

UNIVERSITE D'AUVERGNE

UNIVERSITE BLAISE PASCAL

N° DU : 1577

Année 2005

ECOLE DOCTORALE
DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

N° d'ordre : 420

Thèse

présentée pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE BLAISE PASCAL
Spécialité : Sciences des Aliments
Présentée et soutenue publiquement par

Véronique ZULIANI

Le 4 juillet 2005

**Prédiction de la contamination bactérienne lors de
la fabrication et de la conservation d'un aliment**

-
**Application à de la viande de porc contaminée par
*Listeria monocytogenes***

Directeur de thèse : M. André Lebert, Chargé de recherches - INRA de Clermont-Ferrand/Theix

Rapporteurs : Mme Andrée Voilley, Professeur - ENSBANA de Dijon

Mme Xuân-Mi Meyer, Maître de conférences - ENSIACET de Toulouse

Membres : Mme Régine Talon, Directeur de recherches - INRA de Clermont-Ferrand/Theix

M. Pascal Garry, Responsable du laboratoire de microbiologie - CTSCCV
de Maisons-Alfort

M. Christian Larroche, Professeur - Université Blaise Pascal de Clermont Ferrand

Unité de Recherches sur la Viande
Institut National de la Recherche Agronomique - Clermont-Ferrand/Theix

UNIVERSITE D'AUVERGNE

UNIVERSITE BLAISE PASCAL

N° DU : 1577

Année 2005

ECOLE DOCTORALE
DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

N° d'ordre : 420

Thèse

présentée pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE BLAISE PASCAL
Spécialité : Sciences des Aliments
Présentée et soutenue publiquement par

Véronique ZULIANI

Le 4 juillet 2005

**Prédiction de la contamination bactérienne lors de
la fabrication et de la conservation d'un aliment**

-

**Application à de la viande de porc contaminée par
*Listeria monocytogenes***

Directeur de thèse : M. André Lebert, Chargé de recherches - INRA de Clermont-Ferrand/Theix

Rapporteurs : Mme Andrée Voilley, Professeur - ENSBANA de Dijon

Mme Xuân-Mi Meyer, Maître de conférences - ENSIACET de Toulouse

Membres : Mme Régine Talon, Directeur de recherches - INRA de Clermont-Ferrand/Theix

M. Pascal Garry, Responsable du laboratoire de microbiologie - CTSCCV
de Maisons-Alfort

M. Christian Larroche, Professeur - Université Blaise Pascal de Clermont Ferrand

Unité de Recherches sur la Viande
Institut National de la Recherche Agronomique - Clermont-Ferrand/Theix

Remerciements

La réalisation d'une thèse est loin d'être un exercice individuel. En effet, sans le soutien et la contribution de nombreuses personnes, ce travail n'aurait pu aboutir.

Je tiens à remercier André Lebert, qui a dirigé ces recherches, il m'a permis de réaliser ce travail dans des conditions idéales ; au sein d'une équipe amicale et très disponible. Je remercie chaleureusement Isabelle Lebert qui s'est beaucoup investie dans ce travail, malgré la réalisation et la rédaction de sa propre de thèse.

Je remercie Mesdames André Voilley et Xuân-Mi Meyer pour avoir accepté de rapporter ce travail, ainsi que Madame Régine Talon, Messieurs Pascal Garry et Christian Larroche pour avoir accepté d'être membres du jury.

Je remercie Monsieur Dominique Peyraud, directeur du Centre Technique de la Salaison, de la Charcuterie et des Conserves de Viandes (CTSCCV) de 1994 à 2003 pour avoir initié ce projet de thèse. Mes remerciements vont également à Monsieur Jean Tayeb, actuel directeur du CTSCCV.

Je remercie Monsieur Joseph Culioli, directeur de l'Unité de Recherches sur la Viande de l'INRA de Theix, pour avoir accepté que je réalise cette thèse au sein de son unité. Merci à Madame Régine Talon, responsable de l'équipe microbiologie de l'URV, pour m'avoir accueillie dans « ses locaux » : au laboratoire lors de la réalisation des expériences ou au coin café.

Merci à Pascal Garry, responsable du laboratoire de microbiologie du CTSCCV, pour sa gentillesse et son soutien. Il a toujours su se montrer attentif malgré un emploi du temps très chargé et je le remercie également pour m'avoir permis de réaliser ce travail de thèse sereinement. J'adresse mes excuses aux membres de l'équipe microbiologie du CTSCCV (en particulier Aurore, Françoise, Stéphane et Jean-Yves) pour les avoir fréquemment dérangés avec mes appels téléphoniques.

Merci à Monsieur Jean-Luc Venduvre, directeur scientifique du CTSCCV, pour avoir initié ce projet de thèse. Membre du comité de pilotage, il s'est beaucoup investi dans ce travail et œuvre déjà à son exploitation future.

Merci à Claire Benès, Sefika Saritas et Lucette Cécé, du service documentation du CTSCCV, pour leur aide dans les recherches bibliographiques.

Merci à Jean-Christophe Augustin de l'école Nationale Vétérinaire d'Alfort pour avoir participé activement au comité de pilotage de cette thèse. Merci pour sa disponibilité.

Un grand merci à Stéphane Portanguen. Il m'a accueillie dans son bureau, et s'est montré d'une patience et d'une gentillesse exemplaire, en particulier, lors de la rédaction de ce manuscrit. Merci pour les poses musicales «Kung-fu fighting», excellent remède à la baisse passagère de moral (presque aussi efficace que les bonbons au pamplemousse !). Merci pour son aide inestimable lors de la réalisation des expériences. Je lui souhaite bon courage pour son stage d'ingénieur et les autres projets qu'il a entrepris en cette année 2005.

Merci à Jean-Michel Auberger, pour sa constante bonne humeur et ses mails que j'ai appréciés à leur juste valeur. Merci pour sa formation accélérée sur l'entretien mécanique d'une voiture. Et enfin, merci à lui pour avoir résolu mes soucis hebdomadaires divers et variés en informatique. Je n'oublie pas sa proposition d'assistance informatique à distance...

Merci à Dédé Lasteyras pour nos discussions du matin (j'y ai beaucoup appris sur l'INRA !), pour les salades, les courgettes et autres légumes de son grand jardin ! Je le remercie pour son soutien lors de l'organisation de la journée INR'Avenir 2002.

Merci à Pierre-Sylvain Mirade pour la relecture rapide et efficace de ce manuscrit et pour tous les conseils prodigués lors de sa rédaction. Je regretterai les séances photos mensuelles.

Merci à Jean-Dominique Daudin et à Alain Kondjoyan pour leur disponibilité et pour leurs conseils avisés.

Merci à Jean-François Chazeix pour la découpe et le hachage de la viande.

Merci à Brigitte Duclos qui a su résoudre, toujours dans la bonne humeur qui la caractérise, nombre de mes soucis avec Procite ou la gestion du document maître sous Word.

Un grand merci à Marie-Claire Debote, pour la préparation des milieux et le marquage des boîtes de Pétri. Merci à Marie-Claire et à Yvette Villatte pour leur aide lors de la réalisation des expériences, pour leur rire communicatif, pour leur gentillesse et pour nos petites discussions à la laverie.

Merci à l'équipe microbiologie, en particulier à Sabine Leroy, pour l'intérêt qu'elle a porté à ce travail.

Merci à Stéphanie Morot-Bizot et Laurence Sifre pour nos pauses-déjeuner divertissantes. Ces repas ont été autant de bouffées d'oxygène. Je souhaite à Stéphanie et à Laurence beaucoup de réussite et de bonheur.

Merci à Stella Planchon pour sa compagnie au Congrès des bactéries lactiques à Aurillac (je garde en mémoire l'épisode de la clef). Merci à Stella et Ingrid Chafsey-Chandez, pour leur gentillesse et leur bonne humeur.

Merci à Carine et à Lysiane pour les séances déstressantes de squash et de piscine, malgré les cicatrices et les ampoules.

Merci à Monsieur Larpent, Mademoiselle Gounot, Messieurs Renaud et Borrel pour m'avoir donné le goût de la microbiologie.

Merci à toute ma famille pour le soutien inestimable et les encouragements manifestés en particulier, à ma mère et à ma sœur, sans qui rien n'aurait été possible.

Bonne chance à Bérengère, Stella, Tania, Laurence, Stéphanie, Anne, Sophie, Frédérique et les « deux » Emilie.

-Notations-

Nomenclature

A	Accroissement de la population bactérienne correspondant à la différence entre les concentrations (exprimées en logarithme népérien) initiale et maximale
[A ⁻]	concentration en acide dissocié (mM)
AFSSA	Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments
[AH]	concentration en acide non dissocié (mM)
ANRT	Association Nationale de la Recherche Technique
ARS	Agriculture-agricultural Research Service
ATP	Adénosine TriPhosphate
a_w	activité de l'eau (sans dimension)
$a_{w \min}$	a_w minimale de croissance (sans dimension) $a_{w \min}^{\circ}$ a_w min absolue ($a_{w \min}$, lorsque les autres paramètres environnementaux sont à leur valeur optimale de croissance et en absence d'inhibiteur) (sans dimension)
$a_{w \max}$	a_w maximale de croissance (sans dimension)
$a_{w \text{opt}}$	a_w optimale de croissance (sans dimension)
BHI	Brain Heart Infusion
c	concentration en substance inhibitrice (mM ou pourcentage)
C	concentration massique en eau dans le produit (kg d'eau.m ⁻³)
C_{air}	concentration massique en eau dans l'air (kg d'eau.m ⁻³)
CC	Capacité de Croissance (U Log)
CC _{étuvage}	CC pendant le procédé d'étuvage (U Log)
CC _{globale}	CC pendant le procédé global (U Log)
CC _{stockage}	CC pendant l'étape de stockage (U Log)
CC = 1	courbe représentant les conditions d' a_w , pH, inhibiteur(s), température pour lesquelles l'accroissement de population prédit à l'issue du stockage est égal à 1,0 U Log
CIFRE	Convention Industrielle de Formation par la REcherche
CM	fonction des modèles cardinaux caractérisant l'influence des paramètres environnementaux sur μ_{\max}
CMI	Concentration Minimale Inhibitrice (mM ou pourcentage)
CMI ^o	CMI absolue (CMI, lorsque les autres paramètres environnementaux sont à leur valeur optimale de croissance et en absence d'autre substance inhibitrice) (mM ou pourcentage)
C_p	capacité thermique massique à pression constante (J.kg ⁻¹ .K ⁻¹)
C_{surface}	concentration massique en eau de l'air au contact du produit (kg d'eau.m ⁻³)
CTSCCV	Centre Technique de la Salaison, de la Charcuterie et des Conserves de Viandes
D	temps de réduction décimale, lorsque la température, le pH et l' a_w sont pris en compte (s ou min) (modèle de Mafart et Leguérinel)
D	diffusivité de l'eau dans le produit (m ² .s ⁻¹)
D*	temps de réduction décimale dans les conditions de référence (modèle de Mafart et Leguérinel) de température, pH et a_w et pour un substrat donné (s ou min)
D'	temps de réduction décimale apparent (modèle de Mafart et Leguérinel) en fonction des conditions de température, pH et a_w postérieures au traitement thermique
DLC	Date Limite de Consommation
D _{ref}	D ₀ à la température de référence (s ou min)
D _t	diffusivité thermique (m ² .s ⁻¹)
D _θ	temps de réduction décimale à la température θ (s ou min) <i>i.e.</i> temps nécessaire à la température θ pour réduire par dix la population bactérienne
e_p	épaisseur de l'aliment modèle (mm ou cm)
ERRC	Eastern Regional Research Center
F _{calculée}	variable de Fisher calculée
FICT	Fédération française des Industriels Charcutiers traiteurs et Transformateurs de viandes
F _{table}	variable de Fisher lue dans la table
h	coefficient de transfert de chaleur convectif (W.m ⁻² .K ⁻¹)
h'	coefficient de transfert de chaleur conductif (W.m ⁻² .K ⁻¹)
HCl	acide chlorhydrique
HR _{air}	Humidité Relative de l'air (%)

IC	Intervalle de Confiance (%)
ICMSF	International Commission on Microbiological Specifications for Food
INRA	Institut National de la Recherche Agronomique
ISO	International Standard Organization
J_1	densité de flux de chaleur dû à l'évaporation d'eau ($W.m^{-2}$)
J_2	densité de flux de chaleur par convection à l'interface air/produit ($W.m^{-2}$)
J_3	densité de flux de chaleur par conduction entre le produit et son support ($W.m^{-2}$)
J_4	densité de flux de chaleur par rayonnement ($W.m^{-2}$)
J_5	densité de flux de chaleur par conduction dans le produit ($W.m^{-2}$)
J_D	densité de flux d'eau dans le produit ($kg\ d'eau.m^{-2}.s^{-1}$)
J_E	densité de flux d'eau à l'interface air/produit ($kg\ d'eau.m^{-2}.s^{-1}$)
k	constante de vitesse de réaction d'ordre 1 (t^{-1})
K	constante dépendant de l'état physiologique de l'inoculum reliant μ_{max} et lag (Modèle de Rosso) (sans dimension)
k'	coefficient de transfert d'eau ($m.s^{-1}$)
kGy	kilo Gray
l	largeur du parallépipède d'aliment (cm)
L	longueur du parallépipède d'aliment (cm)
lag	temps de latence (h ou semaines)
L_v	chaleur latente de vaporisation de l'eau ($J.kg^{-1}$)
n'	quantité de données utilisées pour calculer la SCE pour le test de Fisher
N	concentration bactérienne au temps t ($UFC.g^{-1}$)
N_0	concentration bactérienne initiale ($UFC.g^{-1}$)
NaA	acétate de sodium
NaCl	chlorure de sodium
NaOH	hydroxyde de sodium
NF	Norme Française
N_{max}	concentration bactérienne maximale ($UFC.g^{-1}$)
OFIVAL	Office National Interprofessionnel des Viandes, de l'élevage et de l'Aviculture
p	paramètre du modèle secondaire d'Augustin pour la prise en compte de l'influence d'une substance inhibitrice
p_a	nombre de paramètres optimisés du modèle ayant le plus de paramètres optimisés lors de a réalisation de test de Fisher
p_b	nombre de paramètre(s) optimisé(s) du modèle ayant le moins de paramètre(s) optimisé(s) lors de la réalisation de test de Fisher
pK_a	constante de dissociation de l'acide (sans dimension)
p/p	poids par poids de viande ($g.g^{-1}$)
pH	potentiel d'hydrogène (U pH)
pH_{min}	pH minimal de croissance (U pH)
pH_{min}°	pH_{min} absolu (pH_{min} , lorsque les autres paramètres environnementaux sont à leur valeur optimale de croissance et en absence d'inhibiteur) (U pH)
pH_{max}	pH maximal de croissance (U pH)
pH_{opt}	pH optimal de croissance (U pH)
ppm	partie par million
R^2	coefficient de détermination de la droite de régression
rpm	rotations par minute
S	surface du parallépipède d'aliment modèle (cm^2)
SCE	Somme des Carrés des Ecart
t	temps (s, min, h ou semaines)
UFC	Unité Formant Colonie
U Log	Unité Logarithmique (Logarithme décimal)
U pH	Unité pH
URV	Unité de Recherches sur la Viande
USDA	United State Department of Agriculture
V_{air}	vitesse de l'air ($m.s^{-1}$)
v/p	volume par poids de viande ($ml.g^{-1}$)

x	axe selon lequel le transfert de chaleur s'effectue
X	température, pH ou a_w
z'	élévation de température (°C) permettant de diminuer d'un facteur dix D_0
Z_X	écart de température, pH ou a_w par rapport à une valeur de référence entraînant une variation de D^* d'un facteur dix (s'exprime dans l'unité de X : °C, U pH ou sans dimension)

Symboles grecs

α'	niveau de signification des tests de Fisher
γ	fonction des modèles gamma caractérisant l'influence des paramètres environnementaux sur μ_{max}
γ'	fonction du modèle de Le Marc caractérisant l'influence du pH
ε	émissivité (sans dimension)
θ	température (°C ou K)
θ_1	θ d'intersection de la première partie linéaire de la courbe $\mu_{max}^{0.5} = f(\theta)$ avec l'axe des abscisses, dans la représentation graphique du modèle de Charles-Bajard (°C)
θ_c	θ de rupture de pente de la courbe $\mu_{max}^{0.5} = f(\theta)$ avec l'axe des abscisses dans la représentation graphique du modèle de Charles-Bajard (°C)
θ_{max}	θ maximale de croissance (°C)
θ_{max}°	θ_{max} absolue, lorsque les interactions entre paramètres environnementaux sont prises en compte pour déterminer θ_{max} , <i>i.e.</i> θ_{max} lorsque les paramètres environnementaux sont à leur valeur optimale de croissance, en absence d'inhibiteur (°C)
θ_{min}	θ minimale de croissance (°C)
θ_{min}°	θ_{min} absolue (θ_{min} , lorsque les autres paramètres environnementaux sont à leur valeur optimale de croissance et en absence d'inhibiteur) (°C)
θ_{opt}	θ optimale de croissance (°C)
λ	conductivité thermique ($W.m^{-1}.K^{-1}$)
λ'	fonction du modèle de Mafart et Leguérinel décrivant l'influence de la température, du pH ou de l' a_w sur D ou D'
μ_{max}	taux maximal de croissance (h^{-1})
μ_{opt}	μ_{max} , dans un milieu de référence en condition optimale de croissance (h^{-1})
ξ	fonction du modèle de Le Marc caractérisant l'influence des interactions entre paramètres environnementaux
ρ	masse volumique ($kg.m^{-3}$)
ρ'	fonction du modèle secondaire de Le Marc caractérisant l'influence de la température
σ	écart-type
σ'	constante de Stefan-Boltzmann (égale à $5,67.10^{-8}W.m^{-2}.K^{-4}$)
τ	fonction du modèle de Le Marc caractérisant l'influence de la concentration en acide

Indices et exposants

$^\circ$	relatif à la valeur minimale (ou maximale) d'un paramètre, lorsque les autres paramètres sont à leur valeur optimale et en absence d'inhibiteur : valeur absolue
air	relatif à l'air
aliment	relatif à l'aliment
D	relatif à l'acide dissocié
i	relatif à la substance inhibitrice i
j	relatif à la substance inhibitrice j
max	maximum
min	minimum
opt	optimum
ref	relatif à une valeur de référence
sup	relatif au support sur lequel est posé l'aliment
surface	relatif à la surface de l'aliment
u	relatif à l'acide indissocié
w	relatif à l'eau

-Sommaire-

<u>Remerciements</u>	<u>1</u>
<u>Notations</u>	<u>3</u>
<u>Sommaire</u>	<u>9</u>
<u>Introduction</u>	<u>13</u>
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	
	19
<u>1- Procédé de fabrication des lardons</u>	<u>21</u>
1-1. Désossage, découennage et parage	22
1-2. Saumurage	23
1-3. Etuvage	24
1-4. Fumage	25
1-5. Cubage	25
1-6. Conditionnement	25
1-7. Stockage	26
<u>2- Influence des principales étapes du procédé de fabrication des lardons sur le développement de <i>L. monocytogenes</i></u>	<u>26</u>
2-1. Désossage, découennage et parage	26
2-2. Saumurage	27
2-3. Etuvage	29
2-4. Fumage	31
2-5. Cubage	31
2-6. Conditionnement	32
2-7. Stockage	33
<u>3- Modélisation de l'évolution de la contamination de <i>L. monocytogenes</i> au cours d'un procédé</u>	<u>33</u>
3-1. Modèles de microbiologie prévisionnelle	33
3-2. Modèles de transferts	46
3-3. Modélisation d'un système dynamique	49
<u>4- Conclusion</u>	<u>51</u>
MATERIELS ET METHODES	
	53
<u>1- Souche bactérienne</u>	<u>56</u>
<u>2- Aliment modèle</u>	<u>56</u>
2-1. Matière première	56
2-2. Ionisation	56
2-3. Produits ajoutés	57
<u>3- Matériels</u>	<u>57</u>
3-1. a _w -mètre	57
3-2. pH-mètre	58
3-3. Etuves	58
3-4. Enregistreur de température	58
3-5. Incubateurs bactériologiques	59
3-6. Hotte à flux laminaire	59
3-7. Ensemenceur spiral	59
3-8. Stomacher	60
3-9. Incubateur à agitation orbitale	60
3-10. Microscope	60
3-11. Balances	60

<u>4- Expériences préliminaires</u>	60
4-1. Evaluation de la durée des expériences	60
4-2. Ajustement de l' a_w	61
4-3. Ajustement du pH	61
4-4. Inoculation de la viande	62
4-5. Détermination des procédés d'étuvage	62
<u>5- Protocole</u>	<u>63</u>
5-1. Précultures	64
5-2. Contrôle de l' a_w , du pH et du pourcentage d'inhibiteur(s)	64
5-3. Cinétiques bactériennes	64
<u>6- Plans d'expériences</u>	<u>66</u>
6-1. Influence de l' a_w et du pH	67
6-2. Influence de la nature et de la concentration en inhibiteur	67
6-3. Influence du procédé d'étuvage	67
<u>7- Traitements des données</u>	<u>68</u>
7-1. Etude des capacités de croissance	68
7-2. Modélisation des cinétiques de <i>Listeria</i>	69
7-3. Modélisation du transfert de chaleur	77
7-4. Modélisation combinée de l'évolution de la température et de la cinétique bactérienne	80
 RESULTATS	 85
<u>1- Expériences préliminaires</u>	<u>87</u>
1-1. Durée des expériences	87
1-2. Ionisation	87
1-3. Inoculation de la viande	87
1-4. Domaines et niveaux des facteurs étudiés	88
1-5. Ajustement de l' a_w	89
1-6. Ajustement du pH	93
<u>2- Etude et modélisation du développement de <i>L. monocytogenes</i> en fonction du pH et de l'a_w</u>	<u>94</u>
2-1. Résultats expérimentaux	94
2-2. Modélisation	96
<u>3- Etude et modélisation du développement de <i>L. monocytogenes</i> en présence d'inhibiteur(s)</u>	<u>101</u>
3-1. Lactate de sodium	101
3-2. Autres inhibiteurs	106
3-3. Deux inhibiteurs	111
<u>4- Etude et modélisation du développement de <i>L. monocytogenes</i> en fonction du procédé d'étuvage</u>	<u>114</u>
4-1. Résultats expérimentaux	114
4-2. Modélisation	119
<u>5- Validation du modèle combiné à 4°C</u>	<u>133</u>
5-1. En condition statique de température	134
5-2. En condition dynamique de température	137
 <u>Discussion et perspectives</u>	 <u>141</u>
 <u>Conclusion</u>	 <u>155</u>
 <u>Références bibliographiques</u>	 <u>161</u>
 <u>Annexes</u>	 <u>175</u>
 <u>Publications, articles et communications</u>	 <u>181</u>

-Introduction-

La mise sur le marché de nouveaux produits répond à une attente des consommateurs (facilité d'utilisation, maintien des qualités organoleptiques et nutritionnelles...), mais génère parfois de nouveaux problèmes sur le plan microbiologique. C'est le cas pour les lardons, valorisation avancée de la viande de porc datant de la fin des années 1980, dont un des risques microbiologiques majeurs est lié à une bactérie : *Listeria monocytogenes*. En effet, la filière porcine, depuis l'abattoir jusqu'à l'usine de transformation, est particulièrement sensible au risque de contamination par *L. monocytogenes* (Giovannacci *et al.*, 1999) : plusieurs épidémies de listériose ont été liées à la consommation de rillettes ou de langues de porc en gelée (Jacquet *et al.*, 1994 ; De Valk *et al.*, 2000 ; Goulet *et al.*, 2004). Au cours du procédé de fabrication des lardons, il n'y a aucun traitement physique ou chimique suffisamment drastique pour éliminer la totalité de la population de *L. monocytogenes* éventuellement présente.

Les épidémies de listériose, ainsi que leur impact médiatique, ont fortement ébranlé la confiance des consommateurs vis-à-vis des produits de charcuterie/salaison. La gravité des conséquences, pour la santé des consommateurs bien évidemment, mais également pour la pérennité des entreprises concernées par ces crises, a conduit les professionnels à étudier les potentialités de destruction, de survie et de croissance de *L. monocytogenes* au cours de la fabrication et de la conservation de leurs produits. Ces études consistent en la réalisation de tests d'épreuve (ou challenge-tests) qui simulent principalement une contamination accidentelle du produit fini (challenge-test produit) ou du produit au cours de sa fabrication (challenge-test procédé). Cependant, la réalisation de telles expériences est longue et onéreuse, il est donc matériellement impossible de tester l'impact de chaque variation de procédé. C'est particulièrement le cas pour les lardons, puisqu'il n'est pas rare qu'au sein d'une même entreprise, de nombreuses formulations co-existent.

Face aux limites de ces méthodes, l'utilisation de la microbiologie prévisionnelle constitue un outil qui peut aider les professionnels à garantir la qualité hygiénique de leurs produits. En effet, les modèles de microbiologie prévisionnelle permettent d'étudier l'impact de variables clefs d'un procédé (conditions de fabrication, de conservation, formulation ...) et d'un produit (propriétés physico-chimiques) sur le développement d'un microorganisme.

Les prédictions des modèles sont, en règle générale, satisfaisantes :

- quand les microorganismes se développent bien (en conditions optimales de croissance),
- quand les milieux sont liquides et comprennent un nombre limité de constituants (comme les milieux de culture de microbiologie),
- quand les conditions environnementales, principalement la température, le pH et l'activité de l'eau, sont stables.

En effet, les expériences utilisées pour la construction des modèles réunissent souvent l'ensemble de ces conditions. En agroalimentaire, les produits, les formulations et les procédés sont complexes. Les lardons sont hétérogènes, solides, et leur formulation fait intervenir de nombreux ingrédients, comme les acides ou les sels d'acides organiques, qui peuvent influencer sur le développement bactérien. Les différentes étapes du procédé engendrent des variations des propriétés physico-chimiques (pH, activité de l'eau, mais surtout température). Ainsi, alors que certaines étapes du procédé permettent la croissance de *Listeria*, d'autres peuvent contribuer à détruire une partie de la population bactérienne.

La question à laquelle nous devons répondre peut être formulée ainsi : quel est le comportement de *Listeria* lors du procédé de fabrication des lardons et lors de leur stockage avant consommation ? Cette question se pose tous les jours aux professionnels de la charcuterie/salaison. En effet, les poitrines de porc, matière première pour la fabrication des lardons, peuvent potentiellement être contaminées par *L. monocytogenes* et, lors du procédé, leurs propriétés physico-chimiques (température, pH et a_w) évoluent suffisamment pour modifier le développement de *L. monocytogenes*. Pour répondre à la question, il est donc impératif de disposer :

- d'une base de données expérimentales permettant de connaître le comportement de *Listeria* dans de nombreuses situations,
- d'un outil de simulation comportant :
 - o des modèles prédisant la croissance de *Listeria* :
 - même lorsque les conditions environnementales sont éloignées des conditions optimales de croissance de la bactérie,
 - en prenant en compte les ingrédients incorporés à la poitrine de porc et susceptibles d'influencer le développement de *Listeria*.
 - o des modèles prédisant la destruction de *Listeria* en fonction des procédés thermiques appliqués.

Les modèles de microbiologie prévisionnelle doivent également pouvoir tenir compte de l'évolution des propriétés physico-chimiques de l'aliment, comme sa température. Cependant, dans la pratique, ces propriétés ne sont mesurées qu'à des instants donnés et en des endroits précis. Aussi, afin de disposer de données caractérisant le produit en continu, il est nécessaire d'utiliser des modèles de transferts de chaleur et de matière.

Les modèles de croissance, de destruction microbienne et de transferts existent, mais ont été construits isolément, selon des hypothèses qui limitent leurs applications à des conditions restreintes. Afin de répondre à la question précédente, il faut donc réunir les compétences de deux champs disciplinaires, la microbiologie et le génie des procédés.

Répondre à la question « quel est le comportement de *Listeria* lors du procédé de fabrication des lardons et lors du stockage avant consommation ? » revient à vouloir disposer d'un modèle combiné, capable de prédire l'évolution de la température en tout point du produit, en fonction des variables de contrôle des procédés d'étuvage et de stockage. Ces données seront intégrées dans les modèles de microbiologie prévisionnelle, afin de déterminer l'évolution de la population bactérienne (croissance ou destruction) au cours du procédé de fabrication des lardons et de leur stockage. Les effets du saumurage et du fumage seront également pris en compte car ces étapes influencent les propriétés physico-chimiques des lardons (a_w , pH, nature et concentration en sels d'acides organiques et en fumée liquide) qui, elles-mêmes, contrôlent le développement bactérien.

Ce document comprend quatre chapitres :

- une étude bibliographique, qui a pour objectif de présenter les étapes unitaires du procédé de fabrication des lardons. Pour chacune des étapes, nous étudierons les propriétés physico-chimiques qui influencent le développement de *Listeria*. Nous nous intéresserons également :
 - o aux modèles de microbiologie prévisionnelle permettant de prédire la croissance ou la destruction bactérienne,
 - o aux modèles de génie des procédés prédisant les transferts d'eau et de chaleur, entre un aliment et son environnement au cours d'un procédé ;
- les matériels et méthodes utilisés au cours des expériences sont présentés dans le deuxième chapitre. Un soin particulier est apporté à la description du traitement des données de thermique et des cinétiques bactériennes ;

- le troisième chapitre présente les résultats obtenus lors de l'étude de l'influence, sur le développement de *Listeria*, des propriétés physico-chimiques du produit, elles-mêmes modifiées par les étapes clés du procédé. Les résultats relatifs à l'optimisation des paramètres des modèles et à leur validation sont également présentés. Ce chapitre étudie la faisabilité d'une modélisation intégrée de trois modèles : les modèles de microbiologie prévisionnelle (croissance et destruction) et le modèle de transfert de chaleur ;
- les hypothèses de calcul qui ont été faites, les éventuelles améliorations à apporter aux différents modèles utilisés et les perspectives envisagées pour prolonger ce travail sont discutées dans le quatrième chapitre.

Cette thèse a été financée par :

- le Centre Technique de la Salaison, de la Charcuterie et des Conserves de Viandes (CTSCCV),
- l'ANRT de la région Ile-de-France dans le cadre d'une convention CIFRE passée entre le CTSCCV et l'Unité de Recherches sur la Viande de l'INRA de Clermont Ferrand/Theix,
- l'OFIVAL (Etude et modélisation de l'influence des sels d'acides organiques sur le développement de *Listeria monocytogenes*).

-Etude bibliographique-

Au cours de ce chapitre, le procédé de fabrication des lardons sera décrit.

Nous nous attacherons, ensuite, à mettre en évidence l'influence des étapes unitaires de ce procédé sur les propriétés physico-chimiques qui contrôlent le développement de *Listeria*. La majorité des recherches sur le développement des microorganismes a été réalisée en milieu liquide de laboratoire. Or, des études ont montré que les résultats obtenus en milieu liquide ne pouvaient pas être extrapolés pour décrire le comportement des microorganismes dans des produits alimentaires solides (Robins et Brocklehurst, 1994 ; Meldrum *et al.*, 2003 ; Koutsoumanis *et al.*, 2004). Nous limiterons donc notre étude bibliographique aux résultats obtenus en milieu solide et nous nous intéresserons particulièrement à *L. monocytogenes*.

En tenant compte des étapes unitaires du procédé de fabrication des lardons, des propriétés physico-chimiques de l'aliment et des caractéristiques du microorganisme, nous déterminerons, dans une troisième partie, les besoins en terme de modélisation, pour prédire le développement d'un microorganisme présent dans un aliment soumis à un procédé.

1 - Procédé de fabrication des lardons

La fabrication de lardons, valorisation de la poitrine de porc, est une innovation technologique datant de la fin des années 1980. Les lardons sont répertoriés dans le code des usages de la charcuterie, de la salaison et des conserves de viandes (CTSCCV, 1997), comme des produits élaborés à partir de poitrine de porc à laquelle du chlorure de sodium est incorporé et, selon les recettes, des sucres, épices, alcools, condiments, arômes, fumées, flore de biopréservation.

En France, la production de lardons augmente continuellement : elle était, en 2003, de l'ordre de 15 000 tonnes (+12,6% par rapport à 2002) pour les lardons salés ou saumurés, et de 46 417 tonnes (+0,1%) pour les lardons séchés ou fumés. Ainsi, plus de 50% des poitrines se commercialisent aujourd'hui sous forme de lardons (FICT, 2004).

Au cours du procédé de fabrication des lardons, les poitrines de porc subissent différentes opérations unitaires qui font évoluer leurs propriétés physico-chimiques (pH, a_w , température, texture, couleur...). Or, les propriétés physico-chimiques ont une influence prépondérante sur la valeur nutritionnelle du produit fini, sur ses qualités organoleptiques, sur le rendement technologique (rapport entre le poids du produit fini et celui de la viande utilisée) et sur le développement de la flore microbienne.

Dans ce travail, nous décrirons uniquement les étapes unitaires du procédé de fabrication des lardons, dont le diagramme est présenté sur la Figure 1. Nous ne discuterons pas de l'influence de la qualité de la matière première sur les propriétés physico-chimiques des lardons.

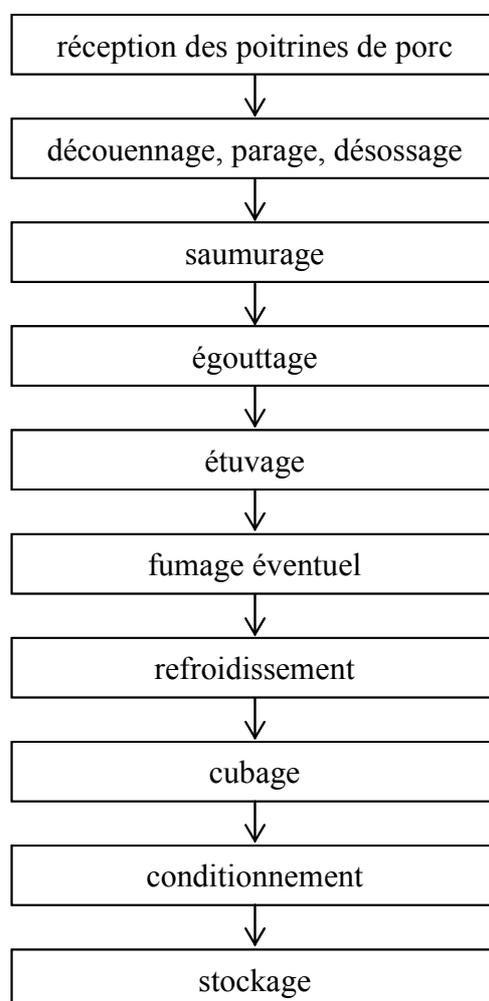


Figure 1 : diagramme de fabrication des lardons (FICT, 2000)

1-1. Désossage, découennage et parage

Les poitrines de porc sont d'abord désossées, découennées et parées. Ces opérations sont réalisées dans des locaux, dont la température est contrôlée et est inférieure à 2°C pour limiter la prolifération bactérienne (FICT, 2000).

Le parage consiste à éliminer l'excédent de gras de couverture. L'épaisseur de la couche de gras résiduelle influence l'évolution de la température dans les poitrines au cours du procédé. En effet, plus la couche de gras est épaisse, et plus le transfert de chaleur est ralenti (Mohsenin, 1980).

1-2. Saumurage

La saumure est une solution aqueuse dans laquelle sont dissous les ingrédients de salaison : chlorure de sodium (de l'ordre de 20 kg pour 100 litres d'eau), nitrite de potassium, nitrate de sodium, sucres (saccharose, dextrose, lactose et sirop de glucose), acides organiques (acides lactique, acétique, citrique...), sels d'acides organiques (lactate de sodium, acétate ou de diacétate de sodium), acide érythorbique, alcools (vin, liqueur) et épices (Frentz et Juillard, 2003). Les propriétés technologiques des ingrédients de la saumure sont présentées dans le Tableau 1. Les conditions d'utilisation des additifs de la saumure sont présentées dans le Tableau 2. Pour 1000 kg de viande, environ 140 kg de saumure sont nécessaires.

Tableau 1 : propriétés technologiques des ingrédients de la saumure (Durand, 1999)

<u>Ingrédients</u>	<u>Propriétés technologiques</u>
Eau	Solvant pour les autres ingrédients Limitation des défauts de texture Augmentation du rendement technologique
Chlorure de sodium	Développement du goût salé Augmentation du pouvoir de rétention d'eau des protéines, donc du rendement technologique Diminution de l'activité de l'eau, donc limitation ou inhibition de la croissance microbienne
Nitrite de potassium	Formation de la couleur Formation de l'arôme caractéristique des salaisons Limitation ou inhibition de la croissance microbienne
Nitrate de sodium	Précurseur des nitrites
Sucres	Substrats pour la croissance de la flore de biopréservation Fixation de molécules d'eau, donc augmentation du rendement technologique Pouvoir réducteur favorisant la formation et le maintien de la couleur
Acides organiques	Diminution du pH, donc limitation ou inhibition de la croissance microbienne Limitation ou inhibition spécifique de la croissance microbienne par les anions
Sels d'acides organiques	Précurseur des acides organiques Diminution de l'activité de l'eau, donc limitation ou inhibition de la croissance microbienne
Acide érythorbique	Réducteur impliqué dans la formation de la couleur
Alcools	Développement du goût
Epices	Développement du goût

Tableau 2 : conditions d'utilisation des additifs de la saumure (Durand, 1999)

Additifs	Dose maximale autorisée
Acides acétique (E260), lactique (E270), citrique (E330)	<i>Quantum satis</i> *
Lactate de sodium (E325), Acétate (E262) ou diacétate de sodium	<i>Quantum satis</i> *
Nitrate de sodium (E251)	250 mg.kg ⁻¹ de viande
Nitrite de potassium (E249)	100 mg.kg ⁻¹ de viande
Acide érythorbique (E315)	500 mg.kg ⁻¹ de viande

**quantum satis* signifie que l'additif peut être utilisé jusqu'à obtenir l'effet souhaité.

Du fait de contraintes technologiques (en particulier limitation de la baisse du pH) et organoleptiques, les professionnels limitent l'ajout des acides et des sels d'acides organiques. Ce sont préférentiellement les sels d'acides qui sont utilisés (1 à 3 g de lactate de sodium pour 100 g de lardons (1 à 3% p/p), 0,2 à 0,8% p/p d'acétate ou de diacétate de sodium, mélange de 50% d'acide acétique et d'acétate de sodium).

La saumure, dont la température est contrôlée à $2,5 \pm 1,0^{\circ}\text{C}$, est parfois directement injectée dans la viande à l'aide d'aiguilles. La saumure qui n'a pas été retenue par la viande est filtrée, puis remise en circulation avec de la saumure « fraîche » pour maintenir constants les concentrations en ingrédients et le volume dans le circuit. Le nettoyage du circuit de re-circulation est indispensable pour garantir la qualité hygiénique des produits et éviter le risque de contamination croisée des viandes et de la saumure (Gill *et al.*, 2005).

Au cours du saumurage, l'usage d'un malaxeur se généralise. Il favorise, par action mécanique, les échanges de solutés entre la viande et la saumure. Le malaxage est constitué de cycles alternés de temps de travail et de repos, au cours desquels les ingrédients de la saumure migrent dans les muscles (Durand, 1999). Cette opération est réalisée à des températures de l'ordre de 4 à 6°C, pour limiter les risques de prolifération microbienne.

1-3. Etuvage

Les poitrines sont égouttées, puis étuvées. Le procédé d'étuvage est très variable d'une entreprise à l'autre. On distingue les étuvages « haute température », qui sont réalisés entre 50 et 55°C pendant des durées comprises entre une heure et une heure et demi, des étuvages « basse température » (30 à 45°C) pendant 12 à 24 heures (Frentz et Juillard, 2003). En aucun cas, l'étuvage ne conduit à la cuisson du produit.

Cette hausse de température peut entraîner une baisse de l'activité de l'eau (a_w) du produit, du fait d'une évaporation en surface. Ainsi, pour limiter la perte de poids des poitrines et garantir un rendement technologique satisfaisant, l'humidité de l'enceinte d'étuvage est aussi contrôlée.

1-4. Fumage

Le fumage ou fumaison est l'opération qui consiste à soumettre une denrée alimentaire à l'action des produits qui se dégagent lors de la combustion incomplète de certains végétaux (Girard, 1988). L'étape de fumage n'est pas obligatoire dans le procédé de fabrication des lardons. Elle peut être appliquée pour développer des caractéristiques organoleptiques spécifiques (couleur, flaveur), même si, à l'origine, le fumage était un procédé de conservation.

Le fumage a lieu dans une cellule fortement ventilée, sans humidification, maintenue à une température de l'ordre de 50°C à 60°C. Sa durée (de une heure et demi à six heures) et la composition de la fumée varient en fonction du goût recherché (Poma, 1998). Aujourd'hui, l'utilisation de fumées liquides (entre 0,1 et 0,3 ml pour 100 g de viande, 0,1-0,3% v/p) tend à se généraliser. Elles sont majoritairement constituées de composés phénoliques (Niedziela *et al.*, 1998) : phénol, guaïacol et ses dérivés, syringol et ses dérivés, eugénol, mais également de formaldéhyde, cétones, acides, furane et pyranne (Sunen *et al.*, 2001) en solution dans de l'acide acétique (Girard, 1988).

1-5. Cubage

Après le fumage, les poitrines sont refroidies à des températures inférieures à 0°C, pouvant atteindre -6 à -8°C. Ces températures négatives sont indispensables pour garantir une coupe régulière. La mise en forme des lardons est effectuée avec une lardonneuse constituée d'un jeu de lames alternatives et d'une lame rotative, pour la section du lardon, la longueur étant déterminée par l'épaisseur de la poitrine.

1-6. Conditionnement

A l'échelle industrielle, le dosage et la mise en barquette sont généralement accompagnés d'un refroidissement secondaire : le lardon étant un produit humide et salé, il peut s'agglomérer facilement, des températures de -12 à -15°C limitent ce défaut.

La barquette est mise sous atmosphère modifiée (en général, de l'azote). Préalablement à cette étape, certains fabricants pulvérisent sur le produit de l'acide lactique ou du lactate de sodium pour améliorer la conservation. L'ajout de flore de biopréservation (principalement des bactéries lactiques du genre *Lactobacillus*) peut éventuellement avoir lieu.

1-7. Stockage

Les barquettes de lardons sont stockées à des températures inférieures à 3°C (FICT, 2000). A cette température, le produit est stable et les propriétés physico-chimiques évoluent très lentement. La durée de conservation des lardons, c'est-à-dire de leur fabrication à leur date limite de consommation, est en moyenne de 45 jours.

2 - Influence des principales étapes du procédé de fabrication des lardons sur le développement de *L. monocytogenes*

La filière porcine, de l'abattoir à l'usine de transformation, est particulièrement sensible au risque de contamination par *L. monocytogenes*, du fait de son portage dans le tractus intestinal ou sur la peau des porcs, de la contamination croisée, en particulier, dans les chambres froides et les salles de découpe (Giovannacci *et al.*, 1999).

Au cours du procédé de fabrication des lardons, de nombreux facteurs physico-chimiques sont contrôlés et permettent de limiter le développement de *L. monocytogenes*. En fonction des opérations unitaires, différentes stratégies sont employées pour garantir la qualité hygiénique des lardons.

2-1. Désossage, découennage et parage

Dans les salles de découpe, le maintien d'une température inférieure ou égale à 2°C limite ou inhibe la prolifération microbienne. Cependant, *Listeria* est un germe psychrotrophe (Larpen, 2000), c'est-à-dire que sa croissance, même si elle est ralentie, est possible jusqu'à des températures de l'ordre de 1°C. Par exemple, dans du pâté de porc, l'abaissement de la température de 10°C à 4°C allonge le temps de latence (*lag*) de *L. monocytogenes* d'un facteur sept et multiplie le temps de génération par environ trois (Farber *et al.*, 1995).

Dans du jambon cuit stérile (pH 6,2), le temps de latence de *L. monocytogenes* est divisé par trois, lorsque la température passe de 4°C à 8°C ; le temps de génération est, quant à lui, divisé par deux (Devlieghere *et al.*, 2001).

La température minimale permettant la croissance de *Listeria* est également liée à la valeur des autres paramètres environnementaux : elle augmente, lorsque le pH est acide et l' a_w basse (Koutsoumanis *et al.*, 2004).

2-2. Saumurage

2-2.1. Chlorure de sodium

En début de procédé, les poitrines de porc ont une a_w proche de 0,99, très favorable au développement bactérien. Lors du saumurage, l'ajout de chlorure de sodium permet de réduire l' a_w à des niveaux compris entre 0,96 et 0,97 (en moyenne, il y a 3% de chlorure de sodium dans les lardons (AFSSA, 2002)), ce qui limite le développement de *Listeria*. En effet, des études réalisées sur du saumon montrent que, pour un même pH et une même concentration en acide lactique, l'augmentation du pourcentage de chlorure de sodium de 3,5 à 5,2% (mesure dans la phase aqueuse) multiplie le temps de génération de *Listeria* par deux. A 8,9% de chlorure de sodium, la croissance de *Listeria* est inhibée (Dalgaard et Jorgensen, 1998).

Des études ont montré que *Listeria* pouvait survivre dans de la saumure contenant 22% de chlorure de sodium (Ryser et Marth (1996), cités par Chawla *et al* (1996)). La saumure peut donc être à l'origine de contamination croisée entre des poitrines de porc contaminées par *Listeria* et d'autres saines. En effet, lors de l'injection de la saumure, les aiguilles peuvent être contaminées avec les *Listeria* présentes en surface de la viande, et ensuite, contaminer la saumure qui va être injectée dans d'autres poitrines, dont la viande en profondeur est stérile (Gill *et al.*, 2005).

Pour les lardons comme pour le jambon cuit (a_w supérieure à 0,97 (Stekelenburg et Kant-Muermans, 2001)), même après saumurage, l' a_w n'est pas suffisamment basse pour éliminer tout risque de prolifération de *Listeria*, puisque ce pathogène peut croître dans une gamme d' a_w de l'ordre de 0,92 à 1,00 (Bourgeois *et al.*, 1996).

L' a_w minimale pour laquelle la croissance de *Listeria* est possible est également influencée par la valeur des autres paramètres environnementaux : elle augmente, lorsque le pH et la température diminuent (Koutsoumanis *et al.*, 2004).

2-2.2. Inhibiteurs

Les inhibiteurs de la croissance microbienne présents dans la saumure sont :

- les acides organiques,
- les sels d'acides organiques
- et le nitrite.

L'effet inhibiteur des acides et des sels d'acides organiques est consécutif à leur pouvoir acidifiant (plus faible pour les sels d'acides par rapport aux acides correspondants) mais également, à la nature de l'anion issu de leur dissociation. A la différence des acides, les sels d'acides organiques ont également un pouvoir osmoréducteur.

Listeria a un pH minimal de croissance de l'ordre de 4,3 à 5,0 (Bourgeois *et al.*, 1996). Le pH minimum au-dessous duquel sa croissance est inhibée est également :

- lié à la valeur de la température et de l' a_w : une température et/ou une a_w basse(s) augmente(nt) le pH minimal de croissance (Koutsoumanis *et al.*, 2004),
- influencé par l'acide utilisé pour ajuster le pH (Durand, 1999). L'efficacité antimicrobienne des acides organiques est supérieure à celle de l'acide chlorhydrique et décroît dans l'ordre suivant : acide acétique, lactique, citrique (Sorrells, 1989). Rosso (1995) a lié l'effet inhibiteur des acides organiques à leur pKa : plus le pKa de l'acide est élevé, plus l'acide est inhibiteur.

Dans les aliments, les acides faibles sont majoritairement sous forme dissociée. C'est la forme non dissociée qui a l'effet antibactérien principal : non chargée, elle pénètre dans la cellule bactérienne, puis se dissocie. Elle entraîne alors une baisse du pH intracellulaire, conduisant à un dérèglement de la pompe à protons, productrice d'énergie sous forme d'ATP. Privée d'énergie, la bactérie ne peut plus assurer les fonctions indispensables à sa survie (Bourgeois *et al.*, 1996).

De plus, en fonction de leur nature, les acides inhibent spécifiquement certaines voies enzymatiques. Par exemple, les ions lactate inhibent les enzymes impliqués dans la conversion de l'acide pyruvique en acide lactique (Houtsma *et al.*, 1994). Une modification de la physiologie et des activités métaboliques bactériennes a également été démontrée en présence d'ions acétate (Jensen *et al.*, 2003).

L'utilisation d'acides et de sels d'acides organiques en charcuterie/salaison est très fréquente (Durand, 1999). Sur des rondelles de saucisse de Bologne conservées à 4°C, l'addition de 1,8% de lactate de sodium augmente de 33% le temps de génération de *Listeria*.

Il est doublé, lorsqu'une combinaison de 1,8% de lactate de sodium et de 0,25% de diacétate de sodium est utilisée (Barmpalia *et al.*, 2005). Sur du jambon conservé à 4°C, la croissance de *Listeria* est inhibée en présence de 2,5 ou 3,3% de lactate de sodium ou de 0,2% de diacétate de sodium. A ces pourcentages, les inhibiteurs n'ont pas d'influence significative sur le goût ou la couleur du jambon (Stekelenburg et Kant-Muermans, 2001).

L'effet inhibiteur du nitrite de sodium sur la croissance de *Listeria* a été mis en évidence par de nombreux auteurs (Vignolo *et al.*, 1998 ; Leistner, 1999). Il est fortement influencé par le pH, la température et la concentration en chlorure de sodium (Durand, 1999). L'abaissement de l' a_w , lors de l'ajout de nitrite de sodium, explique en partie son effet inhibiteur. La forme active du nitrite pourrait également être l'acide nitreux non dissocié (Cammack *et al.*, 1999), mais le mode d'action de cet inhibiteur n'est cependant pas encore clairement expliqué.

2-3. Etuvage

Au cours de cette étape, les poitrines passent d'une température de réfrigération à des valeurs pouvant atteindre 30 à 45°C, lorsque l'étuvage est réalisé à basse température, et jusqu'à 50-55°C, lorsque l'étuvage est effectué à haute température.

La température maximale au-delà de laquelle la croissance de *Listeria* n'a plus lieu est de l'ordre de 45°C (Bourgeois *et al.*, 1996). L'étuvage basse température est un procédé particulièrement sensible, car il se déroule dans un domaine de température très favorable à la croissance de *Listeria*, celle-ci étant la plus rapide à 37°C.

Lorsque l'étuvage est réalisé entre 50 et 55°C, il permet de détruire une partie de la population, et ainsi, de réduire le taux de contamination. Dans ce domaine, une élévation minimale de la température réduit fortement le temps de réduction décimale (D_θ) de *Listeria* (c'est-à-dire le temps nécessaire pour diviser par dix la concentration bactérienne), comme présenté dans le Tableau 3.

*Tableau 3 : influence de la température θ (°C) sur le D_θ (min) pour *Listeria* cultivée dans de la saucisse fermentée (ICMSF, 1996)*

Température (°C)	D_θ (min)
48,9	99-107
52,0	38-42
54,4	20
57,2	6,6-9,8

Outre la température, qui est le paramètre influençant majoritairement la destruction thermique de *Listeria*, la valeur du temps de réduction décimale est également modifiée par de nombreux facteurs liés au procédé, à la matrice ou à la bactérie.

✓ Facteurs liés au procédé :

- la vitesse d'élévation de la température (Tableau 4),
- l'historique de température : dans de la saucisse de foie, la destruction de *Listeria* à 60°C est deux fois plus rapide, lorsque la température de croissance préalable au choc est de 19°C plutôt que 37°C (Bhaduri *et al* (1991), cités par Doyle *et al* (2001)) ;
- les chocs préalables (acide, thermique ou autre) permettent à *Listeria* de mieux résister à la chaleur (Doyle *et al.*, 2001). Par exemple, dans de la viande hachée, le nombre de *Listeria* détruites lors d'un chauffage à 64°C est plus faible lorsque les bactéries ont subi au préalable un traitement thermique de 30 minutes à 48°C (Farber, 1989) ;
- la formulation : dans de la viande hachée de porc (Yen *et al.*, 1991) ou de bœuf (Passos et Kuaye, 2002), l'addition de chlorure de sodium jusqu'à 3% limite la destruction de *L. monocytogenes*. L'ajout de nitrite (200 ppm), nitrate (300 ppm) dans les produits à base de viande, est également corrélé avec une augmentation du temps de réduction décimale à 60, 65 ou 70°C (Mackey *et al.*, 1990 ; Doyle *et al.*, 2001). Le D_{60} de *Listeria* dans la viande de bœuf augmente, lorsque le pH augmente de 5,6 à 6,2 (Jorgensen *et al.*, 1999). En revanche, l'ajout de lactate de sodium favorise la destruction thermique de *Listeria* (Yen *et al* (1992), cités par Doyle *et al.* (2001)).

Tableau 4 : influence de la vitesse d'élévation de température de la viande de porc sur le D_{62} de *Listeria* (Doyle *et al.*, 2001)

Vitesse d'élévation de la température (°C.min ⁻¹)	D_{62} (min)
1,3	9,2
2,2	6,2
8,0	5,5

✓ Facteurs liés à la matrice :

- *L. monocytogenes* est plus résistante à la chaleur dans les aliments solides que dans des bouillons de laboratoire (Murphy *et al.*, 2000),
- la teneur élevée en gras (30%, comparativement à 2%) ralentit la destruction de *Listeria* à 57,2 et 62,8°C (Fain *et al* (1991), cités par Doyle *et al.* (2001)).

✓ Facteurs liés à la bactérie :

- la souche : il est cependant complexe de classer les différentes souches de *Listeria*, puisque les études de destruction thermique sont rarement réalisées dans les mêmes conditions (état physiologique, préculture, milieux) (Doyle *et al.*, 2001),
- l'état physiologique : les bactéries sont moins résistantes en phase exponentielle de croissance qu'en phase stationnaire (ICMSF, 1996),
- les cellules de *L. monocytogenes* adhérentes à un support sont plus résistantes à la chaleur que les cellules planctoniques (Frank et Koffi, 1990).

2-4. Fumage

Lors du fumage, deux paramètres influent sur le développement de *Listeria* : la température qui est supérieure à la température maximale de croissance, et à un degré moindre, les constituants de la fumée liquide qui sont des inhibiteurs de croissance.

L'effet inhibiteur de la fumée liquide est aussi dû à son pouvoir acidifiant (présence d'acide acétique). Lorsque l'acide acétique est utilisé seul, le pH minimal au-dessous duquel la croissance de *Listeria* est inhibée est compris entre 5,0 et 5,2 (Farber *et al.*, 1989).

Les fumées contiennent d'autres composés qui ont un effet inhibiteur, en particulier, le formaldéhyde et les composés phénoliques (Niedziela *et al.*, 1998 ; Sunen *et al.*, 2001). Certaines études ont mis en évidence que l'isoeugénol était le composé actif des fumées (Faith *et al.* (1992), cités par Doyle (1999)), alors que pour d'autres, c'est la concentration en phénols totaux qui est déterminante (Sunen, 1998). Cependant, dans cette même étude, Sunen souligne que, pour plusieurs fumées du commerce, les concentrations à ajouter pour observer un effet inhibiteur optimum sont génératrices de goûts désagréables.

Dans de la chair de saumon, Poysky *et al.* (1997) ont montré que l'ajout de fumée liquide diminuait de 24,4°C la température à partir de laquelle une partie de la population de *Listeria* était détruite.

2-5. Cubage

Lors du cubage, les températures sont négatives et peuvent atteindre -8°C. Aucune bactérie pathogène alimentaire ne peut se multiplier dans ces conditions ; une faible fraction de la population peut même être détruite. Cependant, la majeure partie des bactéries retrouve leur potentiel de croissance, lorsque les températures redeviennent positives (Bourgeois *et al.*, 1996).

Comme pour la destruction thermique à température élevée, l'effet bactériostatique (ou faiblement bactéricide) des températures négatives est influencé par le procédé (vitesse d'abaissement de température, temps d'exposition aux basses températures), le produit (teneur en eau, pH) et la bactérie (état physiologique, espèce).

2-6. Conditionnement

Au cours du conditionnement, quatre paramètres limitent ou inhibent le développement de *Listeria* :

- les températures négatives,
- l'ajout d'acide lactique ou de lactate de sodium (paragraphe 2.2.2),
- l'ajout de bactéries lactiques (biopréservation)
- et la mise sous atmosphère modifiée (en général, de l'azote).

Pour des raisons technologiques, la température est comprise entre -12 et -15°C. Dans ces conditions, la population bactérienne n'évolue pas et une très faible proportion est même détruite.

Des bactéries lactiques, principalement du genre *Lactobacillus*, sont ajoutées aux lardons pour inhiber le développement de bactéries pathogènes ou d'altération (Demeyer, 2004). Les souches utilisées sont principalement sélectionnées pour leur antagonisme vis-à-vis de *Listeria*. Elles doivent également pouvoir survivre aux températures de réfrigération, tolérer la présence de chlorure de sodium, se développer rapidement dans la viande et ne pas en modifier les propriétés sensorielles (Vermeiren *et al.*, 2004). Les bactéries lactiques sont, en général, ajoutées à des concentrations supérieures à 10⁶ cellules par gramme de produit (Durand, 1999). De nombreux travaux réalisés dans de la viande de porc ont montré l'inhibition de *Listeria* par des bactéries lactiques ou les bactériocines qu'elles produisent (Mataragas *et al.*, 2003 ; Sabia *et al.*, 2003).

En règle générale, les barquettes de lardons sont mises sous atmosphère modifiée, principalement sous azote. *Listeria* est peu exigeante vis-à-vis de ses besoins en oxygène. Elle peut se développer en aérobiose ou anaérobiose (ICMSF, 1996). Cependant, la présence d'azote, donc la baisse de la concentration en oxygène, peut contribuer à ralentir sa croissance. La concentration en *Listeria* dans de la viande de bœuf, conservée durant cinq jours à 10°C sous atmosphère modifiée (60% d'oxyde de carbone/40% d'azote/0,4% de monoxyde de carbone), est dix fois plus faible par rapport à une conservation sous un mélange 70% d'oxygène/30% d'oxyde de carbone (Nissen *et al.*, 2000).

Par ailleurs, Liserre *et al.* (2002) ont mis en évidence que l'inhibition de *Listeria* par une souche de *Lactobacillus sakei* était plus efficace sous atmosphère modifiée. Ils ont émis l'hypothèse d'une production de bactériocine plus conséquente, lorsque la concentration en oxygène diminuait.

2-7. Stockage

La stabilité et la sécurité microbienne des lardons jusqu'à leur date limite de consommation sont assurées par une combinaison de plusieurs facteurs. Le maintien d'une température basse (inférieure à 4°C) est la condition la plus importante. Elle permet d'allonger le temps de latence et d'augmenter le temps de génération de *Listeria*. Cependant, elle n'est pas suffisante pour inhiber son développement ; c'est pourquoi, l'ajout de chlorure de sodium et d'inhibiteurs lors du procédé de fabrication, la conservation sous atmosphère modifiée, de même que le respect des règles d'hygiène sont indispensables pour garantir la qualité microbiologique du produit.

3 - Modélisation de l'évolution de la contamination de *L. monocytogenes* au cours d'un procédé

Pour répondre au besoin de la filière, les professionnels doivent disposer d'outils pour maîtriser la contamination de *Listeria* dans leur produit et faire évoluer leur procédé. Des modèles de prédiction peuvent permettre d'atteindre ces objectifs. Ils sont de deux types :

- les modèles de microbiologie prévisionnelle existent et décrivent correctement le comportement de *Listeria* (croissance, survie, destruction), en fonction des propriétés physico-chimiques du produit ;
- les modèles de transferts décrivent l'évolution des propriétés physico-chimiques du produit (température, teneur en eau) en fonction du procédé appliqué.

3-1. Modèles de microbiologie prévisionnelle

En microbiologie prévisionnelle, des modèles primaires et secondaires sont utilisés :

- les modèles primaires décrivent l'allure des cinétiques bactériennes, c'est-à-dire l'évolution de la concentration bactérienne en fonction du temps ;
- les modèles secondaires décrivent l'effet des facteurs environnementaux sur les paramètres des modèles primaires.

3-1.1. Prédictions des cinétiques de croissance

3-1.1.1. Modèles Primaires

Il existe de nombreux modèles primaires pour décrire l'évolution de la population bactérienne en fonction du temps. Deux ont été majoritairement utilisés : le modèle de Gompertz et le modèle logistique avec délai et rupture.

Le modèle de Gompertz, reparamétré par Zwietering *et al* (1990) pour mettre en évidence les paramètres biologiques (Equation 1), a été couramment utilisé, dans le but de prédire la croissance bactérienne (Cheroutre-Vialette, 1999).

$$\ln(N) = \ln(N_0) + A \cdot \exp\left(-\exp\left(\frac{\mu_{\max} \cdot e}{A}(lag - t)\right) + 1\right) \quad \text{Eq. 1}$$

Avec N , la concentration bactérienne (unité formant colonie -UFC.g⁻¹-),
 N_{\max} , la concentration bactérienne maximale,
 $A = \ln(N_{\max}) - \ln(N_0)$,
 $e = \exp(1)$

Cependant, Rosso (1995) a mis en évidence que l'utilisation de ce modèle entraînait une surestimation du taux de croissance, par rapport à la définition classique de μ_{\max} (pente obtenue en représentation logarithmique pendant la phase de croissance exponentielle). Par ailleurs, le paramètre N_0 , calculé au temps initial, est différent de la concentration bactérienne mesurée en début d'expérience. Rosso *et al.* (1996) ont donc développé un modèle logistique avec délai et rupture (Equation 2), limitant les problèmes évoqués ci-dessus. Ce modèle comporte quatre paramètres : N_0 , la concentration bactérienne initiale, N_{\max} , la concentration bactérienne maximale, μ_{\max} , le taux maximal de croissance, et lag , le temps de latence.

$$\frac{dN}{N \cdot dt} = \mu_{\max} \cdot \left(1 - \frac{N}{N_{\max}}\right) \quad \text{Eq. 2}$$

Avec N , la concentration bactérienne au temps t

Ainsi, sous une forme intégrée, on obtient :

$$\begin{cases} \ln(N) = \ln(N_0) & , t \leq lag \\ \ln(N) = \ln(N_{\max}) - \ln\left[1 + \left(\frac{N_{\max}}{N_0} - 1\right) \cdot \exp(-\mu_{\max} \cdot (t - lag))\right] & , t > lag \end{cases} \quad \text{Eq. 3}$$

3-1.1.2. Modèles secondaires

La modélisation secondaire consiste à relier l'effet du pH, de l' a_w , de la température... au taux maximal de croissance et au temps de latence.

Les modèles polynomiaux (Buchanan *et al.*, 1989) décrivent simultanément l'effet de tous les facteurs environnementaux à l'aide de fonctions polynomiales. Cependant ces modèles présentent des inconvénients qui limitent leur utilisation, à savoir :

- l'ajustement des paramètres des modèles nécessite de réaliser de nombreuses expériences,
- les paramètres des modèles n'ont aucune signification biologique,
- enfin, les modèles ne peuvent être utilisés que dans le domaine du plan d'expériences qui a servi à leur élaboration.

Le modèle racine carrée a, d'abord, été développé pour prédire l'influence de la température (Ratkowsky *et al.*, 1982) :

$$\sqrt{\mu_{\max}} = b.(\theta - \theta_{\min}) \quad \text{Eq. 4}$$

Avec θ_{\min} , la valeur extrapolée de la température minimale de croissance de la bactérie, b , un coefficient sans signification biologique

Ce modèle a ensuite été complexifié pour tenir compte du pH (Adams *et al* (1991), cités par Le Marc (2001)), puis de l' a_w (Witjes *et al.*, 1993) :

$$\sqrt{\mu_{\max}} = b.(\theta - \theta_{\min}).\sqrt{(pH - pH_{\min})} \quad \text{Eq. 5}$$

$$\sqrt{\mu_{\max}} = b.(\theta - \theta_{\min}).\sqrt{(pH - pH_{\min}).\sqrt{(a_w - a_{w\min})}} \quad \text{Eq. 6}$$

Avec pH_{\min} et $a_{w\min}$, les valeurs extrapolées du pH minimal et de l' a_w minimale de croissance de la bactérie

Certains coefficients des modèles de type racine carrée n'ont pas de signification biologique, ceci constitue un frein à leur utilisation.

A partir de ce constat, une nouvelle approche a été développée : les modèles gamma. Ceux-ci sont basés sur la connaissance :

- des valeurs cardinales de la souche étudiée, c'est-à-dire des valeurs minimale, optimale et maximale de croissance
- et de la valeur de μ_{opt} qui correspond au taux maximal de croissance (μ_{max}), pour les conditions optimales de croissance.

Le facteur de croissance γ correspond au produit des fonctions caractérisant l'influence des paramètres environnementaux (Equation 7), il est compris entre zéro et un.

$$\gamma = \frac{\mu_{\max}}{\mu_{opt}} = \gamma(\theta) \cdot \gamma(pH) \cdot \gamma(a_w) \quad \text{Eq. 7}$$

Le modèle de Zwietering *et al.* (1992) a été appliqué pour décrire l'évolution du taux maximal de croissance, en fonction de la température, du pH et de l' a_w . Cependant, les paramètres à estimer n'ont pas tous une signification biologique. Les fonctions γ sont définies pour chaque facteur séparément et sont indépendantes de la valeur des autres facteurs. Par exemple, pour la température, la fonction s'écrit :

$$\gamma(\theta) = \left(\frac{(\theta - \theta_{\min}) \cdot [1 - \exp(c'(\theta - \theta_{\max}))]}{(\theta_{opt} - \theta_{\min}) \cdot [1 - \exp(c'(\theta_{opt} - \theta_{\max}))]} \right) \quad \text{Eq. 8}$$

Avec θ_{\min} , θ_{\max} , θ_{opt} , les températures minimale, maximale et optimale de croissance, c' , un coefficient sans signification biologique.

Le modèle cardinal de Rosso (1995) a été développé, selon une approche similaire au modèle de Zwietering *et al.* (1992). Il permet de prendre en compte l'influence de la température, du pH, de l' a_w et de la nature de l'acide sur le taux maximal de croissance (Rosso et Robinson, 2001). Dans ce modèle (Equations 9 et 10), les effets des facteurs environnementaux sont supposés indépendants. Les deux principaux avantages de ce modèle sont :

- une faible corrélation entre les paramètres du modèle
- et une signification biologique de tous les paramètres.

Le modèle de Rosso (1995) s'écrit :

$$\mu_{\max} = \mu_{opt} \cdot CM_n(X) \quad \text{Eq. 9}$$

$$CM_n(X) = \begin{cases} 0 & , X \leq X_{\min} \\ \frac{(X - X_{\max}) \cdot (X - X_{\min})^n}{(X_{opt} - X_{\min})^{n-1} \cdot [(X_{opt} - X_{\min}) \cdot (X - X_{opt}) - (X_{opt} - X_{\max}) \cdot ((n-1)X_{opt} + X_{\min} - nX)]} & , X_{\min} < X < X_{\max} \\ 0 & , X \geq X_{\max} \end{cases} \quad \text{Eq. 10}$$

Avec X, le pH, la température ou l' a_w , X_{\min} la valeur minimale de croissance, X_{opt} la valeur optimale de croissance, X_{\max} , la valeur maximale de croissance, $n = 1$, pour le pH, et $n = 2$, pour la température ou l' a_w

Lorsque les conditions de pré-incubation sont identiques, pour un même substrat, Rosso (1995) a montré qu'il existait une relation entre le temps de latence (*lag*) et le taux maximal de croissance (μ_{max}) :

$$\mu_{max} \cdot lag = K \tag{Eq. 11}$$

Avec *K*, la constante dépendant des conditions de pré-incubation et de la nature du substrat

Augustin (1999) a complété le modèle de Rosso en y intégrant l'effet de facteurs qualitatifs (nature du substrat, agitation des milieux) et des substances inhibitrices (sels d'acides organiques, di ou tri-acides, caféine, phénol, cacao...).

Pour décrire l'influence des substances inhibitrices sur le taux maximal de croissance, Augustin a ajouté une fonction supplémentaire au modèle de Rosso :

$$\gamma(c_i) = \begin{cases} (1 - c_i / CMI_i)^2 & , c_i < CMI_i \\ 0 & , c_i \geq CMI_i \end{cases} \tag{Eq. 12}$$

Avec c_i , la concentration en substance inhibitrice *i*,
 CMI_i , la concentration minimale inhibitrice de la substance *i*

L'effet combiné de la température, du pH, de l' a_w et de la présence de substance inhibitrice est obtenu en multipliant leurs effets séparés :

$$\mu_{max} = \mu_{opt} \cdot CM_2(\theta) \cdot CM_1(pH) \cdot CM_2(a_w) \cdot \prod_{i=1}^n \gamma(c_i) \tag{Eq. 13}$$

Dans le modèle de Rosso (1995), les valeurs minimales de croissance pour la température (θ_{min}), le pH (pH_{min}) et l' a_w ($a_w \min$) sont supposées constantes et indépendantes des conditions environnementales ; ces résultats sont contradictoires avec les travaux de nombreux autres auteurs (Jorgensen *et al.*, 1995 ; Le Marc, 2001 ; Koutsoumanis *et al.*, 2004). Afin de tenir compte des interactions entre la température, le pH, l' a_w et les substances inhibitrices, Augustin (1999) propose de recalculer les valeurs cardinales minimales et les concentrations minimales inhibitrices (CMI), en fonction de la valeur des autres facteurs. Il développe la notion de valeur cardinale minimale absolue et de CMI absolue. La valeur cardinale minimale absolue correspond à la valeur cardinale minimale de croissance, lorsque les autres facteurs sont à leur valeur optimale et en absence d'inhibiteur. La concentration minimale inhibitrice absolue de la substance *i* est la CMI de la substance *i*, lorsque le pH, l' a_w et la température sont à leur valeur optimale et en absence d'autre substance inhibitrice (Equations 14 et 15).

$$X_{\min} = X_{opt} - (X_{opt} - X_{\min}^{\circ}) \cdot \left(\prod_{i=1}^n \left(1 - \frac{c_i}{CMI_i^{\circ}} \right) - \left[\frac{(Y_{opt} - Y)}{(Y_{opt} - Y_{\min}^{\circ})} \right]^3 - \left[\frac{(Z_{opt} - Z)}{(Z_{opt} - Z_{\min}^{\circ})} \right]^3 \right)^{\frac{1}{3}} \quad \text{Eq. 14}$$

Avec CMI_i° , la concentration minimale inhibitrice absolue,
 X_{\min}° , Y_{\min}° , Z_{\min}° , la valeur minimale absolue de croissance pour le pH, la température ou l' a_w

$$CMI_i = CMI_i^{\circ} \left(1 - \frac{\left[\frac{(\theta_{opt} - \theta)}{(\theta_{opt} - \theta_{\min}^{\circ})} \right]^3 + \left[\frac{(pH_{opt} - pH)}{(pH_{opt} - pH_{\min}^{\circ})} \right]^3 + \left[\frac{(a_{wopt} - a_w)}{(a_{wopt} - a_{wmin}^{\circ})} \right]^3}{\prod_{j \neq i} (1 - c_j / CMI_j^{\circ})} \right) \quad \text{Eq. 15}$$

L'effet de la prise en compte des interactions entre facteurs environnementaux se traduit entre autre, par une modification de l'interface entre la zone de croissance et la zone de non croissance (Figure 2). Augustin (1999) considère que cette interface correspond aux conditions pour lesquelles le taux maximal de croissance est nul.

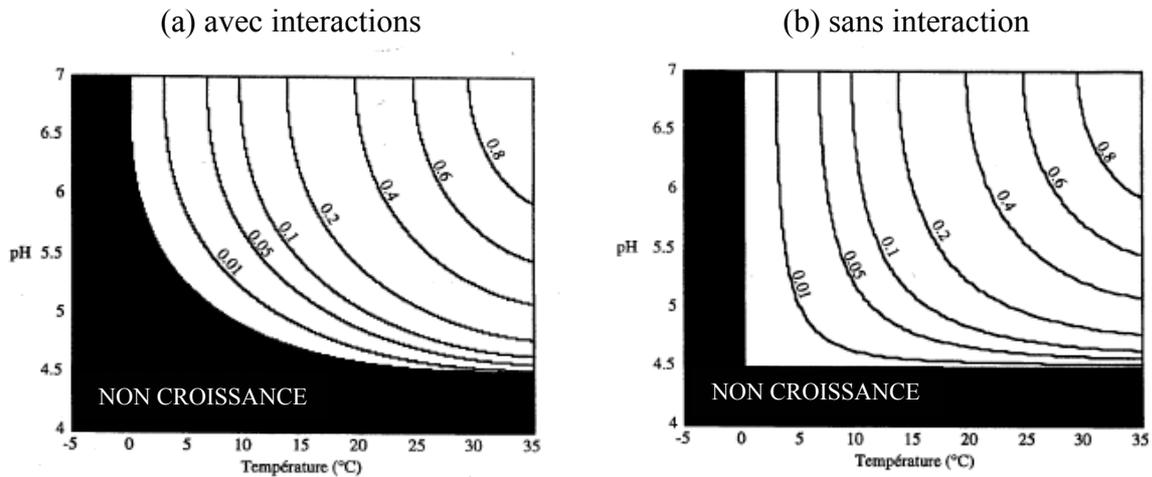


Figure 2 : courbes d'iso-réponses du taux maximal de croissance (d'après le modèle d'Augustin (1999)), en fonction de la température et du pH, lorsque les interactions entre les paramètres environnementaux sont prises en compte (a) ou non (b)

($\mu_{opt} = 1h^{-1}$, $\theta_{opt} = 35^{\circ}C$, $\theta_{\min} (^{\circ}) = 0^{\circ}C$, $pH_{opt} = 7,0$, $pH_{\min} (^{\circ}) = 4,5$)

Le Marc *et al* (2002) ont développé un modèle basé sur cette même approche modulaire. Il permet de modéliser l'effet de la température, du pH et de la concentration en acide organique (acides lactique, acétique, propionique). Ces auteurs proposent trois modifications au modèle d'Augustin :

- premièrement, le modèle décrit l'effet de la température sur le taux maximal de croissance (Equation 16), en tenant compte du comportement spécifique de certaines souches de *Listeria* aux basses températures (Charles-Bajard, 1996). En effet, pour la majorité des bactéries, la racine carrée du taux maximal de croissance (μ_{max}) varie linéairement en fonction de la température, dans la majeure partie de la zone de température suboptimale.

Cette observation n'est pas confirmée pour certaines souches de *Listeria*, pour lesquelles une cassure est présente entre 10 et 15°C. Pour modéliser ce comportement particulier, deux paramètres supplémentaires sont introduits dans le modèle : θ_c , la température de rupture de la pente et θ_l , la température d'intersection de la première partie linéaire de la représentation graphique $\mu_{max}^{0.5} = f(\theta)$ avec l'axe des abscisses (Figure 3).

$$\rho'(\theta) = \begin{cases} \frac{(\theta - \theta_l)^2 \cdot (\theta - \theta_{max})}{(\theta_{opt} - \theta_l) [(\theta_{opt} - \theta_l) \cdot (\theta - \theta_{opt}) - (\theta_{opt} - \theta_{max})(\theta_{opt} + \theta_l - 2\theta)]} & , \theta \geq \theta_c \\ \frac{(\theta_c - \theta_l)^2 \cdot (\theta - \theta_{max})}{(\theta_{opt} - \theta_l) [(\theta_{opt} - \theta_l) \cdot (\theta_c - \theta_{opt}) - (\theta_{opt} - \theta_{max})(\theta_{opt} + \theta_l - 2\theta_c)]} \cdot \left(\frac{\theta - \theta_{min}}{\theta_c - \theta_{min}} \right)^2 & , \theta < \theta_c \end{cases}$$

Eq. 16

Avec θ_c , la température de rupture de pente,
 θ_l , l'intersection de la première partie linéaire avec l'axe des abscisses,
 θ_{opt} , la température optimale de croissance,
 θ_{min} , la température minimale de croissance,
 θ_{max} , la température maximale de croissance

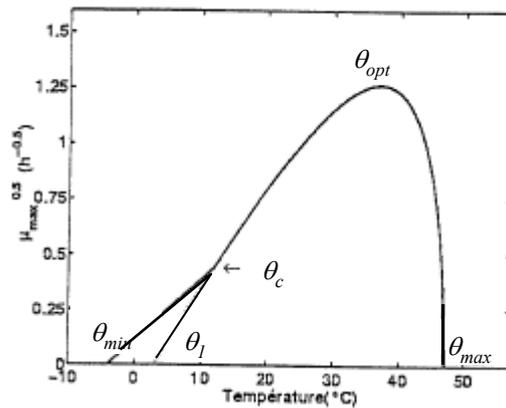


Figure 3 : courbe théorique du modèle proposé par Le Marc (2001), en représentation racine carré, pour décrire l'évolution du taux maximal de croissance de *Listeria* en fonction de la température

Avec θ_c , la température de rupture de pente,
 θ_l , l'intersection de la première partie linéaire avec l'axe des abscisses,
 θ_{opt} , la température optimale de croissance,
 θ_{min} , la température minimale de croissance,
 θ_{max} , la température maximale de croissance

- deuxièmement, l'effet d'un acide organique sur le taux maximal de croissance bactérien est fonction de la concentration d'acide non dissocié, de la concentration d'acide dissocié et des interactions entre les deux formes (Equation 17). Dans le cas de faible concentration d'acide, l'effet de l'acide dissocié peut être négligé (Equation 18) ;

$$\tau([acide]) = \left(1 - \left(\frac{[AH]}{CMI_u \cdot \left(1 - \frac{[A^-]}{CMI_D} \right)} \right)^\alpha \right) \cdot \left(1 - \left(\frac{[A^-]}{CMI_D} \right)^3 \right) \quad \text{Eq. 17}$$

Avec $[AH]$, la concentration en acide non dissocié,
 $[A^-]$, la concentration en acide dissocié,
 CMI_u , la concentration minimale inhibitrice de l'acide non dissocié,
 CMI_D , la concentration minimale inhibitrice de l'acide dissocié,
 α , un paramètre sans signification biologique

$$\tau([acide]) = \left(1 - \left(\frac{[AH]}{CMI_u} \right)^\alpha \right) \quad \text{Eq. 18}$$

- et troisièmement, un terme a été développé pour décrire l'effet des interactions sur le taux maximal de croissance (Figure 4) :

$$\mu_{\max} = \mu_{opt} \cdot \rho'(\theta) \cdot \gamma'(pH) \cdot \tau([acide]) \cdot \xi(\theta, pH, [acide]) \quad \text{Eq. 19}$$

Avec $\xi(\theta, pH, [acide])$, le terme décrivant les effets des interactions non prises en compte par l'approche modulaire

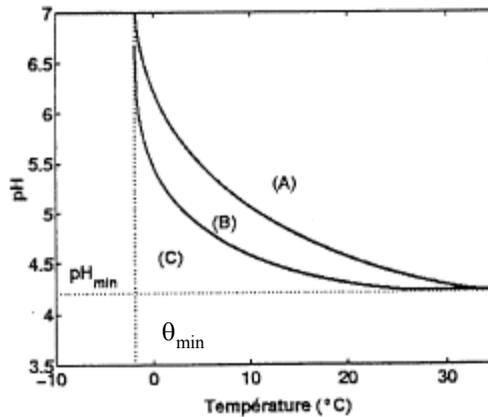


Figure 4 : division du domaine de pH et de température pour *Listeria* (Le Marc, 2001)

Zone (A) : effets indépendants du pH et de la température,

Zone (B) : interaction entre le pH et la température,

Zone (C) : non croissance du fait des interactions,

θ_{\min} , la température minimale de croissance,

pH_{\min} , la température minimale de croissance

Le modèle de Le Marc (2001) ne permet pas de prendre en compte l'effet de substances ou de mélange de substances inhibitrices employés dans les procédés de charcuterie-salaison, comme :

- les mélanges d'acides ou de sels d'acides organiques,
- les diacides, comme l'acide ascorbique, ajouté pour stabiliser les pigments et qui a un effet inhibiteur vis-à-vis de *Listeria* (Giannuzzi et Zaritzky, 1996). En effet, l'utilisation d'un diacide ou d'un triacide (acide citrique) complexifie le modèle, puisqu'une CMI doit être calculée pour chaque forme de l'acide. Pour un diacide, trois formes co-existent (non dissociée, dissociée, seule la première fonction acide dissociée) et quatre pour un triacide ;
- les phénols.

Par ailleurs, seules quelques expériences ont été réalisées pour modéliser l'influence de l' a_w . Enfin, Le Marc (2001) souligne que d'autres études sont nécessaires pour démontrer que l'approche développée peut être utilisée pour modéliser l'évolution des paramètres de croissance de *Listeria* en fonction de la température, du pH, de la concentration en acide organique et de l' a_w .

3-1.2. Prédiction des cinétiques de destruction

3-1.2.1. Modèles primaires

L'allure des cinétiques de destruction des microorganismes est influencée par de nombreux facteurs liés à la bactérie (espèce, état physiologique), au procédé appliqué (vitesse d'élévation de la température ou d'abaissement du pH) et à la nature de la matrice (liquide ou solide). Les cinétiques de destruction (Xiong *et al.*, 1999) peuvent être linéaires (avec ou sans phase de latence, avec ou sans plateau) ou biphasiques.

- Les cinétiques linéaires sont :
 - o sans phase de latence et sans plateau lorsque les bactéries ont une résistance identique à la température ou aux inhibiteurs donc une vitesse de destruction homogène pour toute la population (courbe A, Figure 5) ; c'est le cas, lorsque la population bactérienne dénombrée est une culture pure,
 - o avec une phase de latence mais sans plateau (courbe B, Figure 5) :
 - lorsque les cellules en suspension forment des amas,
 - lorsque la destruction bactérienne n'est pas instantanée, mais consécutive à une multitude de chocs.

- avec un plateau mais sans phase de latence (courbe C, Figure 5) lorsque la population bactérienne est composée de bactéries qui ont une résistance différente à la chaleur ou aux acides : une partie de la population bactérienne (la plus sensible, représentée par la première partie de la cinétique) est détruite, la seconde (résistance au traitement, représentée dans la cinétique par le plateau) n'est pas détruite.
- Les cinétiques sont biphasiques (courbe D, Figure 5) lorsque, dans la population, certaines bactéries sont plus sensibles que d'autres au traitement thermique, acide ou osmotique. La première partie de la cinétique représente la destruction de la fraction la moins résistante (avec une vitesse de destruction rapide), et la seconde partie de la cinétique illustre la destruction de la fraction la plus résistante (avec une vitesse de destruction plus lente). La présence de bactéries plus au moins sensibles à un traitement est observée :
 - lorsque la population bactérienne dénombrée n'est pas une culture pure (mélange de plusieurs souches ou espèces bactériennes),
 - dans le cas de matrice solide : il existe localement des micro-environnements où l' a_w est plus faible. Les bactéries localisées à ces endroits ont une résistance thermique accrue par rapport à la population globale.

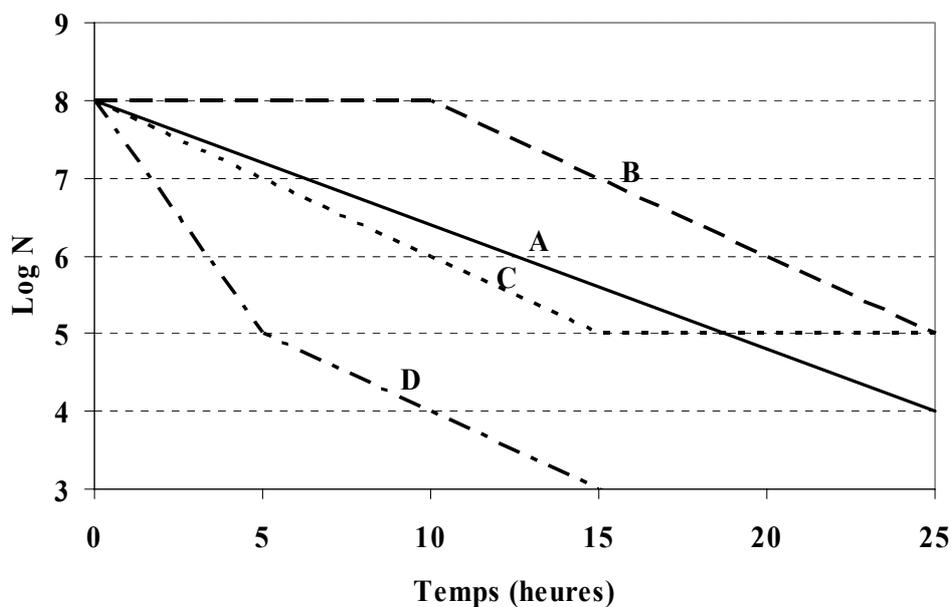


Figure 5 : principales allures des cinétiques de destruction bactérienne

- (A) cinétique linéaire,
- (B) cinétique linéaire avec une phase de latence,
- (C) cinétique linéaire avec un plateau,
- (D) cinétique biphasique

Lorsque la décroissance est exponentielle sans période de latence, (courbe A, Figure 5), la cinétique est de premier ordre (Chick (1908), cité par Xiong *et al* (1999)). Elle est correctement décrite par l'équation suivante :

$$\frac{dN}{N \cdot dt} = -k \quad \text{Eq. 20}$$

Avec N , la concentration bactérienne au temps t ,
 k , la constante de vitesse de réaction (t^{-1})

Ainsi sous une forme intégrée, on obtient :

$$N = N_0 \cdot \exp(-k \cdot t) \quad \text{Eq. 21}$$

Avec t , le temps,
 N_0 , la concentration bactérienne initiale

Le modèle de Buchanan *et al* (1993), cités par Xiong *et al* (1999) permet de décrire la décroissance bactérienne, lorsque celle-ci est exponentielle sans (courbe A, Figure 5) ou après une phase de latence (courbe B, Figure 5) :

$$\log N(t) = \begin{cases} \log N_0 & , t \leq lag \\ \log N_0 - \frac{t - lag}{D_0} & , t > lag \end{cases} \quad \text{Eq. 22}$$

Avec lag , le temps de latence

Lorsque les cinétiques sont de premier ordre (courbe A, Figure 5), lorsqu'une phase plateau est observée (courbe C, Figure 5), ou lorsque la décroissance est biphasique (courbe D, Figure 5), le modèle de Cerf (1977), cité par Xiong *et al* (1999) peut être utilisé :

$$\log \frac{N(t)}{N_0} = f e^{-k_1 t} + (1 - f) e^{-k_2 t} \quad \text{Eq. 23}$$

Avec f et $(1 - f)$, les proportions de bactéries la moins et la plus résistante,
 k_1 et k_2 , les taux d'inactivation des populations bactériennes la moins et la plus résistante.

Le modèle le plus adapté pour décrire les cinétiques de destruction est choisi en fonction de l'allure des courbes expérimentales. Ensuite, lorsque plusieurs modèles peuvent être utilisés, le principe de parcimonie s'applique, et pour une même qualité d'ajustement entre les données expérimentales et la courbe lissée, le modèle le plus simple (celui qui a le moins de paramètres) est employé.

3-1.2.2. Modèles secondaires

La modélisation de la décroissance thermique est, à l'heure actuelle, souvent uniquement basée sur l'influence de la température. Le premier modèle a été proposé par Bigelow (1921), cité par Van Impe *et al* (1995) ; il est décrit par les Equations 24 et 25. Cette approche est basée sur des observations expérimentales mettant en évidence que le temps de réduction décimale (D_θ) décroît exponentiellement avec la température (ICMSF, 1996 ; Bimbenet *et al.*, 2002).

$$k(\theta) = \frac{2,303}{D_{ref}} \exp \left[\frac{2,303}{z'} \cdot (\theta - \theta_{ref}) \right] \quad \text{Eq. 24}$$

$$D_\theta = D_{ref} \cdot 10^{\frac{\theta_{ref} - \theta}{z'}}, \text{ avec } D_\theta = \frac{2,303}{k(\theta)} \quad \text{Eq. 25}$$

Avec k , la constante de vitesse de réaction,

D_θ , le temps de réduction décimale à la température θ ,

D_{ref} , le temps de réduction décimale à la température de référence,

z' , l'élévation de température nécessaire pour diviser par dix la valeur de D_θ

Cerf *et al.* (1996), Juneja *et al.* (2001), Juneja (2003) ont développé des modèles polynomiaux, afin de tenir compte de l'influence de plusieurs paramètres environnementaux sur la destruction thermique des bactéries (Tableau 5).

Tableau 5 : paramètres environnementaux (en plus de la température) pris en compte pour prédire le temps de réduction décimale

Modèles	Paramètres environnementaux pris en compte, en plus de la température, pour prédire le temps de réduction décimale
Cerf <i>et al</i> (1996)	a_w , pH
Juneja <i>et al</i> (2001)	Nature du substrat (poulet ou dinde), pourcentage de gras, interactions entre les paramètres environnementaux
Juneja (2003)	Pourcentages de lactate de sodium et de diacétate de sodium, interactions entre les paramètres environnementaux

Le modèle de Cerf a été validé en bouillon de laboratoire, et les modèles de Juneja, dans de la viande de poulet et de dinde ou dans du maigre de bœuf. Ces trois modèles présentent l'avantage de tenir compte de paramètres environnementaux autres que la température. Cependant, l'utilisation de modèles polynomiaux pour prédire les cinétiques de destruction présente les mêmes inconvénients que pour la modélisation des cinétiques de croissance, à savoir :

- de nombreuses expériences sont nécessaires pour ajuster les paramètres des modèles,
- les paramètres n'ont pas de signification biologique
- et les modèles ne sont utilisables que dans le domaine du plan d'expériences qui a servi à leur élaboration.

Pour décrire l'effet de différents facteurs environnementaux sur la destruction thermique d'un microorganisme, Mafart et Leguérinel (1998), cités par Leguérinel *et al* (2005), utilisent l'approche modulaire. Celle-ci consiste à modéliser individuellement l'effet de chaque facteur. Chaque facteur environnemental se dédouble en un facteur X agissant sur la thermorésistance proprement dite au cours du traitement thermique, et un facteur noté X', agissant sur l'aptitude des cellules survivantes, mais endommagées, à se développer lors de la croissance postérieure au traitement thermique. Ces deux effets sont combinés dans le concept de temps de réduction décimale apparent noté D', avec D' inférieur à D, lorsque les conditions d'incubation ne sont pas optimales.

Lorsque les facteurs pris en compte sont la température (θ), le pH et l' a_w , le modèle s'écrit selon le système d'équations suivants :

$$D = D^* \cdot \lambda'(\theta) \cdot \lambda'(pH) \cdot \lambda'(a_w) \quad \text{Eq. 26}$$

$$D' = D \cdot \lambda'(\theta') \cdot \lambda'(pH') \cdot \lambda'(a_w') \quad \text{Eq. 27}$$

Avec D^* , le temps de réduction décimale dans les conditions de référence de température (θ), pH et a_w déterminé dans une matrice alimentaire donnée,

D , le temps de réduction décimale dans les conditions environnementales optimales d'incubation définies par les fonctions λ'_x ,

D' , le temps de réduction décimale apparent où les facteurs X' (a_w , pH ou température) se rapportent aux conditions d'incubation postérieures au traitement thermique,

λ'_x , une fonction relative au facteur X

Les fonctions λ'_x s'écrivent sous la forme suivante :

$$\lambda'_x = \left(\frac{X - X_{ref}}{Z_x} \right)^n \quad \text{Eq. 28}$$

Avec n, un paramètre sans signification biologique, égal à 2, pour le pH et l' a_w , et à 1 pour la température, X, le facteur environnemental étudié (a_w , pH ou température) noté X pour l'effet au cours du traitement, X', pour l'effet postérieur au traitement,

X_{ref} , la valeur de référence du facteur (à laquelle est déterminé D^*),

Z_x , l'écart par rapport à X_{ref} entraînant une variation de D^* d'un facteur dix

Dans le « concept lambda », analogue au « concept gamma » de Zwietering *et al* (1992), il est supposé que l'effet de chaque facteur est indépendant de celui des autres, le faible poids des interactions ne justifiant pas leur prise en compte. Par ailleurs, l'effet des facteurs température, pH et a_w peut être décrit, en utilisant des paramètres ayant tous une signification biologique (Gaillard *et al.*, 1998 ; Couvert *et al.*, 1999).

