale

Les expériences réalisées pendant mon stage suivent un protocole élaboré antérieurement pour l'obtention d'une viande fermentée mais partiellement déshydratée (figure 4).

a) La matière première

Le rond de gîte de bœuf a été choisi comme aliment model car c'est une partie maigre et assez homogène de la carcasse. Il est plus disponible que la viande de cervidé et s'y apparente en terme de teneur en matière grasse (<5%). Le muscle de viande est coupé en morceaux de taille standard (7x5x1cm), conditionnés sous vide et stockés à -18°C. Juste avant utilisation, les morceaux de viande sont décongelés.

b) La DII

Les morceaux de viande, sont disposés sur un portoir et immergés dans la solution concentrée contenue dans un bac hermétique (figure A, annexe 1).

La solution contient, pour 1L d'eau distillée :

- 950g de sirop de glucose DE21 obtenu par hydrolyse partielle d'amidon de maïs pour avoir 21g de sucre réducteur/100g de sirop.
- du sel dont la concentration varie en fonction de la perte en eau et du gain en sel désiré.

L'ensemble est ensuite agité horizontalement (agitateur va-et-vient LS 20 Gerhardt) durant toute l'opération pour renouveler la solution concentrée à la surface du produit et limiter les phénomènes de dilution qui ralentissent les transferts.

En fin de DII les morceaux sont rincés à l'eau distillée avant de reposer 18-20h à 4°C pour équilibrer les concentrations dans les morceaux.

c) L'ensemencement

Les filets de viande sont trempés 5 secondes dans la solution d'ensemencement. Elle est préparée en mélangeant des ferments lactiques (sélection de souche de Lactobacillus Sakei) (TRADI 313, annexe 2), 0,5% de delvocid (inhibiteur de levures utilisé pour la fabrication de fromages et de saucissons secs, annexe 3) et d'eau physiologique.

Pour limiter les contaminations, tout le matériel d'ensemencement est stérilisé soit à l'autoclave, soit aseptisé à l'éthanol.

d) L'étuvage

Les morceaux de viandes sont suspendus dans un panier et introduits dans une enceinte climatique (figures B et C, annexe 1). Cette enceinte est réglée à une température de 25°C et une hygrométrie de 95%. L'étuvage est réalisé pendant 8, 15, 24, 48 et 72h afin de réaliser une cinétique de fermentation. Les conditions d'étuvage ont été choisies de tel sorte à retrouver les conditions de l'air ambiant du milieu tropical et à limiter le séchage au cours de la fermentation pour n'étudier que les mécanismes de fermentation. Pour chaque temps de fermentation, 3 filets de viande sont analysés.

e) Le séchage

Cette étape envisagée pour finir de sécher la viande et ainsi obtenir un produit de type biltong, n'a pas été étudiée.

II. Analyses physico-chimiques

Pour toutes les analyses physico-chimiques, la viande est préalablement broyée finement au robot ménager.

1. Détermination de la perte en poids au cours des opérations de DII et de fermentation

Les morceaux de viande sont pesés avant et après chaque opération (DII et fermentation) afin de calculer la perte en poids des morceaux de viande au cours de chacune des deux opérations.

$$PP = \frac{M_i - M_f}{M_i} \times 100$$

avec :
PP : perte en poids au cours de la DII ou de la fermentation (g/100g de viande)
M_i : poids du filet avant DII ou fermentation (g)
M_f : poids du filet après DII ou fermentation (g)

2. Détermination de la teneur en eau et calcul de la perte en eau au cours des opérations de DII et de fermentation

La teneur en eau est déterminée par séchage à l'étuve (103°C) jusqu'à poids constant (24h). La viande est pesée dans une coupelle en aluminium.

$$TE = \frac{(masse\ d'eau\ évaporée)}{(m)} \times 100$$

avec :
TE : teneur en eau de la viande avant DII ou fermentation (%)
m : masse de l'échantillon (g)

La perte en eau au cours de la DII ou de la fermentation peut alors être calculée :

$$PE = TE_i - \frac{TE_f \times M_f}{M_i}$$

avec :

PE : perte en eau au cours de la DII ou de la fermentation (g/100g de viande)

TE_i : teneur en eau de la viande avant DII ou fermentation (%)

TE_f : teneur en eau après DII ou fermentation (%)

M_i : poids du filet avant DII ou fermentation (g)

M_f: poids du filet après DII ou fermentation (g)

3. Détermination de la teneur en sel et calcul du gain en sel au cours des opérations de DII et de fermentation

La teneur en sel est estimée à partir de la détermination de la concentration des ions chlorures libres après extraction de ces derniers dans une solution d'acide nitrique.

Le dosage se fait grâce à un chloruremètre (Corning chloride analyser 926). L'échantillon est ajouté à une solution tampon acide (acide acétique, acide nitrique). Deux électrodes d'argent, plongées dans la solution, libèrent des ions argent en continu. Ces ions argent se combinent avec les ions chlorures de l'échantillon sous forme de chlorure d'argent. Lorsque tous les ions chlorures ont été précipités sous forme de chlorure d'argent, des ions argent libres apparaissent et la conductivité de la solution change. Ce changement est détecté par les électrodes de mesures. Le choruremètre donne alors directement le résultat en milligramme d'ions chlorures par litre d'échantillon.

La teneur en sel de la viande est ensuite calculée selon la formule :

$$TS = \frac{1{,}648 \times 10^{-4} \times R \times V}{m}$$

avec :

TS : teneur en sel (%)

R : réponse du chloruremétre (mg d'ions chlorure/L)

V : volume de la solution d'acide nitrique utilisé pour l'extraction (mL)

m : masse de l'échantillon (g)

A partir des teneurs en sel nous pouvons calculer le gain en sel au cours de la DII ou de la fermentation :

$$GS = \frac{TS_f \times M_f}{M_i} - TS_i$$

avec :

GS : gain en sel (g/100g de viande)

TS_i : teneur en sel avant DII ou fermentation (%)

TSf : teneur en sel avant DII ou fermentation (%)

Mi : poids du filet avant DII ou fermentation (g)

Mf : poids du filet après DII ou fermentation (g)

4. Calcul du gain en sucre au cours des opérations de DII et de fermentation par le bilan matière

On peut calculer le gain en sucre grâce au bilan de matière.

$PP = PE - GS - Gsucre + P_{solutés\ propres}$ (la perte en solutés propres est négligeable)

Donc Gsucre = PE – GS – PP

$$Tsucre_f = (Gsucre + Tsucre_i) \times \frac{M_i}{M_f}$$

avec :

$Tsucre_f$: teneur en sucre finale (%)

$Tsucre_i$: teneur en sucre initiale (%)

Gsucre : gain en sucre (%)

Mi : poids du filet avant DII ou fermentation (g)

Mf : poids du filet après DII ou fermentation (g)

5. Dosage de l'acide lactique

Pratiqué d'après le protocole des kits enzymatiques Enzytec™ L-Lactic Acid (ID-No. 1 002 890) et D-Lactic Acid (ID-No. 1 002 889).

a) Préparation des échantillons (déprotéinisation)

La viande est déprotéinisée en ajoutant une solution de $C_6F_eK_4N_6$, $3H_2O$ puis de sulfate de zinc. De la soude est ensuite ajoutée pour ajuster le pH.

b) Dosage

Le dosage de l'acide lactique se fait par spectrophotométrie (à 340 nm) en dosant le NADH produit selon la réaction :

$$D-lactate + NAD^+ \xrightarrow{D-LDH} pyruvate + NADH + H^+$$

Pour le dosage de l'acide L-lactique, l'enzyme D-LDH est remplacée par la L-LDH.

La première réaction étant réversible, il est nécessaire d'éliminer le pyruvate par une seconde réaction :

$$pyruvate + D-glutamate \xrightarrow{GPT} D-alanine + 2oxoglutarate$$

Les réactions de dosage se font dans les cuves de spectrophotomètre en plastique. Dans chaque cuve est ajouté : du tampon glycylglycine (490mg d'acide L-glutamique dans 34mL d'eau, pH 10,0), de la solution de NAD (250mg dans 7mL d'eau), une suspension de glutamate pyruvate transminase (GPT), l'échantillon et de l'eau distillée.

Une première mesure de l'absorbance est effectuée, puis une seconde après ajout de l'enzyme L ou D-lactate déshydrogénase. La réaction est totale au bout d'une heure.

$$[acideL/D\,lactique] = \frac{(V \times MW \times \Delta A)}{(\varepsilon \times d \times v)} \times 1000$$

avec :

[acide L/D lactique] : concentration en acide D ou L lactique de l'échantillon (g/L)

V : volume final dans la cuve (mL)

MW : masse molaire de l'acide lactique (90,1 g/mol)

$\Delta A = A_2\ (aprés\ ajout\ de\ LDH) - A_1\ (avant\ ajout\ de\ LDH)$

ε : coefficient d'absorption du NAD à 340 nm (6.3 $L.mmol^{-1}.cm^{-1}$)

d : trajet optique dans la cuve

v : volume de l'échantillon (mL)

$$TacideL/D\,lactique = [acideL/D\,lactique] \times \frac{100 \times v}{m}$$

avec :
Tacide L/D lactique : teneur en acide lactique (%)
v : volume de l'échantillon (mL)
m : masse de l'échantillon (g)

6. Détermination du pH

Il est mesuré à l'aide d'un pH-mètre (Hanna, pH 211) sur un échantillon de viande agité préalablement dans de l'eau distillée.

7. Mesure de l'activité de l'eau (Aw)

La mesure de l'activité en eau, qui traduit la disponibilité de l'eau, se fait au moyen d'un aw-mètre (FA-st/1, GBX). L'échantillon est placé dans l'enceinte de l'appareil. Un miroir en or est chauffé puis refroidit jusqu'à qu'une sonde détecte la présence de condensation à la surface du miroir. L'appareil relève à ce moment la température du miroir. Cette température est égale à la température de rosée et est en relation directe avec la pression de vapeur saturante dans l'enceinte. Un thermomètre infra rouge mesure d'autre part la température de surface de l'échantillon en relation directe avec la pression de vapeur saturante de l'eau à cette même température.

$$Aw = \frac{Pw}{P°w}$$

$$Aw = f\left(\frac{Tm}{Ts}\right)$$

avec :
Pw : pression partielle de vapeur d'eau d'une solution ou d'un aliment (ici dans l'enceinte de l'aw-mètre)
P°w : pression partielle de vapeur saturante de l'eau pure à la même température
Tm : température du miroir
Ts : température de surface de l'échantillon

8. Dosage des sucres

a) Extraction des sucres

Une double extraction est réalisée sous ébullition douce au reflux avec agitation continue pendant une heure à l'aide d'une solution d'alcool éthylique à 80%. La solution est centrifugée et le surnageant obtenu est évaporé sous vide à 50°C puis repris dans de l'eau ultra pure. La solution est filtrée sur filtre whatman puis sur filtre membrane Minisart Sartorius puis stockée au congélateur à -18°C en attendant l'analyse chromatographique.

b) Dosages des sucres

Le dosage des sucres (glucose, maltose, maltotriose, maltotétraose, maltopentaose, maltohexaose , maltoheptaose) a été effectué au laboratoire de la DGCCRF (Direction Générale de la Consommation, de la Concurrence et de la Répression des Fraudes), par HPLC (Chromatographie Liquide Haute Performance) d'échange d'anions (chromatographie ionique) (figure 5).

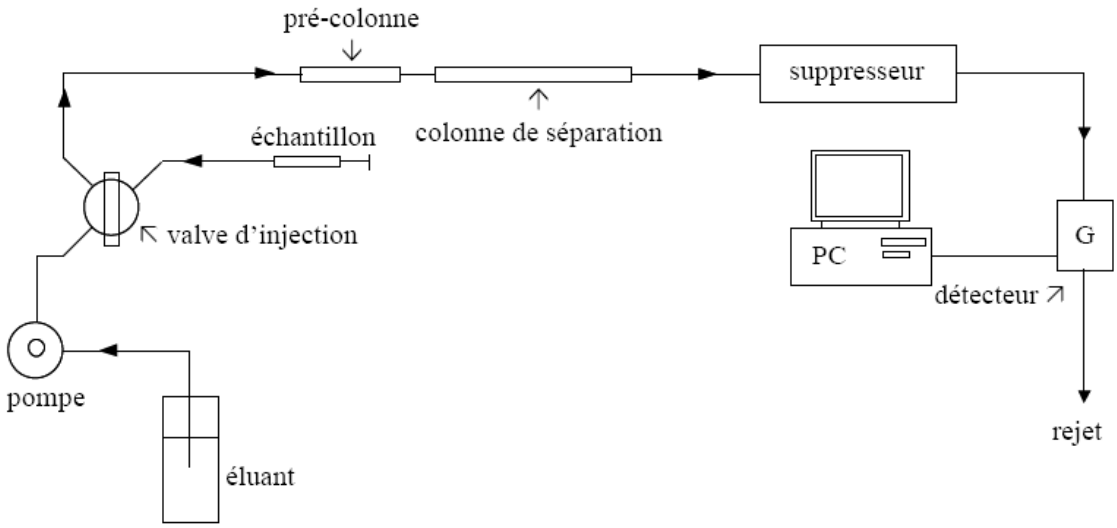


Figure 5 : schéma d'un système de chromatographie ionique

Principe de la chromatographie en phase liquide :

La chromatographie en phase liquide est une méthode physico-chimique basée sur des différences d'interactions entre les solutés, une phase mobile et une phase stationnaire. La phase mobile liquide (ou éluant), parcours en permanence le système chromatographique. Le mélange à séparer et à analyser est mis en solution dans un solvant injecté par l'intermédiaire d'une vanne puis transporté au travers du système. Au niveau de la colonne, les composés en solution se repartissent suivant leurs affinités entre la phase mobile et la phase stationnaire contenues dans la colonne.

Principe de la chromatographie ionique :

Le principe de la chromatographie ionique est basé sur l'ionisation partielle ou totale des espèces à séparer sous un potentiel donné. Les molécules ionisées peuvent alors être séparées par échange d'ions avec la phase stationnaire et la phase mobile.

Les sucres sont des molécules électrochimiquement actives et se comportent comme des acides faibles à pH fortement basique (pH > 12). Les sucres ionisés sont retenus par la phase stationnaire porteuse de groupement ammonium puis séparés sélectivement par l'éluant en fonction de leurs charges. La détection se fait par ampérométrie pulsée, technique basée sur la mesure du courant d'oxydation des sucres à un potentiel déterminé, la concentration des sucres étant proportionnelle au courant d'oxydation mesuré à la surface de l'électrode de travail. L'électrode est soumise à un cycle de trois potentiels répétés deux fois par seconde : le potentiel d'oxydation des sucres, le potentiel de nettoyage de l'électrode et le potentiel de conditionnement de l'électrode. L'ampérométrie pulsée permet une mesure :

- Stable : le cycle des potentiels permet un nettoyage continu de l'électrode
- Spécifique : seules les molécules possédant un groupement alcool secondaire répondent au potentiel d'oxydation
- Sensible : le seuil de détection est de quelques dizaines de pic moles.

Le logiciel, couplé au chromatogramme, permet le pilotage de l'appareillage, l'acquisition des données ainsi que le traitement des résultats. Les pics obtenus sont identifiés, intégrés et quantifiés à partir d'un étalon externe.

Conditions expérimentales : (Annexe 4)

On obtient des chromatogrammes avec différents pics. A l'aide des aires et de notre étalon on peut calculer la concentration en sucre (mg/l)

$$Tsucre = \frac{[sucre] \times dil \times v}{m}$$

avec :
Tsucre : teneur en sucre (%)
[sucre] : concentration du sucre considéré de la solution injectée (mg/L)
dil : facteur de dilution avant injection
V : volume de la fiole jaugée utilisée pour l'extraction (50mL)
m : poids de l'échantillon pesé (g)

On peut comparer cette teneur en sucre déduit par le bilan matière à la teneur en sucre obtenue par HPLC.

9. Dosage des acides organiques

a) Extraction des acides organiques

Les anions organiques et minéraux sont extraits de la viande par une solution d'éthanol à 20% dont le pH est inférieur à 3. L'extraction est effectuée sous ébullition douce au reflux avec agitation pendant une heure avec de l'acide chlorhydrique 0,005N dans une solution éthanolique à 20%. La solution est ensuite centrifugée et filtrée sous vide sur une membrane. Le filtrat est repris dans une fiole jaugée de 50 ml complétée avec de l'éthanol à 20%. Les cations sont éliminés en mélangeant 5 mL de filtrat avec 5 mL d'eau ultra pure (dilution au ½ de l'échantillon) avec 1g de résine échangeuse de cations sous forme H^+ (amberlite IR120). La solution est de nouveau filtrée sur filtre membrane Minisart Sartorius de 0,45µm puis 0,22µm et stockée au congélateur jusqu'à l'analyse chromatographique.

b) Dosage des acides organiques

Comme pour les sucres, les acides organiques sont dosés par chromatographie ionique à la DGCCRF. Le même appareillage est utilisé mais la méthode est quelque peu différente car on utilise une autre colonne pour séparer en gradient les anions minéraux, les acides organiques et les polyphosphates.

