

● RÉSUMÉ DU PROJET

L'élaboration de produits permettant de conserver la viabilité et l'activité des bactéries probiotiques représente un réel défi technologique pour les industriels qui désirent se lancer dans la mise en marché des aliments fonctionnels. Le fromage offre des avantages comme un pH plus élevé, une matrice plus dense et une teneur en matière grasse plus élevée pouvant augmenter la probabilité de survie des bactéries probiotiques au cours de la production, de l'affinage ainsi que lors du passage dans l'estomac humain. Le but principal de ce projet est de déterminer les conditions de viabilité et du maintien des propriétés fonctionnelles des probiotiques dans le fromage. Un caillé modèle reproduisant un environnement similaire à celui retrouvé dans le fromage cheddar a été utilisé pour évaluer les effets combinés du pH, du pourcentage sel/humidité et de la température d'affinage sur la survie et la croissance de différents probiotiques commerciaux lors de la maturation du cheddar. La viabilité des souches *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* Bb-12 et *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 seule ainsi qu'en co-culture a été déterminée pendant une fabrication fromagère de type cheddar et durant l'affinage du fromage pendant 12 semaines à 4°C et à 8°C. La viabilité des bactéries probiotiques dans le fromage a aussi été évaluée selon deux méthodes de quantification : la méthode classique de compte sur boîte et la méthode moléculaire appelée qPCR/PMA. Les résultats ont permis de mieux comprendre les facteurs qui affectent la viabilité et l'activité des bactéries probiotiques dans les fromages de même que le développement d'outils moléculaires utiles aux transformateurs laitiers pour déterminer la viabilité des ferments et des souches probiotiques et pour effectuer le typage de souches.

● OBJECTIFS ET MÉTHODOLOGIE

Les objectifs spécifiques de ce projet sont : 1) Déterminer l'effet de paramètres comme le pH, la teneur en sel sur l'humidité (S/H) et la température d'affinage sur la survie des probiotiques ajoutées jusqu'à la fin de la durée de conservation du fromage; 2) Estimer la viabilité des différentes populations microbiennes présentes dans le fromage par une méthode moléculaire quantitative et 3) Identifier et typer les cultures probiotiques par des méthodes moléculaires.

1. Validation des conditions de viabilité de différents probiotiques commerciaux dans le fromage de type cheddar. Six souches de probiotiques communément utilisées dans l'industrie ont été sélectionnées pour cette étude. Ces six souches sont : *Lactobacillus rhamnosus* RO011, *Lactobacillus rhamnosus* GR1, *Lactobacillus rhamnosus* GG, *Bifidobacterium lactis* BB12, *Lactobacillus helveticus* RO052 et *Lactobacillus acidophilus* LA5. La biocompatibilité entre cinq souches de *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* (LL074, LL225, LL390, W62 et CH-FRS-102) et les six souches probiotiques sélectionnées ont par la suite été évaluées par spectrophotométrie automatisée pendant 24h. L'évaluation des conditions de viabilités des six souches probiotiques (RO011, GR1, GG, BB12, RO052 et LA5) ainsi que de combinaisons de souches probiotiques (GR1 avec BB12 a été faite dans des caillés modèles de type cheddar ou durant l'affinage de fromage cheddar.

2. Déterminer la viabilité des souches probiotiques dans le fromage. La PCR quantitative (qPCR) couplée à l'utilisation du propidium monoazide (PMA) permet de quantifier les bactéries viables par l'ADN car la qPCR-PMA permet de distinguer les bactéries vivantes des mortes en culture pure et dans une matrice alimentaire. Des amorces spécifiques et une sonde basées sur le gène *tuf* ont été conçues pour la quantification de *L. helveticus* RO052, *B. animalis* ssp. *lactis* BB-12 et *L. rhamnosus* RO011. Six fabrications fromagères ont été réalisées dans quatre bassins en parallèle en ajoutant au ferment (contrôle) une de ces souches de bactéries probiotiques par bassin ou en mélange contrôle (sans probiotique) bassin 2: *L. helveticus* RO052 et *L. rhamnosus* RO011; bassin 3: *L. helveticus* RO052 et *B. lactis* BB-12; bassin 4: *L. helveticus* RO052, *L. rhamnosus* RO011 et *B. lactis* BB-12 à un taux d'inoculation permettant l'obtention de 1×10^9 cellules par portion de 30 gr de fromage. Les fromages ont été suivis sur une période de quatre à six mois.

3. Caractères génétiques des cultures probiotiques. La MLVA (*multiple variable number of tandem repeats analysis*) est une méthode qui exploite la présence de courtes séquences d'ADN répétées (tandem repeats, TR) dans le génome bactérien. Le nombre de ces répétitions est grandement variable d'une souche à l'autre (*variable number of tandem repeats, VNTR*). Il est possible de déterminer ce nombre de répétitions en amplifiant tout d'abord la région ciblée par PCR puis en déterminant la taille des amplicons grâce à une électrophorèse capillaire.