Le modèle de Mafart et Leguérinel (1998) a été validé pour prédire la destruction de spores de *Bacillus cereus* dans de la crème au chocolat (Leguérinel *et al.*, 2005). Cependant, ce

modèle nécessite la connaissance de caractéristiques intrinsèques à la bactérie (Z_{pH} , Z_{aw} , Z_0); ces données ne sont pas disponibles dans la littérature pour *L. monocytogenes* et nécessitent de nombreuses expériences pour être déterminées expérimentalement.

3-2. Modèles de transferts

Au cours d'un procédé agroalimentaire, des échanges de matière et de chaleur ont lieu entre le produit alimentaire et son environnement (généralement, de l'air) lorsque :

- les températures ou les concentrations en solutés de deux milieux, ou en deux points d'un même milieu, sont différentes,
- un changement d'état d'un milieu a lieu, comme l'évaporation ou la condensation d'eau.

La résolution analytique des équations caractérisant les échanges de chaleur et de matière peut se révéler très complexe, si le produit est hétérogène et déformable (Bimbenet *et al.*, 2002).

Considérons un aliment solide de forme parallélépipédique, dont l'épaisseur est très petite comparée aux deux autres dimensions. Cet aliment est posé sur un support placé dans un flux d'air (Figure 6). Cette situation est observée lors des procédés de séchage, de refroidissement, de congélation, d'étuvage ou de maturation des produits. Pour décrire les transferts de chaleur et de matière entre l'aliment et son environnement, nous considérerons que le support est inerte, donc qu'il n'y a aucun échange de matière avec l'aliment. Nous nous limiterons également, pour les transferts de matière, à décrire les échanges d'eau.

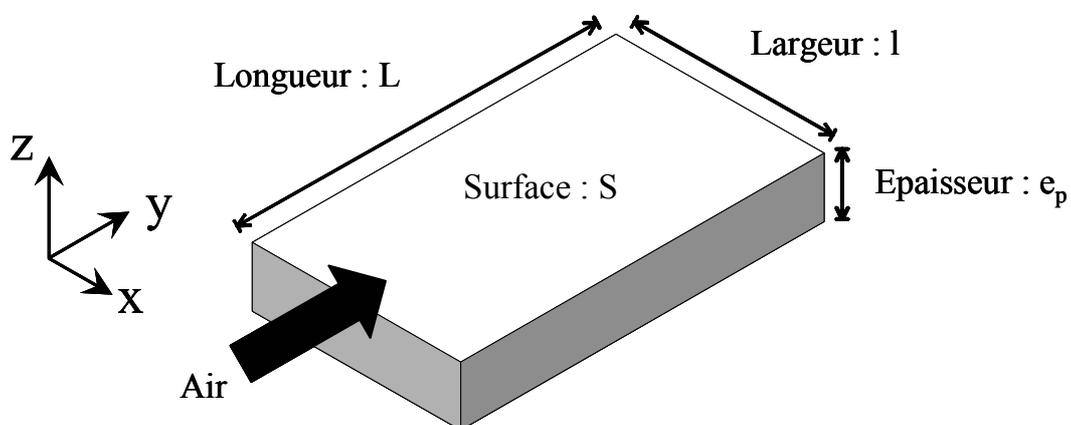


Figure 6 : aliment de forme parallélépipédique placé dans un flux d'air

- ✓ Les transferts d'eau peuvent être décomposés en deux termes (Bimbenet *et al.*, 2002), comme illustré dans la Figure 7 :

- la densité de flux d'eau (J_E), qui correspond aux échanges à l'interface entre l'air et le produit :

$$J_E = k'(C_{surface} - C_{air}) \quad \text{Eq. 29}$$

Avec k' , le coefficient de transfert d'eau (m.s^{-1}),
 C_{air} , la concentration en eau dans l'air (kg d'eau.m^{-3}),
 $C_{surface}$, la concentration en eau de l'air au contact du produit (kg d'eau.m^{-3})

- la densité de flux d'eau (J_D) dans le produit, qui est supposée suivre la loi de Fick :

$$J_D = D(C, \theta) \cdot \frac{\partial C}{\partial z} \quad \text{Eq. 30}$$

Avec D , la diffusivité de l'eau dans le produit ($\text{m}^2.\text{s}^{-1}$),
 C , la concentration en eau dans le produit (kg d'eau.m^{-3}),
 θ , la température ($^{\circ}\text{C}$ ou K)

Les produits alimentaires contiennent, en général, une grande quantité d'eau, qui peut être éliminée lors des procédés technologiques. Cela entraîne une déformation, dont il faut tenir compte en modifiant la loi de Fick (Baucour, 2000).

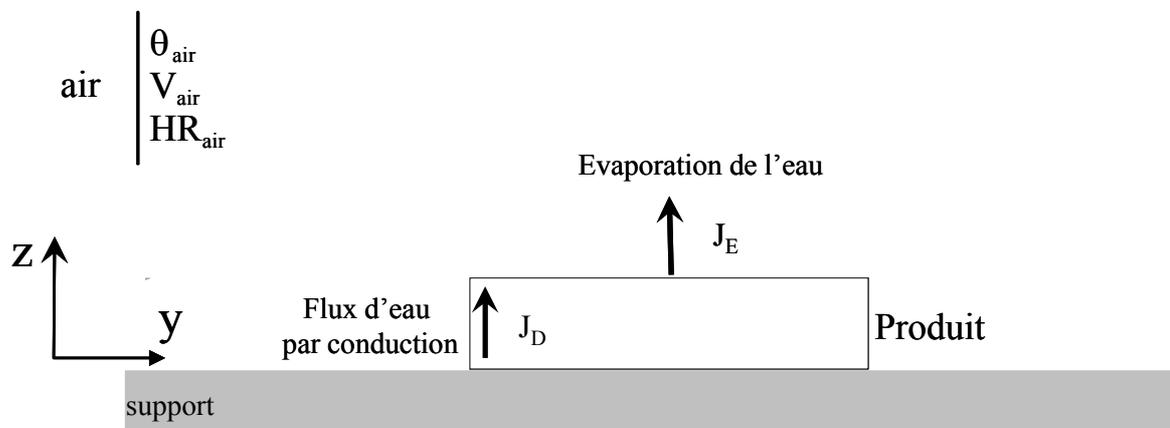


Figure 7 : différents flux d'eau à prendre en compte pour modéliser les transferts d'eau d'un produit au cours d'un procédé agroalimentaire (Zuliani *et al.*, 2004)

Avec θ_{air} , la température de l'air,
 V_{air} , la vitesse de l'air (m.s^{-1}),
 HR_{air} , l'humidité relative de l'air (%)

- ✓ Les transferts de chaleur peuvent s'opérer (Bimbenet *et al.*, 2002) :
 - par contact, il s'agit de conduction,
 - par mouvement de fluides, il s'agit de convection,
 - à distance, il s'agit de rayonnement,
 - lors d'un changement d'état du milieu comme l'évaporation de l'eau.

Lorsque la température d'un aliment évolue au cours d'un procédé, le flux de chaleur est constitué des cinq composantes présentées sur la Figure 8 :

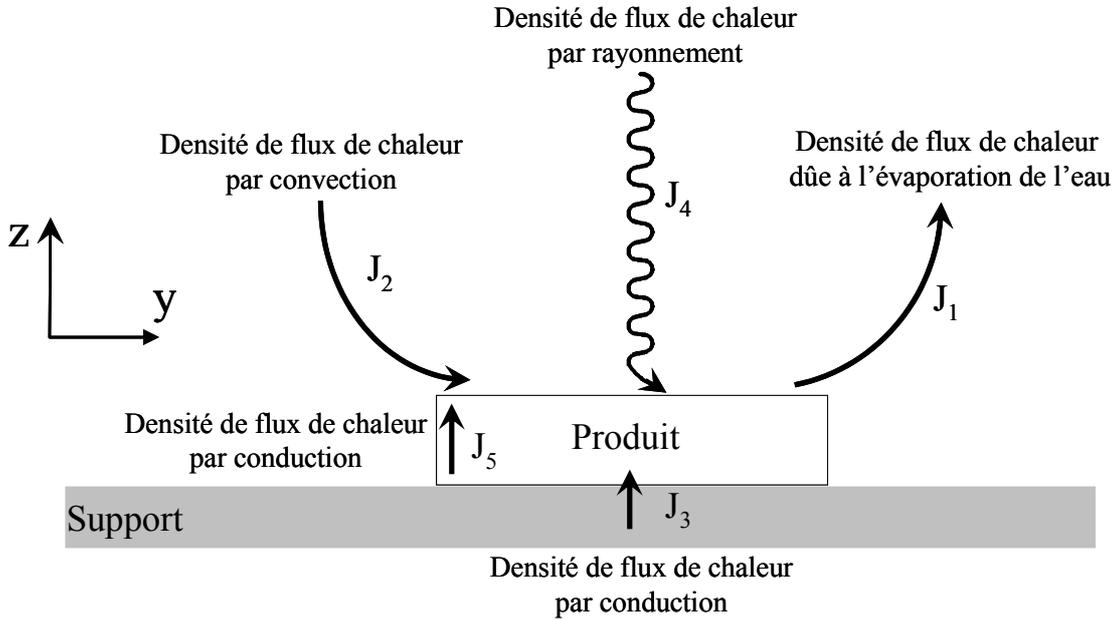


Figure 8 : différentes densités de flux de chaleur à prendre en compte pour modéliser l'évolution de température d'un produit au cours d'un procédé alimentaire (Baucour, 2000)

- Première composante : la densité de flux de chaleur due à l'évaporation de l'eau (J_1) :

$$J_1 = J_E \cdot L_v \quad \text{Eq. 31}$$

Avec J_E , la densité de flux d'eau ($\text{kg d'eau} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$),
 L_v , la chaleur latente de vaporisation de l'eau ($\text{J} \cdot \text{kg}^{-1}$)

- Deuxième composante : la densité de flux de chaleur par convection à l'interface air/produit (J_2) :

$$J_2 = h \cdot (\theta_{air} - \theta_{surface}) \quad \text{Eq. 32}$$

Avec h , le coefficient de transfert de chaleur convectif ($\text{W} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{K}^{-1}$),
 θ_{air} , la température de l'air ($^{\circ}\text{C}$ ou K), $\theta_{surface}$ la température de surface du produit ($^{\circ}\text{C}$ ou K),

- Troisième composante : la densité de flux de chaleur par conduction entre le produit et son support (J_3) :

$$J_3 = h' \cdot (\theta_{sup} - \theta_{surface}) \quad \text{Eq. 33}$$

Avec h' , le coefficient de transfert de chaleur conductif ($\text{W} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{K}^{-1}$),
 θ_{sup} , la température du support ($^{\circ}\text{C}$ ou K)

- Quatrième composante : la densité de flux de chaleur par rayonnement (J_4) :

$$J_4 = \varepsilon \cdot \sigma' \cdot (\theta_{air}^4 - \theta_{surface}^4) \quad \text{Eq. 34}$$

Avec ε , l'émissivité du produit (sans dimension),
 σ' , la constante de Stephan-Boltzmann ($\text{W} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{K}^{-4}$)

- Cinquième composante : la densité de flux de chaleur par conduction dans le produit (J_5) :

$$J_5 = \lambda(C, \theta) \cdot \frac{\partial \theta}{\partial z} \quad \text{Eq. 35}$$

Avec C , la concentration massique d'eau ($\text{kg d'eau} \cdot \text{m}^{-3}$),
 λ , la conductivité thermique ($\text{W} \cdot \text{m}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$)

3-3. Modélisation d'un système dynamique

En condition dynamique, le temps de latence et la vitesse de croissance ou de destruction des bactéries peuvent être différents de ceux mesurés en condition statique. Robinson *et al* (1998) ont défini le temps de latence, en termes de travail à réaliser pour s'adapter à un nouvel environnement et de vitesse à laquelle ce travail est réalisé. Mellefont *et al* (2003) ont mis en évidence que le travail à réaliser était plus conséquent lors d'une diminution de l' a_w que lors d'une augmentation. Il est également plus conséquent lors d'un chauffage que lors d'un refroidissement (Mellefont et Ross, 2003). Lorsque la température augmente, jusqu'à une valeur au-delà de la température maximale de croissance, avant de redescendre à une valeur inférieure, une période de latence est induite préalablement à la croissance (Van Impe *et al.*, 1992). Par ailleurs, dans les aliments, si les montées en température sont rapides (plus de deux degrés par minute), les bactéries n'acquièrent pas de résistance à la température au cours du chauffage, car elles n'ont pas le temps suffisant pour synthétiser des protéines de chocs (Bellara *et al.*, 1999) ; les valeurs des temps de réduction décimale en condition dynamique sont alors égales à celles mesurées aux mêmes températures en condition statique.

Les modèles de microbiologie prévisionnelle ont d'abord été développés pour décrire le comportement des bactéries en conditions statiques. L'intégration des modèles de transferts nécessite la prise en compte de conditions dynamiques, car, au cours du temps, la température et la concentration en eau du produit évoluent. Pour prendre en compte l'évolution des propriétés physico-chimiques d'un produit, lors de la modélisation de l'évolution de la population bactérienne, des hypothèses sont parfois posées :

- Zwietering *et al* (1994) considèrent que, lors du passage d'une température θ_1 à θ_2 (la température étant toujours dans un domaine permettant la croissance de la bactérie), la valeur des taux maximums de croissance à θ_1 et θ_2 est égale à la valeur observée en conditions statiques à θ_1 puis à θ_2 . Pour évaluer la durée du temps de latence, ces auteurs affirment que, dans 73% des cas, si le saut de température intervient pendant le temps de latence, la population bactérienne n'a pas terminé cette période. Une phase de latence se prolonge alors dans la nouvelle condition. Si le saut de température intervient pendant la phase de croissance exponentielle, il n'y a pas de temps de latence, c'est-à-dire que la croissance continue à un taux de croissance égal à celui de la nouvelle condition de température.
- Rosso (1995) propose une autre approche, pour décrire l'influence d'une variation de température sur le temps de latence. Il considère que le temps de latence est une phase

d'adaptation qui consiste en une somme de temps nécessaire pour l'acquisition de la totalité des potentialités permettant la croissance. Pendant une période Δt_i , où la température est considérée comme constante, une latence théorique $\text{lag}(t_i)$ peut être définie. A l'issue de cette période, la population bactérienne a accompli une part de son adaptation égale à $\Delta t_i/\text{lag}(t_i)$. La latence effective est définie comme le temps à partir duquel, la somme de toutes les adaptations est égale à un.

- Bovill *et al.* (2000) ont correctement prédit l'évolution du nombre de *L. monocytogenes* dans du pâté, en tenant compte des variations de température de 8 à 32°C. Ils ont supposé que, lors d'un changement de température, l'adaptation des bactéries aux nouvelles conditions environnementales était immédiate, ceci signifie que la valeur du taux maximal de croissance est instantanément égale au taux maximal de croissance observée en condition constante dans le nouvel environnement.
- Bréand (1998) propose de calculer le temps de latence avant la reprise de croissance, suite à la variation défavorable de température ou de pH, en tenant compte de la durée du stress et de son amplitude.
- Augustin *et al.* (1998) ont modélisé l'influence de l'état physiologique des bactéries et de la température de traitement sur la résistance de *Listeria* à la chaleur. Pour ne pas négliger la destruction des bactéries qui intervient lorsque le milieu est chauffé jusqu'à atteindre la température de traitement puis lorsqu'il est refroidi pour stopper le traitement (condition dynamique de température), la durée du traitement appliquée à température constante est corrigée. La durée corrigée est allongée afin de correspondre à la durée de traitement à température constante, qui aurait le même effet sur la population bactérienne, que le traitement réellement appliqué (incluant le traitement à température constante plus la montée en température et le refroidissement).

4 - Conclusion

De nombreux modèles de microbiologie prévisionnelle ont été développés ces vingt dernières années et validés dans des bouillons de culture. Pour faire progresser cette discipline et permettre son application, il s'agit aujourd'hui, non plus de créer de nouveaux modèles, mais de valider ceux existants dans des conditions proches des pratiques des professionnels. Pour cela, il faut décrire les propriétés physico-chimiques des produits alimentaires, en déduire les facteurs pertinents qui influencent le développement bactérien et caractériser les cinétiques bactériennes en fonction de ces facteurs. Pour répondre à ces besoins, il est nécessaire d'avoir une approche pluridisciplinaire :

- le génie des procédés permet de caractériser l'évolution des propriétés physico-chimiques des aliments en fonction des paramètres contrôlant leur procédé de fabrication,
- la microbiologie prévisionnelle prend en compte l'évolution de ces propriétés physico-chimiques afin de prédire le développement des bactéries.

-Matériels et méthodes-

Pour tenir compte de l'influence de la matrice sur le développement de *Listeria*, l'ensemble des expériences de cette étude sera réalisé dans une mûlée de viande de porc.

Pour intégrer l'influence du procédé, un modèle de transfert de chaleur sera développé, afin de prédire l'évolution de la température en fonction des procédés d'étuvage, de fumage et de stockage. Ces données seront ensuite introduites dans les modèles de microbiologie prévisionnelle.

Au cours des expériences, les principales étapes du procédé de fabrication des lardons seront reproduites (Figure 9). Nous avons choisi d'apporter une attention particulière aux étapes de saumurage, d'étuvage, de fumage, de refroidissement, de conditionnement et de stockage, car elles ont un rôle prépondérant dans l'inhibition ou la destruction de *Listeria*. L'influence de ces étapes sera prise en compte via les propriétés physico-chimiques suivantes :

- le pH (pour le saumurage, le fumage, et le conditionnement),
- l' a_w (pour le saumurage et le conditionnement),
- la nature et la concentration en inhibiteur(s) (pour le saumurage, le fumage, et le conditionnement),
- les températures élevées (pour l'étuvage, le fumage et le refroidissement)
- et les basses températures (pour le saumurage, le refroidissement, le conditionnement et le stockage).

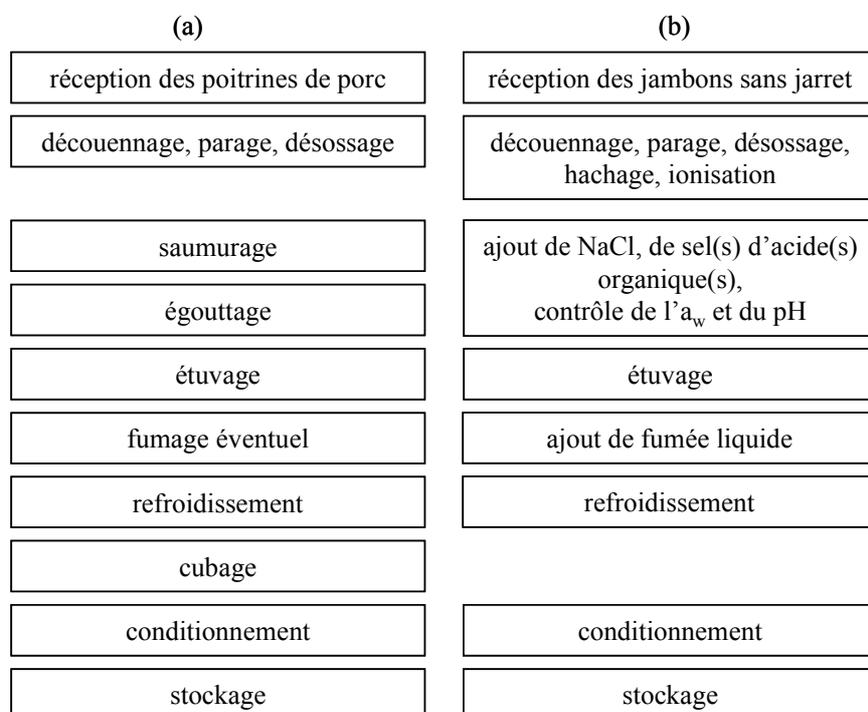


Figure 9 : diagramme de fabrication des lardons (a) (FICT, 2000), (b) procédé appliqué au laboratoire

1 - Souche bactérienne

Listeria monocytogenes 14 a été isolée de sols et de matériels d'usine agroalimentaire. C'est une souche de sérotype 4b, caractérisée par une croissance rapide (Begot *et al.*, 1997). Elle est conservée sur cryobilles (Mast Diagnostic, France) à -18°C.

2 - Aliment modèle

Les cinétiques bactériennes ont été réalisées dans une mêlée de viande de porc, ionisée et conservée à -18°C. Sa teneur en matière grasse libre est de $1,6 \pm 1,1\%$ (1,6 g de matière grasse libre dans 100 g de viande) ; sa composition chimique est présentée en Annexe 1. Cette matrice alimentaire, une fois décongelée (pendant 15 heures à 4°C), a été utilisée comme aliment modèle pour l'ensemble de ce travail.

2-1. Matière première

Des jambons sans jarret ont été découennés, parés, désossés puis hachés (grille n°6) par le boucher de l'Unité de Recherches sur la Viande du centre INRA de Theix. Soixante-quinze kilogrammes de viande (sans os) ont été utilisés pour la réalisation de l'ensemble des expériences.

2-2. Ionisation

La mêlée de viande a été ionisée à une dose de 15 kGy (électrons à haute énergie, Aérial, Illkirch, France) dans le but de réduire sa contamination initiale (viande pauci-microbienne). Pour des raisons d'encombrement, l'ionisation ne pouvait être effectuée simultanément sur plus de 40 kg de viande. Deux lots ont donc été traités : le premier en juillet 2002, le second en mars 2004. Pour obtenir une homogénéité de la dose d'irradiation, la mêlée a été ensachée (400 g par sac), en respectant la géométrie décrite ci-après. Les échantillons ne devant pas dépasser une masse surfacique de $2,5 \text{ g.cm}^{-2}$, ils ont été conditionnés dans des sacs d'une largeur de 15 cm et des parallélépipèdes de dimensions suivantes ont été réalisés : 20 x 15 x 1,3 cm. Après mise sous vide, les échantillons ont été congelés, dans le but de limiter la formation de composés d'oxydation lors de l'ionisation (Farkas, 1998).

2-3. Produits ajoutés

L'ensemble des produits ajoutés à l'aliment modèle est référencé dans le Tableau 6.

Tableau 6 : marque et mode de stérilisation des produits ajoutés à l'aliment modèle

Produits	Marques	Modes de stérilisation
Acétate de sodium trihydraté *	Sigma, France	Filtration * ²
Fumée liquide Enviro24 * ¹	Soussanna, France	Filtration * ²
Guaïacol (2-méthoxyphénol), 99%	Acros organics, France	Filtration * ²
Acide chlorhydrique, rectapur *	Prolabo, France	Autoclavage (15 min, 121°C)
Lactate de sodium, 60%	Purac, France	Filtration * ²
Chlorure de sodium, normapur	Prolabo	Autoclavage (15 min, 121°C)
Hydroxyde de sodium, normapur *	Prolabo	Autoclavage (15 min, 121°C)
Sorbate de potassium, 99% *	Acros organics	Filtration * ²

* le produit a été stérilisé en solution dans de l'eau déminéralisée (solutions 1N pour l'acide chlorhydrique et le chlorure de sodium, solutions à 0,6 g.ml⁻¹ pour l'acétate de sodium et le sorbate de potassium).

*¹ la composition en phénols de la fumée liquide est présentée en Annexe 2.

*² les filtres Stéritop (Millipore, France) de porosité 22 µm ont été utilisés.

3 - Matériels

3-1. a_w-mètre

Les mesures d'a_w ont été réalisées à 20°C avec l'a_w-sprint TH500 (Novasina, Roucaire, France). La température de l'échantillon doit être constante et homogène ; ceci est assuré par thermorégulation (effet Peltier). La plage de régulation de température dans la chambre de mesure est comprise entre 0°C et 50°C ; la précision est de ± 0,2°C, et la résolution, de ± 0,1°C. L'appareil permet un refroidissement maximum de 10°C, par rapport à la température ambiante.

La plage de mesure est comprise entre 0,05 et 1,00 a_w. La reproductibilité des mesures est de ± 0,005 a_w. La précision est de ± 0,01 a_w, et la résolution, de ± 0,001 a_w.

L'étalonnage est réalisé à l'aide de six points de référence d'hygrométrie vendus par Novasina (a_w 0,11 – 0,33 – 0,53 – 0,75 – 0,90 – 0,98). L'étalonnage est également vérifié avec des solutions concentrées de NaCl, pour des a_w comprises entre 0,779 et 0,985 (0,779 – 0,804 – 0,837 – 0,864 – 0,889 – 0,914 – 0,935 – 0,952 – 0,971 – 0,985) (Pitzer et Mayorga, 1973), soit des valeurs égales ou proches du domaine d'a_w qui intéresse notre étude.

3-2. pH-mètre

Le pH de la viande a été mesuré en profondeur, à l'aide d'une sonde de pénétration Inlab 427 (Inlab, France) et du pH-mètre MP230 (Mettler Tolédo, France). La sonde 30K NTC (Mettler Tolédo), reliée au pH-mètre, mesure la température.

Le pH-mètre MP230 a une résolution relative de $\pm 0,001$ U pH, et une précision, de $\pm 0,001$ U pH. L'appareil mesure le pH pour des températures comprises entre -30°C et 130°C ; la sonde de température ayant une résolution de $0,1^{\circ}\text{C}$.

La sonde Inlab 427 est une électrode de pH combinée, contenant une électrode de référence (Argenthal) et un électrolyte polymère à base de chlorure de potassium. Elle fonctionne dans la zone de pH comprise entre 0 et 14.

L'étalonnage du pH-mètre est réalisé à l'aide de trois solutions, de pH : 4,01, 7,00 et 9,21 $\pm 0,02$ U pH, à 25°C (Mettler Tolédo).

3-3. Etuves

L'étuvage de la viande a été réalisé à quatre températures (20, 42, 48 ou 53°C), dans une enceinte réfrigérée à air forcé (FC 90, Eurotherm, Allemagne). Cette enceinte fonctionne pour des températures ambiantes de 0 à 55°C , et des humidités ambiantes de 20 à 95%. Elle peut réguler des températures de stockage de 0 à 62°C . Un ventilateur interne assure une parfaite homogénéité de la température dans l'enceinte. La régulation est réalisée par un régulateur électronique PID Eurotherm type 91, avec une précision de $\pm 0,5^{\circ}\text{C}$.

Le stockage des échantillons de viande a été réalisé dans un incubateur réfrigéré (KB 240, BINDER, Allemagne), possédant un convecteur d'air forcé et opérant sur une plage de température de $-9,9$ à $99,9^{\circ}\text{C} \pm 0,1^{\circ}\text{C}$, pour une température ambiante de 20°C . Pour une utilisation optimale, l'incubateur doit être placé dans une pièce, dont la température se situe entre 5 et 45°C , et l'humidité relative, entre 5 et 70%.

3-4. Enregistreur de température

Lors de l'étuvage et du stockage des échantillons, un enregistreur portatif de température (EL-WIN, Lascar, Angleterre) a été utilisé pour mesurer la température au sein de l'étuve. Cet enregistreur a également été utilisé pour mesurer l'évolution de la température, à cœur d'échantillons d'aliment modèle non ensemencés, lors des étapes d'étuvage et de stockage.

Connecté à un ordinateur, l'EL-WIN, couplé à son logiciel (EasyLog), permet d'obtenir l'évolution de la température en fonction du temps.

L'enregistreur peut fonctionner à des températures ambiantes de -10 à 50°C, et peut mesurer des températures de -25 à 200°C, avec une résolution de $\pm 0,1^\circ\text{C}$, et une précision de $\pm 1^\circ\text{C}$. Il fonctionne à des humidités relatives comprises entre 5 et 95%. Il a une fréquence d'acquisition allant d'une mesure toutes les cinq secondes à une mesure toutes les 12 heures.

3-5. Incubateurs bactériologiques

Après ensemencement, les boîtes de Pétri sont stockées dans des incubateurs bactériologiques BE 500 (Mettler, Allemagne). Le brassage de l'air s'effectue par convection. Ces incubateurs fonctionnent pour des températures ambiantes comprises entre 5 et 40°C, et des humidités relatives variant entre 5 et 80%. La régulation de température est faite avec une précision de $\pm 0,5^\circ\text{C}$.

3-6. Hotte à flux laminaire

Du fait de la pathogénicité de la bactérie étudiée, l'ensemble des expériences s'est déroulé sous une hotte à flux laminaire verticale, de classe II et de type NU 425-400 (Nuair, France). La vitesse du flux d'air est comprise entre 0,3 et 0,6 $\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$.

3-7. Ensemenceur spiral

L'ensemenceur Spiral System (DS, Interscience, France) permet d'ensemencer automatiquement des boîtes de Pétri, afin de dénombrer des cultures microbiennes. L'échantillon liquide est aspiré avec une micropompe et déposé à la surface d'une boîte de Pétri avec un stylet. Le stylet, porté par un système mobile, se déplace du centre vers la périphérie de la boîte, pendant que celle-ci est en rotation. L'échantillon est déposé en spirale, selon un volume régulièrement décroissant, assurant ainsi, une dilution jusqu'au $1/1000^{\text{ème}}$ de la suspension à dénombrer. Un volume total de 49,2 μl est déposé.

Après incubation des boîtes, la concentration bactérienne est déterminée, en rapportant le nombre de colonies comptées dans un secteur, au volume de suspension déposé dans ce même secteur. La limite inférieure de dénombrement est de $2 \cdot 10^3 \text{ UFC}\cdot\text{ml}^{-1}$.

3-8. Stomacher

Les échantillons solides sont mis en suspension, puis malaxés, pendant une minute dans un stomacher (Bagmixer 400, Interscience, France), afin d'obtenir un broyat homogène. Pour éviter le bouchage du stylet de l'ensemencement par des particules de viande, des sacs stomacher avec filtre (porosité de 100 μm , Bagfilter P, Interscience), d'un volume utile de 400 ml, ont été utilisés.

3-9. Incubateur à agitation orbitale

Les précultures, réalisées en erlenmeyer de 50 ml, sont placées dans un incubateur Novotron (Infors, France), dont la vitesse d'agitation est réglable entre 10 et 400 rpm \pm 1 rpm. L'incubateur permet un refroidissement maximum de 5°C, par rapport à la température ambiante, et peut fonctionner jusqu'à 60°C \pm 0,2°C.

3-10. Microscope

Pour vérifier que les précultures ne sont pas contaminées, une observation de la suspension bactérienne est réalisée avec le microscope Laborlux 12 (Leitz, Allemagne). Il s'agit d'un microscope binoculaire avec un objectif à immersion permettant un grossissement de 100.

3-11. Balances

Deux balances ont été utilisées :

- une balance Explorer 4100 g (OHAUS, MC2, France) à calibrage interne : sa plage de mesure est de 4100 g, avec une précision de \pm 0,01 g,
- une balance analytique A 200S (Sartorius, France) : sa plage de mesure est de 202 g, avec une précision de mesure de \pm 0,1 mg.

4 - Expériences préliminaires

4-1. Evaluation de la durée des expériences

La durée de conservation des lardons est, en moyenne, de 45 jours, pour une température de stockage comprise entre 4 et 6°C. Cependant, afin de limiter la durée des expériences, nous avons choisi de conserver l'aliment modèle à 20°C. Pour évaluer le temps de stockage à cette

température, cinq barquettes de lardons (Herta, Auchan, Fleury Michon, Tradilège, Champion) ont été conservées à 20°C. Un examen visuel journalier des barquettes a été effectué, jusqu'à l'apparition des premiers signes d'altération microbiologique (gonflement des barquettes, suintement ou verdissement de la viande).

4-2. Ajustement de l' a_w

Une gamme étalon, $a_w = f(\% \text{ NaCl})$, a été réalisée, afin de déterminer la quantité de chlorure de sodium à ajouter à l'aliment modèle pour l'ajuster à l' a_w souhaitée. Ce paramètre physico-chimique a été mesuré pour plusieurs aliquotes prélevées dans une même mûlée, afin de vérifier l'homogénéité de l' a_w . Des essais similaires ont également été réalisés pour déterminer si l'ajout de sel(s) d'acide(s) organique(s), ou de fumée liquide, modifiait l' a_w initiale de l'aliment modèle. Dans ce cas, des gammes étalon $a_w = f(\% \text{ NaCl})$ ont été effectuées en présence de différentes concentrations de sel(s) d'acide(s) organique(s) ou de fumée liquide.

Le mélange du chlorure de sodium dans l'aliment modèle est réalisé sous une hotte à flux laminaire. En fonction de la quantité de viande utilisée, il est effectué :

- par malaxage manuel, pendant six minutes, pour 400 g de viande. Le sel est mélangé à $\frac{1}{4}$ de la viande, puis le reste de la mûlée est ajouté progressivement. Cette étape est réalisée sur un plateau stérile, avec des gants stériles,
- et à l'aide d'une cuillère stérile (Fisher Labosi, France), pendant une minute, pour 120 g de viande. Le mélange est effectué dans un bûcher stérile de 500 ml.

4-3. Ajustement du pH

Des essais ont été réalisés, afin de :

- déterminer la quantité d'hydroxyde de sodium (1N) ou d'acide chlorhydrique (1N) à ajouter à l'aliment modèle, pour l'ajuster au pH souhaité,
- et vérifier l'homogénéité du pH, en effectuant plusieurs mesures au sein d'une même mûlée.

L'ajustement est réalisé sous une hotte à flux laminaire, après nettoyage du pH-mètre avec de l'éthanol. Les sondes sont décontaminées dans un bain d'éthanol, pendant 15 minutes. Lorsque 400 g de viande sont utilisés, la mûlée est fractionnée, après ajustement de l' a_w , en trois mûlées qui sont placées dans des bûchers stériles de 500 ml. Lorsque 120 g de viande sont utilisés, l'ajustement du pH est réalisé dans le bûcher stérile qui a servi à l'ajustement de l' a_w .

Après chaque addition d'acide ou de base dans le bécher, la mûlée est mûlée avec une cuillère stérile, durant deux minutes et demi ; le pH est ensuite mesuré avec la sonde de pûnûtration Inlab 427 (paragraphe 3.2).

4-4. Inoculation de la viande

Le taux de contamination initiale de l'aliment modèle est fixé à 10^5 UFC.g⁻¹, de manière à ce que, compte tenu du seuil limite de dûtection de notre mûthode, des destructions et des croissances puissent être observées dans des conditions satisfaisantes.

La suspension bactérienne est ajoutée au sac stomacher sans filtre contenant l'aliment modèle (de l'ordre de 120 à 130 g). Un malaxage manuel est effectué pendant deux minutes. Lorsque les expériences nécessitent 400 g d'aliment modèle, la mûlée est divisée, après ajustement de l' a_w , en trois échantillons de 130 g. Ceux-ci sont réunis, après inoculation, dans un sac stomacher et un malaxage manuel est effectué pendant trois minutes.

Des dénombremens de la population de *Listeria* ont été réalisés sur plusieurs échantillons de 20 g prélevés dans un même sac (contenant 400 ou 120 g de viande), afin de vérifier que la concentration bactérienne était homogène et proche de 10^5 UFC.g⁻¹.

4-5. Détermination des procédés d'étuvage

Pour garantir un traitement équivalent d'un échantillon à l'autre, pour un même procédé d'étuvage, l'aliment modèle est mis sous forme parallélépipédique. Pour éviter les contaminations, il est stocké à l'intérieur d'un sac stomacher sans filtre, d'une contenance de 400 ml et de 16,5 cm de largeur. La hauteur du parallélépipède (1,0 cm) et la largeur sont identiques pour tous les échantillons, mais la longueur est ajustée en fonction de la masse de l'échantillon (Figure 10).

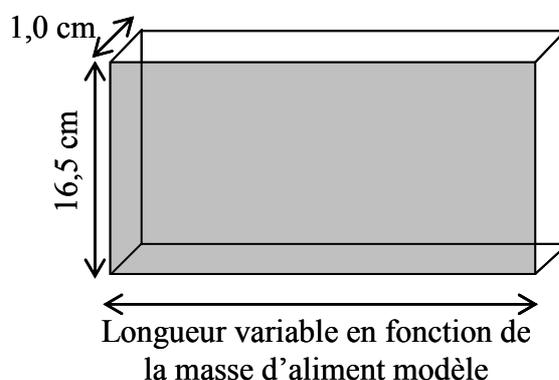


Figure 10 : dimensions du parallélépipède d'aliment modèle lors de l'étuvage

Lors de la fabrication des lardons, le produit reste cru, après l'étuvage. Pour s'assurer que l'aliment modèle ne cuit pas pendant cette étape, nous avons observé sa couleur et sa texture.

Par ailleurs, afin de suivre l'évolution de la température dans l'aliment modèle au cours de l'étuvage et du stockage, des mesures ont été réalisées avec l'enregistreur de température portatif EL-WIN. Pour des raisons de sécurité, elles ont été effectuées au cœur d'un parallélépipède d'aliment modèle (120 g) nonensemencé. La fréquence d'acquisition a été d'une mesure toutes les cinq secondes, du début de l'étuvage jusqu'à stabilisation à la température de stockage.

5 - Protocole

La Figure 11 présente les étapes du protocole utilisé dans cette étude.

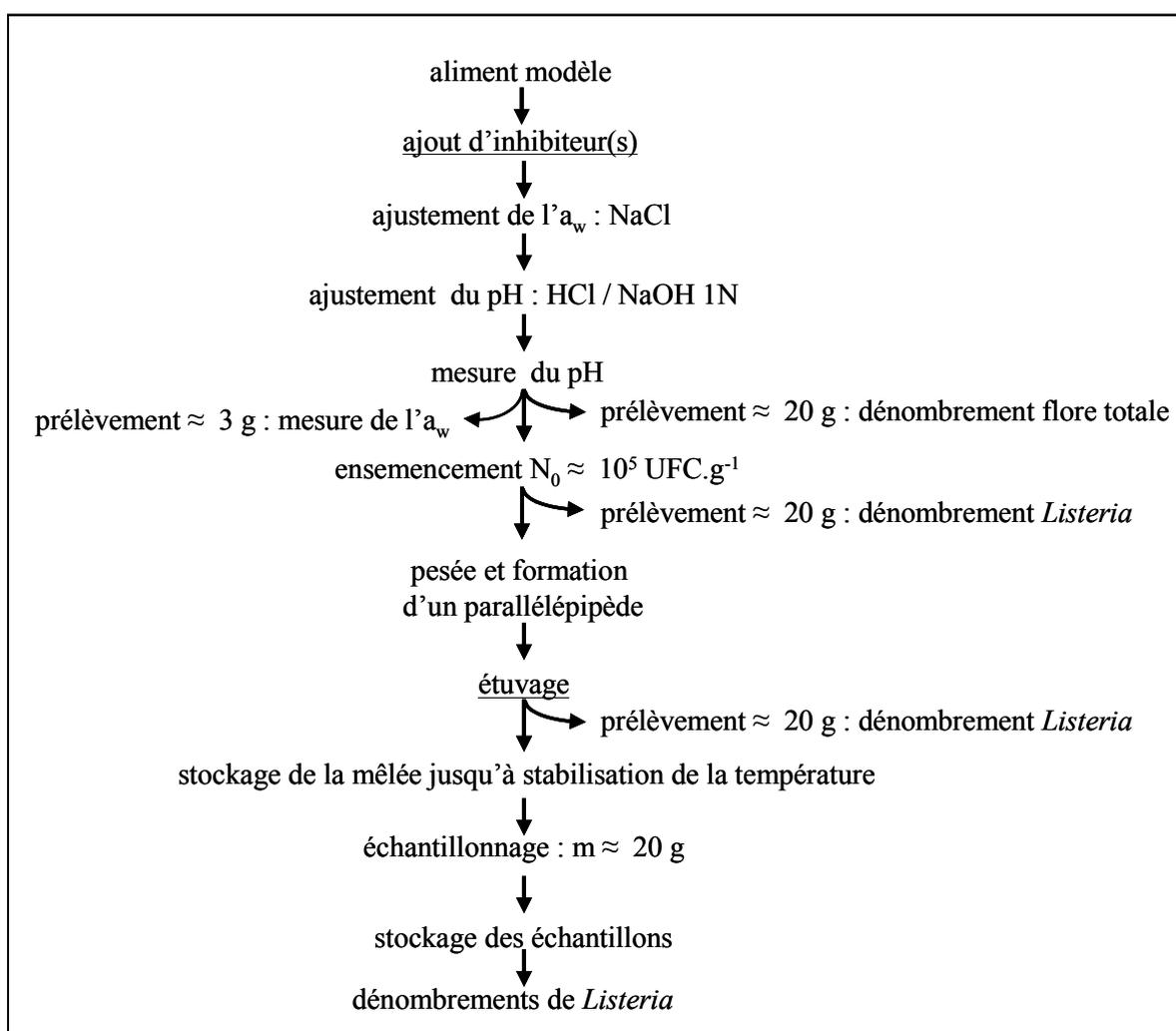


Figure 11 : protocole des expériences

souligné : étape optionnelle selon les facteurs étudiés

5-1. Précultures

Nous avons adapté le protocole préconisé par le groupe méthodologie de Sym'Previus¹, qui recommande de réaliser trois précultures successives, afin d'obtenir une population de *Listeria* de l'ordre de 10^9 UFC.ml⁻¹ en phase stationnaire depuis trois à quatre heures (Annexe 3). La concentration en *Listeria* a été mesurée par dénombrement sur milieu Palcam (Biokar, France).

5-2. Contrôle de l'a_w, du pH et du pourcentage d'inhibiteur(s)

L'a_w, puis le pH, sont ajustés. Le pH de la viande est mesuré, une aliquote est ensuite prélevée dans la mûlée pour contrôler son a_w. La mûlée est conservée à 4°C, jusqu'au lendemain. Les inhibiteurs sont toujours ajoutés à l'aliment modèle avant ajustement de l'a_w. Le volume de solution inhibitrice à ajouter en fonction du pourcentage souhaité est calculé en tenant compte du poids de l'aliment modèle et de la quantité de chlorure de sodium.

5-3. Cinétiques bactériennes

Des cinétiques réduites et des cinétiques complètes sont réalisées. Pour les cinétiques réduites, quatre dénombrements de la population de *Listeria* sont effectués, chacune de ces cinétiques nécessitant environ 120 g d'aliment modèle. Pour les cinétiques complètes (réalisées en triple), environ 400 g d'aliment modèle sont nécessaires et un minimum de quinze dénombrements de la population de *Listeria* est réalisé, conformément aux recommandations du groupe méthodologie de Sym'Previus.

Le protocole présenté en Figure 11 a été suivi pour les cinétiques réduites et complètes.

5-3.1. Ensemencement

Après ajustement du pH, environ 20 g de viande sont prélevés pour dénombrer la flore totale. La mûlée est ensuite inoculée en ajoutant un volume suffisant de la dilution au 1/100^{ème} de la troisième préculture, pour obtenir une contamination initiale de l'ordre de 10^5 UFC.g⁻¹. Un nouveau prélèvement est effectué pour dénombrer la population initiale en *Listeria*.

¹ Sym'Previus est un groupement d'intérêt scientifique (dont le CTSCCV est membre), créé en 1999, ayant pour objectif de développer un outil d'aide à l'expertise en microbiologie prévisionnelle.

5-3.2. Étuvage

Le restant de la mûlée est pesé pour déterminer la longueur du parallélipède d'aliment modèle à réaliser. La mûlée est mise en forme puis étuvée à plat ou directement stockée à 20°C. A la fin de l'étuvage, un échantillon d'aliment modèle est prélevé pour dénombrer la population de *Listeria*.

5-3.3. Stockage

A l'issue de l'étuvage, l'aliment modèle est stocké à 20°C. Après stabilisation de sa température, il est échantillonné. Autant d'échantillons (de l'ordre de 20 g) que de dénombrements à réaliser sont préparés et conservés dans des sacs stomacher.

5-3.4. Dénombrement

Pour les cinétiques réduites, les temps auxquels les dénombrements sont effectués sont présentés dans le Tableau 7.

Tableau 7 : temps (en jours) auxquels les dénombrements sont effectués lors des cinétiques réduites

Facteurs étudiés	t ₁	t ₂	t ₃	t ₄
a _w – pH	0	1	5	7
a _w – pH – inhibiteur(s)	0	1	5	7
a _w – pH – procédé d'étuvage	0	en fin d'étuvage, variable selon le procédé		4 6

Pour les cinétiques complètes, les dénombrements aux temps t₁ et t₂ sont systématiquement réalisés. Les autres dénombrements sont effectués, de manière à disposer de points également repartis lors des phases de latence, exponentielle et stationnaire.

Pour certaines cinétiques, un dénombrement de la flore totale en fin d'expérience permet de vérifier que l'aliment modèle n'a pas été contaminé par une autre flore.

Pour chaque dénombrement, environ 20 g d'aliment modèle sont broyés dans du tryptone-sel (tryptone 1,0 g.l⁻¹ et NaCl 8,5 g.l⁻¹), pendant une minute, pour obtenir une suspension homogène diluée au 1/10^{ème} (1/4 pour le dénombrement de la flore totale). Cette suspension est ensuite stockée pendant 20 minutes (30 minutes lors du dénombrement de la flore totale) à 20°C, pour permettre la revivification des bactéries. Des dilutions au 1/10^{ème} sont réalisées, puisensemencées sur quatre boîtes (deux boîtes pour chacune des deux dilutions successives) à l'aide de l'ensemencement spiral.

Le Tableau 8 présente les milieux et leurs conditions d'incubation en fonction des microorganismes dénombrés.

Tableau 8 : milieux et conditions d'incubation en fonction des microorganismes étudiés

Microorganismes étudiés	Milieux utilisés	Conditions d'incubation
Flore totale	Plate Count Agar (Biokar)	30°C, 72h
<i>L. monocytogenes</i>	Palcam (Biokar)	37°C, 24h puis relecture à 48h

6 - Plans d'expériences

Selon les facteurs étudiés, les plans d'expériences factoriels complets, A ou B, sont réalisés (Figure 12). Le plan A permet d'explorer un large domaine de pH et d' a_w . Le plan B, inclus dans le plan A, encadre plus finement le domaine d' a_w et de pH des lardons. Toutes les expériences des plans correspondent à des cinétiques réduites (paragraphe 5-3).

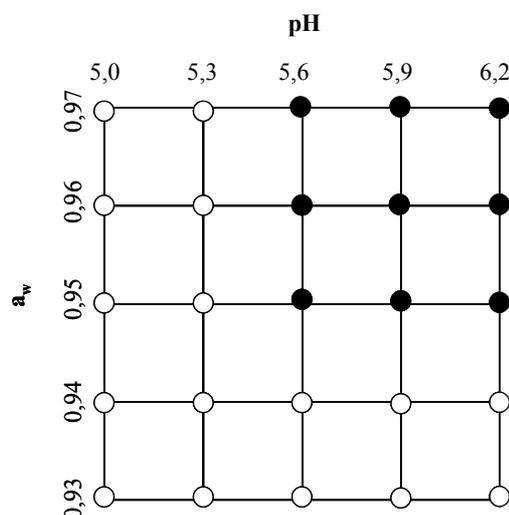


Figure 12 : niveaux d' a_w et de pH étudiés dans les plans d'expériences A et B

- + ● : niveaux d' a_w et de pH du plan d'expériences A (25 cinétiques réduites)
- : niveaux d' a_w et de pH du plan d'expériences B (neuf cinétiques réduites)

6-1. Influence de l' a_w et du pH

L'influence de l' a_w et du pH sur le développement de *Listeria*, est étudiée selon le plan d'expériences A (Figure 12). Des cinétiques complètes, complémentaires à ce plan d'expériences, sont effectuées en triple. Elles sont réalisées dans les conditions suivantes :

- a_w 0,97/pH 6,2, a_w 0,95/pH 5,6, pour une température de stockage de 20°C
- et a_w 0,965/pH 5,9, pour une température de stockage de 4°C.

6-2. Influence de la nature et de la concentration en inhibiteur

L'influence de quatre inhibiteurs (chacun testé à trois concentrations, Tableau 9) est étudiée dans les conditions du plan d'expériences B (Figure 12), ce qui représente un total de 108 expériences. En fonction des résultats obtenus, des cinétiques réduites supplémentaires sont réalisées, pour étudier l'effet de l'ajout simultané de deux inhibiteurs ou d'un phénol majoritaire de la fumée liquide : le guaiacol.

Tableau 9 : pourcentages (et équivalents en concentrations) testés dans le plan d'expériences B, en fonction de la nature de l'inhibiteur

	Nature de l'inhibiteur	Pourcentage (% p/p)	Equivalent en concentration (mM)
1 ^{er} plan	Lactate de sodium	1,5 – 3,0 – 4,5	134 – 268 – 402
2 ^{ème} plan	Acétate de sodium	0,3 – 0,6 – 0,9	22 – 44 – 66
3 ^{ème} plan	Sorbate de potassium	0,3 – 0,6 – 0,9	20 – 40 – 60
4 ^{ème} plan	Fumée liquide	0,3 – 0,6 – 0,9*	-

* pourcentage exprimé en %(v/p)

6-3. Influence du procédé d'étuvage

Trois procédés d'étuvage sont testés (Tableau 10). Chacun est caractérisé par une durée et une température de traitement. Le plan d'expériences A (Figure 12) est appliqué, ce qui représente 75 expériences. En complément du plan d'expériences, des cinétiques complètes sont réalisées en triple. Elles sont effectuées pour les trois procédés d'étuvage, dans les conditions suivantes :

- a_w 0,97/pH 6,2, a_w 0,95/pH 5,6, pour une température de stockage de 20°C
- et a_w 0,965/pH 5,9, pour une température de stockage de 4°C.

Tableau 10 : procédés d'étuvage testés dans le plan d'expériences A

Dénomination	Température (°C)	Durée (h)
4h/42°C	42	4
1h/48°C	48	1
1h/53°C	53	1

7 - Traitements des données

L'ensemble des expériences réalisées a pour but :

- d'étudier l'influence des principaux paramètres du procédé de fabrication des lardons (procédés d'étuvage et de stockage, formulation : pH, a_w , nature et concentration en inhibiteurs) sur l'évolution de la contamination de *L. monocytogenes*
- et d'apporter les données nécessaires pour adapter, optimiser, valider les modèles choisis, afin de prédire le développement de *L. monocytogenes* au cours du procédé de fabrication et du stockage des lardons.

7-1. Etude des capacités de croissance

7-1.1. Définition

La capacité de croissance (CC) est définie comme la différence de population de *L. monocytogenes* entre le début et la fin d'une étape clef du procédé. Trois capacités de croissance peuvent être calculées :

- la capacité de croissance pour le procédé global ($CC_{globale}$) :

$$CC_{globale} = \log(N_{t_4}) - \log(N_{t_1}) \quad \text{Eq. 36}$$

Avec N , la concentration en *Listeria* (UFC.g⁻¹), et t_1 et t_4 définis dans le Tableau 7

- les capacités de croissance pour l'étape d'étuvage ($CC_{étuvage}$) et de stockage ($CC_{stockage}$), qui permettent d'apprécier l'évolution bactérienne au cours d'une étape unitaire du procédé :

$$CC_{étuvage} = \log(N_{t_2}) - \log(N_{t_1}) \quad \text{Eq. 37}$$

$$CC_{stockage} = \log(N_{t_4}) - \log(N_{t_2}) \quad \text{Eq. 38}$$

Avec t_1 , t_2 et t_4 définis dans le Tableau 7.

7-1.2. Analyses des résultats

En fonction de la valeur de la capacité de croissance, trois zones sont définies :

- lorsque la capacité de croissance est strictement supérieure à 1,0 U Log, les conditions sont favorables au développement de la bactérie (Buchanan *et al.*, 1989),
- lorsque la capacité de croissance est strictement inférieure à -1,0 U Log, les conditions sont favorables à la destruction de la population bactérienne,
- et lorsque la capacité de croissance est comprise entre -1,0 U Log et 1,0 U Log, la population est stable, il n'y a ni croissance, ni destruction.

Nous définissons, de plus, la frontière entre le domaine permettant la croissance de *Listeria* ($CC_{globale} > 1,0 \text{ U Log}$) et celui où elle n'a pas lieu ($CC_{globale} < 1,0 \text{ U Log}$). Cette frontière correspond aux $CC_{globale}$ égales à 1,0 U Log, elle est notée $CC = 1$.

7-2. Modélisation des cinétiques de *Listeria*

7-2.1. Modèles de microbiologie prévisionnelle utilisés

Pour modéliser la croissance de *Listeria*, nous avons sélectionné :

- le modèle primaire logistique avec délai et rupture (Rosso *et al.*, 1996) qui présente l'avantage d'être simple et dont les paramètres ont une signification biologique (Equations 2 et 3, Chapitre étude bibliographique)
- et le modèle secondaire d'Augustin (Augustin, 1999) qui permet d'étudier l'influence du pH, de l' a_w , de la température et des inhibiteurs. De plus, les interactions entre facteurs environnementaux sont prises en compte et les paramètres de ce modèle ont une signification biologique (Equations 9 à 15, Chapitre étude bibliographique).

Pour modéliser la destruction thermique de *Listeria*, nous avons sélectionné :

- le modèle de Chick (1908), cité par Xiong *et al* (1999) (Equations 20 et 21, Chapitre étude bibliographique) en supposant que les cinétiques de destruction suivent une cinétique du premier ordre. Le choix de ce modèle, très simple, se justifie par le fait que nous ne disposons que de deux points de dénombrement pendant l'étape d'étuvage (en début et en fin de phase), étape où la température augmente jusqu'à éventuellement détruire une partie de la population bactérienne. Ne pouvant pas définir l'allure des cinétiques de destruction, nous appliquons donc le principe de parcimonie ;
- et le modèle secondaire de Bigelow (1921), cité par Van Impe *et al* (1995), présenté en Equations 24 et 25 (Chapitre étude bibliographique), pour prédire l'évolution du temps de réduction décimale (D_θ) en fonction de la température. Nous fixons, par ailleurs, la température de référence à 60°C. Ainsi, connaissant la valeur de D_{60} et de z' (élévation de température qui diminue d'un facteur dix la valeur de D_θ), D_θ peut être déterminé en utilisant l'Equation 25 (Chapitre étude bibliographique).

7-2.2. Optimisation des paramètres des modèles de microbiologie prévisionnelle

7-2.2.1. Modèle primaire

L'optimisation des paramètres des modèles primaires consiste à lisser les cinétiques expérimentales : la valeur des paramètres des modèles primaires caractérisant les cinétiques bactériennes est ajustée pour que les courbes lissées soient aussi proches que possible des points expérimentaux. Dans notre étude, les cinétiques complètes réalisées en condition statique sont lissées (équation logistique avec délai et rupture, paragraphe 7.2.1) par régression non linéaire, avec un critère des moindres carrés. Cette opération est effectuée avec le module de régression non linéaire du logiciel Statistica Version 6 (Statsoft 6.0, France), en prenant d'abord la méthode de Rosenbrock, puis une méthode quasi-newtonienne. Pour chaque paramètre ajusté, une valeur initiale est donnée. La valeur finale des paramètres est obtenue avec un intervalle de confiance de 95%. Nous avons fixé la valeur initiale de la concentration initiale (N_0) à 10^5 UFC.g⁻¹ et la valeur initiale de la concentration maximale (N_{max}) à la moyenne de celle observée au cours des expériences, lorsque la phase stationnaire est atteinte, *i.e.* $1,6.10^8$ UFC.g⁻¹. Une estimation des valeurs du taux maximal de croissance (μ_{max}) et du temps de latence (*lag*) a été effectuée, pour chaque condition testée, au regard des résultats expérimentaux, afin de disposer d'une valeur initiale.

7-2.2.2. Modèle secondaire

7-2.2.2.1. Sélection des paramètres à optimiser

Pour prendre en compte l'influence de la nature du substrat et de la bactérie, les coefficients des modèles secondaires doivent être optimisés ou obtenus dans la littérature, lorsque ces données sont disponibles.

Les valeurs du taux optimal de croissance (μ_{opt}), du temps de réduction décimale (D_θ) et de z' (élévation de température qui diminue d'un facteur dix la valeur de D_θ) ont été optimisées, à partir de nos données expérimentales.

Nous avons utilisé la valeur moyenne de K (facteur reliant le taux maximal de croissance et le temps de latence), calculée à partir de cinétiques complètes réalisées dans cette étude.

Les valeurs cardinales sont, par hypothèse, indépendantes de la nature du substrat (Augustin, 1999). En conséquence, les valeurs cardinales (X_{min}° , X_{opt} , X_{max}) que nous avons utilisées sont celles proposées par Augustin (1999) (Tableau 11).

Tableau 11 : valeurs cardinales pour *L. monocytogenes* estimées par Augustin (1999)

Propriétés physico-chimiques	Valeurs cardinales	Valeurs estimées
Température	θ_{\min}° (°C)	-3,0
	θ_{opt} (°C)	37,0
	θ_{\max} (°C)	45,5
pH	pH_{\min}° (HCl)	4,38
	pH_{opt}	7,10
	pH_{\max}	9,61
a_w	$a_{w \min}^{\circ}$ (NaCl)	0,913
	$a_{w \text{opt}}$	0,997
	$a_{w \max}$	1,000

Pour modéliser l'influence des sels d'acides organiques et de la fumée liquide, deux approches sont comparées :

- la première consiste à utiliser une valeur de concentration minimale inhibitrice absolue (CMI°) spécifique pour chaque inhibiteur. La valeur des paramètres cardinaux (valeurs optimales, maximales et minimales absolues) est indépendante de la présence d'un inhibiteur. Pour cette approche, utilisée par Augustin (1999), c'est le pH_{\min}° (HCl) qui est utilisé, même en présence d'inhibiteur
- et la seconde, que nous proposons dans ce travail, consiste à utiliser une valeur de CMI° et un pH_{\min}° spécifique pour chaque inhibiteur. Nous supposons que la valeur de pH_{\min}° est influencée par la présence de sel d'acide organique ou de fumée liquide.

Selon l'approche utilisée, nous avons optimisé les valeurs de CMI° :

- en utilisant le pH_{\min}° (HCl) proposé par Augustin, lorsque l'approche développée par cet auteur a été employée,
- simultanément à l'optimisation du pH_{\min}° spécifique de l'acide associé à l'inhibiteur, lorsque l'approche développée dans cette étude a été utilisée.

Nous avons également comparé la qualité des prédictions du modèle, lorsque les valeurs de CMI° et de pH_{\min}° utilisées (Tableau 12) sont optimisées ou obtenues dans la littérature (lorsqu'elles étaient disponibles).

Tableau 12 : valeurs des pH_{\min}° et des CMI° de *L. monocytogenes* estimées par Augustin (1999)

	Valeurs estimées
pH_{\min}° (acide acétique)	4,79
pH_{\min}° (acide lactique)	4,54
CMI° sorbate de potassium	49,6 mM

Enfin, nous avons ajusté la valeur du paramètre de forme p (Equation 39). Augustin (1999) a fixé la valeur de p à un, mais il a envisagé, dans les perspectives de son travail de thèse, d'optimiser la valeur de ce paramètre en fonction de la nature de l'inhibiteur.

$$(1 - c_j / CMI_j^\circ)^p = \left[\frac{(\theta_{opt} - \theta)}{(\theta_{opt} - \theta_{min}^\circ)} \right]^3 + \left[\frac{(pH_{opt} - pH)}{(pH_{opt} - pH_{min}^\circ)} \right]^3 + \left[\frac{(a_{wopt} - a_w)}{(a_{wopt} - a_{wmin}^\circ)} \right]^3 \quad \text{Eq. 39}$$

Avec pH_{min}° , a_{wmin}° , θ_{min}° , les valeurs minimales absolues de croissance,
 pH_{opt} , a_{wopt} , θ_{opt} , les valeurs optimales de croissance,
 c_j , la concentration de la substance inhibitrice j,
 CMI_j° , la concentration minimale inhibitrice absolue de la substance j,

p, un paramètre sans signification biologique

7-2.2.2.2. Méthode d'optimisation

La régression non linéaire avec un critère des moindres carrés est utilisée pour ajuster les paramètres des modèles secondaires (taux optimal de croissance, concentration minimale inhibitrice absolue, paramètre p, z', temps de réduction décimale à la température de référence). Cette opération est réalisée avec le module Solveur d'Excel (méthode de Newton). Pour chaque paramètre ajusté, une valeur initiale est donnée au regard des résultats expérimentaux ou des données de la littérature.

7-2.2.2.3. Données expérimentales utilisées

Le taux optimal de croissance (μ_{opt}) a été optimisé en utilisant les résultats des répétitions des cinétiques complètes réalisées pour une température de stockage de 20°C et dans les conditions environnementales suivantes : pH 5,6/ a_w 0,95 et pH 6,2/ a_w 0,97.

Le paramètre K a été calculé à partir des valeurs de taux maximal de croissance (μ_{max}) et de temps de latence (*lag*) obtenues après lissage des six cinétiques complètes réalisées à 20°C.

Pour optimiser les pH_{min}° spécifiques de chaque inhibiteur, les concentrations minimales inhibitrices (CMI°) et le paramètre p, une partie des cinétiques réduites du plan d'expériences B a été employée ; les autres cinétiques, non utilisées, étant réservées pour évaluer la qualité des prédictions du modèle (Figure 13).

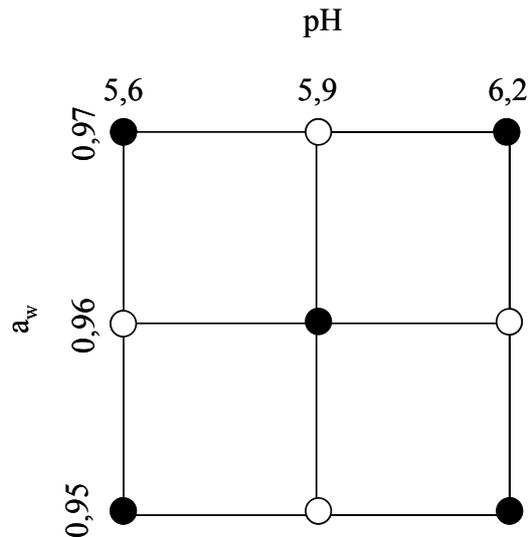


Figure 13 : expériences utilisées pour ajuster les paramètres du modèle d'Augustin (●) ou utilisées pour comparaison avec les prédictions des modèles (○), pour les trois pourcentages d'inhibiteur testés

Les paramètres D_{60} (temps de réduction décimale à 60°C) et z' (élévation de température qui permet de diviser par dix la valeur du temps de réduction décimale), relatifs au modèle secondaire de destruction thermique, ont également été optimisés. Pour cela, nous avons utilisés les résultats des dénombrements bactériens effectués en début et en fin de phase d'étuvage, pour les cinétiques complètes réalisées à une température de stockage de 20°C, dans les conditions environnementales suivantes : pH 5,6/ a_w 0,95 et pH 6,2/ a_w 0,97. Seules les cinétiques au cours desquelles la température de l'aliment modèle est supérieure à la température maximale de croissance de *Listeria* (45,5°C) ont été utilisées, c'est-à-dire les expériences avec un étuvage 1h/53°C et 1h/48°C.

7-2.3. Estimation de la qualité des cinétiques prédites

7-2.3.1. Analyse de Monte Carlo

Après avoir déterminé les paramètres du modèle d'Augustin (μ_{opt} , $K...$), il est possible de prédire des croissances, en calculant d'abord le taux maximal de croissance et le temps de latence avec le modèle secondaire, puis les cinétiques bactériennes avec le modèle primaire, pour des populations bactériennes initiale (N_0) et maximale (N_{max}) données.

La comparaison entre les résultats expérimentaux et les simulations peut être faite, si l'on tient compte, d'une part, des erreurs de mesure, et d'autre part, des incertitudes sur la détermination des paramètres.

Pour ce faire, nous avons utilisé une méthode de Monte Carlo, en supposant que, sur le domaine expérimental exploré, le coefficient de variation (ratio de l'écart-type sur la moyenne) des paramètres était constant. A partir des cinétiques complètes réalisées pour une température de stockage de 20°C et différentes conditions de pH et d'a_w, les taux maximums de croissance (μ_{max}), les populations bactériennes initiales (N_0) et maximales (N_{max}), ainsi que les écarts-types correspondants ont été calculés, ce qui a permis de déterminer les coefficients de variation.

La procédure que nous avons adoptée pour l'analyse de Monte Carlo est la suivante :

- pour une condition donnée de pH, d'a_w, de température et d'inhibiteur, le modèle d'Augustin calcule un taux maximal de croissance et un temps de latence associé (par l'intermédiaire du paramètre K);
- le coefficient de variation étant supposé constant, les écarts-types de μ_{max} ($\sigma_{\mu_{max}}$), N_{max} ($\sigma_{N_{max}}$) et N_0 (σ_{N_0}) sont calculés ;
- une nouvelle valeur de μ_{max} est générée (Utilitaire d'analyses, Excel), en supposant qu'il suit une loi Normale de moyenne μ_{max} et d'écart-type $\sigma_{\mu_{max}}$. Il est fait de même pour N_0 et N_{max} . Le temps de latence est calculé à partir de la nouvelle valeur de μ_{max} ;
- les nouvelles valeurs de μ_{max} , lag , N_0 et N_{max} sont introduites dans le modèle logistique avec délai rupture pour générer une courbe de croissance.

Pour chaque condition, mille courbes sont ainsi générées en fonction du temps. A chaque temps de calcul, les centiles 0,5, 2,5, 5, 95, 97,5, 99,5 sont déterminés. Le n-ième centile est la valeur pour laquelle n % des observations lui sont inférieurs. Le calcul des centiles permet d'obtenir les enveloppes à 90%, 95% et 99%.

Nous avons fixé l'erreur expérimentale à $\pm 0,7$ U Log. En fonction de la disposition des points expérimentaux par rapport aux prédictions du modèle, la qualité des prédictions est estimée (Tableau 13).

Tableau 13 : qualité des prédictions pour chaque cinétique réduite, en fonction de la disposition des points expérimentaux par rapport à la courbe prédite

Correcte		Concentration bactérienne bien estimée	Tout les points expérimentaux +/- 0,7 U Log sont dans l'enveloppe à 90% de la courbe prédite
Incorrecte	Non dangereuse	Concentration bactérienne surestimée	- Aucun point expérimental +/- 0,7 U Log n'est au-dessus de l'enveloppe à 90% de la courbe prédite - Et au moins un point expérimental +/- 0,7 U Log est au-dessous de l'enveloppe de la courbe prédite
	Dangereuse	Concentration bactérienne sous-estimée	- Au moins un point expérimental +/- 0,7 U Log est au-dessus de l'enveloppe à 90% de la courbe prédite

Lorsqu'au cours d'une cinétique, la température est supérieure à la température maximale de croissance de *Listeria* (45,5°C), les modèles de destruction sont utilisés. Nous avons choisi de ne pas tenir compte des incertitudes sur la détermination des paramètres des modèles de destruction :

- d'une part, cela complexifierait le traitement des données, plusieurs analyses de Monte Carlo devant être réalisées simultanément. Le traitement ne pourrait pas être réalisé avec des outils simples de modélisation (Excel), et en utilisant un logiciel plus performant (Matlab), nous limiterions la diffusion de l'outil de prédiction auprès des professionnels de la filière ;
- d'autre part, les cinétiques réalisées ne nous permettent pas de définir l'évolution de l'écart-type du temps de réduction décimale (D_{θ}) en fonction de la température.

7-2.3.2. Tests de Fisher

Nous avons utilisé le test de Fisher :

- pour comparer les deux approches proposées pour prédire l'influence d'un inhibiteur sur la croissance de *Listeria* (paragraphe 7-2-2-2-1) ;
- pour déterminer si l'optimisation des paramètres (pH_{\min}° , CMI° , p) améliore la qualité des prédictions, comparativement à l'utilisation des données de la littérature.

Le test de Fisher permet de déterminer si l'ajout d'un paramètre à un modèle diminue de façon significative la somme des carrés des écarts (SCE) entre les valeurs mesurées et les valeurs prédites. Connaissant le nombre de paramètre(s) de chacun des modèles et la quantité de données utilisée pour calculer la SCE, le rapport F est calculé (Equation 40). Si ce rapport calculé est inférieur à la variable de Fisher (Equation 41) lue dans la table présentée en Annexe 4, alors l'ajout d'un paramètre supplémentaire au modèle n'améliore pas les prédictions. Le principe de parcimonie s'applique et le modèle avec le moins de paramètre(s) est utilisé. Dans le cas contraire, l'ajout d'un paramètre au modèle améliore significativement les prédictions.

$$F_{\text{calculé}} = \frac{n' - p_a}{p_a - p_b} \cdot \frac{SCE_b - SCE_a}{SCE_a} \quad \text{Eq. 40}$$

$$F_{\text{table}}(p_a - p_b, n' - p_a, \alpha') \quad \text{Eq. 41}$$

Avec n' , la quantité de données utilisées pour calculer la somme des carrés des écarts (SCE), p_b et p_a , le nombre de paramètre(s) des modèles a et b (a ayant le nombre le plus élevé de paramètres), SCE_b et SCE_a , la SCE entre les concentrations bactériennes mesurées et prédites avec les modèles a et b, α' , le niveau de signification

Nous nous sommes tout d'abord intéressés à la CMI°. En utilisant le $\text{pH}_{\min}^\circ(\text{HCl})$, et le paramètre p égal à un, nous avons testé si l'optimisation de la CMI° par rapport à l'utilisation de la CMI° proposée par Augustin (Tableau 12) diminuait significativement la SCE entre les concentrations bactériennes expérimentales et prédites.

Nous avons ensuite étudié le pH_{\min}° . Nous avons testé si l'utilisation d'un pH_{\min}° spécifique de l'inhibiteur (proposé par Augustin) plutôt que le $\text{pH}_{\min}^\circ(\text{HCl})$, diminuait significativement la SCE entre les concentrations bactériennes expérimentales et prédites. Nous avons, ensuite, étudié si l'optimisation du pH_{\min}° spécifique de l'inhibiteur améliorerait les prédictions. Lors de ces tests, le paramètre p a été fixé à un. Selon les résultats du premier test de Fisher (étude de la CMI°), soit la CMI° proposée par Augustin a été utilisée, soit elle a été optimisée.

L'influence de la valeur du paramètre p sur la SCE est ensuite étudiée. Nous avons testé si l'optimisation du paramètre p , en fonction de la nature de l'inhibiteur, diminue la SCE par rapport à la SCE calculée lorsque le paramètre p est égal à un. Les valeurs de pH_{\min}° et de CMI° utilisées lors de l'étude du paramètre p sont déterminées en fonction des résultats des précédents tests de Fisher.

7-2.4. Modélisation de la frontière $CC = 1$

La frontière entre les domaines de croissance et d'absence de croissance a été définie comme les conditions environnementales pour lesquelles la capacité de croissance globale est égale à 1,0 U Log ; elle est notée $CC = 1$. Pour la modéliser, nous avons employé une méthode itérative. Pour chaque pH compris entre 4,9 et 6,3 (avec un incrément de 0,05 U pH), l' a_w permettant d'obtenir une CC_{globale} égale à 1,0 U Log est déterminée :

- connaissant la température, les valeurs du taux maximal de croissance (μ_{max}), du temps de latence (lag) et du temps de réduction décimale (D_{θ}) sont prédites;
- ces valeurs sont introduites dans les modèles primaires pour estimer la population bactérienne au temps t_4 défini dans le Tableau 7. Les valeurs de populations bactériennes initiale (N_0) et maximale (N_{max}) sont respectivement fixées à $1.10^5 \text{ UFC.g}^{-1}$ et $1,65.10^8 \text{ UFC.g}^{-1}$. La valeur de l' a_w permettant d'obtenir une CC_{globale} égale à un est alors déterminée à l'aide de la fonction valeur cible de l'Utilitaire d'analyses d'Excel.

Les couples a_w/pH ainsi obtenus sont utilisés pour tracer la frontière $CC = 1$.

7-3. Modélisation du transfert de chaleur

7-3.1. Modèle utilisé

Lors des expériences, la température dans l'aliment modèle est influencée par les procédés d'étuvage et de stockage. Pour modéliser les transferts de chaleur, deux contraintes doivent être respectées :

- le modèle doit être développé avec des outils simples de modélisation (macros sous Excel), afin de pouvoir être diffusé aisément chez les professionnels de la filière
- et le modèle de transfert thermique doit pouvoir simuler tous les procédés d'étuvage actuels et futurs (modification de l'amplitude et de l'intensité de la variation de température, ou de la durée de l'opération), sans qu'aucun paramètre supplémentaire ne soit nécessaire.

De plus, nous avons uniquement considéré les phénomènes de transfert de chaleur à l'intérieur du produit. En effet, les transferts de matière air - produit (évaporation de l'eau, convection à l'interface) sont négligés : ils sont fortement limités, car l'aliment modèle se trouve à l'intérieur d'un sac stomacher fermé. Les transferts de chaleur entre le produit et son support (conduction), de même que le transfert de chaleur par rayonnement ont également été négligés, car ils représentent, dans cette application, des modes mineurs de transfert (Figure 8, Chapitre étude bibliographique).

Nous avons également considéré que :

- l'aliment modèle est inerte, c'est-à-dire qu'il ne consomme, ni ne produit de chaleur,
- le transfert de chaleur au travers de l'aliment modèle sous forme de parallélépipède est unidirectionnel (plaque infinie) : compte tenu de sa géométrie (longueur et largeur grandes par rapport à l'épaisseur), il s'effectue le long d'un unique axe, x , perpendiculaire à l'épaisseur sur chaque face de la plaque (Figure 14).

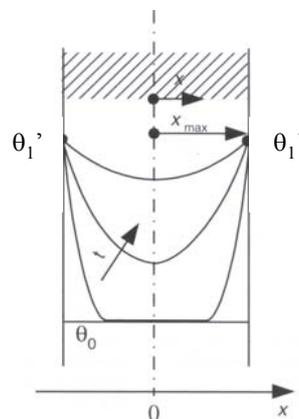


Figure 14 : transfert de chaleur à travers une plaque (Bimbenet et al., 2002)

Avec θ_1' , la température à laquelle sont portées les faces de la plaque d'aliment modèle au temps $t = 0$,
 θ_0 , la température en tout point de la plaque avant traitement thermique,
 x_{max} , la demi épaisseur de la plaque d'aliment modèle,
 x , l'axe selon lequel le transfert de chaleur s'effectue

La conduction de la chaleur à l'intérieur du produit est ainsi décrite par une forme simplifiée de la loi de Fourier (Equation 42) (Bimbenet *et al.*, 2002) :

$$\frac{\partial(\rho.C_p.\theta)}{\partial t} = \frac{-\left(\lambda.\frac{\partial\theta}{\partial x}\right)_x - \left(\lambda.\frac{\partial\theta}{\partial x}\right)_{x+dx}}{dx} \quad \text{Eq. 42}$$

Avec θ , la température en K,
 λ , la conductivité thermique en $\text{W.m}^{-1}.\text{K}^{-1}$,
 C_p , la capacité thermique massique à pression constante en $\text{J.kg}^{-1}.\text{K}^{-1}$,
 ρ , la masse volumique en kg.m^{-3} ,
 x , l'axe selon lequel le transfert de chaleur s'effectue

Lorsque l'on considère que λ , ρ et C_p sont constants dans le temps et dans l'espace, et que dx tend vers zéro alors l'Equation 42 s'écrit :

$$\frac{\partial\theta}{\partial t} = \frac{\partial}{\partial x} \cdot \left(\lambda(C_p, \rho) \cdot \frac{\partial\theta}{\partial x} \right) \quad \text{Eq. 43}$$

$$\frac{\partial\theta}{\partial t} = D_t \cdot \frac{\partial^2\theta}{\partial x^2}, \text{ avec } D_t = \frac{\lambda}{\rho.C_p} \quad \text{Eq. 44}$$

Avec D_t la diffusivité thermique en $\text{m}^2.\text{s}^{-1}$

Une solution numérique à la forme simplifiée de l'équation de Fourier (Equation 44) peut être trouvée, en considérant que (Figure 14) :

- pour $t = 0$, $\theta = \theta_0$,
- pour $x = \pm x_{\max}$, $\theta = \theta_l$

En tout point de la plaque de viande, la température peut être calculée en résolvant l'Equation 45 :

$$\theta = \theta_l - (\theta_l - \theta_0) \cdot \left(\frac{4}{\pi} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{(-1)^{n+1}}{(2n-1)} \cdot \cos \left[\frac{(2n-1)}{2} \cdot \pi \cdot \frac{x}{x_{\max}} \right] \cdot \exp \left[- \left((2n-1) \cdot \frac{\pi}{2} \right)^2 \cdot \frac{D_t \cdot t}{x_{\max}^2} \right] \right) \quad \text{Eq. 45}$$

Quand $\frac{D_t \cdot t}{x_{\max}^2}$ est élevé, la série contenue dans l'Equation 45, converge rapidement. Nous avons émis l'hypothèse que $\frac{D_t \cdot t}{x_{\max}^2}$ était élevé, le calcul de la température a donc été effectué pour $n = 1$ à 30.

Lors de la modélisation de l'évolution de la population bactérienne, il est indispensable de tenir compte de la différence de température à laquelle les bactéries sont soumises, en fonction de leur localisation dans la plaque d'aliment modèle (distance par rapport à la surface). L'évolution de température a donc été prédite en différents points de la plaque. Celle-ci a été divisée dans sa demi épaisseur en n sections d'épaisseurs égales et nous avons considéré que la température était identique, pour tous les points localisés dans une même section, à la température prédite en son centre. Ce postulat entraîne, lors d'un chauffage :

- une surestimation de la température pour la moitié inférieure de la section (notée b sur la Figure 15)
- et une sous-estimation de la température pour la moitié supérieure de la section (notée a sur la Figure 15).

Lors d'un refroidissement, la température est surestimée pour la moitié supérieure de la section et sous-estimée pour la moitié inférieure de la section.

Pour les sections proches du centre de la plaque (sections 4 et 4' de la Figure 15), nous avons prédit la température au cœur de la plaque. Celui-ci correspond au point central de la section constituée des sections 4 et 4'.

Ainsi, lorsque l'on considère la plaque d'aliment modèle dans son épaisseur totale, il y a autant de points où nous surestimons la température, que de points pour lesquelles nous sous-estimons la température. Par ailleurs, les températures prédites au cœur de la plaque sont également utilisées pour optimiser la valeur de la diffusivité thermique de l'aliment modèle (par comparaison avec les températures mesurées) et valider le modèle de transfert de chaleur.

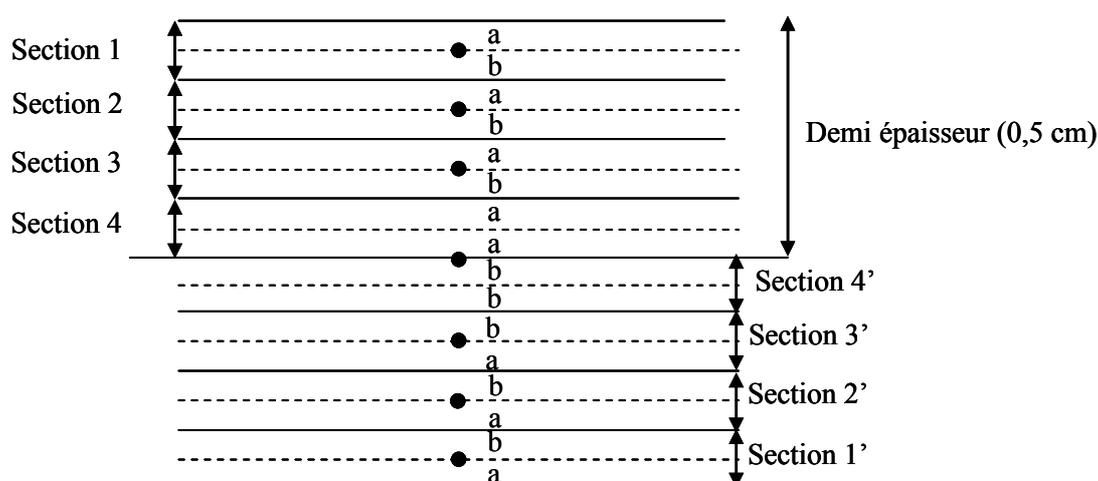


Figure 15 : localisation des points dans les sections pour lesquelles la température a été prédite. Exemple pour quatre sections prises en compte dans la demi épaisseur de la plaque d'aliment modèle

a : surestimation de la température lors d'un refroidissement et sous-estimation lors d'un chauffage
 b : sous-estimation de la température lors d'un refroidissement et surestimation lors d'un chauffage

7-3.2. Optimisation des paramètres du modèle

Afin de tenir compte de l'influence de la nature de l'aliment modèle sur le transfert de chaleur, la valeur de sa diffusivité thermique (D_t) a été optimisée. La méthode de Newton a été utilisée avec un critère des moindres carrés appliqué aux températures mesurées et prédites. Les données de température enregistrées, au cœur d'un parallélépipède d'aliment modèle non ensemencé, lors des trois procédés d'étuvage testés (4h/42°C, 1h/48°C, 1h/53°C), puis du stockage à 20°C, ont été utilisées.

Pour évaluer la qualité des prédictions du modèle de transfert de chaleur (après optimisation de la diffusivité thermique), celles-ci ont été comparées avec les valeurs de température mesurées au cœur d'un parallélépipède d'aliment modèle non ensemencé, lors des trois procédés d'étuvage, puis du stockage à 4°C.

7-4. Modélisation combinée de l'évolution de la température et de la cinétique bactérienne

7-4.1. Stratégie

Nous avons développé un modèle combiné permettant de tenir compte des caractéristiques du procédé étudié, de la nature de l'aliment modèle, de la bactérie et des interactions entre ces trois éléments (Figure 16).

Les valeurs cardinales de la souche et le paramètre z' (élévation de température qui permet de réduire à $1/10^{\text{ème}}$ de sa valeur le temps de réduction décimale) sont supposés indépendants de la nature du substrat (Augustin, 1999 ; Leguériel *et al.*, 2005). Celle-ci influence en revanche le taux optimal de croissance (μ_{opt}), K et le temps de réduction décimale (D_θ).

L'aliment modèle est caractérisé par ses paramètres physico-chimiques. Ces derniers ont une influence sur la croissance et la destruction thermique de *Listeria*.

Le procédé est caractérisé par les couples temps/température (θ_{air}). L'évolution de la température dans l'aliment est fonction du procédé appliqué et de l'aliment (épaisseur, e_p et diffusivité thermique, D_t).

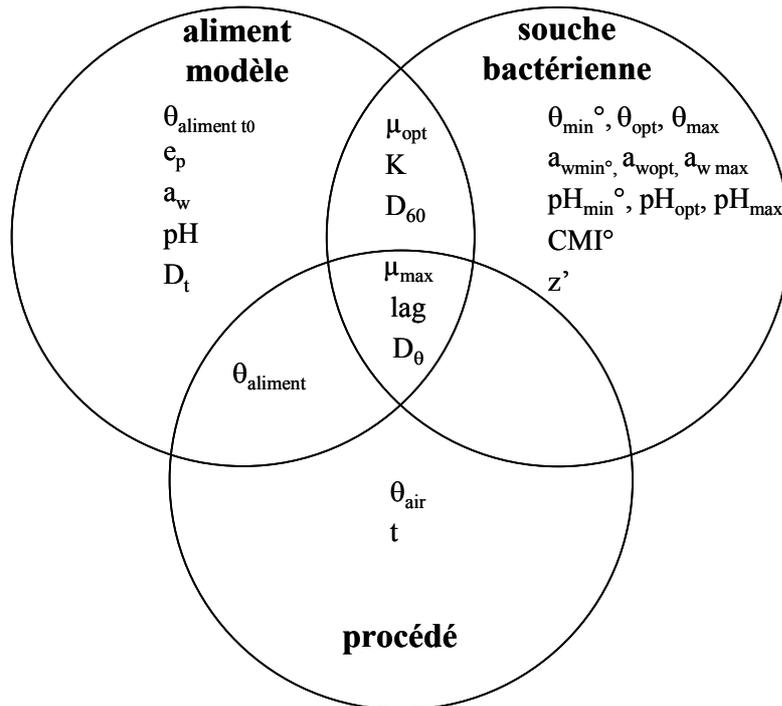


Figure 16 : paramètres impliqués dans la modélisation combinée du développement de *Listeria* en prenant en compte le procédé, la bactérie et l'aliment modèle

Avec D_t , la diffusivité thermique de l'aliment modèle, e_p son épaisseur, $\theta_{\text{aliment } t_0}$ sa température initiale, θ_{aliment} , sa température au cours du procédé, θ_{air} , la température de l'air, t , le temps, $X_{\text{min}}^\circ, X_{\text{opt}}, X_{\text{max}}$, les valeurs cardinales minimales absolues, optimales et maximales pour la température, le pH et l' a_w , CMI° , la concentration minimale inhibitrice absolue, μ_{opt} , le taux optimal de croissance, μ_{max} , le taux maximal de croissance, lag, le temps de latence, K , le facteur de proportionnalité reliant μ_{max} et lag, D_{60} , le temps de réduction décimale à 60°C ; D_θ , le temps de réduction décimale à la température θ , z' , l'élévation de température qui permet de réduire à 1/10^{ème} de sa valeur D_θ

Le modèle combiné est constitué de deux modules :

- un module « transfert » avec le modèle de transfert thermique
- et un module « microbiologie » avec :
 - o des modèles secondaires de microbiologie prévisionnelle, composés du modèle d'Augustin (1999) avec interactions, pour les croissances, et du modèle de Bigelow (1921), cité par Van Impe *et al* (1995), basé sur le temps de réduction décimale à 60°C (D_{60}) et z' , pour les destructions ;
 - o des modèles primaires donnant l'évolution de la concentration bactérienne en fonction du temps : l'équation logistique avec délai et rupture (Rosso *et al*, 1996), pour les croissances, et une équation de destruction thermique suivant une cinétique du 1^{er} ordre (Chick (1908), cité par Xiong *et al* (1999)) pour les destructions.

Pour chaque prédiction, une succession d'opérations fait le lien entre le modèle de transfert thermique et les modèles de microbiologie prévisionnelle. Ces opérations sont réalisées pour plusieurs sections de la demi épaisseur de la plaque d'aliment modèle (Figure 15), afin de tenir compte de l'évolution spatiale de la température :

- la connaissance du procédé (temps/température) caractérisant l'étape d'étuvage et de stockage permet le calcul de l'évolution de température en tout point de l'aliment modèle, connaissant sa géométrie et sa diffusivité thermique (D_t) ;
- la courbe d'évolution de la température pour la section proche de la surface (celle dont la température évolue le plus vite) est transformée en une succession de paliers, dont le pas de température ($\Delta\theta$) est constant, mais dont la durée (Δt) varie (Figure 17). La durée des paliers calculée pour la section proche de la surface est utilisée pour toutes les autres sections ;
- à chaque palier de température, les modèles secondaires de microbiologie prévisionnelle prédisent un couple (μ_{max} , lag), si la température est inférieure à la température maximale de croissance de *Listeria*, ou une valeur de D_θ , si la température est supérieure ou égale à la température maximale de croissance de *Listeria* (Figure 18) ;
- ces valeurs sont introduites dans le modèle primaire (croissance ou destruction), afin de calculer l'évolution de population pendant Δt . La population finale ainsi obtenue est utilisée comme population initiale (N_0) pour le palier suivant.

La population bactérienne totale est calculée en réalisant, à chaque début de palier, la moyenne des concentrations bactériennes prédites pour chaque section.

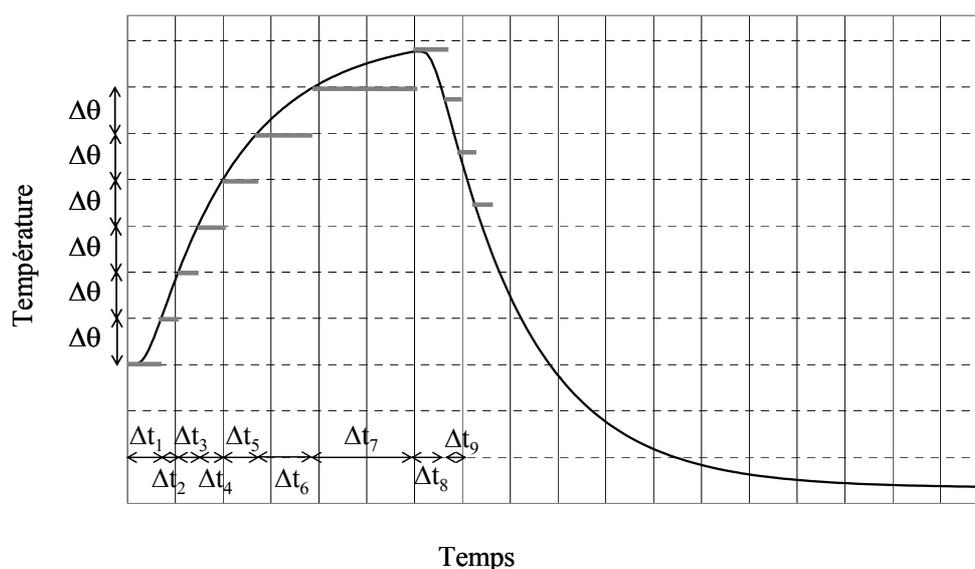


Figure 17 : transformation de la courbe de prédiction de température en une succession de paliers, dont le pas de température ($\Delta\theta$) est constant

— courbe de température prédite par le modèle de transfert thermique

— paliers de température pris en compte par les modèles de microbiologie prévisionnelle

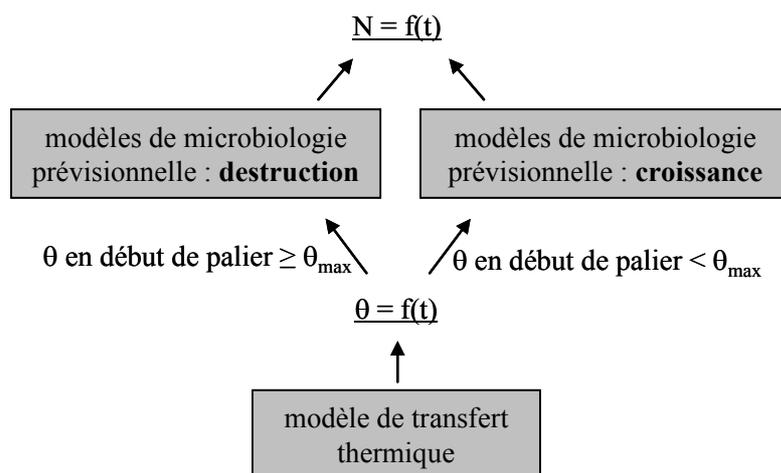


Figure 18 : modèles de microbiologie prévisionnelle utilisés (destruction ou croissance), en fonction de la température prédite en début de palier

Avec θ , la température,

θ_{\max} , la température maximale de croissance,

N , la concentration bactérienne,

t , le temps,

souligné : valeurs prédites

7-4.2. Hypothèses

Pour modéliser les cinétiques de croissance, nous avons appliqué les hypothèses de Zwietering *et al* (1994). Nous supposons que le taux maximal de croissance en condition dynamique est égal au taux maximal de croissance obtenu dans les mêmes conditions environnementales, mais en condition statique de température. Nous considérons également que le temps de latence en condition dynamique est égal au temps de latence dans les conditions initiales de la croissance. Ainsi, lorsque l'évolution de température intervient à x % de la durée du temps de latence, la population bactérienne demeure en latence les $(100-x)$ % dans la nouvelle condition de température. La phase de latence s'achève donc au premier Δt pour lequel la somme des précédents Δt est supérieure à 100% de la latence.

Pour les cinétiques de destruction, nous avons considéré que :

- la destruction bactérienne a lieu dès que la température de l'aliment modèle est supérieure ou égale à la température maximale de croissance de *Listeria* ;
- la destruction de *Listeria* en condition dynamique de température peut être prédite à partir de son comportement en condition statique ;
- l'élévation de température dans l'aliment modèle est trop rapide pour que les bactéries aient le temps de synthétiser des protéines de chocs. Leur résistance à la chaleur n'augmente donc pas au cours de l'étuvage (Bellara *et al.*, 1999) ;
- lorsque la température redevient inférieure à la température maximale de croissance de *Listeria*, alors la croissance reprend immédiatement sans temps de latence.