Principe de la chromatographie ionique pour les acides organiques :

Comme les ions de différentes valences ont des temps de rétention relativement éloignés en chromatographie ionique, le gradient d'éluant (concentration variable au cours de l'analyse) permet de diminuer le temps d'analyse.

Un suppresseur automatique est utilisé pour abaisser la conductivité de l'éluant avant la détection. Il permet ainsi l'utilisation d'un gradient rapide pour séparer les anions inorganiques monovalents et trivalents, et les acides organiques en une seule injection. L'éluant est suppressé grâce à une réaction d'électrolyse de l'eau. Le potentiel appliqué au suppresseur automatique est fixé par l'éluant le plus concentré (pour cette application, 35mM de soude).

La détection se fait par conductimètrie. Celle-ci est basée sur l'aptitude d'une solution ionique à transporter le courant lorsqu'elle est placée entre deux électrodes de charges différentes. Plus la solution sera riche en ions, plus elle conduira le courant à travers les électrodes « fermant » ainsi le circuit électrique.

Conditions expérimentales : (Annexe 4)

Avec le logiciel, les résultats sont obtenus en mg/l de la solution injectée. Ils sont exprimés en mg/100g de matière fraîche selon la formule :

$$Tac\,orga = \left(\frac{[acide] \times dil \times V \times 100)}{m} \right)$$

avec :

Tac org : teneur en acide organique (%)

[acide] : concentration de l'acide organique considéré de la solution injectée (mg/L)

dil : facteur de dilution (avant injection et dilution au ½ lors de l'extraction)

V : volume de la fiole jaugée utilisée pour l'extraction (= 0,05l)

m : poids de l'échantillon pesé (g)

Tableau 4: Milieux utilisés pour la sélection et le dénombrement des microorganismes

Type de milieu	Microorganismes recherchés	Technique d'ensemencement	Température d'incubation	Temps d'incubation
PCA (Place Count Agar)	Flore totale (bacterie aerobies)	En masse (1ml)	30°C	72h
MRS (Man Rogosa et Sharpe)	Flore lactique (lactobacilles)	En surface (100µl)	35°C	48h
CHAPMAN	Coques	En surface (100 µl)	35°C	48h
SABOURAUD	Levures et moisissures	En surface (100 µl)	35°C	48h

III. Analyses microbiologiques

1. Préparation de la solution mère et des dilutions successives

Les ensemencements sont réalisés en double pour chaque filet.

3 g de viande sont prélevés stérilement au centre des morceaux de viande, placés dans un sachet stérile avec 27mL d'eau peptonée et broyés au stomacher. Cette préparation constitue la solution mère (dilution au dixième de l'échantillon). Puis des dilutions successives sont réalisées en prélevant 1mL de cette solution et en l'introduisant dans un tube à essai contenant 9mL d'eau physiologique stérile (à 9g NaCl/L d'eau distillée). Cette opération est reconduite jusqu'à l'obtention de la dilution souhaitée.

2. Techniques de dénombrement et d'identification

Les microorganismes sont dénombrés par comptage des colonies sur des boîtes de Pétri contenant des milieux sélectifs. Les milieux ainsi que les techniques d'ensemencement, les températures et durées d'incubations utilisés sont indiqués dans le tableau 4.

Pour les ensemencements en surface, 100 µL de solution diluée est étalée à l'aide d'un râteau en plastique stérile. Pour les ensemencements en masse, 1 mL de solution diluée est déposé au centre d'une boîte de Pétri et recouvert avec 20 mL de milieu stérile en surfusion à environ 50°C.

3. Techniques d'identification

Pour vérifier l'identification ou caractériser les bactéries on peut utiliser différentes observations ou tests :

a) Colorations de Gram

C'est une coloration qui permet de mettre en évidence les propriétés de la paroi bactérienne et d'utiliser ces propriétés pour les distinguer et les classifier.

Les deux premières étapes colorent en violet le contenu de la bactérie. L'étape 3 (passage de l'alcool) décolore par dissolution les bactéries dont la paroi est riche en lipides. Les bactéries dont la paroi est pauvre en lipides conservent leur teinte violette foncée. La dernière étape permet une contre coloration ayant pour but de redonner aux bactéries précédemment décolorées une teinte rose permettant de les visualiser au microscope.

A l'issu de cette coloration, les bactéries dont la paroi s'est opposée au passage de l'alcool (du fait de leur épaisseur) apparaîtront en violet foncé et seront dites à Gram positives (G+). D'autres apparaîtrons en rose pâle et seront dites à gram négatives (G^-). Leurs parois, plus fines et riches en lipides (phospholipides) laissent l'éthanol (molécule lipophile) pénétrer dans les cellules.

b) Test catalase

La présence ou l'absence de l'activité de la catalase est une caractéristique taxonomique des

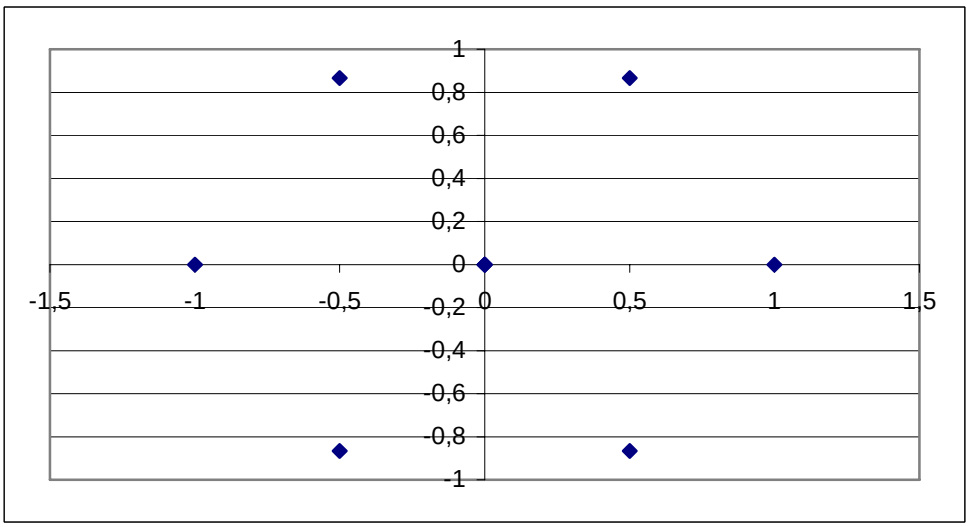
Tableau 5 : Matrice des valeurs codées

essais	[sel]	Temps
1	1	0
2	-1	0
3	0,5	0,866
4	-0,5	-0,866
5	0,5	-0,866
6	-0,5	0,866
7	0	0
8	0	0
9	0	0

Tableau 6 : Matrice des valeurs réelles

essais	[sel] (g/l)	Temps (h)
1	10	17,75
2	5	17,75
3	8,75	28,18
4	6,25	7,08
5	8,75	7,08
6	6,25	28,18
7	7,5	17,75
8	7,5	17,75
9	7,5	17,75

Figure 6 : Domaine expérimentale d'un plan à 2 facteurs



microorganismes. Le réactif test utilisé met en évidence l'enzyme catalase. Cette enzyme est présente dans toutes les cellules à métabolisme aérobie. Ce test est à la base de l'identification des bactéries Gram +.

c) Tests oxydase

OXYDASE TEST DISC permet de mettre en évidence la phénylène diamine oxydase, l'enzyme est capable d'oxyder le N dimétyl paraphénylène diamine.

d) Tests d'identification de *Staphylococcus Aureus*

PASTOREX STAPH PLUS est un test rapide d'agglutination sur lame pour la détection simultanée du facteur d'affinité pour le fibrinogène, de la protéine A et des polysaccharides capsulaires de *Staphylococcus aureus.*

Staphylococcus aureus est un germe pathogène. Le test de détection de la production de coagulase libre permet l'identification de ce microorganisme.

IV. Construction du plan d'expériences en réseau de Doehlert

1. Principe

La méthodologie des plans d'expériences a pour but de modéliser et d'optimiser un procédé, tout en minimisant le nombre d'essais (Goupy, 1988).

Pour modéliser l'effet de la concentration en sel et du temps d'immersion sur le gain en sel et la perte en eau, un plan d'expériences de type réseau de Doehlert à été utilisé, certaines des réponses n'étant pas linéaires.

Dans notre cas, chacune des réponses (perte en eau et gain en sel) est reliée aux facteurs (concentration en sel et temps d'immersion) par un polynôme du second degré.

$$\boxed{y_i = \sum_i a_i X_i + \sum_i a_{ii} X_i^2 + \sum_{i,j} a_{ij} X_i X_j}$$

avec :

y_i : une réponse i

X_i: le facteur i

a_i l'effets linéaire du facteurs X_i

a_{ii} l'effet quadratique du facteur X_i

a_{ij} effet des interaction entre les facteurs X_i et Xj

Le modèle obtenu tient compte des effets des facteurs et des interactions entre ces facteurs (Goupy, 1988).

2. Domaine expérimental :

Le domaine expérimental déterminé par des essais préliminaires décrits dans la partie résultats est le suivant :

- Concentration en sel, notée [sel] varie de 50 à 100g/l
- Temps d'immersion, noté temps varie de 7h10 à 17h45

3. Plan en réseau de Doehlert

Le plan est composé de 9 points expérimentaux et les conditions sont présentées dans les matrices d'expériences (tableau 5 et 6). Ces conditions sont calculées à partir de la matrice des valeurs codées.

Dans cette répartition, tous les points sont équidistants du centre du domaine expérimental. Ils ont disposés régulièrement sur le cercle et forme un hexagone régulier (figure 6).

Les propriétés intéressantes de ce plan sont l'extension du nombre de variables étudiées, le nombre d'expériences peu élevé. Dans le case d'un plan de K facteurs, on a N points expérimentaux, $N = K^2 + K + 3$ (trois répétitions du point central).

Les coefficients de régression sont identifiés et calculés à l'aide du logiciel STATISTICA. L'analyse statistique met en jeu un régression multilinéaire et les techniques d'analyse de variance.

Résultats

Résultats

Dans une première partie, les résultats du plan d'expérience permettant de modéliser l'effet de la concentration en sel et du temps d'immersion sur la perte en eau et le gain en sel sont présentés.

Le deuxième paragraphe concerne les évolutions des caractéristiques microbiologiques et physicochimiques de la viande au cours des opérations de DII. Deux types de DII ont été réalisées provoquant respectivement 20% et 30% de déshydratation.

Enfin, dans une troisième partie les résultats de la mise en fermentation de ces viandes sont étudiés.

I. Influence des conditions de traitement sur la déshydratation et le gain en sel au cours de l'opération de DII

L'objectif de ce projet est de transformer de la viande maigre par une combinaison d'opérations de DII, fermentation et séchage afin d'obtenir un produit de type biltong. Aussi, nous avons dans un premier temps calculé la perte en eau et le gain en sel globaux (au cours de cette succession d'opérations) nécessaires pour obtenir de la viande présentant les mêmes teneurs en eau et en sel qu'un produit de type biltong.

Dans un deuxième temps, un plan d'expériences a été réalisé afin de modéliser les effets des facteurs (concentration en sel et temps d'immersion) sur la déshydratation et le gain en sel au cours de la DII. Le domaine expérimental exploré a été choisi en fonction de la perte en eau et du gain en sel désiré.

L'objectif final de cette première partie de l'étude est de déterminer les conditions de traitement de DII à utiliser pour augmenter la perte en eau tout en obtenant le gain en sel désiré par optimisation du plan.

1. Essais préliminaires

a) Détermination de la perte en eau et du gain en sel global pour arriver à un produit fini de type biltong

On recherche un produit présentant les caractéristiques du biltong qui sont les suivantes (Petit *et al.*, soumis à publication)

$$\begin{cases} TE = 35\% \\ TS = 5\% \end{cases}$$

Ne connaissant pas la teneur en sucre du biltong, nous nous sommes fixés une teneur en sucre de 4% qui est la teneur en sucre de la viande de grisons (Deumier, 1993)

Les filets de bœufs ont les caractéristiques suivantes à l'état initial :

$$\begin{cases} TE = 75\% \\ TS = 0\% \\ Tsucre = 0\% \end{cases}$$

Équation 1 : Perte en eau $$\boxed{PE = TE_i - \frac{TE_f \times M_f}{M_i}}$$

Équation 2 : Gain en sel $$\boxed{GS = \frac{TS_f \times M_f}{M_i} - TS_i}$$

Équation 3 : Gain en sucre $$\boxed{Gsucre = \frac{Tsucre_f \times M_f}{M_i} - Tsucre_i}$$

Équation 4 : Bilan massique $PP = PE - GS - Gsucre + P_{solutés\ propres}$ (on considère que la perte en solutés propres est nulle)

avec $$PP = \frac{M_i - M_f}{M_i} \times 100$$

$$\Longleftrightarrow \quad \boxed{100 - 100\frac{m_f}{m_i} - PE + GS + Gsucre = 0}$$

Nous avons donc un système de 4 équations à 4 inconnues (PE, Gsucre, GS, et mf/mi). Sa résolution par la méthode du pivot de Gauss donne le résultat suivant :

$$\begin{cases} PE = 59{,}4\% \\ G\ sel = 2{,}2\% \\ G\ sucre = 1{,}78\% \\ mf/mi = 0{,}446 \end{cases}$$

La perte en eau globale au cours du procédé doit être de 60%. L'objectif est de pré-sécher au maximum la viande par DII pour la stabiliser et minimiser les risques sanitaires au cours de l'étape de fermentation tout en permettant la fermentation. Une étape supplémentaire de séchage permettra d'obtenir la perte en eau globale souhaitée de 60%.

Le gain en sel au cours de la DII doit être de 2,2%. En effet, aucun traitement postérieur ne peut permettre de diminuer la teneur en sel du produit qui se veut un produit de grignotage prêt à consommer.

Le gain en sucre global doit être de 1,78%. Cependant, une consommation des sucres au cours de la fermentation peut laisser envisager d'obtenir un gain en sucre supérieur au cours de la DII.