● RÉSULTATS ET APPLICATIONS

1. Nouvelles connaissances : Estimation de la biocompatibilité entre des souches commerciales de lactocoques et des souches commerciales de probiotiques. Chaque probiotique a une biocompatibilité différente selon le lactocoque utilisé pour l'acidification du lait. Dans ce projet, la viabilité des probiotiques dans le fromage était accrue par la sélection de la souche de *L. lactis* ssp. *cremoris* W62. Détermination de l'impact des paramètres d'affinage du fromage cheddar (S/H, pH, température, ferment lactique, probiotique en co-culture) sur la survie de souches commerciales de probiotiques au cours de l'entreposage afin d'adapter les paramètres d'affinage selon la souche probiotique utilisée dans le fromage. Les résultats indiquent que toutes les souches probiotiques sont affectées différemment par l'effet combiné du pH, du S/H, de la température et de la présence de la souche W62. Les souches de *L. rhamnosus* GR1 GG et R0011 ont une bonne survie dans les caillés modèle tandis que la souche de *L. acidophilus* LA5 est la moins favorisée par l'environnement des caillés modèles. À 30°C, la survie de la souche *B. animalis* ssp. *lactis* BB12 est meilleure en présence de la souche GR1. La survie des souches BB12 et GR1 seules et en co-cultures a aussi été évaluée lors de la production de fromages à l'usine pilote et durant l'affinage des fromages. L'agi-

tation a un impact sur la viabilité de la souche BB12 pendant l'étape de la cuisson bien que l'utilisation combinée des deux souches probiotiques favorise leur viabilité pendant la fabrication et l'affinage du fromage cheddar. Le projet a permis pour la première fois de faire l'évaluation et la quantification des bactéries viables dans le fromage par qPCR/PMA. Nos résultats indiquent que cette méthode est rapide et fiable pour suivre l'évolution de la viabilité des ferments et des probiotiques au cours de la fabrication et de la maturation du fromage cheddar.

2. Applications : Développement de nouvelles méthodes de typage des bactéries probiotiques comme la Multilocus Variable Number of Tandem Repeats Analysis (MLVA) : Cinq loci VNTR ont été identifiés dans le génome de *B. longum* ssp. *longum* qui ont été amplifiés simultanément au cours d'une PCR multiplex. La MLVA s'est révélée être une méthode de typage performante, rapide et fiable pour le typage de plus de 45 souches de *B. longum* ssp. *longum*. Le projet a permis de développer un savoir-faire unique pour un meilleur suivi de la viabilité des bactéries probiotiques de même que le développement des connaissances sur l'activité des probiotiques et de leurs interactions pendant la maturation du fromage cheddar.

● TRANSFERT DES RÉSULTATS

Le projet a permis la formation de trois étudiantes à la maîtrise (Gabrielle Gagné, impact des paramètres de fabrication et d'affinage, Véronique Dussault-Lepage, méthodes moléculaires, Méridée Gagnon, sélection de souches aérotolérantes) de trois stagiaires (Audrey Mailloux, Jonathan Boivin-Piché, Clémentine Leboucher) et d'un stagiaire post-doctoral (Sébastien Matamoros). Les résultats ont été déjà présentés lors de

plusieurs réunions scientifiques et congrès nationaux et internationaux (Colloque STELA 2011, IDF Cheese 2012, Forum Novalait 2010 et 2012, 6^e Symposium sur les probiotiques, 2010) et ont fait l'objet d'une publication scientifique et d'autres en préparation. Ces activités permettent un transfert efficace des connaissances auprès de la communauté scientifique et des intervenants de l'industrie laitière.

● PARTENAIRES FINANCIERS

Entente de collaboration pour l'innovation en production et transformation laitières (ECI2005-2011) :

- Agriculture et Agroalimentaire Canada
- Fonds de recherche du Québec - Nature et technologies
- Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec
- Novalait inc.

BUDGET TOTAL : 248 724 \$

● POINT DE CONTACT

RESPONSABLES DU PROJET :

Denis Roy

Centre de recherche en sciences et technologie du lait (STELA),
Institut des nutraceutiques et aliments fonctionnels (INAF)
Université Laval
Sainte-Foy (Québec) G1V 0A6
Téléphone : 418-656-2131, poste 3098
Télécopieur : 418-656-3353
Courriel : Denis.roy@inaf.ulaval.ca.

Daniel St-Gelais

Centre de recherche et de développement sur les aliments (CRDA)
Agriculture et agroalimentaire Canada
3600 boul. Casavant Ouest
Saint Hyacinthe (Québec) J2S 8E3
Téléphone : 450-768-3321
Télécopieur : 450-773-8461
Courriel : Daniel.St-Gelais@agr.gc.ca.

COLLABORATRICE :

Gisèle Lapointe, Université Laval



2750, rue Einstein, bureau 220, Québec (Québec) G1P 4R1
Tél. : 418-527-7947 • Téléc. : 419-527-5957
novalait@novalait.ca • www.novalait.ca