-Résultats-

1 - Expériences préliminaires

1-1. Durée des expériences

Le premier signe d'altération microbiologique des lardons (de marques Herta, Auchan, Fleury Michon, Tradilège, Champion), conservés à 20°C, est un gonflement de la barquette. Ce dernier est apparu après une durée de quatre à neuf jours de stockage.

Nous avons choisi de stocker l'aliment modèle durant six jours, à partir de la fin de l'étuvage, soit la durée moyenne de conservation préalable au gonflement des barquettes de lardons à 20°C.

1-2. Ionisation

La viande a été ionisée afin de réduire sa charge microbienne. Le protocole d'ionisation a été déterminé en accord avec des ingénieurs d'Aérial, pour garantir l'efficacité du traitement tout en limitant la dose utilisée.

L'ionisation des échantillons de viande hachée congelés, à une dose de 15 kGy, a permis de réduire la contamination de la mûlée de 3.10^5 UFC.g⁻¹ à un niveau inférieur à 2.10^3 UFC.g⁻¹ (seuil limite de détection).

1-3. Inoculation de la viande

L'aliment modèle est inoculé avec la dilution au 1/100^{ème} de la troisième préculture. Le volume théorique à ajouter est calculé en fonction du poids de l'aliment modèle. Il a été mis en évidence que ce volume devait être multiplié par 3,5 pour obtenir la concentration initiale en *Listeria* souhaitée.

Le malaxage manuel de deux minutes garantit une répartition homogène des bactéries. L'écart-type de concentration en *Listeria* pour trois échantillons de 20 g, prélevés dans une même mûlée de 400 g, est, en moyenne, de 0,1 U Log.

1-4. Domaines et niveaux des facteurs étudiés

1-4.1. a_w et pH

Des mesures d' a_w et de pH ont été effectuées sur des lardons achetés dans le commerce. Des valeurs moyennes de 0,965, pour l' a_w , et de 5,9, pour le pH, ont été obtenues. Nous avons fixé le niveau le plus élevé du domaine d'étude à des valeurs égales à 0,97, pour l' a_w , et 6,2, pour le pH. Les valeurs de pH du salami varient selon le pays d'origine, de 4,6, pour le salami Hongrois (Pidcock *et al.*, 2002), à 5,1, en moyenne, pour le salami grec (Samelis *et al.*, 1998). Le pH minimum du domaine d'étude a été fixé à 5,0, valeur proche des pH des salamis et au-dessus du pH_{min}° (HCl) de *Listeria* (4,38 d'après Augustin (1999)).

Cinq niveaux équidistants ont été choisis pour le plan d'expériences, dans le but d'encadrer les valeurs de pH et d' a_w de nombreux produits de charcuterie/salaison (salami, lardons, jambon, saucisse) : 0,93-0,94-0,95-0,96-0,97, pour l' a_w et 5,0-5,3-5,6-5,9-6,2, pour le pH.

1-4.2. Inhibiteurs

Une enquête téléphonique réalisée auprès de fabricants de lardons a montré que le lactate de sodium et l'acétate de sodium sont les additifs les plus couramment employés. Le premier est utilisé à des pourcentages de l'ordre de 1,5 à 3,0%, le second, entre 0,2 et 0,8%. Nous avons choisi de tester la fumée liquide la plus utilisée par les fabricants de lardons (entretien avec les techniciens de l'entreprise Soussana, fournisseur d'ingrédients et d'additifs) ; celle-ci est ajoutée à des concentrations comprises entre 0,1 et 0,3%. En ce qui concerne le sorbate de potassium, il n'est pas autorisé comme additif dans les lardons. Une analyse bibliographique nous a permis d'évaluer le domaine de concentrations à étudier pour observer des cinétiques d'inhibition.

Nous avons choisi des niveaux identiques ou plus élevés que ceux employés par les professionnels pour favoriser l'observation des cinétiques d'inhibition. Des niveaux équidistants ont donc été déterminés, soit 1,5, 3,0 et 4,5% pour le lactate de sodium, 0,3, 0,6 et 0,9% pour l'acétate de sodium, la fumée liquide et le sorbate de potassium. Pour 120 g d'aliment modèle, nous avons ajouté des volumes de :

- 3,0 à 9,0 ml de sirop de lactate de sodium (sirop à 60%),
- 0,6 à 1,8 ml pour l'acétate de sodium et le sorbate de potassium (solutions à 0,6 g.ml⁻¹)
- et 360 μ l à 1080 μ l de fumée liquide (solution pure).

1-4.3. Procédés d'étuvage

Lors de l'étuvage, l'épaisseur et la largeur du parallélépipède d'aliment modèle sont conditionnées par les dimensions des sacs stomacher sans filtre de 400 ml. La longueur du parallélépipède a été ajustée en fonction de la quantité de viande, pour garantir la constance de la masse surfacique de la mée.

Les essais pour sélectionner les procédés d'étuvage ont été réalisés dans un parallélépipède de 6 cm de longueur (120 g de viande), identique à celui utilisé ensuite pour les cinétiques bactériennes réduites. Des températures de 20 à 55°C et des durées de 20 minutes à quatre heures ont été testées, afin d'encadrer les températures d'étuvage employées par les charcutiers/salaisonniers. Un étuvage de trois ou quatre heures à des températures supérieures ou égales à 48°C cuit l'aliment modèle : la viande est alors très compacte, elle offre une plus grande résistance au tranchage que la viande crue. Nous avons retenu les trois procédés d'étuvage suivants :

- 4h à 42°C,
- 1h à 48°C
- et 1h à 53°C.

Ces procédés conduisent à un léger brunissement de la viande et de l'exsudat, mais la viande reste crue, ce qui est vérifié par les analyses chimiques effectuées au CTSCCV (humidité, matière grasse libre, protéines, phosphore total, collagène, sucres solubles totaux, glucides totaux, nitrites, nitrates, chlorures, cendres - Annexe 1). En effet, tous les dosages réalisés sur l'aliment modèle, avant et après étuvage, montrent des résultats identiques.

1-5. Ajustement de l' a_w

1-5.1. En absence d'inhibiteur

Une gamme étalon, $a_w = f(\% \text{ NaCl})$, a été réalisée (Figure 19). Pour chaque point, 40 g d'aliment modèle ont été utilisés et deux aliquotes ont été prélevées pour mesurer l' a_w . La quantité de NaCl à ajouter, pour ajuster l' a_w de l'aliment modèle, a été déduite de l'équation de la droite de régression (Tableau 14). Nous avons négligé l'effet de l'addition d'HCl ou de NaOH (lors de l'ajustement du pH) pour déterminer le pourcentage de NaCl à ajouter en fonction de l' a_w souhaitée.

L'homogénéité de l' a_w dans la mûlée a également été vérifiée en fonction de la technique utilisée pour l'ajuster :

- pour les mûlées de 400 g, le mélange est effectué par malaxage manuel. Six aliquotes ont été prélevées dans une mûlée ajustée à une a_w de 0,93. Nous avons obtenu une a_w moyenne de $0,929 \pm 0,001$;
- pour les mûlées de 120 g, le mélange est effectué dans un bûcher à l'aide d'une cuillère. Trois aliquotes ont été prélevées dans une mûlée ajustée à une a_w de 0,93. Nous avons obtenu une a_w moyenne de $0,931 \pm 0,002$.

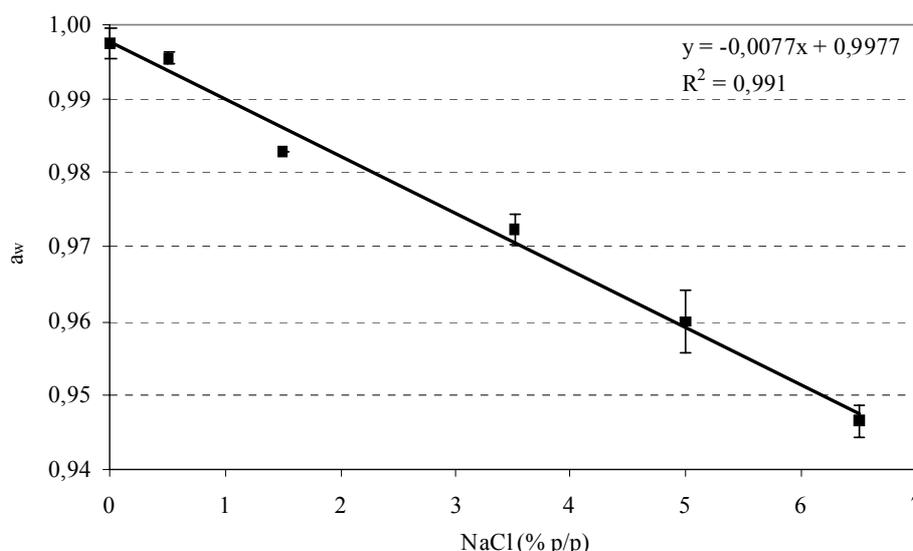


Figure 19 : gamme étalon, a_w en fonction du pourcentage de NaCl ajouté à l'aliment modèle (— écart-type, n = 2)

Tableau 14 : pourcentage de NaCl à ajouter à l'aliment modèle en fonction de l' a_w souhaitée

a_w souhaitée	Pourcentage de NaCl à ajouter (p/p)
0,97	3,6
0,96	4,9
0,95	6,2
0,94	7,5
0,93	8,8

1-5.2. En présence d'inhibiteur(s)

1-5.2.1. Un inhibiteur

L' a_w de l'aliment modèle varie en fonction du pourcentage de lactate de sodium ajouté : l' a_w est de 0,984, lorsque 1,5% est ajouté, contre 0,968, en présence de 4,5% (Figure 20). En conséquence, trois gammes étalon, correspondant à chaque niveau de lactate de sodium étudié, ont été réalisées pour évaluer la quantité de NaCl à ajouter en fonction de l' a_w souhaitée. Pour les trois autres inhibiteurs, nous avons considéré que les différences d' a_w , en

fonction de la quantité d'inhibiteur, étaient négligeables (Figure 20). Une seule gamme étalon a été réalisée au pourcentage intermédiaire en inhibiteur (Figure 21). L'équation de la droite de régression a été calculée pour chaque gamme étalon, nous en avons déduit la quantité de NaCl à ajouter pour ajuster l' a_w de l'aliment modèle (Tableau 15).

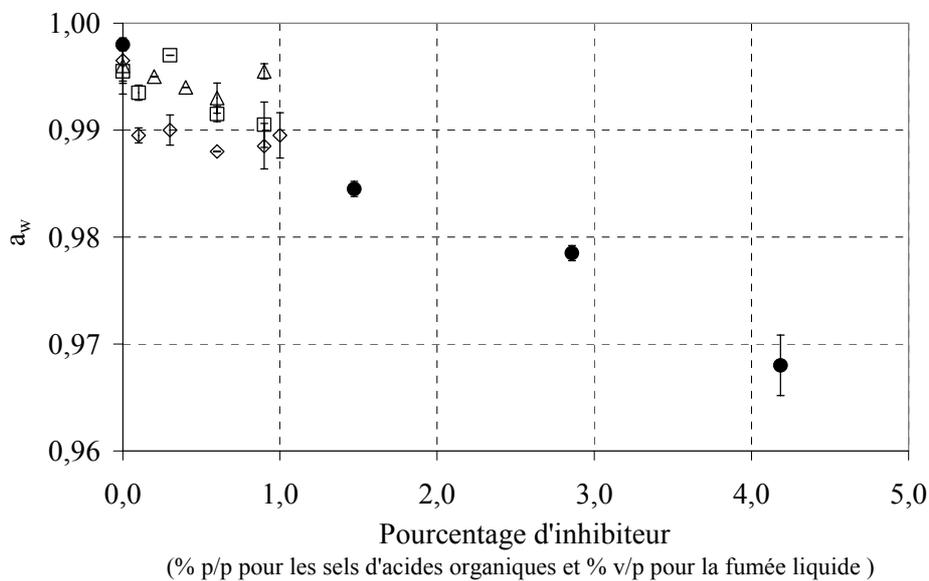


Figure 20 : a_w de l'aliment modèle en fonction de la nature et du pourcentage d'inhibiteur

● lactate de sodium, Δ acétate de sodium, \square sorbate de potassium, \diamond fumée liquide, --- écart-type (n = 2)

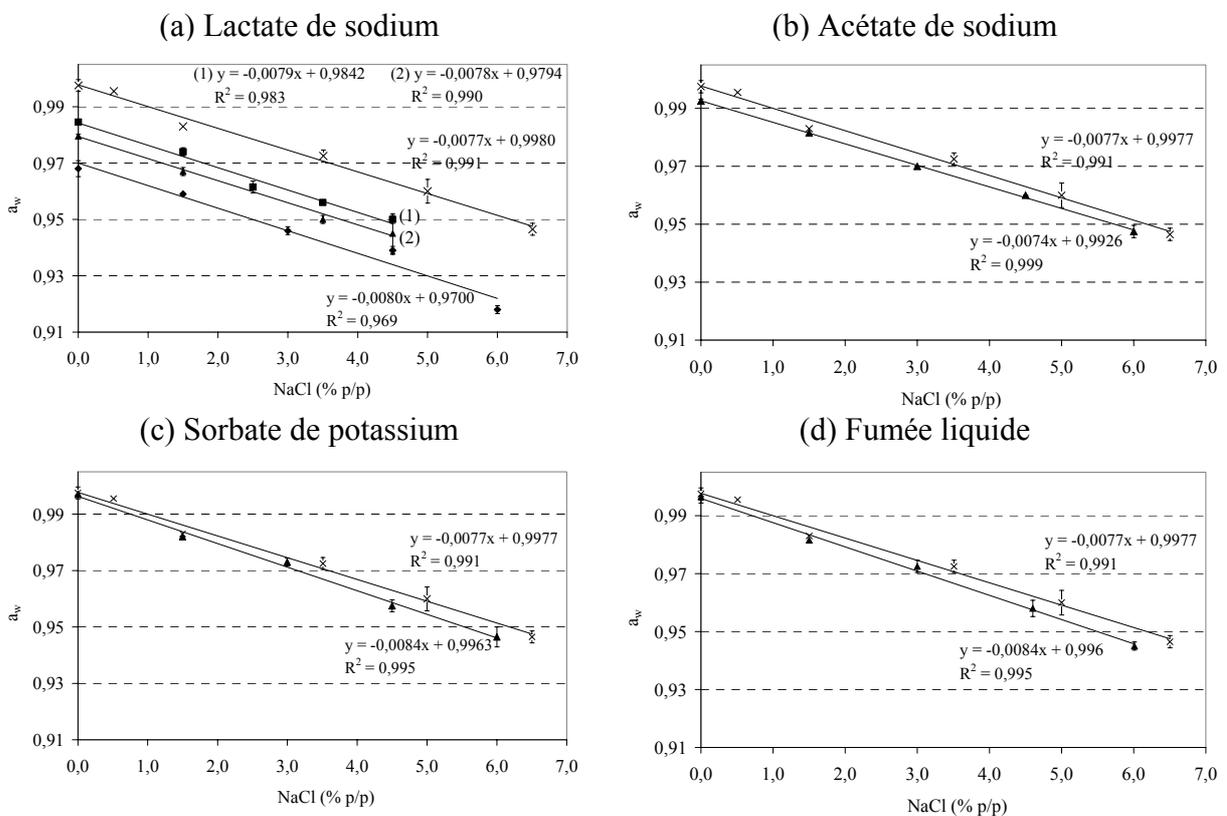


Figure 21 : a_w de l'aliment modèle en fonction du pourcentage de NaCl, de la nature et du pourcentage d'inhibiteur

(a) lactate de sodium: x 0 %, \blacksquare 1,5 %, \blacktriangle 3,0 %, \blacklozenge 4,5%, --- écart-type (n = 2)

(b) acétate de sodium, (c) sorbate de potassium, (d) fumée liquide : x 0 %, \blacktriangle 0,6 %, --- écart-type (n = 2)

Tableau 15 : pourcentage de NaCl à ajouter pour ajuster l' a_w de l'aliment modèle, en fonction de la nature et du pourcentage d'inhibiteur

Nature de l'inhibiteur	% d'inhibiteur ajouté (p/p)	a_w souhaitée	% de NaCl à ajouter (p/p)
Lactate de sodium	1,5	0,97	1,8
		0,96	3,1
		0,95	4,3
	3,0	0,97	1,2
		0,96	2,5
		0,95	3,8
	4,5	0,97	0,0
		0,96	1,3
		0,95	2,5
Acétate de sodium	0,3 à 0,9	0,97	3,1
		0,96	4,4
		0,95	5,8
Sorbate de potassium	0,3 à 0,9	0,97	3,1
		0,96	4,3
		0,95	5,5
Fumée liquide	0,3 à 0,9*	0,97	3,1
		0,96	4,3
		0,95	5,5

* pourcentage exprimé en v/p

1-5.2.2. Deux inhibiteurs

Des gammes étalon, $a_w = f(\% \text{ de NaCl})$, ont également été réalisées en présence de deux inhibiteurs. Les équations des droites de régression donnent la quantité de NaCl à ajouter, en fonction de l' a_w souhaitée (Tableau 16).

Tableau 16 : pourcentage de NaCl à ajouter pour ajuster l' a_w de l'aliment modèle, en fonction de la nature et de la concentration des deux inhibiteurs

Nature des deux inhibiteurs	% d'inhibiteurs ajoutés (p/p)	Equation de la droite de régression	a_w souhaitée	% de NaCl à ajouter (p/p)
Lactate de sodium Sorbate de potassium	1,5 0,3 ou 0,6	$a_w = -0,0095 (\% \text{ NaCl}) + 0,9838$ $R^2 = 0,964$	0,97	1,5
			0,96	2,5
			0,95	3,6
Lactate de sodium Acétate de sodium	1,5 0,3 ou 0,6	$a_w = -0,0074 (\% \text{ NaCl}) + 0,9798$ $R^2 = 0,985$	0,97	1,3
			0,96	2,7
			0,95	4,0
Sorbate de potassium Acétate de sodium	0,3 0,3 ou 0,6	$a_w = -0,0085 (\% \text{ NaCl}) + 0,9865$ $R^2 = 0,968$	0,97	1,9
			0,96	3,1
			0,95	4,3

1-6. Ajustement du pH

Après ajustement de l' a_w (et éventuellement, l'ajout d'inhibiteur), le pH de l'aliment modèle est contrôlé avec des solutions d'HCl (1N) ou de NaOH (1N).

En absence d'inhibiteur et de NaCl, le pH de l'aliment est, en moyenne, de 5,82 (données issues de 18 mesures réalisées dans six sachets de 400 g), avec un pH maximum de 5,88, et un pH minimum de 5,76. Nous avons observé une diminution du pH, lorsque la quantité de NaCl augmente (Figure 22).

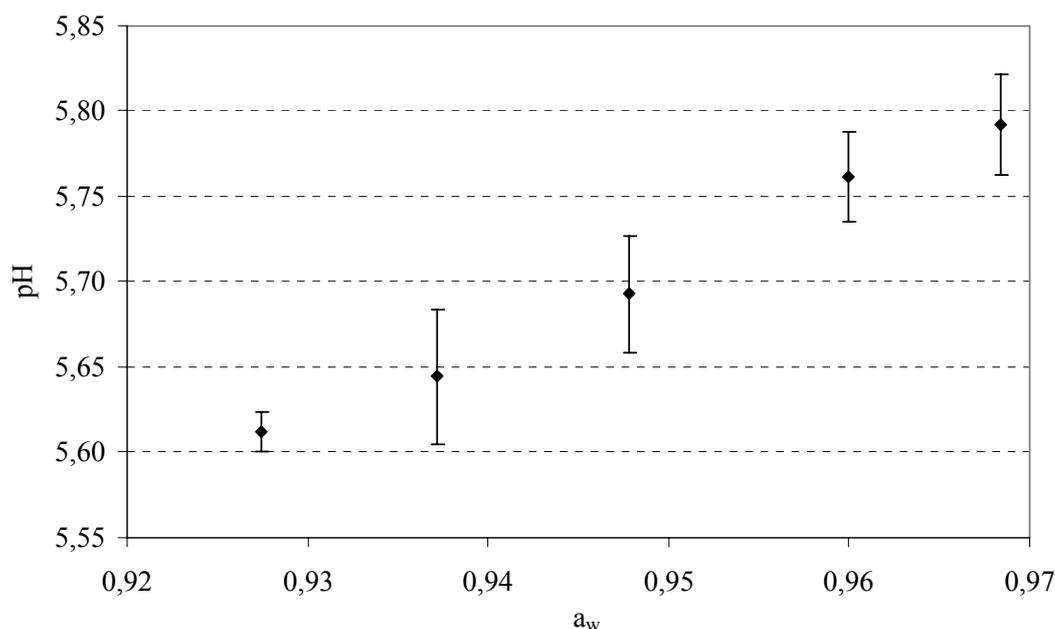


Figure 22 : pH de l'aliment modèle en fonction de l' a_w contrôlée avec du NaCl (— écart-type, n = 5)

Dans la gamme de concentrations testées, l'ajout des inhibiteurs ne modifie pas le pH initial de l'aliment modèle (Figure 23), excepté lorsque la fumée liquide est ajoutée à 0,6 ou 0,9%.

Compte tenu de l'hétérogénéité du pH initial de l'aliment modèle, de l'influence de la concentration en NaCl et du pourcentage de fumée liquide sur le pH, nous n'avons pas prédit le volume d'HCl ou de NaOH à ajouter en fonction du pH souhaité. L'ajustement du pH a été réalisé par ajouts successifs de petits volumes d'HCl (1N) ou de NaOH (1N), mais également, en se basant sur les résultats obtenus lors des expériences précédentes. Ce protocole a permis de limiter l'écart de pH, entre trois mesures effectuées dans une mûlée de 120 g, à 0,1 U pH maximum.

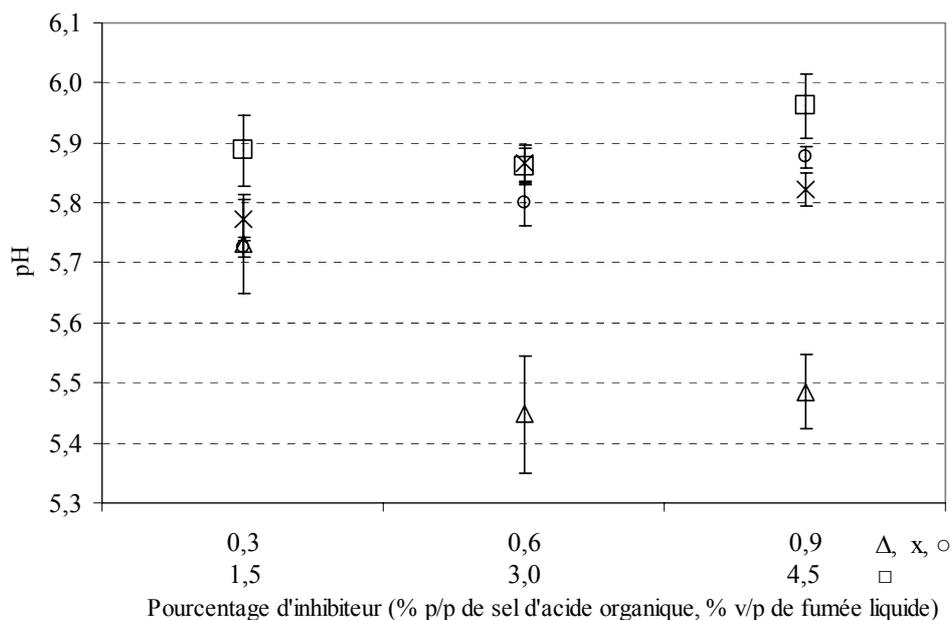


Figure 23 : pH moyen de l'aliment modèle en fonction de la nature et du pourcentage d'inhibiteur ajouté

Δ fumée liquide; x acétate de sodium ; o sorbate de potassium ; □ lactate de sodium; ── écart-type (n = 9)

2 - Etude et modélisation du développement de *L. monocytogenes* en fonction du pH et de l' a_w

Ce chapitre présente les résultats et le traitement des données relatifs aux expériences réalisées, lors du stockage à 20°C de l'aliment modèle, en absence d'inhibiteur et de procédé d'étuvage.

2-1. Résultats expérimentaux

2-1.1. Cinétiques bactériennes

Pour une même a_w , la baisse du pH de 6,2 à 5,0 ralentit la croissance et réduit la capacité de croissance globale ($CC_{globale}$) jusqu'à des valeurs négatives. Pour un même pH, la baisse d' a_w de 0,97 à 0,93 produit des effets similaires (Figure 24). Par exemple, lorsque l' a_w est égale à 0,94, la $CC_{globale}$ est comprise entre -1,0 et 1,0 U Log, pour des pH inférieurs ou égaux à 5,6 (Figure 24 a). Pour des pH plus élevés, la croissance est plus rapide et la $CC_{globale}$ est supérieure à 2,0 U Log. A pH 5,6, la population bactérienne est stable pendant toute la durée du stockage, pour les a_w 0,93 et 0,94. Au-dessus, la $CC_{globale}$ est supérieure à 2,5 U Log (Figure 24 b).

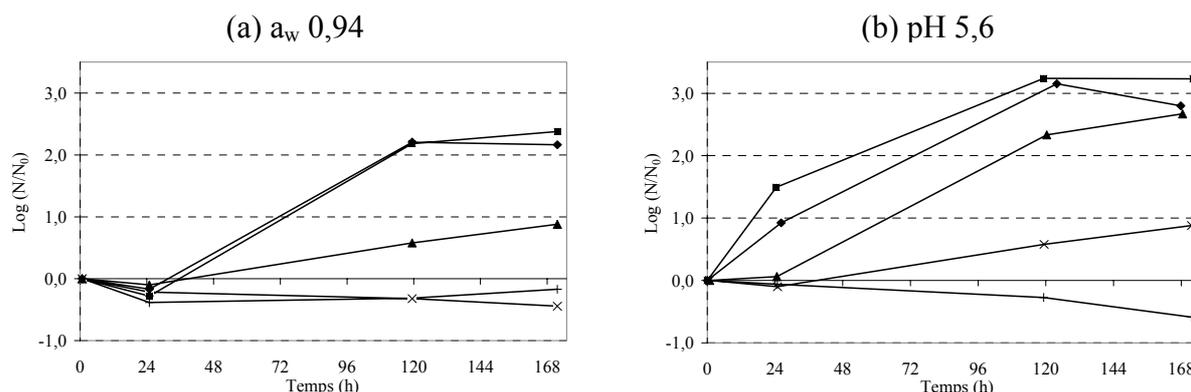


Figure 24 : évolution de la population de *L. monocytogenes* en fonction du pH et de l' a_w

(a) a_w 0,94, effet du pH : ■ pH 6,2 ; ◆ pH 5,9 ; ▲ pH 5,6 ; x pH 5,3 ; + pH 5,0
 (b) pH 5,6, effet de l' a_w : ■ a_w 0,97 ; ◆ a_w 0,96 ; ▲ a_w 0,95 ; x a_w 0,94 ; + a_w 0,93

2-1.2. Domaine de croissance

Sur les 25 conditions d' a_w et de pH testées, aucune ne conduit à la destruction de la population bactérienne ($CC_{globale} < -1,0$ U Log) ; dans neuf cas, la population survit ($-1,0$ U Log $< CC_{globale} < 1,0$ U Log). Une croissance supérieure à 1,0 U Log est observée dans les autres conditions. Ainsi, à 20°C, la croissance de *Listeria* a lieu dans le domaine d' a_w et de pH mesuré dans les lardons du commerce (Figure 25). Notons également que l' a_w minimale, pour laquelle la croissance de *Listeria* est observée, augmente, lorsque le pH diminue (il en est de même pour le pH, lorsque l' a_w diminue). En effet, l' a_w minimale de croissance est proche de 0,94, lorsque le pH est supérieur ou égal à 5,9 ; elle est de l'ordre de 0,95, à pH 5,6 et pH 5,3, et de 0,96, à pH 5,0. Des interactions entre le pH et l' a_w existant, il sera donc essentiel d'en tenir compte lors de l'étape de modélisation.

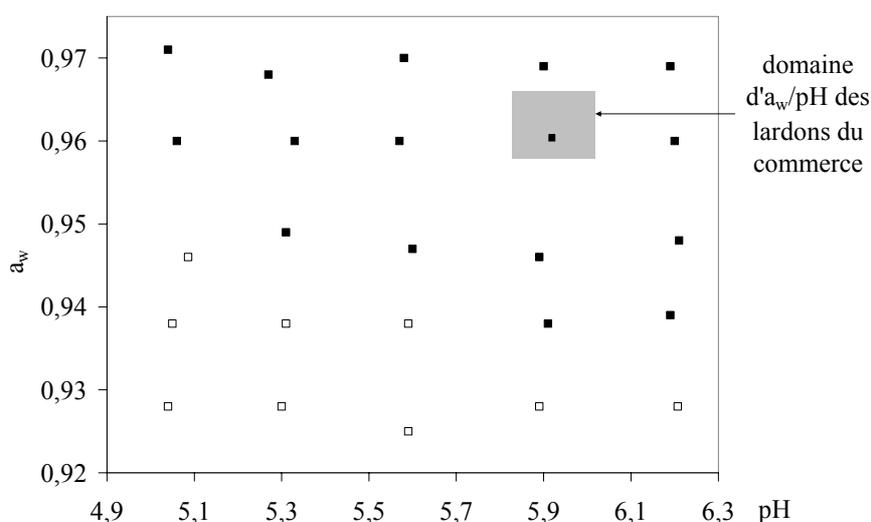


Figure 25 : domaines de croissance et d'absence de croissance de *L. monocytogenes* dans l'aliment modèle à 20°C

■ croissance ($CC_{globale} > 1,0$ U Log) ; □ absence de croissance ($CC_{globale} < 1,0$ U Log)

2-2. Modélisation

2-2.1. Ajustement des paramètres du modèle d'Augustin

Nous avons utilisé les valeurs cardinales proposées par Augustin (1999) pour la température, le pH et l' a_w (Tableau 11, Chapitre matériels et méthodes). Le taux optimal de croissance (μ_{opt}) et K (correspondant au produit du taux maximal de croissance, μ_{max} , et du temps de latence, lag), doivent être estimés, afin de tenir compte de l'influence de la nature du substrat et de l'espèce bactérienne utilisés, ainsi que de l'état physiologique de l'inoculum.

Nous avons obtenu un taux optimal de croissance optimisé de $1,90 \text{ h}^{-1}$, en utilisant les résultats de répétitions des cinétiques complètes pour chacune des deux conditions environnementales testées (pH 5,6/ a_w 0,95 et pH 6,2/ a_w 0,97, pour un stockage à 20°C).

Après lissage des six cinétiques complètes avec le modèle primaire, les valeurs de taux maximal de croissance et de temps de latence ont été utilisées pour calculer K . Les intervalles de confiance à 95%, dans la condition pH 5,6/ a_w 0,95, sont plus grands et chevauchent ceux de la condition pH 6,2/ a_w 0,97. L'hypothèse de constance du produit $[\mu_{max} \cdot lag]$ est confirmée et la valeur de K est fixée à $1,94 \pm 0,52$, ce qui correspond à la moyenne des six valeurs de la Figure 26.

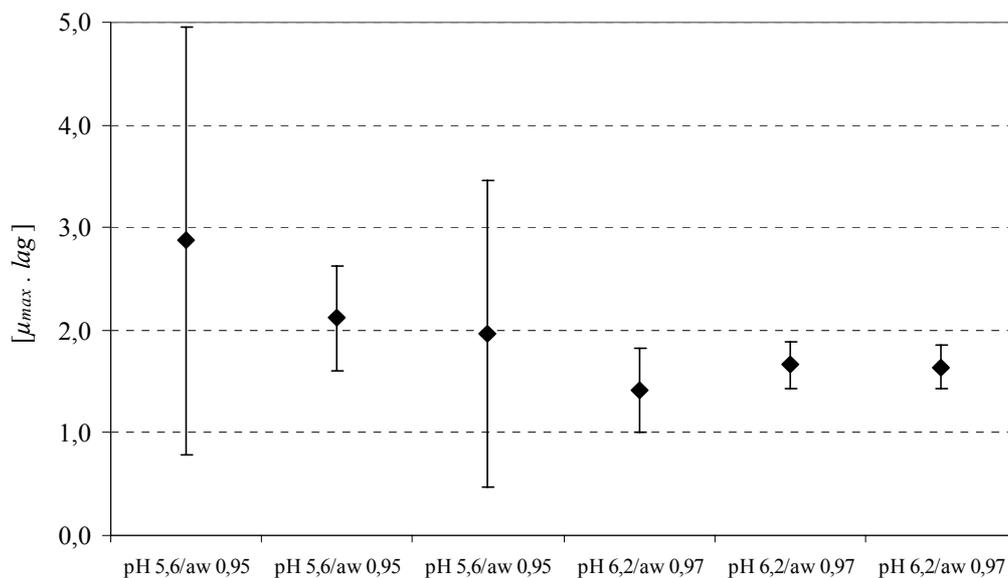


Figure 26 : produit $[\mu_{max} \cdot lag]$ en fonction du pH et de l' a_w dans l'aliment modèle à 20°C (— intervalle de confiance à 95%)

2-2.2. Comparaison des concentrations bactériennes expérimentales et prédites

Les prédictions du modèle secondaire d'Augustin, couplé au modèle primaire logistique avec délai et rupture, ont été comparées aux cinétiques réduites du plan d'expériences A. La frontière $CC = 1$ a également été estimée et comparée avec les valeurs des $CC_{globale}$ expérimentales.

2-2.2.1. Cinétiques bactériennes

Les résultats des cinétiques complètes ont montré que les coefficients de variation de la concentration bactérienne initiale (N_0), de la concentration bactérienne maximale (N_{max}) et du taux maximal de croissance (μ_{max}), sont respectivement égaux à 0,01, 0,007 et 0,06. Nous avons déterminé l'enveloppe contenant 90% des 1000 courbes simulées, en appliquant la méthode de Monte Carlo.

Pour 22 conditions sur les 25 du plan d'expériences A, soit 88% des cinétiques, les modèles simulent correctement le développement de *L. monocytogenes* (Figure 27 a, c, e). Pour les trois prédictions non satisfaisantes, un seul point de dénombrement se trouve en dehors de l'enveloppe à 90% des simulations (Figure 27 b, d, f).

Même pour les trois prédictions non satisfaisantes (deux prédictions non dangereuses et une dangereuse, selon les critères établis dans le Tableau 13, Chapitre matériels et méthodes), le modèle prédit correctement si les conditions environnementales permettent la croissance de *Listeria* ou pas :

- à a_w 0,94/pH 5,9 et a_w 0,96/pH 5,0, les cinétiques expérimentales et prédites attestent de conditions environnementales favorables à un accroissement bactérien ;
- à a_w 0,93/pH 5,9, les conditions environnementales ne permettent pas la croissance de *Listeria*, ce qui est également prédit par le modèle.

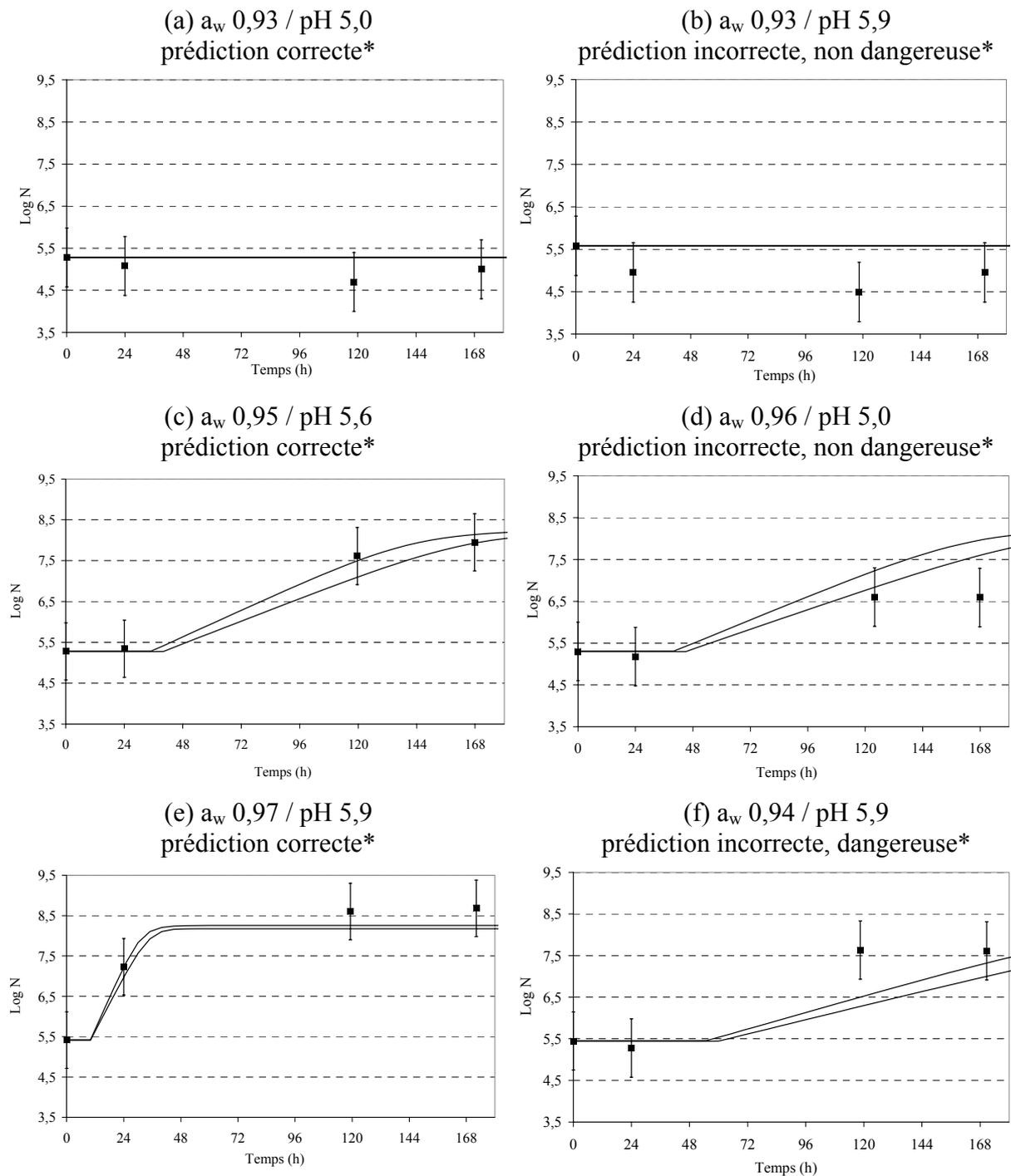


Figure 27 : comparaison des cinétiques bactériennes expérimentales et prédites à 20°C

— cinétique prédite avec une enveloppe à 90 %, —|— erreur expérimentale ($\pm 0,7$ U Log)

* selon les critères établis dans le Tableau 13, Chapitre matériels et méthodes

La qualité des prédictions (prédiction correcte ou incorrecte) des modèles est influencée par les conditions d' a_w et de pH. En effet, les prédictions sont correctes, lorsque :

- l' a_w est inférieure à 0,94 et le pH inférieur ou égal à 5,6,
- l' a_w est supérieure à 0,94 et le pH supérieur ou égal à 5,3.

En dehors de ces deux domaines, les prédictions du modèle sont parfois incorrectes (Figure 28).

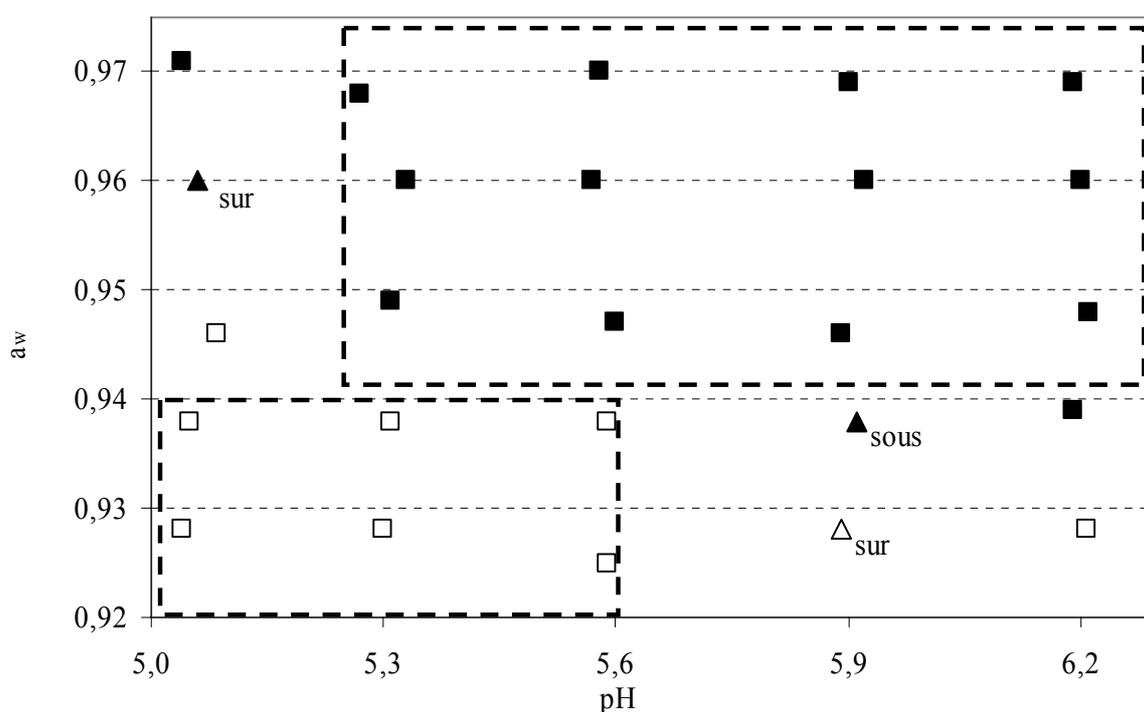


Figure 28 : bilan de la comparaison entre les cinétiques bactériennes expérimentales et prédites en fonction du pH et de l' a_w

- prédictions correctes : [---] domaines d' a_w et de pH,
 ■ : croissance observée ($CC_{globale} > 1,0$ U Log),
 □ : pas de croissance observée ($CC_{globale} < 1,0$ U Log),
 prédictions incorrectes : ▲ : croissance observée ($CC_{globale} > 1,0$ U Log),
 △ : pas de croissance observée ($CC_{globale} < 1,0$ U Log),
 sous : la prédiction sous-estime la population bactérienne,
 sur : la prédiction surestime la population bactérienne

2-2.2.2. Frontière $CC = 1$

Dans le paragraphe précédent, la comparaison entre les prédictions et les résultats expérimentaux a été réalisée, pour chaque cinétique, point par point. La prédiction de la frontière $CC = 1$ s'intéresse au procédé dans sa globalité. Ainsi, son intérêt est d'apprécier l'accroissement de la population bactérienne, après sept jours de stockage à 20°C, par rapport à la limite 1,0 U Log. Les comparaisons entre résultats expérimentaux et prédictions s'effectuent uniquement sur la $CC_{globale}$. Il s'agit de vérifier si la frontière prédite $CC = 1$ délimite correctement les $CC_{globale}$ observées inférieures et supérieures à 1,0 U Log.

Le modèle d'Augustin, couplé au modèle logistique, permet de prédire correctement la frontière $CC = 1$ (Figure 29). Les 16 conditions pour lesquelles une $CC_{globale}$ supérieure à 1,0 U Log sont observées se situent au-dessus de la frontière modélisée. Au-dessous de celle-ci, se trouvent les neuf conditions pour lesquelles la $CC_{globale}$ est inférieure à 1,0 U Log.

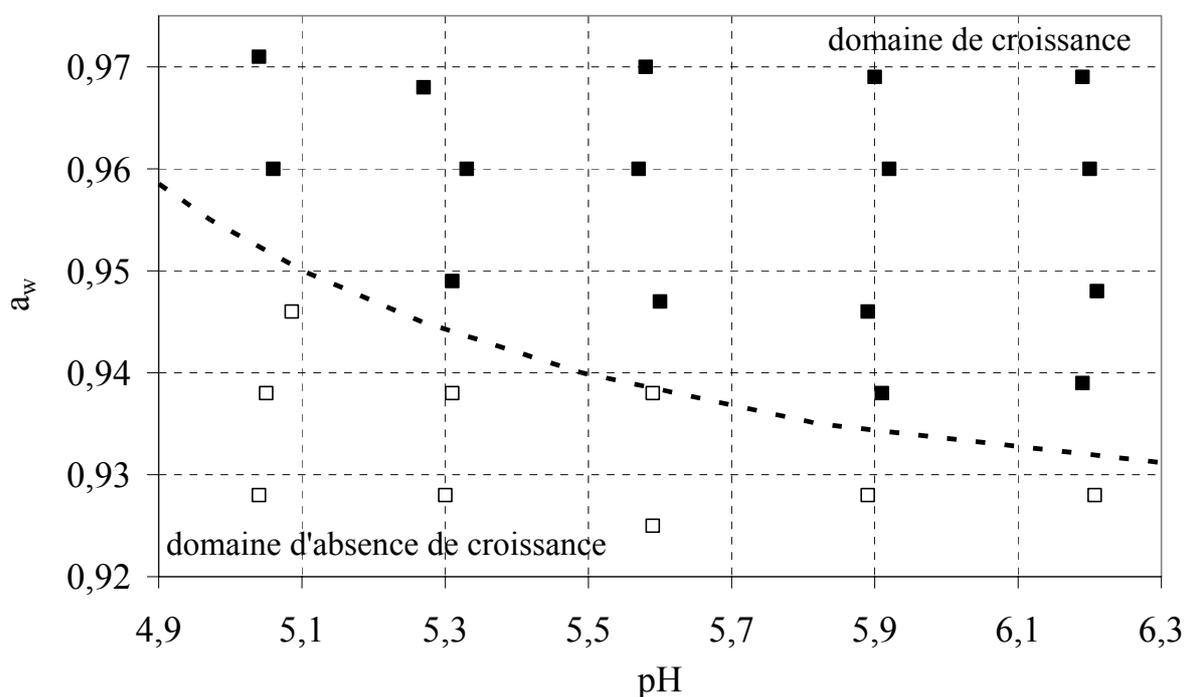


Figure 29 : frontière prédite entre les domaines de croissance et d'absence de croissance, après sept jours de stockage à 20°C

■ croissance observée ($CC_{globale} > 1,0$ U Log) ; □ absence de croissance observée ($CC_{globale} < 1,0$ U Log)
 ---- frontière prédite ($CC_{globale} = 1,0$ U Log)

3 - Etude et modélisation du développement de *L. monocytogenes* en présence d'inhibiteur(s)

Les résultats obtenus dans le plan d'expériences A ont mis en évidence un domaine d' a_w et de pH qui permet la croissance de *L. monocytogenes*. C'est dans ce domaine plus restreint (plan d'expériences B) que nous avons choisi d'étudier l'influence de la nature et de la concentration en inhibiteur. Ce domaine présente l'avantage d'intégrer les valeurs d' a_w /pH des lardons du commerce (Figure 30).

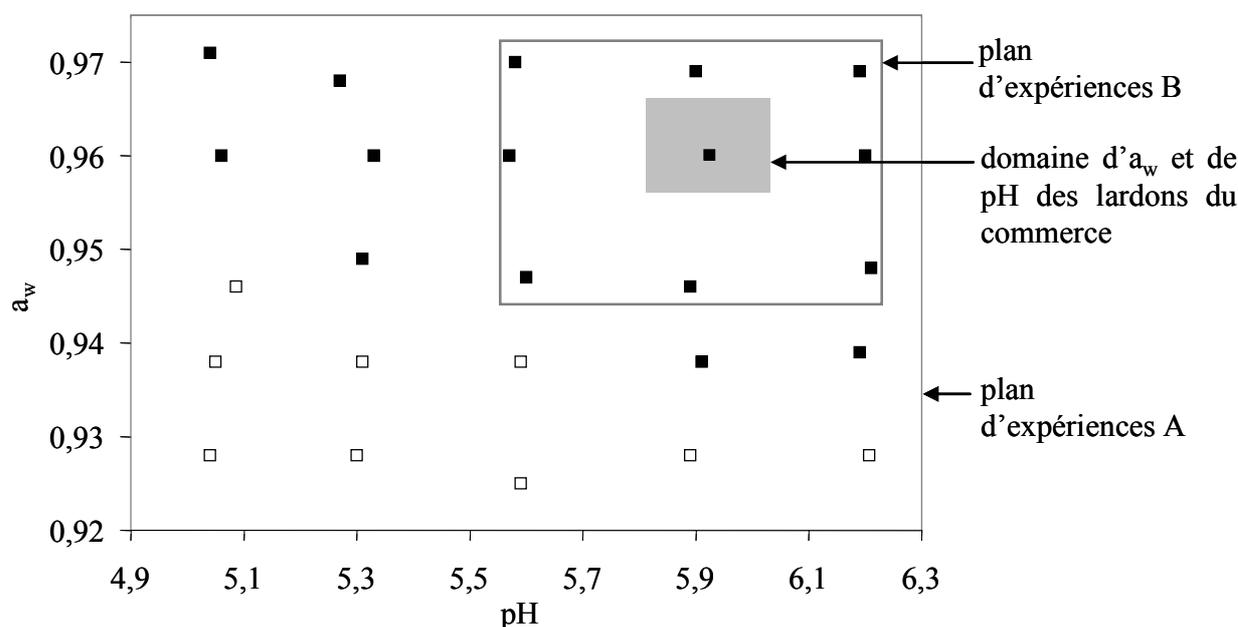


Figure 30 : domaine d' a_w /pH pour lequel l'influence de la nature et de la concentration en inhibiteur est étudiée (plan d'expériences B) par rapport au domaine d' a_w /pH des lardons du commerce et au plan d'expériences A

■ croissance ($CC_{globale} > 1,0$ U Log), □ absence de croissance ($CC_{globale} < 1,0$ U Log)

3-1. Lactate de sodium

3-1.1. Résultats expérimentaux

3-1.1.1. Cinétiques bactériennes

La croissance de *Listeria* est ralentie et la population stagne parfois ($CC_{globale}$ comprise entre -1,0 et 1,0 U Log), lorsque du lactate de sodium est ajouté, que le pH ou l' a_w diminue.

La Figure 31 montre qu'à pH 5,6 et a_w 0,96, la latence est allongée, lorsque du lactate de sodium est ajouté. La $CC_{globale}$ est négative en présence de 3,0 ou 4,5% de lactate de sodium.

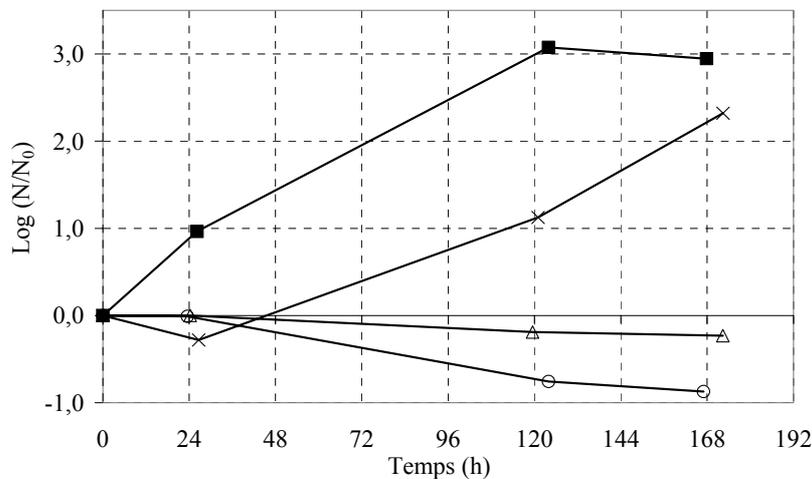


Figure 31 : influence du pourcentage de lactate de sodium sur le développement de *Listeria* à a_w 0,96 et pH 5,6

■ 0% ; × 1,5% ; △ 3,0% ; ○ 4,5%

3-1.1.2. Domaine de croissance

Dans les neuf conditions d' a_w /pH testées, la croissance de *Listeria* est toujours observée en absence d'inhibiteur (Figure 32 a). Le nombre de conditions où la croissance est observée diminue au fur et à mesure que le pourcentage de lactate de sodium augmente (Figure 32 b, c, d).

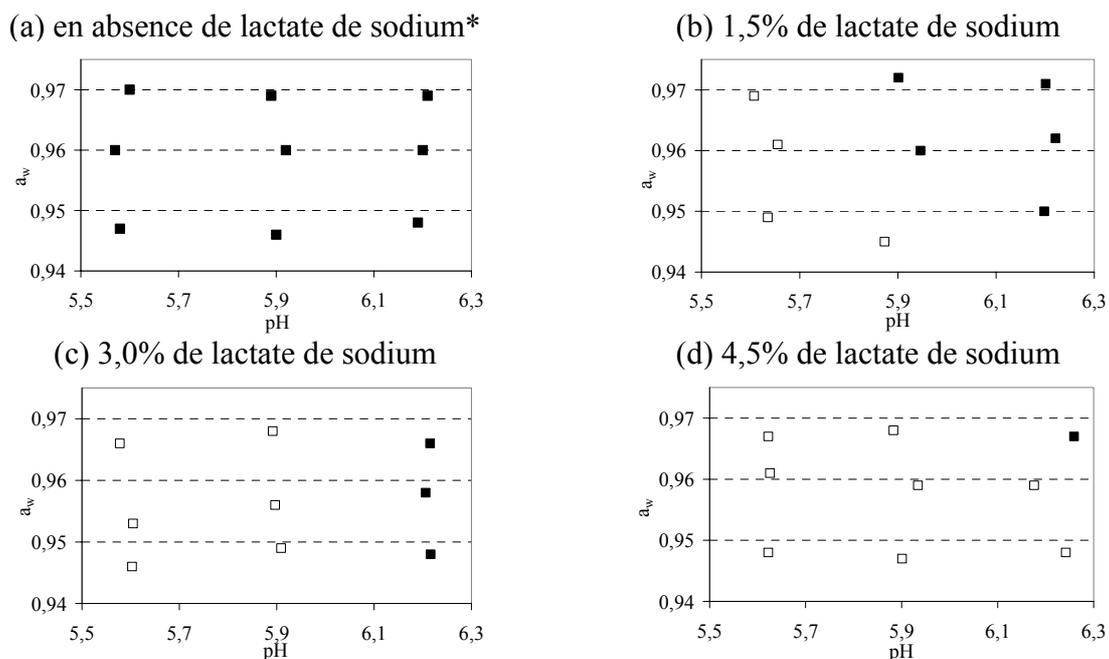


Figure 32 : évolution du domaine permettant la croissance de *Listeria* en fonction du pourcentage de lactate de sodium

■ croissance ($CC_{globale} > 1,0$ U Log) ; □ absence de croissance ($CC_{globale} < 1,0$ U Log),

*les résultats en absence de lactate de sodium ont déjà été présentés Figure 25

3-1.2. Modélisation

3-1.2.1. Ajustement des paramètres du modèle d'Augustin

Pour modéliser l'influence du lactate de sodium sur la cinétique de *L. monocytogenes*, deux approches utilisant le modèle d'Augustin ont été comparées. Dans l'approche proposée par Augustin (1999), une concentration minimale inhibitrice spécifique du lactate de sodium est utilisée, elle est associée au $\text{pH}_{\min}^{\circ}(\text{HCl})$. Dans la seconde que nous proposons, deux paramètres sont nécessaires pour tenir compte de l'influence de l'inhibiteur : la $\text{CMI}^{\circ}_{\text{lactate de sodium}}$ et le pH_{\min}° de l'acide associé : le pH_{\min}° de l'acide lactique (pKa égal à 3,86).

Pour sélectionner l'approche qui donne les prédictions les plus satisfaisantes, nous avons réalisé une série de tests de Fisher (Equations 40 et 41, Chapitre matériels et méthodes).

Sur les 27 cinétiques réduites [trois a_w x trois pH x trois concentrations] réalisées en présence de lactate de sodium, 15 sont utilisées pour optimiser le ou les paramètres du modèle d'Augustin (1999), et 12, servent à comparer la qualité des prédictions du modèle, en fonction de l'approche utilisée.

Dans un premier temps, nous avons optimisé la valeur de la $\text{CMI}^{\circ}_{\text{lactate de sodium}}$, puisqu'elle n'est pas disponible dans la littérature, en utilisant le $\text{pH}_{\min}^{\circ}(\text{HCl})$. Dans un deuxième temps, la $\text{CMI}^{\circ}_{\text{lactate de sodium}}$ a été optimisée, en utilisant le $\text{pH}_{\min}^{\circ}(\text{acide lactique})$ proposé par Augustin (1999) ou en optimisant simultanément le $\text{pH}_{\min}^{\circ}(\text{acide lactique})$. Nous avons ensuite testé si l'optimisation du paramètre p améliore les prédictions, en présence de lactate de sodium (Equation 39, Chapitre matériels et méthodes).

Pour ce faire, nous avons calculé la somme des carrés des écarts entre les cinétiques prédites et les cinétiques expérimentales. Ceci représente un nombre de points de comparaison, n' , égal à 48 (12 cinétiques à quatre points). Nous avons fixé α' , le niveau de signification à 0,005.

Lorsque les prédictions obtenues en utilisant le $\text{pH}_{\min}^{\circ}(\text{HCl})$ ou le $\text{pH}_{\min}^{\circ}(\text{acide lactique})$ proposés par Augustin sont comparées, il n'est pas possible de réaliser un test de Fisher, car les deux modèles ont le même nombre de paramètres optimisés (le dénominateur de l'Equation 40 du Chapitre matériels et méthodes est donc nul) ; les sommes des carrés des écarts (SCE) sont donc comparées.

L'utilisation d'un pH_{\min}° spécifique de l'inhibiteur réduit d'un facteur 1,7 la SCE (Tableau 17). Ainsi, l'approche proposée dans cette étude, consistant à modéliser l'influence d'un inhibiteur par l'intermédiaire de deux paramètres (pH_{\min}° et CMI°) ajustés en fonction de

sa nature, améliore les prédictions, en présence de lactate de sodium, comparativement à l'approche proposée par Augustin.

La variable de Fisher calculée pour comparer l'utilisation d'un pH_{\min}° (acide lactique) optimisé ou obtenu dans la littérature, est supérieure à la variable de Fisher lue dans la Table (Annexe 4) : l'optimisation du pH_{\min}° (acide lactique) améliore donc les prédictions du modèle. En revanche, ces dernières ne sont pas améliorées, lorsque le paramètre p est optimisé (Tableau 17).

Après ajustement et réalisation des tests de Fisher, la valeur des paramètres du modèle d'Augustin que nous retenons est de :

- 9,6% soit 860 mM pour la CMI° lactate de sodium,
- 5,33 pour le pH_{\min}° (acide lactique)
- et un pour p .

Tableau 17 : résultats des tests de Fisher pour la modélisation des cinétiques bactériennes en présence de lactate de sodium (niveau de signification 0,005)

Paramètres étudiés	Paramètres des modèles utilisés	SCE	Nombre de paramètre(s) optimisé(s)	$F_{\text{calculée}}$	F_{table}
CMI° et pH_{\min}°	CMI° optimisée, pH_{\min}° (HCl, Augustin), p égal à 1	44,9	1		
	CMI° optimisée, pH_{\min}° (acide lactique, Augustin), p égal à 1	28,4	1		
CMI° et pH_{\min}°	CMI° optimisée, pH_{\min}° (acide lactique, Augustin), p égal à 1	28,4	1	44	4,050
	CMI° optimisée, pH_{\min}° (acide lactique, optimisé), p égal à 1	14,6	2		
CMI° , pH_{\min}° et p	CMI° optimisée, pH_{\min}° (acide lactique, optimisé), p égal à 1	14,6	2	2	4,055
	CMI° optimisée, pH_{\min}° (acide lactique, optimisé), p optimisé	14,0	3		

Les valeurs de pH_{\min}° (HCl, Augustin) et de pH_{\min}° (acide lactique, Augustin) sont présentées dans les Tableaux 11 et 12, Chapitre matériels et méthodes

Lorsque $F_{\text{calculée}}$ est inférieure à F_{table} (Annexe 4), l'optimisation du paramètre du modèle n'améliore pas les prédictions

3-1.2.2. Comparaison des concentrations bactériennes expérimentales et prédites

Les 12 cinétiques réduites qui n'ont pas été utilisées pour ajuster les paramètres du modèle d'Augustin, ont été comparées aux cinétiques prédites : seules deux cinétiques ne sont pas correctement simulées. Dans un cas, la population bactérienne à 120 heures est sous-estimée, mais la population finale est correctement prédite. Dans l'autre cas, la prédiction est également dangereuse, puisque les deux derniers points de dénombrement sont au-dessus de la courbe simulée.

La Figure 33 compile les résultats des quatre représentations graphiques de la Figure 32 et présente les conditions d' a_w /pH pour lesquelles une croissance de *Listeria* est observée, en fonction du pourcentage de lactate de sodium ajouté. Cette représentation graphique permet de visualiser, sur une même figure, les frontières $CC = 1$ prédites pour les trois pourcentages de lactate de sodium testés.

Cette frontière est correctement prédite, lorsque l'aliment modèle contient 1,5% ou 4,5% de lactate de sodium. Par contre, elle n'est pas prédite de façon satisfaisante en présence de 3,0% de lactate de sodium. En effet, deux points posent problème :

- pour un pH proche de 6,2 et une a_w de l'ordre de 0,95, une croissance est observée expérimentalement, mais la frontière prédite en présence de 3,0% de lactate de sodium se trouve au-dessus de ce point,
- pour un pH proche de 5,9 et une a_w environ égale à 0,97, la croissance n'est observée, que lorsque le pourcentage de lactate de sodium est inférieur ou égal à 1,5%, alors que la condition d' a_w /pH se trouve dans le domaine de croissance prédit en présence de 3,0% de cet inhibiteur.

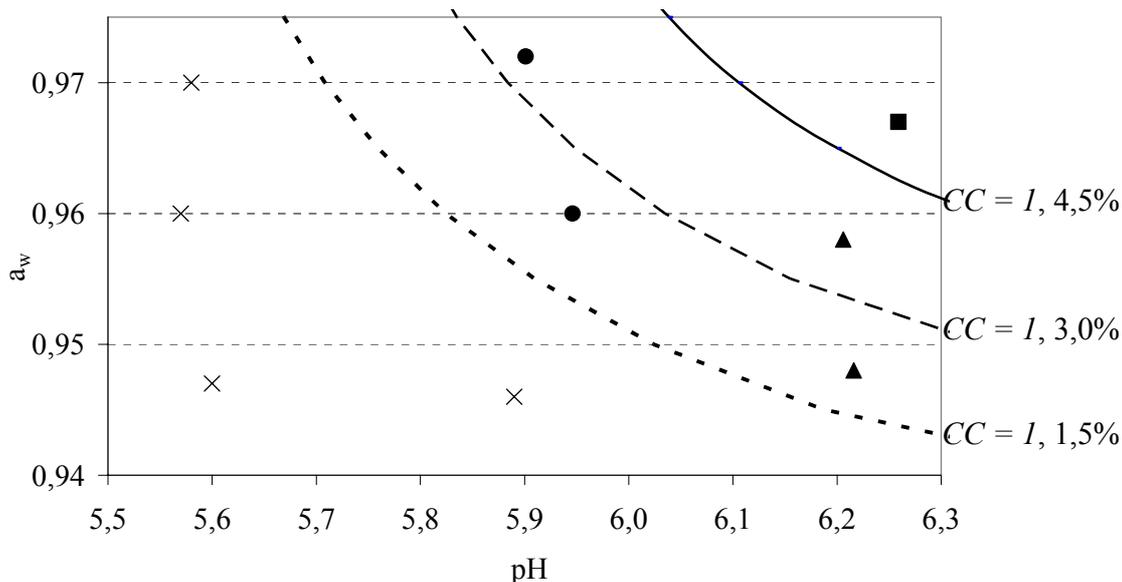


Figure 33 : croissance observée ($CC_{globale} > 1,0$ U Log) par rapport à la frontière $CC = 1$ prédite en fonction du pourcentage de lactate de sodium

- $\leq 4,5\%$ ——— frontière prédite en présence de 4,5%
- ▲ $\leq 3,0\%$ - - - frontière prédite en présence de 3,0%
- $\leq 1,5\%$ - . . . frontière prédite en présence de 1,5%
- × 0%

3-2. Autres inhibiteurs

3-2.1. Résultats expérimentaux

L'influence de l'acétate de sodium, du sorbate de potassium et de la fumée liquide a été étudiée sur le développement de *Listeria*. Les résultats montrent un effet similaire à celui du lactate de sodium pour les trois autres inhibiteurs : lorsqu'ils sont ajoutés à l'aliment modèle, la croissance de *Listeria* est ralentie ou inhibée. Par ailleurs, le domaine d' a_w /pH permettant la croissance est réduit. L'effet inhibiteur de la fumée liquide est uniquement observé, lorsque l' a_w et le pH sont bas, et qu'elle est ajoutée à 0,9%.

Les composés phénoliques sont supposés être à l'origine de l'activité antimicrobienne des fumées (d'après Sofos *et al* (1988), cités par Sunen (1998)). D'autres expériences ont donc été réalisées en présence d'un phénol majoritaire des fumées liquides : le guaiacol (Annexe 2). L'effet inhibiteur du guaiacol a été testé dans une gamme de concentrations de 0,1 à 3000 ppm, soit une concentration 100 fois supérieure à celles mesurées dans les lardons. Aucune inhibition de la croissance de *Listeria* n'a été observée, dans le domaine d' a_w /pH du plan d'expériences B. Ainsi, l'effet inhibiteur de la fumée liquide dans l'aliment modèle n'est pas dû à la présence du guaiacol.

3-2.2. Modélisation

3-2.2.1. Ajustement des paramètres du modèle d'Augustin

Pour ajuster les paramètres du modèle d'Augustin et sélectionner l'approche donnant les meilleures prédictions en présence de fumée liquide, d'acétate de sodium et de sorbate de potassium, nous avons suivi une démarche identique à celle utilisée pour le lactate de sodium.

Tout d'abord, nous avons testé si l'optimisation de la $CMI^{\circ}_{\text{sorbate de potassium}}$ par rapport à celle proposée par Augustin améliorerait les prédictions (Augustin ne propose pas de CMI° pour la fumée liquide ou l'acétate de sodium).

Pour chaque inhibiteur, nous avons comparé l'approche proposée par Augustin (utilisation d'une CMI° spécifique de l'inhibiteur, couplée au $\text{pH}_{\min}^{\circ}(\text{HCl})$) avec l'approche proposée dans cette étude (utilisation d'une CMI° spécifique de l'inhibiteur, couplée au pH_{\min}° de l'acide associé à l'inhibiteur). Nous avons donc optimisé la CMI° de chacun des inhibiteurs, en utilisant :

- le $\text{pH}_{\min}^{\circ}(\text{HCl}, \text{Augustin})$,
- le $\text{pH}_{\min}^{\circ}(\text{acide associé}, \text{Augustin})$ lorsque Augustin (1999) le propose
- et le $\text{pH}_{\min}^{\circ}(\text{acide associé}, \text{optimisé})$.

Les acides associés aux différents inhibiteurs testés sont :

- l'acide sorbique (pKa égal à 4,76) pour le sorbate de potassium
- et l'acide acétique (pKa égal à 4,75) pour l'acétate de sodium et la fumée liquide (Annexe 2).

Pour chaque inhibiteur, nous avons ensuite déterminé si l'optimisation du paramètre p améliore les prédictions des modèles. Pour cette étude, les valeurs de pH_{\min}° et de CMI° sélectionnées avec les précédents tests de Fisher ont été utilisées.

Les valeurs des $F_{\text{calculé}}$ et F_{table} de l'ensemble des tests de Fisher réalisés sont présentées dans le Tableau 18.

Tableau 18 : résultats des tests de Fisher pour la modélisation des cinétiques bactériennes en présence d'inhibiteur (niveau de signification 0,005)

	Paramètre(s) étudié(s)	Paramètre des modèles utilisés	SCE	Nombre de paramètre(s) optimisé(s)	$F_{\text{calculée}}$	F_{table}		
fumée liquide	CMI° et pH_{\min}°	CMI°optimisée, $\text{pH}_{\min}^{\circ}(\text{HCl}, \text{Augustin})$, p égal à 1	19,0	1	6	4,050		
		CMI°optimisée, $\text{pH}_{\min}^{\circ}(\text{acide acétique}, \text{Augustin})$, p égal à 1	9,0	1				
	CMI° et pH_{\min}°	CMI°optimisée, $\text{pH}_{\min}^{\circ}(\text{acide acétique}, \text{Augustin})$, p égal à 1	9,0	1				
		CMI°optimisée, $\text{pH}_{\min}^{\circ}(\text{acide acétique}, \text{optimisé})$, p égal à 1	8,0	2				
CMI°, pH_{\min}° et p	CMI°optimisée, $\text{pH}_{\min}^{\circ}(\text{acide acétique}, \text{optimisé})$, p égal à 1	8,0	2	1	4,055			
	CMI°optimisée, $\text{pH}_{\min}^{\circ}(\text{acide acétique}, \text{optimisé})$, p optimisé	7,9	3					
acétate de sodium	CMI° et pH_{\min}°	CMI°optimisée, $\text{pH}_{\min}^{\circ}(\text{HCl}, \text{Augustin})$, p égal à 1	25,0	1	3	4,050		
		CMI°optimisée, $\text{pH}_{\min}^{\circ}(\text{acide acétique}, \text{Augustin})$, p égal à 1	11,8	1				
	CMI° et pH_{\min}°	CMI°optimisée, $\text{pH}_{\min}^{\circ}(\text{acide acétique}, \text{Augustin})$, p égal à 1	11,8	1				
		CMI°optimisée, $\text{pH}_{\min}^{\circ}(\text{acide acétique}, \text{optimisé})$, p égal à 1	11,0	2				
CMI°, pH_{\min}° et p	CMI°optimisée, $\text{pH}_{\min}^{\circ}(\text{acide acétique}, \text{Augustin})$, p égal à 1	11,8	1	2	4,050			
	CMI°optimisée, $\text{pH}_{\min}^{\circ}(\text{acide acétique}, \text{Augustin})$, p optimisé	11,4	2					
sorbate de potassium	CMI°	CMI°(Augustin), $\text{pH}_{\min}^{\circ}(\text{HCl}, \text{Augustin})$, p égal à 1	32,6	0	30	4,045		
		CMI°optimisée, $\text{pH}_{\min}^{\circ}(\text{HCl}, \text{Augustin})$, p égal à 1	19,6	1				
	CMI° et pH_{\min}°	CMI°optimisée, $\text{pH}_{\min}^{\circ}(\text{HCl}, \text{Augustin})$, p égal à 1	19,6	1			60	4,050
		CMI°optimisée, $\text{pH}_{\min}^{\circ}(\text{acide sorbique}, \text{optimisé})$, p égal à 1	8,5	2				
	CMI°, pH_{\min}° et p	CMI°optimisée, $\text{pH}_{\min}^{\circ}(\text{acide sorbique}, \text{optimisé})$, p égal à 1	8,5	2			0	4,055
		CMI°optimisée, $\text{pH}_{\min}^{\circ}(\text{acide sorbique}, \text{optimisé})$, p optimisé	8,5	3				

Lorsque $F_{\text{calculée}}$ est inférieure à F_{table} (Annexe 4), l'optimisation du paramètre du modèle n'améliore pas les prédictions

En présence des trois inhibiteurs :

- l'approche proposée dans cette étude (CMI° et pH_{min}° spécifique de l'inhibiteur) améliore les prédictions comparativement à l'approche d'Augustin
- et l'optimisation du paramètre p n'améliore pas les prédictions.

L'optimisation du pH_{min}° (acide acétique) n'est pas nécessaire pour la fumée liquide. Pour le sorbate de potassium et l'acétate de sodium, l'optimisation des pH_{min}° des acides associés améliore les prédictions.

La valeur de pH_{min}° (acide acétique) optimisée à partir des expériences, en présence d'acétate de sodium, est égale à 4,91. Pour cet acide, Augustin propose une valeur de pH_{min}° de 4,79. Ces deux valeurs étant très proches, nous avons utilisé, lors des prédictions des cinétiques bactériennes, la valeur moyenne, soit 4,85.

Les valeurs des CMI° , pH_{min}° et p que nous utiliserons pour chacun des inhibiteurs étudiés sont présentées dans le Tableau 19.

Tableau 19 : valeurs de pH_{min}° , CMI° et p utilisées dans le modèle d'Augustin en fonction de la nature de l'inhibiteur

Inhibiteur (acide associé)	CMI° en % (mM)	pH_{min}°	p
Lactate de sodium (acide lactique)	9,6 (860)	5,33	1
Sorbate de potassium (acide sorbique)	1,8 (118)	5,09	1
Acétate de sodium (acide acétique)	2,3 (169)	4,85	1
Fumée liquide Enviro24 (acide acétique)	4,6	4,85	1

3-2.2.2. Comparaison des concentrations bactériennes expérimentales et prédites

Les cinétiques bactériennes sont :

- correctement prédites :
 - o dans 83% des cas, pour le sorbate de potassium et la fumée liquide,
 - o dans 75% des cas, pour l'acétate de sodium (Tableau 20),
- et non correctement prédites, avec une surestimation de la population bactérienne, dans 17% des cas, pour le sorbate de potassium, la fumée liquide et l'acétate de sodium.

Alors que le nombre de cinétiques correctement prédites est équivalent, quelle que soit la nature de l'inhibiteur, il est en revanche influencé par le pourcentage d'inhibiteur ajouté. En effet, les prédictions sont toujours correctes, lorsque l'inhibiteur est ajouté au plus faible pourcentage (1,5% pour le lactate de sodium, 0,3% pour les autres inhibiteurs), et sont parfois non satisfaisantes, lorsque la concentration en sel d'acide ou en fumée liquide est plus élevée.

Tableau 20 : cinétiques réduites correctement prédites et non correctement prédites pour les quatre inhibiteurs étudiés

	Lactate de sodium *	Acétate de sodium	Sorbate de potassium	Fumée liquide
Nombre de courbes correctement prédites	10	9 + <u>31</u>	10	10
Nombre de courbes où la population est sous-estimée	2	1 + <u>5</u>	0	0
Conditions	a_w 0,95/pH 5,9/3,0% ^a a_w 0,96/pH 6,2/3,0% ^{a,b}	a_w 0,96/pH 6,2/0,9% ^a		
Nombre de courbes où la population est surestimée	0	2 + <u>0</u>	2	2
Conditions		a_w 0,95/pH 5,9/0,6% ^{a,b} a_w 0,97/pH 5,9/0,6% ^a	a_w 0,97/pH 5,9/0,6% ^{a,b} a_w 0,96/pH 5,6/0,9% ^b	a_w 0,96/pH 5,6/0,9% ^{a,b} a_w 0,95/pH 5,9/0,9% ^{a,b}

* les résultats en présence de lactate de sodium ont déjà été présentés dans le paragraphe 3-1.2.2

souligné : résultats de 36 cinétiques réduites, complémentaires au plan d'expériences B, réalisées en présence d'acétate de sodium à 0,0054 % ; 0,2 % ; 0,4 % et 0,6 %

a : concentration à t_3 (120 heures) mal estimée

b : concentration à t_4 (168 heures) mal estimée

La frontière $CC = I$ séparant les domaines de croissance et de non croissance a été prédite pour chacun des inhibiteurs et à chacun des pourcentages étudiés (Figure 34).

En présence de sorbate de potassium, elle est correctement estimée, quel que soit le pourcentage d'inhibiteur ajouté (Figure 34 b).

Les conditions d' a_w /pH pour lesquelles une croissance est observée sont identiques, lorsque 0,6 ou 0,9% d'acétate de sodium sont ajoutés. Au contraire, la frontière $CC=I$ prédite par les modèles en présence de 0,9% d'acétate de sodium est au-dessus de la frontière prédite en présence de 0,6% de cet inhibiteur. Lorsque 0,3% d'acétate de sodium sont ajoutés à l'aliment modèle, la frontière $CC = I$ est correctement estimée. Celle-ci n'est pas correctement prédite, lorsque l'acétate de sodium est ajouté à 0,6 % ou 0,9%. En effet, respectivement, un point et trois points sont au-dessous de la frontière prédite, alors que la croissance de *Listeria* a été observée : le domaine permettant la croissance est sous-estimé par le modèle (Figure 34 c).

Les conditions d' a_w /pH, pour lesquelles une croissance est observée, sont identiques en absence de fumée liquide et lorsque 0,3 ou 0,6% de cet inhibiteur sont ajoutés. Au contraire, la frontière $CC = I$ prédite par les modèles est d'autant plus décalée vers les hautes a_w et les pH élevés que le pourcentage de fumée liquide ajouté augmente. Quel que soit le pourcentage de fumée liquide ajouté, la croissance de *Listeria* est observée pour un domaine d' a_w /pH plus étendu que le domaine de croissance prédit (Figure 34 d) : le modèle sous-estime le domaine de croissance de *Listeria*.

Si l'on compare les frontières $CC = 1$ prédites, dans la gamme de pourcentages testés, le sorbate de potassium et le lactate de sodium sont les plus efficaces pour réduire le domaine de croissance de *Listeria*. Ce dernier est plus étendu en présence d'acétate de sodium. La fumée liquide est le produit le moins efficace pour réduire le domaine de croissance de *Listeria*.

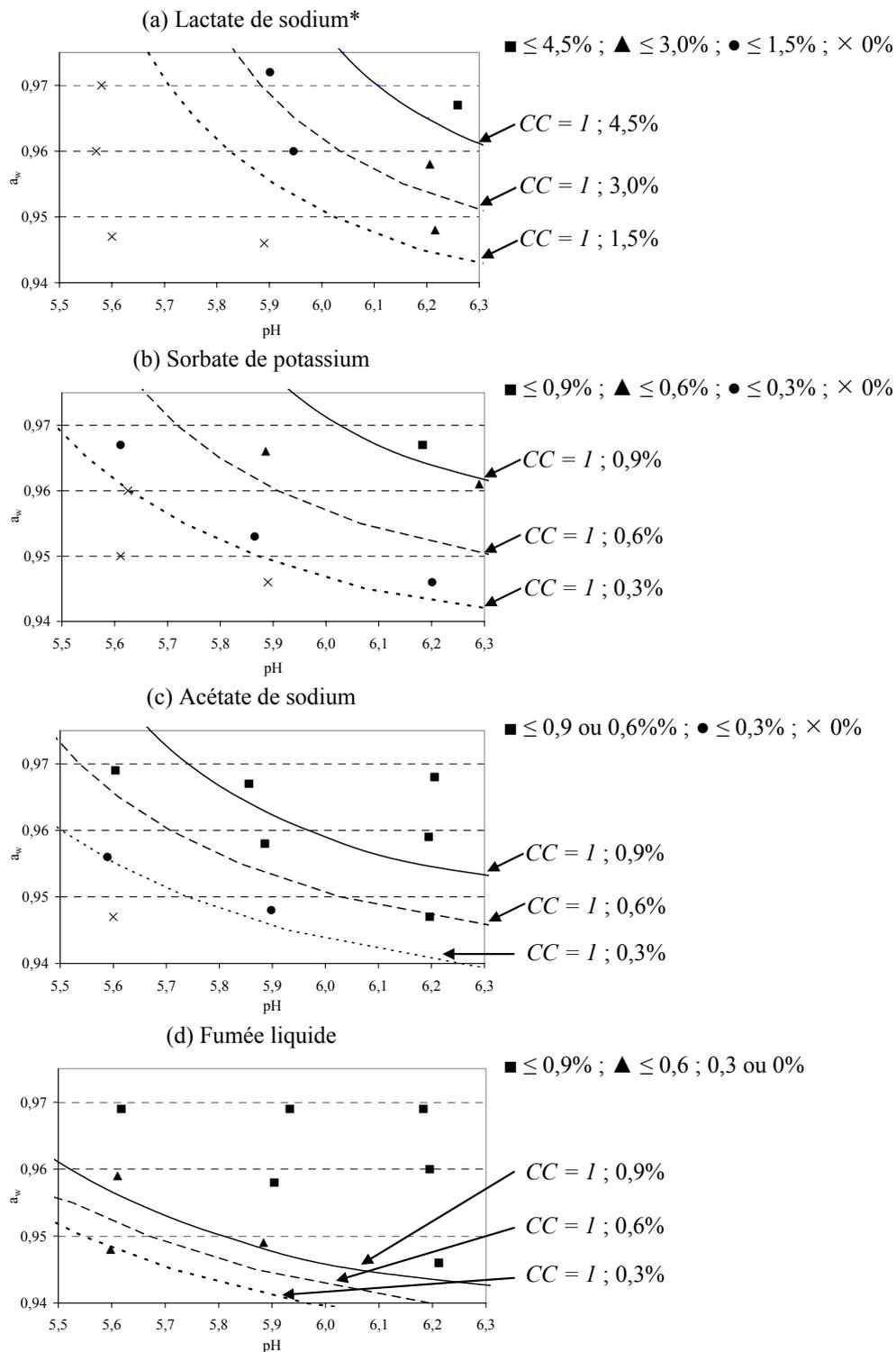


Figure 34 : croissance observée ($CC_{globale} > 1,0$ U Log) par rapport à la frontière $CC = 1$ prédite, en fonction de la nature et du pourcentage d'inhibiteur (*les résultats en présence de lactate de sodium ont déjà été présentés Figure 33)

3-3. Deux inhibiteurs

Dans la formulation de la saumure des lardons, il est fréquent que les sels d'acides organiques soient ajoutés en combinaison. Des cinétiques réduites ont donc été réalisées en présence de deux sels d'acides organiques, pour des conditions d' a_w /pH où ces derniers, ajoutés seuls, permettraient la croissance de *Listeria* (Tableau 21).

L'objectif est de mettre en évidence des interactions entre les deux inhibiteurs en fonction de leur nature, de leur concentration, ainsi que du pH et de l' a_w de l'aliment modèle. Il s'agit également d'étudier si les modèles peuvent correctement prédire l'évolution de la contamination de *Listeria*, lorsque deux inhibiteurs sont ajoutés.

Tableau 21 : conditions pour lesquelles l'ajout de deux inhibiteurs a été testé

		pH																
		6,2						5,9						5,6				
n° d'essai		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14			
0,97		1,5	1,5	1,5	1,5	0,0	0,0	1,5	1,5	1,5	1,5	0,0	0,0	0,0	0,0	Lactate de sodium (%)		
		0,3	0,6	0,0	0,0	0,3	0,6	0,3	0,6	0,0	0,0	0,3	0,6	0,3	0,6	Acétate de sodium (%)		
		0,0	0,0	0,3	0,6	0,3	0,3	0,0	0,0	0,3	0,6	0,3	0,3	0,3	0,3	Sorbate de potassium (%)		
a_w 0,96	n° d'essai	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25				Lactate de sodium (%)		
		1,5	1,5	1,5	1,5	0,0	0,0	1,5	1,5	1,5	0,0	0,0				Acétate de sodium (%)		
		0,3	0,6	0,0	0,0	0,3	0,6	0,3	0,6	0,0	0,3	0,6				Sorbate de potassium (%)		
0,95	n° d'essai	26	27											Lactate de sodium (%)				
		0,0	0,0											Acétate de sodium (%)				
		0,3	0,6											Sorbate de potassium (%)				
		0,3	0,3															

3-3.1. Résultats expérimentaux

L'effet inhibiteur de deux sels d'acides organiques est fortement lié aux valeurs de pH et d' a_w . Pour une a_w de 0,97 et un pH de 6,2, il n'y a pas d'interaction entre les deux inhibiteurs, quelles que soient les combinaisons testées : l'effet des deux inhibiteurs étant équivalent à l'effet du sel d'acide majoritaire. En revanche, lorsque le pH et/ou l' a_w sont plus bas, l'effet inhibiteur des deux sels d'acides peut parfois être supérieur à l'effet du sel d'acide majoritaire. Ceci est observé dans trois conditions sur les 21 testées (soit les 27 conditions moins les six pour lesquelles l' a_w est égale à 0,97 et le pH à 6,2) :

- pH 6,2 / a_w 0,95 / 0,3% de sorbate de potassium + 0,3% d'acétate de sodium,
- pH 5,9 / a_w 0,97 / 1,5% de lactate de sodium + 0,6% d'acétate de sodium
- et pH 5,9 / a_w 0,96 / 1,5% de lactate de sodium + 0,6% d'acétate de sodium.

La Figure 35 illustre ces résultats, quand du lactate de sodium et de l'acétate de sodium sont ajoutés.

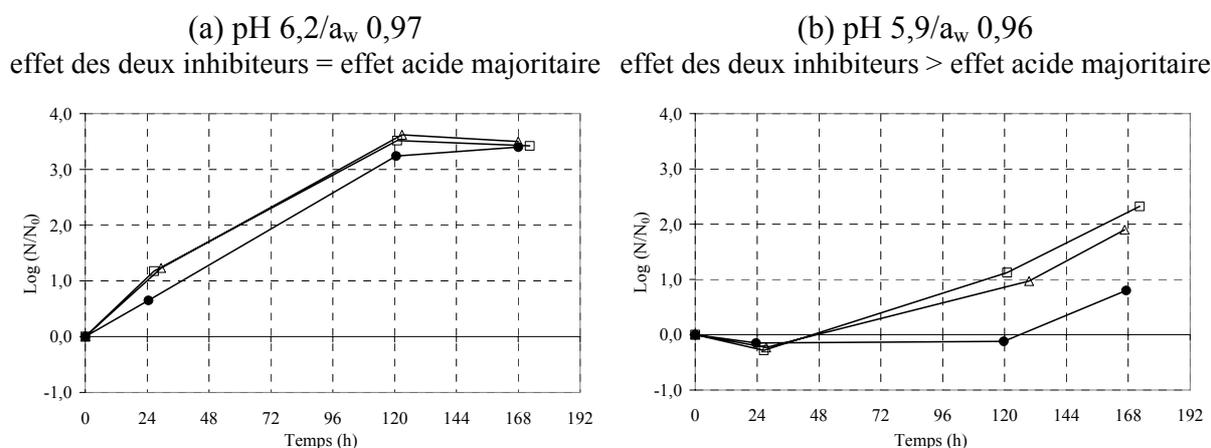


Figure 35 : influence du pourcentage de lactate de sodium et/ou d'acétate de sodium sur l'évolution de la population de *Listeria* dans l'aliment modèle

- 1,5% de lactate de sodium,
- Δ 0,3% d'acétate de sodium,
- 1,5% de lactate de sodium et 0,3% d'acétate de sodium

3-3.2. Modélisation

En présence de deux inhibiteurs, les prédictions sont correctes, lorsque le pH est de 6,2 et l'a_w de 0,97 (Tableau 22). En revanche, lorsque l'a_w et/ou le pH diminue(nt), les prédictions des modèles sont dangereuses, car elles sous-estiment la concentration en *Listeria*, même pour deux des trois conditions environnementales où l'effet des deux sels d'acides est supérieur à l'effet du sel d'acide majoritaire. Les modèles ne sont donc pas adaptés pour prédire l'effet de deux inhibiteurs : les interactions entre facteurs ont un poids trop fort dans le modèle.

Nous proposons donc dans ce travail, une nouvelle approche pour modéliser l'influence de deux sels d'acides organiques. Elle est fondée sur les résultats expérimentaux qui prouvent qu'en présence de deux inhibiteurs, la cinétique bactérienne est souvent équivalente à celle observée en présence du sel d'acide organique ajouté à la plus forte concentration. Nous avons donc modélisé les cinétiques bactériennes, en ne tenant compte que de l'inhibiteur majoritaire (concentration molaire la plus élevée). Les prédictions sont nettement améliorées, puisque 19 cinétiques sur 27 sont correctement prédites, contre 14, en tenant compte des deux sels d'acides. De plus, alors que les prédictions incorrectes sont toutes dangereuses, lorsque les deux inhibiteurs sont pris en compte, elles ne le sont plus, excepté une (Tableau 23). Toutefois, le modèle ne prédit pas correctement la croissance de *Listeria* pour deux des trois conditions où l'effet des deux sels d'acides est supérieur à l'effet du sel d'acide majoritaire.

Tableau 22 : cinétiques réduites correctement et non correctement prédites, lorsque les deux inhibiteurs ajoutés sont pris en compte par le modèle d'Augustin

		pH															
		6,2						5,9						5,6			
n° d'essai		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14		
0,97		1,5	1,5	1,5	1,5	0	0	1,5	1,5	1,5	1,5	0	0	0	0	Lactate de sodium (%)	
		0,3	0,6	0	0	0,3	0,6	0,3	0,6	0	0	0,3	0,6	0,3	0,6	Acétate de sodium (%)	
				0,3	0,6	0,3	0,3	0	0	0,3	0,6	0,3	0,3	0,3	0,3	Sorbate de potassium (%)	
		+	+	+	+	+	+	+	+	sous	sous	+	sous	+	sous	Qualité de la prédiction	
										t ₃ , t ₄	t ₃ , t ₄		t ₃		t ₄	Temps où la population est mal estimée	
a _w 0,96	n° d'essai	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25					
		1,5	1,5	1,5	1,5	0	0	1,5	1,5	1,5	0	0			Lactate de sodium (%)		
		0,3	0,6	0	0	0,3	0,6	0,3	0,6	0	0,3	0,6			Acétate de sodium (%)		
		0	0	0,3	0,6	0,3	0,3	0	0	0,3	0,3	0,3			Sorbate de potassium (%)		
	sous	sous	sous	sous	+	+	+	sous	sous	+	sous			Qualité de la prédiction			
	t ₃	t ₃ , t ₄	t ₃ , t ₄	t ₃ , t ₄			t ₄	t ₃ , t ₄		t ₃ , t ₄				Temps où la population est mal estimée			
0,95	n° d'essai	26	27														
		0	0														
		0,3	0,6														
		0,3	0,3														
	sous	sous															
	t ₃ , t ₄	t ₃ , t ₄															

+ : prédiction correcte (points expérimentaux ± 0,7 U Log inclus dans l'enveloppe à 90 % de la courbe prédite),

sous : sous-estimation de la population bactérienne par les modèles,

t₃ : 120 heures, t₄ : 168 heures,

■ cinétique où l'effet inhibiteur des deux sels d'acides est supérieur à l'effet de l'acide majoritaire

Tableau 23 : cinétiques réduites correctement et non correctement prédites, lorsque seul l'inhibiteur majoritaire (ajouté à la plus forte concentration) est pris en compte par le modèle d'Augustin

		pH															
		6,2						5,9						5,6			
n° d'essai		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14		
0,97		1,5	1,5	1,5	1,5	0	0	1,5	1,5	1,5	1,5	0	0	0	0	Lactate de sodium (%)	
		0,3	0,6	0	0	0,3	0,6	0,3	0,6	0	0	0,3	0,6	0,3	0,6	Acétate de sodium (%)	
				0,3	0,6	0,3	0,3	0	0	0,3	0,6	0,3	0,3	0,3	0,3	Sorbate de potassium (%)	
		+	+	+	+	sur	+	+	sur	+	sur	+	+	sur	+	Qualité de la prédiction	
						t ₂		t ₃ , t ₄		t ₃ , t ₄			t ₃ , t ₄		Temps où la population est mal estimée		
a _w 0,96	n° d'essai	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25					
		1,5	1,5	1,5	1,5	0	0	1,5	1,5	1,5	0	0			Lactate de sodium (%)		
		0,3	0,6	0	0	0,3	0,6	0,3	0,6	0	0,3	0,6			Acétate de sodium (%)		
		0	0	0,3	0,6	0,3	0,3	0	0	0,3	0,3	0,3			Sorbate de potassium (%)		
	+	+	+	sur	+	+	+	+	sous	sur	+			Qualité de la prédiction			
					t ₃			t ₃ , t ₄	t ₃ , t ₄					Temps où la population est mal estimée			
0,95	n° d'essai	26	27														
		0	0														
		0,3	0,6														
		0,3	0,3														
	sur	+															
	t ₃																

+ : prédiction correcte (points expérimentaux ± 0,7 U Log inclus dans l'enveloppe à 90 % de la courbe prédite),

sous : sous-estimation de la population bactérienne par les modèles,

sur : surestimation de la population bactérienne par les modèles,

t₂, 24 heures, t₃ : 120 heures, t₄ : 168 heures,

■ cinétique où l'effet inhibiteur des deux sels d'acides est supérieur à l'effet de l'acide majoritaire

4 - Etude et modélisation du développement de *L. monocytogenes* en fonction du procédé d'étuvage

Pour étudier l'influence du procédé d'étuvage sur le développement de *L. monocytogenes*, le plan d'expériences A a été réalisé (Figure 12, Chapitre matériels et méthodes). Trois procédés d'étuvage ont été testés : quatre heures à 42°C (4h/42°C), une heure à 48°C (1h/48°C) et une heure à 53°C (1h/53°C). Les cinétiques réduites déjà réalisées selon le plan d'expériences A en condition statique de température à 20°C, seront considérées comme un étuvage « témoin » de 24 heures à 20°C (24h/20°C).