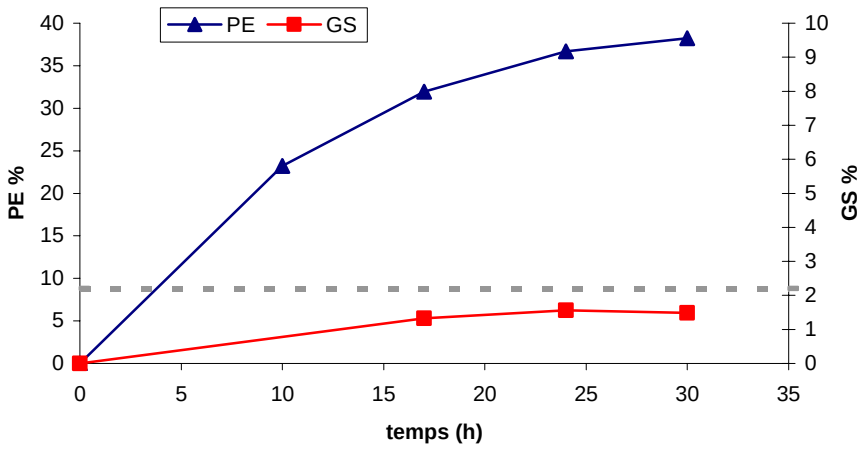


Figure 7 : Cinétique d'imprégnation en sel et de déshydratation lors d'un traitement par immersion dans une solution composée de NaCl [50g/l] et de sirop de glucose [950g/l]

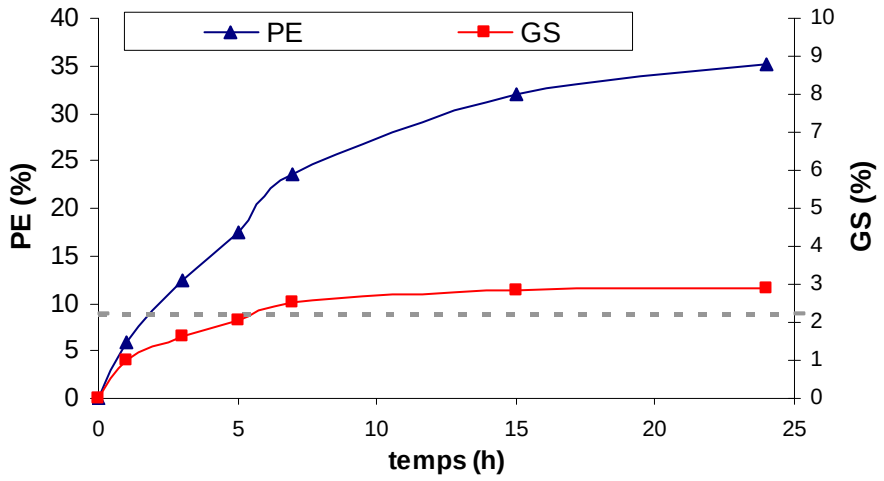


Figure 8 : Cinétique d'imprégnation en sel et de déshydratation lors d'un traitement par immersion dans une solution composée de NaCl [100g/l] et de sirop de glucose [950g/l]

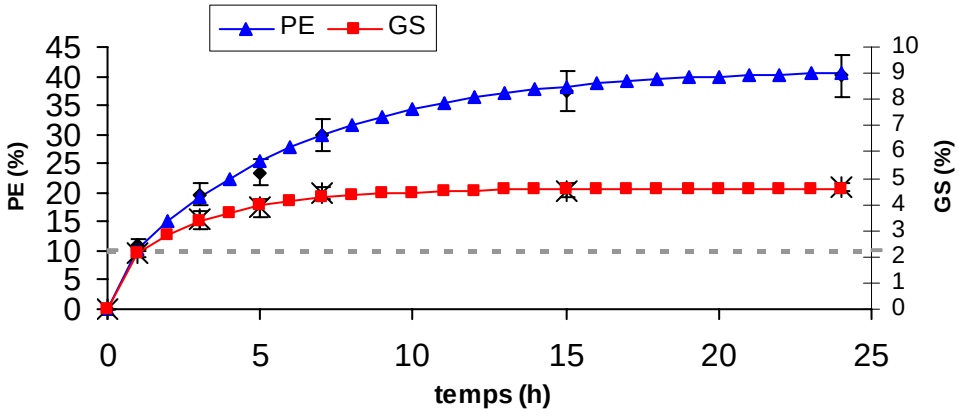


Figure 9 : Cinétique d'imprégnation en sel et de déshydratation lors d'un traitement par immersion dans une solution composée de NaCl [175g/l] et de sirop de glucose [950g/l](d'après Santchurn et al. 2007)

b) Cinétiques de déshydratation et d'imprégnation en sel et détermination du domaine expérimental

Pour déterminer le domaine expérimental du plan d'expériences, trois études cinétiques ont été réalisées sur 24 ou 30h avec une concentration en sucre fixée à 950g/l, et trois concentrations en sel différentes : 50g/l, 100g/l et 175g/l. Ces cinétiques sont représentées sur les figures 7, 8 et 9. Un trait en pointillé a été rajouté pour mieux visualiser la valeur du gain en sel de 2,2%.

La cinétique réalisée avec une concentration en sel de 175g/l montre que pour une perte en eau comprise entre 20 et 30%, le gain en sel est de l'ordre de 4%. Aussi, cette concentration en sel de la solution de DII est trop élevée.

La cinétique réalisée avec 100g de sel/l montre que pour une perte en eau de 20 à 38%, le gain en sel varie de 2 à 3 %. Ces déshydratations et imprégnation en sel sont obtenues pour des immersions d'une durée de 5 à 24h.

Pour la dernière cinétique (50g de sel/L), le gain en sel reste inférieur à 2% pour une perte en eau comprise entre 20 et 38% lors d'immersions de durées comprises entre 10 et 30h.

Ces résultats nous permettent donc de définir le domaine expérimental pour le plan d'expériences suivant :

$50 < Csel < 100$ g/L

$5,5 < temps < 30$ h

En effet, une concentration en sel supérieure à 100 g/L ne permet pas de limiter le gain en sel à 2,2%. Une concentration inférieure à 50g/L n'a pas été envisagée pour ne pas rallonger les temps de traitement. Concernant la durée d'immersion inférieure, une valeur inférieure à 5h30 ne permet pas d'obtenir une perte en eau d'au moins 20% pour les deux cinétiques à 50 et100 g de sel/L et on choisit comme borne supérieure 30h car au delà la perte en eau n'évolue plus.

2. Résultats du plan d'expériences

a) Allure générale des résultats

L'évolution non linéaire de la perte en eau et du gain en sel dans le domaine expérimental défini (figures 8 et 9) nous a amené à réaliser un plan en réseau de Doelhert.

Les tableaux 7 et 8 présentent les résultats expérimentaux du plan d'expériences.

Les effets de la concentration en sel et du temps d'immersion sur la perte en eau et le gain en sel sont résumés dans le tableau 2. L'adéquation entre le modèle et les points expérimentaux est évaluée par le coefficient de régression multiple, R^2. Une analyse de variance et un test de Fisher est effectué sur chaque coefficient afin de connaître son seuil de signification.

Les coefficients de régression des deux réponses « perte en eau » et « gain en sel » sont supérieurs à 0,97 ce qui indique que chacune des deux réponses est très bien représentée par un polynôme de degré 2.

Tableau 7 : Résultats bruts du plan d'expériences

	Concentration en sel		Temps		GS	PE
essais	**Valeurs codées**	**Valeurs réelles (g/l)**	**Valeurs codées**	**Valeurs réelles (heures)**	**g/100g**	**g/100g**
1	1	100	0	17,75	3,08	29,68
2	-1	50	0	17,75	1,57	29,35
3	0,5	87,5	0,866	28,18	2,8	35,23
4	-0,5	62,5	-0,866	7,08	1,77	20,19
5	0,5	87,5	-0,866	7,08	2,23	20,91
6	-0,5	62,5	0,866	28,18	2,03	33,07
7	0	75	0	17,75	2,17	31,33
8	0	75	0	17,75	2,17	28,51
9	0	75	0	17,75	2,17	28,66

Tableau 8 : Effets des variables (concentration en sel et temps d'immersion) sur la perte en eau et le gain en sel au cours de la DII

coefficients	Perte en Eau (PE) %	Gain en Sel (GS) %
constante		
a_0	29,5	2,17
linéaire		
a_1	0,59	0,71***
a_2	7,85 **	0,24**
quadratique		
a_{11}	0,01	0,15
a_{22}	- 2,87	$1,33.10^{-3}$
interaction		
a_{12}	0,83	0,18
R^2	0,97	0,99

Les indices 1 et 2 des coefficients correspondent respectivement à la concentration en sel dans la solution de DII et à la durée d'immersion.
*** $p<0,001$, **$p<0,01$, *$p<0,05$, les autres sont non significatifs.

b) Effets sur la perte en eau

Dans le domaine expérimental étudié, seule la durée du traitement a un impact sur la perte en eau avec un effet linéaire positif signifiant que la perte en eau augmente avec la durée d'immersion. La concentration en sel, quant à elle, n'influence pas de façon significative la perte en eau.

Ces effets sont représentés sur la figure 10.

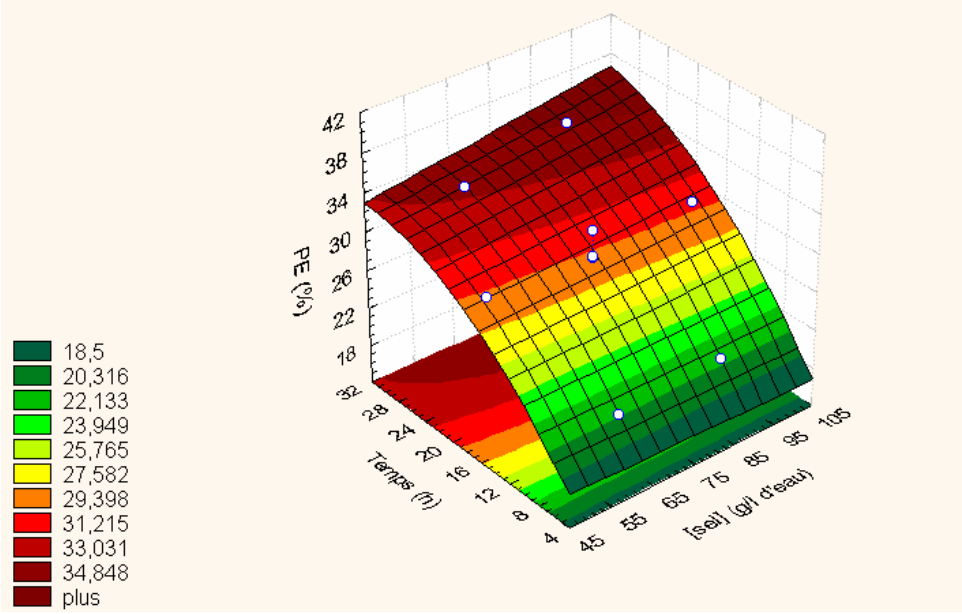


Figure 10 : Effets de la concentration en sel de la solution de DII et du temps d'immersion sur la perte en eau

c) Effets sur le gain sel

On observe des effets linéaires positifs de la concentration en sel et du temps de traitement sur le gain en sel au cours de la DII. Ceci indique que le gain en sel augmente avec la concentration en sel et le temps de traitement. L'effet de la concentration en sel est 3 fois plus important que l'effet de la durée d'immersion dans le domaine expérimental étudié.

La figure 11 représente l'influence de la concentration en sel et du temps de traitement sur le gain en sel.

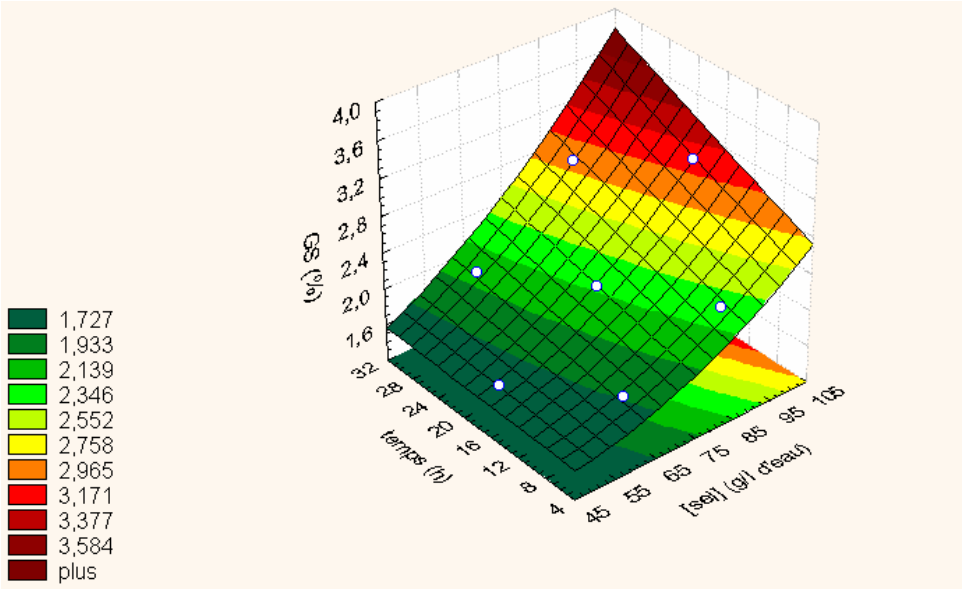


Figure 11: Effets de la concentration en sel de la solution de DII et du temps d'immersion sur le gain en sel

Ces résultats sont valables dans le domaine expérimental étudié.

3. Optimisation du plan

Une optimisation du plan sur la perte en eau et le gain en sel a été réalisée à l'aide du logiciel STATISTICA. Nous avons ainsi pu trouver les conditions de traitement à appliquer pour obtenir, au cours de la DII, une perte en eau de 30% et un gain en sel de 2,2% pour un premier point et une perte en eau de 38% et un gain en sel de 2,2% pour le second point.

Pour obtenir une perte en eau de 30% et un gain en sel de 2,2% il faut appliquer les conditions de DII suivantes :

Durée d'immersion : 17h45h et concentration en sel : 75g/L.

Pour obtenir une perte en eau de 38% et un gain en sel de 2,2% les conditions de DII à appliquer sont :

Durée d'immersion : 30h et concentration en sel : 87,5 g/L.

Tableau 9 : bilan physico-chimique de la viande et de l'opération de DII pour les conditions de DII

		Viande après DII	
	Viande fraîche	Condition 1 (PE 20%)	Condition 2 (PE 30%)
Teneur en eau (%bh)	74,4 ± 0,5	63,9 ± 4,2	58,5 ± 2
Teneur en sel (%bh)	0,082 ± 0,03	2,7 ± 0,6	3,2 ± 0,3
Aw	0,99 ± 0,01	0,97 ± 0,02	0,97 ± 0,02
pH	5,68 ± 0,07	5,7 ± 0,5	5,6 ± 0,1
Teneur en acide L- lactique (%bs)	1,9 ± 0,6	1,9 ± 0,7	2,1 ± 0,2
Teneur en acide D- Lactique (%bs)	0,05 ± 0,12	0,03 ± 0,01	0,07 ± 0,02
Gain en Sel (%)		2,3 ± 0,2	2,4 ± 0,6
Perte en poids (%)		13 ± 2	24 ± 6
Perte en eau (%)		19 ± 4	30,6 ± 0,8

Tableau 10 : Teneurs en sucres de la viande après DII (condition 1, PE 20%)

	Teneur en sucre dans la viande	
	g/100g de viande	% des sucres totaux
glucose	0,39	16
maltose	0,43	17
maltotriose	0,48	18
maltotetraose	0,43	15
maltopentaose	0,26	11
maltohexaose	0,34	12
maltoheptaose	0,24	10

II. Influence de la DII sur les caractéristiques physico-chimiques et la qualité microbiologique de la viande

Nous avons effectué des traitements par immersion de deux types, un nous permettant d'obtenir une perte en eau de 20% et un autre de 30%, le gain en sel pour les deux étant de 2,2%. Nous n'avons pas eu le temps d'effectuer une DII permettant d'obtenir une perte en eau de 38% et un gain en sel de 2,2%. Les conditions de traitement pour ces essais sont les suivantes :

Condition 1 : Solution concentrée eau – sel - sirop de glucose à 100g de sel et 950g de sirop de glucose par kg d'eau. Durée d'immersion de 5h. Cet essai a été répété deux fois.

Condition 2 : Solution concentrée eau – sel - sirop de glucose à 75g de sel et 950g de sirop de glucose par kg d'eau. Durée d'immersion de 17h45.

L'objectif de ce paragraphe est de présenter l'effet de ce traitement sur les caractéristiques physico-chimiques de la viande dans un premier temps et sur la qualité microbiologique dans un deuxième temps.

1. Effet du traitement de DII sur les caractéristiques physico-chimiques de la viande

Des analyses de la viande avant et après la DII ont été effectuées. Les résultats obtenus, reproductibles d'un essai à l'autre, sont synthétisés dans le tableau 9.

Les résultats obtenus sont en accord avec le plan d'expérience. On obtient bien pour la condition 2 de DII une perte en eau de 30% et un gain en sel de 2,4%.

Le traitement par DII entraîne une diminution de la teneur en eau de la viande et de l'activité de l'eau. Celle-ci reste élevée (0,97 quel que soit le niveau de déshydratation).

L'acide L-lactique est naturellement présent dans la viande fraîche à la concentration de 2g/100g de viande. On peut noter que suite à la DII, la teneur en acide L-lactique augmente légèrement notamment lorsque la déshydratation est plus importante du fait de la concentration des acides. L'acide D-lactique, exclusivement d'origine bactérien, est absent.

Pour la DII entraînant une perte en eau de 20% le gain en sucre (calculé d'après le bilan matière) est de 2,2%. La teneur en sucres de la viande de G_1 à G_7 est de 2,5% bh, la teneur en glucose de 0,4% bh. Le glucose représente donc 15% des sucres de G_1 à G_7 (tableau 10).

Tableau 11 : Bilan microbiologique de la viande traitée par DII pour les deux conditions de DII

		Viande après DII	
	Viande fraîche	**Condition 1 (PE 20%)**	**Condition 2 (PE 30%)**
Flore totale (PCA)	$2,9.10^4 \pm 7,1.10^4$	$1,4.10^5 \pm 5,6.10^4$	$9,8.10^4 \pm 1,2.10^5$
Flore lactique (MRS)	$5,6.10^2 \pm 3,2.10^2$	$2,7.10^5 \pm 2,2.10^5$	$8,7.10^4 \pm 3,3.10^4$
Coques (Chapman)	$2,4.10^3 \pm 1,7.10^3$	$4,2.10^2 \pm 3,7.10^2$	$9,6.10^4 \pm 8,6.10^4$
Levures (Sabouraud)	$1,4.10^2 \pm 8,8.10^1$	0 ± 0	$1,0.10^2 \pm 9,3.10^1$

Unités : ufc/g MH (unité formatrices de colonies par gramme de matière humide)

2. Effet du traitement de DII sur la qualité microbiologique de la viande

Les résultats obtenus, reproductibles d'un essai à l'autre, sont synthétisés dans le tableau 11.

a) Flore de la viande fraîche

La viande de bœuf initiale présente une charge d'environ 3.10^4 ufc/g. Dans le cas de la flore aérobie mésophile totale, la norme est de 3.10^5 ufc/g (Durand, 1999). La matière première est donc dans les normes.
Cette flore est constituée de coques (10^3 ufc/g), de bactéries lactiques (10^2 ufc/g), et de levures (10^2 ufc/g).

b) Evolution de la flore aérobie totale au cours de l'opération DII

Dans les 2 cas, on observe une augmentation d'un facteur 10 de la flore aérobie totale au cours de l'opération de DII.

c) Evolution de la flore lactique au cours de l'opération de DII

La flore lactique augmente de 2 à 3 unités log (suivant les essais) au cours du traitement de DII.
Dans le cas d'une DII provoquant une perte en eau de 20%, la flore lactique correspond à la quasi totalité de la flore totale. Alors que pour le cas d'une DII provoquant une déshydratation de 30% autant de coques que de bacilles sont retrouvés.

d) Evolution des coques au cours de l'opération de DII

Cette flore diminue pour la 1ère DII (PE 20%) et augmente d'un facteur 10 dans l'autre cas.