4-1. Résultats expérimentaux

4-1.1. Capacité de croissance

4-1.1.1. *CC_{étuvage}*

Au cours des étuvages 4h/42°C, 1h/48°C et 1h/53°C, la population stagne dans 66 conditions sur les 75 testées (Tableau 24). Pour les neuf autres, une partie de la population bactérienne est détruite. C'est le cas pour sept conditions, lors de l'étuvage 1h/53°C, et deux conditions, pour 4h/42°C, alors qu'aucune destruction n'est observée lors de l'étuvage témoin. Au cours des procédés d'étuvage testés, le risque de prolifération de la population de *Listeria* est donc contrôlé, du fait de la température élevée. En revanche, le pH et l' a_w n'influencent pas la capacité de croissance de *Listeria* pendant l'étuvage ($CC_{étuvage}$). Par ailleurs, la croissance de *Listeria* est uniquement observée pendant l'étuvage témoin.

Tableau 24 : capacité de croissance de *Listeria* au cours de l'étape d'étuvage ($CC_{étuvage}$), en fonction du pH, de l' a_w et du procédé d'étuvage ($N_0=10^5$ UFC.g⁻¹)

a_w	pH	Témoin	Procédés d'étuvage		
		24h/20°C	4h/42°C	1h/48°C	1h/53°C
0,97	5,0	0,1	-0,1	-0,1	-0,6
	5,3	0,3	-0,3	-0,5	<u>-1,1</u>
	5,6	0,5	-0,4	-0,8	-0,9
	5,9	1,8	-0,6	-0,5	<u>-1,3</u>
	6,2	2,6	0,0	-0,7	<u>-1,3</u>
0,96	5,0	-0,1	-0,2	-0,4	-0,3
	5,3	-0,1	-0,4	-0,4	-0,5
	5,6	0,9	-0,2	-0,7	-0,8
	5,9	0,9	-0,2	-0,3	<u>-1,1</u>
	6,2	1,7	-0,1	-0,6	-0,9
0,95	5,0	0,0	-0,1	-0,3	0,1
	5,3	-0,2	-0,5	-0,1	-0,5
	5,6	0,1	-0,9	-0,7	-1,0
	5,9	0,5	-0,8	-0,7	<u>-1,2</u>
	6,2	0,1	<u>-1,1</u>	-0,4	<u>-1,7</u>
0,94	5,0	-0,4	-0,2	-0,2	-0,1
	5,3	-0,2	-0,8	-0,1	-0,5
	5,6	-0,1	-0,3	-0,5	-0,7
	5,9	-0,2	-0,8	-0,5	-0,7
	6,2	-0,3	<u>-1,9</u>	-0,7	-0,3
0,93	5,0	-0,2	-0,3	-0,2	-0,2
	5,3	-0,1	-0,5	-0,3	-0,4
	5,6	-0,1	-0,6	-0,3	-0,2
	5,9	-0,6	-0,9	-0,1	-0,6
	6,2	-0,3	-0,7	-0,3	<u>-1,7</u>

caractère gras : $CC_{étuvage} > 1,0$ U Log

caractère souligné : $CC_{étuvage} < -1,0$ U Log

autre caractère : $-1,0$ U Log $\leq CC_{étuvage} \leq 1,0$ U Log

4-1.1.2. $CC_{stockage}$

A la suite du procédé d'étuvage, l'aliment modèle est stocké, durant six jours, à 20°C. Comme pour le témoin, cette étape est majoritairement favorable à la croissance bactérienne pour les trois procédés d'étuvage testés, puisque 55 conditions sur 75 la permettent (Tableau 25). Pour les 20 autres conditions, la population bactérienne stagne, principalement, lorsque l' a_w est égale à 0,93 (dix conditions) et 0,94 (six conditions) ou lorsque le pH est acide (dix conditions à pH 5,0, et six, à pH 5,3).

Comme pour le procédé témoin, aucune destruction de la population bactérienne n'est observée pendant cette étape.

Tableau 25 : capacité de croissance de *Listeria* au cours de stockage ($CC_{stockage}$), en fonction du pH, de l' a_w et du procédé d'étuvage

a_w	pH	Procédés d'étuvage			
		Témoin 24h/20°C	4h/42°C	1h/48°C	1h/53°C
0,97	5,0	2,4	3,1	3,2	3,4
	5,3	3,0	3,3	4,0	4,1
	5,6	2,7	3,5	4,1	4,0
	5,9	1,5	3,7	3,8	4,4
	6,2	0,8	3,2	4,1	4,4
0,96	5,0	1,4	2,0	0,8	1,5
	5,3	2,3	3,2	3,0	3,7
	5,6	1,9	3,0	3,6	4,0
	5,9	2,0	2,8	3,3	4,0
	6,2	1,3	2,6	3,6	4,0
0,95	5,0	0,1	0,5	0,7	0,9
	5,3	1,7	3,2	3,0	3,2
	5,6	2,6	3,7	3,5	3,5
	5,9	2,4	3,7	3,6	3,7
	6,2	2,7	4,0	3,4	4,1
0,94	5,0	0,2	0,0	-0,1	-0,3
	5,3	-0,2	1,0	-0,1	0,4
	5,6	1,0	2,0	2,1	2,6
	5,9	2,3	3,1	3,2	3,6
	6,2	2,7	4,4	3,5	3,2
0,93	5,0	-0,1	-0,3	-0,3	-0,1
	5,3	-0,3	-0,1	-0,1	0,1
	5,6	-0,5	0,1	0,0	-0,3
	5,9	0,0	1,6	0,1	1,1
	6,2	0,7	1,9	2,3	3,9

caractère gras : $CC_{stockage} > 1,0$ U Log

autre caractère : $-1,0$ U Log $\leq CC_{stockage} \leq 1,0$ U Log

4-1.1.3. $CC_{globale}$

Pour les trois procédés d'étuvage étudiés, dans 53 conditions, le nombre de bactéries croît. Les 22 autres correspondent principalement à des a_w basses (12 conditions pour l' a_w 0,93 ; six pour l' a_w 0,94) ou des pH acides (dix conditions pour le pH 5,0 ; six pour le pH 5,3), attestant de l'influence de ces facteurs sur la capacité de croissance globale de la bactérie (Tableau 26). A la différence de l'étuvage témoin, la croissance de *Listeria* est observée pour les trois procédés à a_w 0,93/pH 6,2 et a_w 0,94/pH 5,6.

Tableau 26 : capacité de croissance de *Listeria* au cours du procédé global ($CC_{globale}$), en fonction du pH, de l' a_w et du procédé d'étuvage ($N_0=10^5$ UFC.g⁻¹)

a_w	pH	Procédés d'étuvage			
		Témoin 24h/20°C	4h/42°C	1h/48°C	1h/53°C
0,97	5,0	2,5	3,0	3,1	2,7
	5,3	3,3	3,0	3,5	3,0
	5,6	3,2	3,1	3,3	3,1
	5,9	3,3	3,1	3,4	3,1
	6,2	3,4	3,1	3,5	3,0
0,96	5,0	1,3	1,8	0,3	1,2
	5,3	2,2	2,8	2,5	3,2
	5,6	2,8	2,8	2,9	3,2
	5,9	2,9	2,6	2,9	2,9
	6,2	2,9	2,5	3,0	3,1
0,95	5,0	0,1	0,3	0,4	-0,9
	5,3	1,5	2,7	2,8	2,7
	5,6	2,7	2,8	2,8	2,5
	5,9	3,0	2,9	2,9	2,4
	6,2	2,8	3,0	3,0	2,4
0,94	5,0	-0,2	-0,2	-0,3	-0,4
	5,3	-0,4	0,2	-0,2	-0,1
	5,6	0,9	1,8	1,7	1,9
	5,9	2,2	2,4	2,8	2,9
	6,2	2,4	2,4	2,8	2,9
0,93	5,0	-0,3	-0,5	-0,5	-0,2
	5,3	-0,3	-0,7	-0,4	-0,4
	5,6	-0,6	-0,6	-0,3	-0,5
	5,9	-0,6	0,7	0,0	0,5
	6,2	0,4	1,2	2,0	2,2

caractère gras : $CC_{globale} > 1,0$ U Log

autre caractère : $-1,0$ U Log $\leq CC_{globale} \leq 1,0$ U Log

La Figure 36 illustre que la $CC_{\text{étuvage}}$ moyenne est positive pour le témoin, alors qu'elle est toujours négative pour les trois procédés testés, attestant que la croissance de *Listeria* est inhibée durant l'étuvage. La CC_{stockage} moyenne, après un procédé d'étuvage, est toujours supérieure à celle du témoin : les procédés d'étuvage favorisent donc le développement de *Listeria* pendant l'étape de stockage.

En revanche, la moyenne des CC_{globale} pour les trois procédés d'étuvage (entre 1,8 et 1,9 U Log) est équivalente à la moyenne des CC_{globale} du procédé témoin (1,6 U Log).

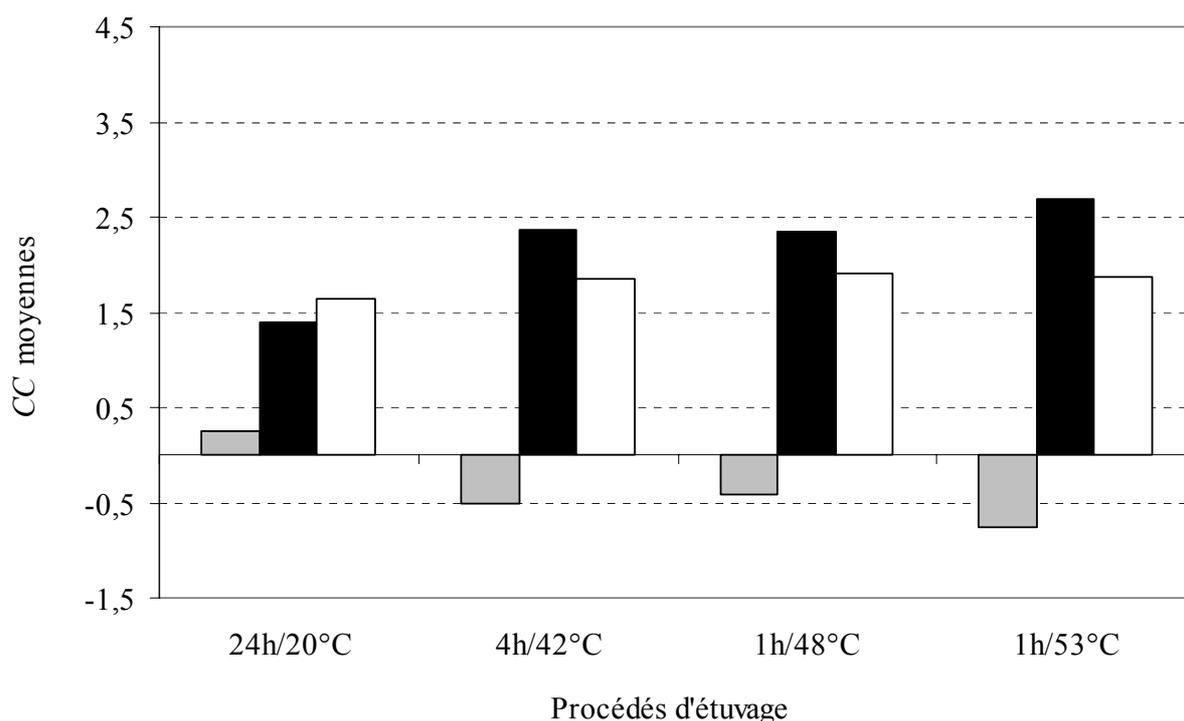


Figure 36 : CC moyennes ($n = 25$) en fonction du procédé d'étuvage et de l'étape étudiée

■ $CC_{\text{étuvage}}$; ■ CC_{stockage} ; □ CC_{globale}

4-1.2. Mesures de la température

Excepté pour le procédé témoin, la température de l'aliment modèle évolue au cours du procédé. Lors de l'étuvage 4h/42°C, la température augmente et atteint la température de consigne, à cœur de la plaque d'aliment modèle, après 77 minutes de traitement. Pour les étuvages 1h/48°C et 1h/53°C, la température de consigne n'est pas atteinte ; cependant, la température à cœur est supérieure à la température maximale de croissance de *Listeria* (45,5°C), respectivement, à partir de 48,5 minutes et 30 minutes de traitement. La température reste supérieure à 45,5°C durant 13,5 minutes, pour les expériences avec un étuvage 1h/48°C, et 38 minutes, pour les expériences avec un étuvage 1h/53°C. Selon le procédé d'étuvage,

entre 90 et 105 minutes de stockage sont nécessaires, pour que la température à cœur de l'aliment modèle devienne égale à 20°C (Figure 37).

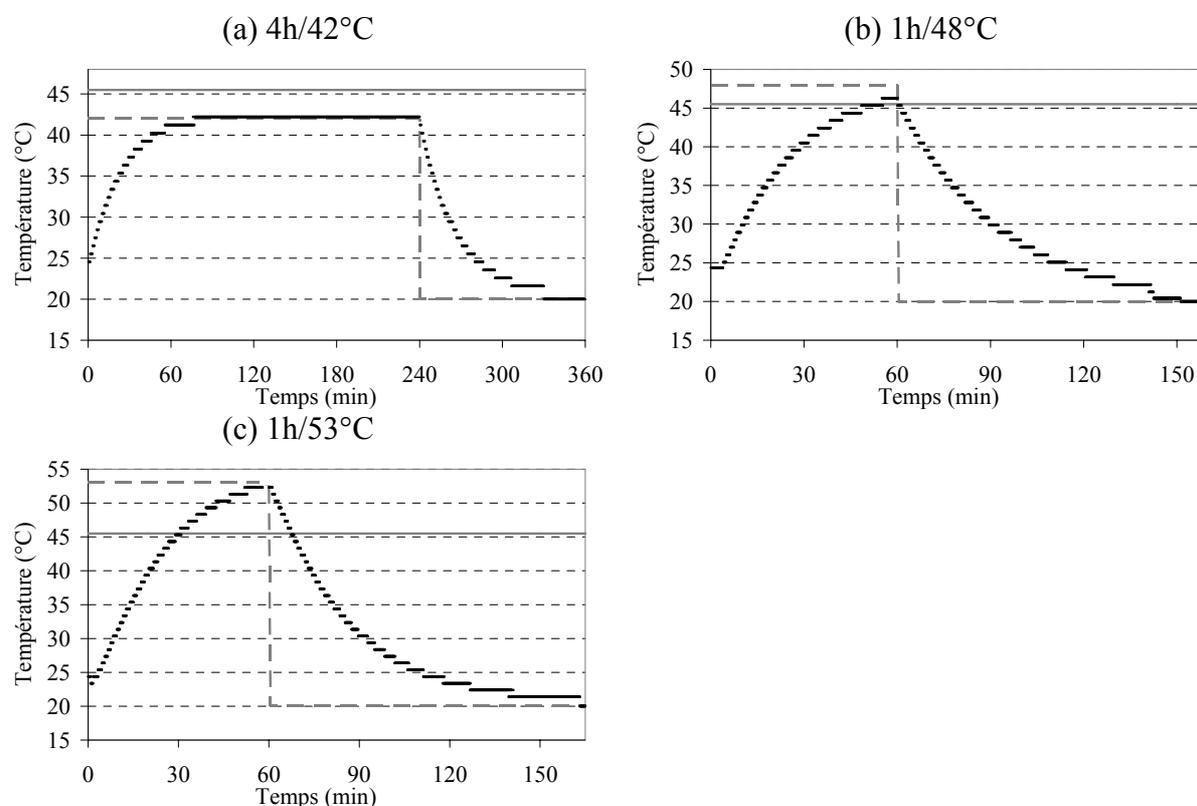


Figure 37 : évolution de la température mesurée à cœur de l'aliment modèle lors du procédé global (stockage à 20°C), en fonction du procédé d'étuvage

— température mesurée,

--- température de consigne : lors de l'étuvage pour (a) 42°C, pour (b) 48°C, pour (c) 53°C, puis 20°C lors du stockage pour (a), (b) et (c),

— température maximale de croissance de *Listeria* (45,5°C)

4-2. Modélisation

4-2.1. Ajustement des paramètres des modèles

4-2.1.1. Modèle de transfert de chaleur

Un modèle de transfert thermique, basé sur la loi de Fourier, a été utilisé pour prédire l'évolution de la température en chaque point de la plaque de l'aliment modèle. Afin de tenir compte de la structure et de la composition, la valeur de la diffusivité thermique (D_t) a été optimisée, avec un critère des moindres carrés appliqué aux températures mesurées et prédites. Les cinétiques de température enregistrées au cœur de la plaque d'aliment modèle,

lors de l'étuvage (pour les trois procédés testés), puis lors du stockage à 20°C, ont été utilisées. La valeur de D_t optimisée est égale à $9.10^{-9} \text{ m}^2.\text{s}^{-1}$ (Figure 38).

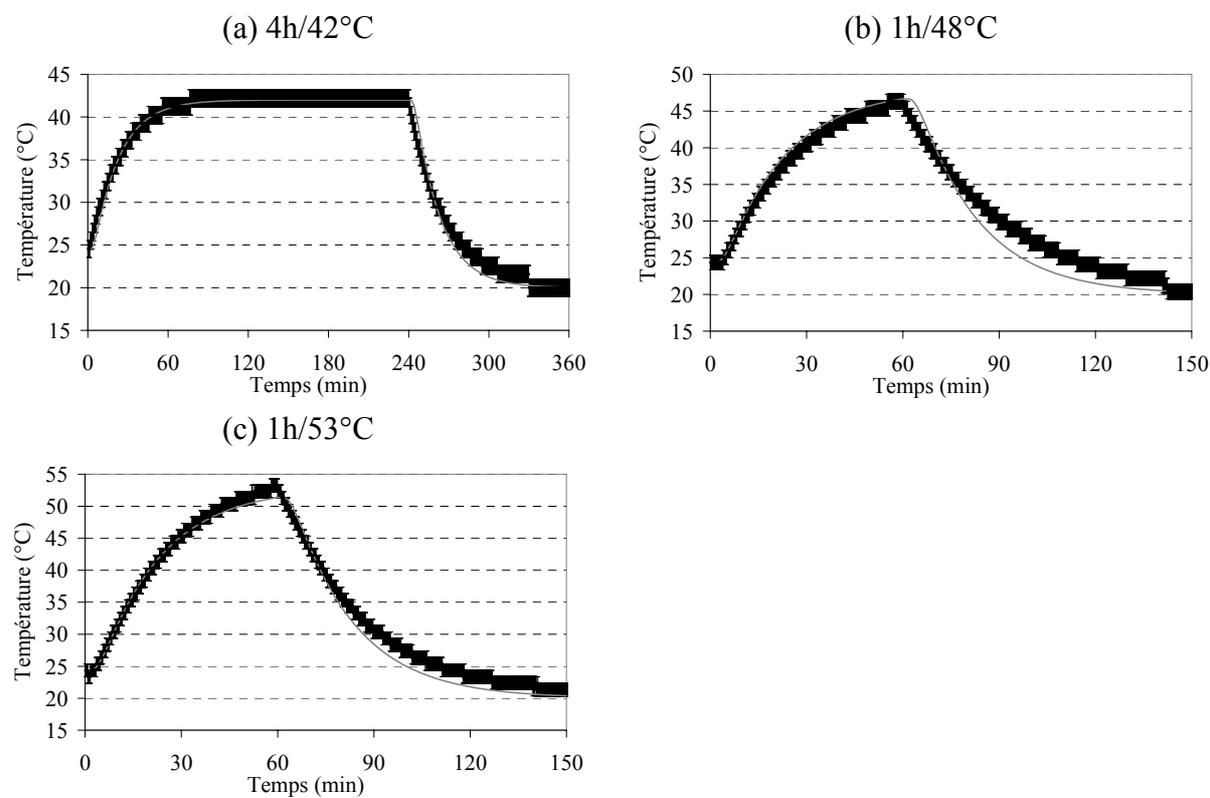


Figure 38 : optimisation de la diffusivité thermique (D_t optimisée égale à $9.10^{-9} \text{ m}^2.\text{s}^{-1}$). Cinétiques de température, à cœur de l'aliment modèle, expérimentales et prédites par le modèle de transfert thermique, lors du procédé d'étuvage et du stockage à 20°C

— cinétique de température prédite,
 I résultats expérimentaux $\pm 1^\circ\text{C}$

Les mesures de température au cœur de la plaque d'aliment modèle étuvé, puis stocké à 4°C, ont été utilisées pour valider le modèle de transfert thermique. Les résultats obtenus pour les trois étuvages sont présentés sur la Figure 39. Lors de l'étape d'étuvage, les données prédites diffèrent des mesures expérimentales d'environ $\pm 1^\circ\text{C}$ (précision de l'enregistreur de température, paragraphe 3-4, Chapitre matériels et méthodes). Lors du stockage, dans un premier temps, la température au cœur de la plaque de viande est surestimée par le modèle de transfert, puis elle est sous-estimée, lorsque la température mesurée devient inférieure à 25°C. L'écart moyen entre les valeurs de température prédites et mesurées au cours du stockage est de 2°C, pour les expériences avec un étuvage 1h/53°C ou 1h/48°C, et de 3°C, pour le expériences avec le procédé 4h/42°C.

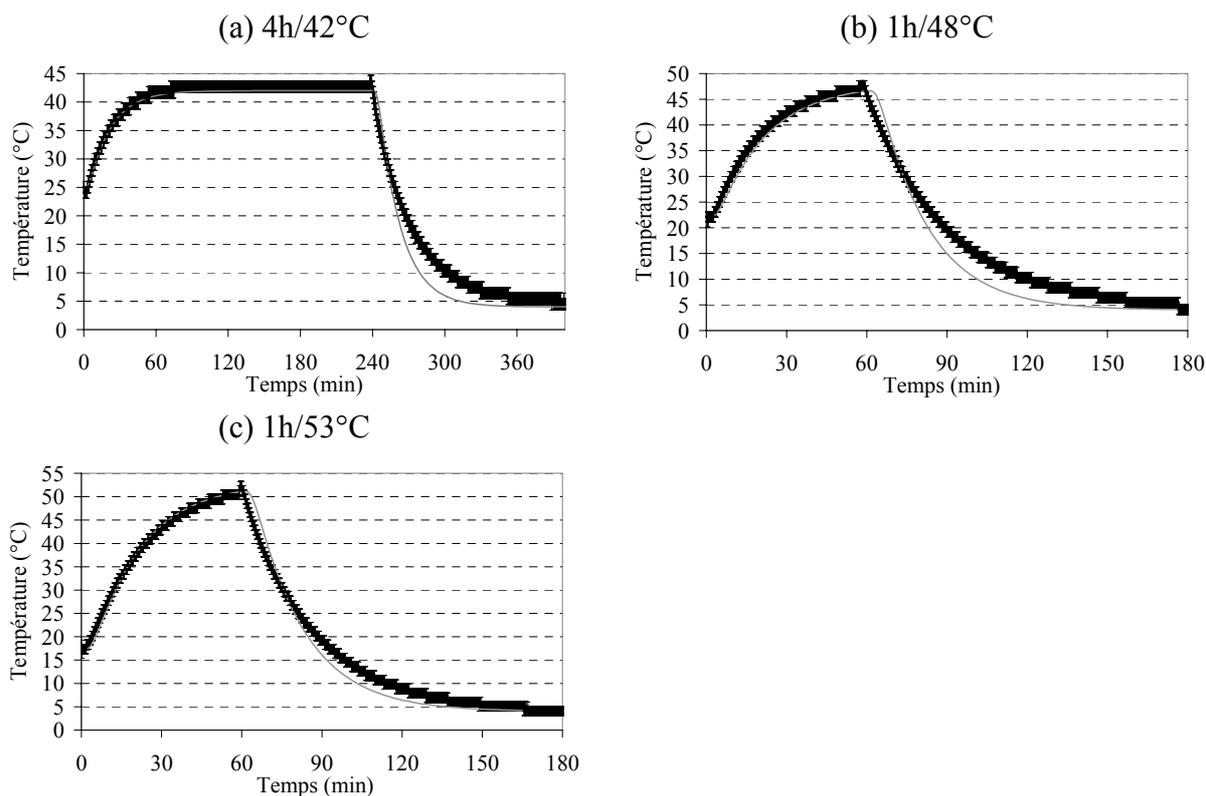


Figure 39 : cinétiques de température à cœur de l'aliment modèle expérimentales et prédites par le modèle de transfert thermique, lors du procédé d'étuvage et du stockage à 4°C

— cinétique de température prédite,
 I résultats expérimentaux $\pm 1^\circ\text{C}$

4-2.1.2. Modèles de microbiologie prévisionnelle

Avant d'être utilisés, les paramètres des modèles secondaires de microbiologie prévisionnelle doivent être optimisés, afin de tenir compte de l'influence de la nature de l'aliment modèle et de l'espèce bactérienne utilisée. Pour les modèles de croissance, nous avons obtenu une valeur K égale à 1,94, et une valeur de taux optimal de croissance, de $1,90 \text{ h}^{-1}$ (paragraphe 2-2-1). Pour les modèles de destruction, les paramètres D_{60} (temps de réduction décimale à 60°C) et z' (élévation de température qui permet de réduire D_θ d'un facteur dix) doivent être optimisés. Pour cela, les populations bactériennes en fin d'étuvage 1h/48°C et 1h/53°C (douze cinétiques complètes avec un stockage à 20°C) doivent être comparées aux concentrations bactériennes prédites. Pour prédire les concentrations bactériennes en fin d'étuvage, il faut modéliser l'évolution de la population bactérienne, tout au long de cette étape.

Il faut donc utiliser :

- le modèle de croissance en début d'étuvage, lorsque la température est inférieure à la température maximale de croissance
- et le modèle de destruction, dès que la température est supérieure à la température maximale de croissance (45,5°C).

Les concentrations expérimentales reflètent la concentration globale à l'issue de l'étape d'étuvage. Pour modéliser l'évolution globale de la population, il faut tenir compte de l'évolution spatiale de la température ; en effet, les bactéries ne sont pas soumises au même traitement thermique, selon leur localisation dans la plaque. Or, la température n'a été mesurée qu'au cœur de la plaque d'aliment modèle. L'évolution de la température, en tout point de l'aliment modèle, doit donc être prédite, préalablement à l'optimisation des paramètres du modèle secondaire de destruction. Nous avons choisi pour des raisons déjà évoquées (simplicité de l'outil de modélisation) de modéliser la cinétique de température en une succession de paliers, dont le pas de température est à définir. Il faut donc :

- premièrement, déterminer le pas de température qui s'appliquera à la section la plus proche de la surface, et en déduire, les durées de paliers communes à toutes les sections (paragraphe 7-4-1, Chapitre matériels et méthodes),
- deuxièmement, déterminer le nombre de sections à prendre en compte dans la demi épaisseur de la plaque d'aliment modèle (prise en compte de l'évolution spatiale)
- et troisièmement, optimiser les valeurs de D_{60} et z' .

4-2.1.2.1. Pas de température

La valeur du pas de température est optimisée en fonction :

- de l'outil de calcul utilisé
- et de la précision que l'on souhaite atteindre pour les concentrations bactériennes prédites.

En effet, la valeur du pas de température modifie l'évolution de concentration bactérienne prédite, du fait de la discrétisation (Baucour (2000) l'a mis en évidence, lors de la modélisation combinée de l'évolution de l' a_w et des cinétiques bactériennes). Le pas de température, séparant chaque palier, doit être choisi, de façon à limiter le temps de calcul (grand pas) et à représenter l'évolution réelle (petit pas).

Nous avons prédit l'évolution de concentration bactérienne pour quatre pas de température : 0,05 – 0,1 – 0,5 et 1°C.

Cependant, comme les paramètres du modèle secondaire de destruction n'ont pas encore été optimisés, nous avons :

- collecté des valeurs de D_0 de la littérature (ICMSF, 1996), uniquement pour des expériences réalisées dans des matrices alimentaires carnés et relatives à *L. monocytogenes*
- et déterminé, à partir de cette base de données, les valeurs de D_{60} et z' utilisées dans le modèle secondaire (calcul de l'équation de la droite de régression $\text{Log}(D_0) = f(\theta)$).

D_{60} a été fixé à 3,8 minutes et z' à 7,7°C.

Les simulations étant effectuées sous Excel, nous sommes limités par la taille des fichiers. Le pas 0,05°C étant le plus petit pas que l'on puisse étudier, il représente le pas témoin. Nous considérons que les concentrations bactériennes prédites sont équivalentes d'une simulation à l'autre, lorsqu'une différence inférieure à 0,05 U Log est observée. Cette valeur seuil a été choisie, car elle est plus de dix fois plus faible que l'erreur expérimentale (0,7 U log) ; nous pouvons donc la considérer comme négligeable. Nous avons choisi d'utiliser le plus grand pas de température qui conduit à une prédiction de la cinétique bactérienne au cœur de la plaque d'aliment modèle équivalente à celle obtenue avec le pas témoin pour l'expérience 1h/53°C, pH 6,2, a_w 0,97 et une température de stockage égale à 20°C.

Le pas 0,5°C a été sélectionné (Figure 40) et nous avons supposé qu'il était applicable aux autres procédés étudiés, puisqu'il a été déterminé pour la plus haute température d'étuvage.

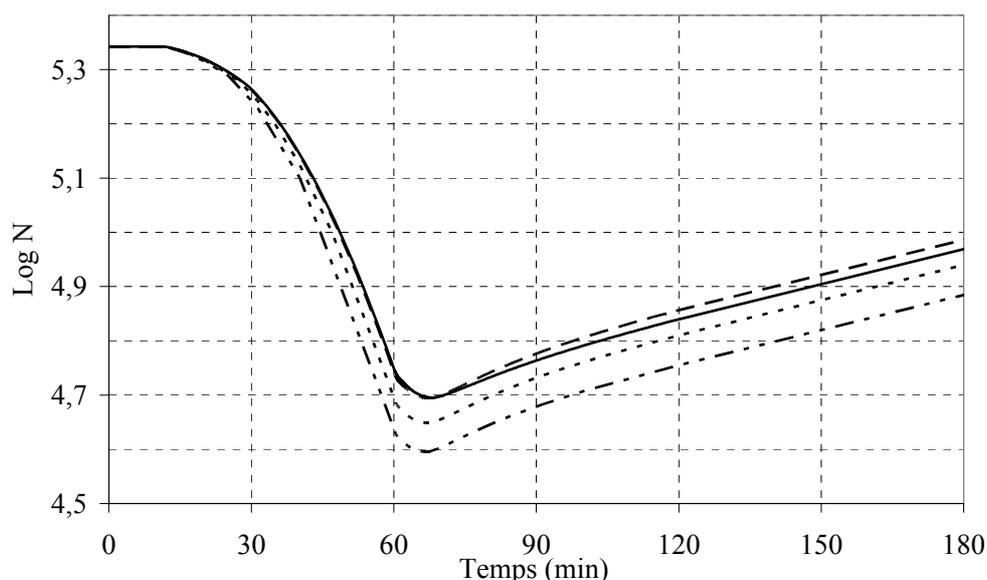


Figure 40 : cinétiques bactériennes prédites en fonction du pas de température du modèle de transfert de chaleur (bactéries au cœur de la plaque, a_w 0,97 – pH 6,2 – étuvage 1h/53°C – stockage à 20°C)
 pas de température : ——— 0,05°C, - - - - 0,1°C, 0,5°C, - . - . - 1°C

4-2.1.2.2. Nombre de sections dans la demi épaisseur

Pour tenir compte de la différence de température à laquelle les bactéries sont soumises, selon leur localisation dans la demi épaisseur (soit 5 mm) de la plaque d'aliment modèle, celle-ci doit être divisée en n sections égales. Ce nombre est à définir. La population bactérienne globale pour l'aliment modèle correspond à la moyenne des concentrations prédites pour les n sections.

Plus le nombre de section(s) est grand, plus la cinétique bactérienne globale est décrite avec précision, mais plus le temps de calcul est long. Nous avons comparé les cinétiques bactériennes globales, quand une, deux, quatre, huit ou seize section(s) sont prises en compte (Figure 41).

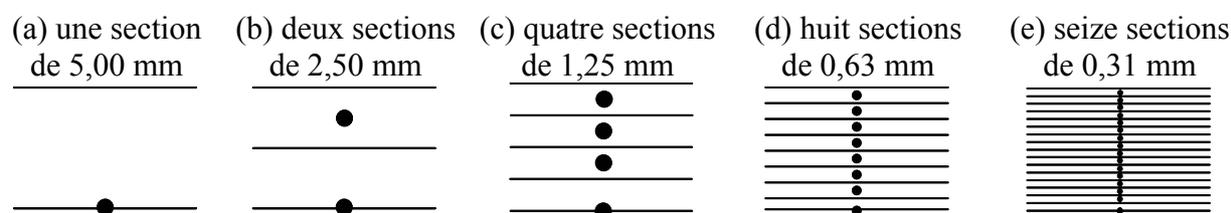


Figure 41 : influence, sur l'épaisseur des sections, du nombre de sections pris en compte dans la demi épaisseur de la plaque d'aliment modèle

● point dans chaque section pour lequel la température a été prédite

Les cinétiques bactériennes ont été prédites, pour l'expérience avec un étuvage de 1h/48°C, un pH de 6,2, une a_w égale à 0,97, une température de stockage de 20°C et un pas de température de 0,5°C. Les valeurs de D_{60} et z' déterminées à partir des données de la littérature ont été utilisées.

La cinétique bactérienne prédite, en considérant seize sections, représente le témoin. La population bactérienne prédite est différente, de plus de 0,05 U Log, comparée à la concentration prédite avec le témoin, uniquement, lorsque le nombre de section est égal à un. Nous diviserons donc la demi épaisseur de l'aliment modèle en deux (Figure 42).

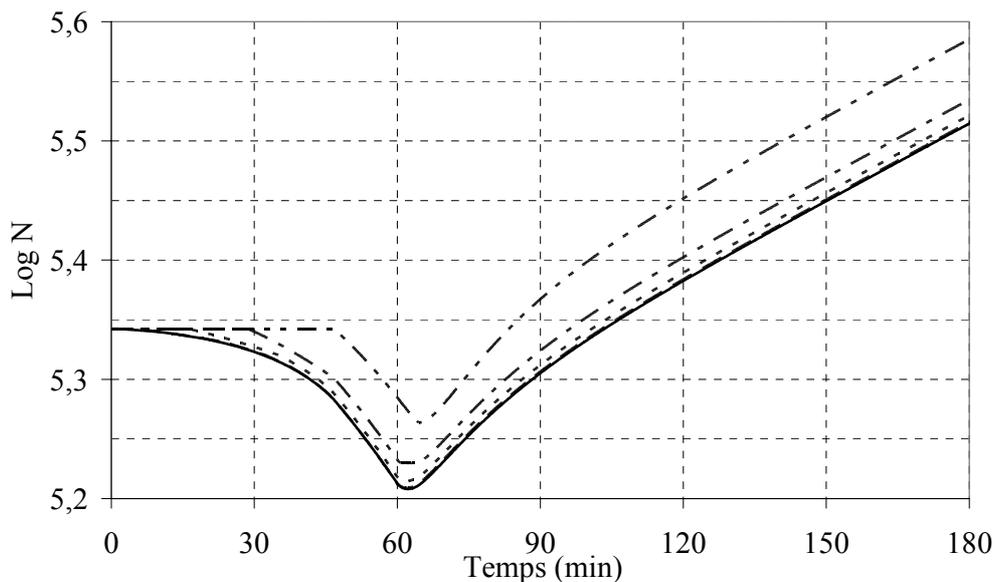


Figure 42 : cinétique bactérienne prédite en fonction du nombre de section(s) dans la demi épaisseur de la plaque d'aliment modèle (pas de température 0,5°C, a_w 0,97 - pH 6,2 - étuvage 1h/48°C – stockage à 20°C)

nombre de section(s) : ——— 16, - - - - 8, - - - - 4, - - - - 2, - - - - 1

4-2.1.2.3. Optimisation des paramètres du modèle secondaire de destruction

Connaissant le pas de température (0,5°C) et le nombre de sections à prendre en compte dans la demi épaisseur (deux), nous avons optimisé les valeurs de D_{60} et z' . Pour cela, les populations bactériennes, en fin d'étuvage 1h/48°C et 1h/53°C (cinétiques complètes avec un stockage à 20°C), ont été comparées aux concentrations bactériennes prédites. Nous avons obtenu une valeur de D_{60} égale à deux minutes et un z' égal à 7,4°C.

4-2.2. Stratégie de modélisation en condition dynamique de température

Pour modéliser l'évolution de la population bactérienne au cours de l'étuvage, puis du stockage, de nombreuses informations sont nécessaires. Il faut disposer de renseignements sur l'aliment modèle (épaisseur, propriétés physico-chimiques, diffusivité thermique...). Il faut également caractériser les microorganismes susceptibles de se développer dans l'aliment modèle (paramètres cardinaux, paramètres caractérisant les cinétiques bactériennes). Enfin, il faut connaître le procédé appliqué à l'aliment modèle (évolution de la température).

Une modélisation combinée de l'évolution de la température et de la cinétique bactérienne est testée. Elle consiste à décomposer la situation globale complexe en plusieurs systèmes plus simples.

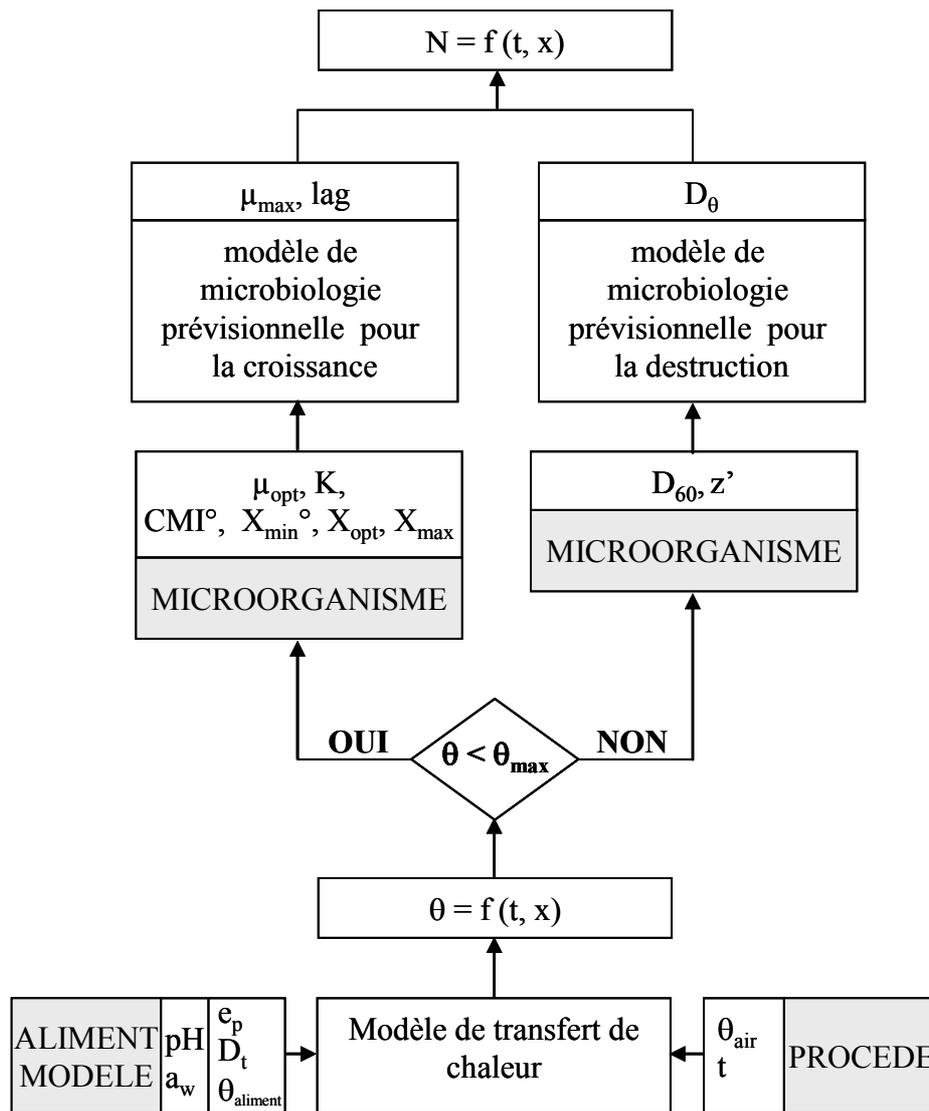


Figure 43 : stratégie de modélisation intégrée de l'évolution de la température et de la population bactérienne

Avec D_t , la diffusivité thermique de l'aliment modèle,

θ_{aliment} , la température initiale de l'aliment modèle,

e_p , l'épaisseur de l'aliment modèle,

x , l'axe selon lequel s'effectue le transfert de chaleur dans la plaque d'aliment modèle,

θ_{air} , la température de l'air,

X_{min}° , X_{opt} , et X_{max} , les valeurs cardinales pour la température, le pH et l' a_w ,

θ_{max} , la température maximale de croissance,

CMI° , les concentrations minimales inhibitrices absolues,

μ_{opt} , le taux optimal de croissance, K , le paramètre reliant le taux maximal de croissance (μ_{max}) et le temps de latence (lag),

D_{60} , le temps de réduction décimale à 60°C,

D_θ , le temps de réduction décimale à la température θ ,

z' , l'élévation de température qui permet de diviser par dix la valeur du temps de réduction décimale,

N , la population bactérienne,

t , le temps

Nous proposons de résoudre ces systèmes par une méthode numérique. Cependant, pour simplifier la résolution, nous considérons que la cinétique d'évolution continue de la température est représentée par une succession de paliers. Sur la durée d'un palier, la température est considérée comme constante. Ainsi, pour prédire l'évolution de la concentration bactérienne en fonction du temps :

1. la courbe d'évolution de la température prédite pour la section dont le centre est à 1,25 mm de la surface est transformée en une succession de paliers de température avec un pas égal à 0,5°C ;
2. la courbe d'évolution de température prédite pour la seconde section, proche du centre de la plaque, est transformée en une succession de paliers, dont le pas de temps est identique à celui de la section proche de la surface ;
3. les températures prédites sont introduites dans les modèles secondaires de microbiologie prévisionnelle. Au début de chaque palier de temps et pour chaque section, un test est réalisé pour déterminer si la température prédite est inférieure à la température maximale de croissance de *Listeria* :
 - si la réponse au test est positive, le modèle de croissance est utilisé
 - et si la réponse au test est négative, le modèle de destruction est utilisé.

Les paramètres des modèles secondaires sont ensuite calculés;

4. les modèles primaires sont utilisés, en prenant comme population initiale, la population finale du pas de temps précédent ;
5. les étapes 3 et 4 sont répétées jusqu'à la fin du procédé ;
6. la moyenne des concentrations bactériennes des deux sections est calculée à chaque début de paliers, afin de déterminer la courbe d'évolution de la population bactérienne globale (Figure 43).

4-2.3. Comparaison des concentrations bactériennes expérimentales et prédites au cours du procédé global

Au cours de l'étuvage, une destruction bactérienne est majoritairement observée pour les trois procédés testés. Puis, lors du stockage, en fonction des conditions de pH et d' a_w , la population bactérienne stagne ou croît.

Quarante-huit cinétiques sur les 75 réalisées sont correctement prédites par le modèle combiné. En fonction du procédé d'étuvage appliqué, leur nombre varie (Tableau 27).

Tableau 27 : cinétiques correctement prédites et cinétiques non correctement prédites, en fonction du procédé d'étuvage appliqué lors des expériences (d'après le critère établi dans le Tableau 13, Chapitre matériels et méthodes)

	Procédé d'étuvage appliqué lors des expériences		
	4h/42°C	1h/48°C	1h/53°C
Prédictions correctes	15	20	13
Prédictions incorrectes population surestimée	6	0	2
Prédictions incorrectes population sous-estimée	4	5	10

Pour les expériences avec un étuvage 4h/42°C, 15 cinétiques sont correctement prédites (tous les points expérimentaux $\pm 0,7$ U Log sont inclus dans l'enveloppe à 90% de la courbe prédite), bien que la faible baisse du nombre de bactéries observées pendant l'étuvage (-0,5 U Log en moyenne) ne soit pas prédite, car la température est au-dessous de la température maximale de croissance de *Listeria*. Lorsque la décroissance mesurée est inférieure à 0,7 U Log, les prédictions sont obligatoirement incorrectes, c'est le cas pour six cinétiques. Ainsi, les prédictions incorrectes pour le procédé global (étuvage + stockage) sont majoritairement dues à une mauvaise estimation du développement bactérien pendant l'étape d'étuvage.

Pour les expériences avec un étuvage 1h/48°C, 20 cinétiques sont correctement prédites. Pour quatre cinétiques sur les cinq qui ne le sont pas, la population finale, à la fin du stockage, est sous-estimée. Cette sous-estimation est :

- dangereuse pour deux conditions, puisque l'accroissement final prédit est faible (entre 0,3 et 0,4 U Log), alors que celui mesuré est élevé (entre 1,3 et 2,3 U Log)
- et non dangereuse pour deux conditions puisque l'accroissement final prédit est élevé (1,5 U Log), mais moins grand que celui mesuré (entre 2,8 et 3,0 U Log). La prédiction permet, cependant, de mettre en garde l'utilisateur sur les conditions environnementales favorables à la croissance de *Listeria*.

Les cinétiques bactériennes prédites au cours des expériences avec un étuvage 1h/53°C sont correctes pour treize conditions sur 25. Lors du procédé d'étuvage, la décroissance bactérienne est bien prédite dans 23 conditions. Ainsi, c'est une mauvaise prédiction du développement de *Listeria* au cours du stockage qui conduit majoritairement à une sous-estimation de la concentration bactérienne. Pour quatre cinétiques, les prédictions sont dangereuses, car l'accroissement final estimé est inférieur à 0,5 U Log, alors que celui mesuré est de 2,0 U Log. Pour les six autres, l'accroissement final prédit est élevé, mais moins grand

que celui mesuré. La prédiction permet, cependant, de mettre en garde l'utilisateur sur les conditions environnementales favorables à la croissance de *Listeria*.

Les frontières prédites pour les expériences avec les étuvages 4h/42°C, 1h/48°C et 1h/53°C sous-estiment le domaine permettant la croissance de *Listeria*. En effet, pour quelques couples a_w /pH (respectivement, trois, quatre et deux, pour 4h/42°C, 1h/48°C et 1h/53°C) proches de la frontière, mais situés au-dessous, une croissance a été observée (Figure 44). Sur la Figure 44, chaque condition environnementale pour laquelle une cinétique réduite a été réalisée est représentée par un symbole carré. Cependant, si l'on tient compte des incertitudes de mesure sur l' a_w (résolution de l' a_w -mètre égale 0,01), des incertitudes de mesure sur le pH (résolution relative du pH-mètre de 0,001) et de l'hétérogénéité des propriétés physico-chimiques de l'aliment modèle (écart-type moyen de 0,002 pour l' a_w , et de 0,03 U pH, pour le pH), les symboles de la Figure 44 devraient être représentés avec des écarts-types. A proximité de la frontière prédite, certains de ces carrés disposeraient d'écarts-types qui chevaucheraient les domaines de croissance et de non croissance.

Par ailleurs, si l'on tient compte de ces mêmes incertitudes de mesure sur l' a_w et le pH lors de la modélisation, la frontière prédite devrait être représentée par une bande, et non pas seulement par une ligne.

Compte tenu des incertitudes de mesure et de l'hétérogénéité de l'aliment modèle, nous considérons donc que le modèle combiné prédit correctement les frontières croissance/non croissance, pour les trois procédés d'étuvage et le procédé témoin.

De plus, pour les expériences avec un étuvage 4h/42°C ou 1h/48°C, la frontière $CC = 1$ prédite est équivalente à celle du procédé témoin. Ces traitements thermiques ne sont pas efficaces pour réduire le domaine de croissance de *Listeria*, lorsque l'aliment modèle est stocké pendant six jours, à 20°C. Inversement, la frontière est décalée vers les hauts pH et les hautes a_w pour les expériences avec le procédé 1h/53°C. Ce procédé réduit donc le domaine de croissance de *Listeria* par rapport au domaine obtenu avec le procédé témoin.

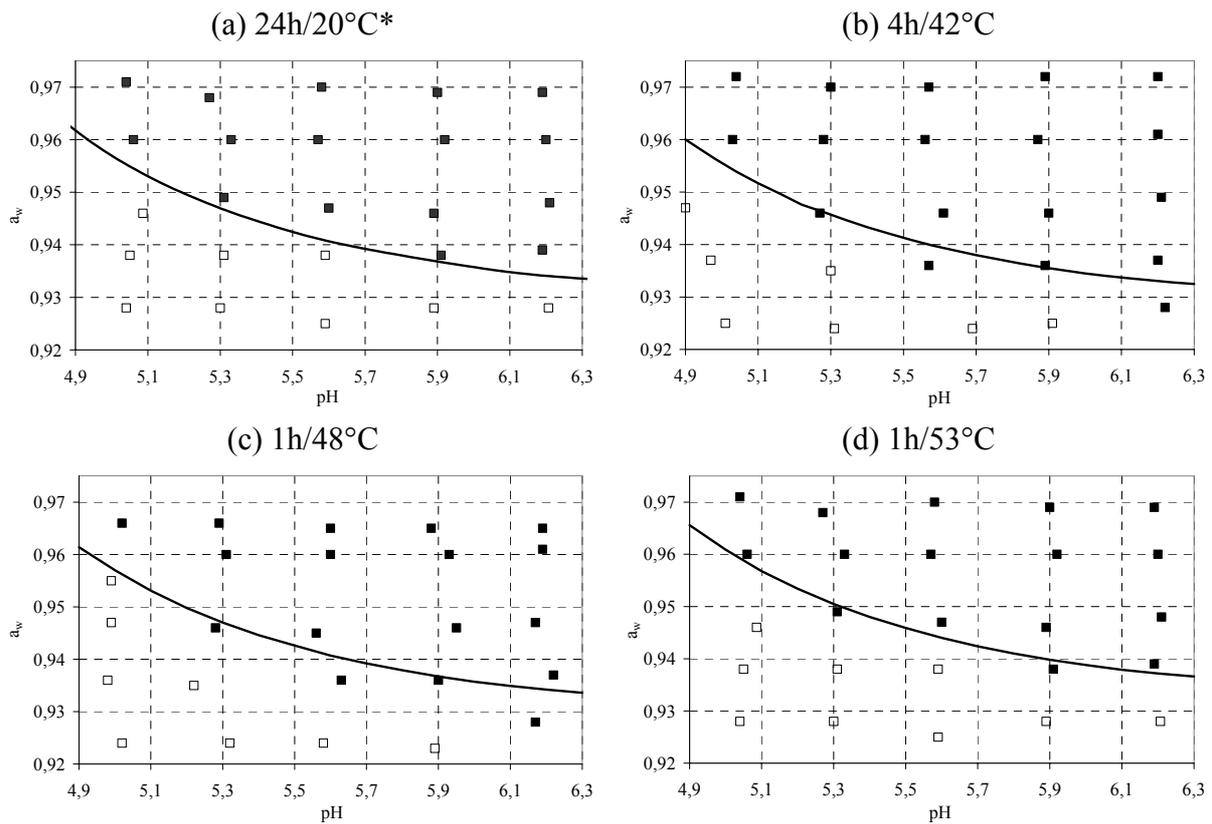


Figure 44 : frontière prédite ($CC_{globale} = 1,0$ U Log) entre les domaines de croissance et d'absence de croissance, après un procédé d'étuvage et six jours de stockage à 20°C
 ■ croissance ($CC_{globale} > 1,0$ U Log); □ absence de croissance ($CC_{globale} < 1,0$ U Log)
 — frontière prédite

*les résultats pour le procédé témoin ont déjà été présentés Figure 29

Les résultats présentés sur la Figure 44 et dans le Tableau 28 montrent que, pour les expériences avec un étuvage 4h/42°C ou 1h/48°C, les prédictions incorrectes sont obtenues pour des conditions d' a_w /pH proches de la frontière entre les domaines de croissance et de non croissance. Pour les expériences avec un étuvage 1h/53°C, les prédictions incorrectes se situent majoritairement pour des conditions d' a_w /pH éloignées de la frontière.

Tableau 28 : conditions d' a_w , de pH et de procédés d'étuvage pour lesquelles les cinétiques prédites sont correctes ou incorrectes

pH	Procédé d'étuvage appliqué lors des expériences														
	4h/42°C					1h/48°C					1h/53°C				
	5,0	5,3	5,6	5,9	6,2	5,0	5,3	5,6	5,9	6,2	5,0	5,3	5,6	5,9	6,2
0,97	t ₃	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	t ₃ , t ₄	t ₂ , t ₄
0,96	+	+	+	+	+	t ₃ , t ₄	+	+	+	+	+	t ₃	t ₃	t ₃ , t ₄	t ₃ , t ₄
0,95	+	t ₃ , t ₄	t ₂	t ₂	t ₂	+	t ₄	+	+	+	t ₃ , t ₄	t ₃ , t ₄	t ₃	+	t ₂
0,94	+	+	t ₃ , t ₄	t ₂ , t ₃ , t ₄	t ₂ , t ₃	+	+	t ₄	t ₃ , t ₄	+	t ₃ , t ₄	+	+	+	+
0,93	+	+	+	t ₂	t ₄	+	+	+	+	t ₄	t ₃	+	+	+	+

+ cinétiques correctement prédites avec une enveloppe à 90 %

t_x temps au(x)quel(s) les concentrations bactériennes ne sont pas correctement estimées

— courbes reliant les cinétiques non correctement prédites, pour chaque procédé d'étuvage

Au cours de l'étuvage 4h/42°C, une destruction bactérienne est observée, mais ne peut pas être prédite, car la température reste toujours inférieure à la température maximale de croissance de *Listeria* (θ_{max}). Afin d'améliorer les prédictions de destruction thermique lors de l'étuvage 4h/42°C, nous avons complété le modèle d'interactions entre les facteurs température, pH et a_w , en considérant que la température maximale de croissance diminue lorsque l' a_w et/ou le pH s'éloigne(nt) des valeurs optimales de croissance de *Listeria* (Figure 45). Le calcul de la température maximale de croissance, qui découle de l'Equation 14 présentée dans le Chapitre étude bibliographique, correspond à :

$$\theta_{max} = \theta_{opt} + (\theta_{max}^{\circ} - \theta_{opt}) \cdot \left(\prod_{i=1}^n \left(1 - \frac{c_i}{CMI_i^{\circ}} \right) - \left[\frac{(pH_{opt} - pH)}{(pH_{opt} - pH_{min}^{\circ})} \right]^3 - \left[\frac{(a_{wopt} - a_w)}{(a_{wopt} - a_{wmin}^{\circ})} \right]^3 \right)^{\frac{1}{3}} \text{ Eq. 46}$$

Avec θ_{max}° , la température maximale de croissance absolue, *i.e.* lorsque les autres facteurs environnementaux sont à leur valeur optimale et en absence de substance inhibitrice,
 θ_{max} , la température maximale de croissance,
 θ_{opt} , la température optimale de croissance,
 c_i la concentration de la substance inhibitrice i ,
 CMI_i° , la concentration minimale inhibitrice absolue de la substance i ,
 pH_{min}° , a_{wmin}° , les valeurs minimales absolues de croissance pour le pH et l' a_w ,
 pH_{opt} et a_{wopt} , le pH et l' a_w optimal(e) de croissance

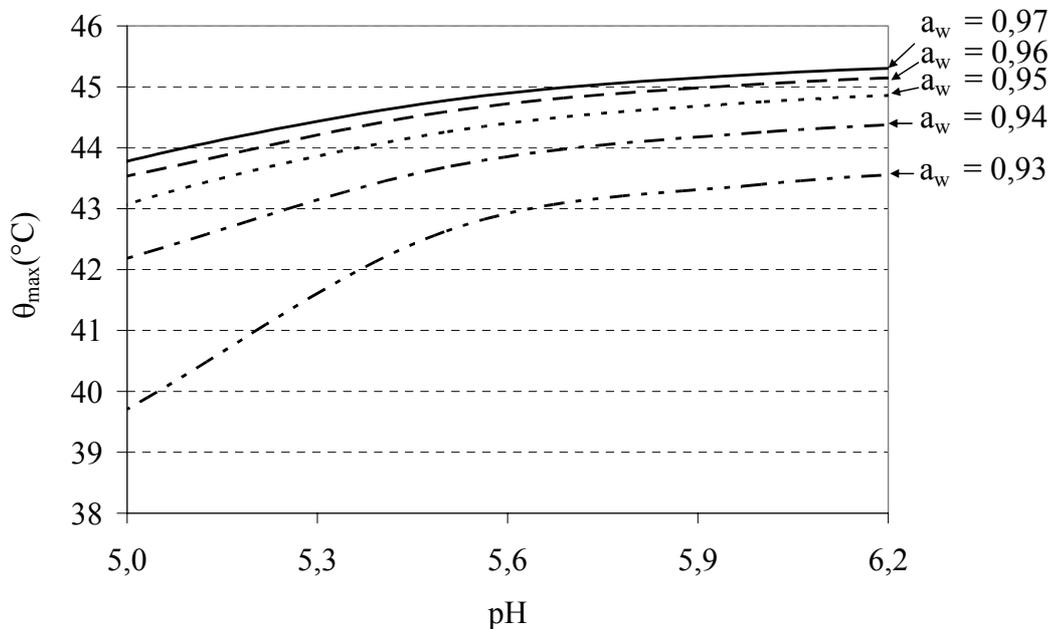


Figure 45 : prédiction de l'évolution de la température maximale de croissance, θ_{max} , en fonction du pH et de l' a_w , lorsque les interactions entre facteurs environnementaux sont prises en compte et en absence d'inhibiteur (valeurs cardinales utilisées présentées dans le Tableau 11, Chapitre matériels et méthodes)

Les résultats des 25 cinétiques réduites du plan d'expériences A avec un étuvage 4h/42°C ont été comparés aux prédictions du modèle d'Augustin modifié en utilisant l'Equation 46. En tenant compte, dans le domaine d'étude, des interactions entre facteurs environnementaux, la température maximale de croissance est inférieure à 42°C, uniquement pour l' a_w 0,93, lorsque le pH est inférieur à 5,4. Dans notre modèle combiné, une destruction bactérienne est prédite, lorsque la température de l'aliment modèle est supérieure à la température maximale de croissance. Pendant l'étuvage, c'est le cas :

- pour la condition a_w 0,93/pH 5,0, pendant 3h20 à cœur de l'aliment modèle, et pendant 3h35, pour la section proche de la surface ; une destruction de 0,4 U Log est prédite (Figure 46).
- pour la condition a_w 0,93/pH 5,3, pendant 2h48 à cœur de l'aliment modèle, et pendant 3h22, pour la section proche de la surface ; une destruction de 0,3 U Log est prédite.

Pour ces expériences, la température maximale croissance est respectivement égale à 39,9 et 40,8°C. Le modèle de destruction prédit une valeur de temps de réduction décimale égale à 42°C, à neuf heures, et à 40°C, à 17 heures.

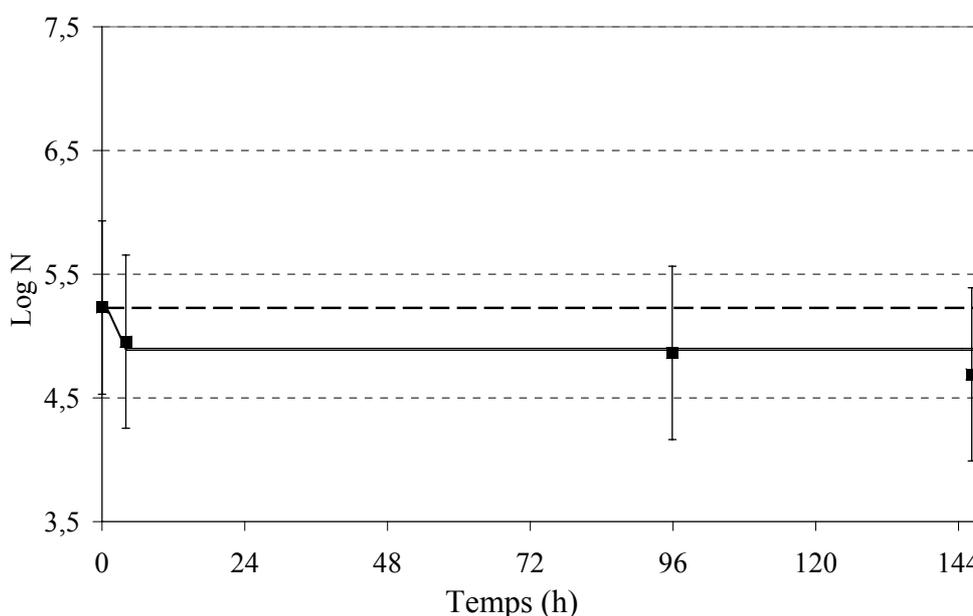


Figure 46 : comparaison de la cinétique expérimentale et des cinétiques prédites avec le modèle d'Augustin ou le modèle d'Augustin modifié, à a_w 0,93 - pH 5,0 - 4h/42°C - stockage à 20°C

— cinétique prédite avec le modèle d'Augustin modifié (Equation 46),
 - - cinétique prédite avec le modèle d'Augustin non modifié,
 ┆ erreur expérimentale ($\pm 0,7$ U Log)

L'abaissement de la température maximale de croissance permet dans ces deux conditions d'améliorer les prédictions. Pour les deux autres procédés d'étuvage et le procédé témoin, les 75 cinétiques prédites sont peu modifiées, par la prise en compte d'une température maximale absolue (température maximale influencée par la valeur des autres paramètres environnementaux). En effet :

- quand la température est inférieure à la température maximale de croissance (θ_{max}), le modèle de croissance est utilisé. Dans le domaine d'étude, les valeurs des taux maximums de croissance et des temps de latence prédites sont majoritairement équivalentes, lorsque la valeur de température maximale de croissance utilisée est calculée en tenant compte ou non de la valeur des autres paramètres environnementaux ;
- quand la température est supérieure ou égale à θ_{max} , le modèle de destruction est utilisé. En tenant compte de l'influence de la valeur du pH et d' a_w sur θ_{max} , sa valeur diminue et le modèle de destruction est utilisé sur une plus longue période. Par exemple à a_w 0,93 et pH 5,0, au cœur de l'aliment modèle, la température est supérieure à θ_{max} , pendant 43 minutes, pour les expériences avec l'étuvage 1h/48°C, et pendant 53 minutes pour 1h/53°C, soit, respectivement, 26 et 16 minutes de plus qu'avec le modèle d'Augustin non modifié. Cependant, les valeurs de temps de réduction décimale dans la zone 39-42°C sont très faibles et la destruction prédite est donc peu modifiée par l'abaissement de la température maximale de croissance.

5 - Validation du modèle combiné à 4°C

Nous nous sommes placés dans des conditions proches de celles rencontrées chez les professionnels de la charcuterie-salaison, en testant notre modèle combiné transfert de chaleur/microbiologie prévisionnelle, pour une température de stockage de 4°C. Quatre cinétiques complètes, chacune répétées trois fois, ont été réalisées à des valeurs d' a_w et de pH proches de celles des lardons du commerce, c'est-à-dire pH 5,9/ a_w 0,965. Les trois procédés d'étuvage ont été testés, ainsi qu'une condition témoin, pour laquelle le stockage à 4°C n'a pas été précédé d'un étuvage.

Les cinétiques bactériennes ont été prédites avec le modèle combiné. Le Tableau 29 rappelle la valeur des paramètres des modèles inclus dans le modèle combiné.

Ces paramètres ont été optimisés afin de tenir compte, dans les prédictions, de l'espèce bactérienne et du substrat utilisé.

Tableau 29 : valeurs des paramètres des modèles inclus dans le modèle combiné

Modèles secondaires de microbiologie	Croissance	μ_{opt}	1,9 h ⁻¹
		K	1,94
	Destruction	D ₆₀	2 min
		z'	7,4°C
Modèle de transfert thermique		D _t	9.10 ⁻⁹ m ² .s ⁻¹

5-1. En condition statique de température

A 4°C, dans la zone d'a_w et de pH des lardons, la croissance de *Listeria* est très lente. La croissance est, de plus, précédée d'une période de latence comprise entre 3,7 et 6,4 semaines (Figure 47).

La durée de conservation des lardons à 4°C est, en moyenne, de 45 jours. L'accroissement de *Listeria* dans l'aliment modèle à l'issue de cette période est de l'ordre de 0 à 0,3 U Log. Dans la zone de pH et d'a_w des lardons, en absence d'étuvage, une température de stockage égale à 4°C permet donc d'inhiber l'accroissement de *Listeria*, jusqu'à la date limite de consommation du produit.

Les cinétiques bactériennes ont été réalisées dans des mêlées d'aliment modèle ayant un pH de l'ordre de 5,9. Les a_w des mêlées sont comprises entre 0,958 et 0,966. Ces écarts d'a_w engendrent des valeurs de taux maximum de croissance et de temps de latence différentes d'une expérience à l'autre (Tableaux 30 et 31).

Nous avons comparé les cinétiques bactériennes avec les prédictions des modèles de croissance. Des analyses de Monte Carlo ont été réalisées pour déterminer l'enveloppe à 90% des courbes prédites, en supposant que les rapports [$\sigma_{\mu_{max}}/\mu_{max}$], [$\sigma_{N_{max}}/N_{max}$], [σ_{N_0}/N_0] restent constants, lorsque la température est égale à 4°C. La population bactérienne est surestimée par les modèles de microbiologie prévisionnelle pour deux expériences sur trois (Figure 47). Le modèle d'Augustin prédit correctement le taux de croissance de *Listeria* à 4°C (Tableau 30) ; en revanche, pour deux des trois cinétiques, le temps de latence prédit est trois à cinq fois plus court que celui mesuré (Tableau 31).

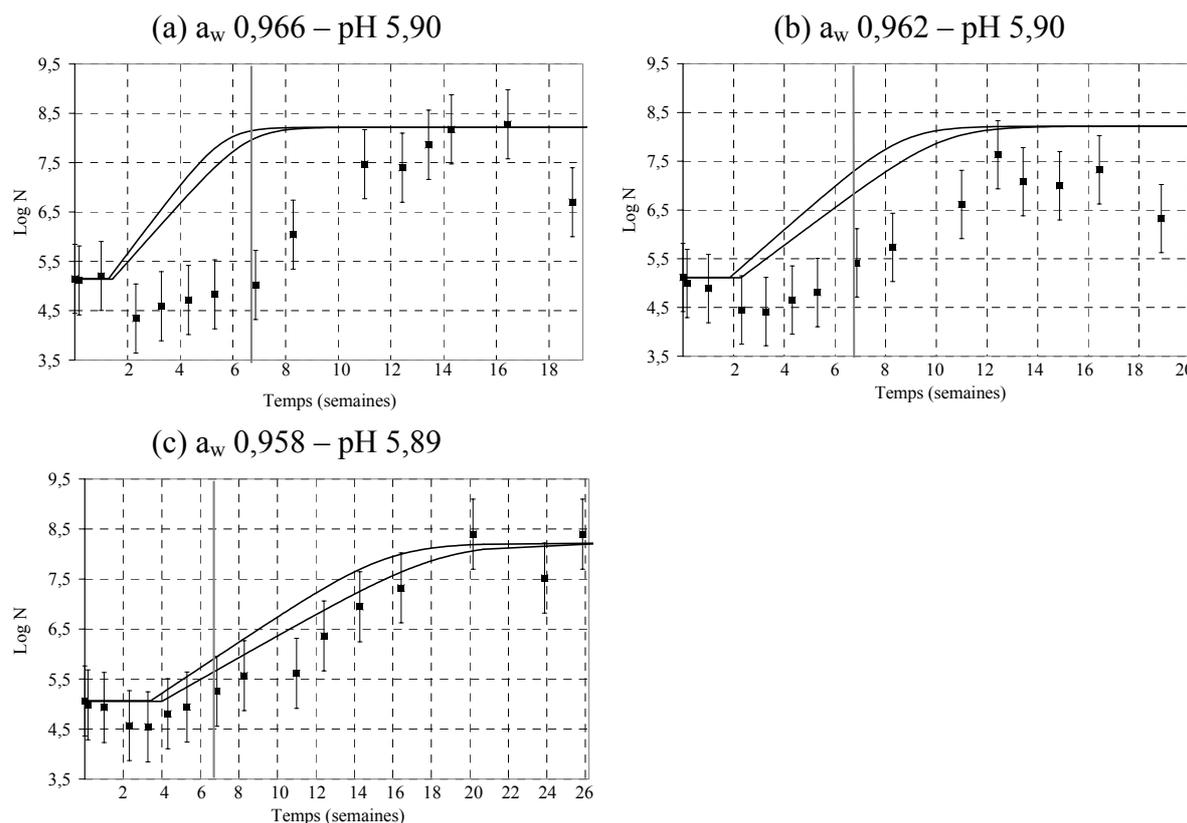


Figure 47 : comparaison des cinétiques expérimentales et prédites, température de stockage égale à 4°C

— cinétique prédite avec une enveloppe à 90 %,
 ┆ erreur expérimentale (± 0,7 U Log),
 — durée de conservation des lardons (45 jours en moyenne)

Tableau 30 : taux maximums de croissance (μ_{max} en h^{-1}) expérimentaux et prédits à 4°C

Conditions a_w /pH	μ_{max} mesuré ± écart-type	μ_{max} prédit ± écart-type*
0,966/5,90	0,008 ± 0,002	0,009 ± 5.10 ⁻⁴
0,962/5,90	0,005 ± 0,004	0,006 ± 4.10 ⁻⁴
0,958/5,89	0,003 ± 0,001	0,003 ± 2.10 ⁻⁴

*écart-type calculé avec l'hypothèse [$\sigma_{\mu_{max}}/\mu_{max}$] = 0,06

Tableau 31 : temps de latence (lag en h) expérimentaux et prédits à 4°C

Conditions a_w /pH	lag mesuré ± écart-type	lag prédit ± écart-type*
0,966/5,90	1070 ± 70	220 ± 20
0,962/5,90	1000 ± 130	340 ± 30
0,958/5,89	610 ± 100	600 ± 60

*écart-type calculé avec l'hypothèse [σ_{lag}/lag] = 0,1

Pour des conditions pré-incubatoires identiques et pour un même substrat, l'hypothèse [$\mu_{max} \cdot lag = K$] est considérée comme acceptable par Rosso (1995), en fonction du pH et de la température ; Augustin (1999) l'utilise également en fonction de l' a_w . Cependant, cette hypothèse est remise en question près des limites de croissance (Delignette-Muller, 1998). Pour une température de stockage de 4°C, la constance du produit [$\mu_{max} \cdot lag$] (vérifiée à

20°C) n'est plus observée, comme l'indique la Figure 48. En effet, la valeur de K diminue linéairement, lorsque l' a_w diminue (entre 0,966 et 0,958).

Nous avons déterminé le temps de latence pour la condition a_w 0,962, à partir de l'équation de la droite de régression (Figure 48) calculée uniquement avec les deux autres points (a_w 0,958 et 0,965). Nous obtenons un temps de latence de 1140 ± 110 heures, donc équivalent (les écarts-types se chevauchent) à celui mesuré (1000 ± 130 heures). La cinétique prédite avec le temps de latence re-calculé est nettement améliorée (Figure 49).

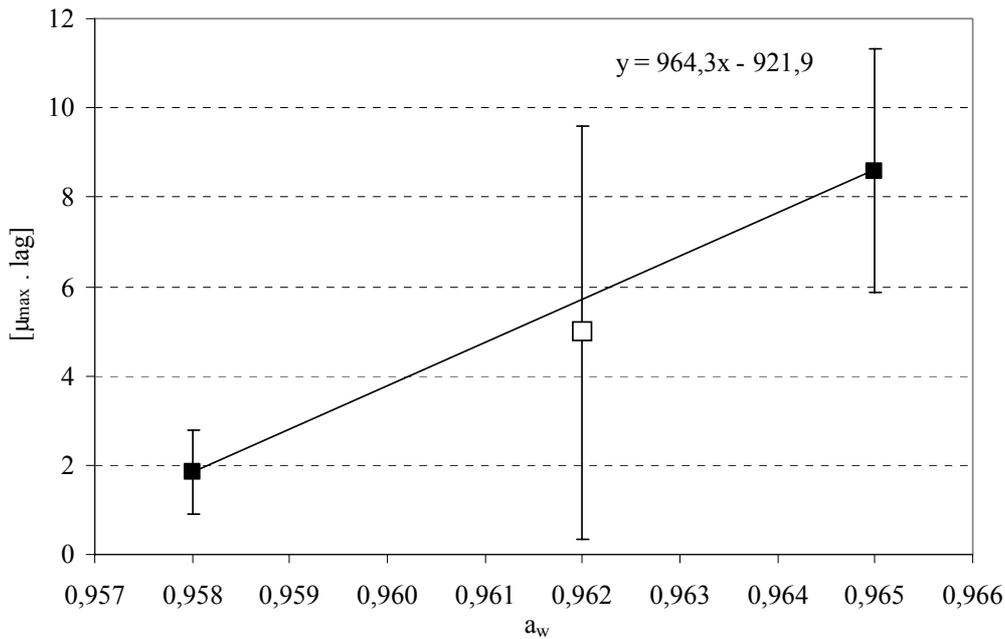


Figure 48 : produit $[\mu_{max} \cdot lag]$ calculé en fonction de l' a_w , pour une température de stockage égale à 4°C et un pH de 5,9 (— écart-type)

- $[\mu_{max} \cdot lag]$ utilisé pour calculer l'équation de la droite de régression,
- $[\mu_{max} \cdot lag]$ utilisé pour comparer la valeur prédite et la valeur expérimentale du temps de latence

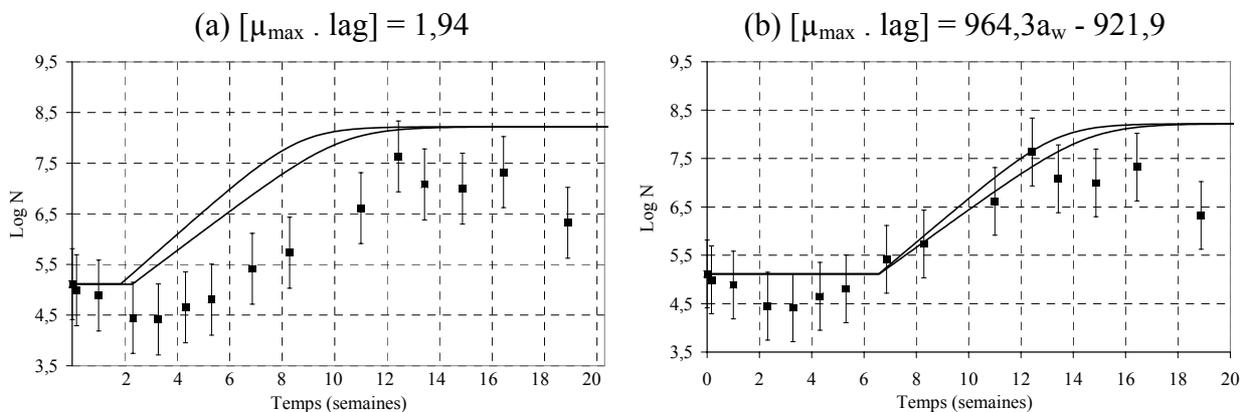


Figure 49 : comparaison de la cinétique expérimentale et des cinétiques prédites à a_w 0,962/pH 5,9, pour une température de stockage de 4°C, en fonction de l'approche utilisée pour modéliser le temps de latence

- cinétique prédite avec une enveloppe à 90 %,
- écart-type
- erreur expérimentale ($\pm 0,7$ U Log)

5-2. En condition dynamique de température

A 4°C, pour les trois cinétiques réalisées dans des conditions environnementales équivalentes, le développement de *Listeria* varie (Figure 50). Par exemple, pour les répétitions de l'expérience avec un étuvage 4h/42°C, entre la deuxième et la cinquième semaine de stockage, la population bactérienne augmente de 1,5 à 2,0 U Log, pour les deux premières répétitions. Pour la troisième répétition, la population bactérienne stagne durant cette même période (Figure 50 a, b, c). Par ailleurs, au cours de l'étuvage 1h/48°C, selon les expériences, une diminution de la population bactérienne, de 0,5 U Log à 1,7 U Log, est observée (Figure 50 d, e, f).

Au cours de cinétiques complètes réalisées en condition dynamique de température (procédés d'étuvage 4h/42°C, 1h/48°C, 1h/53°C), pour un stockage à 4°C, une destruction bactérienne est, tout d'abord, observée pour toutes les expériences lors de l'étape d'étuvage (Figure 50). Pendant le stockage, pour des conditions d' a_w et pH équivalentes à celles des lardons du commerce, le nombre de bactéries augmente. A la date limite de consommation des lardons, c'est-à-dire en moyenne 45 jours après le début de l'expérience, l'accroissement bactérien moyen par rapport à l'inoculum initial est de :

- 2,0 U Log, pour les expériences avec l'étuvage 1h/53°C,
- 2,8 U Log, pour les expériences avec l'étuvage 1h/48°C
- et 2,7 U Log, pour les expériences avec l'étuvage 4h/42°C.

En condition statique de température à 4°C, la population bactérienne, après 45 jours de stockage, est équivalente à la population mesurée en début d'expérience. En revanche, lorsqu'un procédé d'étuvage a lieu, la population bactérienne, à la date limite de consommation des lardons, est multipliée par deux ou trois U Log. Au cours du stockage, la population bactérienne croît plus rapidement, lorsqu'elle a subi un traitement thermique préalable. Par ailleurs, la latence préalable à la reprise de croissance après destruction thermique est négligeable, alors qu'en condition statique, pour des niveaux d' a_w et de pH équivalents, le temps de latence est compris entre 3,7 semaines et 6,4 semaines.

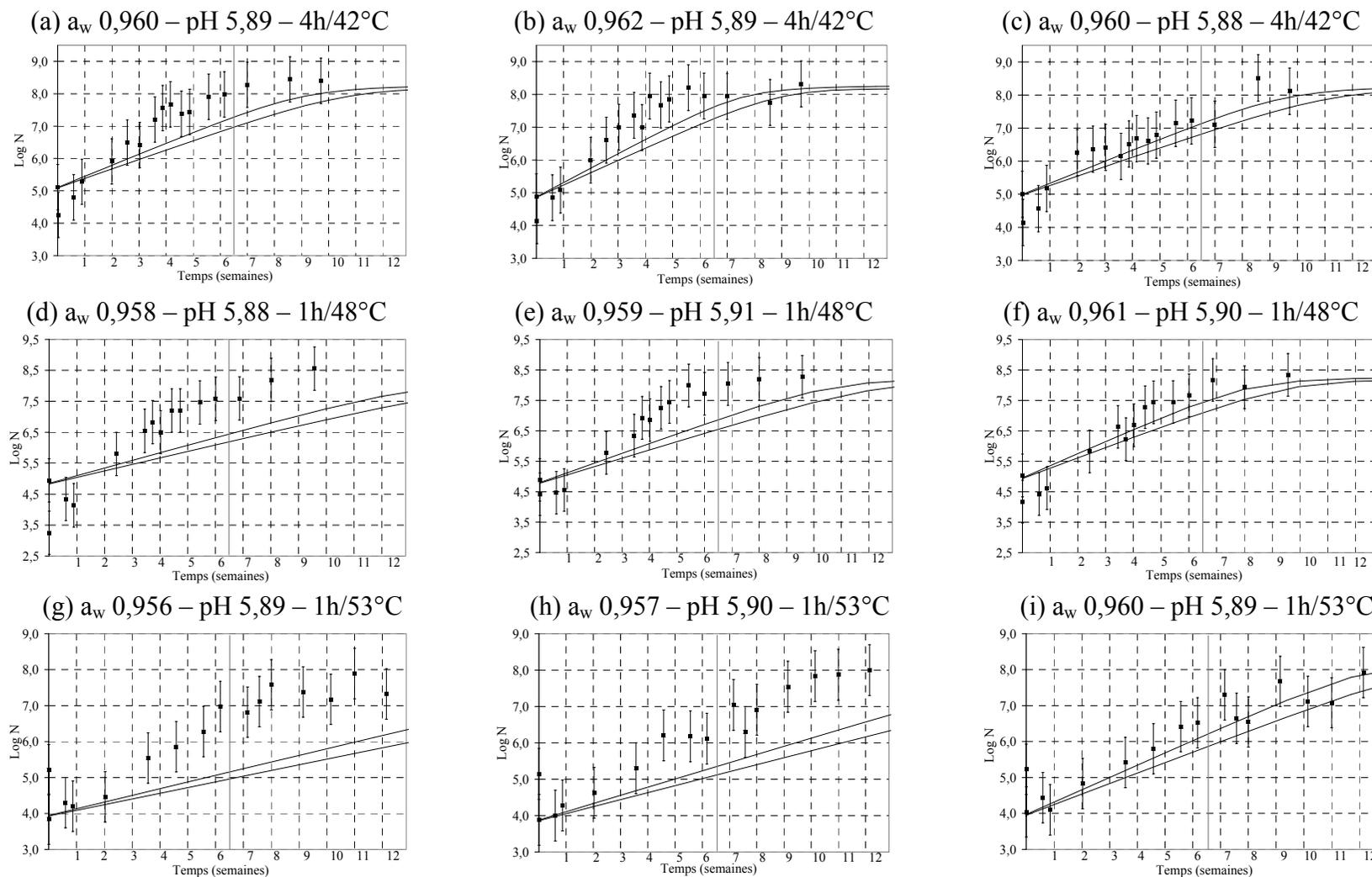


Figure 50 : comparaison des cinétiques expérimentales et prédites en condition dynamique de température, avec un stockage à 4°C

- cinétique prédite avec une enveloppe à 90 %,
- ⊥ erreur expérimentale ($\pm 0,7$ U Log),
- durée de conservation des lardons (45 jours en moyenne)

La comparaison des cinétiques bactériennes expérimentales et prédites en condition dynamique de température pour un stockage à 4°C, montre que :

- la destruction thermique au cours de l'étuvage est :
 - o correctement prédite, pour le procédé 1h/53°C,
 - o sous-estimée
 - pour le procédé 1h/48°C, de 0,4 – 0,5 ou 1,6 U Log, selon les répétitions,
 - pour le procédé 4h/42°C, de 0,8 U Log ;
- l'hypothèse, selon laquelle la croissance après destruction thermique reprend sans période de latence préalable, est correcte, même lors du stockage à 4°C,
- lors du stockage, la concentration bactérienne est majoritairement sous-estimée par le modèle combiné. Pour l'expliquer, quatre hypothèses sont émises :
 - o la concentration bactérienne initiale en début d'étape de stockage est sous-estimée. Cette hypothèse est réfutée : la concentration bactérienne initiale pour le stockage correspond à la concentration prédite à la fin de l'étape d'étuvage. La destruction thermique étant, soit correctement prédite, soit sous-estimée, la valeur de la concentration prédite à la fin de l'étuvage est donc égale ou supérieure à celle observée ;
 - o la concentration bactérienne maximale (N_{max}) est sous-estimée. La valeur utilisée dans les modèles primaires est égale à la moyenne des valeurs mesurées pour les cinétiques complètes réalisées avec une température de stockage de 20°C (8,2 U Log). Cette hypothèse est réfutée au regard des cinétiques présentées sur la Figure 50, qui attestent d'une valeur de N_{max} expérimentale proche de celle utilisée dans le modèle combiné ;
 - o le temps de latence, avant reprise de croissance, est surestimé. Cette hypothèse est réfutée, car celui-ci est fixé à zéro dans le modèle combiné, quels que soient l'étuvage et la valeur de pH et d' a_w ;
 - o la vitesse de croissance prédite est plus lente que celle observée. Le taux de croissance est correctement prédit en condition statique à 4°C, mais au regard de la Figure 50, la vitesse de croissance des bactéries, après un procédé d'étuvage, est effectivement sous-estimée.

Au cours de l'étude du comportement de *Listeria* lors d'un procédé d'étuvage, puis du stockage à 4°C de l'aliment modèle, nous avons mis en évidence :

- que le comportement de *Listeria* pour des conditions expérimentales identiques est très variable
- et que l'étape d'étuvage accélère la vitesse de croissance de *Listeria* au cours du stockage.

Comme ces deux observations ne sont pas prises en compte par le modèle combiné, celui-ci ne peut pas prédire pas correctement le développement de *Listeria*.

-Discussion et perspectives-

Au cours de ce travail, nous nous sommes intéressés à l'évolution d'une population de *L. monocytogenes*, lors des différentes étapes du procédé de fabrication et du stockage des lardons. Le procédé appliqué lors des expériences mime les étapes de saumurage (avec ajout d'inhibiteurs), d'étuvage et de stockage. Ces étapes modifient les paramètres physico-chimiques de la viande : concentration en NaCl, pourcentages d'inhibiteurs (sels d'acides organiques ou fumée liquide), a_w , pH, et température. Ce sont ces paramètres physico-chimiques qui influencent l'évolution de la population de *L. monocytogenes* : croissance, inhibition ou destruction. Nous avons ainsi montré que :

- la population de *Listeria* - en fin de période de stockage - n'est jamais détruite, même lorsque l' a_w , le pH ou la température de stockage diminuent, ou lorsqu'un ou plusieurs inhibiteurs sont ajoutés à l'aliment modèle ;
- même si l'étape d'étuvage détruit une partie de la population,
 - o le niveau de contamination, après étuvage et six jours de stockage à 20°C, est identique à celui mesuré dans la condition témoin sans étuvage ;
 - o le niveau de contamination après 45 jours de stockage à 4°C, est supérieur pour les expériences présentant un procédé d'étuvage par rapport aux expériences réalisées dans la condition témoin.

L'ensemble des données expérimentales a servi au développement d'un modèle de prédiction de l'évolution de *Listeria*, lors du procédé de fabrication et du stockage des lardons. Ce modèle est constitué de deux modules :

- un module « microbiologique », qui décrit l'influence des paramètres physico-chimiques sur la population de *Listeria*. Ce module est lui-même scindé en deux sous-modules. Le premier s'intéresse à la croissance de *Listeria*, en prenant en compte l' a_w , le pH, la température et la présence d'inhibiteur(s). Le second sous-module s'intéresse à la destruction en fonction de la température ;
- un module « thermique », qui décrit l'évolution temporelle et spatiale de la température dans l'aliment.

Paramètres du modèle combiné

Chaque module du modèle combiné est caractérisé par un ou plusieurs paramètres identifiés à l'aide des données expérimentales. La comparaison des valeurs des paramètres des modèles utilisées dans cette étude avec les données bibliographiques est limitée, car peu de valeurs des paramètres du module microbiologique (taux optimal de croissance, K , $\text{pH}_{\text{min}}^\circ$ en présence d'inhibiteur, concentration minimale inhibitrice, temps de réduction décimale à

60°C, z') et du module thermique (diffusivité thermique) ont été mesurées pour *L. monocytogenes* dans la viande.

Les valeurs optimisées du sous-module de croissance sont égales à 1,9 h⁻¹, pour le taux optimal de croissance (μ_{opt}), et 1,94, pour K. Augustin (1999) propose une valeur de μ_{opt} pour *L. monocytogenes*, dans les produits à base de viande, égale à 1,3 h⁻¹, et une valeur de K, égale à 2,14 (valeur spécifique de l'espèce bactérienne, mais pas du substrat). Ces valeurs sont proches de celles que nous avons obtenues. La différence entre les valeurs de μ_{opt} peut s'expliquer par le fait que celle proposée par Augustin est issue de données récoltées pour différents produits à base de différentes viandes : bœuf, porc, volaille, viande hachée contaminée en profondeur ou viande contaminée en surface.

La valeur de pH_{min}° (acide acétique) que nous avons obtenue (4,91) est proche de celle proposée par Augustin (4,79). En revanche le pH_{min}° (acide lactique) optimisé à partir de nos données expérimentales (5,33) est très nettement supérieur à celui proposé par Augustin (4,54), qui correspond à la valeur médiane de pH_{min}° (acide lactique) obtenus pour différentes souches de *L. monocytogenes*. Une des hypothèses, pouvant expliquer cette différence, est que la souche bactérienne utilisée dans ce travail est plus sensible à l'acide lactique que la majorité des autres souches de *L. monocytogenes*.

La concentration minimale inhibitrice (CMI^o) du lactate de sodium obtenue dans cette étude, 892 mM, est dans le domaine de CMI, proposé par Houtsma *et al.* (1993) pour ce sel d'acide; ce domaine se situe entre 804 et 982 mM. La CMI^o proposée par Augustin pour le sorbate de potassium (49,6 mM) est environ deux fois plus faible que la valeur optimisée à partir de nos données (118 mM), laissant supposer que la souche que nous avons utilisée est particulièrement résistante à cet inhibiteur. Nous n'avons pas connaissance de travaux publiés proposant pour *Listeria* un pH_{min}° (acide sorbique) ou une CMI^o pour l'acétate de sodium et la fumée liquide Enviro24.

La valeur optimisée, à partir de nos données expérimentales, du temps de réduction décimale à 60°C (D_{60}) est égale à deux minutes, et z' , à 7,4°C. En utilisant 78 données de la littérature (ICMSF, 1996) obtenues pour *L. monocytogenes*, dans des produits à base de viande, nous avons calculé une valeur de D_{60} égale à 3,8 minutes, et un z' , de 7,7°C. Les valeurs de z' de notre étude ou issue de la littérature sont très proches. La valeur de D_{60} optimisée est plus faible que celle de la littérature, elle n'est cependant pas aberrante, car, pour des produits à base de viande, nous avons répertorié des valeurs de D_{60} comprises entre 1,1 et 16,7 minutes (ICMSF, 1996). Cette forte variabilité s'explique par le fait que de nombreux facteurs, listés dans le Chapitre étude bibliographique, influencent ce paramètre.

Dans le module thermique, la diffusivité thermique (D_t) de l'aliment modèle a été optimisée et une valeur de $9.10^{-9} \text{ m}^2.\text{s}^{-1}$ a été obtenue. La diffusivité thermique des aliments est influencée par de nombreux facteurs : teneur en eau et en gras, structure, température... Entre 0 et 35°C, les valeurs de D_t mesurées dans la viande de porc varient entre 5.10^{-8} et $1.10^{-7} \text{ m}^2.\text{s}^{-1}$ (Morley, 1972). La valeur obtenue dans notre travail est plus faible, car, l'aliment étant haché, l'air situé entre les particules de viande ralentit le transfert de chaleur.

Inhibiteurs

En France, pour les produits à base de viande, l'utilisation du lactate de sodium et de l'acétate de sodium est gérée par la règle du *quantum satis*, c'est-à-dire qu'ils peuvent être ajoutés au produit jusqu'à obtenir l'effet désiré. Cependant, les contraintes technologiques et organoleptiques limitent les concentrations auxquelles ils sont utilisés. En effet, ajoutés à des concentrations trop élevées, les sels d'acides organiques abaissent fortement le pH de la viande, ce qui réduit le rendement technologique (Durand, 1999) et conduit à des défauts de goût non acceptables par les consommateurs. Dans notre étude, nous avons montré l'effet bactériostatique de l'acétate de sodium, du lactate de sodium et du sorbate de potassium, sur *Listeria* dans l'aliment modèle. L'intensité de l'effet inhibiteur est fortement liée aux valeurs de pH et d' a_w . L'action bactériostatique de la fumée liquide Enviro24 n'est observée qu'à bas pH et basse a_w , et à un fort pourcentage de 0,9%. En effet, l'action des fumées est associée à leur pouvoir acidifiant (Sunen *et al.*, 2001). Sunen (1998) a montré que l'effet inhibiteur des fumées était aussi lié à leur fraction phénolique. Nous avons testé l'effet inhibiteur du principal phénol présent dans de nombreuses fumées liquides, le guaïacol (Sunen *et al.*, 2001). Nous n'avons montré aucune action inhibitrice du guaïacol sur *Listeria* dans l'aliment modèle, et confirmons ainsi, les résultats de Sunen *et al.* (2003) sur l'absence de corrélation entre l'augmentation de la concentration en phénol et l'effet anti-*Listeria*.

Dans notre étude, la synergie de l'effet inhibiteur de deux sels d'acides organiques a rarement été mise en évidence (trois conditions sur 27), et seulement, lorsque le pH et l' a_w ne sont pas simultanément élevés. Les conditions sont alors proches de la frontière entre les domaines de croissance et de non croissance. Lorsque le pH est égal à 6,2 et l' a_w est égale à 0,97, l'effet inhibiteur observé correspond toujours à la seule action du sel d'acide en concentration la plus forte. De nombreux auteurs ont montré une synergie des sels d'acides organiques sur *Listeria*, dans des produits à base de viande, pour des pH compris entre 5,7 et 6,3, conservés à 4-5°C (Stekelenburg et Kant-Muermans, 2001 ; Mbandi et Shelef, 2002 ; Jensen *et al.*, 2003). En revanche, pour d'autres expériences réalisées à 4°C dans de la

saucisse, du salami ou du jambon fumé, aucune synergie n'a été observée entre le diacétate de sodium et le lactate de potassium (Seman *et al.*, 2002). L'ensemble de ces études montre qu'il est nécessaire d'intégrer les interactions entre la température, le pH, l' a_w et la concentration en inhibiteur, pour mieux expliquer les situations avec ou sans synergie entre deux sels d'acides.

Nous avons modélisé l'influence des inhibiteurs sur *Listeria*, en utilisant le modèle d'Augustin (1999). Il prend en compte la concentration minimale inhibitrice de l'inhibiteur et le pH minimal de croissance de l'acide chlorhydrique. Nous avons montré que cette approche n'était pas suffisante, car, pour chaque sel d'acide organique, il est nécessaire de tenir compte de la nature de l'acide associé pour la détermination du pH minimal de croissance. Notre approche se justifie, car le mode d'action de l'inhibiteur peut être associé :

- à la concentration minimale inhibitrice, qui caractérise l'action spécifique de l'inhibiteur sur le métabolisme bactérien. Par exemple, le lactate de sodium inhibe la voie de conversion de l'acide pyruvique en acide lactique (Houtsma *et al.*, 1994) ;
- au pH minimal de croissance, qui caractérise l'inhibition due à l'acidification du milieu et à la nature de l'acide. En effet, Rosso (1995) a montré que les pH_{min}° diffèrent selon la nature de l'acide.

En optimisant simultanément la concentration minimale inhibitrice et le pH minimal de croissance de chaque sel d'acide, le module « microbiologique » prédit correctement l'effet de ces sels d'acides sur le développement de *Listeria*. Nous avons montré que pour modéliser l'effet de deux sels d'acides organiques, il suffisait de prendre en compte l'inhibiteur ajouté à la plus forte concentration. La fumée liquide est un mélange de composés phénoliques en présence d'acide acétique. Nous avons mis en évidence qu'il suffisait d'identifier la concentration minimale inhibitrice, et de prendre le pH minimal de croissance de l'acide acétique, pour prédire correctement l'effet de la fumée liquide sur *Listeria*.

L'influence de l'étape de saumurage sur l'évolution de la population de *Listeria* peut être estimée par le module « microbiologique ». Ce module décrit l'influence du pH, de l' a_w et de la concentration en inhibiteurs. Il a été développé dans des conditions constantes de température.

Procédés d'étuvage

Pour modéliser l'influence du procédé d'étuvage sur le développement de *Listeria*, deux approches ont été envisagées :

- la première consistait à considérer le procédé d'étuvage comme une condition pré-opératoire. La valeur du produit [$\mu_{max} \cdot lag = K$] étant influencée par les conditions pré-incubatoires (Augustin, 1999), il aurait été nécessaire de calculer une valeur de K pour chaque procédé d'étuvage. Seule la croissance au cours du stockage aurait alors été prédite. Cette approche a été abandonnée, car elle ne permettait pas de traiter d'autres conditions d'étuvage, sans réaliser des expériences supplémentaires.
- la seconde, que nous avons développée, prend en compte le module « microbiologique » décrit précédemment et le module « thermique ». Ce dernier permet de connaître l'évolution de la température dans l'aliment modèle. La valeur de la température détermine alors, dans le module « microbiologique », le type d'évolution de la population de *Listeria* (croissance ou destruction), et en conséquence, le type de modèle utilisé : modèle de croissance ou modèle de destruction.

Le module « thermique » peut être utilisé, non seulement, pour prendre en compte l'étuvage, mais aussi, le refroidissement, le stockage et le fumage de façon intégrale.

De nombreux modèles de thermique ont été développés et validés dans divers aliments. Ces modèles peuvent décrire l'ensemble des flux de chaleur (par conduction, par convection, par rayonnement, par évaporation d'eau) correspondant aux échanges entre l'air, le produit et le support du produit. Cependant, pour des raisons de simplification, seuls un ou deux flux sont souvent considérés.

Ainsi, Carciofi *et al* (2002) ont modélisé les phénomènes de convection et de conduction pour décrire l'évolution de température, lors de la cuisson (70°C à cœur) de la mortadelle. Le refroidissement du jambon après sa cuisson (de 74°C à cœur, jusqu'à 10°C) a été décrit par un modèle de conduction en trois dimensions (Wang et Sun, 2002).

Lorsque le produit est de forme simple, il est possible de ne considérer les flux que selon deux, voire une dimension de l'espace. Dans notre étude, nous avons assimilé la plaque d'aliment modèle à une plaque infinie, dans laquelle les transferts de chaleur s'effectuent principalement suivant l'épaisseur. L'aliment modèle étant conservé dans un sac fermé, sa teneur en eau est constante (Annexe 1), et les transferts d'eau, négligeables. Cependant, des transferts de matière affectent les produits de charcuterie/salaison au cours de leur fabrication. Ils interviennent essentiellement pendant les étapes de saumurage et d'étuvage. Le module

« thermique » pourrait être complété par un module « matière » intégrant la déformation de l'aliment (Baucour, 2000).

Le module « thermique », développé dans cette étude, prédit correctement l'évolution de la température, au cours des étapes d'étuvage, de refroidissement et de stockage de l'aliment.

Connaissant la température maximale de croissance de *L. monocytogenes*, le module « thermique » détermine les domaines où le module « microbiologique » fonctionne en croissance ou en destruction.

L'étuvage est une étape complexe où les deux situations, croissance et destruction, peuvent se rencontrer successivement. Une analyse approfondie de la littérature montre que les domaines de température (expérimentaux et prédits) de croissance et de destruction sont disjoints. En effet, ils sont respectivement égaux à [0°C - 45°C] et [49°C - 82°C] (ICMSF, 1996 ; Augustin, 1999 ; USDA-ARS-ERRC, 2005). Ainsi, il y a une incertitude sur l'évolution de la population de *Listeria* dans la plage de température située entre les deux domaines précédents. Or, cette plage de température est présente dans deux des trois étuvages étudiés (1h/48°C et 1h/53°C), une première fois lors du chauffage et une seconde fois, lors du refroidissement, ce qui pose problème pour la prédiction.

Nous allons nous intéresser, dans un premier temps, à l'étuvage 4h/42°C, pour lequel une destruction moyenne de 0,5 U Log a été mesurée. Celle-ci ne peut pas être prédite par le module « microbiologique », puisque la température du produit reste inférieure à la température maximale de croissance de *L. monocytogenes* estimée par Augustin (1999) *i.e.* 45,5°C.

Deux hypothèses peuvent expliquer cette observation :

- nous avons pris, comme valeur de température maximale de croissance, la valeur estimée par Augustin, à partir d'un grand nombre de données de la littérature sur *L. monocytogenes*. Cependant, la température maximale de croissance semble varier suivant les souches comme l'ont montré Le Marc (2001) et le groupe méthodologie de Sym'Previus. Ce dernier a trouvé une valeur de 43,4 °C pour *L. monocytogenes* 14, la souche utilisée dans notre étude. Néanmoins, l'intégration de la variabilité de la température maximale de croissance selon la souche n'est pas possible dans le modèle secondaire d'Augustin ;
- nous avons modifié le modèle d'Augustin, en ajoutant un terme d'interaction entre la température maximale de croissance, le pH et l' a_w . La modification entraîne un abaissement de la température maximale de croissance : elle atteint environ 40°C, à pH

5,0 et a_w 0,93. Il serait nécessaire de valider cette hypothèse, car la température maximale de croissance s'approche, alors, de la température optimale de croissance. Par ailleurs, les paramètres des modèles secondaires de microbiologie prévisionnelle ont été optimisés en émettant l'hypothèse qu'une destruction bactérienne a lieu lorsque la température est supérieure ou égale à 45,5°C, et que le nombre de bactéries croît, lorsque la température est inférieure à 45,5°C. Or, en faisant évoluer la température maximale de croissance en fonction des valeurs de pH et d' a_w , le domaine de température :

- pour lequel le modèle de destruction est utilisé, peut être plus étendu et débuté à 40°C, au lieu de 45,5°C ;
- pour lequel le modèle de croissance est utilisé, peut être moins étendu (limite supérieure du domaine égale à 40°C, au lieu de 45,5°C).

Il faudrait donc optimiser de nouveau les paramètres des modèles de microbiologie, en tenant compte de cette nouvelle hypothèse.

Pendant l'étuvage 1h/48°C, la température prédite au centre de l'aliment modèle reste supérieure à 45,5°C, durant 12 minutes, et une destruction moyenne de 0,4 U Log est observée. Durant l'étuvage 1h/53°C, la température prédite à cœur de l'aliment reste supérieure à 45,5°C durant 28 minutes, ce qui entraîne une destruction de 0,8 U Log, en moyenne. Ce sont ces valeurs de destruction de la population bactérienne, à la fin de l'étuvage, qui servent pour analyser les prédictions du modèle de destruction. Ce dernier prédit une décroissance de 0,1 U Log pour l'étuvage 1h/48°C et de 0,8 U Log pour l'étuvage 1h/53°C. Ensuite, lors de l'étape de stockage, la température prédite à cœur du produit reste encore supérieure à 45,5°C, durant cinq minutes après l'étuvage 1h/48°C, et neuf minutes, après l'étuvage 1h/53°C. Le modèle combiné tient compte de cette évolution.

Nous avons formulé précédemment une hypothèse d'interaction entre la température maximale de croissance, le pH et l' a_w . Dans ce cas, comme la température maximale de croissance diminue pour certains pH et certaines a_w , la période de destruction augmente. Cependant, la valeur du temps de réduction décimale à 42°C étant estimée à neuf heures, la qualité des prédictions pour les étuvages 1h/48°C et 1h/53°C n'est pas modifiée.

Procédé global (étuvage puis stockage)

Une étape de stockage suit la fabrication des lardons. Dans un premier temps, nous avons considéré une température de stockage de 20°C. Les résultats montrent que les échantillons ayant subi un des trois étuvages atteignent la même population, après six jours de conservation, que les échantillons non étuvés. Pourtant, une diminution de la population de *Listeria* a été observée pendant les étuvages. Ainsi, le bénéfice de ce traitement thermique est annulé à la fin de la période de stockage à 20°C. Dans un second temps, nous avons stocké les échantillons à 4°C. Les vitesses de croissance de *Listeria* mesurées pour les expériences avec les conditions d'étuvage 4h/42°C, 1h/48°C et 1h/53°C sont deux à trois fois plus rapides que celles pour le témoin. De plus, le temps de latence est compris entre zéro et 100 heures pour les trois procédés d'étuvage, alors qu'il est de 800 heures, en moyenne, pour la condition témoin. En conséquence, après 45 jours, durée moyenne de conservation des lardons à 4°C, aucune augmentation de la population n'est observée pour les expériences témoin, alors qu'une augmentation minimum de 2 U Log est mesurée pour les expériences, avec la condition d'étuvage 1h/53°C, et de 3 U Log, dans les deux autres conditions d'étuvage. Ces résultats doivent faire réfléchir sur la manière dont les challenge-tests sont réalisés. En effet, les challenge-tests procédé qui miment une contamination du produit au cours de son procédé, ou les challenge-tests produit qui miment une contamination du produit fini, servent à déterminer la date limite de consommation des aliments. Or, ils ne prennent pas (pour les challenge-tests produit) ou pas toujours en compte (pour les challenge-tests procédé) l'ensemble des étapes du procédé. Cette méthodologie peut conduire à une sous-estimation de la population bactérienne, et à une surestimation, de la date limite de consommation de l'aliment.

L'observation de croissances plus rapides après un traitement thermique, osmotique, ... a déjà été rapportée dans la littérature. Buchanan et Klawitter (1991) ont montré qu'à 5°C, dans de la viande de bœuf, le taux maximal de croissance de *Listeria* est augmenté de 23%, lorsque la bactérie est pré-incubée à 37°C, au lieu de 19°C. Pour des chocs thermiques, McKellar *et al.* (1997) montrent que seules les bactéries les plus résistantes peuvent survivre au choc, réparer les dommages et croître à nouveau. La reprise de la croissance est due à une petite fraction de l'inoculum d'origine, dont le taux maximal de croissance est plus élevé que celui de la population globale (McKellar, 1997). Cette hétérogénéité de la population bactérienne, suite à des variations de conditions environnementales, a été soulignée par McMeekin et Ross (1996). L'existence de différentes fractions d'une même population bactérienne, avec des

sensibilités différentes à la température, a été modélisée dans le cas de destruction thermique par Cerf (1977), cité par Xiong *et al* (1999). D'autres auteurs font l'hypothèse que la croissance plus rapide des bactéries après un choc thermique est due aux modifications structurales et chimiques de la matrice (Bailey *et al* (1987), Kim *et al* (1993), cités par James *et al* (2000)).

Dans le module « microbiologique » nous avons supposé que, lors du refroidissement après étuvage, *Listeria* reprenait sa croissance, dès que la température devenait inférieure à la température maximale de croissance, et ce, sans induction d'une période de latence. Les données expérimentales, obtenues pour un stockage à 4°C et 20°C, nous permettent de confirmer cette hypothèse.

Pour les étuvages 4h/42°C et 1h/48°C suivis d'un stockage à 20°C, plus de 80% des prédictions sont correctes, ou si elles sont incorrectes, sont non dangereuses. Les autres prédictions (20% restantes) concernent des conditions de pH et d' a_w proches de la frontière entre les domaines de croissance et de non croissance. A proximité de cette frontière, la variabilité du comportement de *Listeria* augmente (Begot *et al.*, 1997).

Pour l'étuvage 1h/53°C suivi d'un stockage à 20°C, seulement 60% des prédictions sont correctes ou non dangereuses. Les 40% restantes ne sont pas toujours liées à des conditions proches de la frontière. Après un choc thermique, seule une fraction de la population survit et croit. Le taux maximal de croissance de ces bactéries est plus élevé que celui de la population globale d'origine (McKellar, 1997), mais l'importance de cette fraction est dépendante de l'intensité et de l'amplitude des chocs thermiques. Bellara *et al.* (1999) ont montré que les bactéries acquièrent une résistance au cours du chauffage et synthétisent des protéines de chocs, si les vitesses de montée en température sont inférieures à deux degrés par minute. Dans notre étude, la vitesse d'élévation de température à cœur de l'aliment modèle est plus lente que deux degrés par minute, quel que soit le procédé d'étuvage. Plus on se rapproche de la surface de l'aliment modèle et plus la vitesse d'élévation de température est rapide. A 1,25 mm de la surface, la vitesse d'élévation est supérieure à deux degrés par minute les quatre à cinq premières minutes du traitement thermique. En fonction du procédé et de leur localisation dans la plaque d'aliment modèle, les bactéries acquièrent donc une résistance plus ou moins forte au traitement thermique.

Pour améliorer les prédictions du modèle combiné, il faudrait mieux intégrer l'évolution de la température (intensité et amplitude), en tout point du produit, pour pouvoir évaluer la fraction de la population ayant des potentialités de croissance différentes.

Pour modéliser l'interface croissance/non croissance, Le Marc (2001) et Augustin (1999) calculent la courbe d'iso-réponse pour laquelle le taux maximal de croissance est égal à zéro. Dans notre étude, pour prendre en compte, à la fois, le taux maximal de croissance et le temps de latence, nous avons calculé la courbe correspondant à un accroissement de 1,0 U Log pour définir la frontière croissance/non croissance. En effet, cette approche ne permet pas de tenir compte de la variabilité au voisinage de l'interface croissance/non croissance et il faudrait l'aborder par des modèles probabilistes (Koutsoumanis *et al.*, 2004). Cependant, cette technique demande un grand nombre de données expérimentales, difficiles à obtenir dans les matrices alimentaires. De plus, l'intégration d'un module « probabiliste », avec le module « thermique » et le module « microbiologique de croissance et destruction » n'est pas simple et pose *a priori* des problèmes d'analyse numérique.

L'abaissement de la température de stockage de 20 à 4°C permet de ralentir la croissance de *Listeria* pour les expériences témoin, sans étuvage. Le taux maximal de croissance est correctement prédit par le modèle d'Augustin, alors que le temps de latence est surestimé. En effet, à 4°C, pour un pH de 5,9, le produit [$\mu_{max} \cdot lag$] augmente avec l' a_w : il est inférieur à deux, lorsque l' a_w est de 0,958 (donc proche de la valeur de K calculée à 20°C), et supérieur à huit à a_w 0,966. Ce domaine d' a_w /pH est proche de la frontière entre les domaines de croissance et de non croissance, et de nombreux auteurs ont montré que l'hypothèse [$\mu_{max} \cdot lag = K$] n'était pas vérifiée, lorsque l'on s'approche de cette limite (Robinson *et al.*, 1998 ; Delignette-Muller, 1998 ; Desnier-Lebert, 2004). Cependant, alors que Robinson *et al* (1998) observent une augmentation du produit [$\mu_{max} \cdot lag$] lorsque l' a_w diminue, nous observons une augmentation de ce produit, lorsque l' a_w augmente de 0,958 à 0,966. Le produit [$\mu_{max} \cdot lag$] étant interprété comme le travail que les bactéries doivent accomplir avant d'entrer en division (Robinson *et al.*, 1998), il est inattendu qu'il augmente, lorsque l'on se rapproche des conditions optimales de croissance. C'est pourquoi d'autres données expérimentales doivent être obtenues avant de valider le modèle que nous avons proposé pour prédire le temps de latence à 4°C.

Dans les trois conditions d'étuvage étudiées et pour un stockage à 4°C, le modèle sous-estime la croissance de *Listeria*. Lors du stockage à 20°C, seul l'étuvage 1h/53°C pose problèmes au niveau des prédictions. En stockant à 4°C, c'est-à-dire en amplifiant l'intensité et l'amplitude du refroidissement, les trois conditions d'étuvage sont mal prédites. De ce fait, les hypothèses concernant la présence de fraction de population ayant des potentialités de croissance différente semblent se confirmer.

L'approche que nous avons développée pour prendre en compte l'étuvage ne permet pas de prédire tous les comportements observés. Il n'en reste pas moins que c'est un outil de simulation utile pour déterminer l'influence d'une modification de procédé (abaissement de la température, ajout d'un inhibiteur ...) sur la durée de conservation des lardons. Nous avons appliqué notre modèle combiné, pour calculer la limite autorisée de 100 UFC.g⁻¹ de *Listeria* dans les lardons à la date limite de consommation (DLC), en considérant une contamination initiale de 1 UFC.g⁻¹. La Figure 51 donne la frontière 100 UFC.g⁻¹ pour quatre situations. Le domaine situé en dessous de cette frontière correspond à un produit dont la contamination reste inférieure à 100 UFC.g⁻¹. A l'opposé, le domaine situé au-dessus correspond à un produit, dont la contamination est supérieure à 100 UFC.g⁻¹.

Par rapport au domaine d'a_w et de pH des lardons du commerce, l'ajout de 0,3% d'acétate de sodium, combiné à un stockage à 4°C, permet de garantir un produit ayant, à sa DLC, moins de 100 UFC.g⁻¹ de *Listeria*.

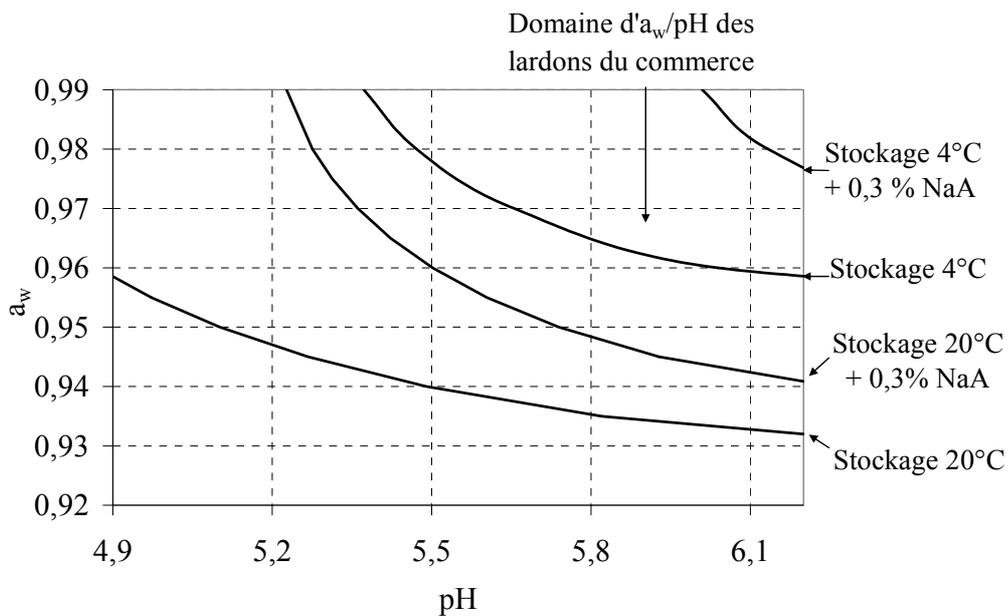


Figure 51 : évolution de la limite prédite pour laquelle la population de L. monocytogenes est égale à 100 UFC.g⁻¹ (contamination initiale égale à 1 UFC.g⁻¹), en fonction de la température de stockage et de la présence d'acétate de sodium (NaA), en condition statique de température

La limite prédite à 20°C est calculée à l'issue de sept jours de stockage,

La limite prédite à 4°C est calculée à l'issue de 45 jours de stockage (durée de conservation moyenne des lardons)

-Conclusion-

Au cours de ce travail de thèse, nous avons étudié le comportement de *Listeria*, lors du procédé de fabrication et du stockage de lardons. Pour cela, nous avons reproduit les principales étapes du procédé, en simulant une contamination de la matière première en début de procédé, et travaillé avec un aliment modèle, *i.e.* de la viande de porc hachée. Nous avons abordé le problème selon deux angles : un angle « expérimental » afin de disposer d'une base de données, et un angle « modélisation » pour développer un modèle prédictif du comportement de *Listeria*.

Nous nous sommes intéressés à l'influence de paramètres physique (température) ou chimiques (a_w , pH, présence d'inhibiteurs) sur la croissance, l'inhibition ou la destruction de *Listeria* dans de la viande de porc ionisée, préalablement hachée. Nous avons mis en place différents plans factoriels et vérifié que :

- le pH et l' a_w influencent la croissance de *Listeria* : quand ces deux paramètres baissent, la croissance de *Listeria* est ralentie et la latence est plus longue,
- cette influence est d'autant plus forte que l'on s'approche des conditions limites de croissance, où l'existence d'interactions entre le pH et l' a_w a été mise en évidence.

De même, nous avons mis en évidence l'effet inhibiteur de trois sels d'acides organiques (acétate de sodium, lactate de sodium et sorbate de potassium), et d'une fumée liquide, sur le développement de *Listeria* : la croissance est d'autant plus ralentie que la concentration en inhibiteur est forte, et que le pH et l' a_w sont bas. Toutefois, aucune destruction de *Listeria* n'a été obtenue, même aux concentrations les plus élevées. L'ajout simultané de deux sels d'acides s'est rarement traduit par une synergie d'effet, et seulement, lorsque le pH et l' a_w ne sont pas conjointement élevés.

Enfin, nous nous sommes intéressés à l'évolution de la température du produit, lors de l'étuvage et du stockage, et à son influence sur le développement de *Listeria*. Nous avons observé que l'étape d'étuvage pouvait entraîner une destruction partielle de la population de *Listeria*. Cependant, cette destruction est compensée en totalité par la suite, lors du stockage.

Nous avons abordé la modélisation du procédé de fabrication des lardons en nous imposant deux contraintes, à savoir :

- que le modèle combiné puisse représenter tous les procédés d'étuvage actuels et futurs (modification de l'amplitude et de l'intensité de la variation de température, durée de l'opération), sans avoir à identifier un ou plusieurs paramètres caractéristiques
- et que le modèle soit développé avec des outils simples de modélisation (macros sous Excel), afin de pouvoir le distribuer aisément auprès des professionnels de la filière.

Ces contraintes se sont traduites par des simplifications, parfois importantes, du module « thermique ».

L'approche suivie combine, donc, un module « microbiologique » qui décrit la croissance ou la destruction de *Listeria* en fonction de paramètres physico-chimiques étudiés précédemment, et un module « thermique », qui prédit l'évolution spatiale et temporelle de la température dans l'aliment.

Le module « microbiologique » comporte deux sous-modules qui permettent de distinguer deux comportements de *Listeria* :

- le sous-module « croissance » utilise le modèle primaire de Rosso *et al.* (modèle logistique avec délai et rupture, 1996), et le modèle secondaire de Rosso, complété par Augustin (1999), en intégrant l'effet des inhibiteurs et l'existence d'interactions entre facteurs. Ce sous-module prédit correctement l'évolution de contamination de *Listeria* dans une mûlée de viande de porc à 20°C, en fonction du pH, de l' a_w et de la présence d'un inhibiteur. En présence de deux sels d'acides organiques, dans la gamme de concentration testée, seul l'inhibiteur ajouté à la plus forte concentration doit être pris en compte pour la modélisation.

De plus, la frontière entre les domaines de croissance et d'absence de croissance est correctement prédite.

Lorsque la température de stockage est de 4°C (en l'absence d'étuvage), le taux maximal de croissance est bien prédit par le modèle secondaire. La valeur du temps de latence ne peut être déduite de sa relation de proportionnalité avec le taux maximal de croissance.

- le sous-module « destruction » utilise les modèles classiques, avec les paramètres de thermodestruction D_0 et z . La destruction de *Listeria* observée lors des procédés d'étuvage est correctement prédite.

Le module « thermique » décrit la conduction de la chaleur par la loi de Fourier, en considérant que les phénomènes de transferts s'effectuent essentiellement dans l'épaisseur du produit. Pour tenir compte de la deuxième contrainte évoquée précédemment, nous avons découpé le produit en sections d'épaisseur égale et considéré que la température était constante à l'intérieur de celles-ci. Le module « thermique » donne des prédictions satisfaisantes de l'évolution de température de l'aliment modèle, pour les trois procédés d'étuvages testés et les deux températures de stockage. L'avantage de ce module est de pouvoir simuler tout autre procédé d'étuvage : modification de la durée ou de la température du procédé, de la vitesse de montée et de descente en température.

La combinaison des deux modules donne des prédictions raisonnables de l'évolution de contamination de *Listeria*, au cours du procédé de fabrication des lardons et de leur stockage, en fonction du procédé d'étuvage appliqué, de la formulation de la saumure (a_w , pH, nature(s) et concentration(s) en inhibiteur(s)) et de la température de stockage. Le modèle ne donne pas de prédictions satisfaisantes dans le cas d'un étuvage suivi d'un stockage à 4°C. Les prédictions pourraient être améliorées, en tenant compte du fait que le traitement thermique sélectionne une fraction de la population bactérienne ayant des potentialités de croissance différentes de celles de la population initialement présente dans l'aliment modèle. Le modèle combiné prédit enfin correctement la frontière entre les domaines de croissance et d'absence de croissance de *Listeria*. Il peut également être utilisé pour simuler la frontière, pour laquelle la concentration en *Listeria* est égale à 100 UFC.g⁻¹, à la date limite de consommation du produit.

Ce travail est une étape dans la mise au point de modèles combinés, prenant en compte l'évolution des paramètres physico-chimiques d'un aliment, lors de sa fabrication ou de son stockage. Plusieurs voies existent, afin d'améliorer les prédictions de notre modèle ou pour prendre en compte d'autres paramètres caractérisant le procédé, la formulation ou le produit :

- il faudrait caractériser les évolutions du produit (en termes de structure et de disponibilité des nutriments), au cours d'un traitement thermique, afin d'expliquer le comportement de *Listeria*, lors d'un procédé comportant un étuvage 1h/53°C ;
- il serait intéressant de décrire et modéliser le comportement de *Listeria* en présence d'autres bactéries. En effet, la viande utilisée dans cette étude a été ionisée pour s'affranchir des interactions entre *Listeria* et la flore naturellement présente, principalement, la flore lactique (Sabia *et al.*, 2003). Or, les bactéries lactiques modifient le milieu, en l'acidifiant, et en produisant des bactériocines (Duffes *et al.*, 1999) ;

- la prise en compte des inhibiteurs dans le modèle devrait être étendue aux nitrites et aux nitrates, ingrédients de base utilisés en salaison (Durand, 1999). Le nitrite modifie le potentiel d'oxydoréduction qui influence le développement bactérien (Ouvry *et al.*, 2002). Il serait nécessaire de modéliser l'effet du nitrite sur la croissance de *Listeria*, en tenant compte de son action sur le potentiel d'oxydoréduction ;
- il serait souhaitable de passer de l'aliment modèle (viande de porc hachée) au produit réel (le lardon). Cependant, une telle démarche se traduirait par une complexification du modèle, car il faudrait prendre en compte :
 - que lors du procédé, un séchage a lieu en surface du produit, ce qui modifie localement l' a_w et entraîne une déformation de ce dernier,
 - d'autres transferts de chaleur (convection, rayonnement et évaporation).
- les transferts de matière qui peuvent influencer le comportement de *Listeria* ne se limitent pas aux transferts d'eau. Il faudrait ainsi s'intéresser aux transferts de sel dans la matrice alimentaire, au cours du procédé de fabrication et du stockage, sans oublier le cas des inhibiteurs ;
- il serait indispensable d'améliorer notre connaissance du comportement de *Listeria* pour des situations rencontrées dans le procédé de fabrication des lardons : réponse à un choc (thermique, osmotique et acide), notamment en terme de physiologie, comportement de part et d'autre de la température maximale de croissance.

Notre travail a permis de répondre en grande partie à la question initiale « quel est le comportement de *Listeria* lors du procédé de fabrication des lardons et lors du stockage avant consommation ? ». Le modèle combiné que nous avons mis au point répond aussi aux deux contraintes imposées : représentation des étuvages présents ou futurs et outil simple à transférer. Cet outil est, dès à présent, utilisable pour prédire les frontières entre les domaines de croissance et d'absence de croissance, et pour aider à la détermination des dates limite de consommation des produits de charcuterie/salaison, en cas de modification du procédé de fabrication.

-Références bibliographiques-

-A-

ADAMS, M.R., LITTLE, C.R. et EASTER, M.C. Modelling the effect of pH, acidulant and temperature on the growth rate of *Yersinia enterocolitica*. *Journal of Applied Bacteriology*, 1991, 71, 65-71.

AFSSA. Rapport Sel : évaluation et recommandations, AFSSA, Maisons-Alfort, 2002. 200p.

AUGUSTIN, J.C., CARLIER, V. et ROZIER, J. Mathematical modelling of the heat resistance of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Applied Microbiology*, 1998, 84, 185-191.

AUGUSTIN, J.C. Modélisation de la dynamique de croissance des populations de *Listeria monocytogenes* dans les aliments. 156p. *Thèse de Doctorat*, Université Claude Bernard, Lyon 1. 1999.

-B-

BAILEY, J.S., THOMSON, J.E., et COX, N.A. Contamination of poultry during processing. The microbiology of poultry meat products, CUNNINGHAM F.E. et COX N.A., Academic Press, Londres, Angleterre 1987. 193-211.

BARMPALIA, I.M., KOUTSOUMANIS, K., GEORNARAS, I. , BELK, K.E., SCANGA, J.A., KENDALL, P.A., SMITH, G.C. et SOFOS, J.N. Effect of antimicrobials as ingredients of pork bologna for *Listeria monocytogenes* control during storage at 4 or 10°C. *Food Microbiology*, 2005, (22), 205-211.

BAUCOUR, P. Mesure des isothermes de sorption dans les hautes humidités. Modélisation du couplage transfert d'eau et croissance bactérienne en surface des viandes. 130p. *Thèse de Doctorat*, Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand II. 2000.

BEGOT, C., DESNIER, I., DAUDIN, J.-D., LABADIE, J.C. et LEBERT, A. Recommendations for calculating growth parameters by optical density measurements. *Journal of Microbiological Methods*, 1996, 25, 225-232.

BEGOT, C., LEBERT, I. et LEBERT, A. Variability of the response of 66 *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* strains to different growth conditions. *Food Microbiology*, 1997, 14(5), 403-412.

BELLARA, S.R., FRYER P.J., MCFARLANE C.M., THOMAS, C.R., HOCHING, P.M. et MACKEY, B.M. Visualization and modelling of the thermal inactivation of bacteria in a model food. *Applied and environmental Microbiology*, 1999, 65(7), 3095-3099.

BHADURI, S., SMITH, P.W., PALUMBO, S.A., TURNER-JONES, C.O., SMITH, J.L., MARMER, B.S., BUCHANAN, R.L., ZAIKA, L.L. et WILLIAMS, A.C. Thermal destruction of *Listeria monocytogenes* in liver sausage slurry. *Food Microbiology*, 1991, 8, 75-78.

BIGELOW, W.D. The logarithmic nature of thermal death time curves. *Journal of Infectious Diseases*, 1921, 29, 528.

BIMBENET, J.J., DUQUENOY, A. et TRYSTRAM, G. Génie des procédés alimentaires, Dunod, Paris, 2002. 303p.

BOURGEOIS, C.M., MESCLE, J.F. et ZUCCA, J. Microbiologie alimentaire, Lavoisier Tec & Doc, Paris, 1996. 672p.

BOVILL, R., BEW, J., COOK, N., D'AGOSTINO, M., WILKINSON, N. et BARANYI, J. Predictions of growth for *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* during fluctuating temperature. *International Journal of Food Microbiology*, 2000, 59(3), 157-65.

BRÉAND, S. Etude biométrique de la réponse d'une population bactérienne à une variation défavorable de température ou de pH. 191p. *Thèse de Doctorat*, Université Claude Bernard, Lyon 1. 1998.

BUCHANAN, R.L., STAHL, H.G. et WHITING, R.C. Effects and interactions of temperature, pH, atmosphere, sodium chloride, and sodium nitrite on the growth of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*, 1989, 52(12), 844-851.

BUCHANAN, R.L. et KLAWITTER, L.A. Effect of temperature history on the growth of *Listeria monocytogenes* Scott A at refrigeration temperature. *International Journal of Food Microbiology*, 1991, 12, 235-246.

BUCHANAN, R.L., GOLDEN, M.H. et WHITING, R.C. Differentiation of the effects of pH and lactic or acetic acid concentration on the kinetics of *Listeria monocytogenes* inactivation. *Journal of Food Protection*, 1993, 56, 474-478.

-C-

CAMMACK, R., JOANNOU, C.L., CUI, X.Y., TORRES-MARTINEZ, C., MARAJ, S.J. et HUGHES, M. Nitrite and nitrosyl compounds in food preservation. *Biochimica et biophysica Acta*, 1999, 478-488.

CARCIOFI, B.A.M., FAISTEL, J., ARAGAO, G.M.F. et LAURINDO, J.B. Determination of thermal diffusivity of mortadella using actual cooking process data. *Journal of Food Engineering*, 2002, 55, 89-94.

CERF, O., DAVEY, K.R. et SADOUDI, A.K. Thermal inactivation of bacteria-a new predictive model for the combined effect of three environmental factors: temperature, pH and water activity. *Food Research International*, 1996, 29(3-4), 219-226.

CERF, O. Tailing of survival curves of bacterial spores. *Journal of applied bacteriology*, 1977, 42, 1-9.

CHARLES-BAJARD, S. Modélisation à visée prévisionnelle de la cinétique de croissance d'une population de *Listeria monocytogenes* dans les aliments. 156p. *Thèse de Doctorat*, Université Claude Bernard, Lyon 1. 1996.

CHAWLA, C.S., CHEN, H. et DONNELLY, C.W. Mathematically modeling the repair of heat-injured *Listeria monocytogenes* as affected by temperature, pH, and salt concentration. *International Journal of Food Microbiology*, 1996, 30(3), 231-42.

CHEROUTRE-VIALETTE, M. Croissance de *Listeria monocytogenes* soumise à des chocs acides, basiques et osmotiques. Mesure et modélisation. 100p. *Thèse de Doctorat*, Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand II. 1999.

CHICK, H. An investigation of the laws of disinfection. *Journal of Hygiene of Cambridge*, 1908, 8, 92-158.

COUVERT, O., LEGUERINEL, I. et MAFART, P. Modelling the overall effect of pH on the apparent heat resistance of *Bacillus cereus* spores. *International Journal of Food microbiology*, 1999, 49(1-2), 57-62.

CTSCCV. Code des usages de la charcuterie, de la salaison et des conserves de viandes, CTSCCV, Maisons Alfort, 1997. 528p.

-D-

DALGAARD, P. et JORGENSEN, L.V. Predicted and observed growth of *Listeria monocytogenes* in seafood challenge tests and in naturally contaminated cold-smoked salmon. *International Journal of Food Microbiology*, 1998, 40(1-2), 105-115.

DELIGNETTE-MULLER, M.L. Relation between the generation time and the lag time of bacterial growth kinetics. *International Journal of Food Microbiology*, 1998, 43, 97-104.

DEMEYER, D. Meat fermentation: principles and applications. Handbook of food and beverage fermentation technology, HUI H., MEUNIER-GODDIK L., HANSEN A.S., JOSEPHSEN J., STANFIELD P.S., et TOLDRA F., Marcel Dekker, Inc, New York, USA 2004. 353-369.

DESNIER-LEBERT, I. Prédiction de la croissance de *Listera innocua* par une approche phénoménologique : modélisations complémentaires des propriétés du milieu, des transferts d'eau et des cinétiques. 186p. *Thèse de Doctorat*, Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand II. 2004.

DE VALK, H., ROCOURT, J., LEQUERREC, F., JACQUET, Ch., VAILLANT, V., PORTAL, H., PIERRE, O., PIERRE, V., STAINER, F., SALVAT, G. et GOULET, V. Bouffée épidémique de listériose liée à la consommation de rillettes. *Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire*, 2000, 4, 15-17.

DEVLIEGHIERE, F., GEERAERD, A.H., VERSYCK, K.J., VANDEWAETERE, B., VAN IMPE, J. et DEBEVERE, J. Growth of *Listeria monocytogenes* in modified atmosphere packed cooked meat products: a predictive model. *Food Microbiology*, 2001, 18, 53-66.

DOYLE, E. Control of *Listeria* in meat. Litterature survey of the various techniques used in *Listeria* intervention, Food Research Institute, University of Wisconsin-Madison, 1999. 24p.

DOYLE, M.E., MAZZOTTA, A.S., WANG, T., WISEMAN, D.W. et SCOTT, V.N. Heat resistance of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*, 2001, 64(3), 410-429.

DUFFES, F., LEROI, F., BOYAVAL, P. et DOUSSET, X. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by *Carnobacterium spp.* strains in a simulated cold smoked fish system stored at 4 degrees C. *International Journal of Food Microbiology*, 1999, 47(1-2), 33-42.

DURAND, P. Technologie des produits de charcuterie et des salaisons, Tec & Doc, Paris, 1999. 530p.

-F-

FAIN, A.R., LINE, J.E., MORAN, A.B., MARTIN, L.M., LECHHOWICH, R.V., CAROSELLA, J.M. et BROWN, W.L. Lethality of heat to *Listeria monocytogenes* Scott A: D-value and z-value determinations in ground beef and turkey. *Journal of Food Protection*, 1991, 54, 756-761.

FAITH, N.G., YOUSEF, A.E. et LUCHANSKY J.B. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by liquid smoke and isoeugenol, a phenolic component found in smoke. *Journal of Food Safety*, 1992, 12(4), 303-314.

FARBER, J.M. Thermal resistance of *Listeria monocytogenes* in foods. *International Journal of Food Microbiology*, 1989, 8(3), 285-291.

FARBER, J.M., SANDERS, G.W. et DUNFIELD, S. The effect of various acidulants on the growth of *Listeria monocytogenes*. *Letters in Applied Microbiology*, 1989, 9, 181-183.

FARBER, J.M., MCKELLAR, R.C. et ROSS, W.H. Modelling the effects of various parameters on the growth of *Listeria monocytogenes* on liver pâté. *Food Microbiology*, 1995, 12, 447-453.

FARKAS, J. Irradiation as a method for decontaminating food. A review. *International Journal of Food Microbiology*, 1998, 44(3), 189-204.

FICT. Guides de bonnes pratiques d'hygiène, FICT, Paris, 2000. 476p.

FICT. Production Industrielle Française 2003. Charcuteries-salaisons - plats cuisinés - produits traiteurs - conserves de viandes, FICT, Paris, 2004. 8p.

FRANK, J.F. et KOFFI, R.A. Surface adherent growth of *Listeria monocytogenes* is associated with increased resistance to surfactant sanitizers and heat. *Journal of Food Protection*, 1990, (53), 550-554.

FRENTZ, J.C. et JUILLARD, A. L'encyclopédie de la charcuterie, Maé/Erti, Paris, 2003. 1376p.

-G-

GAILLARD, S., LEGUERINEL, I. et MAFART, P. Modelling combined effects of temperature and pH on the heat resistance of spores of *Bacillus cereus*. *Food Microbiology*, 1998, 15, 625-630.

GIANNUZZI, L. et ZARITZKY, N.E. Effect of Ascorbic Acid in Comparison to Citric acid and Lactic Acid on *Listeria monocytogenes* Inhibition at Refrigeration Temperatures. *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie*, 1996, 29, 278-285.

GILL, C.O., MCGINNIS, C.J., HOUDE, A., LAMOUREUX, L. et LEBLANC, D. Microbiological conditions of moisture-enhanced pork before and after cooking. *Food Microbiology*, 2005, 22, 321-327.

GIOVANNACCI, I., RAGIMBEAU, C., QUEGUINER, S., SALVAT, G., VENDEUVRE, J.-L., CARLIER, V. et ERMEL, G. *Listeria monocytogenes* in pork slaughtering and cutting plants use of RAPD, PFGE and PCR-REA for tracing and molecular epidemiology. *International Journal of Food Microbiology*, 1999, 53, 127-140.

GIRARD, J.P. Technologie de la viande et des produits carnés, Lavoisier Tec et Doc, Paris, 1988. 280p.

GOULET, V., JACQUET, C., MARTIN, P., VAILLANT, V., LAURENT, E. et DE VALK, H. Surveillance de la listériose humaine en France, 2001. *Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire*, 2004, 9, 33-36.

-H-

HOUTSMA, P. C., DE WIT, J. C. et ROMBOUTS, F. M. Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of sodium lactate for pathogens and spoilage organisms occurring in meat products. *International Journal of Food Microbiology*, 1993, 20(4), 247-257.

HOUTSMA, P.C., KUSTERS, B.J., DE WIT, J.C., ROMBOUTS, F.M. et ZWIETERING, M.H. Modelling growth rates of *Listeria innocua* as a function of lactate concentration. *International Journal of Food Microbiology*, 1994, 24(1-2), 113-123.

-I-

ICMSF. Micro-organisms in foods: Microbiological specifications of food pathogens, Blackie academic & professional, Londres, Angleterre, 1996. 513p.

-J-

JACQUET, Ch., MIEGEVILLE, A.F., CATIMEL, B., HUYNH, G., COURTIEU, A.-L. et ROCOURT, J. La listériose humaine en France en 1991, 1992 et 1993. Bilan à partir des souches adressées aux centres nationaux de référence. *Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire*, 1994, 28, 123-125.

JAMES, C., GÖKSOY, E.O., CORRY, J.E.L. et JAMES, S.J. Surface pasteurisation of poultry meat using steam at atmospheric pressure. *Journal of Food Engineering*, 2000, 45, 111-117.

JENSEN, J.M., ROBBINS, K.L., RYAN, K.J., HOMO-RYAN, C., MCKEITH F.K. et BREWER, M.S. Effects of lactic acid and acetic acid salts on quality characteristics of enhanced pork during retail display. *Meat Science*, 2003, 63, 501-508.

JORGENSEN, F., STEPHENS, P.J. et KNÖCHEL, S. The effect of osmotic shock and subsequent adaptation on the thermotolerance and cell morphology of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Applied Bacteriology*, 1995, 79, 274-281.

JORGENSEN, F., HANSEN, T.B. et KNOCHEL S. Heat shock-induced thermotolerance in *Listeria monocytogenes* on growth phase pH and lactic acid. *Food Microbiology*, 1999, 16, 185-194.

JUNEJA, V.K., EBLEN, B.S. et MARKS, H.M. Modeling non-linear survival curves to calculate thermal inactivation of *Salmonella* in poultry of different fat levels. *International Journal of Food Microbiology*, 2001, 70(1-2), 37-51.

JUNEJA, V.K. Predictive model for the combined effect of temperature, sodium lactate, and sodium diacetate on the heat resistance of *Listeria monocytogenes* in beef. *Journal of Food Protection*, 2003, 66(5), 804-811.

-K-

KIM, J., SLAVIK, M.F., GRIFFIS, C.L. et WALKER, J.T. Attachment of *Salmonella typhimurium* to skins of chicken scaled at various temperatures. *Journal of Food Protection*, 1993, 56(8), 661-665.

KOUTSOUMANIS, K., KENDALL, P. et SOFOS, J. A comparative study on growth limits of *Listeria monocytogenes* as affected by temperature, pH and a_w when grown in suspension or on a solid surface. *Food Microbiology*, 2004, 21, 415-422.

-L-

LARPENT, J.P. *Listeria*, 2^{ème} édition, Editions Tec & Doc, Paris, 2000. 238p.

LE MARC, Y. Développement d'un modèle modulaire décrivant l'effet des interactions entre les facteurs environnementaux sur les aptitudes de croissance de *Listeria*. 161p. *Thèse de Doctorat*, Université de Bretagne Occidentale. 2001.

LE MARC, Y., HUCHET, V., BOURGEOIS, C.M., GUYONNET, J.P., MAFART, P. et THUAULT, D. Modelling the growth kinetics of *Listeria* as a function of temperature, pH and organic acid concentration. *International Journal of Food Microbiology*, 2002, 73, 219-237.

LEGUERINEL, I., SPEGAGNE, S., COUVERT, O., GAILLARD, S. et MAFART, P. Validation of an overall model describing the effect of three environmental factors on the apparent D-value of *Bacillus cereus* spores. *International Journal of Food Microbiology*, 2005, in press.

LEISTNER, L. Combined methods for food preservation. Handbook of Food Preservation, RAHMAN S., New York, USA, 1999. 457-485.

LEPORQ, B. Protocole de préculture pour obtenir *Listeria monocytogenes* 4b en phase stationnaire. *Compte rendu de réunion du groupe méthodologie Sym' Previus*, 2001.

LISERRE, A.M., LANDGRAF, M., DESTRO, M.T. et FRANCO, B.D. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by a bacteriocinogenic *Lactobacillus sake* strain in modified atmosphere-packaged Brazilian sausage. *Meat Science*, 2002, 61, 449-455.

-M-

MACKEY, B.M., PRITCHET, C., NORRIS, A. et MEAD, G.C. Heat resistance of *Listeria*: strain differences and effects of meat type and curing salts. *Letters in Applied Microbiology*, 1990, 10, 251-255.

MAFART, P. et LEGUERINEL, I. Modelling combined effect of temperature and pH on the heat resistance of spores by a non-linear Bigelow equation. *Journal of Food Science*, 1998, 63, 6-8.

MATARAGAS, M., DROSINOS, E.H. et METAXOPOULOS, J. Antagonistic activity of lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes* in sliced cooked cured pork shoulder stored under vacuum or modified atmosphere at 4 +/- 2°C. *Food Microbiology*, 2003, 20, 259-265.

MBANDI, E. et SHELEF, L.A. Enhanced antimicrobial effects of combination of lactate and diacetate on *Listeria monocytogenes* and *Salmonella spp.* in beef bologna. *International Journal of Food Microbiology*, 2002, 76(3), 191-8.

MCKELLAR, R.C. A heterogeneous population model for the analysis of bacterial growth kinetics. *International Journal of Food Microbiology*, 1997, 36(2-3), 179-186.

MCKELLAR, R.C., BUTLER, G. et STANISH, K. Modelling the influence of temperature on the recovery of *Listeria monocytogenes* from heat injury. *Food Microbiology*, 1997, 14, 617-626.

MCMEEKIN, T.A. et ROSS, T. Shelf life prediction: status and future possibilities. *International Journal of Food Microbiology*, 1996, 33(1), 65-83.

MELDRUM, R.J., BROCKLEHURST, T.F., WILSON, D.R. et WILSON, P.D. The effects of cell immobilization, pH and sucrose on the growth of *Listeria monocytogenes* Scott A at 10°C. *International Journal of Food Microbiology*, 2003, 20, 97-103.

MELLEFONT, L.A., MCMEEKIN, T.A. et ROSS, T. The effect of abrupt osmotic shifts on the lag phase duration of foodborne bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 2003, 83(3), 281-293.

MELLEFONT, L.A. et ROSS, T. The effect of abrupt shifts in temperature on the lag phase duration of *Escherichia coli* and *Klebsiella oxytoca*. *International Journal of Food Microbiology*, 2003, 83(3), 295-305.

MOHSEIN, N.N. Thermal properties of foods and agricultural materials, Gordon and Breach, New York, USA, 1980. 407p.

MORLEY, M.J. Thermal properties of meat: tabulated data, J.W. Arrowsmith Ltd., Bristol, Angleterre, 1972. 48p.

MURPHY, R.Y., MARKS, B.P., JOHNSON, E.R. et JOHNSON, M.G. Thermal inactivation kinetics *Salmonella* and *Listeria* in ground chicken breast and liquid medium. *Journal of Food Science*, 2000, 65(4), 706-710.

-N-

NIEDZIELA, J.C., MACRAE, M., OGDEN, I.D. et NESVADBA, P. Control of *Listeria monocytogenes* in salmon; antimicrobial effect of salting, smoking and specific smoke compounds. *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie*, 1998, 31, 155-161.

NISSEN, H., ALVSEIKE, O., BREDHOLT, S., HOLCK, A. et NESBAKKEN, T. Comparison between the growth of *Yersinia enterocolitica*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella spp.* in ground beef packed by three commercially used packaging techniques. *International Journal of Food Microbiology*, 2000, 59(3), 211-220.

-O-

OUVRY, A., WACHE, Y., TOURDOT-MARECHAL, R., DIVIES, C. et CACHON, R. Effects of oxidoreduction potential combined with acetic acid, NaCl and temperature on the growth, acidification, and membrane properties of *Lactobacillus plantarum*. *FEMS Microbiology Letters*, 2002, 214(2), 257-261.

-P-

PASSOS, M.H. et KUAYE, A.Y. Influence of the formulation, cooking time and final internal temperature of beef hamburgers on the destruction of *Listeria monocytogenes*. *Food Control*, 2002, 13, 33-40.

PIDCOCK, K., HEARD, G.M. et HENRIKSSON, A. Application of nontraditional meat starter cultures in production of Hungarian salami. *International Journal of Food Microbiology*, 2002, 76(1-2), 75-81.

PITZER, K.S. et MAYORGA, G. Thermodynamics of electrolytes. II. Activity and osmotic coefficients for strong electrolytes with one or both ions univalent. *The Journal of Physical Chemistry*, 1973, 77(19), 2300-2308.

POMA, J.P. Le jambon sec et les petites salaisons, Erti, Paris, 1998. 166p.

POYSKY, F.T., PARANJPYE, R.N., PETERSON, M.E., GRETCHEN, A.P., GUTTMAN, A.E. et EKLUND, M.W. Inactivation of *Listeria monocytogenes* on hot-smoked salmon by the interaction of heat and smoke or liquid smoke. *Journal of Food Protection*, 1997, 60(6), 649-654.

-R-

RATKOWSKY, D.A., OLLEY, J., MCMEEKIN, T.A. et BALL, A. Relationship between temperature and growth rate of bacterial cultures. *Journal of Bacteriology*, 1982, 149(1), 1-5.

ROBINS, M.M. et BROCKLEHURST, T.F. Food structure and the growth of pathogenic bacteria. *Food Technology International*, 1994, 31-36.

ROBINSON, T.P., OCIO, M.J., KALOTI, A. et MACKEY, B.M. The effect of the growth environment on the lag phase of *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*, 1998, 44(1-2), 83-92.

ROSSO, L. Modélisation et microbiologie prévisionnelle : élaboration d'un nouvel outil pour l'agroalimentaire. 190p. *Thèse de Doctorat*, Université Claude Bernard, Lyon 1. 1995.

ROSSO, L., BAJARD, S., FLANDROIS, J.P., LAHELLEC, C., FOURNAUD, J. et VEIT, P. Differential growth of *Listeria monocytogenes* at 4 and 8°C: consequences for the shelf life of chilled products. *Journal of Food Protection*, 1996, 59, 944-949.

ROSSO, L. et ROBINSON, T.P. A cardinal model to describe the effect of water activity on the growth of moulds. *International Journal of Food Microbiology*, 2001, 63(3), 265-273.

RYSER, E.T. et MARTH, E.H. Behavior of *Listeria monocytogenes* during the manufacture and ripening of brick cheese. *Journal of Dairy Science*, 1996, 30, 231-242.

-S-

SABIA, C., DE NIEDERHAUSERN, S., MESSI, P., MANICARDI, G. et BONDI, M. Bacteriocin-producing *Enterococcus casseliflavus* IM 416K1, a natural antagonist for control of *Listeria monocytogenes* in Italian sausages ("cacciatore"). *International Journal of Food Microbiology*, 2003, 87(1-2), 173-179.

SAMELIS, J., METAXOPOULOS, J., VLASSI, M. et PAPPA, A. Stability and safety of traditional Greek salami - a microbiological ecology study. *International Journal of Food Microbiology*, 1998, 44(1-2), 69-82.

SEMAN, D.L., BORGER, A.C., MEYER, J.D., HALL, P.A. et MILKOWSKI, A.L. Modeling the growth of *Listeria monocytogenes* in cured ready-to-eat processed meat products by manipulation of sodium chloride, sodium diacetate, potassium lactate, and product moisture content. *Journal of Food Protection*, 2002, 65(4), 651-658.

SOFOS, J.N., MAGA, J.A. et BOYLE, D.L. Effect of ether extracts from condensed wood smokes on the growth of *Aeromonas hydrophila* and *Staphylococcus aureus*. *Journal of Food Science*, 1988, 53, 1840-1843.

SORRELLS, M. Effect of pH, acidulant, time and temperature on the growth and survival of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*, 1989, 52(8), 571-573.

STEKELENBURG, F.K. et KANT-MUERMANS, M.L. Effects of sodium lactate and other additives in a cooked ham product on sensory quality and development of a strain of *Lactobacillus curvatus* and *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*, 2001, 66(3), 197-203.

SUNEN, E. Minimum inhibitory concentration of smoke wood extracts against spoilage and pathogenic micro-organisms associated with foods. *Letters in Applied Microbiology*, 1998, 27, 45-48.

SUNEN, E., FERNANDEZ-GALIAN, B. et ARISTIMUNO, C. Antibacterial activity of smoke wood condensates against *Aeromonas hydrophila*, *Yersinia enterocolitica* and *Listeria monocytogenes* at low temperature. *Food Microbiology*, 2001, 18, 387-393 .

SUNEN, A., ARISTIMUNO, C. et FERNANDEZ-GALIAN, B. Activity of smoke wood condensates against *Aeromonas hydrophila* and *Listeria monocytogenes* in vacuum-packaged, cold-smoked rainbow trout stored at 4°C. *Food Research International*, 2003, 36, 111-116 .

-U-

USDA-ARS-ERRC Pathogen Modelling Program 7.0. www.arserrc.gov/mfs/pathogen.htm, 2005.

-V-

VAN IMPE, J.F., NICOLAI, B.M., MARTENS, T., DE BAERDEMAEKER, J. et VANDEWALLE, J. Dynamic mathematical model to predict microbial growth and inactivation during food processing. *Applied and Environmental Microbiology*, 1992, 58(9), 2901-2909.

VAN IMPE, J.F., NICOLAI, B.M., SCHELLEKENS, M., MARTENS, T. et DE BAERDEMAEKER, J. Predictive microbiology in a dynamic environment: a system theory approach. *International Journal of Food Microbiology*, 1995, 25, 227-249.

VERMEIREN, L., DEVLIEGHERE, F. et DEBEVERE, J. Evaluation of meat born lactic acid bacteria as protective cultures for the biopreservation of cooked meat products. *International Journal of Food Microbiology*, 2004, 96(2), 149-164.

VIGNOLO, G., FADDA, S., KAIRUZ, M.N., HOLGADO, R. et OLIVIER, G. Effects of curing additives on the control of *Listeria monocytogenes* by lactocin 705 in meat slurry. *Food Microbiology*, 1998, (15), 259-264.

-W-

WANG, L. et SUN, D.W. Modelling vacuum cooling process of cooked meat-part 2: mass and heat transfer of cooked meat under vacuum pressure. *International Journal of Refrigeration*, 2002, 25, 862-871.

WITJES, T., MCCLURE, P.J., ZWIETERING, M.H. et ROBERTS, T.A. Modelling bacterial growth of *Listeria monocytogenes* as a function of water activity, pH and temperature. *International Journal of Food Microbiology*, 1993, 18, 139-149.

-X-

XIONG, R., XIE, G., EDMONDSON, A.E. et SHEARD, M.A. A mathematical model for bacterial inactivation. *International Journal of Food Microbiology*, 1999, 46, 45-55.

-Y-

YEN, L.C., SOFOS, J.N. et SCHMIDT, G.R. Effect of meat curing ingredients on thermal destruction of *Listeria monocytogenes* in ground pork. *Journal of Food Protection*, 1991, 54(6), 408-412.

YEN, L.C., SOFOS, J.N. et SCHMIDT, G.R. Destruction of *Listeria monocytogenes* by heat in ground pork formulated with kappa-carrageenan, sodium lactate and the algin/calcium meat binder. *Food Microbiology*, 1992, 9, 223-230.

-Z-

ZULIANI, V., LEBERT, I. et LEBERT, A. Integrated modelling of food processing and bacterial behaviour. Recent Research Developments in Microbiology, (8), SUDARSAN N.J., Research SignPost, Kerala, Inde, 2004. 295-323.

ZWIETERING, M.H., JONGENBURGER, I., ROMBOUTS, F.M. et VAN'T RIET, K. Modeling the bacterial growth curve. *Applied and Environmental Microbiology*, 1990, 56(6), 1875-1881.

ZWIETERING, M.H., WIJZES, T., DE WIT, J.C. et VAN'T RIET, K. A decision support system for prediction of the microbial spoilage in foods. *Journal of Food Protection*, 1992, 55(12), 973-979.

ZWIETERING, M.H., DE WIT, J.C., CUPPERS, H.G.A.M. et VAN'T RIET, K. Modelling of bacterial growth with shifts in temperature. *Applied and Environmental Microbiology*, 1994, 60(1), 204-213.

-Annexes-

Annexe 1

Rapport d'analyses du CTSCCV : viande de porc hachée ionisée

Analyse	Méthode	Résultat avant étuvage	Résultat après étuvage 1h/53°C	Unité*
Humidité	NF V04-401	74,1 ± 0,7	75,7 ± 0,7	%
Matière grasse libre	NF V04-403	2,2 ± 1,1	1,6 ± 1,1	%
Protéines	NF V04-407	22,6 ± 1,1	21,4 ± 1,1	%
Phosphore total	méthode interne 07-03-05	0,53	0,53	%
Collagène	NF V04-415	0,9 ± 0,7	0,7 ± 0,7	%
Sucres solubles totaux	flux continu	0,25	0,25	%
Glucides totaux	flux continu	0,25	0,25	%
Nitrites	NF V04-409 automatisée	7	7	mg.kg ⁻¹
Nitrates	NF V04-410 modifiée et automatisée	0	0	mg.kg ⁻¹
Chlorures	ISO 1841-2 1996 modifiée	0	0	%
Cendres	NF V04-404	1,11 ± 0,14	1,13 ± 0,14	%

* % ou mg.kg⁻¹ de viande de porc hachée ionisée

Annexe 2

Rapport d'Analyse du CTSCCV : fumée liquide Enviro24

Phénols totaux : 1,6 g.100g⁻¹

Répartition des phénols (dosage par micro extraction en phase solide)

Composé	Moyenne (% de phénols totaux)	Ecart-type
4-éthyl-guaiacol	15,18	0,65
guaiacol	16,70	0,11
4-méthyl-guaiacol	6,15	0,15
phénol, o-crésol	45,54	1,17
p-crésol	10,78	0,11
m-crésol	0,00	0,00
eugénol	3,16	0,43
syringol	2,04	0,19
isoeugénol	0,21	0,03
acétosyringone	0,07	0,00
vanilline	0,13	0,01
acétovanillone	0,03	0,00

Les analyses ont été doublées

Annexe 3

**Protocole de préculture adapté du protocole proposée par
SYM'PREVIUS pour obtenir une population bactérienne de *L.
monocytogenes*
en phase stationnaire (Leporq, 2001)**

1. Ensemencer 10 ml de BHI, conservé à température ambiante, avec une cryobille
2. Incuber au bain-marie agité (150 rpm), à 37°C, pendant 16 heures
 - préculture n° 1, concentration $\approx 10^9$ UFC.ml⁻¹
3. Réaliser une dilution au 1/10^{ème} de la préculture n°1, prélever 60 µl et ensemencer 10 ml de BHI
4. Incuber au bain marie agité (150 rpm), à 37°C, pendant 8 heures.
 - préculture n° 2, concentration $\approx 10^9$ UFC.ml⁻¹
5. Réaliser une dilution au 1/10 000^{ème} de la préculture n°2, prélever 80 µl et ensemencer 10 ml de BHI
6. Incuber au bain marie agité (150 rpm), à 37°C, pendant 16 heures
 - préculture n° 3, en phase stationnaire depuis trois à quatre heures, concentration $\approx 10^9$ UFC.ml⁻¹

Annexe 4 : Table de Fisher, $\alpha' = 0,005$

		Pa-Pb																	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	15	20	30	50	100	200	500	•
$n' - p_a$	1	161	200	216	225	230	234	237	239	241	242	246	248	250	252	253	254	254	254
	2	18,5	19,0	19,2	19,2	19,3	19,3	19,4	19,4	19,4	19,4	19,4	19,4	19,4	19,5	19,5	19,5	19,5	19,5
	3	10,1	9,55	9,28	9,12	9,01	8,94	8,89	8,85	8,81	8,79	8,70	8,66	8,62	8,58	8,55	8,54	8,53	8,53
	4	7,71	6,94	6,59	6,39	6,26	6,16	6,09	6,04	6,00	5,96	5,86	5,80	5,75	5,70	5,66	5,65	5,64	5,63
	5	6,61	5,79	5,41	5,19	5,05	4,95	4,88	4,82	4,77	4,74	4,62	4,56	4,50	4,44	4,41	4,39	4,37	4,37
	6	5,99	5,14	4,76	4,53	4,39	4,28	4,21	4,15	4,10	4,06	3,94	3,87	3,81	3,75	3,71	3,69	3,68	3,67
	7	5,59	4,74	4,35	4,12	3,97	3,87	3,79	3,73	3,68	3,64	3,51	3,44	3,38	3,32	3,27	3,25	3,24	3,23
	8	5,32	4,46	4,07	3,84	3,69	3,58	3,50	3,44	3,39	3,35	3,22	3,15	3,08	3,02	2,97	2,95	2,94	2,93
	9	5,12	4,26	3,86	3,63	3,48	3,37	3,29	3,23	3,18	3,14	3,01	2,94	2,86	2,80	2,76	2,73	2,72	2,71
	10	4,96	4,10	3,71	3,48	3,33	3,22	3,14	3,07	3,02	2,98	2,85	2,77	2,70	2,64	2,59	2,56	2,55	2,54
	11	4,84	3,98	3,59	3,36	3,20	3,09	3,01	2,95	2,90	2,85	2,72	2,65	2,57	2,51	2,46	2,43	2,42	2,40
	12	4,75	3,89	3,49	3,26	3,11	3,00	2,91	2,85	2,80	2,75	2,62	2,54	2,47	2,40	2,35	2,32	2,31	2,30
	13	4,67	3,81	3,41	3,18	3,03	2,92	2,83	2,77	2,71	2,67	2,53	2,46	2,38	2,31	2,26	2,23	2,22	2,21
	14	4,60	3,74	3,34	3,11	2,96	2,85	2,76	2,70	2,65	2,60	2,46	2,39	2,31	2,24	2,19	2,16	2,14	2,13
	15	4,54	3,68	3,29	3,06	2,90	2,79	2,71	2,64	2,59	2,54	2,40	2,33	2,25	2,18	2,12	2,10	2,08	2,07
	16	4,49	3,63	3,24	3,01	2,85	2,74	2,66	2,59	2,54	2,49	2,35	2,28	2,19	2,12	2,07	2,04	2,02	2,01
	17	4,45	3,59	3,20	2,96	2,81	2,70	2,61	2,55	2,49	2,45	2,31	2,23	2,15	2,08	2,02	1,99	1,97	1,96
	18	4,41	3,55	3,16	2,93	2,77	2,66	2,58	2,51	2,46	2,41	2,27	2,19	2,11	2,04	1,98	1,95	1,93	1,92
	19	4,38	3,52	3,13	2,90	2,74	2,63	2,54	2,48	2,42	2,38	2,23	2,16	2,07	2,00	1,94	1,91	1,89	1,88
	20	4,35	3,49	3,10	2,87	2,71	2,60	2,51	2,45	2,39	2,35	2,20	2,12	2,04	1,97	1,91	1,88	1,86	1,84
22	4,30	3,44	3,05	2,82	2,66	2,55	2,46	2,40	2,34	2,30	2,15	2,07	1,98	1,91	1,85	1,82	1,80	1,78	
24	4,26	3,40	3,01	2,78	2,62	2,51	2,42	2,36	2,30	2,25	2,11	2,03	1,94	1,86	1,80	1,77	1,75	1,73	
26	4,23	3,37	2,98	2,74	2,59	2,47	2,39	2,32	2,27	2,22	2,07	1,99	1,90	1,82	1,76	1,73	1,71	1,69	
28	4,20	3,34	2,95	2,71	2,56	2,45	2,36	2,29	2,24	2,19	2,04	1,96	1,87	1,79	1,73	1,69	1,67	1,65	
30	4,17	3,32	2,92	2,69	2,53	2,42	2,33	2,27	2,21	2,16	2,01	1,93	1,84	1,76	1,70	1,66	1,64	1,62	
40	4,08	3,23	2,84	2,61	2,45	2,34	2,25	2,18	2,12	2,08	1,92	1,84	1,74	1,66	1,59	1,55	1,53	1,51	
50	4,03	3,18	2,79	2,56	2,40	2,29	2,20	2,13	2,07	2,03	1,87	1,78	1,69	1,60	1,52	1,48	1,46	1,44	
60	4,00	3,15	2,76	2,53	2,37	2,25	2,17	2,10	2,04	1,99	1,84	1,75	1,65	1,56	1,48	1,44	1,41	1,39	
80	3,96	3,11	2,72	2,49	2,33	2,21	2,13	2,06	2,00	1,95	1,79	1,70	1,60	1,51	1,43	1,38	1,35	1,32	
100	3,94	3,09	2,70	2,46	2,31	2,19	2,10	2,03	1,97	1,93	1,77	1,68	1,57	1,48	1,39	1,34	1,31	1,28	
200	3,89	3,04	2,65	2,42	2,26	2,14	2,06	1,98	1,93	1,88	1,72	1,62	1,52	1,41	1,32	1,26	1,22	1,19	
500	3,86	3,01	2,62	2,39	2,23	2,12	2,03	1,96	1,90	1,85	1,69	1,59	1,48	1,38	1,28	1,21	1,16	1,11	
•	3,84	3,00	2,60	2,37	2,21	2,10	2,01	1,94	1,88	1,83	1,67	1,57	1,46	1,35	1,24	1,17	1,11	1,00	

-Publications, articles
et communications-

Liste des publications, chapitre d'ouvrage et articles

	Page
<u>Publication acceptée à Journal of Applied Microbiology</u>	187
J.C. AUGUSTIN, V. ZULIANI, M. CORNU, L. GUILLIER. Growth rate and growth/no growth boundaries of <i>Listeria monocytogenes</i> in dairy products, meat products and seafood products in suboptimal conditions.	
<u>Chapitre d'ouvrage publié dans Recent Research Developments in Microbiology</u>	211
V. ZULIANI, I. LEBERT, A. LEBERT. Integrated modelling of food processing and bacterial behaviour, 2004 (8), p 295-323, Research SignPost, Kerala, Inde.	
<u>Publication soumise à International Journal of Food Microbiology (en juin 2004)</u>	241
V. ZULIANI, I. LEBERT, P. GARRY, J.L. VENDEUVRE, J.C. AUGUSTIN, A. LEBERT. Effects of heat processing regime, pH, water activity and their interactions on the behaviour of <i>Listeria monocytogenes</i> in ground pork.	
<u>Article publié dans le Bulletin de liaison du Centre Technique de la Salaison de la Charcuterie et des Conserves de Viandes</u>	267
V. ZULIANI. La microbiologie prévisionnelle : un outil pour l'optimisation de la formulation et du procédé, bulletin du CTSCCV, 2004, (1), 14, p 33-34.	
<u>Article publié dans la revue Salles propres et maîtrises de la contamination (Association pour la prévention et l'étude de la contamination)</u>	269
V. ZULIANI, P. GARRY. Les germes pathogènes dans l'industrie agroalimentaire, Salles propres et maîtrises de la contamination, 2004, 31, p 12-16.	

Liste des communications dans des congrès

- | | Page |
|---|------|
| <p><u>Première Conférence Internationale sur la microbiologie environnementale, industrielle et appliquée, BioMicroWorld, Badajoz, Espagne, 15-18 mars 2005</u></p> <p>Communication orale</p> <p>V. ZULIANI, P. GARRY, J.L. VENDEUVRE, J.C. AUGUSTIN, I. LEBERT, A. LEBERT. Integrated modelling of food process and bacterial behaviour: application for predicting the evolution of <i>L. monocytogenes</i> contamination during delicatessen process.</p> | 275 |
| <p><u>Sixième Congrès National de la Société Française de Microbiologie, SFM, Bordeaux, France, 10-12 mai 2004</u></p> <p>Communication par poster</p> <p>V. ZULIANI, I. LEBERT, P. GARRY, J.C. AUGUSTIN, J.L. VENDEUVRE, A. LEBERT. Effets comparés de deux sels de sodium (chlorure et lactate) et du pH sur l'interface croissance/non croissance de <i>L. monocytogenes</i> dans la viande de porc.</p> | 277 |
| <p><u>Neuvième Congrès International de Génie des Procédés alimentaires, ICEF9, Montpellier, France, 7-11 mars 2004</u></p> <p>Communication par poster</p> <p>V. ZULIANI, I. LEBERT, P. GARRY, J.C. AUGUSTIN, J.L. VENDEUVRE, A. LEBERT. Validation of the Augustin γ-concept model for <i>Listeria monocytogenes</i> in ground pork as a function of pH, water activity and steam conditions.</p> | 279 |
| <p><u>Journées de l'école doctorale, Ecole Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé, Clermont Ferrand, France, 4-5 mars 2004</u></p> <p>Communication orale</p> <p>V. ZULIANI, P. GARRY, A. LEBERT. Modélisation des conditions de croissance et de survie de <i>Listeria monocytogenes</i> dans la viande de porc traitée en salaison.</p> | 285 |

Quatrième colloque international de modélisation prévisionnelle dans les aliments, 287

Quimper, France, 16-19 juin 2003

Communication par poster

V. ZULIANI, P. GARRY, J.L. VENDEUVRE, J.C. AUGUSTIN, I. LEBERT, A. LEBERT. Growth of *Listeria monocytogenes* in ground pork as a function of pH and water activity. In : Predictive Modelling in Foods – Conference proceedings (15-19 juin 2003, Quimper, France), éditeurs : J.F.M. Van Impe, A.H. Geeraerd, I. Leguérinel, P. Mafart, Belgique, 2003, p 43-45.

Growth rate and growth probability of *Listeria monocytogenes* in dairy, meat and seafood products in suboptimal conditions

J.-C. Augustin¹, V. Zuliani^{2,3}, M. Cornu⁴ and L. Guillier^{1,5}

¹Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, Maisons-Alfort, ²Centre Technique de la Salaison, de la Charcuterie et des Conservés de Viandes, Maisons-Alfort, ³Unité de Recherches Qualité des Produits Animaux, Institut National de la Recherche Agronomique, Saint-Genès Champanelle, ⁴Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments, Maisons-Alfort, and ⁵Arilait Recherches, Paris, France

2005/0217: received 2 March 2005, revised 18 May 2005 and accepted 1 June 2005

ABSTRACT

J.-C. AUGUSTIN, V. ZULIANI, M. CORNU AND L. GUILLIER. 2005.

Aims: To evaluate the performances of models predicting the growth rate or the growth probability of *Listeria monocytogenes* in food.

Methods and Results: Cardinal and square root type models including or not interactions between environmental factors and probability models were evaluated for their ability to describe the behaviour of *L. monocytogenes* in liquid dairy products, cheese, meat and seafood products. Models excluding interactions seemed sufficient to predict the growth rate of *L. monocytogenes*. However, the accurate prediction of growth/no-growth limits needed to take interactions into account. A complete and a simplified form (preservatives deducted) of a new cardinal model including interactions and parameter values were suggested to predict confidence limits for the growth rate of *L. monocytogenes* in food. This model could also be used for the growth probability prediction.

Conclusions: The new cardinal model including interactions was efficient to predict confidence limits for the growth rate of *L. monocytogenes* and its growth probability in liquid dairy products, meat and seafood products. In cheese, the model was efficient to predict the absence of growth of the pathogen.

Significance and Impact of the Study: The suggested model can be used for risk assessment and risk management concerning *L. monocytogenes* in dairy, meat and seafood products.

Keywords: dairy products, growth rate, growth/no-growth interface, *Listeria monocytogenes*, meat products, seafood products.

INTRODUCTION

Numerous predictive models have been proposed these last decades to describe the growth rate and the growth boundaries of micro-organisms (see Ross and Dalgaard 2004 for a review). Many of them were specifically developed for *Listeria monocytogenes* in broth and tend thus to provide conservative predictions in food. These fail-safe models give a margin of safety which can be unacceptable for many food applications (Brocklehurst 2004). An alternative

approach is to develop models directly in food (Duffy *et al.* 1994) or to use data obtained in food by challenge testing (Anon 2001, 2003, 2004; Pinon *et al.* 2004). These predictions are generally good but they are food and processes specific. Therefore, it would be more attractive to improve and validate existing models for a more general applicability but it is difficult for users to know the confidence they can have in a model prediction for a specified food (Delignette-Muller *et al.* 1995). Validation studies of proposed models were published (te Giffel and Zwietering 1999; Devlieghere *et al.* 2001; Giménez and Dalgaard 2004) but the extent of the model validations are somewhat uncertain because these studies included few food data or were restricted to a limited range of growth conditions.

Correspondence to: Jean-Christophe Augustin, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, 7, avenue du Général de Gaulle F-94704 Maisons-Alfort, France (e-mail: jaugustin@vet-alfort.fr).

te Giffel and Zwietering (1999) have shown that models excluding interactions between environmental factors were in many cases sufficiently accurate to predict the growth rate of *L. monocytogenes* in food. To increase the performance of these models near the growth/no-growth interface of *L. monocytogenes*, modifications of these models have been proposed to take into account interactions between environmental factors (Augustin and Carlier 2000b; Le Marc *et al.* 2002). In parallel, probability models have been proposed to describe the growth probability of *L. monocytogenes* (Tienungoon *et al.* 2000; Koutsoumanis *et al.* 2004) in microbiological media. It seems therefore essential to study the performance of predictive models in food with large data sets in order to specify to the users the confidence they can have in the predictions.

The aim of the present study was to study the performance of three type of models to predict the growth rate and/or the growth probability of *L. monocytogenes* in dairy, meat and seafood products in suboptimal conditions. These three types of models were: standard secondary models, secondary models including interactions between environmental factors, and probability models describing the growth probability of *L. monocytogenes*.

MATERIALS AND METHODS

Growth data of *L. monocytogenes*

Growth data of *L. monocytogenes* in liquid microbiological media, liquid dairy products (milk, whey, cream), cheeses, meat products (beef, pork, chicken, turkey meats, deli meats) and seafood products (cold-smoked salmon, cold-smoked trout, marinated herring, cod, crawfish, tarama) were collected from published articles and from unpublished data (Table 1).

Growth rates. Maximum specific growth rates were estimated from published viable counts growth kinetics or were directly obtained in papers.

Maximum specific growth rates, μ_{max} (h^{-1}), estimated from published growth kinetics were obtained by fitting the logistic with delay growth model (Kono 1968; Broughall *et al.* 1983; Rosso *et al.* 1996; Augustin and Carlier 2000a; Pinon *et al.* 2004). Differences between estimations were often observed depending on the primary growth model used (Augustin and Carlier 2000a; McKellar and Lu 2004). The published growth rates were then corrected according to the primary model used to estimate them. As the logistic with delay growth model was chosen as the reference one, the maximum specific growth rates estimated with the Gompertz, logistic, Baranyi, and log-linear models were multiplied by the factors 0.84, 0.86, 0.97 and 1.00 respectively (Augustin and Carlier 2000a). A total of 588 growth

rates were obtained from 26 studies in microbiological media, 196 were obtained in liquid dairy products from 15 studies, 140 were obtained in cheeses from five studies, 306 were obtained in meat products from 17 studies, and 80 were obtained in seafood products from six studies.

Growth/no-growth data. Growth/no-growth data obtained by viable counts or by optical density were obtained from the literature. For these data, the following information was collected: the way to define the growth or the no-growth and the duration of the experimental period. When this information was not available, we assumed that the growth corresponded to at least, a doubling of the initial bacterial concentration within 30 days.

A total of 2724 growth/no-growth data were obtained in microbiological media from 39 studies, 196 were obtained in liquid dairy products from 15 studies, 144 were obtained in cheeses from five studies, 324 were obtained in meat products from 17 studies, and 80 were obtained in seafood products from six studies.

Environmental factors. The following factors were notified for each growth data: temperature, pH, main acid present in the medium, water activity, concentration of sodium nitrite, concentration of phenol, and proportion of CO₂ in the modified atmosphere. We considered that the main acid in food products was lactic acid. Products containing intentionally added acid salts were not included in the present study.

When the water activity (a_w) was not reported by the authors, it was estimated using the concentration of NaCl and the moisture of the food product according to the following equation (Resnik and Chirife 1988): $a_w = 1 - 0.0052471WPS - 0.00012206WPS^2$, where WPS is the water phase salt in %, i.e. $WPS = 100 \times \%NaCl / (\%moisture + \%NaCl)$ with NaCl being the NaCl concentration (w/v).

The undissociated sodium nitrite concentration, nit ($\mu mol l^{-1}$), was calculated using the following equation (Duffy *et al.* 1994): $nit = (nitrite \times 1000/69.01) / (10^{pH - 3.37} + 1)$, where nitrite is the concentration of total sodium nitrite ($mg kg^{-1}$).

Although the inhibitory effect of CO₂ was mainly due to the concentration of CO₂ dissolved into the water phase of foods, we used the proportion of CO₂ present in the gas mixtures of modified atmosphere packages. Indeed, the dissolved CO₂ concentration depending greatly on the gas/product ratio (Devlieghere *et al.* 1998), it was not possible to accurately estimate these concentrations without information about these ratios so we used the proportion of CO₂, which was a simpler but certainly less accurate parameter. For vacuum packaging, the proportion was set to 0.3 (Beumer *et al.* 1996).

Table 1 Growth/no-growth data used in the study for the performance evaluation of models describing the behaviour of *Listeria monocytogenes* in microbiological media and foods

Products	References	No. growth rates	No. growth/no-growth data
Liquid microbiological media	El-Shenawy and Marth (1988a,b)	14	12
	George <i>et al.</i> (1988)	0	80
	Ahamad and Marth (1989)	6	2
	Buchanan <i>et al.</i> (1989), Buchanan and Klawitter (1990), Buchanan and Phillips (1990)	141	66
	Farber <i>et al.</i> (1989, 1992)	0	806
	Katoh (1989)	12	4
	Petran and Zottola (1989)	14	9
	Sorrells <i>et al.</i> (1989)	0	24
	Cole <i>et al.</i> (1990)	0	18
	Conner <i>et al.</i> (1990)	0	6
	Walker <i>et al.</i> (1990)	26	26
	Hart <i>et al.</i> (1991)	3	2
	McClure <i>et al.</i> (1991)	0	993
	Tapia de Daza <i>et al.</i> (1991)	0	44
	Miller (1992)	9	4
	Nolan <i>et al.</i> (1992)	0	6
	Duh and Schaffner (1993)	8	4
	Oh and Marshall (1993)	6	5
	Brocklehurst <i>et al.</i> (1995)	3	2
	Bajard <i>et al.</i> (1996)	20	12
	Farber <i>et al.</i> (1996)	43	43
	Patchett <i>et al.</i> (1996)	2	1
	Fernández <i>et al.</i> (1997)	17	20
	McKellar <i>et al.</i> (1997)	39	10
	Membré <i>et al.</i> (1997)	13	20
	Robinson <i>et al.</i> (1998)	25	7
	Tienungoon <i>et al.</i> (2000)	0	50
	Devlieghere <i>et al.</i> (2001)	0	48
	Le Marc (2001), Le Marc <i>et al.</i> (2002)	23	85
	Pin <i>et al.</i> (2001)	39	39
	Koutsoumanis <i>et al.</i> (2004)	0	182
	Uyttendaele <i>et al.</i> (2004)	22	22
	J.C. Augustin, unpublished data	103	72
	Liquid dairy products	Donnelly and Briggs (1986)	26
Rosenow and Marth (1987a,b)		30	30
Marshall and Schmidt (1988)		19	19
Ryser and Marth (1988)		21	21
Schaack and Marth (1988)		14	14
Papageorgiou and Marth (1989a)		16	16
Pearson and Marth (1990)		12	12
Walker <i>et al.</i> (1990)		12	12
Buchanan and Klawitter (1991)		2	2
El-Gazzar <i>et al.</i> (1991)		12	12
Wang and Johnson (1992)		5	5
Zapico <i>et al.</i> (1993)		6	6
Bajard (1996)		12	12
Murphy <i>et al.</i> (1996)		9	9
Ryser and Marth (1987, 1989)		16	20
Cheese		Genigeorgis <i>et al.</i> (1991)	121
	Abdilla <i>et al.</i> (1993)	2	2
	P. Garry, personal communication	1	1

Table 1 Continued

Products	References	No. growth rates	No. growth/no-growth data
Meat products	Kaya and Schmidt (1989)	3	3
	Grau and Vanderlinde (1990, 1992, 1993)	88	88
	Chen and Shelef (1992)	8	8
	Grant <i>et al.</i> (1993)	8	8
	Hudson and Mott (1993c), Hudson <i>et al.</i> (1994)	8	8
	Schlyter <i>et al.</i> (1993)	1	1
	Duffy <i>et al.</i> (1994)	53	53
	Greer and Dilts (1995)	2	2
	Dykes (2003)	22	22
	Stekelenburg (2003)	1	1
	Membré <i>et al.</i> (2004)	5	5
	Bampalia <i>et al.</i> (2005)	2	2
	Zuliani <i>et al.</i> (2003)	64	64
	J.C. Augustin, unpublished data and P. Garry, personal communication	41	59
Seafood products	Peterson <i>et al.</i> (1993)	21	21
	Pelroy <i>et al.</i> (1994)	10	10
	Giménez and Dalgaard (2004)	5	5
	Cornu <i>et al.</i> (2003) and H. Bergis and M. Cornu, personal communication	44	44

Growth models

Growth rate models. The evaluated growth rate models were on the general form: $\mu_{\max} = \mu_{\text{opt}} \tau(T) \rho(\text{pH}) \alpha(a_w) \iota(\text{nit, phe, CO}_2) \xi(T, \text{pH}, a_w, \text{nit, phe, CO}_2)$, where T is the temperature ($^{\circ}\text{C}$), a_w is the water activity, nit is the undissociated concentration of sodium nitrite ($\mu\text{mol l}^{-1}$), phe is the phenol concentration (ppm), and CO_2 is the CO_2 proportion. μ_{opt} is the optimal value of the maximum specific growth rate μ_{\max} when $T = T_{\text{opt}}$, $\text{pH} = \text{pH}_{\text{opt}}$, $a_w = a_{w, \text{opt}}$, $\text{nit} = \text{phe} = \text{CO}_2 = 0$. T_{opt} , pH_{opt} and $a_{w, \text{opt}}$ were arbitrarily set to 37°C , 7.1 and 0.997 respectively (Augustin and Carlier 2000a). τ is a function describing the effect of temperature on μ_{\max} in suboptimal conditions ($T \leq 30^{\circ}\text{C}$), ρ is a function describing the effect of pH on μ_{\max} in suboptimal conditions ($\text{pH} \leq 7.1$), α is a function describing the effect of water activity on μ_{\max} in suboptimal conditions ($a_w \leq 0.997$), ι is a function describing the effect of nitrite, phenol and CO_2 on μ_{\max} and ξ is a function describing the interactions between the above environmental factors.

The functions describing the effect of temperature, pH, water activity, preservatives and their interactions on μ_{\max} , and the growth rate models used are reported in Table 2. Two different models excluding interactions between environmental factors were evaluated: a cardinal parameter growth model (model #1) and a square root type growth model (model #2). Three different models including interactions between environmental factors were evaluated: a modified form of the cardinal model proposed by Augustin and Carlier (2000b) (model #3), an expanded form of the cardinal model proposed by Le Marc *et al.* (2002) (model #4) and a new model derived from the two previous ones

(model #5). This new model is based on the assumptions of Le Marc *et al.* (2002) regarding the effect of the interactions between environmental factors within the growth range of *L. monocytogenes* and keeps growth/no-growth boundaries on the form of the model proposed by Augustin and Carlier (2000b).

Growth/no-growth models. The growth rate models #1 to #5 were evaluated for their ability to describe the growth limits of *L. monocytogenes*. For these models, the growth and no growth were predicted according to the criteria used by the authors in their studies. For example, if the authors defined the growth as a 1 \log_{10} increase of the initial bacterial concentration, the prediction of the model was considered as growth if it also predicted at least a 1 \log_{10} increase during the length of the experiment. The increase of the population was predicted with the logistic with delay primary growth model by setting the lag time, 'lag' to $2.1/\mu_{\max}$ because 2.1 was found to be the median ($\mu_{\max} \text{lag}$)-value for the growth studies concerning *L. monocytogenes* (Augustin and Carlier 2000a).

Two models describing the probability of growth of *L. monocytogenes* as a function of the temperature, the pH and the water activity were evaluated (Table 2). The first one (model #6) was proposed by Tienungoon *et al.* (2000) for temperatures ranging from 3.1 to 30°C , pH ranging from 3.7 to 7.8, and water activities ranging from 0.928 to 0.995. The second one (model #7) was proposed by Koutsoumanis *et al.* (2004) for temperatures ranging from 4 to 30°C , pH ranging from 4.24 to 6.58 and water activities ranging from 0.900 to 0.993. For the evaluation of these probability models, we considered that growth or no growth were

Table 2 Growth rate and growth/no-growth models evaluated in the study

Models	Equations	Descriptions	References
CM ₁	$CM_1(X) = \begin{cases} 0, & X \leq X_{min} \\ \frac{(X - X_{opt})(X - X_{max})}{(X_{opt} - X_{min})[(X - X_{opt}) - (X_{opt} - X_{max})] + (X_{opt} - X_{min})^2}, & X_{min} < X < X_{max} \end{cases}$	Effect of <i>T</i> , pH and <i>a_w</i> on μ_{max}	Russo <i>et al.</i> (1995)
SR ₁	$SR_1(X) = \begin{cases} 0, & X \leq X_{min} \\ \left(\frac{X - X_{opt}}{X_{opt} - X_{min}}\right)^n, & X_{min} < X \leq X_{opt} \end{cases}$	Effect of <i>T</i> , pH and <i>a_w</i> on μ_{max}	Ratkowsky <i>et al.</i> (1982), Zwietering <i>et al.</i> (1991)
SR	$SR(\epsilon) = \begin{cases} 1 - \frac{\epsilon}{MIC}, & \epsilon < MIC \\ 0, & \epsilon \geq MIC \end{cases}$	Effect of preservatives on μ_{max}	Devlieghere <i>et al.</i> (2001), Giménez and Dalgaard (2004)
P	$P(X) = \begin{cases} 1 - \frac{10^{10} \mu_{max} X}{1 - 10^{10} \mu_{max} X}, & X \leq X_{min} \\ \frac{X - X_{opt}}{X_{opt} - X_{min}}, & X_{min} < X \leq X_{opt} \end{cases}$	Effect of pH on μ_{max}	Presser <i>et al.</i> (1997), Tienangoon <i>et al.</i> (2000)
Interactions	$X_{i,min} = X_{i,opt} - (X_{i,opt} - X_{i,min}^0) \left[\prod_j \left(\frac{1 - \epsilon_j}{MIC_j} \right) - \sum_j \left(\frac{X_{i,opt} - X_j}{X_{i,opt} - X_{j,min}^0} \right)^{\beta_j} \right]$	Effect of environmental factors on minimal cardinal values	Augustin and Carlier (2000b)
Interactions	$MIC_j = MIC_j^0 \left[1 - \frac{\sum_i \left(\frac{X_{i,opt} - X_j}{X_{i,opt} - X_{j,min}^0} \right)}{\prod_i \left(\frac{1 - \epsilon_i}{MIC_i} \right)} \right]$	Effect of environmental factors on MICs	Augustin and Carlier (2000b)
Interactions	$\xi = \begin{cases} 1, & \psi \leq 0.5 \\ 2(1 - \psi), & 0.5 < \psi < 1 \\ 0, & \psi \geq 1 \end{cases} \quad \psi = \sum_i \frac{\phi_i \epsilon_i}{\prod_j [1 - \phi_j \epsilon_j]}$	Effect of interactions between environmental factors on μ_{max}	Le Marc <i>et al.</i> (2002)
Interactions	$\phi_{LM}(T) = [1 - \sqrt{CM_2(T)}]^2, \quad \phi_{LM}(pH) = [1 - CM_1(pH)]^2,$	Contributions of environmental factors to the interactions	Le Marc (2001), Le Marc <i>et al.</i> (2002)
Model #1	$\mu_{max} = \mu_{opt} CM_2(T) CM_1(pH) SR_1(a_w) SR(nit) SR(phe) SR(CO_2)$	Growth rate model excluding interactions	
Model #2	$\mu_{max} = \mu_{opt} SR_2(T) P(pH) SR_1(a_w) SR(nit) SR(phe) SR(CO_2)$	Growth rate model excluding interactions	
Model #3	$\mu_{max} = \mu_{opt} CM_2^0(T) CM_1^0(pH) SR_1^0(a_w) SR^0(nit) SR^0(phe) SR^0(CO_2)$	Growth rate model including interactions	
Model #4	$\mu_{max} = \mu_{opt} CM_2(T) CM_1(pH) SR_1(a_w) SR(nit) SR(phe) SR(CO_2) \xi(T, pH, a_w, nit, phe, CO_2)$	Growth rate model including interactions	
Model #5	$\mu_{max} = \mu_{opt} CM_2(T) CM_1(pH) SR_1(a_w) SR(nit) SR(phe) SR(CO_2) \xi(T, pH, a_w, nit, phe, CO_2)$	Growth rate model including interactions	
Model #6	$1 - SR(nit) SR(phe) SR(CO_2) \ln\left(\frac{P}{1 - P}\right) = b_0 + b_1 \ln(T - T_{min}) + b_2 \ln^2(T - T_{min}) + b_3 \ln(1 - \exp[0.536(T - 48)]) + b_4 \ln(a_w - a_{w,min}) + b_5 \ln(1 - 10^{10} \mu_{max} - pH) + b_6 \ln^2(1 - 10^{10} \mu_{max} - pH)$ with $b_0 = -6.023$, $b_1 = 19.00$, $b_2 = -3.049$, $b_3 = 7514$, $b_4 = 4.635$, $b_5 = 141.0$, $b_6 = 240.2$, $T_{min} = 0.4164$, $a_{w,min} = 0.9142$, $pH_{min} = 3.350$ for the strain Scott A, and $b_0 = -25.36$, $b_1 = 44.12$, $b_2 = -7.022$, $b_3 = 10257$, $b_4 = 8.951$, $b_5 = 291.8$, $b_6 = 704.1$, $T_{min} = -1.623$, $a_{w,min} = 0.9152$, $pH_{min} = 3.350$ for the strain L5	Growth probability model	Tienangoon <i>et al.</i> (2000)
Model #7	$\ln\left(\frac{P}{1 - P}\right) = a_0 + a_1 T + a_2 pH + a_3 \sqrt{T - a_w} + a_4 T pH + a_5 T \sqrt{T - a_w} + a_6 pH \sqrt{T - a_w} + a_7 T^2 + a_8 pH^2$ with $a_0 = -605.935$, $a_1 = 1.272$, $a_2 = 180.260$, $a_3 = 809.232$, $a_4 = 0.507$, $a_5 = -4.411$, $a_6 = -183.674$, $a_7 = -0.065$, $a_8 = -11.460$ for broth medium, and $a_0 = -516.908$, $a_1 = 3.218$, $a_2 = 130.741$, $a_3 = 957.558$, $a_4 = 0$, $a_5 = -7.574$, $a_6 = -186.298$, $a_7 = -0.031$, $a_8 = -6.687$ for agar medium	Growth probability model	Koutsoumanis <i>et al.</i> (2004)
Model #8	$P = \frac{1}{1 + \exp[\theta(P - \theta)]}$ with $\theta = 1 - \sum_j \left(\frac{X_{i,opt} - X_j}{X_{i,opt} - X_{j,min}^0} \right)^{\beta_j} - \sum_j \frac{\epsilon_j}{MIC_j}$	Growth probability model	

© 2005 The Society for Applied Microbiology, *Journal of Applied Microbiology*, doi:10.1111/j.1365-2672.2005.02710.x

predicted when the growth probabilities were above 0.5 or below 0.5 respectively.