Dans tous les cas, l'absence de la bactérie pathogène : *Staphylococcus Aureus* avant et après DII a été confirmée.

e) Evolution des levures et moisissures au cours de l'opération de DII

En se basant sur la 2ème DII (PE 30%), la quantité de levures n'évolue pas au cours de la DII. L'absence de levures observée après le 1er traitement de DII semble être due à une erreur de manipulation.

➡ **Au cours du traitement par immersion, il semble donc qu'il y ait augmentation de la flore totale d'un facteur 10 avec une croissance plus importante des bactéries lactiques que des coques**.

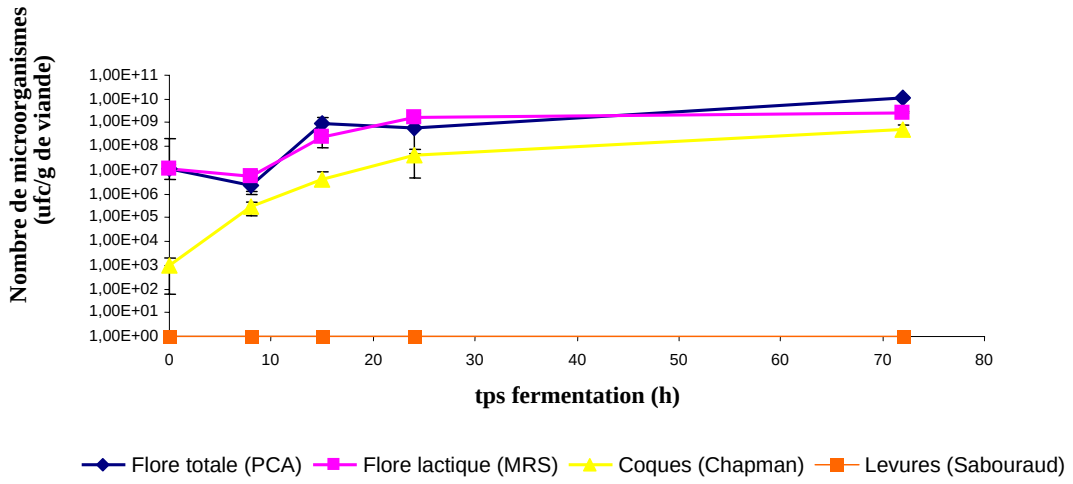


Figure 12 : Evolution de la flore microbienne au cours de la fermentation après une déshydratation de 20% (Cinétique n°1)

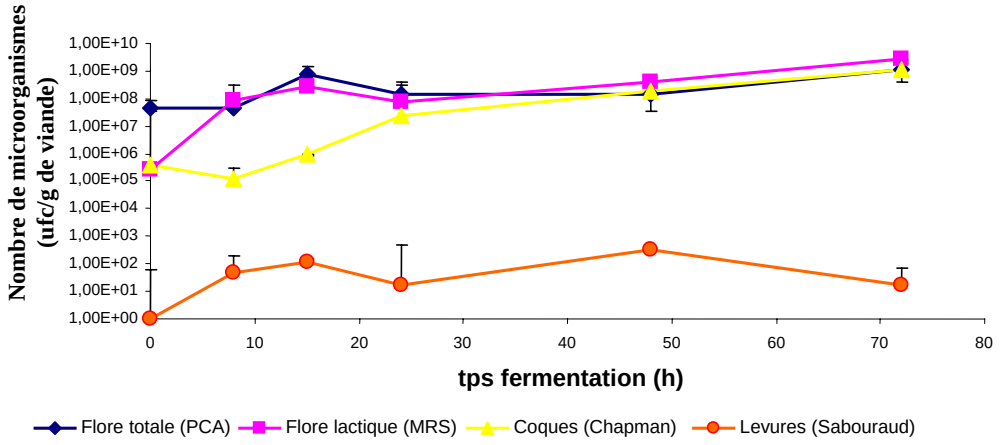


Figure 13 : Evolution de la flore microbienne au cours de la fermentation après une déshydratation de 20% (Cinétique n°2)

III. Etude des effets de la déshydratation par DII sur la fermentation

1. Etude de la fermentation après une DII provoquant une perte en eau de 20%

Cette étude a été menée afin de confirmer des résultats antérieurs (Pegoraro, 2006) quant à l'aptitude d'une viande à fermenter alors qu'elle a subi préalablement un traitement par DII provoquant une perte en eau de 20%, et en ajoutant un inhibiteur de levures dans la solution d'ensemencement. Des analyses complémentaires (dosage des sucres et des acides organiques) ont été réalisées afin de mieux expliquer les mécanismes observés.

Deux cinétiques de fermentation ont été réalisées.

a) Evolution des microorganismes au cours de la fermentation

Les résultats des dénombrements des flores totale, lactique, des coques et des levures sont représentés sur les figures 12, 13.

Les deux cinétiques sont relativement similaires.

Les courbes montrent que l'on a bien une croissance des flores totale, lactique et des coques suivant un profil classique de croissance microbienne caractérisé par deux phases :

- Une phase de croissance pendant les premières 24h d'étuvage avec augmentation de la flore
- Une phase stationnaire : de 24 h à 72h pendant laquelle la croissance est ralentie

• Evolution de la flore totale

La flore totale augmente d'une unité log.

• Evolution de la flore lactique

Lors de cet étuvage il y a sélection des bactéries lactiques qui se sont développées en masse de plus de 2 unités log. On remarque qu'en fin de fermentation les ferments représentent plus de la moitié de la flore totale.

• Evolution des levures

Le nombre de levures reste nul ou bas par rapport à des essais ultérieurs réalisés sans Delvocid (Pegoraro, 2006). Les levures sont donc bien inhibées par le Delvocid qui s'avère donc être un fongicide efficace.

• Evolution des coques

Les coques ont gagné respectivement 4 et 3 unités log lors de la 1ère et 2ème cinétique de fermentation. Il s'agit donc de la flore qui montre la croissance la plus importante.

Les identifications de *Staphyloccocus Auréus* réalisées à chaque temps de fermentation se sont révélées négatives.

On peut également noter la surprenante augmentation de coques entre la fin de la DII et le temps juste après

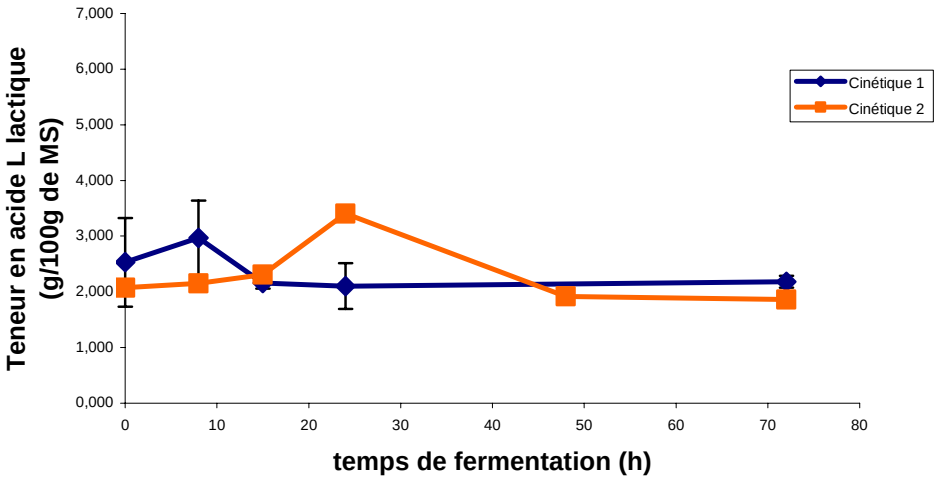


Figure 14 : Evolution de la teneur en acide L- lactique au cours de la fermentation après une déshydratation de 20%

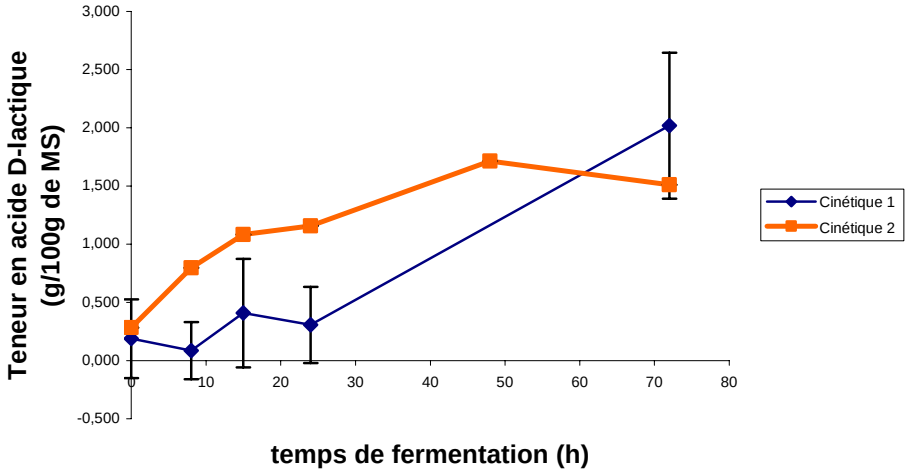


Figure 15 : Evolution de la teneur en acide D- lactique au cours de la fermentation après une déshydratation de 20%

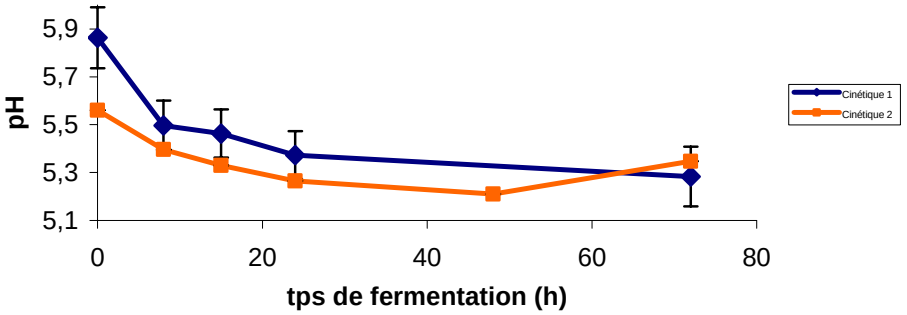


Figure 16 : Evolution du pH de la viande au cours de la fermentation après une déshydratation de 20%

ensemencement (t 0h) pour la cinétique 2. En effet, le nombre de coques passe de 4.10^2 (tableau 11) à 2.10^5 ufc/g de viande (figure 13). Ce phénomène n'est pas observé sur la 1ère cinétique (tableau 11 et figure 12).

Cette augmentation pourrait être due à un mauvais dénombrement à t 0h des coques. Le nombre de lactobacilles à t 0h qui est bien inférieur à la flore totale et aux résultats de la cinétique 1 nous conforte dans l'idée qu'il y ait eu un problème de manipulation pour ce temps.

Cependant, cette forte augmentation du nombre de coques juste après ensemencement a été observée dans des essais antérieurs. Aussi, peut-on imaginer qu'elle pourrait être due à un apport de coques par la solution d'ensemencement. Cette dernière a donc été analysée et les résultats du dénombrement sont présentés dans le tableau A en annexes 5. Dans le tableau B sont résumés les résultats des tests d'identification.

On retrouve bien sur MRS des bacilles gram+ ce qui laisse envisager que ce sont bien des Lactobacillus Sakei même si leur identification n'a pas été réalisée.

Le nombre de coques s'élève dans la solution d'ensemencement à 100ufc/mL. Aussi, la solution d'ensemencement ne serait pas à l'origine de l'augmentation des coques au moment de l'ensemencement observée. D'après les tests d'identifications, ces coques sont catalases$^+$ et oxydases$^-$. Ce sont donc des Staphyloccoques.

b) Evolution des caractéristiques physico-chimiques au cours de la fermentation

La croissance bactérienne et les conditions d'étuvage induisent des changements physico-chimiques de la viande au cours de la fermentation.

• Evolution de la perte en poids et de la perte en eau

Les 2 essais sont reproductibles. La perte en poids des morceaux de viande est quasi linéaire et atteint 19% à 72h. Cette perte en poids est due au séchage au cours de l'étuvage (18 % de perte en eau à 72h) malgré les 95% d'humidité relative régnant dans l'enceinte.

L'activité de l'eau diminue faiblement au cours de la fermentation (0,96 à t 72h).

• Evolution de la teneur en acide lactique

Les figures 14 et 15 montrent l'évolution au cours des deux essais de fermentation de la teneur en acide lactique D et L.

La teneur en acide L lactique reste constante au cours de la fermentation.

L'acide D lactique, absent de la viande fraîche, voit sa teneur augmenter pendant la fermentation. Il y a production de cet acide par les bactéries lactiques qui se développent. La teneur atteint 1,5 à 2g/100g de matière sèche à 72h.

Son évolution est cependant quelque peu différente pour les deux cinétiques de fermentation. A noter cependant que le point à 48h n'a pas été réalisé pour l'essai 1. Pour le premier essai, la production d'acide D lactique est faible jusqu'à 24h puis sa teneur augmente beaucoup entre 24 et 72h. Par contre, pour le 2ème essai, la production est plus importante jusqu'à 48h puis s'arrête. On observe même une diminution entre 48 et 72h.

• Evolution du pH

Au cours de l'essai 1, le pH diminue tout au long de la fermentation pour passer de 5,8 à 5,4 (figure 16).