A new logistic function (model #8) was also proposed in this study to describe the growth probability of *L. monocytogenes* according to a function θ which is linked to the effect of the environmental factors and their interactions on μ_{\max} (Table 2). This function θ varies from $-\infty$ to approx. 0 within the no-growth domain and from approx. 0 to 1 within the growth domain.

Estimation of model parameters

Estimation of minimal cardinal values and minimal inhibitory concentrations. Growth data obtained in liquid microbiological media were used to estimate the minimal temperature, the minimal pH for HCl and lactic acid, the minimal water activity ($X_{i,\min}$) and the minimal inhibitory concentrations (MICs) for undissociated sodium nitrite, phenol and CO₂ (MIC_j). We observed a greater variability according to the study considered rather than according to the *L. monocytogenes* strains in use. Therefore, we estimated one parameter value by study or author rather than one value by strain and by study. Mean values of the individual estimations were then used as estimations of the model parameter values.

Estimation of optimal specific growth rates. Optimal specific growth rates in liquid microbiological media, liquid dairy products, cheeses, meat and seafood products were estimated by fitting the growth models with the previously estimated $X_{i,\min}$ - and MIC_j-values. The mean values of the individual estimations were adopted as estimations of the optimal specific growth rates.

Estimation of growth probability model parameters. Parameters of model #8 were estimated by fitting the model to observed growth probabilities of each study calculated on 0.05 intervals of θ .

Model fitting. Fits were performed on the square root of μ_{\max} to stabilize the variances of the residuals (Zwietering *et al.* 1990; Ratkowsky *et al.* 1991, 1996) by linear or non-linear regression using the least squares criterion. Growth probability model fits were performed by nonlinear regression. The minimum sums of the squared residuals were computed with the REGRESS and NLINFIT subroutines of MATLAB 7.0.1 software (The MathWorks Inc., Natick, MA, USA).

Performance evaluation of models

Growth rate models. The comparison of models describing the growth rate of *L. monocytogenes* relied on the calculation of bias (B_f) and accuracy (A_f) factors (Ross 1996)

from non-nil predicted and observed μ_{\max} -values. For these comparisons, we used the mean values of indices giving the same weight to each study.

Growth/no-growth models. The comparison of models describing the growth/no growth of *L. monocytogenes* relied on the calculation of correct prediction percentage (CPP) representing the percentage of all cases that were correctly predicted (Hajmeer and Basheer 2003). For this evaluation, observations obtained near the growth/no-growth interface were only used. The tested conditions were characterized by θ -values within the range [-0.75; +0.75]. All models accurately predicted growth/no growth outside this range, except probability models #6 and #7. The predictive values of the models were also specified. The positive predictive value, PPV, is the probability that growth actually occurs when growth is predicted by the model: $PPV = 100 \times [TG / (TG + FG)]$, and the negative predictive value, NPV, is the probability that no growth occurs when no growth is predicted by the model: $NPV = 100 \times [TNG / (TNG + FNG)]$, where TG (true growth) is the number of cases where the model correctly predicts growth, TNG (true no growth) is the number of cases where the model correctly predicts no growth, FG (false growth) is the number of cases where the model incorrectly predicts growth while no growth is observed, and FNG (false no growth) is the number of cases where the model incorrectly predicts no growth while growth is observed.

Validation of the growth rate and growth/no-growth models for *L. monocytogenes* in food products

Additional growth data obtained in food under suboptimal conditions were used for validation of the selected models. These data were only used for validation because some food characteristics were not specified in the published articles, or because growth rates were estimated from only few counts leading to a great uncertainty on the estimations. In these cases, arbitrarily values were set for the lacking characteristics. A total of 196 growth rates issued from 38 studies (21 for cheeses, 128 for meat products and 47 for seafood products), plus 18 growth/no-growth data obtained in meat products were available for the validation step.

RESULTS

Minimal cardinal values and MICs

The minimal cardinal values and the MICs of *L. monocytogenes* in microbiological media obtained with the different growth models are shown in Table 3. Minimal cardinal values could not be obtained using the models excluding

Table 3 Minimal cardinal values and minimal inhibitory concentrations (MIC) of *Listeria monocytogenes* estimated in liquid microbiological media

Parameters	Models					References		
	#1	#2	#3	#4	#5			
T_{min} (°C)	1.79	1.58	-0.75	0.22	-0.02	El-Shenawy and Marth (1988a,b) George <i>et al.</i> (1988) Ahmad and Marth (1989) Buchanan <i>et al.</i> (1989), Buchanan and Klawitter (1990), Buchanan and Phillips (1990) Farber <i>et al.</i> (1989, 1992) Kato (1989) Petran and Zottola (1989) Sorrells <i>et al.</i> (1989) Cole <i>et al.</i> (1990) Walker <i>et al.</i> (1990) Hart <i>et al.</i> (1991) McClure <i>et al.</i> (1991) Tapia de Daza <i>et al.</i> (1991) Duh and Schaffner (1993) Oh and Marshall (1993) Bajard <i>et al.</i> (1996) Farber <i>et al.</i> (1996) Fernández <i>et al.</i> (1997) McKellar <i>et al.</i> (1997) Robinson <i>et al.</i> (1998) Tienungoon <i>et al.</i> (2000) Le Marc (2001), Le Marc <i>et al.</i> (2002) Pin <i>et al.</i> (2001) Koutsoumanis <i>et al.</i> (2004) J.C. Augustin, unpublished data		
	n.a.*	n.a.	-1.48	-1.50	-1.47			
	-2.42	-3.29	-2.42	-2.42	-2.42			
	-1.29	-2.22	-2.86	-1.30	-1.77			
	n.a.	n.a.	-4.39	-4.96	-5.31			
	-1.26	-2.43	-1.55	-1.26	-1.26			
	1.45	-0.19	1.46	1.45	1.45			
	n.a.	n.a.	-8.56	-11.11	-9.01			
	n.a.	n.a.	1.91	1.19	1.91			
	-2.77	-2.82	-3.09	-2.88	-3.11			
	-1.86	-2.00	-1.86	-1.86	-1.86			
	n.a.	n.a.	3.30	4.59	3.77			
	n.a.	n.a.	0.19	-0.53	0.19			
	-0.75	-1.67	-0.75	-0.75	-0.75			
	-2.45	-2.75	-4.80	-3.82	-4.04			
	-2.36	-2.71	-2.36	-2.36	-2.36			
	-1.33	-1.46	-4.23	-2.72	-3.91			
	0.90	1.01	-7.04	-2.50	-3.51			
	-0.54	-1.93	-0.54	-0.54	-0.54			
	1.37	-1.36	0.74	1.25	1.28			
	n.a.	n.a.	-2.51	-1.83	-2.08			
	-0.93	-1.47	-2.29	-1.39	-1.73			
	-2.43	-2.56	-3.49	-2.68	-3.14			
	n.a.	n.a.	-2.09	-3.03	-1.96			
	-1.27	-1.90	-1.27	-1.27	-1.27			
	Mean	-0.95	-1.66	-2.03	-1.68		-1.72	
	SD	1.49	1.33	2.63	2.78		2.55	
pH_{min} HCl	3.84	4.53	3.65	4.01	3.93	El-Shenawy and Marth (1988a,b) George <i>et al.</i> (1988) Buchanan <i>et al.</i> (1989), Buchanan and Klawitter (1990), Buchanan and Phillips (1990) Farber <i>et al.</i> (1989, 1992) Petran and Zottola (1989) McClure <i>et al.</i> (1991) Oh and Marshall (1993) Brocklehurst <i>et al.</i> (1995) Farber <i>et al.</i> (1996) Fernández <i>et al.</i> (1997) Robinson <i>et al.</i> (1998) Tienungoon <i>et al.</i> (2000) Le Marc (2001), Le Marc <i>et al.</i> (2002) Koutsoumanis <i>et al.</i> (2004)		
	4.65	4.65	4.28	4.38	4.31			
	4.27	4.44	4.07	4.25	4.24			
	4.79	4.79	4.46	4.67	4.67			
	4.55	4.65	4.52	4.55	4.55			
	n.a.	n.a.	4.36	4.40	4.53			
	4.45	4.79	3.72	4.23	4.20			
	4.03	4.30	3.94	3.93	3.94			
	4.42	5.05	3.26	4.33	3.85			
	4.84	4.92	4.16	4.48	4.28			
	4.21	4.61	4.20	4.21	4.21			
	4.58	4.58	4.27	4.38	4.32			
	4.59	4.82	4.20	4.31	4.28			
	4.45	4.45	4.37	4.50	4.37			
	Mean	4.44	4.66	4.10	4.33		4.26	
	SD	0.29	0.21	0.35	0.20		0.24	
	pH_{min} lactic acid	5.04	5.04	4.82	4.93		4.91	Farber <i>et al.</i> (1989, 1992) Sorrells <i>et al.</i> (1989)
		4.61	4.61	4.51	4.53		4.51	
Mean	4.83	4.83	4.67	4.73	4.71			
SD	0.30	0.30	0.22	0.28	0.28			

Table 3 Continued

Parameters	Models					References
	#1	#2	#3	#4	#5	
$a_{w\min}$	0.894	0.889	0.884	0.895	0.892	Buchanan <i>et al.</i> (1989), Buchanan and Klawitter (1990), Buchanan and Phillips (1990)
	0.924	0.924	0.914	0.919	0.921	Farber <i>et al.</i> (1989, 1992)
	0.927	0.927	0.911	0.911	0.911	Cole <i>et al.</i> (1990)
	n.a.	n.a.	0.946	0.953	0.939	McClure <i>et al.</i> (1991)
	0.925	0.925	0.910	0.91	0.910	Tapia de Daza <i>et al.</i> (1991)
	0.914	0.914	0.914	0.914	0.914	Miller (1992)
	0.921	0.921	0.919	0.919	0.919	Nolan <i>et al.</i> (1992)
	0.935	0.931	0.899	0.912	0.917	Fernández <i>et al.</i> (1997)
	0.918	0.883	0.911	0.917	0.918	Robinson <i>et al.</i> (1998)
	0.914	0.914	0.894	0.895	0.893	Koutsoumanis <i>et al.</i> (2004)
Mean	0.919	0.914	0.910	0.915	0.913	
SD	0.012	0.017	0.017	0.016	0.014	
MIC _{nit} ($\mu\text{mol l}^{-1}$)	13.3	11.5	19.7	13.2	14.1	Buchanan <i>et al.</i> (1989), Buchanan and Klawitter (1990), Buchanan and Phillips (1990)
	n.a.	n.a.	80.9	22.1	35.9	McClure <i>et al.</i> (1991)
Mean	13.3	11.5	50.3	17.7	25.0	
SD	–	–	43.3	6.3	15.4	
MIC _{phe} (ppm)	18.2	18.2	30.8	23.5	31.9	Membré <i>et al.</i> (1997)
MIC _{CO₂}	1.24	1.24	3.15	1.65	2.21	Farber <i>et al.</i> (1996)
	1.22	1.27	3.14	1.70	3.80	Fernández <i>et al.</i> (1997)
	1.72	1.72	5.92	1.97	3.11	Pin <i>et al.</i> (2001)
Mean	1.39	1.41	4.07	1.77	3.04	
SD	0.28	0.27	1.60	0.17	0.80	

*Not applicable.

interactions when data sets obviously showed large interactions between environmental factors. The variability of T_{\min} - and pH_{\min} -values was relatively low with standard deviations (SDs) representing between 3 and 6% of the growth ranges [$100 \times \text{SD} / (X_{\max} - X_{\min})$]. On the contrary, the variability of $a_{w\min}$ - and MIC-values was greater. The SDs of $a_{w\min}$ -values represented between 14 and 20% of the growth range and the SDs of MIC_{nit} and MIC_{CO₂} represented between 10 and 85% of the growth ranges.

Optimal specific growth rates

Mean values of the optimal specific growth rates obtained in the different media are shown in Table 4. It was observed that the predictions in seafood products were better by ignoring the concentration of phenol, therefore the μ_{opt} -values presented in Table 4 were estimated by assuming that no phenol was present in these products. The variability of μ_{opt} -values depended on the product under consideration. This variability was low in liquid microbiological media, dairy products and seafood products with coefficients of

variation [$100 \times (\text{SD}/\text{mean})$] varying between 15 and 25%. The variability was greater for meat products (30–50%) and was very high in cheese with a coefficient of variation approximating 90%. The individual optimal specific growth rates observed in cheeses are shown in Table 5.

Evaluation of the model performances

We could observe that the average performances of the tested growth rate models were very close (Table 6). Except for the cheese, bias factors were close to one indicating no over- or under-predictions of the models, which was coherent as the estimations of the model parameters were performed with the same data sets. Accuracy factors varied from 1.3 to 1.5 indicating that predicted growth rate were, on average, different from 30 to 50% compared with the observed ones. The cardinal model including interactions #3 proposed by Augustin and Carlier (2000b) underestimated the growth rates with average bias factors greater than 1, this phenomenon was already pointed out by Cornu *et al.* (2003) and Giménez and Dalgaard (2004) in cold-smoked

Table 4 Optimal specific growth rates (h^{-1}) of *Listeria monocytogenes* in liquid microbiological media, liquid dairy products, cheese, meat and seafood products

Products	n*	Models [mean (SD)]					
		#1	#2	#3	#4	#5	#5bis†
Microbiological media	21	1.154 (0.185)	1.423 (0.252)	1.132 (0.277)	1.075 (0.167)	1.047 (0.173)	1.004 (0.218)
Liquid dairy products	14	0.818 (0.150)	1.012 (0.186)	0.746 (0.142)	0.745 (0.131)	0.742 (0.132)	0.742 (0.132)
Cheese	20‡	0.244 (0.213)	0.272 (0.240)	0.257 (0.240)	0.215 (0.189)	0.212 (0.187)	0.212 (0.187)
Meat products	13	1.372 (0.434)	1.547 (0.478)	1.668 (0.857)	1.165 (0.329)	1.168 (0.348)	1.036 (0.318)
Seafood products	4	0.729 (0.164)	0.834 (0.203)	0.844 (0.276)	0.608 (0.120)	0.565 (0.116)	0.480 (0.090)

*Number of studies.

†Model #5bis is the simplified form of model #5 where inhibitory substances are ignored.

‡Number of cheese.

Table 5 Optimal specific growth rates (h^{-1}) estimated for *Listeria monocytogenes* in cheese

References	Cheese	Models				
		#1	#2	#3	#4	#5
Ryser and Marth (1987)	Camembert	0.671	0.740	0.801	0.558	0.547
Ryser and Marth (1989)	Brick	0.033	0.030	0.061	0.029	0.028
Genigeorgis <i>et al.</i> (1991)	Brie (centre)	0.255	0.261	0.247	0.245	0.243
Genigeorgis <i>et al.</i> (1991)	Brie (centre)	0.410	0.504	0.388	0.393	0.390
Genigeorgis <i>et al.</i> (1991)	Brie (surface)	0.095	0.125	0.080	0.082	0.081
Genigeorgis <i>et al.</i> (1991)	Camembert (centre)	0.161	0.211	0.134	0.138	0.136
Genigeorgis <i>et al.</i> (1991)	Camembert (surface)	0.110	0.144	0.091	0.094	0.093
Genigeorgis <i>et al.</i> (1991)	Cottage cheese	0.193	0.120	0.119	0.135	0.116
Genigeorgis <i>et al.</i> (1991)	Queso fresco	0.021	0.026	0.020	0.020	0.020
Genigeorgis <i>et al.</i> (1991)	Queso fresco	0.025	0.029	0.024	0.023	0.022
Genigeorgis <i>et al.</i> (1991)	Queso fresco	0.066	0.074	0.061	0.062	0.061
Genigeorgis <i>et al.</i> (1991)	Queso panella	0.546	0.655	0.520	0.527	0.522
Genigeorgis <i>et al.</i> (1991)	Queso panella	0.049	0.058	0.047	0.047	0.047
Genigeorgis <i>et al.</i> (1991)	Queso panella	0.078	0.086	0.076	0.074	0.073
Genigeorgis <i>et al.</i> (1991)	Queso ranchero	0.449	0.488	0.436	0.425	0.420
Genigeorgis <i>et al.</i> (1991)	Ricotta	0.452	0.486	0.445	0.435	0.433
Genigeorgis <i>et al.</i> (1991)	Ricotta	0.458	0.486	0.565	0.390	0.390
Genigeorgis <i>et al.</i> (1991)	Teleme	0.013	0.013	0.013	0.013	0.013
Abdalla <i>et al.</i> (1993)	White pickle	0.542	0.605	0.590	0.419	0.408
P. Garry, personal communication	Emmental	0.250	0.290	0.415	0.199	0.188
Mean		0.244	0.272	0.257	0.215	0.212
SD		0.213	0.240	0.240	0.189	0.187

salmon. The predictions of the growth models in cheese were poor: although the bias factors were close to 1, the accuracy factors were very high with values approximating 3.5 on average.

In microbiological media, the best CPPs (Table 7) were observed with the two cardinal models including interactions #4 and #5, and with the probability model #7 proposed by Koutsoumanis *et al.* (2004). In food products (except for cheese), the model performances were close with average CPPs >90%. The high PPVs of all models indicated a good growth prediction of them, but the cardinal models

including interactions #4 and #5 and the probability model #7 showed the best NPVs for microbiological media, indicating better confidence in no-growth predictions. The good predictive value of the probability model #7 that only accounted for temperature, pH and water activity challenged the need to include the effects of nitrite, phenol and CO₂ in the proposed models. In cheeses, the CPPs were of approx. 50% and were characterized by large SDs indicating a great variability from one study to another. However, high NPVs were obtained for these products, suggesting a relative confidence in no-growth predictions.

Table 6 Bias (B_f) and accuracy (A_f) factors of growth rate models for *Listeria monocytogenes* in liquid microbiological media, liquid dairy products, cheese, meat and seafood products

Products	n*	B_f [mean (SD)]					A_f [mean (SD)]						
		#1	#2	#3	#4	#5	#5bis†	#1	#2	#3	#4	#5	#5bis
Microbiological media	22	1.08 (0.26)	1.03 (0.23)	1.18 (0.26)	1.02 (0.20)	1.03 (0.19)	1.00 (0.25)	1.36 (0.22)	1.30 (0.14)	1.49 (0.33)	1.32 (0.12)	1.35 (0.17)	1.40 (0.27)
Liquid dairy products	14	1.10 (0.34)	1.06 (0.27)	1.18 (0.62)	1.05 (0.28)	1.06 (0.29)	1.06 (0.29)	1.39 (0.31)	1.33 (0.23)	1.53 (0.59)	1.36 (0.22)	1.38 (0.23)	1.38 (0.23)
Cheese	20‡	0.96 (0.90)	0.96 (0.93)	0.99 (0.96)	0.92 (0.86)	0.91 (0.86)	0.91 (0.86)	3.46 (2.48)	3.58 (2.68)	3.62 (2.41)	3.41 (2.32)	3.42 (2.32)	3.42 (2.32)
Meat products	14	1.05 (0.34)	1.04 (0.34)	1.24 (0.63)	1.04 (0.32)	1.10 (0.35)	1.03 (0.33)	1.41 (0.21)	1.39 (0.21)	1.85 (0.34)	1.38 (0.18)	1.46 (0.24)	1.38 (0.22)
Seafood products	4	0.98 (0.29)	0.97 (0.30)	1.14 (0.46)	0.96 (0.26)	1.00 (0.29)	1.00 (0.27)	1.47 (0.22)	1.48 (0.24)	1.68 (0.28)	1.44 (0.20)	1.46 (0.20)	1.43 (0.18)

*Number of studies.
 †Model #5bis is the simplified form of model #5 where inhibitory substances are ignored.
 ‡Number of cheese.

Although the models excluding interactions between environmental factors #1 and #2 seemed adapted to predict the growth rate, they were less accurate for the growth/no-growth prediction. Two models were then selected to predict the growth of *L. monocytogenes* in food, the new cardinal model including interactions #5 for the growth rate and the growth/no-growth prediction and the probability model #7 for the growth/no-growth prediction. The new cardinal model #5 was preferred to the cardinal model #4 because its analytical form was simpler.

Performance characterization of the selected models

Growth rate prediction. The performance of the new cardinal model including interactions #5 was assessed within the growth range of *L. monocytogenes* according to the function θ , which was chosen to quantify the effect of environmental factors on the growth rate. Figure 1 shows the evolution of the average bias and accuracy factors of the model in liquid microbiological media according to the values of θ . A significant increase of the bias factor was observed when θ decreased to 0, i.e. near the growth limits. This phenomenon was explained by the fact that the bias factor could not account for null growth rates. Therefore, only non-nil observed growth rates were used in this region leading to an apparent underestimation of the model predictions. An increase of the average accuracy factor was observed when θ decreased, signing less accurate predictions when growth limits were approached. This index was difficult to use to define confidence intervals for predicted growth rates because it was not possible to use it when the predicted growth rate was null. To define confidence limits for predictions and to overpass the difficulties linked to the use of the classical bias and accuracy factors, we used the model parameter estimations distributions to estimate lower and upper confidence limits for the predicted growth rates. We assumed that the minimal cardinal values and the MICs were normally distributed and that the optimal specific growth rates followed a gamma distribution (Pouillot *et al.* 2003). The distribution expectations were set to the mean of the observed values (Table 3), that was -1.72°C for T_{\min} , 4.26 for pH_{\min} HCl, 4.71 for pH_{\min} lactic acid, 0.913 for $a_{w \min}$, $25.0 \mu\text{mol l}^{-1}$ for MIC_{nit} , 31.9 ppm for MIC_{phe} , and 3.04 for MIC_{CO_2} . The distribution SDs were set according to the variability of the parameter estimations observed. The variability of T_{\min} and pH_{\min} was assumed to be equal to 5% of the growth range [$\text{SD}/(X_{\max}-X_{\min}) = 0.05$]. The SDs for T_{\min} , pH_{\min} HCl and pH_{\min} lactic acid were then set to 2.34°C , 0.27 and 0.25 respectively. The variability of $a_{w \min}$ was assumed to be 15%, so, the SD was set to 0.013. The variability of MIC-values was assumed to be 60% for nitrite and 30% for phenol and CO_2 , so the SDs for MIC_{nit} ,

Table 7 Correct prediction percentages (CPP), positive predictive values (PPV), and negative predictive values (NPV) of growth/no-growth models for *Listeria monocytogenes* in liquid microbiological media, liquid dairy products, cheese, meat and seafood products

Products	n*	Indices	Models [mean (SD)]							
			#1	#2	#3	#4	#5	#6†	#7‡	#5bis§
Microbiological media	33	CPP (%)	85.1 (17.1)	85.7 (16.4)	86.0 (15.0)	89.5 (14.3)	90.3 (12.9)	83.5 (18.5)	89.1 (16.7)	88.6 (16.2)
		PPV (%)	92.2 (11.9)	92.0 (12.8)	94.0 (12.4)	95.3 (10.3)	94.4 (11.9)	89.5 (18.2)	88.0 (18.3)	92.1 (15.5)
		NPV (%)	62.1 (38.5)	62.0 (34.4)	58.7 (37.2)	67.5 (34.5)	70.9 (34.4)	65.1 (38.6)	90.7 (21.0)	78.2 (30.6)
Liquid dairy products	14	CPP (%)	99.1 (3.3)	100.0 (0.0)	98.2 (6.7)	98.2 (6.7)	99.1 (3.3)	98.2 (6.7)	98.2 (6.7)	99.1 (3.3)
		PPV (%)	100.0 (0.0)	96.4 (13.4)	98.6 (5.3)	98.6 (5.3)	98.6 (5.3)	100.0 (0.0)	97.6 (8.9)	98.6 (5.3)
		NPV (%)	100.0 (-)	-	100.0 (-)	100.0 (-)	100.0 (-)	50.0 (70.7)	100.0 (-)	100.0 (-)
Cheese	49¶	CPP (%)	53.4 (46.1)	54.1 (46.6)	56.1 (40.5)	57.5 (40.3)	56.8 (40.4)	54.4 (36.6)	63.3 (37.6)	56.8 (40.4)
		PPV (%)	45.2 (45.9)	45.9 (46.6)	39.1 (46.7)	39.4 (46.8)	39.4 (46.8)	40.3 (45.6)	40.9 (47.0)	39.4 (46.8)
		NPV (%)	100.0 (0.0)	100.0 (0.0)	83.3 (36.5)	84.1 (35.8)	84.1 (35.8)	79.3 (41.2)	86.0 (33.9)	84.1 (35.8)
Meat products	14	CPP (%)	90.7 (14.6)	90.3 (15.5)	93.6 (9.1)	91.2 (14.2)	91.0 (14.3)	90.1 (14.8)	91.9 (14.7)	90.7 (14.4)
		PPV (%)	92.2 (15.1)	91.0 (15.1)	96.8 (6.5)	93.4 (13.9)	93.5 (13.9)	92.2 (15.0)	94.1 (14.0)	92.2 (14.9)
		NPV (%)	73.1 (38.8)	58.3 (50.0)	59.9 (44.2)	68.8 (39.7)	67.2 (40.0)	67.1 (37.8)	69.3 (33.4)	71.7 (41.5)
Seafood products	4	CPP (%)	97.7 (4.5)	97.7 (4.5)	91.0 (10.5)	98.3 (3.4)	98.3 (3.4)	92.7 (9.5)	98.9 (2.3)	98.3 (3.4)
		PPV (%)	97.7 (4.5)	97.7 (4.5)	98.1 (3.8)	98.3 (3.5)	98.3 (3.5)	97.7 (4.5)	98.8 (2.4)	98.3 (3.5)
		NPV (%)	-	-	10.0 (14.1)	100.0 (-)	50.0 (70.7)	0.0 (-)	100.0 (-)	100.0 (-)

*Number of studies.

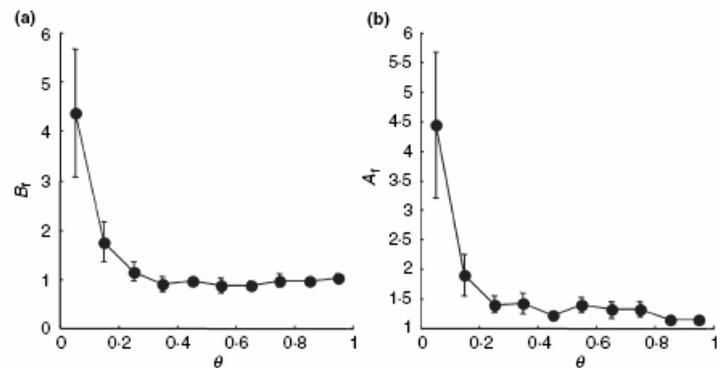
†Strain L5 parameters for microbiological media, dairy, meat and seafood products, and Scott A parameters for cheeses.

‡Broth parameters for microbiological media and liquid dairy products and agar parameters for solid food.

§Model #5bis is the simplified form of model #5 where inhibitory substances are ignored.

¶Number of cheese.

Fig. 1 Evolution of the (a) bias (B_t) and (b) accuracy (A_t) factors of the new cardinal model including interactions #5 within the growth range of *Listeria monocytogenes* in microbiological media. Plotted points are the mean values and vertical bars indicate 1 SD



MIC_{phe} and MIC_{CO₂} were set to 15.0 μmol l⁻¹, 9.6 ppm, and 0.91 respectively. The optimal specific growth rates in liquid microbiological media, liquid dairy products, cheeses, meat and seafood products were characterized by means (Table 4) of 1.05, 0.74, 0.21, 1.17, and 0.57 h⁻¹ and the SDs were rounded to 0.21, 0.15, 0.21, 0.35 and 0.11 h⁻¹ respectively. These mean values and SDs corresponded to the following parameters of gamma distributions: α = 25.00 and β = 0.0420, α = 24.34 and β = 0.0304, α = 1.00 and β = 0.2100, α = 11.87 and β = 0.1047, α = 26.85 and

β = 0.0212 for microbiological media, dairy products, cheeses, meat and seafood products respectively. By using the 10th and 90th percentiles of the distributions of model parameters (Figs 2 and 3), we could hold approx. 95% of the observed maximum specific growth rates (null values included). 95% confidence limits for the growth rate of *L. monocytogenes* could then be proposed by using the following parameter values: (i) for the lower limits: T_{min} = 1.28°C, pH_{min} HCl = 4.61, pH_{min} lactic acid = 5.03, a_w min = 0.930, MIC_{nit} = 5.8 μmol l⁻¹, MIC_{phe} =

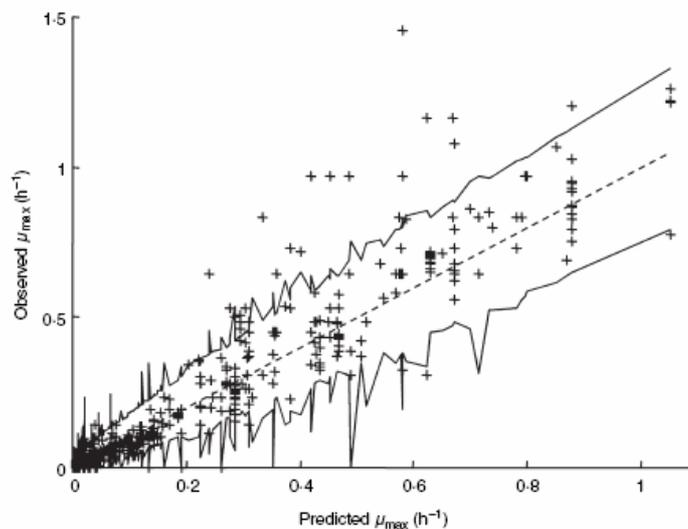


Fig. 2 Plots of observed maximum specific growth rates for *Listeria monocytogenes* in microbiological media against predicted growth rates with the new cardinal model including interactions #5. The dotted line represents the perfect adequacy between observations and predictions and the solid lines represent the confidence limits of the predictions

19.6 ppm, $MIC_{CO_2} = 1.87$, microbiological media $\mu_{opt} = 0.79 \text{ h}^{-1}$, liquid dairy products $\mu_{opt} = 0.56 \text{ h}^{-1}$, cheese $\mu_{opt} = 0.02 \text{ h}^{-1}$, meat products $\mu_{opt} = 0.75 \text{ h}^{-1}$, seafood products $\mu_{opt} = 0.43 \text{ h}^{-1}$, (ii) for the upper limits: $T_{min} = -4.72^\circ\text{C}$, $pH_{min} \text{ HCl} = 3.91$, $pH_{min} \text{ lactic acid} = 4.39$, $a_{w \text{ min}} = 0.896$, $MIC_{nit} = 44.2 \mu\text{mol l}^{-1}$, $MIC_{phe} = 44.2 \text{ ppm}$, $MIC_{CO_2} = 4.21$, microbiological media $\mu_{opt} = 1.33 \text{ h}^{-1}$, liquid dairy products $\mu_{opt} = 0.94 \text{ h}^{-1}$, cheese $\mu_{opt} = 0.48 \text{ h}^{-1}$, meat products $\mu_{opt} = 1.63 \text{ h}^{-1}$, seafood products $\mu_{opt} = 0.71 \text{ h}^{-1}$.

Growth/no-growth prediction. The average positive and NPVs of the new cardinal model including interactions #5 are reported in Table 8. We could observe that PPV and NPV for growth data in the predicted growth domain near the growth limits were complementary. Indeed, although we were in the growth domain, no growth could be predicted because of the criteria used to define the growth (large bacterial population increase and/or short duration of observation). As PPV and NPV were complementary, we only referred to the PPV to predict the growth/no growth. The evolution of the average of the PPV (i.e. growth probability) with θ is shown in Fig. 4. The estimated parameters of the model #8 describing the growth probability with θ were $a = 11.1$ (95% confidence interval [8.9; 13.3]), $b = 0.019$ (95% confidence interval [0.000; 0.039]).

As a great variability of the PPV was observed according to the data sets (Fig. 4), we proposed the following method to obtain reliable growth/no-growth predictions. An average

CPP value of 92.3% was obtained for liquid microbiological media, by using the model #8 to predict the growth probability of *L. monocytogenes* and by considering that growth or no growth occurred when the probability was above 0.5 or below 0.5 respectively. This average CPP value increased to 97.0% when using the following decision rule: growth was predicted when the growth probability was above 0.9 and no growth was predicted when the growth probability was below 0.1. The performances of this method are reported in Table 9. The drawback of this rule was that predictions were available for only 74% of the data. The space defined by environmental factors could then be divided into three parts: a reliable no-growth domain, a reliable growth domain, and an uncertain domain. The performances of the method for dairy products, cheese, meat and seafood products are reported in Table 9. No NPV could be calculated for seafood products because the absence of growth was never predicted by the model. The low NPV obtained for meat products was in fact only linked to two false no-growth predictions. By giving the same weight to each data, we obtained an NPV of 96.7% (two false no-growth for 26 no-growth predictions). The rule seemed then usable for dairy products, meat and seafood products. The predictive performances were poor in cheese, but the model could be used for no-growth prediction in the cheese.

Simplification of the new cardinal model including interactions. Because of the good performance of the probability model #7, we evaluated the need to take into

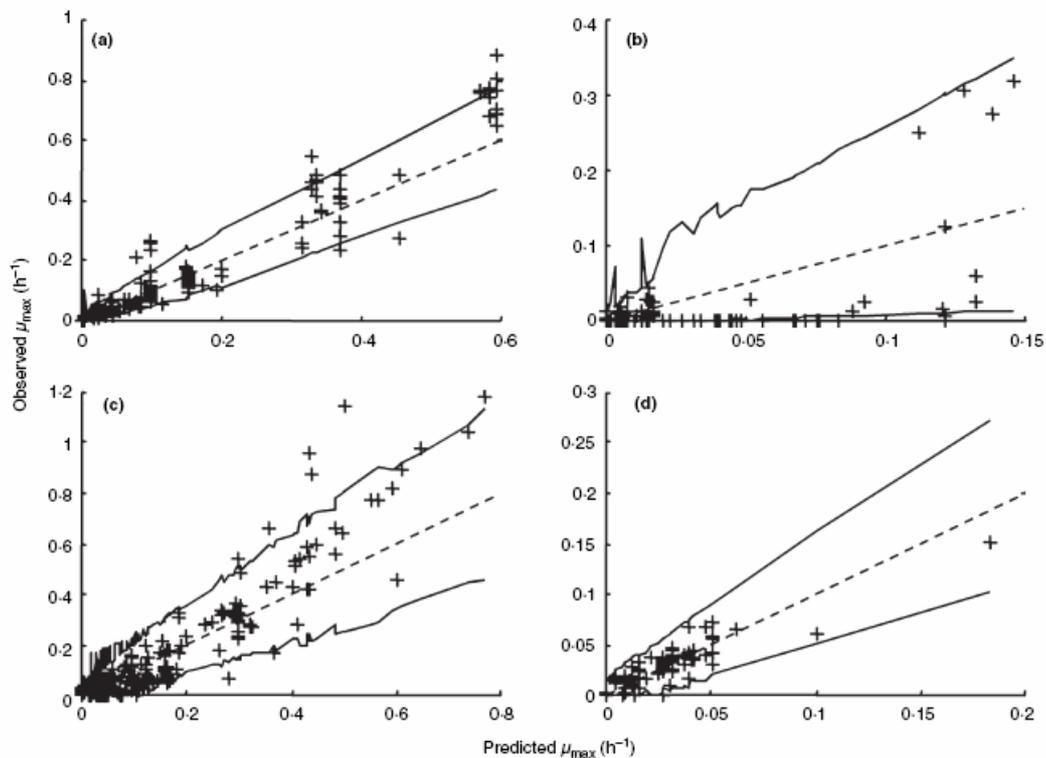


Fig. 3 Plots of observed maximum specific growth rates for *Listeria monocytogenes* in (a) liquid dairy products, (b) cheese, (c) meat, and (d) seafood products against predicted growth rates with the new cardinal model including interactions #5. The dotted line represents the perfect adequacy between observations and predictions and the solid lines represent the confidence limits of the predictions

account preservatives encountered in food for the growth prediction of *L. monocytogenes*. New estimations were then performed with the cardinal model including interactions #5 by deducting nitrite, phenol and CO_2 (model #5bis). The cardinal values previously estimated were conserved and new μ_{opt} mean values (and SDs) were estimated (Table 4). The performances of the simplified model were very close from the ones obtained with the complete model (Tables 6 and 7). In microbiological media, the lower PPV (Table 7) was due to the high concentrations of nitrite used in some experiments where no growth was observed. Therefore, the simplified model was adapted for the growth prediction of *L. monocytogenes* in food products.

Growth rate confidence limits were defined using the same approach as previously described. The following μ_{opt} -values (h^{-1}) were proposed for the lower and upper limits in microbiological media, meat and seafood products: [0.74; 1.28], [0.66; 1.47], [0.36; 0.61] respectively. The μ_{opt} -values

for liquid dairy products and cheese were the same as in the complete model (no preservatives added in these products).

The study of the predictive values of the simplified model gave the same type of results as with the complete model (Fig. 5). The estimated parameters of the model #8bis describing the evolution of the growth probability with the function θ_{TPA} (θ where $c_j = 0$) were $a = 10.2$ (95% confidence interval [8.0; 12.5]), $b = 0.037$ (95% confidence interval [0.012; 0.062]).

When using the decision rule previously defined (growth and no-growth prediction when the growth probability was above 0.9 and below 0.1 respectively), the performances of the simplified model #8bis (Table 9) were inferior to the ones of the complete model #8 in microbiological media because of the presence of high preservative concentrations, however, the performances were equivalent for food products. The growth/no-growth predictive value of the prob-

θ	CPP (%)		PPV (%)		NPV (%)	
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
<-0.75	100.0	0.0	-	-	100.0	0.0
[-0.75; -0.70]	95.0	11.2	-	-	95.0	11.2
[-0.70; -0.65]	100.0	0.0	-	-	100.0	0.0
[-0.65; -0.60]	90.7	13.5	-	-	90.7	13.5
[-0.60; -0.55]	91.7	16.7	-	-	91.7	16.7
[-0.55; -0.50]	92.9	18.9	-	-	92.9	18.9
[-0.50; -0.45]	100.0	0.0	-	-	100.0	0.0
[-0.45; -0.40]	97.6	6.3	-	-	97.6	6.3
[-0.40; -0.35]	94.3	15.1	-	-	94.3	15.1
[-0.35; -0.30]	100.0	0.0	-	-	100.0	0.0
[-0.30; -0.25]	94.2	10.2	-	-	94.2	10.2
[-0.25; -0.20]	65.8	41.0	-	-	65.8	41.0
[-0.20; -0.15]	87.2	29.4	-	-	87.2	29.4
[-0.15; -0.10]	82.0	29.9	-	-	82.0	29.9
[-0.10; -0.05]	90.0	17.7	-	-	90.0	17.7
[-0.05; 0.00]	67.1	38.2	-	-	67.1	38.2
[0.00; 0.05]	46.2	37.7	63.3	41.5	47.0	39.3
[0.05; 0.10]	49.9	42.0	70.8	43.9	26.5	41.8
[0.10; 0.15]	57.4	37.9	67.5	39.7	20.8	40.1
[0.15; 0.20]	71.0	39.2	82.5	34.2	7.5	15.0
[0.20; 0.25]	90.8	22.5	92.2	22.2	0.0	0.0
[0.25; 0.30]	93.0	18.5	93.9	18.5	0.0	0.0
[0.30; 0.35]	92.5	19.9	92.5	19.9	-	-
[0.35; 0.40]	98.2	7.2	98.2	7.2	-	-
[0.40; 0.45]	99.1	3.7	99.1	3.7	-	-
[0.45; 0.50]	99.4	2.3	99.4	2.3	-	-
[0.50; 0.55]	96.1	15.7	96.1	15.7	-	-
[0.55; 0.60]	96.9	12.5	96.9	12.5	-	-
[0.60; 0.65]	100.0	0.0	100.0	0.0	-	-
[0.65; 0.70]	100.0	0.0	100.0	0.0	-	-
[0.70; 0.75]	100.0	0.0	100.0	0.0	-	-
>0.75	100.0	0.0	100.0	0.0	-	-

Table 8 Evolution of the correct prediction percentage (CPP), the positive predictive value (PPV), and the negative predictive value (NPV) of the new cardinal growth model including interactions #5 for *Listeria monocytogenes* in liquid microbiological media, according to the function θ describing the effects of temperature, pH, water activity, nitrite, phenol and CO₂ and their interactions (model #8)

ability model #7 was also increased by the above decision rule (Table 9). The performances of this model were a little bit lower than the performances of the model #8bis. However, the advantage of this probability model was its narrow uncertain domain, as the predictable percentages were higher than 90%. Figure 6 illustrates the confident growth/no-growth domains, and uncertain domains for the two models.

Validation of the growth rate and growth/no-growth models

The results obtained for the validation of the complete and simplified cardinal model including interactions #5 and #5bis and the probability models #7, #8 and #8bis are shown in Table 10. Four per cent of the observed growth rates were below the lower confidence limit of the predicted ones with the complete model #5 against 15% with the

simplified model #5bis. This was due to the fact that the presence of preservatives in meat (nitrite and CO₂) and seafood products (CO₂) was not taken into account by the simplified model. Examples of this phenomenon are presented in Table 11. Approximately 3% of the observed growth rates were above the upper confidence limits of the predictions with both models. However, some of them were questionable, for example, the μ_{max} -value of 0.16 h⁻¹ (Table 11) observed in Camembert cheese at 10°C by Murphy *et al.* (1996) seemed very high.

The better capacity of the probability model #7 to produce a growth/no-growth prediction (96% of cases) compared with model #8 (70%) was however linked to a decreased CPP. Indeed, the percentage of false growth predictions for this model was 16% against 8% for the model #8 and it predicted three false no growth in meat products. The performance of the simplified probability model #8bis was intermediate.

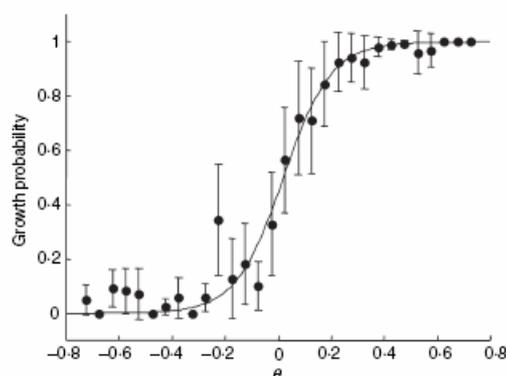


Fig. 4 Evolution of the growth probability of *Listeria monocytogenes* in microbiological media according to the function θ describing the effects of temperature, pH, water activity, nitrite, phenol and CO_2 , and their interactions. Plotted points are the mean values and vertical bars indicate 1 SD. The solid line is the fitted model #8

DISCUSSION

All tested models showed quite bias and accuracy factors. The models appeared then equivalent to predict the growth rate of *L. monocytogenes* in food. Polynomial models available on the free Pathogen Modeling Program (U.S. Department of Agriculture, <http://www.arserrc.gov/mfs/pathogen.htm>) were not evaluated in this study because they were shown to overestimate the growth rates in food (Pinon *et al.* 2004). Although acceptable limits were proposed for bias and accuracy factors (Ross 1999; Dalgaard 2000; Ross and

McMeekin 2003), the interpretation of these indices remained difficult because the calculated values depended largely on the formula used (Baranyi *et al.* 1999). Models including interactions between environmental factors appeared more effective to predict the growth/no growth of the pathogen. In order to compare the model performance for growth/no growth, it was essential to consider the way to define growth or no growth. This definition was indeed differently interpreted according to the authors. For example, Buchanan *et al.* (1989) considered that there was no growth when the cultures displayed $<1 \log_{10}$ cycle increase of the initial bacterial concentration during the experimental period, Cole *et al.* (1990) reported growth when a visible growth was observed in microtitre plate wells within a period of 60 days, and Koutsoumanis *et al.* (2004) reported no growth when no increase of the turbidity of the broth medium was observed within 30 days of incubation with a confirmation by bacterial counts. The best effectiveness of models including interactions was more obvious near the growth limits. Therefore, the average CPP of models excluding interactions was 47% for data corresponding to θ -values between -0.1 and 0.1 even though the average CPP of models including interactions was 63% for the same data. The new cardinal model including interactions was then preferred to the other models for two reasons: first, it was more effective to predict the growth/no-growth limits and secondly, its analytical form was simpler than the form proposed by Le Marc *et al.* (2002). This model was based on the same hypothesis concerning the growth/no-growth interface as the model proposed by Augustin and Carlier (2000b) but it now progressively takes into account the effect of interactions between environmental factors on the growth rate in the manner proposed by Le Marc *et al.* (2002), with a

Table 9 Correct prediction percentages (CPP), positive predictive values (PPV), negative predictive values (NPV) and prediction percentages (PP) of growth probability models for *Listeria monocytogenes* in liquid microbiological media, liquid dairy products, cheeses, meat and seafood products (growth predicted when growth probability is above 0.9, no growth predicted when growth probability is below 0.1)

Products	n*	Models											
		#8				#8bis†				#7			
		CPP (%)	PPV (%)	NPV (%)	PP (%)	CPP (%)	PPV (%)	NPV (%)	PP (%)	CPP (%)	PPV (%)	NPV (%)	PP (%)
Microbiological media	33	97.0	98.3	94.6	74.5	93.1	94.8	94.2	72.5	89.6	89.0	91.0	97.0
Liquid dairy products	14	100.0	100.0	100.0	95.9	100.0	100.0	100.0	91.8	98.2	97.6	100	100
Cheese	49‡	52.4	42.9	73.3	81.9	52.4	42.9	73.3	81.3	62.9	41.9	84.8	99.5
Meat products	14	97.8	97.7	75.0	74.4	97.3	97.2	100.0	81.5	93.1	94.8	67.6	90.9
Seafood products	4	98.7	98.7	–	88.8	98.2	98.2	–	96.3	98.8	98.8	100	98.8

*Number of studies.

†Model #8bis is the simplified form of model #8 where inhibitory substances are ignored.

‡Number of cheese.

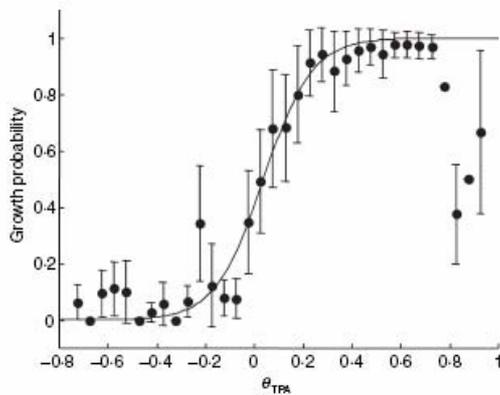


Fig. 5 Evolution of the growth probability of *Listeria monocytogenes* in microbiological media according to the function θ_{TPA} describing the effects of temperature, pH, water activity, and their interactions (θ without inhibitory substances). Plotted points are the mean values and vertical bars indicate 1 SD. The solid line is the fitted model #8bis

space where environmental factors have independent effects on the growth rate. The model proposed in 2000 by Augustin and Carlier was shown to overestimate the effect of

interactions on the growth rate (Comu *et al.* 2003; Giménez and Dalgaard 2004; Ross and Dalgaard 2004) which contrary to the new model acted on the entire growth range. Whatever the model chosen, it is important to insist on the fact that models shall be used with parameter values consistent with these models. Indeed, as it was pointed out by Ross and Dalgaard (2004), large differences were observed between cardinal values, MICs and optimal specific growth rates for *L. monocytogenes*, depending on the model used to estimate them.

The observed dispersion of parameter estimations included the biological variability and the uncertainty on these parameters. The dispersion was sometimes consistent with the biological variability obtained by other authors. Thus, Pouillot *et al.* (2003) observed a mean SD of 1.26°C for the biological variability of T_{min} against an SD of 2.55°C in our study. For the optimal specific growth rate of *L. monocytogenes* in milk, they observed a mean SD of 0.18 h⁻¹ against 0.13 h⁻¹ in our study. We can then consider that the observed variability is to some extent representative of the biological variability of the growth parameters of *L. monocytogenes*. Nevertheless some other factors not yet identified certainly interacted with this biological variability, as the dispersion of the optimal specific growth rate was very dependent on the food

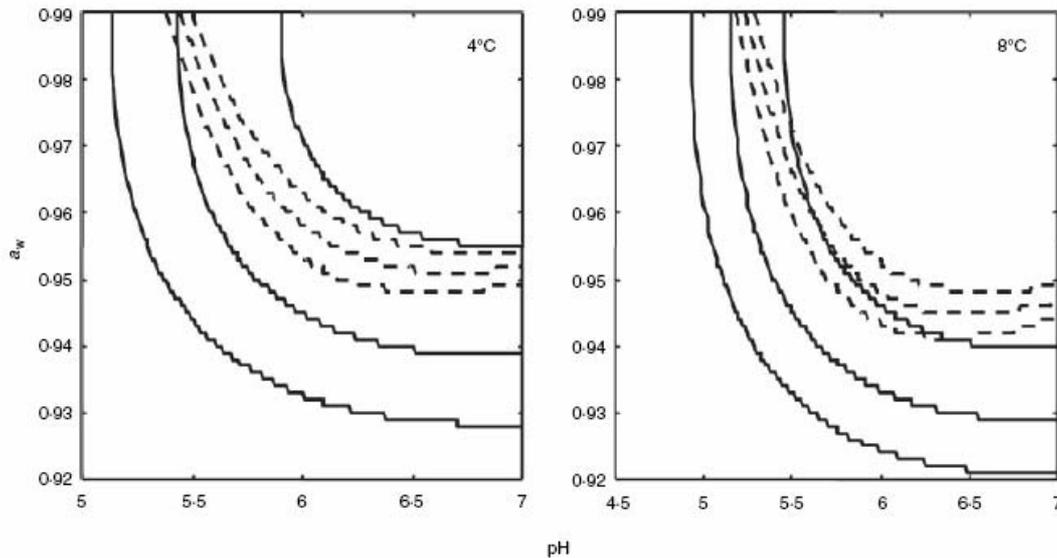


Fig. 6 Predicted growth and no-growth domains for *Listeria monocytogenes* at 4 and 8°C according to the pH and the water activity of food. The solid lines represent the limits predicted by the simplified probability model #8bis and the dotted lines represent the limits predicted in agar by the probability model #7 proposed by Koutsoumanis *et al.* (2004). The lower lines correspond to a growth probability of 0.1, the middle lines correspond to a probability of 0.5 and the upper lines correspond to a probability of 0.9

Table 10 Results of the validation of the *Listeria monocytogenes* growth models in food

Predictions	Indices	Food products	n*	Models		
				#5 and #8	#5bis and #8bis†	#7
Growth rate	No. above upper limit	Cheese	21	1	1	–
		Meat	128	1	1	–
		Seafood	47	4	5	–
	No. below lower limit	Total	196	6 (3%)	7 (4%)	–
		Cheese	21	2	2	–
		Meat	128	5	21	–
Growth/no growth‡	No. of predictions	Seafood	47	0	6	–
		Total	196	7 (4%)	29 (15%)	–
		Cheese	21	18	18	21
		Meat	146	92	103	137
		Seafood	47	40	44	47
		Total	214	150 (70%)	165 (77%)	205 (96%)
	No. of false growths	Cheese		2	2	8
		Meat		8	14	21
		Seafood		2	3	3
		Total		12 (8%)	19 (12%)	32 (16%)
	No. of false no growths	Cheese		0	0	0
		Meat		0	0	3
Seafood			0	0	0	
Total			0	0	3 (1%)	

*Number of data.

†Models #5bis and #8bis are the simplified forms of models #5 and #8 where inhibitory substances are ignored.

‡Growth predicted when growth probability is above 0.9, no growth predicted when growth probability is below 0.1.

considered. The coefficient of variation of 90% observed for cheeses was certainly because of unidentified abiotic (heterogeneity of pH or aw, lactic acid concentration) or biotic (competitive microflora) factors influencing the growth rate of *L. monocytogenes*. In addition, large variations in optimal growth rates were observed for identical cheeses (Table 5) without explanation. For example, Genigeorgis *et al.* (1991) observed an increase of the population of *L. monocytogenes* of 0.59 log₁₀ on the surface of Brie cheese at pH 7.2 in 30 days at 4°C whereas the increase of the population was of 0.86 log₁₀ in 6 days in the centre of the same cheese at pH 6. Some refinements of the model should then be made to take these factors into account and thus, to reduce the confidence interval of the predictions. Therefore, the proposed model was a simplification of the real situation and the observed dispersion did certainly better reflect the completeness error of the model (Baranyi and Roberts 1995) than the biological variability. However, the observed parameter variability constituted an important knowledge for quantitative risk assessment studies but it should carefully be used. Indeed, the dispersions observed according to the strains used in experimental studies were probably not representative of the frequency of the distribution of strains naturally contaminating food.

For model validation, our results confirmed that it was important to collect data from a large number of studies rather than from a large number of data issued from few studies (te Giffel and Zwietering 1999). The observed growth data were effectively relatively variable depending on the study from which they were issued and a model could show good or poor performances depending on the data sets used. This phenomenon was particularly pronounced for the growth of *L. monocytogenes* in cold-smoked salmon, where large differences in growth rates were observed between naturally and artificially contaminated samples. The weak growth of the pathogen in naturally contaminated salmon (Cortesi *et al.* 1997; Lappi *et al.* 2004) was mainly attributed to the effect of the competitive microflora (Dalgaard and Jørgensen 1998; Ross *et al.* 2000; Ross and McMeekin 2003), and models were proposed to take into account these interactions (Giménez and Dalgaard 2004).

In order to take into account the completeness error of the model and the biological variability, we proposed parameter values that allowed to predict limits of *L. monocytogenes* growth rates with a confidence level of approx. 95%. Although the proposed method was empirically derived, with assumptions on the parameter distributions, it gave (except for cheese) confidence limits including on average more than 95% of the observed growth rates in a well-

Table 11 Observed and predicted growth of *Listeria monocytogenes* in food

References	Food products	T (°C)	pH	a _w	nit (μmol l ⁻¹)	pbc (ppm)	CO ₂	Observed		Predicted μ _{max} (h ⁻¹)			Growth probability (%)	
								μ _{max} (h ⁻¹)	Growth	#5	#5bis*	#8	#8bis*	#7
Papageorgiou and Marth (1989b)	Feta cheese	4	4.75	0.975	0	0	0	0.00	No	0 (0; 0)†	0 (0; 0)	0	0	0
Hicks and Lund (1991)	Cottage cheese	4	4.68	(0.985)‡	0	0	0	0.00	No	0 (0; 0)	0 (0; 0)	0	0	0
Murphy et al. (1996)	Camembert cheese	12	4.63	(0.985)	0	0	0	0.00	No	0 (0; 0.01)	0 (0; 0.01)	1	1	0
Wang and Johnson (1997)	Camembert cheese	4	6.4	0.982	0	0	0	0.01	Yes	0.01 (0; 0.02)	0.01 (0; 0.02)	98	96	100
McAuliffe et al. (1999)	Camembert cheese	10	6.4	0.982	0	0	0	0.16	Yes	0.02 (0; 0.07)	0.02 (0; 0.07)	100	100	100
	Cottage cheese	4	6.2	(0.985)	0	0	0	0.02	Yes	0.01 (0; 0.02)	0.01 (0; 0.02)	97	95	100
Buchanan and Klawitter (1991)	Canned meat	30	5.2	0.985	0	0	0	0.00	No	0 (0; 0.01)	0 (0; 0.01)	17	16	0
	Canned meat	5	(6.3)	(0.99)	(0)	0	0	0.02	Yes	0.06 (0; 0.18)	0.06 (0; 0.18)	99	99	100
Buncic et al. (1991)	Frankfurters	5	(6.3)	(0.99)	(0)	0	0	0.04	Yes	0.04 (0.01; 0.11)	0.04 (0.01; 0.10)	99	98	100
Hart et al. (1991)	Frankfurters	4	(6.2)	0.977	(0.5)	0	0.3	0.01	Yes	0.02 (0; 0.07)	0.02 (0; 0.07)	88	94	100
	Chicken breast	1	5.8	(0.99)	0	0	0	0.00	No	0 (0; 0)	0 (0; 0)	0	0	93
Marshall et al. (1991)	Chicken nuggets	15	5.8	(0.99)	0	0	0.3	0.07	Yes	0.19 (0.08; 0.34)	0.18 (0.08; 0.33)	100	100	100
Schillinger et al. (1991)	Minced beef	7	(6.0)	(0.98)	(0)	0	0	0.02	Yes	0.06 (0.01; 0.13)	0.05 (0.01; 0.12)	99	98	100
	Comminuted cured raw pork	15	5.7	0.989	2.7	0	0	0.07	Yes	0.07 (0.02; 0.16)	0.06 (0.02; 0.14)	99	98	100
	Salami	15	6.3	0.986	0.7	0	0	0.08	Yes	0.24 (0.11; 0.41)	0.22 (0.11; 0.38)	100	100	100
Campanini et al. (1993)	Pâté	14	5.45	0.971	29.9	0	0	0.06	No	0 (0; 0)	0.09 (0.02; 0.19)	0	0	98
Hudson and Mott (1993a)	Pork loins	10	6.1	(0.98)	(0)	0	0	0.06	Yes	0.11 (0.04; 0.21)	0.09 (0.04; 0.19)	100	100	100
Manu-Tawiah et al. (1993)	Beef striploins	4	5.8	(0.99)	0	0	0	0.01	Yes	0.02 (0; 0.07)	0.02 (0; 0.07)	90	87	100
Avery et al. (1994)	Beef wieners	5	5.4	(0.99)	0	0	0.3	0.01	Yes	0 (0; 0.05)	0.01 (0; 0.06)	38	60	69
McKellar et al. (1994)	Beef wieners	5	5.4	(0.99)	0	0	0	0.00	No	0 (0; 0)	0.01 (0; 0.06)	5	60	69
Schmidt (1995)	Frankfurters	5	6.23	0.970	0.4	5	0.3	0.01	Yes	0.01 (0; 0.07)	0.03 (0; 0.08)	67	96	100
	Frankfurters	2	5.87	0.970	0.9	5	0.3	0.02	Yes	0 (0; 0.04)	0.02 (0; 0.07)	38	91	100
Beumer et al. (1996)	Cooked chicken breast	7	6.2	(0.97)	(0)	0	0.3	0.01	Yes	0 (0; 0.04)	0.01 (0; 0.04)	65	80	100
	Cooked chicken breast	7	(6.3)	(0.98)	(0)	0	0.3	0.05	Yes	0.05 (0; 0.11)	0.05 (0.01; 0.11)	98	99	100
Blom et al. (1997)	Cooked ham	4	6.4	0.989	(0)	0	0.3	0.04	Yes	0.06 (0.01; 0.13)	0.06 (0.02; 0.13)	98	99	100
Duffy et al. (2000)	Minced beef	10	5.51	(0.99)	0	0	0.3	0.02	Yes	0.03 (0; 0.08)	0.03 (0; 0.08)	93	96	100
Nissen et al. (2000)	Minced beef	10	6.83	(0.99)	0	0	0	0.03	No	0.06 (0; 0.16)	0.07 (0.01; 0.16)	94	97	100
Nyati (2000)	Minced beef	4	(5.8)	(0.99)	0	0	0.6	0.01	No	0.15 (0.06; 0.27)	0.13 (0.05; 0.24)	100	100	100
	Chicken breast	0	5.6	0.990	0	0	0	0.01	Yes	0 (0; 0.07)	0.02 (0; 0.07)	51	87	100
	Chicken breast	2.5	5.6	0.985	0	0	0	0.09	Yes	0 (0; 0.01)	0 (0; 0.01)	18	17	5
	Chicken breast	2.5	5.6	0.985	0	0	0	0.09	Yes	0 (0; 0.04)	0 (0; 0.04)	56	51	64

© 2005 The Society for Applied Microbiology, *Journal of Applied Microbiology*, doi:10.1111/j.1365-2672.2005.02710.x

Table 11 *Continued*

References	Food products	T (°C)	pH	a _w	nit ($\mu\text{mol l}^{-1}$)	phe (ppm)	CO ₂	Observed		Predicted μ_{max} (h ⁻¹)				Growth probability (%)
								μ_{max} (h ⁻¹)	Growth	#5	#5bis*	#8	#8bis*	
Bedie <i>et al.</i> (2001)	Frankfurters	4	6.23	0.946	(0)	0	0.3	0.00	Yes	0 (0; 0.04)	0 (0; 0.04)	48	68	2
		4	5.87	0.962	(0)	0	0.3	0.00	No	0 (0; 0.05)	0.01 (0; 0.05)	65	80	52
Devlieghere <i>et al.</i> (2001)	Sterile ham	4	6.19	0.982	(0)	0	0	0.03	Yes	0.03 (0; 0.08)	0.02 (0; 0.07)	97	95	100
		12	6.19	0.982	(0)	0	0	0.09	Yes	0.15 (0.07; 0.28)	0.14 (0.06; 0.25)	100	100	100
Dykes and Moorhead (2002)	Beef	4	(5.8)	(0.99)	0	0	0.3	0.00	No	0.01 (0; 0.07)	0.02 (0; 0.07)	76	87	100
Mbandi and Shalef (2002)	Beef bologna	5	6.3	(0.97)	(0)	0	0	0.01	Yes	0.03 (0; 0.09)	0.03 (0; 0.08)	98	97	100
Ingham <i>et al.</i> (2004)	Beef snack sticks	5	5.0	0.95	(0)	0	0	NK§	No	0 (0; 0)	0 (0; 0)	1	1	0
	Elk sausage	21	5.3	0.96	(0)	0	0	NK	No	0.14 (0.01; 0.29)	0.12 (0.01; 0.26)	99	98	99
	Summer sausage	21	4.9	0.95	(0)	0	0	NK	No	0 (0; 0.15)	0 (0; 0.13)	38	35	0
P. Garry, personal communication	Mettwurst	8	5.91	0.952	(0)	0	0	0.00	No	0.03 (0; 0.10)	0.03 (0; 0.09)	96	94	78
Rørvik <i>et al.</i> (1991)	Smoked salmon	4	6.19	0.982	0	(0)	0.3	0.02	Yes	0.01 (0; 0.03)	0.01 (0; 0.03)	90	95	100
Wang and Shalef (1992)	Cod fish fillets	5	(6.0)	(0.99)	0	0	0	0.01	Yes	0.02 (0; 0.04)	0.02 (0; 0.04)	97	96	100
		20	(6.0)	(0.99)	0	0	0	0.29	Yes	0.18 (0.12; 0.26)	0.16 (0.10; 0.23)	100	100	100
Dorsa <i>et al.</i> (1993)	Crawfish tail meat	6	(6.0)	(0.99)	0	0	0	0.01	Yes	0 (0; 0.01)	0 (0; 0.01)	53	48	100
		6	(6.0)	(0.99)	0	0	0	0.06	Yes	0.03 (0.01; 0.05)	0.02 (0.01; 0.05)	98	97	100
Hudson and Mott (1993b)	Cold-smoked salmon	5	6.1	0.983	0	(0)	0	0.03	Yes	0.02 (0; 0.04)	0.02 (0; 0.04)	98	96	100
		10	6.1	0.983	0	(0)	0.3	0.09	Yes	0.05 (0.02; 0.09)	0.05 (0.02; 0.08)	99	100	100
Oh and Marshall (1994)	Crawfish tail meat	4	(6.0)	(0.98)	0	0	0	0.01	Yes	0.01 (0; 0.03)	0.01 (0; 0.03)	94	92	100
Rosso <i>et al.</i> (1996)	Salmon	8	6.0	0.984	0	11	0	0.03	Yes	0.04 (0.01; 0.07)	0.03 (0.01; 0.06)	99	99	100
Nilsson <i>et al.</i> (1997)	Cold-smoked salmon	5	6.15	0.973	0	(0)	0.3	0.06	Yes	0.01 (0; 0.04)	0.01 (0; 0.03)	93	96	100
		5	6.15	0.973	0	(0)	0.7	0.01	Yes	0 (0; 0.03)	0.01 (0; 0.03)	75	96	100
Dalgaard and Jørgensen (1998)	Cold-smoked salmon	5	6.2	0.971	0	(0)	0.3	0.01	Yes	0.01 (0; 0.03)	0.01 (0; 0.03)	93	96	100
Szabo and Cahill (1999)	Hot-smoked salmon	4	6.1	(0.97)	0	(0)	1	0.00	No	0.01 (0; 0.04)	0.01 (0; 0.03)	94	97	100
		10	6.3	(0.97)	0	(0)	0.3	0.06	Yes	0.04 (0.01; 0.08)	0.04 (0.02; 0.07)	99	100	100
Nykanen <i>et al.</i> (2000)	Cold-smoked trout	3	(6.0)	(0.97)	0	(0)	0.3	0.01	Yes	0 (0; 0.02)	0 (0; 0.02)	70	83	99
		8	(6.0)	(0.97)	0	(0)	0.3	0.02	Yes	0.03 (0; 0.05)	0.02 (0.01; 0.05)	98	99	100
Katls <i>et al.</i> (2001)	Cold-smoked salmon	10	6.0	0.983	0	0	0.3	0.03	Yes	0.05 (0.01; 0.08)	0.04 (0.02; 0.08)	99	100	100
Gnanou Besse (2004)	Cold-smoked salmon	8	(6.0)	(0.97)	0	6	0.3	0.04	Yes	0.03 (0; 0.05)	0.02 (0.01; 0.05)	98	99	100
		8	(6.0)	(0.97)	0	6	0.3	0.01	Yes	0.03 (0; 0.05)	0.02 (0.01; 0.05)	98	99	100

*Models#5bis and#8bis are the simplified forms of models#5 and#8, where inhibitory substances are ignored.

†In brackets: confidence limits of predictions.

‡In brackets: characteristics arbitrarily set because not specified in the study.

§Not known.

balanced manner. Thus, the mean percentages of growth rates above the upper limits in microbiological media and meats were 1.4 and 1.9%, respectively, and the mean percentages of growth rates below the lower limits in microbiological media and meats were 1.6 and 1.8% respectively. In the validation study, some observed growth rates were above the predicted upper limits in seafood products, but these data were obtained by challenge testing in smoked salmon for which it was pointed out that growth in naturally contaminated samples was weaker (Cortesi *et al.* 1997; Lappi *et al.* 2004). On the contrary, some observed growth rates in meat products were below the predicted lower limits. This was mainly due to the presence of preservatives (e.g. nitrite) not taken into account by the model as the concentrations were not specified in the studies.

Another advantage of this new model was its capacity to predict the growth probability of *L. monocytogenes* in food. A probability model based on the results obtained with the new cardinal model including interactions was proposed. When considering that no growth is observed when the growth probability is below 0.1 and that growth occurs when this probability is above 0.9, we obtained a relatively consistent decision rule. Growth was sometimes wrongly predicted in cheese as lactic acid concentration and microbial interactions were certainly very important factors, that were not taken into account by the model. In meat products, false growth was also predicted for the reason described above (presence of inhibitory substances not known). In the validation study, the model never predicted false no-growth, which was important for a pathogenic micro-organism. Thus, this decision rule seemed safely usable for the no-growth prediction of *L. monocytogenes* in food. The only drawback of this rule was its poor prediction capacity as only 70% of the situations were predictable in the validation study. In these cases the calculated probability could however give an idea of the micro-organism behaviour, and the prediction obtained with the probability model proposed by Koutsoumanis *et al.* (2004) could also be used although this one predicts more false growth (16% of the previsions in this study) and sometimes false no growth (1% of the previsions in this study).

The simplification of the model by ignoring the effects of nitrite, phenol and CO₂ could be used when these parameters were not known. In seafood products, the effect of phenol is controversial (Ross *et al.* 2000; Giménez and Dalgaard 2004), and it was indeed observed in the present study that ignoring the phenol concentration led to better predictions. On the contrary, the predictions were improved when the CO₂ concentration was taken into account. In all food products, the predictions obtained with the simplified model were logically more conservative than those obtained with the complete one and no false no growth was predicted.

When information on the presence of preservatives in food was available, it appeared preferable to use the complete model for the refinement of predictions.

In conclusion, the proposed models seemed suitable to predict the growth rate and the growth probability of *L. monocytogenes* in liquid dairy products, meat and seafood products under suboptimal growth conditions. In cheese, the models seemed appropriate for the no-growth prediction but refinements should be performed to increase the PPV of the model.

ACKNOWLEDGEMENTS

We gratefully acknowledge Hélène Bergis and Pascal Garry for providing growth data obtained from seafood products, deli meats, and cheese, and Carole Feurer who checked the manuscript for the correct use of English.

REFERENCES

- Abdalla, O.M., Christen, G.L. and Davidson, P.M. (1993) Chemical composition of and *Listeria monocytogenes* survival in white pickled cheese. *J Food Prot* 56, 841–846.
- Ahamad, N. and Marth, E.H. (1989) Behavior of *Listeria monocytogenes* at 7, 13, 21, and 35°C in tryptose broth acidified with acetic, citric, or lactic acid. *J Food Prot* 52, 688–695.
- Anon (2001) *Avis de l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments relatif à la classification des aliments selon le danger représenté par Listeria monocytogenes*. Maisons-Alfort, France: AFSSA (<http://www.afssa.fr>).
- Anon (2003) *Quantitative Assessment of the Relative Risk to Public Health from Foodborne Listeria monocytogenes among Selected Categories of Ready-to-Eat Foods*. FDA, Center for Safety and Applied Nutrition, USDA, Food Safety and Inspection Service, Washington, USA (<http://www.cfsan.fda.gov>).
- Anon (2004) *Risk Assessment of Listeria monocytogenes in Ready-to-Eat Foods*. Geneva, Switzerland: FAO/WHO (<http://www.who.int/foodsafety>).
- Augustin, J.-C. and Carlier, V. (2000a) Mathematical modelling of the growth rate and lag time for *Listeria monocytogenes*. *Int J Food Microbiol* 56, 29–51.
- Augustin, J.-C. and Carlier, V. (2000b) Modelling the growth rate of *Listeria monocytogenes* with a multiplicative type model including interactions between environmental factors. *Int J Food Microbiol* 56, 53–70.
- Avery, S.M., Hudson, J.A. and Penney, N. (1994) Inhibition of *Listeria monocytogenes* on normal ultimate pH beef (pH 5.3–5.5) at abusive storage temperatures by saturated carbon dioxide controlled atmosphere packaging. *J Food Prot* 57, 331–333.
- Bajard, S. (1996) *Modélisation à visée prévisionnelle de la cinétique de croissance d'une population de Listeria monocytogenes*. PhD Thesis, Université Claude-Bernard Lyon 1, Lyon, France.
- Bajard, S., Rosso, L., Fardel, G. and Flandrois, J.P. (1996) The particular behaviour of *Listeria monocytogenes* under sub-optimal conditions. *Int J Food Microbiol* 29, 201–211.

- Baranyi, J. and Roberts, T.A. (1995) Mathematics of predictive food microbiology. *Int J Food Microbiol* 26, 199–218.
- Baranyi, J., Pin, C. and Ross, T. (1999) Validating and comparing predictive models. *Int J Food Microbiol* 48, 159–166.
- Bampalia, I.M., Koutsoumanis, K.P., Geornaras, I., Belk, K.E., Scanga, J.A., Kendall, P.A., Smith, G.C. and Sofos, J.N. (2005) Effect of antimicrobials as ingredients of pork bologna for *Listeria monocytogenes* control during storage at 4 or 10°C. *Food Microbiol* 22, 205–211.
- Bedic, G.K., Samelis, J., Sofos, J.N., Belk, K.E., Scanga, J.A. and Smith, G.C. (2001) Antimicrobials in the formulation to control *Listeria monocytogenes* postprocessing contamination on Frankfurters stored at 4°C in vacuum packages. *J Food Prot* 64, 1949–1955.
- Beumer, R.R., te Giffel, M.C., de Boer, E. and Rombouts, F.M. (1996) Growth of *Listeria monocytogenes* on sliced cooked meat products. *Food Microbiol* 13, 333–340.
- Blom, H., Nerbrink, E., Dainty, R., Hagtvædt, T., Borch, E., Nissen, H. and Nesbakken, T. (1997) Addition of 2.5% lactate and 0.25% acetate controls growth of *Listeria monocytogenes* in vacuum-packed, sensory-acceptable serelat sausage and cooked ham stored at 4°C. *Int J Food Microbiol* 38, 71–76.
- Brocklehurst, T. (2004) Challenge of food and the environment. In *Modeling Microbial Responses in Food* ed. McKellar, R.C. and Lu, X. pp. 197–232. Boca Raton, FL: CRC Series in Contemporary Food Science, CRC Press.
- Brocklehurst, T.F., Parker, M.L., Gunning, P.A., Coleman, H.P. and Robins, M.M. (1995) Growth of food-borne pathogenic bacteria in oil-in-water emulsions: II-Effect of emulsion structure on growth parameters and form of growth. *J Appl Bacteriol* 78, 609–615.
- Broughall, J.M., Anslow, P.A. and Kilsby, D.C. (1983) Hazard analysis applied to microbial growth in foods: development of mathematical models describing the effect of water activity. *J Appl Bacteriol* 55, 101–110.
- Buchanan, R.L. and Klawitter, L.A. (1990) Effects of temperature and oxygen on the growth of *Listeria monocytogenes* at pH 4.5. *J Food Sci* 55, 1754–1756.
- Buchanan, R.L. and Klawitter, L.A. (1991) Effect of temperature history on the growth of *Listeria monocytogenes* Scott A at refrigeration temperatures. *Int J Food Microbiol* 12, 235–246.
- Buchanan, R.L. and Phillips, J.G. (1990) Response surface model for predicting the effects of temperature, pH, sodium chloride content, sodium nitrite concentration and atmosphere on the growth of *Listeria monocytogenes*. *J Food Prot* 53, 370–376.
- Buchanan, R.L., Stahl, H.G. and Whiting, R.C. (1989) Effects and interactions of temperature, pH, atmosphere, sodium chloride, and sodium nitrite on the growth of *Listeria monocytogenes*. *J Food Prot* 52, 844–851.
- Buncic, S., Paunovic, L. and Radisic, D. (1991) The fate of *Listeria monocytogenes* in fermented sausages and in vacuum-packaged Frankfurters. *J Food Prot* 54, 413–417.
- Campanini, M., Pedrazzoni, I., Barbuti, S. and Baldini, P. (1993) Behaviour of *Listeria monocytogenes* during the maturation of naturally and artificially contaminated salami: effect of lactic-acid bacteria starter cultures. *Int J Food Microbiol* 20, 169–175.
- Chen, N. and Shelf, L.A. (1992) Relationship between water activity, salts of lactic acid, and growth of *Listeria monocytogenes* in a meat model system. *J Food Prot* 55, 574–578.
- Cole, M.B., Jones, M.V. and Holyoak, C. (1990) The effect of pH, salt concentration and temperature on the survival and growth of *Listeria monocytogenes*. *J Appl Bacteriol* 69, 63–72.
- Conner, D.E., Scott, V.N. and Bernard, D.T. (1990) Growth, inhibition, and survival of *Listeria monocytogenes* as affected by acidic conditions. *J Food Prot* 53, 652–655.
- Cornu, M., Beaufort, A., Rudelle, S., Bergis, H., Miconnet, N., Serot, T. and Delignette-Muller, M.L. (2003) Growth of *Listeria monocytogenes* in cold-smoked salmon. Comparison and validation of predictive models. In *Predictive Modelling in Foods 4th International Conference-Conference proceedings* ed. van Impe, J.F.M., Geeraerd, A.H., Leguérinel, I. and Mafart, P. pp. 105–107. Leuven, Belgium: Katholieke Universiteit Leuven/BioTec.
- Cortesi, M.L., Sarli, T., Santoro, A., Murru, N. and Pepe, T. (1997) Distribution and behavior of *Listeria monocytogenes* in three lots of naturally-contaminated vacuum-packed smoked salmon stored at 2 and 10°C. *Int J Food Microbiol* 37, 209–214.
- Dalgaard, P. (2000) Fresh and lightly preserved seafood. In *Shelf-life Evaluation of Foods* ed. Man, C.M.D. and Jones, A.A. pp. 110–139. London: Aspen Publishers, Inc.
- Dalgaard, P. and Jørgensen, L.V. (1998) Predicted and observed growth of *Listeria monocytogenes* in seafood challenge tests and in naturally contaminated cold-smoked salmon. *Int J Food Microbiol* 40, 105–115.
- Delignette-Muller, M.L., Rosso, L. and Flandrois, J.P. (1995) Accuracy of microbial growth predictions with square root and polynomial models. *Int J Food Microbiol* 27, 139–146.
- Devlieghere, F., Debevere, J. and van Impe, J. (1998) Concentration of carbon dioxide in the water-phase as a parameter to model the effect of a modified atmosphere on microorganisms. *Int J Food Microbiol* 43, 105–113.
- Devlieghere, F., Geeraerd, A.H., Versyck, K.J., Vandewaetere, B., van Impe, J. and Debevere, J. (2001) Growth of *Listeria monocytogenes* in modified atmosphere packed cooked meat products: a predictive model. *Food Microbiol* 18, 53–66.
- Donnelly, C.W. and Briggs, E.H. (1986) Psychrotrophic growth and thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* as a function of milk composition. *J Food Prot* 49, 994–998.
- Dorsa, W.J., Marshall, D.L., Moody, M.W. and Hackney, C.R. (1993) Low temperature growth and thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* in precooked crawfish tail meat. *J Food Prot* 56, 106–109.
- Duffy, L.L., Vanderlinde, P.B. and Grau, F.H. (1994) Growth of *Listeria monocytogenes* on vacuum-packed cooked meats: effects of pH, a_w , nitrite and ascorbate. *Int J Food Microbiol* 23, 377–390.
- Duffy, G., Walsh, D., Sheridan, J.J., Logue, C.M., Harrington, D., Blair, I.S. and McDowd, D.A. (2000) Behaviour of *Listeria monocytogenes* in the presence of *Listeria innocua* during storage of minced beef under vacuum or in air at 0°C and 10°C. *Food Microbiol* 17, 571–578.
- Duh, Y.-H. and Schaffner, D.W. (1993) Modeling the effect of temperature on the growth rate and lag time of *Listeria innocua* and *Listeria monocytogenes*. *J Food Prot* 56, 205–210.
- Dykes, G.A. (2003) Behaviour of *Listeria monocytogenes* on two processed meat products as influenced by temperature or attached growth during preincubation. *Food Microbiol* 20, 91–96.
- Dykes, G.A. and Moorhead, S.M. (2002) Combined antimicrobial effect of nisin and a listeriophage against *Listeria monocytogenes* in broth but not in buffer or on raw beef. *Int J Food Microbiol* 73, 71–81.

- El-Gazzar, F.E., Bohner, H.F. and Marth, E.H. (1991) Growth of *Listeria monocytogenes* at 4, 32, and 40°C in skim milk and in retentate and permeate from ultrafiltered skim milk. *J Food Prot* 54, 338–342.
- El-Shenawy, M.A. and Marth, E.H. (1988a) Sodium benzoate inhibits growth of or inactivates *Listeria monocytogenes*. *J Food Prot* 51, 525–530.
- El-Shenawy, M.A. and Marth, E.H. (1988b) Inhibition and inactivation of *Listeria monocytogenes* by sorbic acid. *J Food Prot* 51, 842–847.
- Farber, J.M., Sanders, G.W., Dunfield, S. and Prescott, R. (1989) The effect of various acidulants on the growth of *Listeria monocytogenes*. *Lett Appl Microbiol* 9, 181–183.
- Farber, J.M., Coates, F. and Daley, E. (1992) Minimum water activity requirements for the growth of *Listeria monocytogenes*. *Lett Appl Microbiol* 15, 103–105.
- Farber, J.M., Cai, Y. and Ross, W.H. (1996) Predictive modelling of the growth of *Listeria monocytogenes* in CO₂ environments. *Int J Food Microbiol* 32, 133–144.
- Fernández, P.S., George, S.M., Sills, C.C. and Peck, M.W. (1997) Predictive model of the effect of CO₂, pH, temperature and NaCl on the growth of *Listeria monocytogenes*. *Int J Food Microbiol* 37, 37–45.
- Genigeorgis, C., Carniciu, M., Dutulescu, D. and Farver, T.B. (1991) Growth and survival of *Listeria monocytogenes* in market cheeses stored at 4 to 30°C. *J Food Prot* 54, 662–668.
- George, S.M., Lund, B.M. and Brocklehurst, T.F. (1988) The effect of pH and temperature on initiation of growth of *Listeria monocytogenes*. *Lett Appl Microbiol* 6, 153–156.
- Giffel, M.C. and Zwietering, M.H. (1999) Validation of predictive models describing the growth of *Listeria monocytogenes*. *Int J Food Microbiol* 46, 135–149.
- Giménez, B. and Dalggaard, P. (2004) Modelling and predicting the simultaneous growth of *Listeria monocytogenes* and spoilage microorganisms in cold-smoked salmon. *J Appl Microbiol* 96, 96–109.
- Gnanou Besse, N. (2004) Effet de la taille et de la composition de la population initiale sur la croissance de *Listeria monocytogenes*. *PhD Thesis*, Université de Technologie de Compiègne, Compiègne, France.
- Grant, I.R., Nixon, C.R. and Patterson, M.F. (1993) Comparison of the growth of *Listeria monocytogenes* in unirradiated and irradiated cook-chill roast beef and gravy at refrigeration temperatures. *Lett Appl Microbiol* 17, 55–57.
- Grau, F.H. and Vanderlinde, P.B. (1990) Growth of *Listeria monocytogenes* on vacuum-packaged beef. *J Food Prot* 53, 739–741.
- Grau, F.H. and Vanderlinde, P.B. (1992) Occurrence, numbers, and growth of *Listeria monocytogenes* on some vacuum-packaged processed meats. *J Food Prot* 55, 4–7.
- Grau, F.H. and Vanderlinde, P.B. (1993) Aerobic growth of *Listeria monocytogenes* on beef lean and fatty tissue: equations describing the effects of temperature and pH. *J Food Prot* 56, 96–101.
- Greer, G.G. and Dilts, B.D. (1995) Lactic acid inhibition of the growth of spoilage bacteria and cold tolerant pathogens on pork. *Int J Food Microbiol* 25, 141–151.
- Hajmeer, M. and Basheer, I. (2003) Comparison of logistic regression and neural network-based classifiers for bacterial growth. *Food Microbiol* 20, 43–55.
- Hart, C.D., Mead, G.C. and Norris, A.P. (1991) Effects of gaseous environment and temperature on the storage behaviour of *Listeria monocytogenes* on chicken breast meat. *J Appl Bacteriol* 70, 40–46.
- Hicks, S.J. and Lund, B.M. (1991) The survival of *Listeria monocytogenes* in Cottage cheese. *J Appl Bacteriol* 70, 308–314.
- Hudson, J.A. and Mott, S.J. (1993a) Growth of *Listeria monocytogenes*, *Aeromonas hydrophila* and *Yersinia enterocolitica* in pâté and comparison with predictive models. *Int J Food Microbiol* 20, 1–11.
- Hudson, J.A. and Mott, S.J. (1993b) Growth of *Listeria monocytogenes*, *Aeromonas hydrophila* and *Yersinia enterocolitica* on cold-smoked salmon under refrigeration and mild temperature abuse. *Food Microbiol* 10, 61–68.
- Hudson, J.A. and Mott, S.J. (1993c) Growth of *Listeria monocytogenes*, *Aeromonas hydrophila* and *Yersinia enterocolitica* on cooked beef under refrigeration and mild temperature abuse. *Food Microbiol* 10, 429–437.
- Hudson, J.A., Mott, S.J. and Penney, N. (1994) Growth of *Listeria monocytogenes*, *Aeromonas hydrophila*, and *Yersinia enterocolitica* on vacuum and saturated carbon dioxide controlled atmosphere-packaged sliced roast beef. *J Food Prot* 57, 204–208.
- Ingham, S.C., Buege, D.R., Dropp, B.K. and Losinski, J.A. (2004) Survival of *Listeria monocytogenes* during storage of ready-to-eat meat products processed by drying, fermentation, and/or smoking. *J Food Prot* 67, 2698–2702.
- Katla, T., Møretro, T., Aasen, I.M., Holck, A., Axelsson, L. and Naterstad, K. (2001) Inhibition of *Listeria monocytogenes* in cold smoked salmon by addition of sakacin P and/or live *Lactobacillus sakei* cultures. *Food Microbiol* 18, 431–439.
- Katoh, H. (1989) Determination of mean generation time for *Listeria monocytogenes*. *Jap J Food Microbiol* 6, 135–138.
- Kaya, M. and Schmidt, U. (1989) Verhalten von *Listeria monocytogenes* im hackfleisch bei kuhl- und gefrierlagerung. *Fleischwirtsch* 69, 617–620.
- Kono, T. (1968) Kinetics of microbial cell growth. *Biotech Bioeng* 10, 105–131.
- Koutsoumanis, K.P., Kendall, P.A. and Sofos, J.N. (2004) A comparative study on growth limits of *Listeria monocytogenes* as affected by temperature, pH and *a_w* when grown in suspension or on a solid surface. *Food Microbiol* 21, 415–422.
- Lappi, V.R., Ho, A.H., Gall, K. and Wiedmann, M. (2004) Prevalence and growth of *Listeria* on naturally contaminated smoked salmon over 28 days of storage at 4°C. *J Food Prot* 67, 1022–1026.
- Le Marc, Y. (2001) Développement d'un modèle modulaire décrivant l'effet des interactions entre les facteurs environnementaux sur les aptitudes de croissance de *Listeria*. *PhD Thesis*, Université de Bretagne Occidentale, Quimper, France.
- Le Marc, Y., Huchet, V., Bourgeois, C.M., Guyonnet, J.P., Mafart, P. and Thuault, D. (2002) Modelling the growth kinetics of *Listeria* as a function of temperature, pH and organic acid concentration. *Int J Food Microbiol* 73, 219–237.
- Manu-Tawiah, W., Myers, D.J., Olson, D.G. and Molins, R.A. (1993) Survival and growth of *Listeria monocytogenes* and *Yersinia enterocolitica* in pork chops packaged under modified gas atmospheres. *J Food Sci* 58, 475–479.
- Marshall, D.L. and Schmidt, R.H. (1988) Growth of *Listeria monocytogenes* at 10°C in milk preincubated with selected pseudomonads. *J Food Prot* 51, 277–282.