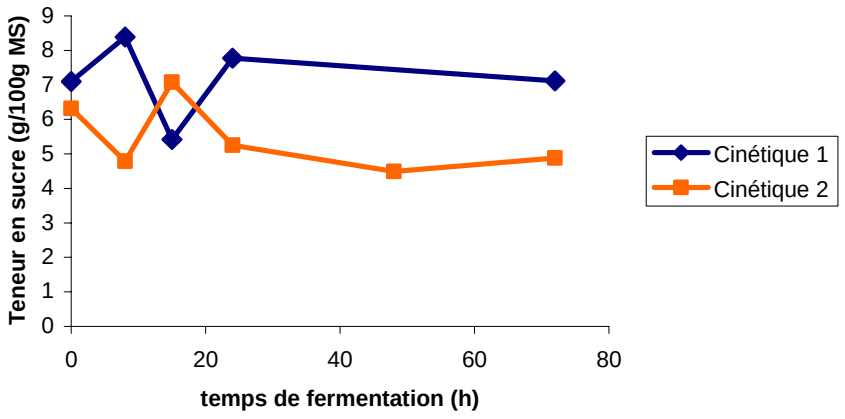


Figure 17 : Evolution de la teneur en sucres totaux au cours de la fermentation après une DII de 20%

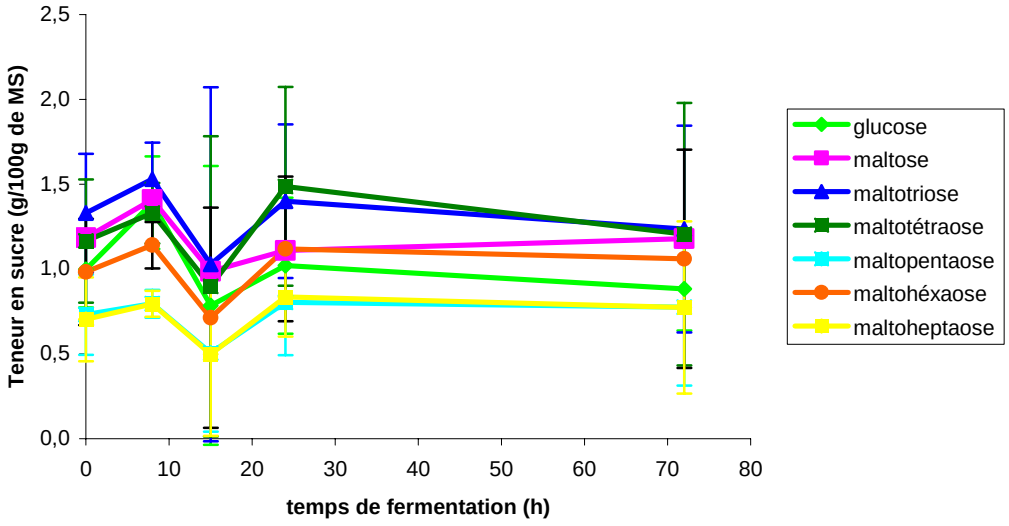


Figure 18 : Evolution de la teneur en sucres au cours de la fermentation (cinétique 1)

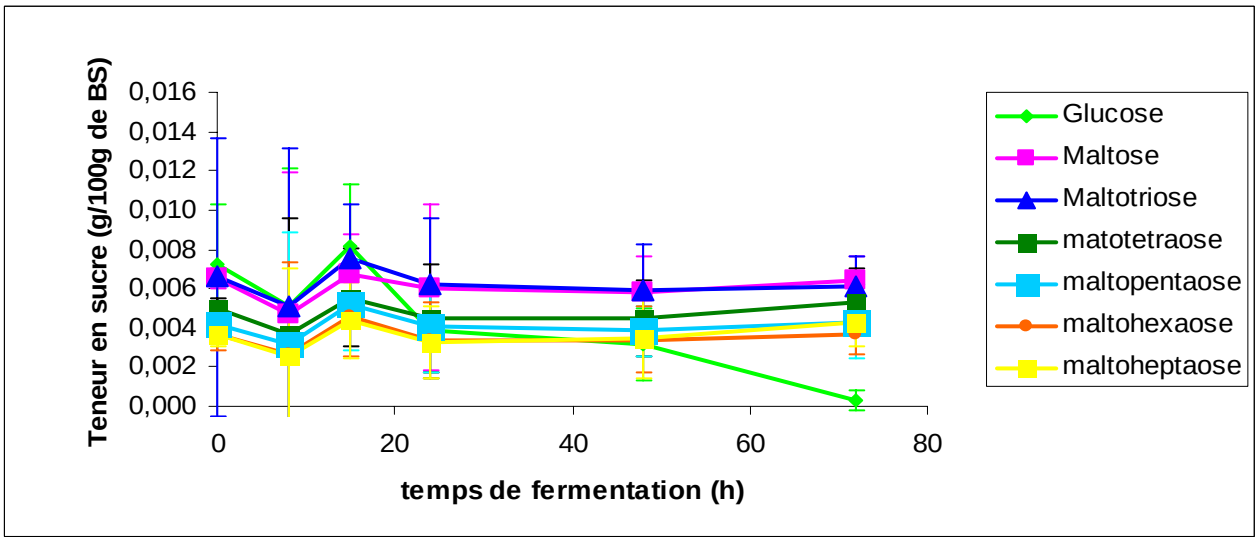


Figure 19 : Evolution de la teneur en sucres au cours de la fermentation (cinétique 2)

Pour l'essai 2, le pH passe de 5,6 à 5,2 en 48 h et réaugmente à 5,3 entre 48 et 72h ce qui peut s'expliquer par la diminution de l'acide D-lactique (figure 15) pendant le même temps. Cette évolution du pH entre 48 et 72h ne peut être confirmée par l'essai 1 du fait de l'absence du point à 48h.

- **Evolution des teneurs en sucres**

Les résultats des deux essais sont décrits sur les figures 17, 18 et 19. On peut globalement dire que les teneurs en sucres de la viande ne varient pas beaucoup et leur évolution entre 0 et 24h (augmentation puis diminution ou l'inverse selon la cinétique considérée) est difficile à expliquer.

Seul le glucose semble diminuer globalement entre 0 et 72 h pour la 2ème cinétique de fermentation. Sa teneur initiale est de 6,3g/100g de matière sèche. Il est même totalement consommé à 72h.

- **Evolution de la teneur en acides organiques**

Les acides organiques n'ayant jamais été dosé sur ce type de matrice, la première étape de ce travail a été d'identifier les acides organiques extraits. Les chromatogrammes (dont un exemple est donné en annexe 6) montrent 5 pics aux temps de rétention (présenté dans le tableau D annexe 7) :

Le tableau C annexe 7 donne les temps de rétention d'un certain nombre d'étalons : l'acide lactique, pyruvique, acétique, oxalique et citrique. On peut donc en conclure que le 1er pic est l'acide lactique. Mais on ne retrouve ni l'acide acétique, ni l'acide pyruvique, acides auxquels nous pensions au départ. Les autres acides ne sont pas non plus l'acide oxalique et l'acide citrique.

D'autre part, des injections d'acide D lactique et d'acide L lactique montrent que ces deux isomères ne peuvent être séparés par HPLC ionique.

Les teneurs en acide lactique totales calculées à partir du dosage HPLC et du dosage enzymatique sont présentées dans le tableau E annexe 7. Les résultats montrent que ces teneurs ne sont pas comparables.

Nous avons voulu voir si les acides n°2 à 6 évoluaient au cours de la fermentation avant de s'engager dans l'achat de nouveaux étalons.

Pour les acides 2 à 6, l'évolution des aires des pics (la teneur ne pouvant être calculée sans étalon) est représentée figures D, E, F, G, dans l'annexe 8

➡ **Les bactéries lactiques se développent, il y a production d'acide D lactique (jusqu'à 1,5 à 2%bs), baisse du pH (jusqu' à 5,2) et consommation du glucose qui passe de (1,3 à 0,03%bs à 72h). On peut donc conclure qu'il y a une fermentation lactique après une DII de 20%.**

2. Effet d'une déshydratation plus importante par DII (PE = 30%) sur la fermentation

Cette cinétique a été menée afin d'étudier l'aptitude d'une viande à fermenter alors qu'elle a subi préalablement un traitement par DII provoquant une déshydratation de 30%.

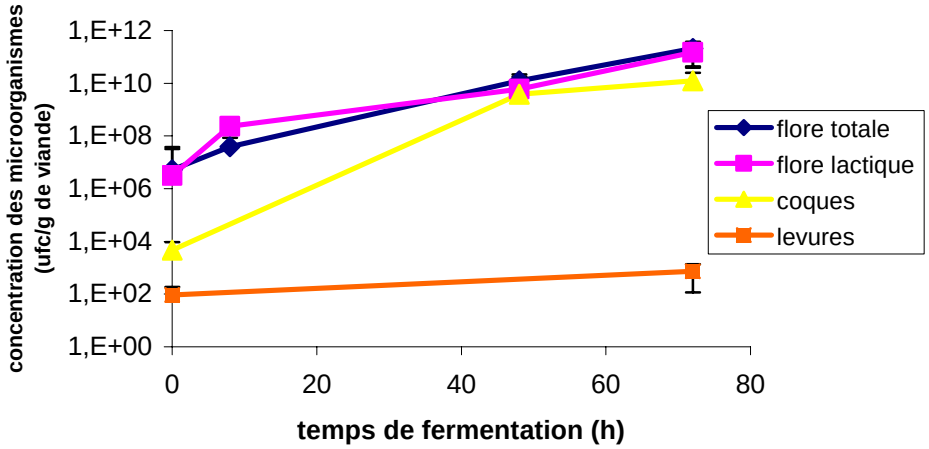


Figure 20 : Evolution des flores microbienne au cours de la fermentation après une déshydratation de 30%

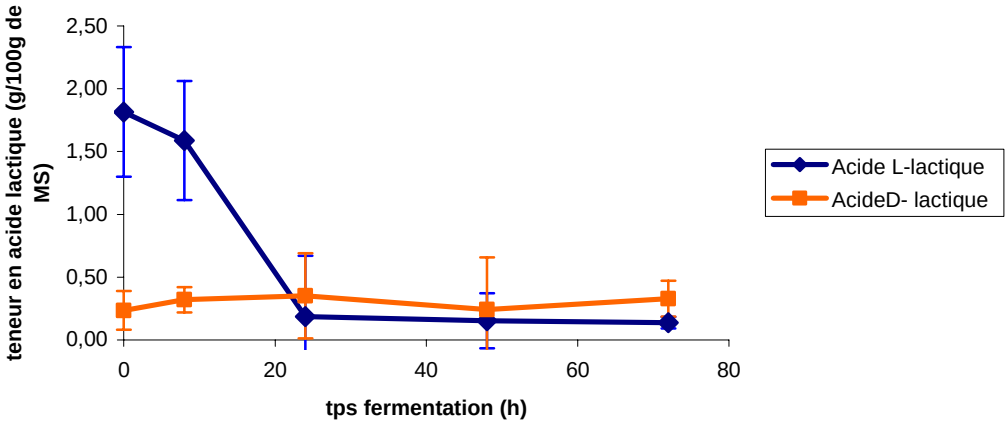


Figure 21: Evolution de la teneur en acide lactique D et L au cours de la fermentation, après un traitement DII de 30%

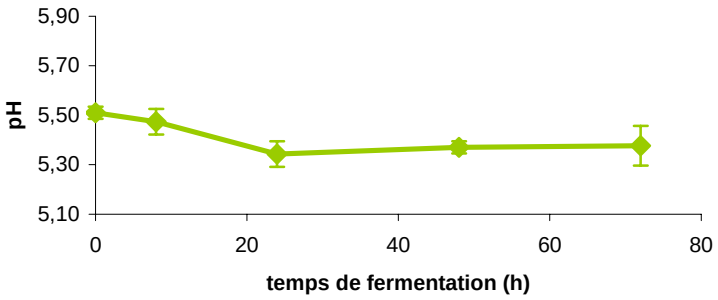


Figure 22: Evolution du pH des filets de viande au cours de la fermentation après avoir subi un traitement DII 30%

a) Evolution des microorganismes au cours de la fermentation

L'évolution des flores microbiennes au cours de la fermentation après une DII provoquant une perte en eau de 30% est représentée figure 20.

Comme dans le cas de la fermentation d'une viande moins déshydratée on retrouve une croissance de la flore totale, de la flore lactique et des coques. Cependant, en fin de fermentation, la flore lactique et la flore totale sont plus élevées puisqu'elles atteignent 10^{12} contre 10^{9} après la DII provoquant 20% de perte en eau. A t0, on retrouve pourtant le même nombre de microorganismes.

Ce résultat est cependant à prendre avec précaution car les colorations de gram ont montré qu'on retrouvait un grand nombre de coques au milieu des bacilles sur le milieu MRS.

Concernant les coques, ils sont de 10^{3} après ensemencement et augmentent de 7 unités log, ils sont donc également plus nombreux que dans les essais sur la viande moins déshydratée. Aucun *Staphylococcus Aureus* n'a été identifié.

Le nombre de levures (déterminé uniquement à 0 et 72h de fermentation pour contrôle) est de l'ordre de celui retrouvé pour les essais antérieurs soit 10^{2} à 10^{3} et n'augmente pas au cours de la fermentation.

b) Evolution des caractéristiques physico-chimiques au cours de la fermentation

- **Evolution de l'acide lactique**

L'acide L lactique est totalement consommé en 24 h de fermentation (figure 21). Il n'y a aucune production d'acide D-lactique.

- **Evolution du pH**

Le pH diminue peu jusqu'à 24h (il passe de 5,51 à 5,34) puis se stabilise (figure 22).

➡ Malgré la croissance des flores, l'absence de production d'acide lactique et de diminution du pH laisse penser qu'il n'y a pas eu fermentation

Discussion

Discussion

I. Influence des conditions de DII sur la déshydratation et l'imprégnation en sel

La fabrication d'un produit de type biltong par la combinaison d'opérations de DII, fermentation et séchage éventuel nécessite, d'après les caractéristiques initiales et finales des produits, une perte en eau globale de 60%, un gain en sel et un gain en sucre globaux de 25,2 et 1,8% respectivement.

Grâce au plan d'expériences nous avons pu déterminer précisément les conditions de traitement (concentration en sel et temps d'immersion) à appliquer en DII pour obtenir une perte en eau de 30% ou de 38% et un gain en sel de 2,2%. Concernant ce deuxième point de fonctionnement, la perte en eau recherchée était de 40%. Cependant, nous avons vu que 38% de déshydratation était la limite qu'il était possible d'observer avec une solution composée de sirop de glucose à 950g/L et de sel quelle que soit sa concentration.

La possibilité d'utiliser, en remplacement du sirop de glucose, la mélasse est une perspective intéressante. En effet, des essais antérieurs, présentés en bibliographie ont montré son efficacité en terme de déshydratation puisque une perte en eau plus importante (allant jusqu'à 50%) avait été obtenue. Cependant, l'utilisation de ce soluté entraîne une imprégnation en sucre plus importante.

Quoiqu'il en soit, une étape complémentaire de séchage s'avère nécessaire pour obtenir un produit aussi déshydraté que le biltong.

II. Quelle est l'évolution de la qualité microbiologique de la viande pendant le traitement de DII ?

Au cours de la DII nous avons obtenu une augmentation de la flore bactérienne d'un facteur 10 et ce à plusieurs reprises. Ce résultat est en opposition avec des essais antérieurs (Pegararo, 2006 et Deumier, 1993) qui quant à eux avaient observé une diminution d'un facteur 10 de cette flore.

En effet la forte concentration en solutés de la solution d'immersion constitue un milieu défavorable pour la croissance des microorganismes (diminution de l'activité de l'eau, augmentation de la pression osmotique).
D'autre part, les viandes au départ possédaient des niveaux de contaminations semblables.
Les analyses de la viande après DII ayant, pour notre part, toutes été réalisées après avoir passé 16-20 h au frigo, la croissance de flores a peut être eu lieu dans cette période.

On remarque tout de même qu'au cours de la DII, on a croissance des bactéries lactiques qui représentent au moins la moitié de la flore totale ce qui laisse envisager une sélection de la flore lactique pendant le traitement de DII. Pour vérifier cette hypothèse, il faudrait identifier le nombre et le type de microorganismes de la viande avant et après DII.

Par ailleurs, les tests d'identifications réalisés ont montré que les coques présents n'étaient pas des *Staphylococcus Aureus* ce qui est rassurant quant à la qualité sanitaire de la viande.

III. La fermentation est-elle possible après une déshydratation de 20% ?

Il semble qu'il y a bien fermentation lactique après une déshydratation de 20%.

En effet la fermentation se caractérise, pour un saucisson sec, par une baisse du pH jusqu'à 5 et une production d'acide D lactique de 0,5g/100g de matière fraîche (Durand, 1999)

Nous obtenons des valeurs du même ordre de grandeur. Le pH minimum observé est de 5,2 et il y a production d'acide D lactique de plus de 0,5g/100g de viande. On note également la croissance de la flore lactique.

Pour les deux cinétiques réalisées, le pH diminue jusqu'à 48h. Entre 48 et72h de fermentation, il continue de diminuer dans un cas et réaugmente très légèrement pour le 2ème cas. Ce qui confirme les résultats antérieurs de fermentation réalisés avec le Delvocid (Durand, 1999). Avant ajout de Delvocid, le pH revenait systématiquement à sa valeur initiale entre 48 et 72h. Le delvocid a donc été introduit dans le protocole standart.

L'évolution du pH concorde avec l'évolution de la teneur en acide lactique. En effet, cette dernière augmente jusqu'à 72h ou au moins jusqu'à 48 et stagne ou diminue très légèrement entre 48 et 72h.

La non concordance entre l'évolution de l'acide lactique et le pH des essais antérieurs nous avaient amené à vouloir doser les autres acides organiques éventuellement présents.

Les résultats obtenus pour le dosage des acides organiques, ne sont pas précis et nous n'avons pas pu identifier les différents acides présents dans la viande. D'après la littérature, on devrait retrouver dans la viande fermentés les acides suivants : lactique, pyruvique et acétique. Durand (1999) indique une teneur en ces acides dans le saucisson sec qui reste faible. Nous n'avons réussi à identifier que l'acide lactique, l'analyse ne nous permet pas de faire de distinction entre l'acide D et L lactique. Les teneurs en acide lactique obtenues avec le dosage du kit enzymatique ne sont pas comparables aux teneurs obtenues après un dosage par HPLC.

De plus, les aires des pics obtenus sont très faibles sauf un, ce qui ne nous permet pas de moins diluer l'échantillon avant injection. Des essais complémentaires devront être réalisés.

La fermentation se caractérise également par une transformation de glucose en acide lactique. Aussi, est-il

nécessaire d'observer également une consommation de glucose pour conclure quant à la fermentation.

Nos résultats montrent que le glucose est bien consommé au cours de la fermentation notamment entre 48 et 72h pour lequel il est totalement consommé. Sa teneur initiale était de 6,75% bs. Aussi, sa consommation est de l'ordre de grandeur de la production d'acide lactique.