- Marshall, D.L., Wiese-Lehigh, P.L., Wells, J.H. and Farr, A.J. (1991) Comparative growth of *Listeria monocytogenes* and *Pseudomonas fluorescens* on precooked chicken nuggets stored under modified atmospheres. *J Food Prot* 54, 841–843, 851.
- Mbandi, E. and Shelef, L.A. (2002) Enhanced antimicrobial effects of combination of lactate and diacetate on *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. in beef bologna. *Int J Food Microbiol* 76, 191–198.
- McAuliffe, O., Hill, C. and Ross, R.P. (1999) Inhibition of *Listeria monocytogenes* in cottage cheese manufactured with a lactacin 3147-producing starter culture. *J Appl Microbiol* 86, 251–256.
- McClure, P.J., Kelly, T.M. and Roberts, T.A. (1991) The effects of temperature, pH, sodium chloride and sodium nitrite on the growth of *Listeria monocytogenes*. *Int J Food Microbiol* 14, 77–92.
- McKellar, R.C. and Lu, X. (2004) Primary models. In *Modeling Microbial Responses in Food* ed. McKellar, R.C. and Lu, X. pp. 21–62. Boca Raton, FL: CRC Series in Contemporary Food Science, CRC Press.
- McKellar, R.C., Moir, R. and Kalab, M. (1994) Factors influencing the survival and growth of *Listeria monocytogenes* on the surface of Canadian retail wieners. *J Food Prot* 57, 387–392.
- McKellar, R.C., Butler, G. and Stanich, K. (1997) Modelling the influence of temperature on the recovery of *Listeria monocytogenes* from heat injury. *Food Microbiol* 14, 617–625.
- Membré, J.M., Thurette, J. and Cateau, M. (1997) Modelling the growth, survival and death of *Listeria monocytogenes*. *J Appl Microbiol* 82, 345–350.
- Membré, J.-M., Kubacka, M., Dubois, J. and Chéné, C. (2004) Temperature effect on *Listeria monocytogenes* growth in the event of contamination of cooked pork products. *J Food Prot* 67, 463–469.
- Miller, A.J. (1992) Combined water activity and solute effects on growth and survival of *Listeria monocytogenes* Scott A. *J Food Prot* 55, 414–418.
- Murphy, P.M., Rea, M.C. and Harrington, D. (1996) Development of a predictive model for growth of *Listeria monocytogenes* in a skim milk medium and validation studies in a range of dairy products. *J Appl Bacteriol* 80, 557–564.
- Nilsson, L., Huss, H.H. and Gram, L. (1997) Inhibition of *Listeria monocytogenes* on cold-smoked salmon by nisin and carbon dioxide atmosphere. *Int J Food Microbiol* 38, 217–227.
- Nissen, H., Alvseike, O., Bredholt, S., Holck, A. and Nesbakken, T. (2000) Comparison between the growth of *Yersinia enterocolitica*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* spp. in ground beef packed by three commercially used packaging techniques. *Int J Food Microbiol* 59, 211–220.
- Nolan, D.A., Chamblin, D.C. and Troller, J.A. (1992) Minimal water activity levels for growth and survival of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua*. *Int J Food Microbiol* 16, 323–335.
- Nyati, H. (2000) Survival characteristics and the applicability of predictive mathematical modelling to *Listeria monocytogenes* growth in sous vide products. *Int J Food Microbiol* 56, 123–132.
- Nykanen, A., Weckman, K. and Lapvetelainen, A. (2000) Synergistic inhibition of *Listeria monocytogenes* on cold-smoked rainbow trout by nisin and sodium lactate. *Int J Food Microbiol* 61, 63–72.
- Oh, D.-H. and Marshall, D.L. (1993) Influence of temperature, pH, and glycerol monolaurate on growth and survival of *Listeria monocytogenes*. *J Food Prot* 56, 744–749.
- Oh, D.-H. and Marshall, D.L. (1994) Enhanced inhibition of *Listeria monocytogenes* by glycerol monolaurate with organic acids. *J Food Sci* 59, 1258–1261.
- Papageorgiou, D.K. and Marth, E.H. (1989a) Behavior of *Listeria monocytogenes* at 4 and 22°C in whey and skim milk containing 6 or 12% sodium chloride. *J Food Prot* 52, 625–630.
- Papageorgiou, D.K. and Marth, E.H. (1989b) Fate of *Listeria monocytogenes* during the manufacture, ripening and storage of Feta cheese. *J Food Prot* 52, 82–87.
- Patchett, R.A., Watson, N., Fernandez, P.S. and Kroll, R.G. (1996) The effect of temperature and growth rate on the susceptibility of *Listeria monocytogenes* to environmental stress conditions. *Lett Appl Microbiol* 22, 121–124.
- Pearson, L.J. and Marth, E.H. (1990) Behavior of *Listeria monocytogenes* in the presence of cocoa, carrageenan, and sugar in a milk medium incubated with and without agitation. *J Food Prot* 53, 30–37.
- Pelroy, G., Peterson, M., Rohinee, P., Almond, J. and Eklund, M.W. (1994) Inhibition of *Listeria monocytogenes* in cold-process (smoked) salmon by sodium nitrite and packaging method. *J Food Prot* 57, 114–119.
- Peterson, M.E., Pelroy, G.A., Paranjpye, R.N., Poysky, F.T., Almond, J.S. and Eklund, M.W. (1993) Parameters for control of *Listeria monocytogenes* in smoked fishery products: sodium chloride and packaging method. *J Food Prot* 56, 938–943.
- Petran, R.L. and Zottola, E.A. (1989) A study of factors affecting growth and recovery of *Listeria monocytogenes* Scott A. *J Food Sci* 54, 458–460.
- Pin, C., García de Fernando, G.D., Ordóñez, J.A. and Baranyi, J. (2001) Applying a generalized *z*-value concept to quantify and compare the effect of environmental factors on the growth of *Listeria monocytogenes*. *Food Microbiol* 18, 539–545.
- Pinon, A., Zwietering, M., Perrier, L., Membré, J.-M., Leporq, B., Mettler, E., Thuault, D., Coroller, L. et al. (2004) Development and validation of experimental protocols for use of cardinal models for prediction of microorganism growth in food products. *Appl Environ Microbiol* 70, 1081–1087.
- Pouillot, R., Albert, I., Cornu, M. and Denis, J.-B. (2003) Estimation of uncertainty and variability in bacterial growth using Bayesian inference. Application to *Listeria monocytogenes*. *Int J Food Microbiol* 81, 87–104.
- Presser, K., Ratkowsky, D.A. and Ross, T. (1997) Modelling the growth rate of *Escherichia coli* as a function of pH and lactic acid concentration. *Appl Environ Microbiol* 63, 2355–2360.
- Rorvik, L.M., Yndestad, M. and Skjerve, E. (1991) Growth of *Listeria monocytogenes* in vacuum-packed, smoked salmon, during storage at 4°C. *Int J Food Microbiol* 14, 111–118.
- Ratkowsky, D.A., Olley, J., McMeekin, T.A. and Ball, A. (1982) Relationship between temperature and growth rate of bacterial cultures. *J Bacteriol* 149, 1–5.
- Ratkowsky, D.A., Ross, T., McMeekin, T.A. and Olley, J. (1991) Comparison of Arrhenius-type and Bełehradek-type models for prediction of bacterial growth in foods. *J Appl Bacteriol* 71, 452–459.
- Ratkowsky, D.A., Ross, T., Macario, N., Dommett, T.W. and Kamperman, L. (1996) Choosing probability distributions for modelling generation time variability. *J Appl Bacteriol* 80, 131–137.
- Resnik, S.L. and Chirife, J. (1988) Proposed theoretical water activity values at various temperatures for selected solutions to be used as

- reference sources in the range of microbial growth. *J Food Prot* 51, 419–423.
- Robinson, T.P., Ocio, M.J., Kaloti, A. and Mackey, B.M. (1998) The effect of the growth environment on the lag phase of *Listeria monocytogenes*. *Int J Food Microbiol* 44, 83–92.
- Rosenow, E.M. and Marth, E.H. (1987a) Growth of *Listeria monocytogenes* in skim, whole and chocolate milk, and in whipping cream during incubation at 4, 8, 13, 21, and 35°C. *J Food Prot* 50, 452–459.
- Rosenow, E.M. and Marth, E.H. (1987b) Addition of cocoa powder, cane sugar, and carrageenan to milk enhances growth of *Listeria monocytogenes*. *J Food Prot* 50, 726–729.
- Ross, T. (1996) Indices for performance evaluation of predictive models in food microbiology. *J Appl Bacteriol* 81, 501–508.
- Ross, T. (1999) *Predictive Food Microbiology Models in the Meat Industry*. Sydney: Meat and Livestock Australia.
- Ross, T. and Dalgaard, P. (2004) Secondary models. In *Modeling Microbial Responses in Food* ed. McKellar, R.C. and Lu, X. pp. 63–150. Boca Raton, FL: CRC Series in Contemporary Food Science, CRC Press.
- Ross, T. and McMeekin, T.A. (2003) Modeling microbial growth within food safety risk assessments. *Risk Anal* 23, 179–197.
- Ross, T., Dalgaard, P. and Tienungoon, S. (2000) Predictive modelling of the growth and survival of *Listeria* in fishery products. *Int J Food Microbiol* 62, 231–245.
- Rosso, L., Lobry, J.R., Bajard, S. and Flandrois, J.P. (1995) Convenient model to describe the combined effects of temperature and pH on microbial growth. *Appl Environ Microbiol* 61, 610–616.
- Rosso, L., Bajard, S., Flandrois, J.P., Lahellec, C., Fournaud, J. and Veit, P. (1996) Differential growth of *Listeria monocytogenes* at 4 and 8°C: consequences for the shelf life of chilled products. *J Food Prot* 59, 944–949.
- Ryser, E.T. and Marth, E.H. (1987) Fate of *Listeria monocytogenes* during the manufacture and ripening of Camembert cheese. *J Food Prot* 50, 372–378.
- Ryser, E.T. and Marth, E.H. (1988) Growth of *Listeria monocytogenes* at different pH values in uncultured whey or whey cultured with *Penicillium camemberti*. *Can J Food Microbiol* 34, 730–734.
- Ryser, E.T. and Marth, E.H. (1989) Behavior of *Listeria monocytogenes* during manufacture and ripening of Brick cheese. *J Dairy Sci* 72, 838–853.
- Schaack, M.M. and Marth, E.H. (1988) Behavior of *Listeria monocytogenes* in skim milk during fermentation with mesophilic lactic starter cultures. *J Food Prot* 51, 600–606.
- Schillinger, U., Kaya, M. and Lücke, F.-K. (1991) Behaviour of *Listeria monocytogenes* in meat and its control by bacteriocin-producing strain of *Lactobacillus sake*. *J Appl Bacteriol* 70, 473–478.
- Schlyter, J.H., Degnan, A.J., Loeffelholz, J., Glass, K.A. and Luchansky, J.B. (1993) Evaluation of sodium diacetate and ALTA™ 2341 on viability of *Listeria monocytogenes* in turkey slurries. *J Food Prot* 56, 808–810.
- Schmidt, U. (1995) Sliced, vacuum-packed Frankfurter-type sausage. Technological measures to inhibit the growth of *Listeria*. *Fleischwirtschaft* 75, 804–807.
- Sorells, K.M., Enigl, D.C. and Hatfield, J.R. (1989) Effect of pH, acidulant, time, and temperature on the growth and survival of *Listeria monocytogenes*. *J Food Prot* 52, 571–573.
- Stekelenburg, F.K. (2003) Enhanced inhibition of *Listeria monocytogenes* in Frankfurter sausage by the addition of potassium lactate and sodium diacetate mixtures. *Food Microbiol* 20, 133–137.
- Szabo, E.A. and Cahill, M.E. (1999) Nisin and ALTA™ 2341 inhibit the growth of *Listeria monocytogenes* on smoked salmon packaged under vacuum or 100% CO₂. *Lett Appl Microbiol* 28, 373–377.
- Tapia de Daza, M.S., Villegas, Y. and Martinez, A. (1991) Minimal water activity for growth of *Listeria monocytogenes* as affected by solute and temperature. *Int J Food Microbiol* 14, 333–337.
- Tienungoon, S., Ratkowsky, D.A., McMeekin, T.A. and Ross, T. (2000) Growth limits of *Listeria monocytogenes* as a function of temperature, pH, NaCl, and lactic acid. *Appl Environ Microbiol* 66, 4979–4987.
- Uyttendaele, M., Rajkovic, A., Benos, G., François, K., Devlieghere, F. and Debevere, J. (2004) Evaluation of a challenge testing protocol to assess the stability of ready-to-eat cooked meat products against growth of *Listeria monocytogenes*. *Int J Food Microbiol* 90, 219–236.
- Walker, S.J., Archer, P. and Banks, J.G. (1990) Growth of *Listeria monocytogenes* at refrigeration temperatures. *J Appl Bacteriol* 68, 157–162.
- Wang, L.-L. and Johnson, E.A. (1992) Inhibition of *Listeria monocytogenes* by fatty acids and monoglycerides. *Appl Environ Microbiol* 58, 624–629.
- Wang, L.-L. and Johnson, E.A. (1997) Control of *Listeria monocytogenes* by monoglycerides in foods. *J Food Prot* 60, 131–138.
- Wang, C. and Sheref, L.A. (1992) Behavior of *Listeria monocytogenes* and the spoilage microflora in fresh cod fish treated with lysozyme and EDTA. *Food Microbiol* 9, 207–213.
- Zapico, P., Gaya, P., Nunez, M. and Medina, M. (1993) Goats' milk lactoperoxidase system against *Listeria monocytogenes*. *J Food Prot* 56, 988–990.
- Zuliani, V., Garry, P., Vendeuvre, J.-L., Augustin, J.-C., Lebert, I. and Lebert, A. (2003) Growth of *Listeria monocytogenes* in ground pork as a function of pH and water activity. In *Predictive Modelling in Foods 4th International Conference-Conference Proceedings* ed. van Impe, J.F.M., Geeraerd, A.H., Leguérin, I. and Mafart, P. pp. 43–45. Leuven, Belgium: Katholieke Universiteit Leuven/BioTec.
- Zwietering, M.H., Jongenburger, I., Rombouts, F.M. and van't Riet, K. (1990) Modeling of the bacterial growth curve. *Appl Environ Microbiol* 56, 1875–1881.
- Zwietering, M.H., de Koos, J.T., Hasenack, B.E., de Wit, J.C. and van't Riet, K. (1991) Modeling of bacterial growth as a function of temperature. *Appl Environ Microbiol* 57, 1094–1101.

Research Signpost
37/661 (2), Fort P.O., Trivandrum-695 023, Kerala, India



Recent Res. Devel. Microbiology, 8(2004): 295-323 ISBN: 81-7736-211-9

14

Integrated modelling of food processing and bacterial behaviour

Véronique Zuliani¹, Isabelle Lebert^{2*} and André Lebert^{2,*}

¹Centre Technique de la Salaison, de la Charcuterie et des Conserves de Viandes, 7 avenue du Général de Gaulle, 94704 Maisons-Alfort Cedex, France

²Unité de Recherches sur la Viande, Institut National de la Recherche Agronomique, 63122 Saint-Genès Champanelle, France

*E-mail: ilebert@clermont.inra.fr, *E-mail: lebert@clermont.inra.fr

Abstract

The quality and safety of food products depend on the micro-organisms, the food characteristics and the process. Food products may become unsafe because of the growth of pathogenic or spoilage bacteria if they are not properly processed and stored. During a process, environmental conditions may vary as a function of time or space in the food. In many process preservation techniques, temperature varies (cooling, heat process), pH decreases (acidification, fermentation) or the water activity (a_w) decreases

Correspondence/Reprint request: Dr. Véronique Zuliani, Centre Technique de la Salaison, de la Charcuterie et des Conserves de Viandes, 7 avenue du Général de Gaulle, 94704 Maisons-Alfort Cedex, France
E-mail: vzuliani@clermont.inra.fr

(drying process, addition of solutes). As a consequence, diffusion phenomena (water or mass transfer), as well as heat transfer, occur in the product, indicating that gradients of temperature, pH and a_w exist in foods. Predicting conditions that prevent or limit bacterial growth in such complex situations is not easy. Process modelling is a tool to help us understand how the variables that control the process modify the main environmental parameters (temperature, pH and a_w) that affect bacterial behaviour. We developed a global modelling approach in our laboratory which consists of combining a predictive bacterial model and a food processing model. We applied it to predict the behaviour of *Listeria*, taking account of the product characteristics and the process effects. Two examples are presented in this work: the effect of a drying process and the effect of a heating process on *Listeria* behaviour.

Introduction

Micro-organisms, food products and processes are the three main components involved in the quality and safety of food products. Indeed, food products may become microbiologically unsafe if the growth of pathogenic or spoilage bacteria occurs, particularly when they are not properly processed and stored. The microbial quality and safety of food products are usually evaluated by performing bacterial studies: bacteria are grown in laboratory media or in food as a function of the main parameters affecting growth: temperature, pH or water activity (a_w). These studies are mainly done under static environmental conditions and do not take the dynamic changes that can occur in the food and during the processing of the food into account. Indeed, environmental conditions may vary as a function of time or space in the food because of diffusion phenomena (water or mass transfer) or heat transfer. Diffusion may occur, for example, during process preservation techniques when temperature varies (cooling, heat process), pH decreases (acidification, fermentation) or a_w decreases (drying process, addition of solutes). Gradients of temperature, pH and a_w exist in food products. Process modelling can be a tool to describe how the variables that control the process modify the main environmental parameters (temperature, pH and a_w) that affect bacterial behaviour. As a consequence, the conditions that prevent or limit bacterial growth in many existing process situations can be predicted.

Listeria bacteria are widespread in the environment. Among the different species, *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* are the two that are the most commonly isolated from food processing [1]. *L. monocytogenes* can be fatal, particularly in the very young and immunocompromised individuals. Most cases are linked to the contamination of raw or processed foods with *L. monocytogenes*. Listeriosis is therefore a major threat to human health. *Listeria* spp. can grow at low temperatures [2], low pH [3] and low a_w [4,5]; they are therefore able to survive and multiply in a wide range of food products.

Many types of process are used in the meat industry. During transformation, raw meat products are subjected to different processes such as cooling (refrigeration, freezing), heating (cooking, steaming, pasteurisation, etc.) or drying, in order to decrease or limit the development of bacteria and improve the storage of the final product. Therefore, there is a need to understand and model the behaviour of bacteria and *Listeria*, in particular, during processing.

We developed a global modelling approach in our laboratory that consists of combining a food-processing model and predictive bacterial models. We applied it to predict the behaviour of *Listeria*, taking account of the product characteristics and the process effects. Two examples are presented in this work: the effect of a heating process and the effect of a drying process on *Listeria* behaviour. In the first example, temperature was the main parameter subject to variation, while the pH and the a_w remained constant throughout the experiments. Experiments were performed on minced pork meat. In the second example, only the a_w at the surface of a gelatine gel varied due to drying conditions, while the temperature and the pH of the product remained constant.

Predictive models for process operations

We first considered the general case of a solid foodstuff placed in an air flow, on a support. This situation exists (1) in operations such as cooling, freezing, drying or maturation and (2) during storage. In order to simplify the problem, we considered the case of a parallelepiped product whose thickness was very small compared to the two other dimensions (Figure 1). On the basis of this assumption, heat and matter transfers are then a function of only one dimension: the thickness or z-coordinate.

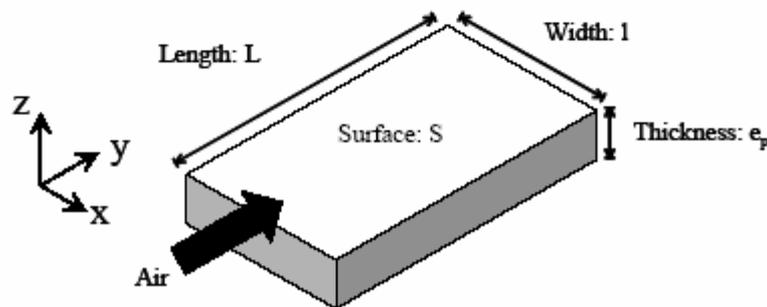


Figure 1. Parallelepiped foodstuff placed in an air flow

In this situation, the foodstuff exchanges heat and matter with the air and the support on which is placed. We limited the exchanges of matter to the exchange of water alone and considered that the support could not exchange water with the product since it is inert.

Water balance

The water balance is composed of two variables (Figure 2):

- the flux density of water corresponding to the exchange at the air/product interface:

$$J_E = k \cdot (C_{surface} - C_{air}) \quad [Eq. 1]$$

where: k = water transfer coefficient (m . s⁻¹);
 C_{air} = water concentration in the air (kg water . m⁻³);
 $C_{surface}$ = water concentration in the air in contact with the product (kg water . m⁻³)

- it is assumed that the flux density of water in the product is Fickian:

$$J_D = D(C,T) \cdot \frac{\partial C}{\partial z} \quad [Eq. 2]$$

where: C = volumetric water concentration in the product (kg water . m⁻³)
 T = temperature of the product (°C or K)
 D = water diffusivity in the product (m² . s⁻¹)

It is assumed that water diffusivity depends only on the concentration and the temperature.

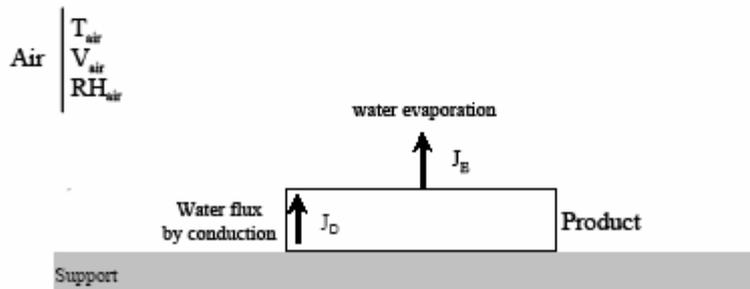


Figure 2. Different mass flux densities to be taken into account in the case of a foodstuff placed in an air flow

The flux density of water, J_E , can also be expressed as a function of the water activity on the surface of the product:

$$J_E = k \cdot (P(T_{\text{Surface}}) - a_{w,s} \cdot P(T_{\text{dew}})) \quad [\text{Eq. 3}]$$

where: $a_{w,s}$ = water activity on the surface of the product
 P = partial pressure of air at temperature T (Pa)
 T_{Surface} = surface product temperature ($^{\circ}\text{C}$ or K)
 T_{dew} = dew point temperature ($^{\circ}\text{C}$ or K)

The evolution of the water concentration in the product over a period of time is given by:

$$\frac{\partial C}{\partial t} = \frac{\partial}{\partial z} \left(D(C, T) \cdot \frac{\partial C}{\partial z} \right) \quad [\text{Eq. 4}]$$

Shrinkage of the product

The modelling of the water transfer in the foodstuffs often encounters the problem of the shrinkage of the product due to water extraction. In order to take this shrinkage into account, it is necessary to consider several assumptions related to the variation of the volume of the product. Different authors [6-8] showed that the product retraction was linear for high water contents ($X > 0.5$ kg water/kg dry matter). Ruiz Cabrera [9] listed the retraction models that were proposed. The simplest assumption is to consider that the product volume is the sum of the partial volumes of water and dry matter:

$$V_{\text{Product}} = V_{\text{Water}} + V_{\text{Dry Matter}} \quad [\text{Eq. 5}]$$

By considering the first assumption (thickness \ll other dimensions), the shrinkage takes place only in the direction of the water transfer. Equation 5 is reduced to an addition of lengths of water (z_{Water}) and dry matter ($z_{\text{Dry Matter}}$) (Figure 3):

$$z_{\text{Product}} = z_{\text{Water}} + z_{\text{Dry Matter}} \quad [\text{Eq. 6}]$$

By considering a small volume for which the water content X is homogeneous, it can be shown that the ratio $z_{\text{Product}}/z_{\text{Dry Matter}}$ is then a linear function of the average water content \bar{X} :

$$\frac{z_{\text{Product}}}{z_{\text{Dry Matter}}} = 1 + \frac{\rho_{\text{Dry Matter}}}{\rho_{\text{Water}}} \bar{X} \quad [\text{Eq. 7}]$$

where: $\rho_{\text{Dry Matter}}$ = density of the dry matter (kg dry matter . m⁻³)
 ρ_{Water} = density of water (kg water . m⁻³)
 \bar{X} = average water content (kg water . kg dry matter⁻¹)

A transformation of coordinates can be made: the z-coordinate is transformed into a "solid coordinate" (ξ). Using this solid coordinate, which is invariant with time [10,11], the Fick equation has the following form:

$$\frac{\partial X}{\partial t} = \frac{\partial}{\partial \xi} \left(D^*(X, T) \cdot \frac{\partial X}{\partial \xi} \right) \quad [\text{Eq. 8}]$$

where: X = water content (kg water . kg dry matter⁻¹)
 D^* = effective diffusivity in the new solid coordinate (m²_{Dry Matter} . s⁻¹)

D^* is related to the diffusivity D :

$$D^*(X, T) = \frac{D(X, T)}{\left(1 + \frac{\rho_{\text{Dry Matter}}}{\rho_{\text{Water}}} \cdot X \right)^2} \quad [\text{Eq. 9}]$$

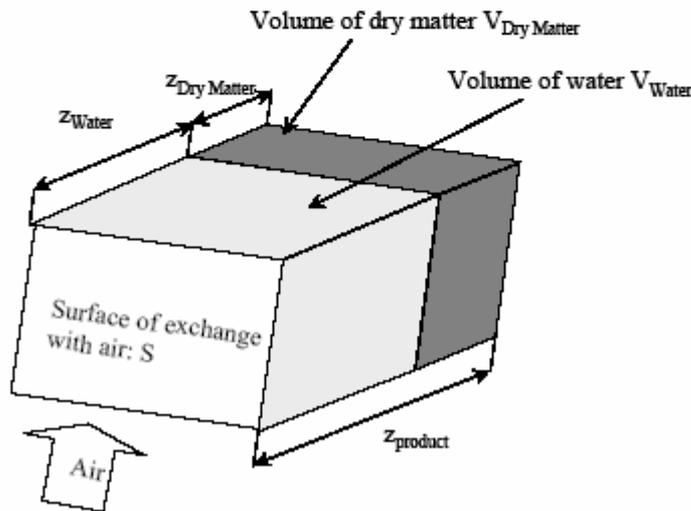


Figure 3. Principle of additivity of volumes

Heat balance

Heat transfer occurs in two cases: (1) when a difference of temperature exists between two media or between two points of the same medium, or (2) when there is a phase modification such as vaporisation or boiling, condensation, etc. Three heat exchange modes are possible:

- by contact, referred to as thermal conduction
- by movement of a fluid, referred to as thermal convection
- from a distance, referred to as thermal radiation.

Mass transfer also occurs in two cases: (1) when a difference of concentration exists between two media or between two points of the same medium, or (2) when there is a phase modification such as vaporisation, condensation, etc.

Two mass exchange modes are possible:

- by contact, referred to as mass conduction
- by movement of a fluid, referred to as mass convection

Heat transfer is composed of five variables (Figure 4):

- the flux density of heat J_1 corresponding to the water evaporation at the air/product interface:

$$J_1 = J_E \cdot L_V \quad [\text{Eq. 10}]$$

where: J_E = flux density of water (kg water . m² . s⁻¹)
 L_V = vaporisation heat of water (J . kg⁻¹)

- the flux density of heat J_2 describing the exchange at the air/product interface:

$$J_2 = h \cdot (T_{\text{air}} - T_{\text{surface}}) \quad [\text{Eq. 11}]$$

where: h = heat transfer coefficient (W . m⁻² . K⁻¹)
 T_{air} = air temperature (°C or K)
 T_{surface} = temperature of the product surface (°C or K)

- the flux density of heat J_3 corresponding to the heat transfer by conduction between the product and the support:

$$J_3 = h' \cdot (T_{\text{support}} - T_{\text{contact}}) \quad [\text{Eq. 12}]$$

where: S' = product surface in contact with the support (m²)
 h' = heat transfer coefficient (W . m⁻² . K⁻¹)
 T_{support} = support temperature (°C or K)
 T_{contact} = temperature of the product surface in contact with the support (°C or K)

- the flux density of heat J_4 describing the radiation contribution:

$$J_4 = \epsilon \cdot \sigma \cdot (T_{\text{air}}^4 - T_{\text{surface}}^4) \quad [\text{Eq. 13}]$$

where: ϵ = emissivity of the product (no dimension)
 σ = Stefan-Boltzmann constant (W . m⁻² . K⁻⁴)

- the flux density of heat J_5 in the product:

$$J_5 = \lambda(C, T) \cdot \frac{\partial T}{\partial x} \quad [\text{Eq. 14}]$$

where: C = water concentration in the product (kg water . m⁻³)
 T = temperature of the product (°C or K)
 λ = heat diffusivity in the product (m² . s)

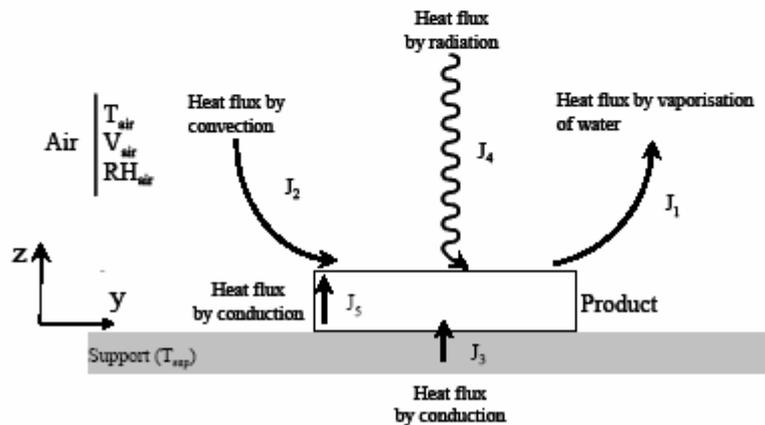


Figure 4. Different heat flux densities to be taken into account in the case of a foodstuff placed in an air flow

It is assumed that heat diffusivity depends only on the concentration and the temperature.

The evolution of the temperature in the product over a period of time is given by:

$$\frac{\partial T}{\partial t} = \frac{\partial}{\partial x} \left(\lambda(C, T) \cdot \frac{\partial T}{\partial x} \right) \quad [\text{Eq. 15}]$$

Resolution method

The resolution was based on an explicit finite difference scheme with centrally located differences. In order to obtain a good level of accuracy, series of calculations were performed by refining the spatial discretisation until the results did not vary. The time step was automatically adapted to obtain convergence and to minimise the calculation time which was equal to a few minutes.

Predictive models of bacterial behaviour

Predictive microbiology consists of developing mathematical models that describe the effects of environmental parameters (temperature, pH, a_w , etc.) on the evolution (growth or destruction) of a microbial population or on the production of metabolites. Many models have been built and describe the behaviour of pathogenic bacteria (*Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, etc.) or spoilage micro-organisms (*Brochothrix thermosphacta*, *Pseudomonas* spp.). Predictive microbiology was also developed to evaluate the effect of processing, distribution and storage operations on the microbiological safety of foods [12].

Predictive microbiology models are composed of two parts:

- a primary model which describes the evolution of the micro-organism population as a function of time under the respected environmental conditions, given the initial population. In the case of growth, four parameters are needed: the initial population (N_0), the maximum population in the stationary phase (N_{max}), the lag time (Lag) and the generation time (GT). In the case of decrease, two parameters are needed: the initial population (N_0) and the decimal reduction time (D_T). D_T is the time needed to observe a ten-fold decrease of the bacterial population at temperature T.
- a secondary model which describes the relationships between environmental conditions and the lag time and generation time for growth and the decimal reduction time for decrease.

In our study, we actually set up a predictive approach. As a consequence, we first used the secondary model to calculate the growth or decrease parameters under the conditions of our study and, secondly, used these data in the primary equation to predict the evolution of *Listeria* populations over a period of time.

Bacterial growth model

Primary growth model

In predictive microbiology, many primary models are available. We chose the simple model of Rosso *et al.* [13], a delay logistic equation, *i.e.*, with a breakpoint at the transition between the lag time and the exponential phase. The differential form of the primary model is the logistic equation:

$$\frac{dN_t}{N_t \cdot dt} = \mu_{\max} \cdot f(N_t) \quad [\text{Eq. 16}]$$

where: μ_{\max} = maximum growth rate (h⁻¹)
 t = time (h)
 N_t = bacterial population at time t (colony forming unit . g⁻¹)

The slowdown function f has the following form:

$$f(N_t) = \left(1 - \frac{N_t}{N_{\max}}\right) \quad [\text{Eq. 17}]$$

where: N_{\max} = maximum population (colony forming unit . g⁻¹)

The integrated form of Rosso's equation is:

$$\begin{cases} t < \text{Lag} & \ln(N_t) = \ln(N_0) \\ t \geq \text{Lag} & \ln(N_t) = \ln(N_{\max}) - \ln \left[1 + \left(\frac{N_{\max}}{N_0} - 1 \right) \cdot \exp(-\mu_{\max} \cdot (t - \text{Lag})) \right] \end{cases} \quad [\text{Eq. 18}]$$

where: N_0 = initial population (colony forming unit . g⁻¹)
 Lag = lag time (h)

The maximum growth rate (μ_{max}) is linked to the generation time (GT) by the relation:

$$\mu_{max} = \frac{\ln(2)}{GT} \quad [\text{Eq. 19}]$$

where: GT = generation time (h) (h)

Secondary growth model

Secondary models correlate the growth parameters (maximum growth rate and lag time) to the temperature, the pH and the a_w , or other environmental properties. We chose Augustin's cardinal model [14] as the secondary model because: (1) it independently describes the effects of environmental factors on the growth rate and lag time; (2) additional factors can be added due to the multiplicative structure of the model; (3) if the conditions are close to the limits of growth of the micro-organism, improvements to the model can be made by taking interactions between the environmental factors into account [15]; and (4) the parameters of the model have a simple biological significance. The parameters of Augustin's model were fitted using a large database on *Listeria monocytogenes* growth gathered from the literature [14] and gave good predictions of the growth parameters.

The secondary model used is the model proposed by Augustin [14]:

$$\begin{cases} \mu_{max} = \mu_{opt} \cdot CM_2(T) \cdot CM_1(pH) \cdot CM_2(a_w) \\ \mu_{max} \cdot \text{Lag} = K \end{cases} \quad [\text{Eq. 20}]$$

where: μ_{opt} = the maximum specific growth rate in standard medium at optimal conditions of growth (h^{-1})

K = constant depending on the physiological state of the inoculum and on the product

CM_n = the cardinal model of the nth order:

$$CM_n(X) = \begin{cases} 0 & X \leq X_{min} \\ \frac{(X - X_{min}) \cdot (X - X_{opt})^n}{(X_{opt} - X_{min})^{n+1} \cdot [(X_{opt} - X_{min}) \cdot (X - X_{opt}) - (X_{opt} - X_{max}) \cdot ((n-1)X_{opt} + X_{min} - nX)]} & X_{min} < X < X_{max} \\ 0 & X \geq X_{max} \end{cases} \quad [\text{Eq. 21}]$$

where: X_{env} = environmental factor (temperature, pH or a_w)
 X_{min} = value of the environmental factor below which no growth occurs
 X_{opt} = value of the environmental factor at which μ_{max} is maximum
 X_{max} = value of the environmental factor above which no growth occurs
 n = order in the cardinal model: $n=2$ for CM(T) and CM(a_w), $n=1$ for CM(pH).

In order to take interactions between environmental factors into account, an additional equation is needed to calculate the minimal value of one environmental factor (X_{min}) as a function of the value of two other environmental factors (Y and Z):

$$X_{min} = X_{opt} - (X_{opt} - X_{min}^0) \times \left(\left[\frac{(Y_{opt} - Y)}{(Y_{opt} - Y_{min}^0)} \right]^3 + \left[\frac{(Z_{opt} - Z)}{(Z_{opt} - Z_{min}^0)} \right]^3 \right)^{\frac{1}{3}} \quad [\text{Eq. 22}]$$

where: X_{min}^0 = the value of environmental factor X below which no growth occurs for Y_{opt} and Z_{opt}
 Y_{min}^0 = value of environmental factor Y below which no growth occurs for X_{opt} and Z_{opt}
 Z_{min}^0 = the value of environmental factor Z below which no growth occurs for X_{opt} and Y_{opt}
X, Y and Z are one of the three environmental factors: temperature, pH and a_w

Bacterial thermal inactivation model

Primary model for thermal inactivation

Since we assumed that the decline of *L. monocytogenes* was immediately exponential, the primary model used was a log linear one:

$$N(t) = N_0 \cdot 10^{\frac{-t}{D_T}} \quad [\text{Eq. 23}]$$

where: D_T = the decimal reduction time at temperature T (s⁻¹)

Secondary model for thermal inactivation

The secondary model used for thermal decrease is the standard one: we assumed that the heat resistance of *Listeria* under changing conditions can be predicted from their behaviour at static temperatures. This means that the conduction heating of food is too fast to allow sufficient time for *Listeria* to acquire any increased heat resistance [16]. We also considered that a thermal decrease took place as soon as the temperature was higher than T_{\max} (i.e. 45.5°C).

$$D(T) = D_{60} \cdot 10^{\frac{60-T}{z_D}} \quad [\text{Eq. 24}]$$

where: z = increase in temperature required to reduce the D_T value to one-tenth of its value at the lower temperature (°C)

Combined modelling approach

We developed an integrated methodology similar to that of Wilson *et al.* [17]. The models were combined according to the modelling strategy of Figure 5, to predict the behaviour of a bacterial population in/on a foodstuff placed in an air flow. The heat and water transfer models predict the evolution of the temperature and the water content as a function of time and space (in the direction z), if the characteristics of the air (velocity, temperature, relative humidity), the heat and water transfer coefficients (h and k) and the heat and water diffusivity (λ and D) in the product are known. When combining the sorption isotherm with transfer models, the water activity inside and on the surface of the foodstuff can be calculated over a period of time. The secondary models calculate the growth or inactivation parameters from the pH of the product, the temperature and the a_w . The two latter values are predicted by the previous models. Using the primary model, the bacterial behaviour can be predicted over a period of time.

This approach was validated in two different situations. The first case corresponds to the industrial production of diced bacon. During its manufacture, the foodstuff may undergo a phase of maturation at a temperature somewhat close to the maximum temperature of growth. The global approach allowed us to determine the influence of heat processing regimes on the behaviour of *Listeria* on fresh pork meat. Since the product is placed in sealed bag, water transfer can be eliminated and only heat transfer considered. The second case deals with a foodstuff drying at low temperature. This situation is encountered in the case of cheese ripening or sausage fermentation. In this case, only water transfers are to be taken into account since the temperature fluctuates only slightly.

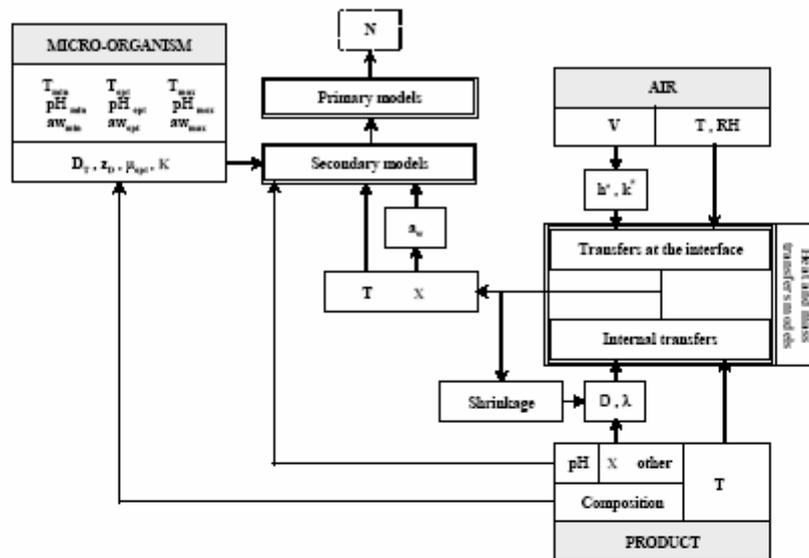


Figure 5. Combined modelling approach in order to predict the behaviour of a micro-organism present on a foodstuff placed in an air flow.
 □ inputs and □ outputs necessary for the models, □ models

First validation: Effect of a heating process

Context

The widespread occurrence of *L. monocytogenes* in the pork processing industry, from the slaughterhouse to the cutting room [18], makes it nearly impossible to avoid minor contamination during meat processing [19]. Thus, raw meat products are considered to be one of the most sensitive foods concerned by the risk of *L. monocytogenes* contamination. In France, 16% of the meat products tested between 1993 and 1994 were contaminated with this bacteria [20]. The industrial production of diced bacon is at risk of *Listeria* contamination. Therefore, there is a need to understand and model the behaviour of *Listeria* during this process.

Experimental design

The major phases of the diced bacon process were replicated in the laboratory: the formulation (five pH: 5.0, 5.3, 5.6, 5.9, 6.2, and five a_w : 0.93, 0.94, 0.95, 0.96, 0.97), the heat process phase (four heat processing regimes: 24h/20°C, 4h/42°C, 1h/48°C, 1h/53°C) and the storage phase (at 20°C).

Experimental methodology

L. monocytogenes behaviour was studied in artificially contaminated raw minced pork meat. The experimental methodology consists of three stages: the preparation of the meat, the heat process and the storage. Frozen minced pork meat was irradiated using high electron energies (AERIAL, Strasbourg, France) at 15 kGy, to eliminate the majority of natural flora in order to work with low-level contaminated samples. The pH and a_w of the meat were adjusted with autoclaved solutions of NaOH 1N (Normapur, Prolabo, France) or HCl 1N (Rectapur, Prolabo) and NaCl (Normapur, Prolabo), respectively. After pH and a_w adjustments, meat samples were inoculated at a rate of 10^5 CFU \cdot g⁻¹ of meat. According to the detection threshold of the technique used, the size of the inoculum made it possible to observe the growth, inhibition or inactivation of *Listeria*.

Experiments were performed in an incubator (FC 90, Eurotherm, Dardilly, France). A rectangle of raw minced meat was formed: its width was the same as that of a 400 ml stomacher bag (Interscience, Saint-Nom-La-Br t che, France), *i.e.*, 16.5 cm, with a thickness of 1 cm. The length was determined according to the exact weight of the sample (24.4 cm for 400 g of minced meat).

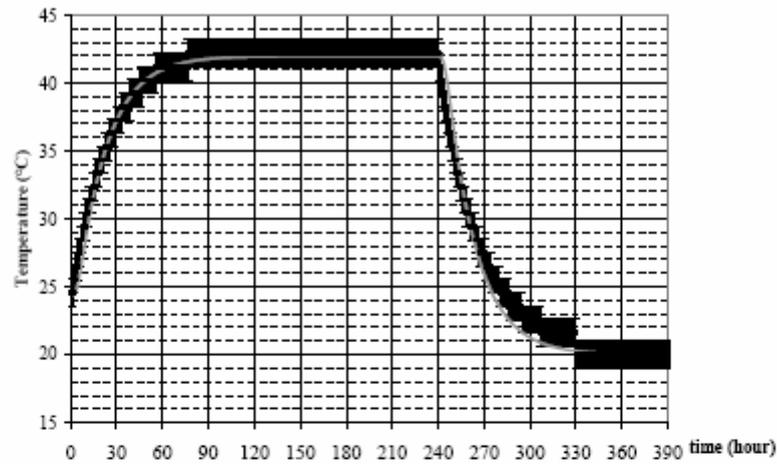
For each of the 100 experiments, bacterial numeration was performed four times: at the beginning of the experiment, at the end of the heat process step, and four and six days after the end of the heat process step. These experimental data were used to validate the integrated model prediction. For two conditions of pH and a_w (5.6/0.96 and 6.2/0.97) and for the four heat processing regimes, growth curves with 15 enumeration times were performed in triplicate. Those data were used to optimise the parameters of the microbial secondary models.

During the heat processing of raw minced meat, its core temperature was recorded (El-win and EasyLog software, Lascar, Wilshire, England). A measurement was made every five seconds during the heat process step and until the stability of the core temperature was reached during the meat storage at 20°C (incubator type BE 500, Memmert, Schwabach, Germany).

Estimation of parameters

The value of heat diffusivity λ in the minced pork meat was optimised by non-linear regression (Excel, Microsoft, France) from experimental temperature measurements during both heat processing and storage phases. The value was found to be equal to $9 \cdot 10^{-9}$ m \cdot s⁻². Figure 6 shows the comparison between experimental and predicted temperatures by the heat transfer model during a heat processing regime of 4h/42°C and storage at 20°C in the centre of the meat.

The cardinal values of pH, temperature and a_w (Table 1) were those proposed by Augustin [14] for the model developed, taking interactions between environmental factors into account.



with in ordinate one line each °C

Figure 6. Comparison of experimental data and predicted core temperature during a heat processing regime of 4h/42°C and storage at 20°C.
experimental data $\pm 1^\circ\text{C}$: [---], predicted values: [—]

Table 1. Cardinal parameters of *Listeria monocytogenes* [14]

cardinal parameter	value	
	with interactions	without interactions
T_{\min} (°C)	-3.0	-2.7
T_{\max} (°C)	45.5	45.5
T_{opt} (°C)	37,0	37,0
$a_w \text{ min}^\circ$	0,913	0.910
$a_w \text{ opt}$	0.997	0.997
$a_w \text{ max}$	1.000	1.000
pH_{\min}	4.38	4.55
pH_{opt}	7.10	7.10
pH_{\max}	9.61	9.61

The mean value of constant K (Equation 20) was experimentally obtained under static conditions and found to be equal to 1.944. The μ_{opt} value was optimised by non-linear regression using data from the growth curves made with 15 enumeration times during the four heat processing regimes. For the

regimes 1h/48°C and 1h/53°C, only the data after the heat process step were used. The optimal value of μ_{opt} was equal to 1.90 h⁻¹. The mean value of N_{max} was 1.7 10⁸ CFU . g⁻¹).

The values of D_{60} and z_D were optimised by non-linear regression by using the population evolution when the heat process was conducted with $T > T_{max}$. We obtained a D_{60} of 117 s⁻¹ and a z_D of 7.4°C.

Estimation of confidence interval of model predictions

A Monte Carlo analysis was performed in order to determine the 90% confidence interval of the model predictions. We assumed that the experimental error was equal to ± 0.7 U Log.

The modelling approach

In order to simplify the modelling approach, we considered some quantities to be negligible:

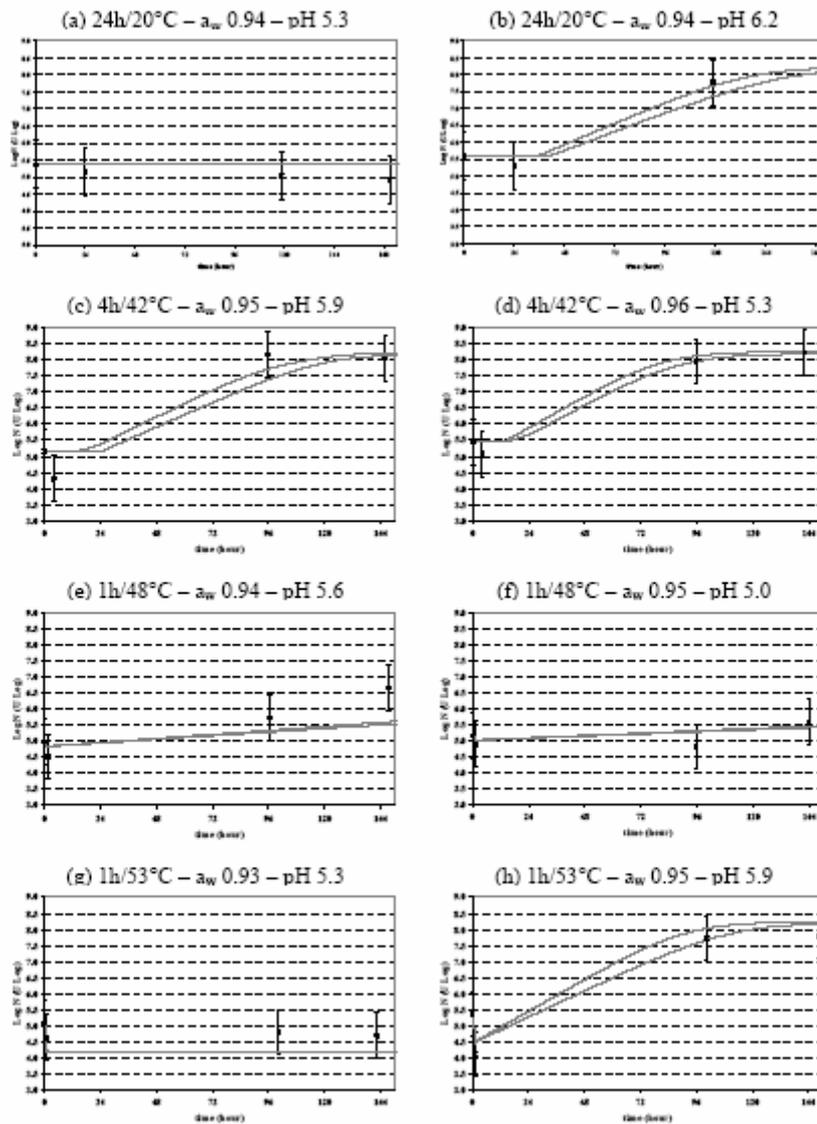
- the resistance to heat transfer of the stomacher bags in which the meat was packed before heat processing
- the radiation heat transfer
- the water transfer through the bag between meat and incubator atmosphere
- the water transfer inside the product

On the basis of these assumptions, we could then limit ourselves to the heat transfer inside the product and at the product/air interface, on the one hand, and to bacterial growth and inactivation models, on the other.

Validation of the integrated model

Figure 7 shows some predicted *Listeria* kinetics. We considered that:

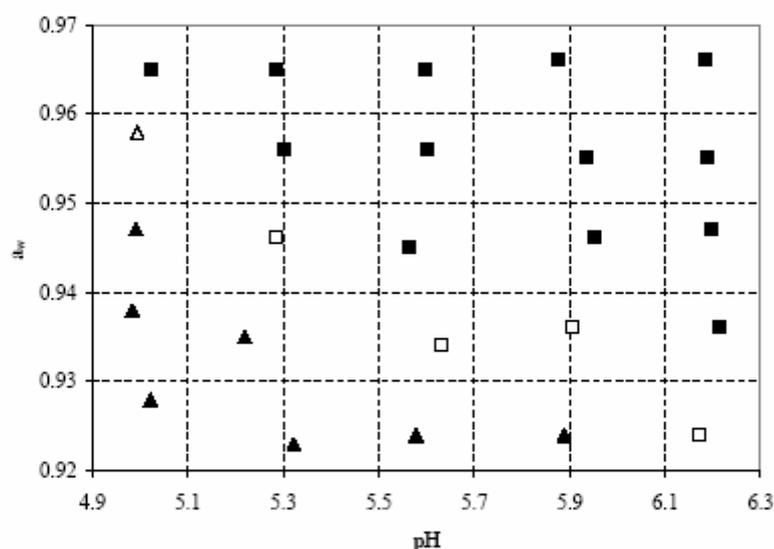
- when the four experimental data points ± 0.7 U Log were included in the 90% confidence intervals of the predicted kinetics, prediction was correct;
- when one or more experimental data points ± 0.7 U Log was higher than the 90% confidence intervals of the predicted kinetics, prediction was not correct and fail dangerous;
- when no point ± 0.7 U Log was higher than the 90% confidence intervals of the predicted kinetics and one or more experimental data points ± 0.7 U Log was lower than the 90% confidence intervals, prediction was not correct and fail safe.



with in ordinate, one line each 0.5 U Log

Figure 7. Validation of the integrated model. Experimental data $\pm 0.7^\circ\text{C}$ (experimental error): \blacksquare ; 90% confidence intervals (calculated by Monte Carlo analysis): —

On Figures 7a and 7g, *Listeria* population remained constant (after the decrease during the heat processing regime for 1h/53°C) and was correctly predicted by the combined models. The growth of *Listeria* is accurately predicted on Figures 7b, 7d and 7h. Even when the *Listeria* growth is slow, models give correct predictions (Figure 7f). For 4h/42°C – a_w 0.95 – pH 5.9 (Figure 7c), the prediction is fail safe since the population at time 4h is overestimated compared to what was observed. On the contrary, prediction of *Listeria* growth for 1h/48°C – a_w 0.94 – pH 5.6 (Figure 7e) is fail dangerous. Indeed, at 168 hours, the *Listeria* population is underestimated.



with in ordinate one line each 0.01 a_w and with x-axis one line each 0.2 pH unit.

Figure 8. Evaluation of the performance of the Augustin model as a function of pH and a_w for heat processing regime 1h/48°C. closed symbol: accurate prediction, all experimental points ± 0.7 U Log inside the 90% confidence interval of the Augustin model. open symbol: fail-dangerous prediction, one or more experimental point(s) ± 0.7 U Log outside the 90% confidence interval of the Augustin model. ■ or □: conditions of pH, a_w for which growth was observed (final increase in population higher than 1.0 U Log) for a heat processing regime of 1h/48°C, followed by six days of storage at 20°C. ▲ or △: conditions of pH and a_w for which no growth was observed (final increase in population equal or lower than 1.0 U Log) for a heat processing regime 1h/48°C, followed by six days of storage at 20°C.

In the 25 conditions tested for heat processing regime 1h/48°C, the use of an integrated approach made it possible to predict *Listeria* evolution during the experimental process of diced bacon, given the heat processing regime and formulations (a_w /pH) (Figure 8). Indeed, 80% of the predictions for the heat processing regime 1h/48°C were correct. Nevertheless, the accuracy of the predictions decreases for conditions near the limit of pH and a_w compatible with the growth of the bacteria. Moreover, when predictions are not correct, they are always fail dangerous.

For 24h/20°C, 84% of the predictions are correct, 60% for 4h/42°C and 52% for 1h/53°C.

Second application (validation): Effect of a drying process on *Listeria* growth

Context

The safety and quality of foods depend on parameters such as processing procedures. The conditions in which the process is applied determine the microbial quality of the product. During cold storage, meat cooling or maturation of fermented sausages, foods often encounter variable air conditions (temperature (T, °C), velocity (V, m . s⁻¹) and relative humidity (RH, %)). These changes can affect bacterial behaviour and growth may occur on the surface of the food. In most cases, the water activity on the surface ($a_{w,s}$) of the food may not be equal to the global a_w of the food because of the phenomena of diffusion, water and mass transfer. As a consequence, $a_{w,s}$ cannot be considered equal to RH/100.

This work has focused on water transfer and changes in $a_{w,s}$ of food for two reasons: the $a_{w,s}$ cannot be directly measured and studies in predictive microbiology have shown that bacterial growth rate greatly varies in the narrow range of a_w between 0.9 and 1. The water transfer model [21] was used to predict the surface water activity as a function of the processing variables (V, T, RH of air) and the product characteristics (water content, X (kg water . kg dry matter⁻¹), diffusivity, D (m² . s⁻¹)). The aim of this work was to validate the use of the water transfer model combined with a predictive bacterial model to predict the growth of *Listeria innocua* inoculated on the surface of a gelatine gel when it was placed in an air flow.

Experimental methodology

The growth of *L. innocua* CLIP 20595 was investigated in a tryptic meat broth that contained gelatine to solidify the medium. The initial properties of the gelatine gel were $a_w = 0.98$, X = 2 kg water . kg dry matter⁻¹ and pH 5.5. The inoculum level was between 10³ and 10⁴ CFU . g⁻¹.

Inoculated samples were incubated in a wind tunnel [22] in which the air characteristics (T, V, RH) could be controlled. At each sampling time, the top of the inoculated samples was removed and analysed for viable counts. Temperature was set at 18°C and three conditions of velocity and relative humidity (V, RH) were tested: M1: (2.3 m . s⁻¹, 95.5%), M2: (2.3 m . s⁻¹, 91.9%) and M3: (4.6 m . s⁻¹, 92.6%) (Table 2).

Table 2. Conditions of incubation during the experiments involving growth at the surface of the gel in the wind tunnel

experiments	M1	M2	M3
drying time (h)	216	216	216
T _{air} (°C)	17.8	17.9	17.9
T _{dew point} (°C)	17.1	16.8	16.6
average RH (%)	95.5	91.9	92.6
V (m . s ⁻¹)	2.3	2.3	4.6
X ₀ (kg water . kg dry matter ⁻¹)	2.06	2.00	2.06
initial a _w	0.986	0.990	0.985
initial pH	5.66	5.66	5.64

Estimation of parameters

The use of the water transfer model requires various parameters: water transfer coefficient at the air/product interface (k), sorption isotherm and water diffusivity in the gelatine gel (D). Parameter k was estimated from drying experiments of gelatine gel at 18°C. Gel samples were placed in the working area of the wind tunnel and only the upper surface of the gel was in contact with the air flow. The estimated value of k was found to be equal to 0.022 m . s⁻¹. The experimental sorption curve of gelatine gel was fitted with the Ferro-Fontan equation [23]:

$$\ln\left(\frac{\gamma}{a_w}\right) = \alpha.X^{-R} \quad [\text{Eq. 25}]$$

Parameters were estimated by Baucour [21]: $\alpha = 3.42 \cdot 10^{-2}$; $\gamma = 1.00$ and $R = 1.51$. The water diffusivity D depends on the water content of the gelatine gel. An empirical equation was determined by Ruiz-Cabrera [9]:

$$D = a \cdot e^{(c+bX)e^{d(X-e)}} \cdot (aX+b) \quad [\text{Eq. 26}]$$

with $a = 0.137$; $b = 1.5 \cdot 10^{-4}$; $c = -19.21$; $d = 22.94$; $f = -0.573$.

Three experiments were carried out (Table 2) at 18°C to validate the prediction of the water transfer model. Since surface a_w could not be measured during the experiments because its value depends on the local water content at the surface of the product and that is directly connected to air flow properties, comparisons of the experimental and predicted average water content of the samples were made. Figure 9 shows that the water transfer model accurately predicts the water content of the gel after different drying times and for relative humidities ranging between 92% and 96% and air flow velocity between 2 and 5 m . s⁻¹ [24].

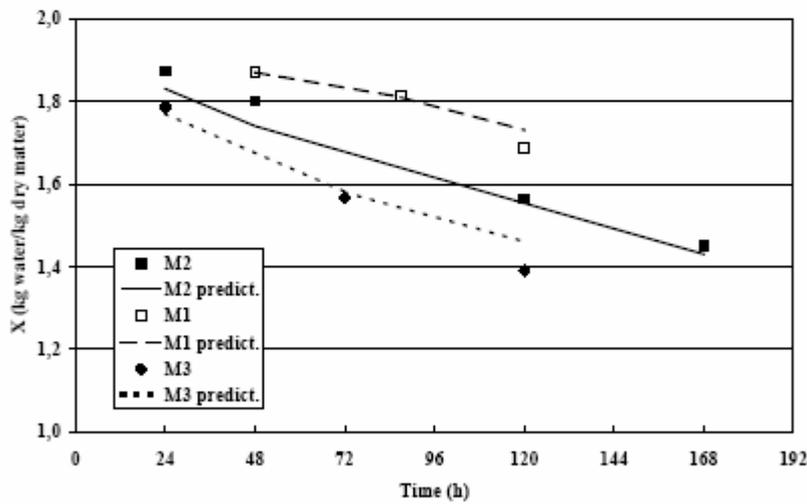


Figure 9. Experimental and predicted average water content (X) in gelatine gel samples from Line 1 at 18°C in the wind tunnel after different drying times and different conditions of relative humidity (RH) and velocity (V) of air [24] at M1 [RH = 95.5%, V = 2.3 m . s⁻¹], experimental (□) and predicted (— —) water content; at M2 [RH = 92%, V = 2.3 m . s⁻¹], experimental (■) and predicted (—) water content; at M3 [RH = 92.5%, V = 4.6 m . s⁻¹], experimental (◆) and predicted (- - -) water content.

Augustin's cardinal model was first validated on data of *L. innocua* grown in broth. Lebert *et al.* [25] had measured the growth kinetics in broth in which the a_w was controlled by the addition of solutes. They showed that the assumption $[\mu_{max} \times \text{Lag}] = \text{constant}$ could not be applied [26]. Consequently, a lag model was set up, independently of the μ_{max} model. The equations used functions similar to those of the μ_{max} model: the parameters in the μ_{max} model and Lag model were those proposed by Augustin (Table 1). $a_{w,\min}$ and L_{opt} for the Lag model and $a_{w,\min}$ and μ_{opt} for the μ_{max} model were fitted with the experimental data.

$$\frac{1}{Lag} = \frac{1}{Lag_{opt}} CM'_2(T).CM'_1(PH).CM'_2(a_w) \quad [\text{Eq. 27}]$$

where: Lag_{opt} = minimum lag time obtained in standard medium under optimum growth conditions.

Lebert *et al.* [25] showed that growth in broth in which a_w was controlled by the addition of NaCl, was faster at a similar a_w than growth at the surface of the gelatine gel in which a_w was controlled by the quantity of water expressed as the water content (kg water mass . kg dry mass⁻¹). The model validated in broth could not be used to predict the bacterial growth in gelatine gel. A specific bacterial growth model in gelatine gel was fitted on the experimental data [25] and the optimised parameters are summarised in Table 3. The cardinal values for temperature, pH and $a_{w,\max}$ were those presented in Table 1 (for the model without interactions). The model in gelatine gel was validated on bacterial growth under dynamic conditions of a_w during experiments performed in the wind tunnel.

Table 3. Modified cardinal parameters of *Listeria monocytogenes* [26].

Cardinal parameter	μ_{max} model	Lag model
$a_{w\ min}^{\circ}$	0.927	0.905
$a_{w\ opt}$	1.000	0.992
μ_{opt}	1.380	
$1/Lag_{opt}$		0.469

Validation of the integrated model

When the relative humidity decreased from 95.5% to 92% at the same velocity, the growth was slowed down after 48 hours of incubation and the maximal population decreased from 8.9 to 7.3 \log_{10} (CFU \cdot cm $^{-2}$). When the velocity was twice as great at a similar relative humidity of about 92%, a decrease in growth was observed as well. Growth was stopped after 24 hours of incubation at a relative humidity of 92.5% and a velocity of 4.6 m \cdot s $^{-1}$ and the maximum population did not exceed 5 \log_{10} (CFU \cdot cm $^{-2}$). The different behaviour of *L. innocua* under the three drying conditions was accurately predicted by the combined model (Figure 10).

As previously reported, the a_w cannot be measured on the surface of the gel under drying conditions since no technique exists to precisely measure the a_w at a particular point of a product. The predictions of the combined thermodynamic and transfer models compensate for the lack of techniques. The evolution of the predicted a_w under each drying condition clearly explained the different growth observed. It was demonstrated that the minimum a_w for growth on the surface of gelatine gel ranged between a_w 0.935 and 0.946 [24]. As soon as the predicted surface a_w reached 0.94, that is, in the range of the minimum a_w for growth, the growth stopped (Figure 11).

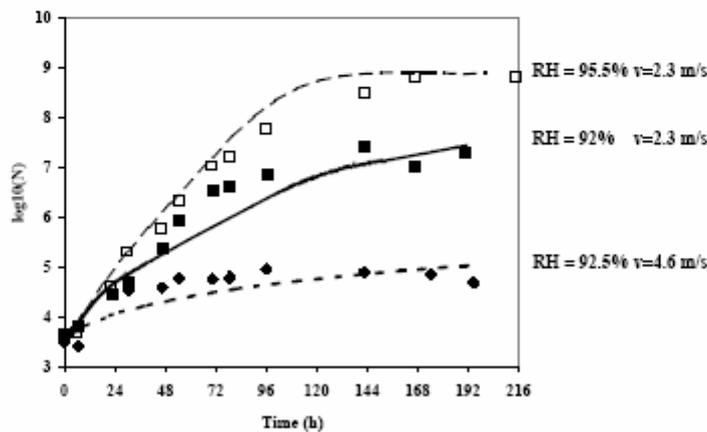


Figure 10. Measured and predicted growth of *L. innocua* CLIP 20595 at 18°C in the wind tunnel as a function of the relative humidity (RH) and velocity (V) of air at [RH = 95.5%, V = 2.3 m \cdot s $^{-1}$], experimental (\square) and predicted (— —) growth; at [RH = 92%, V = 2.3 m \cdot s $^{-1}$], experimental (\blacksquare) and (—) predicted growth; at [RH = 92.5%, V = 4.6 m \cdot s $^{-1}$], experimental (\blacklozenge) and predicted (- -) growth.

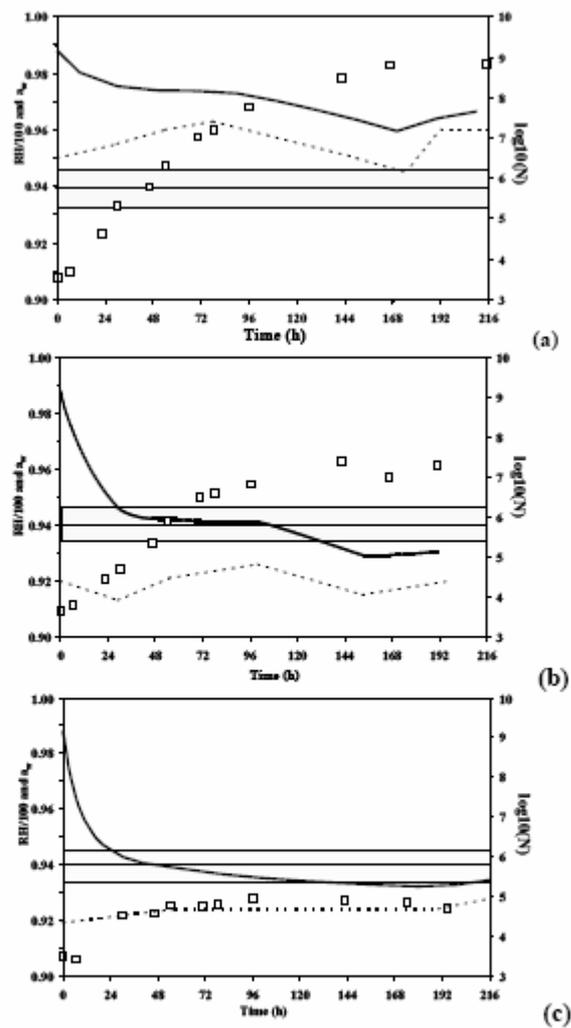


Figure 11. Predicted surface a_w profiles (—) calculated with the measured RH profile (- -) using the combined water transfer model and the thermodynamic model for three growths of *L. innocua* CLIP 20595 (□). Experiments performed at 18°C in the wind tunnel: (a) [RH = 95.5% and $V = 2.3 \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$], (b) [RH = 92%, $V = 2.3 \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$] and (c) [RH = 92.5%, $V = 4.6 \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$]. minimum a_w range for *L. innocua* CLIP 20595 growth on gelatine gel measured by Lebert *et al.* [25].

Conclusion

In this work, we attempted to validate the use of this integrated modelling approach on the basis of two examples, the effect of a drying process and the effect of a heating process on *Listeria* behaviour:

- the first one made it possible to describe the growth or inactivation of *L. monocytogenes* in raw pork meat batter during heat processing and storage, given the heat processing parameters, the properties of the medium and the cardinal values of the bacteria.
- the second one made it possible to describe the growth of *L. innocua* at the surface of a gelatine gel when placed in an air flow, given the drying process parameters, the properties of the medium and the cardinal values of the bacteria.

Many conventional food processes entail the evolution of physical factors such as temperature (steaming, cooling, cooking, etc.) or water activity (drying, cooking). Those factors have a great influence on the qualities of the product: evolution of the structure, of the sensory quality, of the microbial flora, etc. Therefore, it is essential to take the dynamics of temperature and a_w (according to time and space) into account in order to accurately predict the evolution of the food contamination during a process. Nevertheless, the measurement of temperature or water activity at each point of the food at each point in time is not conceivable and is sometimes impossible. Furthermore, control variables applied during a process, such as V and RH , are not directly linked to a_w properties, the required parameters linked to bacterial growth models. The global approach by integration of mass and heat transfer model into bacterial models is thus indispensable.

Such an integrated approach, taking the characteristics of the medium, the bacteria and the process into account will be useful for predicting food safety. It will also have many applications in HACCP and risk analysis.

Nomenclature

a_w	water activity of the product	
$a_{w\max}$	maximum water activity	
$a_{w\min}$	minimum water activity	
$a_{w\text{opt}}$	optimum water activity	
$a_{w,s}$	water activity on the surface of the product	
C	volumetric water concentration in the product	(kg water · m ⁻³)
C_{air}	water concentration in the air	(kg water · m ⁻³)
C_{surface}	water concentration in the air in contact with the product	(kg water · m ⁻³)
D	water diffusivity in the product	(m ² · s ⁻¹)
D^*	effective water diffusivity in the solid-coordinate system	(m ² _{Dry Matter} · s ⁻¹)

D_T	decimal reduction time at temperature T	(s^{-1})
e_p	thickness	(m)
GT	generation time	(h)
h	heat transfer coefficient between product and air	$(W \cdot m^{-2} \cdot K^{-1})$
h^*	heat transfer coefficient	$(W \cdot m^{-2} \cdot K^{-1})$
h'	heat transfer coefficient between product and support	$(W \cdot m^{-2} \cdot K^{-1})$
J_E	water flux density at the air/product interface	$(kg \text{ water} \cdot m^{-2} \cdot s^{-1})$
J_D	water flux density in the product	$(kg \text{ water} \cdot m^{-2} \cdot s^{-1})$
J_1	heat flux density due to water evaporation	$(J \cdot m^{-2} \cdot s^{-1})$
J_2	heat flux density at the air/product interface	$(J \cdot m^{-2} \cdot s^{-1})$
J_3	heat flux density between the product and the support	$(J \cdot m^{-2} \cdot s^{-1})$
J_4	heat flux density by radiation	$(J \cdot m^{-2} \cdot s^{-1})$
J_5	heat flux density in the product	$(J \cdot m^{-2} \cdot s^{-1})$
K	constant depending on the physiological state of the inoculum and on the product	
k	water transfer coefficient at the air/product interface	$(m \cdot s^{-1})$
k^*	water transfer coefficient	$(m \cdot s^{-1})$
l	width	(m)
L	length	(m)
Lag	lag time	(h)
Lag _{opt}	optimal lag time	(h)
L _v	vaporisation heat of water	$(J \cdot kg^{-1})$
n	order in the cardinal model: n=2 for CM(T) and CM(a _w), n=1 for CM(pH)	
N_0	initial population	(colony forming unit $\cdot g^{-1}$)
N_t	bacterial population at time t	(colony forming unit $\cdot g^{-1}$)
N_{max}	maximum population	(colony forming unit $\cdot g^{-1}$)
P	partial pressure of air at temperature T	(Pa)
pH	hydrogen potential	
pH _{max}	maximum pH	
pH _{opt}	optimum pH	
RH	relative humidity of the air	(%)
S	product surface in contact with air	(m^2)
S'	product surface in contact with the support	(m^2)
T	temperature	(°C or K)
$T_{product}$	temperature of the product	(°C or K)
T_{air}	air temperature	(°C or K)
$T_{contact}$	temperature of the product surface in contact with the support	(°C or K)
T_{dew}	dew point temperature	(°C or K)
T_{max}	maximum temperature	(°C or K)
T_{min}	minimum temperature	(°C or K)
T_{opt}	optimum temperature	(°C or K)
$T_{support}$	support temperature	(°C or K)
$T_{Surface}$	surface product temperature	(°C or K)
t	time	(h)
V	air velocity	$(m \cdot s^{-1})$
$V_{Product}$	volume of the product	(m^3)
$V_{Dry\ Mass}$	partial volume of the dry water	(m^3)

V_{water}	partial volume of the water	(m^3)
X	water content	($\text{kg water} \cdot \text{kg dry matter}^{-1}$)
X_0	initial water content of gelatine gel	($\text{kg water} \cdot \text{kg dry matter}^{-1}$)
\bar{X}	average water content	($\text{kg water} \cdot \text{kg dry matter}^{-1}$)
X_{env}	environmental factor (temperature, pH or a_w)	
X_{min}	value of the environmental factor below which no growth occurs	
X_{opt}	value of the environmental factor at which μ_{max} is optimum	
X_{max}	value of the environmental factor above which no growth occurs	
X_{min}^0	value of environmental factor X below which no growth occurs for Y_{opt} and Z_{opt}	
Y_{min}^0	value of environmental factor Y below which no growth occurs for X_{opt} and Z_{opt}	
Z_{min}^0	value of environmental factor Z below which no growth occurs for X_{opt} and Y_{opt}	
Z_D	increase in temperature required to reduce the D_T value to one tenth of its value at the lower temperature	($^{\circ}\text{C}$ or K)
z_{Product}	thickness or length of the product	(m)
$z_{\text{Dry Matter}}$	length due to dry water	(m)
z_{water}	length due to water	(m)
ϵ	emissivity of the product	(no dimension)
λ	heat diffusivity in the product	($\text{m}^2 \cdot \text{s}$)
$\rho_{\text{Dry Matter}}$	density of the dry matter	($\text{kg dry matter} \cdot \text{m}^{-3}$)
ρ_{Water}	density of water	($\text{kg water} \cdot \text{m}^{-3}$)
σ	Stefan-Boltzmann constant	($\text{W} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{K}^{-4}$)
ξ	solid coordinate	
μ_{opt}	maximum specific growth rate in standard medium at optimal conditions of growth	(h^{-1})
μ_{max}	maximum specific growth rate	(h^{-1})

References

1. Cox, L. J., Kleiss, T., Cordier, J. L., Cordellana, C., Konkel, P., Pedrazzini, C., Beumer, R. R. and Siebenga, A. 1989, *Food Microbiol.*, 6, 49.
2. Walker, S. J., Archer, P. and Banks, J. G. 1990, *J. Appl. Bact.*, 68, 157.
3. George, S. M., Lund, B. M. and Brocklehurst, T. F. G 1988, *Lett. Appl. Microbiol.*, 6, 153.
4. Farber, J. M., Coates, F. and Daley, E. F. 1992, *Lett. Appl. Microbiol.*, 15, 103.
5. Nolan, D. A., Chamblin, D. C. and Troller, J. A. 1992, *Int. J. Food Microbiol.*, 16, 323.
6. Suzuki, K., Kiyoshi, K., Tsutomu, H. and Hideaki, H. 1976, *J. Food Sci.*, 41, 1189.
7. Lozano, J. E., Rotstein, E. and Urbicain, M. J. 1983, *J. Food Sci.*, 48, 1497.
8. Ratti, C. 1994, *J. Food Eng.*, 23, 91.
9. Ruiz Cabrera, M. A. 1999, Détermination de la relation entre la diffusivité de l'eau et la teneur en eau dans les matériaux déformables à partir d'images RMN -

- Elaboration de la méthode avec des gels de gélatine et transposition à la viande, thesis, Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand, 122 p.
10. Rovedo, C. O., Suarez, C. and Viollaz, P. 1998, *J. Food Eng.*, 36, 211.
 11. Nadeau, J. P. and Puiggali, J. R. 1995, *Séchage des processus physiques aux procédés industriels*, Lavoisier Tec Doc, Paris.
 12. McMeekin, T. A., Olley, June, Ratkowsky, D. A. and Ross, T. 2002, *Int. J. Food Microbiol.*, 73, 395.
 13. Rosso, L., Bajard, S., Flandrois, J. P., Lahellec, C., Fournaud, Jeanne and Veit, P. 1996, *J. Food Protect.*, 59, 944.
 14. Augustin, J.-C. 1999, *Modélisation de la dynamique de croissance des populations de Listeria monocytogenes dans les aliments*, thesis, Université Claude Bernard - Lyon 1, 153.
 15. Augustin, J.-C. and Carlier, V. 2000, *Int. J. Food Microbiol.*, 56, 29.
 16. Bellara, S. R., Fryer P.J., McFarlane C.M., Thomas, C. R., Hocking, P. M. and Mackey, B. M. 1999, *Appl. Environ. Microbiol.*, 65, 3095.
 17. Wilson, P. D., Brocklehurst, T. F., Arino, S., Thuault, D., Jakobsen, M., Lange, M., Farkas, J., Wimpenny, J. W. and Van Impe, J. F. 2002, *Int. J. Food Microbiol.*, 73, 275.
 18. Giovannacci, I., Ragimbeau, C., Queguiner, S., Salvat, G., Vendeuvre, J.-L., Carlier, V. and Ermel, G. 1999, *Int. J. Food Microbiol.*, 53, 127.
 19. Stekelenburg, F. K. 2003, *Food Microbiol.*, 20, 133.
 20. Pierre, O. and Veit, P. 1996, *BEH*, 45, 195.
 21. Baucour, P. 2000, *Mesure des isothermes de sorption dans les hautes humidités. Modélisation du couplage transfert d'eau et croissance bactérienne en surface des viandes*, thesis, Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand II
 22. Robles Olvera, V., Bégot, C., Lebert, I. and Lebert, A. 1999, *J. Food Eng.*, 38, 425.
 23. Ferro Fontan, C., Chirife, J., Sancho, E. and Iglesias, H. A. 1982, *J. Food Sci.*, 47, 1590.
 24. Lebert, I. 2004, *Prédiction de la croissance de Listeria innocua par une approche phénoménologique : modélisations complémentaires des propriétés du milieu, des transferts d'eau et des cinétiques*, thesis, Université Blaise Pascal, 186.
 25. Lebert, I., Dussap, C. G. and Lebert, A. 2004, *Int. J. Food Microbiol.*, 94, 67.
 26. Lebert, Isabelle, Portanguen, S., Dussap, C. G. and Lebert, André 2004, *International Congress on Engineering and Food - iCEF9*, 7-11 march 2004, Montpellier, France.

Effects of heat processing regime, pH, water activity and their interactions on the behaviour of *Listeria monocytogenes* in ground pork

Véronique ZULIANI* (1), Isabelle LEBERT (2), Pascal GARRY (1), Jean-Luc VENDEUVRE (1), Jean-Christophe AUGUSTIN (3), André LEBERT (2)

(1) Centre Technique de la Salaison, de la Charcuterie et des Conserves de Viandes
7 avenue du Général de Gaulle, 94704 Maisons-Alfort Cedex, FRANCE

(2) Unité de Recherches sur la Viande, Institut National de la Recherche Agronomique
63122 Saint-Genès Champanelle, FRANCE

(3) Unité Mixte de Recherches RISQUAL ENVA/INRA,
Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort,
7 avenue du Général de Gaulle, 94704 Maisons-Alfort Cedex, FRANCE

Tel: +33 (0)1 43 68 57 85

Fax: +33 (0)1 43 76 02 20

E-mail: vzuliani@clermont.inra.fr

Véronique Zuliani

Equipe Génie des Procédés

Unité de Recherches sur la Viande

INRA de Clermont-Ferrand - Theix

63122 Saint-Genès Champanelle

FRANCE

Abstract

Listeria monocytogenes 14, isolated from an industrial pork batter, was inoculated into ground pork. The influence of a heat processing regime (4h at 42°C, 1h at 48°C, 1h at 53°C), including a control treatment (24h at 20°C), and a storage phase (at 20°C), on the behaviour of *L. monocytogenes*, was studied. The effects of two others factors, pH (5.0, 5.3, 5.6, 5.9, 6.2) and water activity (0.93, 0.94, 0.95, 0.96, 0.97), were also tested, in combination with the heat processing regime.

For the specific heat process phase, a_w , the heat processing regime and their interactions with pH or a_w , have a significant effect on the behaviour of *L. monocytogenes*. During the storage

phase, all parameters tested and their interactions were also significant. Nevertheless, the area in which the growth of *L. monocytogenes* was observed at the end of the experiment was not influenced by the heat processing regime tested. On the contrary, pH, a_w and their interactions were particularly significant. The boundary of the growth area which delimits environmental conditions where growth was higher than 1.0 Log CFU/g from those where growth was lower than 1.0 Log CFU/g was correctly predicted by Augustin's secondary model.

Keywords: *Listeria monocytogenes*, pork meat, growth capacity, a_w , pH, heat processing regime, Augustin's model, boundary of growth area

1. Introduction

Bacterial food diseases frequently occur in developed countries with significant health and economic consequences. In 1999, 660 clusters were reported in France (Haeghebaert *et al.*, 2002). Most of these diseases involved classic pathogenic microorganisms such as *Salmonella*, *Staphylococcus aureus* or *Clostridium perfringens*. Other bacteria, referred to as new emerging pathogens, such as *Listeria monocytogenes*, were involved as well (Buisson et Teysou, 2002). This bacteria is problematic because of its ability to grow over a wide range of temperatures (-2.7 to 45.5°C), pH (4.5 to 9.6) and water activity values (a_w) (0.91 to 1.0) (Augustin, 1999), enabling it to survive in many foods. Over the last 15 years, *L. monocytogenes* has often been involved in meat disease outbreaks: in France, in 1992, 279 people became ill after consumption of pork tongue in aspic; a year later, potted minced pork was responsible for 33 cases (McLauchlin, 1996). More recently, in 1998, a listeriosis outbreak occurred in the USA involving frankfurters and affected 50 people (Stekelenburg, 2003).

Among the food groups consisting of seafood, baked goods, vegetables, dairy or meat products, the latter is the most frequently contaminated with *L. monocytogenes*. In France, 16% of the meat products tested between 1993 and 1994, (Pierre et Veit, 1996) were contaminated by *L. monocytogenes*. Raw minced meat (36% of the analysed samples were contaminated) and cooked minced pork (45%) are particularly concerned. In Belgium, between 1997 and 1998, *L. monocytogenes* was isolated from 18.3% of the 308 pork bacon samples tested (Uyttendaele *et al.*, 1999).

Thus, delicatessen products are frequently contaminated by *L. monocytogenes* as a result of the use of contaminated raw material. During the process, the physico-chemical properties of delicatessen products are modified. For example, the temperature of the product increases

during heat processing, commonly used for delicatessen products (Durand, 1999). Depending on the formulation, pH and a_w may also be modified as a result of the addition of NaCl, sugar and additives (with antibacterial activities) such as nitrite or organic acid salts.

In this study, we focused on pH, a_w and heat processing regime. The effects of these factors on the behaviour of the *L. monocytogenes* inoculated into ground pork were studied during the heat process phase and the storage phase at 20°C. Our aim was to analyse each phase, one by one, in order to determine the parameters and their interactions that have an influence on the evolution of contamination during a process composed of formulation, a mild heat treatment and a storage phase. Growth was considered to be significant when the population increased by more than 1.0 Log Colony Forming Units-CFU/g. This value (1.0 Log CFU/g) was used to delimit the boundary between the growth and no-growth areas, as a function of pH and a_w for a given processing regime. An attempt was then made to predict such a boundary.

2. Materials and Methods

2.1. The organism used and preparation of inoculum

Listeria monocytogenes 14, serotype 4b, is a fast growing strain (Bégot *et al.*, 1997), isolated from an industrial pork batter {Bégot, Lebert, et al. 1997 #1453}. Before being used, it was stored on glass beads at -20°C.

Stationary phase inoculum was obtained after three subcultures in 10 ml Brain Heath Infusion (BHI, Oxoid, Dardilly, France), incubated at 37°C in a rotary shaker (Novotron, Infors, Massy, France) at 150 rotations per minute (rpm). The first one was inoculated with a bead and incubated overnight. The second subculture was then inoculated with 59 µl of the first one, diluted to 1/10. After eight hours of incubation, the last subculture was inoculated with 84 µl of the second one, diluted to 1/10 000, and incubated overnight. This provided a three-four hour stationary phase inoculum containing about 10⁹ CFU/ml (Leporq, 2001).

2.2. Media and reagents

NaCl (Normapur, Prolabo, Fontenay-sous-Bois, France) was added to adjust the a_w of the meat. HCl (Rectapur, Prolabo), 1N or NaOH (Normapur, Prolabo) 1N were used to adjust the pH. NaCl powder, HCl and NaOH solutions were sterilised by autoclaving for 15 min at 121°C to prevent contamination of the meat samples. In order to keep powder dry during autoclaving, NaCl was put in test tubes with a top.

Palcam agar (Biokar, Beauvais, France) was used for enumeration of *L. monocytogenes* and Plate Count Agar (Biokar) for total counts. Tryptone (0.1 w/v %, Biokar) -NaCl (0.85 w/v

%, Prolabo) water was used for all serial dilutions and for dilution of the inoculum. All media and diluents were autoclaved at 121°C for 15 min.

2.3. Experimental design

In order to study the influence of the heat processing regime and the formulation (a_w , pH) on the behaviour of *L. monocytogenes*, a complete factorial design (four x five x five) was used.

The effects of the heat processing regime (4h at 42°C, referred to as 4h/42°C; 1h at 48°C: 1h/48°C; 1h at 53°C: 1h/53°C; and a control treatment, 24h at 20°C: 24h/20°C, *i.e.*, at storage temperature), pH (5.0, 5.3, 5.6, 5.9, 6.2) and a_w (0.93, 0.94, 0.95, 0.96, 0.97) were studied.

The four processing regimes were chosen in order to replicate actual industry practices as closely as possible.

High values of pH and a_w tested were close to the average ones found for commercial diced bacon. The low values corresponded to those frequently found for other typical raw meat products (Pidcock *et al.*, 2002 ; Cole *et al.*, 1990).

2.4. Experimental procedure

2.4.1. Meat decontamination

In order to work with meat samples which were equally contaminated and had low initial contamination, meat was irradiated using high electron energies (AERIAL, Schiltigheim, France). First, the fat was removed from shank-free pork shoulders. The meat was then minced and rectangular samples (length: 20 cm; width: 15 cm; thickness: 1.3 cm) of about 400g were vacuum packed, frozen at -20°C and irradiated with a dose of 15 kGy. This dose was chosen because it was the minimum dose that allowed the decrease of the bacterial population without forming too many oxidation compounds (Farkas, 1998).

2.4.2. Adjusting a_w and pH

After thawing the meat at 4°C, the a_w was adjusted. 3.6 to 8.6% (w/w) NaCl was manually mixed with about 1/5 of the meat (using sterile gloves). The rest of the batter was then progressively added. The a_w was measured at 20°C after adjustment of the pH with an electric hygrometer (a_w -sprint TH500, Novasina, Roucaire, Nice, France). Six standards (Novasina) were used to calibrate it. At 25°C, their a_w was: 0.113, 0.328, 0.529, 0.753, 0.901, 0.980 ±0.003.

After adjusting the a_w , meat pH was adjusted: NaOH or HCl solutions were gradually added to the meat and mixed to obtain the desired pH, which was measured using a MP230 pH meter (Mettler Toledo, Viroflay, France) and an Inlab 427 penetration probe (Mettler Toledo). The temperature was controlled with a probe (30K NTC, Mettler Toledo) connected to the pH meter. Three standard solutions with pH values of 4.01, 7.00, 9.21 \pm 0.02 at 25°C (Mettler Toledo) were used to calibrate it.

These two phases were carried out in a laminar air flow cabinet, NU 425-400 (NuAire, Saint Ouen l'Aumone, France), to prevent the contamination of the meat. They took place 24 hours before the meat was inoculated and the samples were then stored at 4°C until the beginning of the experiment.

2.4.3. Meat inoculation

Meat samples were inoculated at a rate of 10^5 cells per gram of meat. According to the threshold detection of the technique used, this inoculum size made it possible to observe the growth, inhibition and decrease of *L. monocytogenes*. The subculture was added to the meat in a closed stomacher bag. The contents of the bag were then mixed by hand in order to obtain a homogeneous concentration of bacteria.

2.4.4. Heat processing

To guarantee the homogeneity of the heat process for all of the experiments, a rectangle of meat was formed: its width was the same as that of the 400 ml stomacher bag (InterScience, Saint-Nom-La Bretèche, France), *i.e.*, 16.5 cm, with a thickness of 1 cm. The length was determined according to the exact weight of the sample (6.1 cm for 100 g of minced meat). Heat processing took place in a forced air incubator (FC 90, Eurotherm, Dardilly, France). During each heat process, the temperature of the incubator was recorded to control its stability (El-win and Easylog software, Lascar, Wiltshire, England).

2.4.5. Bacterial enumerations

For each of the one hundred conditions included in the experimental design, four meat samples were analysed for *L. monocytogenes* numbers: at the beginning of the experiment (t_0), at the end of the heat process phase (t_1), during storage at days four (t_4) and six (t_6).

In addition to the kinetics of the experimental design, kinetics with 15 enumeration times (including t_0 , t_1 , t_4 , t_6) were performed in triplicate at pH 5.6/ a_w 0.95 for the four heat

processing regimes (including control treatment) and at pH 6.2/ a_w 0.97 for the control treatment.

The storage time of the experimental design (six days at 20°C) was chosen because it corresponded, at refrigeration temperature, to the length of time between production and the use-by-date of commercial delicatessen products such as diced bacon (45 days when it is stored at 4°C). Indeed, in previous experiments, the first signs of microbiological degradation of commercial diced bacon (expansion of the packaging tray, greenness of meat) were observed after six days of storage at 20°C.

The t_1 enumeration made it possible to study the evolution of the *L. monocytogenes* population during the heat process phase. The enumeration at t_4 was essential to plot kinetic curves.

Enumeration of total bacterial count was made one time for each experiment just before meat inoculation. The contaminated *L. monocytogenes* meat was heat processed and finally stored at 20°C in a refrigerated incubator (KB 240, Binder, Tuttlingen, Germany). This storage temperature, higher than those found in the commercial cold chain, made it possible to reduce experiment time.

For each enumeration, 20g of meat were aseptically removed from the packages and placed in stomacher bags with 180 ml of tryptone-salt water. Samples were then stomached in a Model 400 Lab Stomacher (InterScience) for 1 min and serial dilutions were carried out. All platings were made in duplicate using a spiral Plater (InterScience). Plates were incubated (incubator type BE 500, Memmert, Schwabach, Germany) for 24 to 48h at 37°C for Palcam, 72h at 30°C for PCA, and then enumerated.

2.5. Data analysis

The one hundred conditions included in the experimental design were broken down into three phases:

- the first, between t_0 and t_1 , corresponded to the heat process phase.
- the second, between t_1 and t_6 , corresponded to the storage phase.
- the third, between t_0 and t_6 , corresponded to the global phase.

2.5.1 Study of the growth capacity

We calculated a growth capacity (GC) that characterises the evolution of the population during each phase as described below:

- for the heat process phase: $GC_{t_1/t_0} = \text{Log}(N \text{ at } t_1) - \text{Log}(N \text{ at } t_0)$

- for the storage phase: $G_{Ct_6/t_1} = \text{Log}(N \text{ at } t_6) - \text{Log}(N \text{ at } t_1)$
- for the global experiment: $G_{Ct_6/t_0} = \text{Log}(N \text{ at } t_6) - \text{Log}(N \text{ at } t_0)$

where N is the *L. monocytogenes* concentration in CFU per gram of meat.

In order to study the influence of pH, a_w , heat processing regimes and their interactions, GC data were used to perform multifactorial analysis of variance (ANOVA) using Statistica 6.0 software (Statsoft, Maisons-Alfort, France).

2.5.2. Modelling

Two models were necessary to model bacterial growth needs:

- a primary model for describing the evolution of the bacterial concentration as a function of time. The logistic growth model with delay (Rosso *et al.*, 1996) was used. The curves were then characterised by maximal growth rate (μ_{\max}), lag time (lag), initial bacterial concentration (N_0) and maximal bacterial concentration (N_{\max}). Using experimental values for N_0 and N_{\max} equal to $1.65 \cdot 10^8$ UFC/g, we optimised μ_{\max} and lag values with Rosenbrock's method, followed by the Quasi-Newton method (Statistica 6.0).

- a secondary model for describing the influence of a_w , pH, heat processing regimes on μ_{\max} and lag. The cardinal model with interactions developed by Augustin (Augustin et Carrier, 2000) was used. Its parameters (optimal growth rate- μ_{opt} - and K, which links lag with μ_{\max}) were optimised using Newton's method (Excel, Microsoft, Courtabœuf, France).

3. Results

3.1. Experimental variations

Four replicates of the experiments in the centre of the experimental design (pH 5.6/ a_w 0.95) and for the four heat processing regimes tested (including the control treatment) were performed. The mean and the standard deviation of the GC were calculated (Table 1).

During the heat processing phase, the standard deviation was lower for the control treatment (24h/20°C), compared to the three others. During storage, the standard deviation was similar for the four processing regimes (including control treatment). For the global experiment, it was lower for 4h/42°C and 1h/53°C than for 24h/20°C and 1h/48°C.

For the three processing regimes and the control treatment, regardless of the phase studied, the variation coefficient (absolute value of the ratio of the standard deviation to the mean value) was lower than 0.20. For the G_{Ct_6/t_1} and the G_{Ct_6/t_0} , the variation coefficient was between 0.03 and 0.07.

3.2. The heat process phase

Table 2 compares the GC_{t_1/t_0} under the one hundred conditions tested (three heat process regimes and the control treatment x five pH x five a_w). We decided that at a GC value lower than -1.0 Log CFU/g, the combination of pH, a_w and the heat processing regime resulted in a decrease of the number of *L. monocytogenes* (inactivation). When the GC value was higher than or equal to -1.0 Log CFU/g and lower than or equal to 1.0 Log CFU/g, inhibition of *L. monocytogenes* was considered, and when the GC value was higher than 1.0 Log CFU/g, environmental conditions were favourable to *L. monocytogenes* growth.

We thus concluded that during the heat process phase, the *L. monocytogenes* population survived in 88 of the one hundred conditions tested. Out of the 12 other conditions, three resulted in *L. monocytogenes* growth and occurred only in the control treatment 24h/20°C, (a_w 0.97/pH 6.2 - a_w 0.97/pH 5.9 and a_w 0.96/pH 6.2) for conditions which combined high pH and high a_w . These results are indicative of the considerable influence of pH and a_w on the GC_{t_1/t_0} .

The most effective heat processing regime to reduce the *L. monocytogenes* population during the heat process phase was the 1h/53°C treatment. Indeed, the nine conditions where the *L. monocytogenes* population decreased were:

- during the 4h/42°C process (two conditions) for pH 6.2 at both a_w 0.95 and 0.94,
- during the 1h/53°C process (seven conditions). Main decreases occurred for pH values equal to 5.9 or 6.2 and six out of the seven when a_w was greater than 0.95; the decrease in the number of *L. monocytogenes* was the highest when pH and a_w were closer to the optimal pH and a_w for *L. monocytogenes* growth, *i.e.*, 7.1 for pH and 0.997 for a_w (Augustin, 1999).