Il s'agit du seul sucre dont la teneur diminue ce qui semble logique puisque Sakei ne fermente que le glucose et le fructose. Mais ce résultat est à confirmer puisque sur les deux cinétiques réalisées, il n'a été observé qu'une seule fois.

On peut maintenant se poser la question de savoir si la teneur en sucre et notamment en glucose de la viande est assez élevée après la DII pour une bonne fermentation. Celle ci pourrait être favorisée par une teneur plus élevée en glucose ou autre sucre fermentescible. Les sucres de grosses masses molaires sont nécessaires pour limiter l'imprégnation en sel mais il serait possible d'augmenter la concentration de glucose dans la solution d'immersion pour augmenter sa teneur dans la viande. Sur ce point, la mélasse s'avérerait là encore un soluté intéressant puisqu'elle est plus riche en petits sucres. Une analyse de sa composition en sucres nous apporterait plus d'informations à ce sujet.

Les bactéries lactiques se développent, il y a production d'acide D lactique du même ordre de grandeur que la consommation de glucose et baisse du pH (jusqu' à 5,3). Nous pouvons en déduire qu'il y a une fermentation lactique après une DII de 20%.

IV. La fermentation est-elle possible après une déshydratation plus poussée de 30% lors du traitement de DII ?

En analysant les résultats nous constatons qu'il n'y a pas de fermentation suite à une déshydratation plus poussée jusqu'à 30%. En effet, bien qu'on observe une croissance des microorganismes et une baisse du pH, il n'y a pas production d'acide D lactique.

Il n'est cependant pas possible d'affirmer avec certitude que cette perte en eau plus importante au cours de la DII empêche la fermentation sans avoir répété cette manipulation (une cinétique seulement réalisée).

On ne retrouve pas de *Staphylococcus Aureus* au cours de la fermentation. Ce résultat est encourageant pour la suite du projet en ce qui concerne la qualité de la viande.

Conclusion et Perspectives

Conclusion et Perspectives

Ce travail nous a montré qu'après un traitement DII la déshydratation maximale qu'il est possible d'obtenir est de 38% pour un gain en sel de 2,2% et un gain en sucre fixé à 4%.

Au cours de la DII, les flores semblent augmenter. Une analyse qualitative de la flore présente avant après DII serait nécessaire pour définir avec précisions le rôle de la DII sur les flores.

Ce stage nous a également permis de confirmer l'aptitude de fermentation de la viande de boeuf après une déshydratation-imprégnation par immersion (DII) provoquant une perte en eau de 20 %. Entre 0 et 48h d'étuvage tous les paramètres mesurés sont caractéristiques d'une fermentation :

- croissance de la flore bactérienne de 10^7 à 10^9 ufc/g de viande
- baisse du pH de 0,3 unités
- production d'acide D lactique de 0,2 à 1,5 g/100g de matière sèche.
- consommation totale du glucose dont la teneur initiale est de 6,3g/100g de matière sèche.

En modifiant la formulation de la DII pour obtenir après celle ci une perte en eau de 30% nous nous sommes aperçu que la viande ne semblait pas fermenter. En effet bien qu'on observe une forte croissance bactérienne (10^6 à 10^{11} ufc/g), une baisse du pH (0,2 unités) il n'y a pas de production d'acide D lactique.

Il est nécessaire de renouveler cette cinétique pour confirmer qu'une viande déshydratée à 30% ne peut être fermentée. Ce résultat est peut être du à la déshydratation mais aussi à la faible teneur en glucose initiale. L'augmentation de la concentration en glucose pourrait favoriser la fermentation même à ce niveau de déshydratation.

Des essais avec une solution de DII plus riche en glucose s'avère être une perspective intéressante.

L'utilisation de la mélasse permettrait à la fois de déshydrater de façon plus importante la viande et l'enrichir en petits sucres. Cependant sa composition exacte en sucres (notamment fructose, glucose) reste à analyser.

Durant la fermentation, les coques augmentent de façon importante. Nous n'avons pas retrouvé de *Staphylococcus Aureus*. Il est donc nécessaire de les identifier et ainsi connaître leur rôles dans la fermentation. Pour cela une analyse complète de la viande fraîche s'impose. De plus, l'utilisation d'une souche pure de ferment, nous permettrait de mieux maîtriser les mécanismes en jeu.

L'étape de séchage n'a pas encore été mise au point afin de finir la déshydratation de notre produit.
A long terme, une formulation basée sur celle du biltong (rajout divers ingrédients de salaison) est envisagée, ainsi que des analyses sanitaires et organoleptiques.

Annexes

Annexe 1 : Photos au cours du protocole

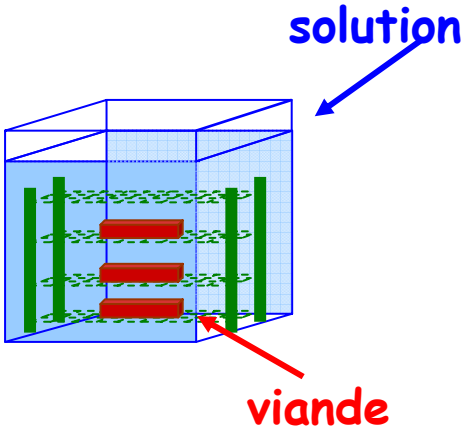


Figure A: Dispositif du traitement DII

Figure B : Morceaux de viande pendant l'étuvage

Figure C : Enceinte climatique

Annexe 2 : Fiche Ferments

SOUSSANA TECHNOLOGIE

TRADI 313

Ferment de maturation

DEFINITION

Ferments destinés aux applications pour saucissons secs nécessitant une acidification moyenne.

TRADI 313 est une sélection de *Lactobacillus sakei*. Le *L. sakei* permet une maîtrise et une régulation de la chute du pH sur un format traditionnel.

La vitesse d'acidification **TRADI 313** est adaptée à tous les types calibres, très apprécié sur des calibres moyens il est particulièrement efficace sur les plus grosses pièces. Le **TRADI 313** s'utilise seul ou en complément de staphylocoque ou encore d'un mélange de ferment.

DECLARATION D'INGREDIENTS

Ferments de maturation, ferments lactiques ou ferments.

SECURITE ALIMENTAIRE

Le produit ainsi que ses composants :

Ne contiennent pas d'O.G.M. à déclarer, tels que définis par les Règlements CE N°1829/2003 et N°1830/2003 du 22 septembre 2003.
N'ont pas été soumis à un traitement d'Ionisation.

Concernant les Allergènes figurant dans la liste de l'ANIA reprise dans la Directive 2003/89/CE, nous vous énumérons ci-dessous les allergènes présents dans le produit :
aucun

DOSE D'EMPLOI

Sachet-dose pour 200kg

SOUSSANA S.A. : 13, RUE DES ALOUETTES, 94320 THIAIS – FRANCE (1) 49 78 58 00 – TELECOPIE (1) 49 78 58 88 – E-MAIL soussana@soussana.com
SOCIETE ANONYME FONDEE EN 1919 AU CAPITAL DE 2.400.000 €. – REGIE PAR LES ARTICLES 118 à 150 DE LA LOI DU 24/07/1966
R.C.S. CRETEIL B 572 080 838 – CODE APE 151 A – C.C.P. PARIS 105 109 E

ADRESSER TOUTE CORRESPONDANCE A : BP 202, 94527 THIAIS CEDEX

Nos produits sont conformes aux spécifications de la fiche technique et les éléments de leur composition sont indiqués en toute bonne fois. La proposition de déclaration d'ingrédients n'est qu'une suggestion d'étiquetage ; la déclaration d'ingrédients étant de la responsabilité du fabricant du produit fini. Les applications ne sont mentionnées qu'à titre indicatif. Le fabricant doit se conformer à la législation s'appliquant au produit à fabriquer dans le pays utilisateur. Toute utilisation non conforme de nos produits n'engage pas notre responsabilité mais celle du fabricant du produit fini.

MODE D'UTILISATION

Les mélanges de ferments sont incorporés au minerai lors du hachage ou cuttérage des viandes ou pendant la phase de pétrissage :

- soit directement en l'état
- soit dissous dans un peu d'eau

Les températures de fermentation recommandées sont comprise entre 20 et 24°C pour environ 48 heures. Les conditions de température et d'hygrométrie devant être adaptées aux produits et à l'environnement.

CONDITIONNEMENT

Par carton de 50 sachets doses (imperméables à l'air et à l'eau) par carton.

STOCKAGE ET DUREE DE VIE

Date de péremption indiquée sur les sachets :

- en frigo à une température inférieure à +5°C : 6 semaines.
- en congélateur à une température inférieure à -17°C : 12 mois.

NT 929 – mise à jour : 3/06
TRADI 313 : FE 01 150

SOUSSANA S.A. : 13, RUE DES ALOUETTES, 94320 THIAIS – FRANCE (1) 49 78 58 00 – TELECOPIE (1) 49 78 58 88 – E-MAIL soussana@soussana.com
SOCIETE ANONYME FONDEE EN 1919 AU CAPITAL DE 2.400.000 €. – REGIE PAR LES ARTICLES 118 à 150 DE LA LOI DU 24/07/1966
R.C.S. CRETEIL B 572 080 838 – CODE APE 151 A – C.C.P. PARIS 105 109 E

ADRESSER TOUTE CORRESPONDANCE A : BP 202, 94527 THIAIS CEDEX

Nos produits sont conformes aux spécifications de la fiche technique et les éléments de leur composition sont indiqués en toute bonne fois. La proposition de déclaration d'ingrédients n'es qu'une suggestion d'étiquetage ; la déclaration d'ingrédients étant de la responsabilité du fabricant du produit fini. Les applications ne sont mentionnées qu'à titre indicatif. Le fabricant doi se conformer à la législation s'appliquant au produit à fabriquer dans le pays utilisateur. Toute utilisation non conforme de nos produits n'engage pas notre responsabilité mais celle d fabricant du produit fini.

Annexe 3 : Fiche Delvocid

Delvocid®

Prévention des moisissures sur les produits alimentaires

Introduction

Delvocid® est un fongicide dont le composé actif est la natamycine (pimaricine)/ En 1955, Delvocid fut isolé pour la première fois dans nos laboratoires de recherche à partir d'une souche de *Streptomyces natalensis* (un micro-organisme trouvé dans un prélèvement de sold au Natal en Afrique du Sud). Après des recherches approfondies, nous sommes à même de fabriquer la matière sous une forme très purifiée Le produit pur n'a pas de couleur, ni d'odeur, ni de saveur. Même à des doses infimes, il combat très efficacement les moisissures et levures susceptibles de se développer et de déterriorer les produits alimentaires (voir tableau 1 & 2). Delvocid® n'ayant aucune influence sur les bactéries, le processus naturel de maturation se déroule normalement dans le fromage, le jambon cru et le saucisson sec.

Comme aucun autre produit jusqu'ici n'était capable de combattre de façon efficace et sans effets secondaires néfastes l'apparition de moisissures et levures sur des produits alimentaires, nous avons étudié, de façon approfondie, les applications éventuelles de Delvocid® dans le domaine alimentaire. Il apparaît que la prévention des moisissures en alimentation devient un intêret primordial depuis qu'il a été reconnu que certaines moisissures rencontrées sur des produits alimentaires produisaient des matières très toxiques (mycotoxnes) (1, 2, 3) actuellement à l'étude (1,4). Des publications de l'OMS (5), de Wogan (6) et de beaucoup d'autres, font ressortir ce problème en ajoutant que certaines de ces mycotoxines ont des proriétés très cancérigènes. Depuis 35 ans l'expérience montre que Delvocid est quasiment la solution idéale pour la prévention des moisissures en alimentation.

Sensibilité des moisissures à la Pimaricine (tableau 1)

	MIC Min. inhibition conc. µg/ml
Aspergillus chevalieri 4298	0 63
Aspergillus clavatus	01 -0.5
Aspergillus flavus CBS 3005	6.0
Aspergillus flavus 88 67	4.5
Aspergillus flavus Madagascar	5 0
AspergilJus flavus Port Lamy	5.0
Aspergillus nidulans	1.0
Aspergillus niger	1-1.8
Aspergillus ochraceus 4069	2.5
Aspergillus orycae	10
Botrytis cinerea	1-25
Fusarium sp	10
Gloeosporium album	2.5
Mucor mucedo	1.2-5
Penicillium chrysogenum	0.6-13
Penicillium digitatum	2.5
Penicillium expansum	5
Penicillium islandicum	1.1
Penicillium notatum 4640	5
Penicillium roqueforti var. *punctatum 6018*	10
Rhizopus oryzae 4758	10

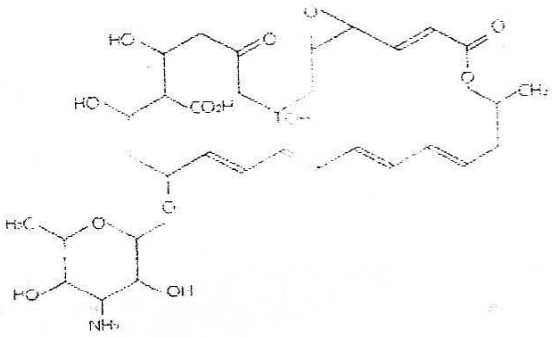
Sensibilité des levures à la Pimaricine (tableau 2)

	MIC Min. inhibition conc. µg/ml
Brettanomyces bruxellensis	1.5
Candida albicans	1.5-2.0
Candida guilliermondii	3.0 mg/L
Candida vini	1.0
Hansenula polymorpha	1.0
Kloeckera apiculata	3.0
Saccharomyces bailii	1.0
Saccharomyces bayanus	1.0
Saccharomyces cerevisiae 8021	2.5
Saccharomyces cerevisiae var. *ellipsoideus*	2.5
Saccharomyces exiguus	2.5
Saccharomyces ludwigii 0339	2.5
Saccharomyces rouxii 0562	5
Saccharomyces sake 0305	5
Torulopsis candida	2.0
Torulopsis *lactis-condensi*	3.0

Propriétés

1. Structure

Delvocid® dans sa forme pure est obtenue sous forme de poudre cristalline. Sa structure chimique compliquée a entretemps été déterminée. Sa formule empirique est $C_{33}H_{47}NO_{13}$. Sa formule développée est la suivante :



2. Propriétés physiques

Delvocid® n'a pas de couleur, ni d'odeur, ni de saveur. Sous sa forme cristalline, Delvocid® est très stable. Le spectre ultra violet montre des maxima à α = 250, 295, 5, 311 nm. La rotation spécifique de la pimaricine varie sensiblement dans trois solvants organiques importants : α^{25} dans l'acide acétique glacial est de +272,8, dans le Butanol de +250,0 et dans le DimethylFormamide de +58,0. Les spectres peuvent servir à des fins d'identification et d'analyse. La solubilité dans l'eau et dans la plupart des solvants organiques est extrêmement faible. A température ambiante, 50 mg environ se dissolvent dans un litre d'eau. Grâce à sa solubilité Delvocid® convient par excellence, aux produits alimentaires. Delvocid® ne pénètre pas dans l'aliment, et reste sur la surface. Ainsi Delvocid ne pénètre pas dans l'aliment, et reste sur la surface. Ainsi, Delvocid® est le plus actif là où apparaissent la plupart des moisissures et levures, tandis qu'il n'influe pas sur les processus de fermentation indispensables pour certains aliments. Delvocid® est amphotère ; sa solubilité dans l'eau est plus faible près de la neutralité et augmente en pH acide ou alcalin.

3. Propriétés chimiques

Comme indique Delvocid® est appartient au groupe des tétraènes. C'est justement l'appartenance à cette famille qui explique, en grande partie, l'efficacité de Delvocid® sur les moisissures et levures. Par contre, cette structure le rend quelque peu sensible aux agents oxydants et aux rayons ultra-violets.

4. Propriétés microbiologiques

Delvocid® combat activement presque touts les moisissures et levures, mais est inopérant contre les virus, les bactéries et autres micro-organismes. Des expériences tant au laboratoire qu'en pratique l'ont démontré.

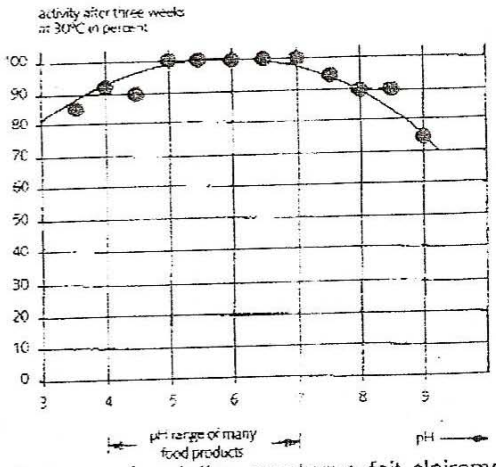
Généralement, la concentration minimum d'inhibition est fonction de la quantité de micro-organismes présents. Voir la concentration minimu d'inhibition (CMI) d'un certain nombre de levures et moisissures (tabl. 1 & 2). Ces valeurs ont été obtenues sous des conditions identiques vis-à-vis du pH, de la température et de la teneur initiale en germes.

5. Activité et stabilité

La faible concentration et la stabilité de Delvocid® sur le produit traité, expliquent l'intérêt de l'application. Pour le Delvocid® en suspension, la stabilité est délimitée par les facteurs suivants : acidité (pH), température, lumière, agents oxydants et métaux lourds.

A. Acidité pH

L'efficacité de Delvocid® sur les moisissures et levures en suspension aqueuse diluée n'est pas influencée par le pH. C'est le grand avantage de Delvocid® par rapport à certains autres fongicides. Cependant, l'acidité influe sur la stabilité de Delvocid®. Avec un pH intérieur à 3 ou supérieur à 9, la suspension Delvocid® est moins stable. Le schéma 2 montre l'activité restante d'une suspension aqueuse à 0,1 % après stockage à 30°C à un pH donné. Le pH de la plupart des aliments se situe entre 4 et 7 et ceci se révèle la plage où Delvocid® se révèle le plus stable.

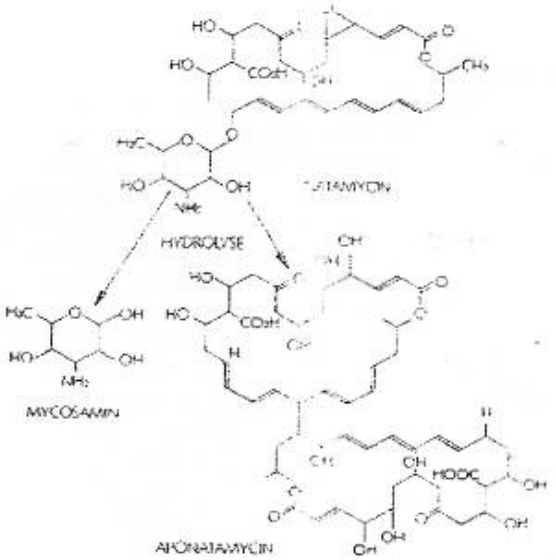


Cette représentation graphique fait clairement ressortir la grande stabilité du Delvocid® dilué dans une large zone de pH ; ceci n'est nullement une image exagérée, car à une température de 30°C, la courbe de la stabilité se situerait même encore un peu plus haut.

B. Température

Une suspension aqueuse de Delvocid® peut supporter pendant plusieurs jours une température de 50°C sans conséquences perceptibles. Elle subit même, avec succès, un chauffage à 100°C pendant plusieurs heures. Toutefois, des « solutions diluées » sont moins stables et la diminution de l'activité est due principalement à l'hydrolyse de la partie mycosamine dans la molécule (voir schéma 1).

Les données détaillées sont fournies dans le diagramme.



Statut et réglementation du Delvocid®

La présence de moisissures sur les aliments constitue un danger pour l'homme. Un certain nombre de moisissures produisent des substances très toxiques (mycotoxines) même à des températures très basses, certaines sont cancérigènes. Ces substances étant secrétées par le mycélium, se répandent dans les poroduits alimentaires et le nettoyage de la surface n'élimine donc pas la présence des mycotoxines. La prévention des moisissures est donc primordiale et l'effet fongicide du Delvocid® d'une grande importance. De plus, le risque de détérioration d'importants stocks de produits alimentaires devient le souci constant des producteurs et distributeurs.

Un bon fongicide doit répondre aux critères suivants :

- Grande efficacité contre *toutes* les moisissures pouvant causer détérioration ;
- La stabilité doit être suffisante pour préserver les aliments des moisissures pendant la période de stockage ;
- Innocuité pour le consommateur ;
- Prix de revient inchangé ;
- Ne doit pas influer sur la qualité, l'aspect extérieur, l'odeur, la couleur et la saveur.

Delvocid® satisfait à tous ces critères. Depuis 1967, dans la plupart des pays de l'Europe de l'Ouest, Delvocid® a été utilisé de façon croissante sur une grande gamme de fromages et de saucissons. Son utilisation constante dans les entrepôts de fromage (7) n'a jamais conduit à la sélection de souches résistantes et les doses d'emploi, établies dans des conditions rigoureusement contrôlées, sont restées inchangées.

Delvocid® offre aussi les avantages supplémentaires suivants :

- traités à la concentration très faible de 5 mg/kg d'aliment, les aliments sont préservés longtemps des moisissures et levures. Delvocid est donc un fongicide d'une efficacité extra ordinaire ;
- Delvocid® prévient la formation des produits issus de moisissures toxiques ou cancérigènes ;
- Delvocid® ne présente aucun danger pour la santé de l'homme. Des recherches scientifiques et des expériences pratiques, depuis de longues années, l'ont prouvé amplement à maintes reprises ;
- Delvocid n'influe pas sur le prix de revient. Au contraire, Delvocid® permet de faire des économies considérables ; les soins en cave sont diminués, les perte par suite de détérioration sont évitées, tandis qu'on ne reçoit pas de plaintes de la part des acheteurs ;
- Delvocid® rehausse la qualité et l'aspect des aliments traités. Ceux-ci ont un aspect plus attrayant.
- Delvocid® reste à la surface des aliments et ne les pénètre pas.

Point de vue de la législation

La législation surveille constamment et activement la santé du consommateur. De nombreux pays ont une législation concernant les additifs alimentaires et des recommandations FAO/OMS dans le Codex Alimentaire. Sur la base d'informations fournis par DSM, les experts du FAO/AMS attribuent pour l'homme une dose journalière admissible (DJA) de 0,3 mg par kilo de poids corporel (8).

Cette dose journalière admissible (DJA) ayant une très large marge de sécurité, n'est pas atteinte même en cas de consommation importante de fromage et de saucisson.

L'utilisation de Delvocid pour certains produits alimentaires est autorisée en UE, Argentine, Australie, Bahrein, Canada, Chili, C.I.S., République Tchèque, Finlande, Israël, Koweit, Mexique, Norvège, Oman, Philippines, Pologne, Quatar, Arabie Saoudite, Afrique du Sud, Suède, Turquie, Emirats Arabes Unis, USA et Vénézuela. Nous vous conseillons de vérifier régulièrement la mise des législations avec DSM.

Application

Introduction

Le consommateur accepte difficilement la présence de moisissures et levures à la surface de certains fromages. Pour cette raison, le fromager doit essayer d'en éviter le développement au maximum. Toutefois, les conditions de stockage et de marturation favorisent la formation de ces moisissures et levures , une spore de moisissure suffit à contaminer entièrement la surface du fromage

L'élimination mécanique des moisissures n'est pas l'idéal car, durant leur croissance, les moisissures et levures produisent des filaments de mycélium qui pénètrent profondément dans le fromage, se ramifient et conduisent à une nouvelle croissance surperficielle interne. De plus, ils produisent de nombreuses métabolites dont certaines, très toxiques, peuvent nuire à la santé du consommateur. L'élimination superficielle des moisissures visibles n'influe pas sur les métabolites se trouvant à l'intérieur de la croûte, et par conséquent, ne représente pas une garantie pour le consommateur. Pour cette raison, la prévention de la croissance des moisissures et levures doit s'effectuer en utilisant un conservateur alimentaire. DSM Food Specialties a developpé et introduit plusieurs formulations qui se sont révélées très efficaces dans l'industrie fromagère et commercialisé sous la marque Delvocid® Instant, un produit poudre possédant 50 % de matière active : Natamycine (Pimaricine).

Delvocid® Instant possède les avantages suivants, comparé à d'autres conservateurs alimentaires déjà utilisés dans l'industrie fromagère :

- Delvocid® Instant est, à des concentrations très basses, très actif contre toutes les levures et moisissures.
- Delvocid® Instant n'ayant pas d'activité bactéricide, ne perturbe pas la maturation du fromage et n'entrave aucunement la croissance de la flore de surface (morge bactérienne)
- Delvocid® Instant n'a pas de couleur, ni d'odeur, ni de saveur.
- Delvocid® Instant ne pénètre pas dans le fromage. De plus, étant très actif ; cela rend son emploi à la fois facile et économique.

Formulations

1. Delvocid® Instant

Delvocid® Instant est une poudre contenant 50 % de matière active. Sa suspension dans l'eau est facile. Elle convient, par excellence, aux fromages ne nécessitant pas d'enrobage et est très efficace our les fromages dont la maturation s'effectue sous film.

S'utilise par immersion ou pulvérisation des fromages. De plus, très valable pour les fromages présentant, à leur surface une flore bactérienne sans formation de moisissures et ou la maturation s'effectue sous des conditions naturelles. Il est recommandé de traiter les fromages avec une suspension de 0,3 - 0,5 % de Delvocid® Instant. Occasionnellement, la dose peut être plus forte ou plus faible, celle-ci étant adaptée aux conditions locales.

2. Produit plastique d'enrobage au Delvocid® Instant

Pour l'enrobage des fromages, les fabricants ajoutent du Delvocid® Instant aux produits plastiques. Le produit d'enrobage donne un aspect extérieur brillant au fromage et évite sa déshydration. Le produit doit contenir au minimum 0,1 % de Delvocid® Instant. Les concentrations peuvent varier selon le temps de stockage et le nombre de traitements. Pour être efficace, l'enrobage doit avoir un pH d'au moins 4,5 et ne contenir ni métaux lourds ni péroxyde

Les enrobages contenant du Delvocid® peuvent être obtenus de plusieurs fabricants d'enrobages.

A voir également : fiche produit Superdex®, Delvocoat® et Plasticoat®.

Application

La pratique démontre qu'il est plus simple de prévenir la formation de moisissures que de la combattre. Il est donc recommandé de traiter les fromages au Delvocid® Instant, le plus tôt possible : dès leur sortie du bain de saumure ou de la presse. Dans certains cas, il est préférable de rincer les fromages à l'eau (60°C environ) avant de les traiter au Delvocid® Instant, par exemple, lorsque le bain de saumure a été contaminé par certaines bactéries. Les fromages peuvent être traités par immersion ou par pulvérisation d'une suspension aqueuse. Pour certains fromages, il est d'usage d'incorporer le fongicide au film plastique.

Préparation d'une suspension Delvocid® Instant

Tout d'abord, ajouter un poids d'eau équivalent au poids de Delvocid® Instant nécessaire puis homogénéiser

parfaitement. Ensuite, diluer la suspension obtenue à la concentration désirée en ajoutant de l'eau. Les doses exigées sont mentionnées au dose de la couverture

Mode opératoire

1. Immersion ou pulvérisation avec le Delvocid® Instant.

a). Immersion : le fromage est plongé dans la dispersion, soit directement après le bain de saumure, soit après le pressage. Une immersion de quelques secondes est recommandée. Pour éviter le dessalage de la croûte du fromage et limiter la croissance des bactéries, il est recommandé d'ajouter 5-10 % de sel au bain de trempage. La solution reste stable durant 5 jours. Après une nuit, mélanger la suspension car le Delvocid® Instant risque de se déposer. Après immersion, le fromage est séché à l'air puis emballé.

b) Pulvérisation : Delvocid® Instant peut être pulvérisée sur le fromage tout de suite après fabrication afin d'éviter la décantation de la matière active au fond du bac de lancement, le produit doit être brassé continuellement, ou repompé régulièrement. Ceci est important également pour éviter de colmater les buses. Le type de buses utilisé doit permettre la pulvérisation de fines suspensions. Après trempage ou pluvérisation, les fromages doivent sécher à l'air avant d'être emballés dans un film plastique ou recouverts de cire

2. Film plastique d'enrobage au Delvocid® Instant

Delvocid® Instant peut être ajouté aux produits plastiques d'enrobage par le fabricant de ces produits ou par le fabricant de fromage. Il est important de s'assurer de la répartition homogène de Delvocid® dans l'émulsion plastique. En fonction de la taille du fromage, verser la quantité de produit plastique nécessaire pour traiter toute la surface. Etaler à l'aide d'une éponge propre. L'éponge ne doit pas être

plongée dans le liquide d'immersion pour éviter toute contamination et multiplication des bactéries.

Il est évident que chaque côté doit être traité séparément.

Les fromages en forme de boule, tel que l'Edam, peuvent être traités en une seule fois. Afin d'obtenir un enrobage solide et durable, plusieurs applications sont recommandées.

Durée de la protection

Delvocid® Instant est un fongicide ce qui signifie qu'il tue les spores de moisissures et le mycélium. Delvocid® Instant se trouve lentement hydrolysé en composés inactifs ; cette hydrolyse dépendant , en grande partie, de l'humidité durant le stockage et de la quantité d'eau contenue dans la croûte du fromage. Dans la pratique, après un traitement, le fromage étant stocké, emballé, sera protégé durant de longues périodes sans qu'aucune nouvelle infection ne réapparaisse. Les fromages, dont la maturation s'effectue naturellement, seront traités plusieurs fois afin de maintenir la protection. En général, après le premier traitement, la protection est valable 3 semaines et plus ; toutefois, des traitements supplémentaires prolongeront la protection suivant l'évolution de la surface du fromage.

Durée de la protection

Delvocid® Instant est un fongicide ce qui signifie qu'il tue les spores de moisissures et le mycélium. Delvocid® Instant se trouve lentement hydrolysé en composés inactifs ; cette hydrolyse dépendant , en grande partie, de l'humidité durant le stockage et de la quantité d'eau contenue dans la croûte du fromage. Dans la pratique, après un traitement, le fromage étant stocké, emballé, sera protégé durant de longues périodes sans qu'aucune nouvelle infection ne réapparaisse. Les fromages, dont la maturation s'effectue naturellement, seront traités plusieurs fois afin de maintenir la protection. En général, après le premier traitement, la protection est valable 3 semaines et plus ; toutefois, des traitements supplémentaires prolongeront la protection suivant l'évolution de la surface du fromage.

Conditionnement et stockage

Delvocid® Instant est fourni en flacon polyéthylène. Poids net 100 ou 500 grammes. Delvocid® Instant doit être stocké à température ambiante, de préférence à -20°C. Il est recommandé de le protéger de la lumière. Dans ces conditions le Delvocid® Instant peut être conservé pendant 2 ans en flacons fermés.

Le tableau ci-dessous indique de grammes de Delvocid® Instant sont nécessaires pour la préparation de suspension à différentes quantités de matière active (Natamycine).

		Concentration de matière active					
	% Delvocid® Instant :	0.01	0.02	0.05	0.1	0.2	0.4
Quantité d'eau en litres	ppm de Natamycin :	50	100	250	500	1000	2000
10		1 a)	2	5	10	20	40
25		2.5	5	12.5	25	50	100
50		5	10	25	50	100	200
75		7.5	15	37.5	75	150	300
100		10	20	50	100	200	400

a) grammes de Delvocid® Instant/volume d'eau indiqué

Références

1. F Kiermeier, E. Zierer; Zur Wirkung von Pimaricin aus Schimmelpilz Entwicklung auf Lebensmittel.Z.Lebensm U.151 (1973)179
2. L. Bullerman, J. Olivigni. Mycotoxin producing potential of moulds isolated from Cheddar cheese. J. Food Science 39 (1974)1166
3. L. Leistner, F Tauchman; Fleischwirtschaft 50 (1970) 965
4. P Lafont - et al; Toxin production by fifty strains of Penicillin used in the cheese industry. Food Cosmetics Toxicol 14 (1976)137
5. WHO; World Health Organisation, International Agency for Research on Cancer, Annual Report 1970.
6. Wogan, G.N.; Department of Nutrition and Food Science. Massachusetts Institute of Technology. Aflatoxin risks and control measures. Federation Proceedings vo l 27 (1968) no 3.
7. WHO; World Health Organisation, Technical Report Series 599 (1976).

L'information contenue ici est, à notre connaissance, exacte et complète. Néanmoins, toutes recommandations ou suggestions sont faites sans engagement ni garantie

Recommandations pour différents type de fromage (tableau 3)

Type de fromage	Formulation		Taux d'utilisation recommandé (ppm) Delvocid® Instant	Remarques*)
Asiago	Emulsion plastique	+	1000	2ème traitement après 2 semaines
American Blue	Suspension aqueuse	+	2000	+ sel avant piquage
Appenzeller	Suspension aqueuse	+	4000	+ sel
Caccrolla	Emulsion plastique	+	3000	
Caciotta	Suspension aqueuse	+	4000 - 6000	+ sel
Cheddar	Suspension aqueuse	+	3000 - 5000	+ sel
Chanco	Emulsion plastique	+	1000	Répéter dans 2-3 semaines
	Suspension aqueuse	+	4000	+ sel
Cottage cheese	Crème	+	200	
Edam	Emulsion plastique	+	1000	Second traitement après 10 jours
	Suspension aqueuse	+	4000	+ sel
Emmenthaler	Suspension aqueuse	+	4000	Second traitement après 2 semaines
Swiss	Suspension aqueuse	+	4000	+ film
Fontina	Suspension aqueuse	+	3000 - 5000	+ sel
Fontal	Suspension aqueuse	+	3000 - 5000	+ sel
Gouda	Emulsion plastique	+	1000	second traitement après 5 jours
	Suspension aqueuse	+	4000	+ sel
Gruyère	Suspension aqueuse	+	4000	+ sel
Grana	Emulsion plastique	+	5000	Répéter si nécessaire
Herrgards	Suspension aqueuse	+	3000 - 5000	+ sel
Hushaltost	Suspension aqueuse	+	3000 - 5000	+ sel
Manchego	Suspension aqueuse	+	3000 - 5000	
Muenster	Suspension aqueuse	+	4000	+ sel
Oaxaca	Suspension aqueuse	+	2000	+ sel
Peconno Romano	Emulsion plastique	+	5000	
Pategras	Suspension aqueuse	+	2000	+ sel
Prato	Emulsion plastique	+	1000	Répéter dans 2-3 semaines
	Suspension aqueuse	+	3000 - 5000	+ sel
Pröstost	Suspension aqueuse	+	3000 - 5000	+ sel
Provolone	Emulsion plastique	+	5000	
Queso minas	Suspension aqueuse	+	2000	+ sel
Queso blanco	Suspension aqueuse	+	2000	+ sel
Romadur	Suspension aqueuse	+	4000	+ sel
Saint Paulin	Suspension aqueuse	+	4000	+ sel
	Emulsion plastique	+	2000	
Sbrinz	Emulsion plastique	+	5000	
Stilton	Suspension aqueuse	+	3000 - 5000	+ sel
Tilsiter	Suspension aqueuse	+	3000 - 5000	+ sel

*) =+ sel seulement en cas de traitement par trempage

Annexe 4 : Conditions expérimentales de l'analyse HPLC

DOSAGE DES SUCRES :

- Appareil de chromatographie ionique de type DIONEX
- Colonne : Carbopac PA1, 4 x 250 mm , pré-colonne : Carbopac PA1 guard
- Phase stationnaire : résine de billes de polystyrène- divinyl- benzène recouvertes de micro-particules de latex, porteuses de groupements d'ammonium quaternaire
- Boucle d'injection : 25µl
- Eluants : solution de soude 0,1N et d'acétate de sodium 0,03N (A), solution de soude 0,1N et d'acétate de sodium 1N (B), eau ultra pure (C), soude 2N (D)
- Mode d'élution : gradient linéaire qui varie de 100% de A à 50% de A et 50% de B en 30 minutes
- Débit d'élution : 1ml/min
- Détecteur : ampérométrique de type ED40
- Logiciel de pilotage : Peaknet de DIONEX
- Etalon : glucose, maltose, maltotriose, maltotétraose, maltopentaose, maltohexaose, maltoheptaose en poudre, pesés pour obtenir une solution à 50 ppm pour chaque sucre

DOSAGE DES ACIDES ORGANIQUES :

- Appareil de chromatographie ionique de type DIONEX
- Colonne : Ion Pac AS11, pré-colonne : Carbopac PA1 guard
- Phase stationnaire : résine de billes de polystyrène-divinyl-benzène recouvertes de microparticules de latex (très hydrophiles) porteuses de groupements amine quaternaire
- Boucle d'injection : 25µl
- Eluants : eau ultra pure (A), soude 5 mM (B), soude 100 mM (C), soude 200 mM (D)
- Mode d'élution : gradient linéaire de 0,5 mM à 35 mM de soude en 25 minutes
- Logiciel de pilotage : Peaknet de DIONEX
- Etalon : afin d'identifier les acides organiques extraits de la viande, plusieurs étalons, chacun à la concentration de 10 ppm, ont été utilisés : D lactate, L-lactate, mélange de D et L lactate (50:50), acétate de sodium, acide pyruvique, acide oxalique et acide citrique

Annexe 5: Analyse de la solution d'ensemencement

Tableau A: Dénombrement des microorganismes dans la solution d'ensemencement.

	eau + ferments + delvocid	**eau + ferments**
Flore totale (ufc/g)	$5,85.10^{9}$	$8,11.10^{9}$
Flore lactique (ufc/g)	$5,90.10^{9}$	$7,19.10^{9}$
Coques (ufc/g)	$1,00.10^{2}$	$5,00.10^{1}$

Tableau B : Tests d'identification des microorganismes dans la solution d'ensemencement

	eau + ferments + delvocid	**eau + ferments**
Sur Chapman		
GRAM	G^{+}, coques en amas	G^{+}, coques en, amas
Catalase	C^{+}	C^{+}
Oxydase	O^{-}	O^{-}
Test Pastorex Staph	négatif	négatif
Sur MRS		
GRAM	G^{+}, bacilles	G^{+}, bacilles
Catalase	C^{-}	C^{-}
Oxydase	O^{-}	O^{-}

Annexe 6 : Chromatogrammes d'acide organique

Analyse des ANIONS minéraux et organiques
Gradient NaOH
Colonne DIONEX IONPAC AS 11

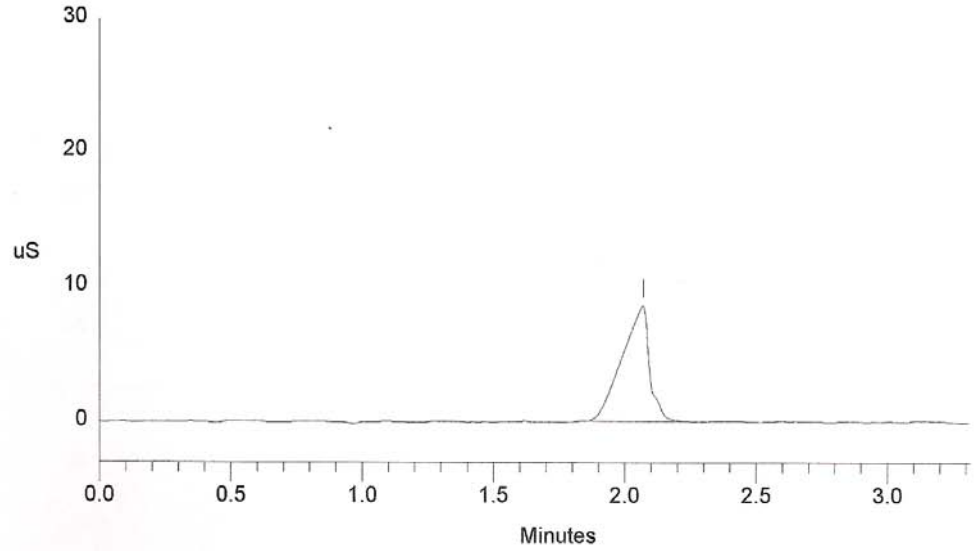
Data File :	C:\PEAKNET\DATA\nit00144.D06	Report Date:	18/01/2007 11:59:43
Sample Name:	Ac lactique L & D 20ppm	Collected :	18/01/2007 11:49:20
Inject # :	6	Vial # :	
Method File:	c:\peaknet\method\anion.met	Calibrated :	18/01/2007 10:44:39
System Name:	DIONEX	Detector :	ED40:COND
Column Type:		Operator :	section1
Data Points:	996	Rate :	5.00 Hz
Module Name:		Moduleware :	1.15

Calibration	Volume	Dilution	Start	Stop	Area Reject	Pk. Width	Threshold
External	1	1	0.00	3.32	1000	10.00	11.05

********** Peak Report: All Peaks **********

No Pic	temps Ret.	Nom du Composé	Concentration ppm	Hauteur du Pic	Surface du Pic	Bl. Code	%Delta
1	2.07	pyruvate	67.11	85328	619750	1	32.13
		Totals	67.11	85328	619750		

File: nit00144.D06 Sample: Ac lactique L & D 10ppm



Analyse des ANIONS minéraux et organiques
Gradient NaOH
Colonne DIONEX IONPAC AS 11

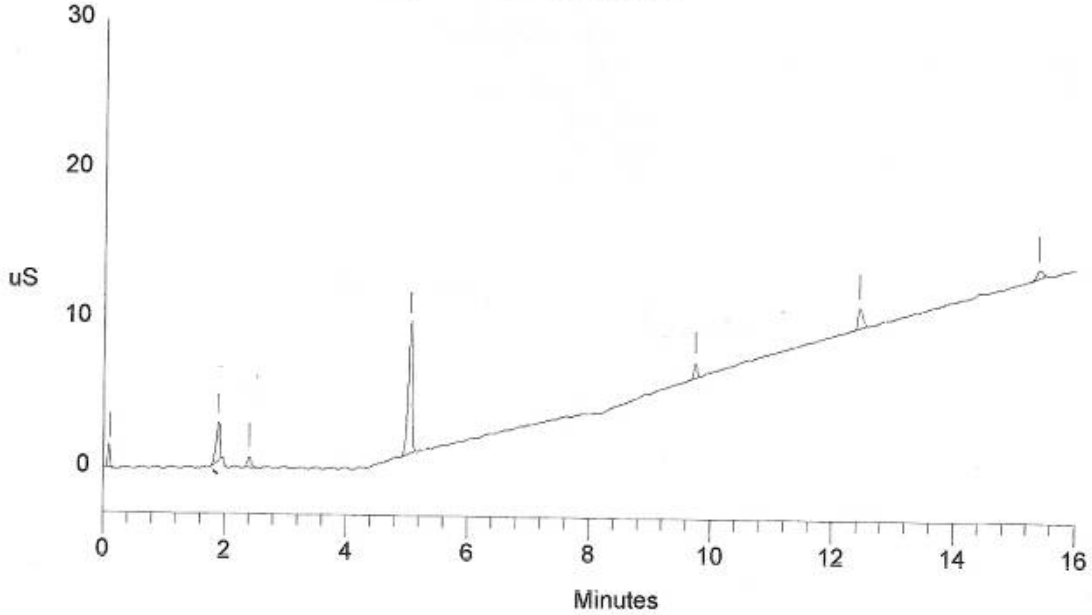
Data File : C:\PEAKNET\DATA\nit00144.D02	Report Date: 18/01/2007 11:12:36
Sample Name: ech VF A dil 1/4	Collected : 18/01/2007 10:47:31
Inject # : 2	Vial # :
Method File: c:\peaknet\method\anion.met	Calibrated : 18/01/2007 10:44:39
System Name: DIONEX	Detector : ED40:COND
Column Type:	Operator : section1
Data Points: 4800	Rate : 5.00 Hz
Module Name:	Moduleware : 1.15

Calibration	Volume	Dilution	Start	Stop	Area Reject	Pk. Width	Threshold
External	1	1	0.00	16.00	1000	10.00	11.05

********** Peak Report: All Peaks **********

No Pic	temps Ret.	Nom du Composé	Concentration ppm	Hauteur du Pic	Surface du Pic	Bl. Code	%Delta
1	0.10		0.00	13587	39372	1	
2	1.90		11.59	25694	107023	1	21.06
3	2.40		0.00	6753	28823	1	
4	5.05		0.00	87378	379139	1	9.31
5	9.74		3.74	9972	37136	1	0.79
6	12.44		0.00	13400	68230	1	
7	15.39		0.00	5293	37175	1	
		Totals	15.33	162077	696897		

File: nit00144.D02 Sample: ech VF A dil 1/4



Annexe 7 : Dosage des acides organiques

Tableau C : Temps de rétention des différents étalons passés.

Etalon	
	tps rétention (min)
Acide lactique	2
Acide pyruvique	2,22
Acide acétique	8,74
Acide oxalique	8,94
Acide citrique	12,5

Tableau D : Aires et temps de rétention des différents acides organiques présents dans la viande au cours de la fermentation

	Viande fraîche		**t après DII**		**t 0h**		**t 8 h**		**t 72h**	
	tps rétention (min)	**aire**	**tps rétention (min)**	**aire**	**tps rétention (min)**	**aire**	**tps rétention (min)**	**aire**	**tps rétention (min)**	**aire**
Acide Lactique	1,9	107023	2	273620	2,12	406324	1,7	354590	2,21	382998
2	2,4	28823	2,56	96685	2,73	181905	3	665623	2,78	111012
3	5,05	379139	5,32	5322314	5,48	9051932	5,98		5,48	5E+06
4	9,74	37136	9,84	101177	10,06	309314	10,29	363717	10,26	392389
5	12,44	68230	12,52	150232	12,73	263836	12,96	317731	12,9	324937
6	15,39	37175	15,46	64036	15,6	185868	15,81	97234	15,83	6749

Tableaux E: Comparaison des teneurs en acide lactique de la viande au cours de la fermentation obtenues avec le dosage par HPLC et celles obtenues par le dosage du kit enzymatique.

% de bh	VF	t aps DII	t 0h	t 8h	t 24h	t 48h	t 72h
Acide lactique dosé pas HPLC	0,14	0,54	0,75	0,2	0,44	0,61	0,78
Acide lactique dosé par le kit enzymatique	1,72	0,9	0,82	1,08	1,57	1,57	1,43

Références Bibliographiques

Références bibliographiques

Bohuon P. (1995). Déshydratation Imprégnation par Immersion en solution ternaires : étude des transports d'eau et de solutés sur gel et produits d'origine animale. Thése de doctorat, Université Montpellier II.

Bourgeois C.M. et Leveau J.Y. (1991). Techniques d'analyse et de contrôle dans les industries agroalimentaires, collection sciences et techniques agroalimentaire, volume 3.

Centre Technique de la Salaison de la Charcuterie et des Conserves de Viande (CTSCCV) (1997). Code des usages de la charcuterie, de la salaison et des conserves de viande. **2**, 6-8

Collignan A. et Deumier F. (2001). Application d'un nouveau procédé de salaison à la valorisation de la venaison.

Collignan A. et Raoult-Wack A.L. (1992). Dewatering and salting of meat through immersion in concenttrated solutions at low temperature in 38thICoMST. Clermont-Ferrand. France, p 1186-1189.

Collignan A., Raoult-Wack A.L. et Themelin A. (1992). Energy study of food processing by osmotic dehydration and air drying. Agricultural Engineering Journal, **1(3)**, 125-135

Deumier F. (1993). Application de la DII à la salaison de la viande de daim, optimisation du procédé sur la base de critères microbiologiques et organoleptiques. Mémoire de fin d'études.

Durand P. (1999). Technologies des produits de charcuterie et des salaisons. Séchage –Maturation, 9. Collection Sciences & Technologies agroalimentaires. Editions TEC & DOC

Girard J.P. (1988). Technologie de la viande et des produits carnés. Technique et documentation – Lavoisier, Paris, 280p.

Goupy J. (1988). La méthode des plans d'expériences optimisation des essais et de l'interprétation des résultats. Bordas. Paris

Islam M.N. et Flinck J.N. (1982). Dehydratation of potatoe. II Osmotic concentration and its effect on air drying behaviuor. Journal of Food Technology, 17.

Jouve J.L. (1996). La qualité microbiologique des aliments. CNERNE-CNRS. Partie 3.

Le Maguer M. (1988). Osmotic dehydratation :review and future directions. In : Proceedings of Symposium on Progress in Food Preservation Processes, (1), CERIA, Brussels.

Pegoraro S. (2006). Etude de la fermentation d'une viande après un traitement de déshydratation - imprégnation par immersion. Rapport de stage 3ème année INSFA.

Petit T, Santchurn S et Collignan A. (soumis à publication). Physiocochemical and microbiological characteristics of Biltong. A traditional salted dried meat of Southem Africa.

Pinto M.F., Ponsano E.H.G, Franco B.D.G.M., Shimokomaki M. (2002). Charqui meats as fermented meat products:role of bacteria for some sensorial properties development. Meat Science, 61 (2), 187-191.

Ponting (1973). Osmotic dehydratation of fruits – Recent modifications and applications. Proc. Biochem, 8.

Raoult-Wack A.L. et Guibert S. (1990). La déshydratation osmotique. *Les cahiers de l'ENSBANA*, **7**, 171-192.

Raoult –Wack AL. (1994) Cahier de l'AFSIA. La déshydratation- imprégnation par immersion, n°10. association française de séchage dans l'industrie et l'agriculture

Santchurn S (2005). Etude et amélioration des procédés traditionnels de transformation de la viande. Rapport du CIRAD annuel.

Santchurn S., Collignan A. et Thrystram G. (2007). Impact of solute molecular mass and mobility, and solution viscosity on mass transfer during immersion of meat in a complex solution. Journal of Food Engineering (78) 1188-1201.

Spieβ W.E.L. et Behsnilian D (1998). Osmotic treatments in food processing ; current state and future needs. *Proceeding of the 11th International Drying Symposium (IDS'98), Halkidiki, Greece.*