In order to statistically determine if the heat processing regime (with the control treatment), the a_w and the pH influenced the GC_{t_1/t_0} , an ANOVA was carried out (Table 3). Results show that a_w has a significant effect on the behaviour of *L. monocytogenes* during the heat process phase. Three other factors have a highly significant effect: heat processing regime, interactions between heat processing regime and pH (heat processing regime*pH) and interactions between heat processing regime and a_w (processing regime* a_w). These results emphasized the considerable effect of the heat processing regime during this phase. Indeed, the use of drastic time/temperature conditions during this process is an effective method for reducing the *L. monocytogenes* population.

3.3. The storage phase

Following the heat process, meat samples were stored at 20°C for six days. The influence of pH, a_w and heat processing regime were studied.

For the one hundred conditions tested, the G_{Ct_6/t_1} were calculated (Tables 2 and 4). Growth ($G_{Ct_6/t_1} > 1.0 \text{ Log CFU/g}$) was observed for 71 conditions. Inhibition ($-1.0 \text{ Log CFU/g} \leq G_{Ct_6/t_1} \leq 1.0 \text{ Log CFU/g}$) of the *L. monocytogenes* population was observed for 29 conditions and no inactivation ($G_{Ct_6/t_1} < -1.0 \text{ Log CFU/g}$) was observed. Contrary to the heat process phase, the storage phase was generally favourable to *L. monocytogenes* growth. Moreover, the influence of pH and a_w on the G_{Ct_6/t_1} was very pronounced for the four treatments (three heat processes and the control) tested.

Most of the conditions where the *L. monocytogenes* population remained constant were those for which the pH was lower than 5.9 and the a_w lower than 0.95. Therefore, reducing pH and a_w is an effective method for controlling bacterial development. On the contrary, the increase of those parameters resulted in an increase of the *L. monocytogenes* population, except for 24h/20°C. Indeed, after the control treatment, growth ($G_{Ct_6/t_1} > 1.0 \text{ Log CFU/g}$) actually only occurred in 16 out of the 25 conditions. For some conditions of the other nine combinations (when pH and a_w were high), growth had already begun during the control treatment phase (see Table 2, G_{Ct_1/t_0}). Six a_w /pH formulations did not result in *L. monocytogenes* growth after 1h/53°C, eight after 1h/48°C and six after 4h/42°C.

ANOVA (Table 5) carried out on the G_{Ct_6/t_1} confirms our observations. Indeed, pH, a_w , heat processing regime (including control treatment) and heat processing regime*pH and a_w *pH, as well, have a highly significant effect on the growth of *L. monocytogenes* during the storage phase. Heat processing regime* a_w is also significant.

3.4. The global experiment

Study of the kinetics of the bacteria demonstrates the effect of pH and a_w (Figure 1). For pH 5.0 and heat processing regime 4h/42°C (Figure 1a), bacteria survived during the heat process phase. Then, during storage, the growth of *L. monocytogenes* was only observed at a_w 0.97 and 0.96. The stationary phase was not reached for some of the conditions after six days at 20°C.

At a_w 0.96 and for the treatment 24h/20°C (Figure 1b), an increase of the initial contamination level was always observed, regardless of the pH. Moreover, as previously observed, pH had a significant influence on the G_{Ct_6/t_0} (it was equal to about 3.0 Log CFU/g at pH 6.2, 5.9 and 5.6, 2.2 for pH 5.3 and only about 1.3 at pH 5.0). Figure 1b also shows that when pH decreased, even if not calculated, the lag time was longer and the maximal growth rate was lower.

Table 4 shows that for the global experiment, 70 conditions of heat process regimes (including control treatment) and formulations (a_w *pH) studied resulted in an increase of the initial *L. monocytogenes* contamination level ($G_{Ct_6/t_0} > 1.0$ Log CFU/g). Moreover, no decrease was observed ($G_{Ct_6/t_0} < -1.0$ Log CFU/g) after six days of storage at 20°C. For pH under 5.3 and a_w under 0.94, no growth occurred, regardless of the heat process regime. On the contrary, growth always occurred when pH was higher than 5.6 and a_w was higher than 0.95. There is an intermediate zone between these two areas where both growth and inhibition were observed, depending on the pH/ a_w combination. This observation attests to interactions between these two parameters.

The heat processing regime did not seem to have an influence on the G_{Ct_6/t_0} . Indeed, the G_{Ct_6/t_0} were equivalent for the four processing regimes tested (Figure 2). Even if a decrease took place during the heat process phase when ground pork was heated, the GC during the storage was greater after a heat process than for the control treatment.

3.5. Modelling

The six kinetics with 15 sampling times performed in ground pork under constant temperatures were fitted to estimate μ_{max} and lag. K (which links μ_{max} and lag) was calculated and was equal to the mean value of 1.944 ± 0.518 . Using the Augustin's secondary model, μ_{opt} was optimised by unlinear regression. We estimated it to be 1.455 h^{-1} . Other parameters were equal to those proposed by Augustin for the model, taking account of the interactions (Augustin et Carlier, 2000). Given pH, a_w and heat processing regime, μ_{max} and lag values could thus be determined using Augustin's model and introduced into the primary model developed by Rosso (Rosso *et al.*, 1996) for calculating bacterial concentration at each point in time of the experiment.

Those two models were used to predict the boundary between the growth area ($G_{Ct_6/t_0} > 1.0$ Log CFU/g) and the no-growth area ($G_{Ct_6/t_0} < 1.0$ Log CFU/g) for the global experiment. This boundary was defined as the conditions of pH, a_w and processing regime that result in a G_{Ct_6/t_0} equal to 1.0 Log CFU/g (*i.e.*, an increase of 1.0 Log CFU/g in 168 hours). Since the G_{Ct_6/t_0} is the same for the four processing regimes (Figure 2), we only modelled the boundary for static temperature conditions, *i.e.*, at 20°C.

For each pH, we determined the a_w for which G_{Ct_6/t_0} was equal to 1.0 Log CFU/g at 20°C. The function target value (Excel, Microsoft, Courtabœuf, France) was used. It was repeated for each pH between 4.9 and 6.3 (increment of 0.05). We thus obtained couples of a_w /pH for which G_{Ct_6/t_0} was equal to 1.0 Log CFU/g. They were used to establish the line representing

the boundary between the growth and the no-growth areas (Figure 3). Comparing experimental data with the prediction shows that the boundary of the growth area was accurately predicted. Indeed, for 24 of the 25 conditions tested, the behaviour of *Listeria* was correctly predicted. Nevertheless, for one condition (pH 5.0/ a_w about 0.95), the prediction was fail dangerous since a no-growth was predicted, contrary to what had been experimentally observed.

4. Discussion

The development of bacteria in food is commonly controlled or limited by combined factors (Chawla et Chander, 2004) such as pH (Grau et Vanderline, 1993), a_w (Devlieghere *et al.*, 2001), temperature (Conner *et al.*, 1986) or use of conservatives (Stekelenburg, 2003 ; Stekelenburg, 2003 ; Seman *et al.*, 2002 ; Seman *et al.*, 2002 ; Mbandi et Shelef, 2002 ; McClure *et al.*, 1991). In this work, we focused on the first three in order to study the influence of several formulation scenari (pH, a_w) and heat processing regimes on the behaviour of *L. monocytogenes* during common phases of delicatessen product processes. Since the structure of the medium has been shown to have a great influence on bacterial development (Wilson *et al.*, 2002 ; Robins et Brocklehurst, 1994), we worked with ground pork, a solid medium. Indeed, Lebert et al. (2004) showed that growth of *L. innocua* is slower at the surface of a gelatine gel than in broth. This can be explained by the fact that physical properties such as viscosity and diffusivity are different (Stecchini *et al.*, 2004). Moreover, we worked at temperatures (during the heat processing regime) where a decrease of the population takes place and thermal inactivation kinetics have also been shown to be dependent on the nature of the medium (Doyle *et al.*, 2001). Nevertheless, working with solid medium is more complicated than working with broth: enumeration of bacterial population is more time-consuming and expensive and the homogeneity of pH, a_w and bacterial concentration is more difficult to obtain. Thus, we used minced meat in order to guarantee the homogeneity in the meat batter and the protocol that we used made this possible.

We first analysed the variability of our protocol by repeating the experiments in the centre of the experimental design (pH 5.6/ a_w 0.95) four times for the four processing regimes tested (the control: 24h/20°C, 4h/42°C, 1h/48°C, 1h/53°C). Variations were small, regardless of the phase, so we considered that no replicate was necessary. It must be pointed out that standard variations are calculated on the overall kinetics. Usually, the variability for lag and μ_{max} are calculated separately. Variation coefficients are about 0.17 for lag and 0.09 for μ_{max} when

experiments are carried out in broth (Begot *et al.*, 1996). In our case, we took both parameters into account and obtained a variation coefficient that was always lower than 0.20.

In the literature (McMeekin *et al.*, 1993), the experimental error is generally ± 0.5 Log CFU/g. We therefore decided that when a difference in the population between two sampling times (called Growth Capacity) was less than -1.0 Log CFU/g, a bactericidal effect was observed. When Growth Capacity was greater than or equal to -1.0 Log CFU/g and less than or equal to 1.0 Log CFU/g, it corresponded to a bacteriostatic effect of the process. Growth was considered when the Growth Capacity was higher than 1.0 Log CFU/g. During the heat process phase at 4h/42°C, 1h/48°C, 1h/53°C a bactericidal or bacteriostatic effect was always observed. Some decrease of the population was observed at 42°C, even if this temperature is lower than the maximal temperature for growth of the strain used (about 45°C). Nevertheless, this temperature was determined in broth and we can suppose that the growth in meat is an additional stress that contributes to lowering the maximal temperature for growth. For the control treatment (24h/20°C), *L. monocytogenes* growth was observed for high values of pH and a_w . Moreover, no bactericidal effect was observed, even for low pH and low a_w . When comparing the different experimental conditions within the framework of the experimental design, it is evident that the heat process is a supplementary hurdle to be considered during a process, (Leistner, 1999).

We could have obtained a greater bactericidal effect by increasing the temperature of the heat process and/or the time of application. But this option was not applicable because it would have resulted in cooked meat with unsatisfactory organoleptic qualities. Indeed, in previous experimental tests (data not shown), initial changes in meat colour were observed for heat process phases that lasted longer or that used higher temperatures. Therefore, in the range acceptable for the desired organoleptic qualities, the heat processing regime has to be combined with other hurdles in order to ensure the microbiological quality of raw delicatessen products. Since interactions between pH (or a_w) and heat processing regimes have a highly significant effect on the growth capacity during the heat process phase, it is essential to adjust pH and a_w . Beuchat *et al.* (1986, referred to by Doyle *et al.*, 2001) and Juneja *et al.*, (1999, referred to by Doyle *et al.*, 2001) found that the heat resistance of *L. monocytogenes* was reduced at low pH. For a_w , Grau and Vanderline (1993) and Yen *et al.* (1991) showed that the addition of 3% NaCl to ground pork enhanced the heat resistance of *L. monocytogenes*. The same results were observed by Passos and Kuaye (2002) in beef hamburgers with 1.5% NaCl. Our study confirms that with the increase of NaCl from 3.6% (a_w 0.97) to 8.6% (a_w 0.93), *L. monocytogenes* was more resistance to heat during the process phase. Indeed, higher Growth

Capacities were observed for 1h/53°C when a_w was equal to or lower than 0.95 and for 4h/42°C when a_w was equal to or lower than 0.94.

Immediately after the heat process phase, ground pork was stored at 20°C, a temperature that is favourable to *L. monocytogenes* growth. We showed that pH, a_w and their interactions are determining factors since low values could inhibit the increase of the bacterial population. Such interactions have already been observed by Augustin and Carlier (2000), McClure et al. (1989) and Cole et al. (1990).

To evaluate the effect of the heat process phase on the storage phase, the heat process phase was considered as a pre-history heat treatment. The influence of temperature history was previously described in relation to pre-incubation conditions and the subsequent growth of bacteria (Augustin *et al.*, 2000 ; Buchanan et Klawitter, 1991). It was found that pre-inoculation temperature affected the length of the lag phase but did not modify μ_{max} and maximum population densities. The effect of pre-treatment (such as sublethal heat shock) on the heat resistance of microorganisms was also studied by Quintavalla and Campanini (1991). They showed that heating cells of *L. monocytogenes* at increasing temperatures of 0.5°C/minute increased the heat resistance of the organism when subsequently exposed to constant temperatures. In our study, even if bacteria had incurred sublethal damage due to the heat process phase, their growth capacity was not altered since the growth capacity during storage is greater after the heat process than after the control treatment.

The global experiment was a succession of two phases: the heat process phase and the storage phase at 20°C. The growth capacity during the global experiment is influenced by pH and a_w . Given that the inoculation level was equal for all the conditions of the experimental design, it was observed that the population at the end of storage was similar, regardless of the heat process, compared to the control treatment. Therefore, even if the processing regime influenced the growth capacity of *Listeria* during the two previous phases when analysed separately, its influence was not observed in the global analysis of the process. In the literature, thermal inactivation is generally studied alone and pronounced effects are shown on the bacterial population (Juneja *et al.*, 1997 ; Gaze *et al.*, 1989). Our study shows that a single phase of the process must not be taken alone but should be included and studied within the framework of the global process whenever possible. The effect of a single operation can be minimised or emphasized by other steps of the process.

In our study, we defined an area where growth occurred ($GCt_6/t_0 > 1.0$ Log CFU/g) and an area where bactericidal or bacteriostatic effects ($GCt_6/t_0 < 1.0$ Log CFU/g) were observed.

The boundary that separates the two areas corresponds to a Growth Capacity equal to 1.0 Log CFU/g (Figure 3). The study of the boundary of the growth area of *Listeria* (identical, regardless of the heat processing regime) confirms the effect of pH, a_w and their interactions as described by Leistner (1999), Augustin and Carlier (2000) and Koutsoumanis et al. (2004). Our study showed a minimal pH for *L. monocytogenes* growth of 5.1 when a_w was 0.97 and only 6.2 when a_w was 0.93. Comparison with other data is very difficult because these limits depend on the strain used and relatively few publications consider the effect of multiple factors, especially in food model products (Wilson *et al.*, 2002 ; Roberts *et al.*, 1979).

The boundary of the growth area of *Listeria* at 20°C in ground pork is correctly predicted by our method, combining Augustin's and Rosso's models. In most of the cases, the determination of the growth/no-growth interface is based on the logit of the probability P, *i.e.*, that the organism will grow (Tienungoon *et al.*, 2000). The limit of the model is that the determination of the probability requires replicates. In their work, Tienungoon et al. (2000) carried out experiments in broth and four replicates were generally made using turbidity methods. Nevertheless, these types of methods cannot be applied to solid food. Augustin (1999) and Le Marc (2001) also developed a method for determining the boundary of the growth/no-growth areas. They defined the boundary as the environmental conditions that make it possible for a μ_{max} to be equal to 0. Our method is original because it takes both lag and μ_{max} values into account. It is particularly well adapted to industrial processes that aim at a level of contamination that is lower than a limit at the used-by-date of their product.

Comparing the growth area of *Listeria* in ground meat with the average of the values for pH and a_w measured for commercial diced bacon indicates that this product is compatible with the growth of *L. monocytogenes*. Indeed, pH measured for diced bacon ranges from 5.8 to 6.1, and a_w from 0.955 to 0.965. Nevertheless, the minimal a_w and minimal pH for growth also depend on the temperature and concentrations of inhibitors (Le Marc *et al.*, 2002 ; Cole *et al.*, 1990 ; Farber *et al.*, 1989). Thus, by reducing the storage temperature from 20°C to refrigeration temperature or by adding nitrite or organic acid salt, frequently used in delicatessen products (Durand, 1999), the boundary of the growth area will be modified and the minimal pH and minimal a_w for growth will increase.

Using the methodology developed in this study, we can predict the incidence of a decrease of the storage temperature from 20°C to 4°C on the evolution of the boundary of the growth area (Figure 3). At 20°C, we considered that the boundary for GCT_6/t_0 was equal to 1.0 Log CFU/g after seven days at 20°C (control treatment 24h/20°C + six days of storage). At 4°C, we chose the storage time on the basis of the use-by-date of commercial diced bacon: 45 days.

We therefore considered that growth took place when the increase of the population of *Listeria* was higher than 1.0 Log CFU/g in 45 days. The boundary was thus when GC_{t_{45}/t_0} was equal to 1.0 CFU/g. When temperature decreases, Figure 3 shows that minimal pH and a_w where a growth is observed increase. The area compatible with the growth of *Listeria* is thus reduced compared to the one observed when meat is stored at 20°C. pH and a_w values for diced bacon are on the boundary of the growth area. This product may result in the development of *Listeria*, even at low temperatures. Similar predictions can be made by taking other parameters into account, since Augustin's model is a cardinal one for which the influences of environmental parameters on μ_{max} and lag are multiplicative. For example, we could study the influence of additives frequently used in delicatessen products on the evolution of the boundary of the growth area. We can suppose that this area will be reduced.

Conclusion

In the industrial raw delicatessen product process, where the heat process is used to guarantee satisfactory organoleptic qualities, we have shown that treatment alone is not adequate to ensure the microbiological quality of the product. Nevertheless, a heat processing regime at sublethal temperatures can inhibit the growth of *Listeria* during this phase. According to pH and a_w , the heat process can even make it possible to reduce *L. monocytogenes* contamination, especially at 1h/53°C, but this reduction of the contamination level is not extended during the storage phase. Therefore, for the global process, pH and a_w have a highly significant effect on the area compatible with growth of *Listeria*, contrary to the heat processing regime.

The boundary of the growth area in pork meat is well predicted by the combination of Augustin's and Rosso's models. This novel method could be used by the meat industry to predict the microbial safety of its products. Indeed, in addition to temperature, pH and a_w , the effect of additives frequently found in delicatessen products and which have shown an anti-listerial effect, such as organic acids (Dubal *et al.*, 2004), phenols (Membré *et al.*, 1997), nitrite (Buchanan *et al.*, 1989), could be taken into account for determining the boundary of the growth area.

References

- Augustin, J. C. 1999, Modélisation de la dynamique de croissance des populations de *Listeria monocytogenes* dans les aliments. Thèse de docteur es sciences, Université Claude Bernard Lyon 1. 156p.
- Augustin, J. C. and Carlier, V. 2000, Modelling the growth rate of *Listeria monocytogenes* with a

multiplicative type model including interactions between environmental factors. *International Journal of Food Microbiology* 56, 53-70.

Bégot, C., Desnier, I., Daudin, J.-D., Labadie, J. C. and Lebert, A. 1996, Recommendations for calculating growth parameters by optical density measurements. *Journal of Microbiological Methods* 25, 225-232.

Bégot, C., Lebert, I. and Lebert, A. 1997, Variability of the response of 66 *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* strains to different growth conditions. *Food Microbiology* 14, 403-412.

Buchanan, R. L. and Klawitter, L. A. 1991, Effect of temperature history on the growth of *Listeria monocytogenes* Scott A at refrigeration temperature. *International Journal of Food Microbiology* 12, 235-246 .

Buchanan, R. L., Stahl, H. G. and Whiting, R. C. 1989, Effects and interactions of temperature, pH, atmosphere, sodium chloride, and sodium nitrite on the growth of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection* 52, 844-851.

Buisson, Y. and Teysou, R. 2002, Les Toxi-infections alimentaires collectives. *Revue Française Des Laboratoires* 348, 61-66.

Chawla, S. P. and Chander, R. 2004, Microbiological safety of shelf-stable meat products prepared by employing hurdle technology. *Food Control* 15, 559-563

Cole, M. B., Jones, M. V. and Holyoak, C. 1990, The effect of pH, salt concentration and temperature on the survival and growth of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Applied Bacteriology* 69, 63-72.

Conner, D. E., Brackett, R. E. and Beuchat, L. R. 1986, Effect of temperature, sodium chloride, and pH on growth of *Listeria monocytogenes* in cabbage juice. *Applied and Environmental Microbiology* 52, 59-63.

Devlieghere, F., Geeraerd, A. H., Versyck, K. J., Vandewaetere, B., Van Impe, J. and Debevere, J. 2001, Growth of *Listeria monocytogenes* in modified atmosphere packed cooked meat products : a predictive model. *Food Microbiology* 18, 53-66.

Doyle, M. E., Mazzotta, A. S., Wang, T., Wiseman, D. W. and Scott, V. N. 2001. Heat resistance of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection* 64, 410-429.

Dubal, Z. B., Paturkar, A. M., Waskar, V. S., Zende, R. J., Latha, C., Rawool, D. B. and Kadam, M. M. 2004, Effect of food grade organic acids on inoculated *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *E. coli* and *S. Typhimurium* in shepp/goat meat stored at refrigeration temperature. *Meat Science* 66, 817-821.

Durand, P. 1999, Technologie des produits de charcuterie et des salaisons, Tec & Doc (Eds), Paris, France, pp 42-103.

Farber, J. M., Sanders, G. W. and Dunfield, S. 1989, The effect of various acidulants on the growth of *Listeria monocytogenes*. *Letters in Applied Microbiology* 9, 181-183.

Farkas, J. 1998. Irradiation as a method for decontaminating food. A review, *International Journal of Food Microbiology* 44, 189-204.

Gaze, J. E., Brown, G. D., Gaskell, D. E. and Banks, J. G. 1989, Heat resistance of *Listeria monocytogenes* in homogenates of Chicken, Beef steak and Carrot. *Food Microbiology* 6, 251-259.

Grau, F. H. and Vanderline, P. B. 1993, Aerobic Growth of *Listeria monocytogenes* on Beef Lean and Fatty Tissue - Equations Describing the Effects of Temperature and pH. *Journal of Food Protection* 56, 96-101.

Haeghebaert, S., Le Querrec, F., Gallay, A., Bouvet, P., Gomez, M. and Vaillant, V. 2002, Les toxi-infections alimentaires collectives en France en 1999 et 2000. *Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire* 23, 105-109.

Juneja, V. K., Snyder, O. P. Jr and Marmer, B. S. 1997, Thermal destruction of *Escherichia coli* O157:H7 in beef and chicken: determination of D- and z-values. *International Journal of Food Microbiology* 35, 231-237.

Koutsoumanis, K., Kendall, P. and Sofos, J. 2004, A comparative study on growth limits of *Listeria monocytogenes* as affected by temperature, pH and a_w when grown in suspension or on a solid surface. *Food Microbiology* 21, 415-422.

Le Marc Y. 2001, Développement d'un modèle modulaire décrivant l'effet des interactions entre les facteurs environnementaux sur les aptitudes de croissance de *Listeria*. Thèse de docteur de l'université de Bretagne Occidentale, mention microbiologie, Université de Bretagne Occidentale. 161 p.

Le Marc, Y., Huchet, V., Bourgeois, C. M., Guyonnet, J. P., Mafart, P. and Thuault, D. 2002, Modelling the growth kinetics of *Listeria* as a function of temperature, pH and organic acid concentration. *International Journal of Food Microbiology* 73, 219-237.

Lebert, I., Dussap, C. G. and Lebert, A. 2004, Effect of $a(w)$, controlled by the addition of solutes or by water content, on the growth of *Listeria innocua* in broth and in a gelatine model. *International Journal of Food Microbiology* 94, 67-78.

Leistner, L. 1999. Combined Methods for Food Preservation, In: *Handbook of Food Preservation*, Rahman, S., New York, USA. pp 457-485

Leporq, B. 2001, Protocole de préculture pour obtenir *Listeria monocytogenes* 4b en phase stationnaire. *Compte Rendu De Réunion Du Groupe Méthodologie Sym' Previus*

Mbandi, E. and Shelef, L. A. 2002, Enhanced antimicrobial effects of combination of lactate and diacetate on *Listeria monocytogenes* and *Salmonella spp.* in beef bologna. *International Journal of Food Microbiology* 76, 191-8.

McClure, P. J., Roberts, T. A. and Oguru, O. P., 1989. Comparison of the effects of sodium chloride, pH and temperature on the growth of *Listeria monocytogenes* on gradient plates and in liquid medium. *Letters in Applied Microbiology* 9, 95-99.

McLauchlin, J. 1996, The relationship between *Listeria* and listeriosis. *Food Control* 7, 197-183.

McMeekin, T. A., Olley, J; N., Ross, T., Ratkowsky, D. A. 1993, In: *Predictive Microbiology: Theory and Application*, Research Studies Press LTD, Taunton, Somerset, England.

Membré, J. M., Thurette, J. and Catteau, M. 1997, Modelling the growth, survival and death of

Listeria monocytogenes. Journal of Applied Microbiology 82, 345-350.

Passos, M. H. C. R. and Kuaye, A. Y. 2002, Influence of the formulation, cooking time and final internal temperature of beef hamburgers on the destruction of *Listeria monocytogenes*. Food Control 13, 33-40.

Pidcock, K., Heard, G. M. and Henriksson, A. 2002, Application of nontraditional meat starter cultures in production of Hungarian salami. International Journal of Food Microbiology 76, 75-81.

Pierre, O. and Veit, P. 1996, Plan de surveillance de la contamination par *Listeria monocytogenes* des aliments distribués. Résultats des plans 1993-1994. Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire 45, 1-6.

Quintavalla, S. and Campanini, M. 1991, Effect of rising temperature on the heat resistance of *Listeria monocytogenes* in meat emulsion. Letters in Applied Microbiology 12, 184-187.

Roberts, T. A., Britton, C. R. and Shroff, M. N. 1979, The effect of pH, water activity, sodium nitrite and incubation temperature on growth of bacteria isolated from meats. Food Microbiology and Technology 57-71.

Robins, M. M., Brocklehurst, T. F. G. and Wilson, P. 1994, Food structure and the growth of pathogenic bacteria. Food Technology International 31-36.

Rosso, L., Bajard, S., Flandrois, J. P., Lahellec, C., Fournaud, J. and Veit, P. 1996, Differential growth of *Listeria monocytogenes* at 4 and 8°C : consequences for the shelf life of chilled products. Journal of Food Protection 59, 944-949.

Seman, D. L., Borger, A. C., Meyer, J. D., Hall, P. A. and Milkowski, A. L. 2002, Modeling the growth of *Listeria monocytogenes* in cured ready-to-eat processed meat products by manipulation of sodium chloride, sodium diacetate, potassium lactate, and product moisture content. Journal of Food Protection 65, 651-658.

Stecchini, M. L., Del Torre, M. and Venir, E. 2004, Growth of *Listeria monocytogenes* as influenced by viscosity and water activity. International Journal of Food Microbiology 96, 181-187.

Stekelenburg, F. K. 2003, Enhanced inhibition of *Listeria monocytogenes* in Frankfurter sausage by the addition of potassium lactate and sodium diacetate mixtures. Food Microbiology 20, 133-137.

Tienungoon, S., Ratkowsky, D. A., McMeekin, T. A. and Ross, T. 2000, Growth limits of *Listeria monocytogenes* as a function of temperature, pH, NaCl, and lactic acid. Applied and Environmental Microbiology 66, 4979-87.

Uyttendaele, M., De Troy, P. and Debevere, J. 1999, Incidence of *Listeria monocytogenes* in different types of meat products on the Belgian retail market. International Journal of Food Microbiology 53, 75-80.

Wilson, P. D., Brocklehurst, T. F., Arino, S., Thuault, D., Jakobsen, M., Lange, M., Farkas, J., Wimpenny, J. W. and Van Impe, J. F. 2002, Modelling microbial growth in structured foods: towards a unified approach. International Journal of Food Microbiology 73, 275-89.

Yen, L. C., Sofos, J. N. and Schmidt, G. R. 1991, Effect of Meat Curing Ingredients on Thermal Destruction of *Listeria monocytogenes* in Ground Pork. Journal of Food Protection 54, 408-412.

Table 1: experimental variations (four replicates) of the Growth Capacity, GC (Log CFU/g), as a function of the phase and the heat processing regime (including control treatment) studied. GC_{t_1/t_0} = GC during heat process phase, GC_{t_6/t_1} = GC during storage phase, GC_{t_6/t_0} = GC during global experiment.

Table 2: Growth Capacity for *Listeria* in ground pork during heat process phase (GC_{t_1/t_0}) as a function of a_w , pH and heat processing regime (including control treatment), with $N_0=10^5$ CFU/g.

boldface: $GC_{t_1/t_0} > 1.0 \text{ Log CFU/g}$

italics: $GC_{t_1/t_0} < -1.0 \text{ Log CFU/g}$

other: $-1.0 \text{ Log CFU/g} \leq GC_{t_1/t_0} \leq 1.0 \text{ Log CFU/g}$

Table 3: ANOVA, effect of heat processing regimes (including control treatment), pH, a_w and their interactions on the GC_{t_1/t_0} .

No significant effect: $P > 0.05$

Significant effect: $0.01 < P \leq 0.05$

Very significant effect: $0.001 < P \leq 0.01$

Highly significant effect: $P \leq 0.001$

Table 4: Growth Capacity of *Listeria* at 20°C in ground pork during the global experiment (GC_{t_6/t_0}) as a function of a_w , pH and heat processing regime (including control treatment), with $N_0=10^5$ CFU/g

boldface: $GC_{t_1/t_0} > 1.0 \text{ Log CFU/g}$

other: $-1.0 \text{ Log CFU/g} \leq GC_{t_1/t_0} \leq 1.0 \text{ Log CFU/g}$

Table 5: ANOVA, effect of heat processing regimes (including control treatment), pH, a_w and their interactions on the GC_{t_6/t_0}

No significant effect: $P > 0.05$

Significant effect: $0.01 < P \leq 0.05$

Very significant effect: $0.001 < P \leq 0.01$

Highly significant effect: $P \leq 0.001$

Table 1

heat processing regime		24h/20°C	4h/42°C	1h/48°C	1h/53°C
GCt ₁ /t ₀	mean	0.1	-0.8	-0.6	-0.9
	standard deviation	0.01	0.14	0.12	0.10
GCt ₆ /t ₁	mean	2.8	3.5	3.3	3.3
	standard deviation	0.19	0.15	0.18	0.15
GCt ₆ /t ₀	mean	2.9	2.7	2.7	2.4
	standard deviation	0.19	0.08	0.17	0.11

Table 2

a _w	pH	control	heat processing regime		
		24h/20°C	4h/42°C	1h/48°C	1h/53°C
0.97	5.0	0.1	-0.1	-0.1	-0.6
	5.3	0.3	-0.3	-0.5	-1.1
	5.6	0.5	-0.4	-0.8	-0.9
	5.9	1.8	-0.6	-0.5	-1.3
	6.2	2.6	0.0	-0.7	-1.3
0.96	5.1	-0.1	-0.2	-0.4	-0.3
	5.3	-0.1	-0.4	-0.4	-0.5
	5.6	0.9	-0.2	-0.7	-0.8
	5.9	0.9	-0.2	-0.3	-1.1
	6.2	1.7	-0.1	-0.6	-0.9
0.95	5.0	0.5	-0.1	-0.3	0.1
	5.3	-0.2	-0.5	-0.1	-0.5
	5.6	0.1	-0.9	-0.7	-1.0
	5.9	0.5	-0.8	-0.7	-1.2
	6.2	0.1	-1.1	-0.4	-1.7
0.94	5.0	-0.4	-0.2	-0.2	-0.1
	5.3	-0.2	-0.8	-0.1	-0.5
	5.6	-0.1	-0.3	-0.5	-0.7
	5.9	-0.2	-0.8	-0.5	-0.7
	6.2	-0.3	-1.9	-0.7	-0.3
0.93	5.0	-0.2	-0.3	-0.2	-0.2
	5.3	-0.1	-0.5	-0.3	-0.4
	5.6	-0.1	-0.6	-0.3	-0.2
	5.9	-0.6	-0.9	-0.1	-0.6
	6.2	-0.3	-0.7	-0.3	-1.7

Table 3

Parameter	SS	df	MS	F-value	P
Intercept	12.35	1	12.35	95.71	0.000
Heat processing regime	14.79	3	4.93	38.20	0.000
a_w	1.54	4	0.38	2.98	0.028
pH	0.94	4	0.24	1.82	0.140
Heat processing regime * a_w	7.57	12	0.63	4.89	0.000
Heat processing regime * pH	5.64	12	0.47	3.64	0.000
a_w * pH	3.38	16	0.21	1.64	0.094
Error	6.19	48	0.13		

with SS for sums of the squares, df for degree of freedom, MS for mean squares, F for Fisher and P for probability

Table 4

a_w	pH	heat processing regime			
		control 24h/20°C	4h/42°C	1h/48°C	1h/53°C
0.97	5.0	2.5	3.0	3.1	2.7
	5.3	3.3	3.0	3.5	3.0
	5.6	3.2	3.1	3.3	3.1
	5.9	3.3	3.1	3.4	3.1
	6.2	3.4	3.1	3.5	3.0
0.96	5.1	1.3	1.8	0.3	1.2
	5.3	2.2	2.8	2.5	3.2
	5.6	2.8	2.8	2.9	3.2
	5.9	2.9	2.6	2.9	2.9
	6.2	2.9	2.5	3.0	3.1
0.95	5.0	2.9	0.3	0.4	-0.9
	5.3	1.5	2.7	2.8	2.7
	5.6	2.7	2.8	2.8	2.5
	5.9	3.0	2.9	2.9	2.4
	6.2	2.8	3.0	3.0	2.4
0.94	5.0	-0.2	-0.2	-0.3	-0.4
	5.3	-0.4	0.2	-0.2	-0.1
	5.6	0.9	1.8	1.7	1.9
	5.9	2.2	2.4	2.8	2.9
	6.2	2.4	2.4	2.8	2.9
0.93	5.0	-0.3	-0.5	-0.5	-0.2
	5.3	-0.3	-0.7	-0.4	-0.4
	5.6	-0.6	-0.6	-0.3	-0.5
	5.9	-0.6	0.7	0.0	0.5
	6.2	0.4	1.2	2.0	2.2

Table 5

Parameter	SS	df	MS	F-value	P
Intercept	491.95	1	491.95	2487.61	0.000
Heat processing regime	20.15	3	6.72	33.96	0.000
a_w	101.71	4	25.43	128.58	0.000
pH	50.00	4	11.75	59.40	0.000
Heat processing regime * a_w	5.10	12	0.42	2.15	0.031
Heat processing regime * pH	10.60	12	0.88	4.47	0.000
a_w * pH	35.62	16	2.23	11.26	0.000
Error	9.49	48	0.20		

with SS for sums of the squares, df for degree of freedom, MS for mean squares, F for Fisher and P for probability

Figure 1: kinetics of *L. monocytogenes* in ground pork ($N_0=10^5$ CFU/g)

(a) pH 5.0, heat processing regime 4h/42°C: ——— 0.97, - - - - 0.96, - - - - - 0.95, - - - - - 0.94, - - - - - 0.93, ■ experimental data

(b) a_w 0.96, control treatment 24h/20°C: ——— 6.2, - - - - 5.9, - - - - - 5.6, - - - - - 5.3, - - - - - 5.0, ■ experimental data

Figure 2: means of the GC for the 25 conditions (pH/ a_w) studied as a function of heat processing regime (including control treatment)

■ GC_{t1/t0} (heat process phase); ■ GC_{t6/t1} (storage phase); ■ GC_{t6/t0} (global experiment)

Figure 3: comparison of GC_{t6/t0} with predicted boundary (GC = 1.0 Log CFU/g) of the growth/no-growth areas at 20°C in ground pork for *L. monocytogenes* as a function of a_w and pH

■ growth (GC_{t6/t0} > 1.0 Log CFU/g), □ no growth (GC_{t6/t0} < 1.0 Log CFU/g)

——— predicted boundary at 4 °C (GC_{t45/t0} = 1.0 Log CFU/g)

- - - - predicted boundary at 20°C (GC_{t6/t0} = 1.0 Log CFU/g)

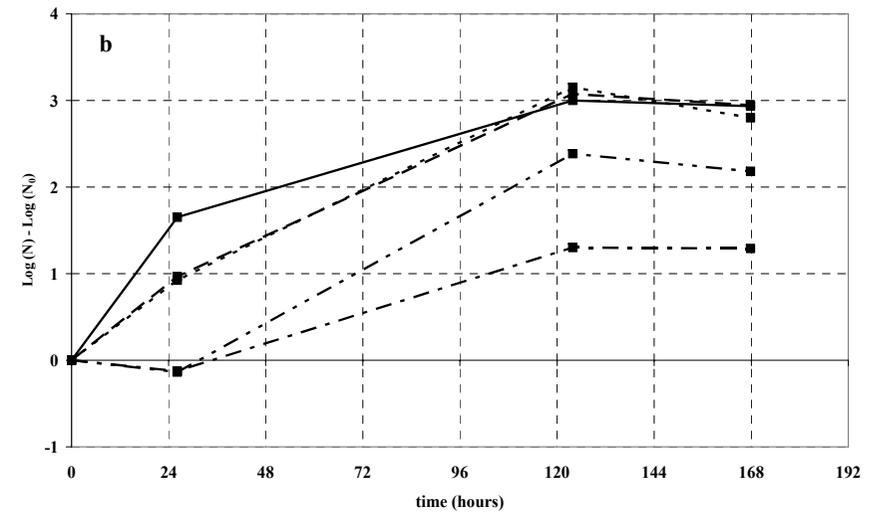
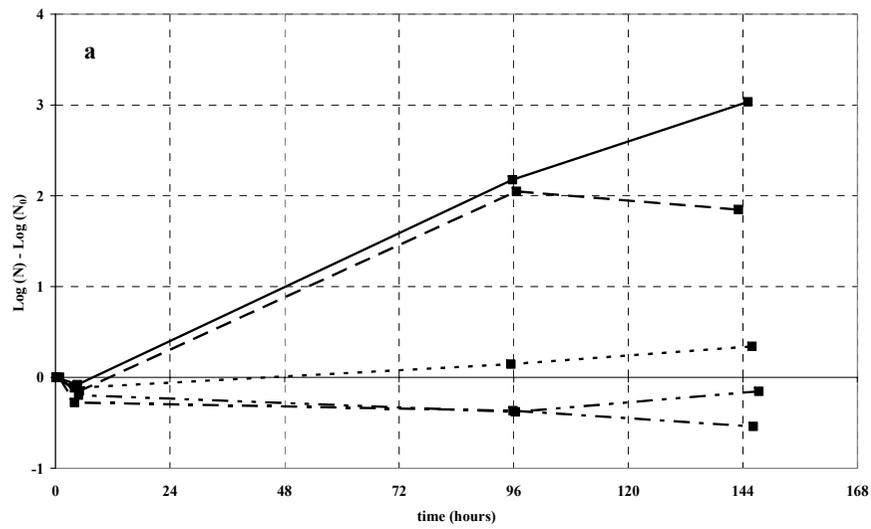


Figure 1

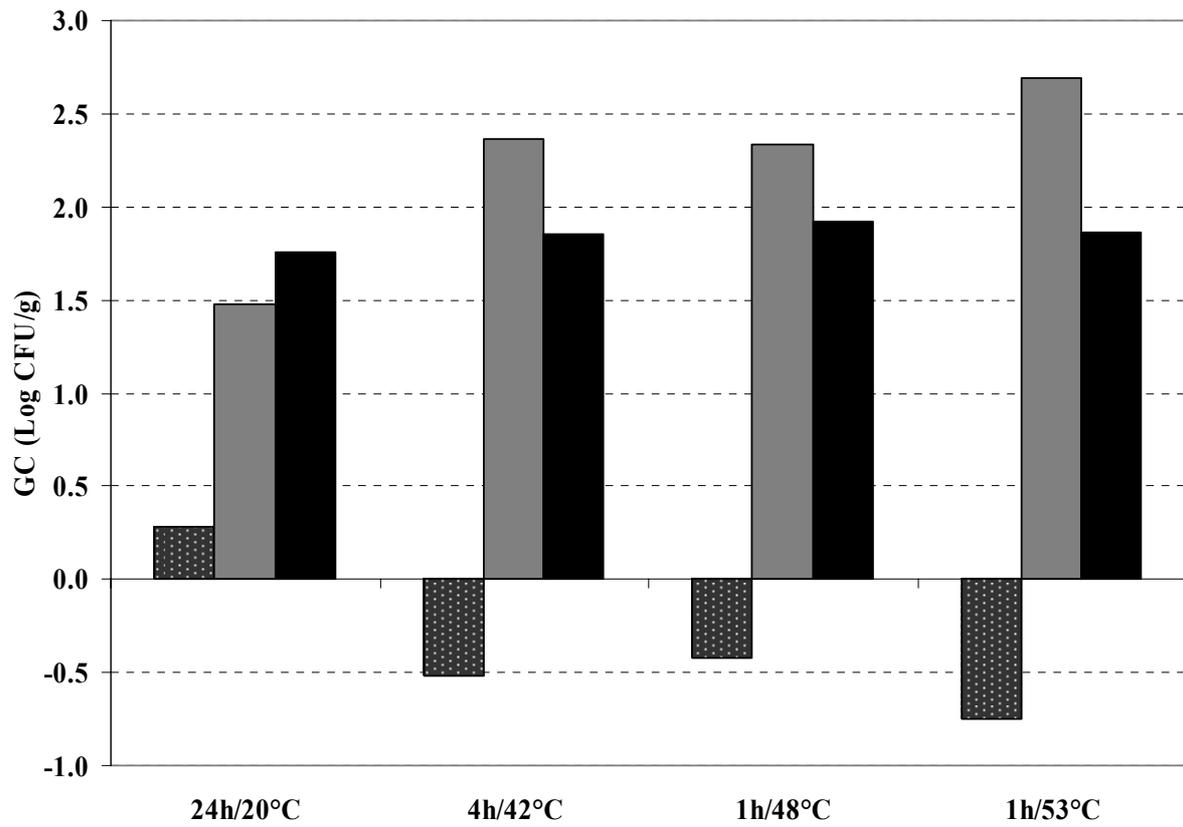


Figure 2

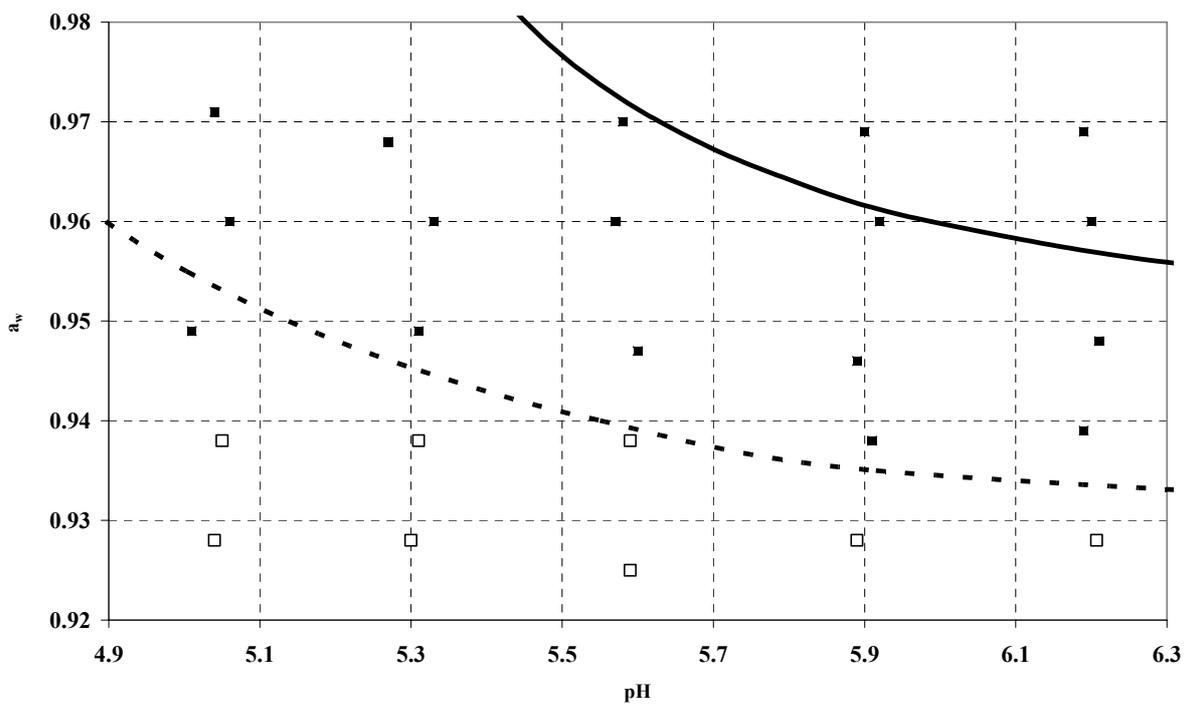
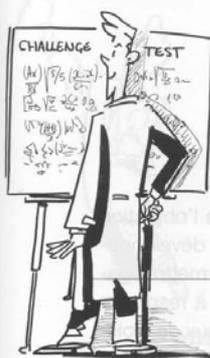


Figure 3



TRAVAUX EN COURS

La microbiologie prévisionnelle : un outil pour l'optimisation de la formulation et du procédé

VÉRONIQUE ZULIANI, CTSCCV

LA MAÎTRISE DES RISQUES MICROBIOLOGIQUES

Produire un aliment en respectant les exigences de sécurité alimentaire, de durée de vie, les normes microbiologiques et en répondant au goût du consommateur est un exercice complexe que les professionnels de l'agroalimentaire doivent réaliser. En effet, les consommateurs souhaitent des aliments sains et naturels subissant moins de traitements thermiques (maintien des qualités nutritionnelles) et chimiques (moins de sels, d'acides ou de conservateurs) qui auraient pour conséquence une diminution des barrières antimicrobiennes. L'aliment peut alors devenir un milieu favorable au développement bactérien entraînant une diminution de la durée de vie du produit ou une augmentation des risques pour la santé humaine.

En effet, lorsque l'une des barrières antimicrobiennes est amoindrie, une ou plusieurs autres barrières doivent pouvoir être mises en place pour obtenir un aliment dont la stabilité est similaire (Leistner, 1999). Par exemple, la diminution de la quantité de sel(s) doit pouvoir être remplacée par une diminution de la température de conservation ou l'adjonction d'acide ou de conservateur.

Tester chaque cas étant matériellement difficile (la réalisation systématique de test de vieillissement est longue et onéreuse), il est recommandé, dans un premier temps (au stade de la conception de la formulation) d'utiliser les modèles mathématiques développés en microbiologie prévisionnelle. Ces derniers décrivent dans des aliments "modèles" les effets de la température, du pH, de l'activité de l'eau (a_w) et d'autres paramètres environnementaux, sur le taux de croissance d'un micro-organisme, ou bien sur le temps nécessaire pour atteindre un nombre donné de bactéries ou une production de métabolites. Ils peuvent être appliqués à la prévision de la qualité microbiologique et

de la durée de vie des produits, à l'optimisation des procédés de fabrication et de leur contrôle ou en analyse des risques (McMeekin et Ross, 1996).

La validation de tels modèles se fait ensuite à l'aide de challenge tests, par ré-ensemencement dirigé dans le vrai produit (test de croissance de phase I ou II selon les critères de l'Afssa du 29 octobre 2001). Cette validation est faite notamment lorsque les formulations sont ajustées au plus près des conditions limites pour lesquelles la croissance est prévue ou serait possible.

OUTILS ET APPLICATIONS AU CTSCCV

Conscient des nombreuses applications de la microbiologie prévisionnelle, de ses retombées économiques (par exemple en accélérant le temps de développement d'une recette et en baissant ainsi son coût), le CTSCCV s'est impliqué dans différents programmes de recherches sur ce sujet.

En effet, le CTSCCV fait partie du comité technique de **Sym'PREVIUS** dont l'objectif est de produire un système de documentation et de prévision du comportement des micro-organismes dans les aliments à l'usage des professionnels. Ce programme, démarré à la fin de l'année 1999, dispose de l'appui des pouvoirs publics (Ministères de la Recherche et de l'Agriculture), d'organismes et d'entreprises (Bongrain, Danone, Pernod Ricard, Fromageries Bel) et de laboratoires et centres techniques (ADRIA, Aérial, Arilait, CTSCCV, INRA/INAPG, ENVA, IP Lille) représentées par leurs associations professionnelles (ACTIA, UNIR). Par ailleurs, le CTSCCV a initié un **programme de recherche** (thèse en partenariat avec l'équipe Génie des Procédés de l'Unité de Recherches sur la Viande de l'INRA de Clermont Ferrand/Theix) **visant à modéliser les conditions de survie et de décroissance de *Listeria monocytogenes* dans la viande de porc traitée en salaison**. Ce

La microbiologie prévisionnelle : un outil pour l'optimisation de la formulation et du procédé

travail a pour objectif d'ajuster le modèle d'Augustin (Augustin, 1999) et de le valider (notamment aux conditions limites) en vérifiant que ses prévisions sont proches des résultats expérimentaux obtenus dans un "aliment modèle". Dans cette étude, il s'agit de viande de porc crue, traitée en salaison.

Ce projet se divise en 3 étapes :

Première étape : Elle consiste à étudier l'influence des conditions d'étuvage ainsi que du pH et de l' a_w sur le développement de *Listeria monocytogenes*. Les "zones à risques" du produit par rapport à différents procédés (quatre procédés d'étuvage) ou formulations (cinq niveaux de pH / cinq niveaux d' a_w) seront étudiés.

Deuxième étape : Le principal objectif de cette étape est d'analyser comment l'ajout d'un acide organique limite ou inhibe la croissance de *Listeria monocytogenes*. Il s'agit d'augmenter la marge de sécurité des professionnels de la charcuterie-salaison en leur donnant une relative souplesse au niveau des conditions d' a_w et de pH, tout en garantissant un produit microbiologiquement sain. L'influence de la nature de l'acide, de sa concentration et l'action simultanée de deux acides seront étudiés.

Les deux premières étapes de l'étude sont réalisées sur un modèle de viande hachée.

Troisième étape : Son but est d'étudier l'influence de la taille des cubes de viande et du malaxage sous vide pour se rapprocher des conditions réelles existant pour des pièces telles que les poitrines destinées à la fabrication de lardons.

À la suite du travail de validation du modèle d'Augustin, un outil informatique sera réalisé. Il permettra de simuler le développement de *Listeria monocytogenes* en fonction de différents scénarios de formulation (pH, a_w , lactate ou acétate de sodium,...) et de procédés (température de conservation, conditions d'étuvage). Il sera alors une aide non négligeable à la détermination de la durée de vie des produits de salaison en évaluant en fonction de la contamination initiale de l'aliment, le temps nécessaire pour atteindre une concentration bactérienne.

Par ailleurs, ce nouvel outil trouvera également son application en analyse des risques alimentaires. En effet, il pourra être utilisé lors de l'identification des

points critiques de contrôle (CCP) via l'obtention d'informations sur les cinétiques de développement de *Listeria monocytogenes*. Il permettra également de définir les limites critiques à respecter pour chaque CCP (en déterminant le taux de croissance de *Listeria monocytogenes* en fonction des paramètres environnementaux). Enfin, son utilisation pourra faciliter la mise en place d'actions correctives en cas de déviations identifiées au cours de la surveillance des CCP et permettra de vérifier le bon fonctionnement du système HACCP.

La microbiologie prévisionnelle est une "science" interdisciplinaire (génie des procédés, microbiologie, mathématiques,...) qui évolue continuellement afin d'enrichir les modèles (en prenant mieux en compte la complexité de composition des matrices alimentaires) et d'améliorer la qualité des prévisions. L'information qu'elle apporte est à l'heure actuelle très riche ; cependant, son utilisation sans discernement peut conduire à des erreurs d'interprétations des résultats. Elle nécessite donc d'être exploitée avec l'aide des techniciens du CTSCCV.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- AFSSA, Avis du 29 octobre 2001 relatif à la classification des aliments selon le danger représenté par *Listeria monocytogenes*
- J.C. AUGUSTIN, Modélisation de la dynamique de croissance des populations de *Listeria monocytogenes* dans les aliments. Université Claude Bernard Lyon, 1999.
- L. LEISTNER, Combined Methods for Food Preservation. In Handbook of Food Preservation, New-York, ed. S. Rahman, 1999, p. 457-485.
- T.A. MCMEEKIN et T. ROSS, T. Modeling applications. Journal of Food Protection, 1996, p. 37-42.

ABRÉVIATIONS

ACTIA : Association de Coordination Technique pour l'Industrie Agroalimentaire
ADRIA : Association pour le Développement et la Recherche appliquée aux Industries Agricoles et alimentaires
UNIR : Ultra propre Nutrition Industrie Recherche
INRA/INAPG : Institut National de la Recherche Agronomique / Institut National d'Agronomie Paris Grignon
IP Lille : Institut Pasteur Lille
ENVA : École Nationale Vétérinaire d'Alfort

DOSSIER

Les germes pathogènes dans l'industrie agro-alimentaire

Bactéries, champignons, parasites, virus : quels sont les micro-organismes pathogènes auxquels doit faire face l'industrie agroalimentaire ? Les auteurs de cet article dressent la liste des germes impliqués dans les toxi-infections ou les intoxications alimentaires.

Par
**Véronique
Zuliani et
Pascal
Garry,**

Centre
Technique de la
Salaison, de la
Charcuterie et
des Conserves
de Viandes
(CTSCCV)

Nos aliments sont rarement stériles. Ils contiennent habituellement des micro-organismes qui pour la plupart sont inoffensifs, certains d'entre eux sont même essentiels au développement de la saveur. C'est le cas pour de nombreux produits de charcuterie / salaison (saucisson, saucisses...), laitiers (fromages, yaourt) ou végétaux (pain, choucroute, bière, vins) pour lesquels la flore microbienne est dite positive.

En revanche, d'autres micro-organismes peuvent avoir un effet négatif sur un aliment. On distingue les micro-organismes d'altérations qui peuvent être à l'origine de dégradations organoleptiques ou nutritionnelles (fermentations ou développement d'arômes indésirables) et entraînent une diminution de la durée de vie des aliments, des micro-

organismes pathogènes qui prolifèrent ou libèrent des toxines en causant ainsi des infections ou des intoxications après ingestion par le consommateur. Parmi les micro-organismes pathogènes, on compte des bactéries, des champignons, des parasites et des virus.

En 2001, en France, 6 800 cas de toxi-infections alimentaires collectives ont été dénombrés (5). Véritable problème de santé publique, ces infections sont également responsables de lourdes pertes économiques (retrait ou destruction de produits). Pour les professionnels, il est donc essentiel de connaître les sources de contamination possibles et les germes dont le développement est potentiellement adapté au produit et à son procédé.

Source de contamination par des pathogènes et développement des micro-organismes dans les aliments.

Les germes pathogènes ubiquitaires, c'est-à-dire présents et véhiculés par l'eau ou le sol, sont à l'origine de contamination primaire des matières premières alimentaires. *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia* ou *Listeria* sont les germes pathogènes les plus fréquemment isolés d'échantillons d'eau ou de sol. Par la suite, lorsque les matières premières sont transformées, elles sont susceptibles d'être contaminées par d'autres micro-organismes présents, même à faible concentration, dans l'usine. Cette niche écologique évolue en fonction de l'environnement de l'usine (air, surface, matériels, personnels...) et des processus technologiques conduisant au produit fini (2). Dans l'usine les risques de contamination peuvent être réduits en optimisant sa conception et en appliquant des règles d'hygiène appropriées (nettoyage, désinfection...). Les processus technologiques sont à l'origine de la sélection de la flore psychrotrophe (*Listeria*, *Escherichia*, *Yersinia*, *Aeromonas*) pour les aliments réfrigérés ou de sporulés (*Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus*) pour les

Organismes	T (°C)	pH	a _w
<i>Aspergillus flavus</i>	6 - 45	1,5/3,5 - 8/11	> 0,78
<i>Bacillus cereus</i>	10 - 49	4,9 - 9,3	> 0,93
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	12,8 - 40	5 - 9,6	> 0,94
<i>Escherichia coli</i>	2,5 - 45	4,6 - 9,5	> 0,94
<i>Campylobacter jejuni</i>	25 - 42	5,5 - 8	NR
<i>Yersinia enterocolitica</i>	1 - 44	4,4 - 9	NR
<i>Listeria monocytogenes</i>	2 - 45	4,8 - 9,6	> 0,95
<i>Aeromonas hydrophila</i>	0 - 45	4,5 - ?	> 0,96
<i>Salmonella spp.</i>	6,5 - 47	4,5 - ?	> 0,95
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	12,8 - 40	5 - 9,6	> 0,94
<i>Shigella spp.</i>	> 8 - < 45	? - 9-11	NR
<i>Staphylococcus aureus</i>	7 - 45	2,6 - 10	> 0,86
<i>Clostridium perfringens</i>	6 - 52	5,5 - 8	> 0,93
<i>Clostridium botulinum</i>			
A & B	10 - 50	4,7 - 9	> 0,93
Non proteolitique	5 - ?	4,7 - 9	NR
E	3,3 - 15-30	4,7 - 9	> 0,95
F	4 - ?	4,7 - 9	> 0,97

Tableau 1 : Valeurs minimales et maximales de température, pH et a_w de germes pathogènes (5-7-12).

DOSSIER

aliments ayant subi un traitement par la chaleur. Les micro-organismes sont également sensibles à nombres de modifications physico-chimiques appliquées à la matière première. Outre la température, le pH, l'activité de l'eau (a_w) ou le potentiel d'oxydoréduction peuvent évoluer et favoriser la colonisation préférentielle par un micro-organisme pathogène particulièrement adapté à ce nouvel environnement (Tableau 1).

Dans le cas particulier des abattoirs, la contamination des carcasses est souvent causée par des germes présents sur la peau, les plumes (*Staphylococcus*, *Listeria*) ou dans le tube digestif et les muqueuses (*Campylobacter*, *Yersinia*, *Shigella*, *Salmonella*, *Escherichia*) des animaux (8).

Les principaux germes impliqués dans les toxi-infections ou les intoxications alimentaires et les aliments associés.

Les toxi-infections alimentaires sont des maladies contractées en consommant des aliments dans lesquels les germes pathogènes présents se sont par la suite multipliés dans le contenu intestinal. Les intoxications sont provoquées par l'ingestion d'aliments contenant une ou des toxines, produites par des micro-organismes pathogènes.

Des bactéries souvent associés à des aliments particuliers

Parmi les bactéries pathogènes, on distingue celles responsables de la majeure partie des infections alimentaires de celles responsables de cas sporadiques (12) (Tableau 2). Cependant du point de vue de la gravité de la pathologie, la hiérarchie est totalement différente. En effet, en 2001, *Listeria monocytogenes* a été responsable en France de 187 cas signalés d'infection alimentaire (5), ce qui représente moins de 4 % des infections alimentaires totales, cependant du fait de son fort taux de mortalité (décès de 20 à 30 % des personnes contaminées principalement immunodéprimées (9), la listériose est une maladie à déclaration obligatoire depuis 1998 (4). A contrario, 1726 personnes ont contracté une salmonellose en France en 2001 (5), cependant une mortalité inférieure à 1 % a été observée. Les bactéries à l'origine des infections ou intoxications sont souvent associées à des aliments particuliers du fait de leurs caractéristiques physico-chimiques, de leurs conditionnements ou des températures de conservation... (Tableau 3).

Les salmonelles

Les salmonelles sont des bactéries Gram -, anaérobie facultatif. La salmonellose est la Toxi-Infection Alimentaire Collective (TIAC) la plus fréquente en France en 2001 (64 % des TIAC) (5). Les principaux sérotypes impliqués dans les TIAC sont *Enteritidis* et *Typhimurium* (7).

Il existe des porteurs sains de Salmonelles qui hébergent dans leur tractus digestif ces bactéries de manière transitoire ou permanente. Ils sont susceptibles d'être à l'origine de contamination des aliments au cours de la transformation des produits.

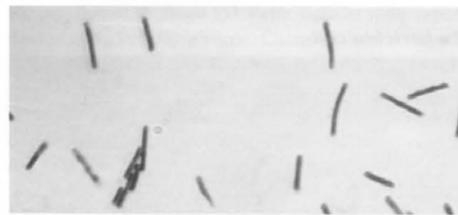
Bactéries impliquées majoritairement dans les toxi-infections ou les intoxications alimentaires	Bactéries responsables de cas sporadiques dans les toxi-infections ou les intoxications alimentaires
<i>Salmonella</i> spp. <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Clostridium perfringens</i> <i>Bacillus cereus</i>	<i>Clostridium botulinum</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Campylobacter jejuni</i> <i>Listeria monocytogenes</i> <i>Yersinia enterocolitica</i> <i>Aeromonas hydrophila</i> <i>Shigella</i> <i>Vibrio parahaemolyticus</i>

Tableau 2 : principales bactéries pathogènes responsables d'infections ou d'intoxications alimentaires (2-5-10).

Bactéries impliquées dans les toxi-infections ou les intoxications alimentaires	Principaux aliments associés
<i>Salmonella</i> spp.	Œufs, produits à base d'œufs, viande crue
<i>Staphylococcus aureus</i>	Lait, produits laitiers, viande, œufs, produits à base d'œufs, charcuterie, volaille, poisson, fruits de mer
<i>Clostridium perfringens</i>	Viande, volaille, poisson, fruits de mer
<i>Bacillus cereus</i>	Lait cru, viande, végétaux
<i>Clostridium botulinum</i>	Aliments en conserve, jambon cru, miel
<i>Escherichia coli</i>	Viandes, lait cru, steaks hachés
<i>Campylobacter jejuni</i>	Lait cru, viande, volailles
<i>Listeria monocytogenes</i>	Lait cru, fromage à pâte molle, glace, poisson fumés, légumes crus, charcuterie
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Lait cru, glace, végétaux, porc cru
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Fruits de mer, viande rouge, volaille, lait cru
<i>Shigella</i>	Légumes crus, fruits crus, lait, (steaks hachés ?)
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Fruits de mer, poissons, viande

Tableau 3 : bactéries identifiées et aliments associés (2-5).

Clostridium perfringens

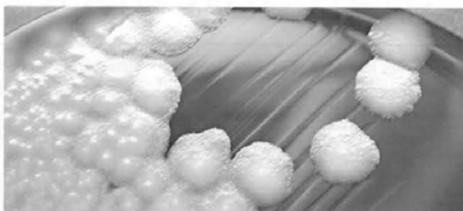


Clostridium perfringens est un germe sporulé à Gram +, anaérobie. Il a été identifié comme agent responsable de 2,9 % des TIAC en 2001, en France (5). Très résistante à la chaleur sous la forme de spores, la bactérie

DOSSIER

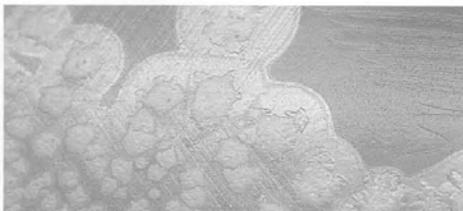
peut se développer rapidement lorsque les aliments sont maintenus trop longtemps à température ambiante.

Bacillus cereus



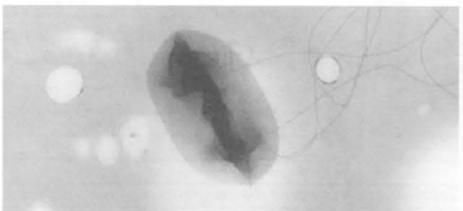
Bacillus cereus, sporulé à Gram + est normalement aérobie mais aussi anaérobie facultatif. Il a été responsable de 2,9 % des TIAC en 2001 en France (5). Les toxines (émétique ou diarrhéique) peuvent être produites dans les aliments ou lors de la multiplication cellulaire de la bactérie dans le tube digestif. L'enterotoxine diarrhéique est thermolabile (5 min à 56°C). En revanche la toxine émétique peut résister 90 min à 120°C (10).

Clostridium botulinum



Cette bactérie, sporulée à Gram +, anaérobie, provoque une intoxication, le botulisme. Cette intoxication a une dose infective faible, de l'ordre de 0,2 µg (10). Très résistante à la chaleur sous la forme de spores, les bactéries peuvent se développer lorsque les conditions sont plus favorables. La toxine peut être facilement détruite par la chaleur.

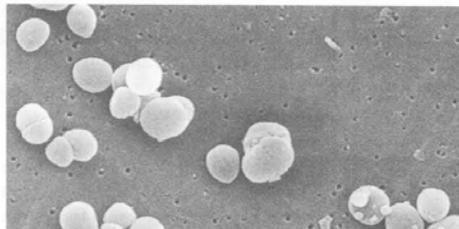
Escherichia coli



C'est une bactérie Gram -, anaérobie facultatif. Les pathologies les plus graves sont rencontrées avec les *Esche-*

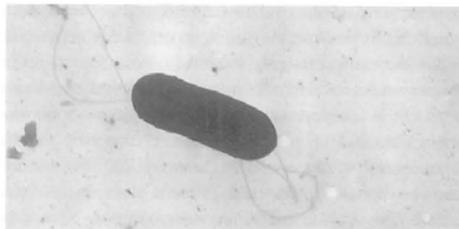
richia coli entérohémorragiques dont le chef de file est *Escherichia coli* 0157:H7 (3). Elles produisent de puissantes toxines appelées "vérotoxines" responsables des pathologies. En France, l'origine alimentaire des ces maladies n'est pas vérifiée (avec *Escherichia coli* 0157:H7, cette bactérie a été cependant mise en cause dans des épidémies d'origine alimentaire aux Etats-Unis, au Canada ainsi qu'en Ecosse et au Japon (7).

Staphylococcus aureus

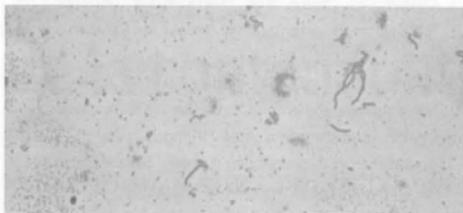


Cette bactérie, Gram +, est une anaérobie facultatif responsable d'intoxication par ingestion d'une enterotoxine (13). Cette toxine est détruite par la chaleur (supérieure à 60°C) ou le froid (inférieure à 7°C), sa dose infectieuse est très faible, de l'ordre de 1 ng (10). En 2001, *Staphylococcus aureus* a été à l'origine, en France, de 15,8 % des TIAC (5). Il existe des porteurs sains de *Staphylococcus aureus*. Le portage dans la gorge et les fosses nasales de cette bactérie concerne 30 à 40 % de la population (3).

Listeria monocytogenes



Listeria monocytogenes est une bactérie aérobie/microaérophile à Gram +. Son incidence en France est faible (environ 4,4 cas par million d'habitants) néanmoins sa dose infectieuse est basse chez les personnes immunodéprimées (femmes enceintes, personnes ayant une maladie ou un traitement entraînant une diminution de l'immunité). C'est une bactérie psychrotrophe qui peut se multiplier dans les aliments, en particulier à basse température lorsque les systèmes de réfrigération sont mal contrôlés (9).

Yersinia enterocolitica

C'est une bactérie anaérobie facultatif à Gram-. Le pouvoir pathogène de certaines de ces souches est dû à la production d'une enterotoxine thermostable et/ou au caractère invasif pour les cellules intestinales (7). Son émergence récente est liée à l'utilisation large de la réfrigération domestique, la consommation de légumes crus et le développement de l'alimentation collective (2). Cependant, en France, l'infection humaine reste sporadique.

Campylobacter jejuni

Campylobacter jejuni est une bactérie Gram -, microaéroophile, qui produit deux types de toxine (entero- ou cytotoxine). La bactérie survie mais se développe mal dans les aliments (7). Elle est peu abondante en France, mais dans certains pays comme l'Angleterre, la fréquence de la campylobactériose dépasse largement celle de la salmonellose (38 991 cas contre 13 775 en 2003) (6).

Aeromonas hydrophila

C'est une bactérie anaérobie facultatif à Gram - (10). Elle se développe aux températures de réfrigération et produit deux toxines. Les malades sont souvent des patients immunodéprimés.

Shigella

C'est une bactérie Gram -, anaérobie facultatif. Dotée de propriété invasive en particulier pour les cellules épithéliales de l'intestin (14), son pouvoir pathogène est également lié à la production d'une endotoxine, la Shiga toxine.

Vibrio parahaemolyticus

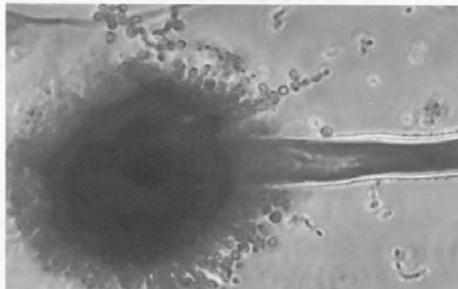
Vibrio parahaemolyticus est une bactérie anaérobie facultatif, Gram -. Le mécanisme de toxicité de la bactérie n'est pas clairement identifié. Cependant, l'implication d'une enterotoxine est acceptée de même que le rôle de deux hémolysines thermostables (10).

Cette liste de bactéries associées à des infections ou intoxications n'est bien entendu pas exhaustive. Très exceptionnellement en France, mais parfois plus courante dans des pays présentant d'autres coutumes alimentaires, des bactéries du genre *Brucella*, *Pseudomonas cocovenenans*,

Pleisiomonas... peuvent être à l'origine de maladies dues à la consommation d'aliments.

Les champignons : pas de réels dangers

Les champignons filamenteux peuvent être des organismes toxigènes, psychrotrophes, supportant des a_w faibles et des pressions osmotiques élevées. Cependant, la diversification de notre alimentation empêche l'absorption régulière de doses suffisantes de toxines pour être réellement dangereuses (2). Le risque majeur émane de la présence éventuelle de la toxine " patuline " sécrétée par *Aspergillus clavatus* ou *Penicillium expansum* dans les pommes de terre altérées ou les jus de fruits.



La présence d'aflatoxines sécrétées surtout par *Aspergillus flavus* (photo ci-dessus) peut être mise en évidence sur les graines d'oléagineux ou dans les tourteaux.

Citons enfin les ochratoxines sécrétées par *Aspergillus ochraceus* et *Penicillium viridicatum*, espèces communes sur le maïs, la citrine produite par *Penicillium citrinum* fréquent sur l'orge et le riz moisiss et la citréoviridine élaborée par *Penicillium citreo-viride*, moisissure du riz (Japon) (7).

Les parasites

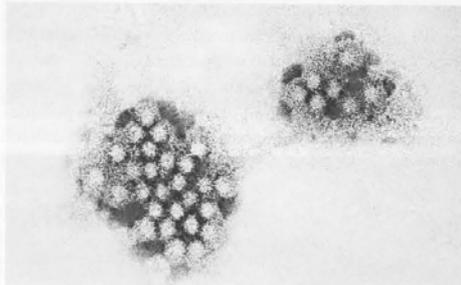
Les infections parasitaires les plus fréquentes en France sont celles causées par l'ingestion de viande de bœuf infestée par *Taenia saginata* (3). Cette maladie reste cependant majoritairement bénigne. Citons également *Taenia solium*, véhiculé par la viande de porc ou *Toxoplasma gondii* (1) pouvant souiller la viande et les végétaux. Des épidémies causées par la consommation de viande (porc, cheval, bœuf...) infestée par *Trichinella spiralis* ont été recensées en Indonésie et en Thaïlande.

Les virus : l'hygiène en cause

Les virus figurent parmi les principaux agents de maladies d'origines alimentaires (12). Les virus se transmettent à l'homme par l'intermédiaire des aliments à la suite d'une contamination directe ou indirecte (défaut d'hygiène) de

DOSSIER

ceux-ci par des matières fécales humaines. Les aliments incriminés sont souvent des mollusques provenant d'eaux contaminées mais aussi de nombreux autres aliments contaminés par des personnes infectées. Le virus de l'hépatite A et les virus des gastro-enterites de type *novovirus*, anciennement Norwalk, (photo ci-dessous) sont ceux les plus fréquemment impliqués dans les infections alimentaires (11). Ils peuvent être inactivés par un chauffage suffisant.



Le respect des règles d'hygiène et la mise en place de méthodes HACCP (*Hazard Analysis Critical Control Point*) est indispensable pour lutter efficacement contre les germes pathogènes dans l'industrie agroalimentaire. Ces méthodes préventives requièrent la formation des personnels et la mise en place d'importants moyens économiques.

L'identification des germes pathogènes les plus susceptibles de se développer dans un produit est indispensable dans le but de déterminer les moyens d'action envisageables pour limiter les risques de contamination : emploi de désinfectant spécifique, mise en place de chaîne de production anoxique, réfrigération, chauffage... Cependant, toutes ces opérations ont un impact sur la flore positive et la saveur du produit. La réalisation systématique de tests de vieillissement pour déterminer l'impact sur la flore microbiologique d'une modification du procédé ou de la formulation est riche en information, néanmoins elle reste longue et onéreuse. Depuis quelques années, la microbiologie prévisionnelle peut aider les professionnels : en utilisant des modèles mathématiques, elle peut prédire le devenir d'une population microbienne en fonction du procédé (conditions d'étuvage, de stockage...) et de la formulation (pH, a_w , concentrations en inhibiteurs...), identifier des points critiques ou participer à la détermination de la date limite de consommation d'un produit (2). L'ensemble des processus de fabrication peut être pris en compte, de la production à l'emballage et au stockage sans oublier le rôle du consommateur. En effet par un mauvais stockage ou une cuisson inadéquate il peut également être le principal responsable de l'infection alimentaire qu'il contracte.

Bibliographie

1. Anonymous. 2004. The International Congress on Toxoplasmosis. International Journal for Parasitology in press.
2. Bourgeois, C. M., J. F. Mesclé, and J. Zucca. 1996. Microbiologie alimentaire, Lavoisier Tec & Doc, Paris
3. Centre d'Information des Viandes. 2002. Micro-organismes et parasites des Viandes. Les connaître pour les maîtriser. Cahier Sécurité des Aliments.
4. Goulet, V., C. Jacquet, P. Martin, V. Vaillant, E. Laurent, and H. De Valk. 2004. Surveillance de la listériose humaine en France, 2001. Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire 9.
5. Haeghebaert, S., F. Le Querrec, P. Bouvet, A. Gallay, Espié, E., and V. Vaillant. 2002. Les toxi-infections alimentaires collectives en France en 2001. Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire 50.
6. Health Protection Agency. General outbreaks of foodborne illness, England and Wales laboratory Reports, 2003. CDR Weekly 13.
7. ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Foods). 1996. Micro-organisms in foods : Microbiological specifications of food pathogens. Blackie academic & professional, London.
8. James, C., M. Nicolaon, and S. J. James. 1999. Review of microbial and control measures in abattoirs. FRPERC (Food Refrigeration and Process Engineering Reserach Centre, University of Bristol, Langford.
9. Larpent, J. P. 2000. Listeria, 2^e édition., Tec & Doc, Paris.
10. Larpent, J. P. 2000. Microbiologie et aliments : Microbiologie négative. Industries Alimentaires et Agricoles mai:21-34.
11. Le Guyader, S. and M. Pommepuy. 2002. Contamination virale des aliments : création d'un réseau européen de surveillance et de recherche. Revue Française des Laboratoires 348:53-59.
12. Organisation Mondiale de la Santé. 1997. Rapport trimestriel de statistiques sanitaires mondiales. Organisation Mondiale de la Santé, Genève.
13. Sandel, M. K. and J. L. McKillip. 2004. Virulence and recovery of *Staphylococcus aureus* relevant to the food industry using improvements on traditional approaches. Food Control 15:5-10.
14. Tetteh, G. L., S. K. Sefa-Dedeh, R. D. Phillips, and L. R. Beuchat. 2004. Survival and growth of acid-adapted and unadapted *Shigella flexneri* in a traditional fermented Ghanaian weaning food as affected by fortification with cowpea. International Journal of Food Microbiology 90 : 189-95.

INTEGRATED MODELLING OF FOOD PROCESS AND BACTERIAL BEHAVIOUR: APPLICATION FOR PREDICTING THE EVOLUTION OF *L. MONOCYTOGENES* CONTAMINATION DURING DELICATESSEN PROCESS

V. ZULIANI, P. GARRY, J.L. VENDEUVRE

Centre Technique de la Salaison, de la Charcuterie et des Conserves de Viandes, Maisons-Alfort, France.

J.C. AUGUSTIN

Unité Mixte de Recherches RISQUAL ENVA/INRA, Maisons-Alfort, France.

I. LEBERT, A. LEBERT

Unité de Recherches sur la Viande, INRA, Theix, France.

Microorganism, food and process are the three main components involved in the quality and safety of food products. Indeed food products may become microbiologically unsafe if the growth of pathogenic or spoilage bacteria occurred in particular when they are not properly processed and stored. Predictive microbiology is a powerful tool that can help professional to guarantee the microbiological quality of their products. Nevertheless, too many models have been built in static condition with broth medium. So, their ability to predict the behaviour of bacteria in food during its process (inducing dynamic environmental conditions) is not as satisfactory as it could.

In this study, we developed a global modeling approach similar to that of Wilson *et al.*[1]. Such approach consists in combining a food-processing model and predictive bacterial models. As raw pork meat is part of the most sensitive food concerning risk with *Listeria monocytogenes* contamination [2] there is a need to understand and model the behaviour of *L. monocytogenes* during delicatessen processes. We thus applied an integrated modeling approach to predict the behaviour (growth and decrease) of *L. monocytogenes* taking account of the raw meat product characteristics and the process effects (formulation, heat processing regime and storage temperature).

All experiments were carried out in raw minced pork meat artificially contaminated with *L. monocytogenes*. We studied the effect of pH (five levels), water activity- a_w - (five levels), heat processing regimes (four time/temperature combinations) and storage temperature (two levels) on the evolution of contamination of the bacteria.

Two bacterial models were used: a growth model and an inactivation model. A heat transfer model was also used to take the change of temperature into account. The parameters of the models were adjusted in order to take account of the influence of the product characteristics and the strain used. Predicted kinetics were compared with experimental data obtained in more than one hundred different environmental conditions. Models were first individually validated and the combined approach was also validated.

Such integrated approach, taking into account the characteristics of the medium, the bacteria and the process predict accurately the evolution of listerial contamination in raw pork. It will be useful for predicting food safety. It will also have many applications in HACCP or risk analysis.

References

[1] P.D. Wilson, T.F. Brocklehurst, S. Arino, D. Thuault, M. Jakobsen, M. Lange, J. Farkas, J.W. Wimpenny and J. F. Van Impe. International Journal of Food Microbiology **73** (2002), p. 275

[2] I. Giovannacci, C. Ragimbeau, S. Queguiner, G. Salvat, J.L. Vendeuvre, V. Carlier and G. Ermel. International Journal of Food Microbiology **53** (1999), p 127

EFFETS COMPARES DE DEUX SELS DE SODIUM (CHLORURE ET LACTATE) ET DU PH SUR L'INTERFACE CROISSANCE / NON CROISSANCE DE *LISTERIA MONOCYTOGENES* DANS LA VIANDE DE PORC.

V. Zuliani¹, I. Lebert², P. Garry¹, JC Augustin³, JL. Venduvre¹, A. Lebert²

¹Centre Technique de la Salaison, de la Charcuterie et des Conserves de Viandes, Maisons Alfort, France.

²INRA de Clermont Ferrand/Theix, SRV, St Genès Champanelle, France.

³Services d'Hygiène et Industrie des Denrées Alimentaires d'Origine Animale, Maisons-Alfort, France.

L'activité de l'eau (a_w) et le pH ont une influence prépondérante sur la survie et le développement bactérien. Dans les aliments, le chlorure de sodium (NaCl) et le lactate de sodium (NaL) sont couramment utilisés pour réguler l' a_w de manière à garantir la stabilité et la sécurité microbienne.

L'objectif de ce travail est d'étudier l'influence du pH, de l' a_w , de la nature et de la concentration des sels utilisés pour la réguler, sur l'interface croissance / non croissance et la cinétique de développement de *Listeria monocytogenes* (Lm). L'évolution de la population de Lm est suivie pendant 7 jours à 20°C dans une méele de viande de porc préalablement inoculée, dont le pH a été ajusté.

Un plan d'expériences factoriel complet étudie : 3 niveaux d' a_w (0,95 ; 0,96 ; 0,97), 4 niveaux de NaL (0 ; 1,5% ; 3,0% ; 4,5%) et 3 niveaux de pH (5,6 ; 5,9 ; 6,2). Lorsque la quantité de NaL testée n'est pas suffisante pour abaisser l' a_w aux niveaux étudiés, du NaCl est ajouté à la méele.

L'interface croissance / non croissance de Lm évolue fortement selon la nature du sel utilisé. En effet alors qu'une croissance est observée pour les 9 conditions d' a_w *pH testées lorsque le NaCl est utilisé comme dépresseur (niveau NaL 0%), une stagnation du nombre de Lm est constatée dès l'ajout de 1,5% de NaL pour le pH 5.6 quel que soit l' a_w . Le pourcentage de NaL ajouté à la méele a également une influence significative sur la vitesse de croissance de Lm : à pH 6,2 et 0,97 d' a_w après 24 h d'ensemencement, la population de Lm augmente de plus de 2,5 Log lorsque le NaCl est utilisé comme dépresseur. En présence de 1,5% de NaL cet accroissement n'est que de 1,2 Log alors que pour les niveaux 3,0 et 4,5% la population bactérienne stagne. Après 7 jours à 20°C jusqu'à la concentration 3,0% de NaL, la phase plateau est atteinte et l'accroissement final est de l'ordre de 3,4 Log alors que pour 4,5%, la phase exponentielle est en cours et l'accroissement d'environ 1,4 Log.

Dans les mêmes conditions d' a_w et de pH, la présence de NaL représente pour Lm un stress supplémentaire qui, additionné au stress osmotique (et parfois acide) ne permet pas toujours son développement. Lorsque Lm parvient à s'adapter à cet environnement hostile, sa phase de latence est significativement allongée et l'accroissement de population observé au bout de 7 jours est plus faible. Ainsi, la nature du dépresseur est un paramètre indispensable à prendre en compte lors de

l'étude de l'effet d'une diminution de l' a_w sur la survie ou le développement des microorganismes.

ICEF9-2003

International Conference Engineering and Food

Validation of the Augustin γ -concept model for *Listeria monocytogenes* in ground pork as a function of pH, water activity and steam conditions

Zuliani Véronique (1), Lebert Isabelle (2), Garry Pascal (3), Augustin Jean Christophe (4),
Vendeuvre Jean-Luc (5), Lebert André (6)

(1)(3)(5) Centre Technique de la Salaison, de la Charcuterie et des Conserves de Viandes, 7 avenue du Général de Gaulle, F- 94704 Maisons-Alfort Cedex, France

vzuliani@clermont.inra.fr

(2)(6) Institut National de la Recherche Agronomique, Station de Recherches sur la Viande, Centre de Clermont-Ferrand / Theix, F-63122 Saint-Genès Champanelle, France

lebert@clermont.inra.fr

(4) Service d'Hygiène et Industrie des Denrées Alimentaires d'Origine Animale, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, 7 avenue du Général de Gaulle, F- 94704 Maisons-Alfort Cedex, France

Abstract

Listeria monocytogenes (Lm) 14 was inoculated in ground pork, a product model close bacon cubes. The influence of pH, water activity and steam process on the growth / no growth interface and the kinetics of Lm were studied. Then, the performance of the Augustin γ -concept model was tested. The model gives good results as 90 experiments on 100 were well described. Nevertheless, it is more difficult to predict the growth of Lm near the growth / no growth interface.

Key words: predictive microbiology, *Listeria monocytogenes*, meat, a_w , pH, steam conditions

Introduction

Listeria monocytogenes (Lm) has been recognised as an important new emerging food born pathogen that is responsible for numerous cases of listeriosis in the last 15 years. Bacon cubes are part of the raw meat product which can frequently be contaminated by Lm during its processing because contaminated raw material is used. Then it is essential to understand the capacity of the microorganism to survive and multiply under conditions associated with the processing and storage of bacon cubes for which industrial production dates back to the end of 80's years. The major steps of the process consist in dressing pork belly, then meat is pickled (with salt and reducing sugar). Bacon cubes are then steamed (to develop organoleptics qualities) and finally cut, acid salt pulverized and conserved under modified atmosphere at 4/6°C.

The aims of this study, carried out in ground pork a product model close to bacon cubes, were to simulate some of these processing units in order to validate the Augustin model for the response of Lm as a function of pH, a_w (water activity), steam process and their interactions.

Materials and methods

1 Collecting data

Organism and preparation of inoculum

L. monocytogenes 14, serotype 4b, was used throughout these experiments. It is a fast growing strain¹, isolated from an industrial pork batter. It was stored on glass beads at -20°C.

A 3–4 hours stationary phase inoculum containing about 10⁹ Colony Forming Units / mL was obtained after 3 subcultures in 10 ml Brain Heart Infusion (BHI; Oxoid) at 37°C on a rotary shaker (Novotron, Infors, France) at 150 rpm.

Media

Growth was followed by plate count on Palcam agar (Biokar, Beauvais, France) for enumeration of Lm and Plate Count Agar (Biokar) for total counts.

Meat decontamination

In order to work with meat samples which had equal and low initial contamination, they were irradiated with high electrons energies (AERIAL, Schiltigheim, France) to a dose of 15 kGy²

Adjusting a_w and pH

After meat thawing at 4°C, a_w was adjusted with NaCl (Normapur, PROLABO, France). The a_w of meat was measured at 20°C with an electric hygrometer (a_w -sprint TH500, Novasina, Roucaire, France). After adjusting the a_w , pH was adjusted by addition of HCl, 1N or NaOH, 1N volumes.

The pH of the meat was measured using a MP230 pH meter (Mettler Toledo, France) and an Inlab 427 penetration probe (Inlab, France). The temperature was controlled with a probe (30K NTC, Mettler Toledo) connected to the pH meter.

Meat inoculation

Meat samples were inoculated to reach 10^5 cells per gram of meat.

Steam

Steam treatment took place in an incubator (FC 90, Eurotherm, Dardilly, France). To guarantee the homogeneity of the steam treatment for all the experiments, a rectangle of meat was formed. Its measurement were adjust to the exactly weight of the batter².

Experimental procedure

Enumeration of total bacterial count was made one time for each experiment just before meat inoculation. Then the *Lm* contaminated meat was steamed and finally stored at 20°C in a refrigerated incubator (KB 240, Binder, Tuttlingen, Germany). This temperature, straight upper than those used in the meat processing industry allowed reducing the time of the experiments.

For each enumeration, 20g of meat was aseptically removed from the packages². Concentration of bacteria was determined in cfu per gram of meat.

Experimental designs

The study was carried out in two stages:

-In the first stage, the influence of the steam condition and the formulation (a_w , pH) on the growth / no growth interface and the kinetic of *Lm* was studied. A complete factorial design (4x5x5) was employed. These experiments were also used to validate the Augustin model in comparing experimental data point and predicted values.

The effects of steam condition (24h at 20°C called latter -24h/20°C - ; 4h at 42°C -4h/42°C-; 1h at 48°C - 1h/48°C - ; 1h at 53°C -1h/53°C -), pH (5.0; 5.3; 5.6; 5.9; 6.2) and a_w (0.93; 0.94; 0.95; 0.96; 0.97) were tested.

The 4 steam treatments were chosen in order to reflect the evolution of the steam process that exists in the meat industry. High values of pH and a_w tested are closed to those found for the commercial bacon cubes average. The low values correspond to those frequently found for salami or other cooked pork meats^{3;4}.

For each of the 100 conditions, 4 sampling times of *Lm* were performed: at the beginning (t_0) and at the end of the steaming (t_1), then 4 days (t_4) and 6 days (t_6) after the end of the steaming.

This storage time was chosen because it corresponds, at refrigeration temperature, to the time between the production and the use-by-date of bacon cubes. The t_1 enumeration allowed studying the evolution of *Lm* during the steam step. The enumeration at t_4 was essential to realise kinetic curves (to validate the model).

-In the second stage, in order to re-estimate some parameters of the model, 24 growth curves were realised. According to the growth / no growth interface previously obtained, the experimental design was chosen in the growth area of *Lm*. For each of the conditions tested, curves were realised in triplicate and a minimum of 14 enumerations were made. First enumerations were made just after inoculation of the meat. Then for conditions others than 24/h20°C, next enumerations were realised just after the steam step. In those cases, the second enumeration was the first taking into account during the fitting of the curves.

2 Data analysis

Growth / no growth interface

The differences, expressed in log, between the enumeration made at t_0 and at t_6 were calculated. Conditions resulting in log increases > 1.0 were classified as positive for growth. Other conditions were considered as positive for survival or decrease⁵.

Curve fitting

Growth curves were fitted from the experimental 14 points kinetics using the logistic growth model with delay⁶.

$$x(t) = \begin{cases} x_0 & , t = lag \\ \frac{x_0}{x_{max}} & , t > lag \\ 1 + \left(\frac{x_{max}}{x_0} - 1 \right) \times \exp(-\mu_{max} \times (t - lag)) & \end{cases} \quad \text{Eq. [1]}$$

where X_{max} is the maximum bacterial concentration, lag is the lag time (h), μ_{max} is the maximum specific growth rate (h^{-1}).

Secondary model used

The Augustin secondary model is a multiplicative model which describe the effects of temperature, pH, a_w , inhibitory substances and qualitative factors (nature of the growth medium, agitation) on μ_{max} and lag of Lm .

The Augustin model is based on several hypotheses:

- qualitative factors were assumed to have proportional effect on μ_{max} .
- $\mu_{max} \times Lag$ was assumed to be constant according to physiological state of bacteria

$$\begin{cases} \sqrt{\mu_{max}} = \sqrt{\mu_{opt} CM_2(T)CM_1(pH)CM_2(a_w)} + \varepsilon \\ \ln(\mu_{max} Lag) = \ln K + \varepsilon' \end{cases} \quad \text{Eq. [2]}$$

where μ_{opt} is the maximum specific growth rate (h^{-1}) in the reference medium for optimal conditions, K is a constant depending on the physiological state of the inoculum, ε and ε' are errors terms.

$$CM_n(X) = \begin{cases} 0 & X \leq X_{min} \\ \frac{(X - X_{max})(X - X_{min})^n}{(X_{opt} - X_{min})^{n-1} [(X_{opt} - X_{min})(X - X_{opt}) - (X_{opt} - X_{max})((n-1)X_{opt} + X_{min} - n.X)]} & X_{min} < X < X_{max} \\ 0 & X \geq X_{max} \end{cases} \quad \text{Eq. [3]}$$

where X is temperature, pH or a_w , X_{min} is the value below which no growth occurs, X_{opt} is the value at which μ_{max} is equal to its optimal value $\mu_{opt(X)}$, X_{max} is the value above which no growth occurs and n is a shape parameter.

$$X_{min} = X_{opt} - (X_{opt} - X_{min}^o) \times \left[\left(\frac{Y_{opt} - Y}{Y_{opt} - Y_{min}^o} \right)^{-3} + \left(\frac{Z_{opt} - Z}{Z_{opt} - Z_{min}^o} \right)^{-3} \right]^{\frac{1}{3}} \quad \text{Eq. [4]}$$

with X , Y and Z being temperature, pH and a_w and X_{min}^o , value below which no growth occurs for Y_{opt} and Z_{opt} .

Re-estimation of the Augustin model parameters

On order to use this model, we had first to configure it. Indeed, pH_{min} , a_{wmin} , μ_{opt} and K have to be adjusted according to our experimental data.

- Estimation of absolute minimal cardinal values and μ_{opt}

Fits were performed on the 24 growth curves realised by linear regression in minimizing the sum of the squared residuals (equation [5]). The lag, the μ_{max} , the initial and maximal population were determined for each experiments.

$$SSR = \sum_{i=1}^n (N(t)_{observed} - N(t)_{fitted})^2 \quad \text{Eq. [5]}$$

where n is the number of data points, N the concentration of Lm at the time t .

μ_{max} values obtained were compared with those predicted by the Augustin model according to pH, a_w , and storage temperature. Values of pH_{min} , a_{wmin} and μ_{opt} were then performed by linear regression in minimizing the SSR (equation [6]). Others cardinals values used were estimated equal to the values obtained by Augustin (Table 1).

$$SSR = \sum_{i=1}^n (\mu_{max}(i)_{observed} - \mu_{max}(i)_{fitted})^2 \quad \text{Eq. [6]}$$

Table 1: cardinal values used to optimise pH_{min} , a_{wmin} and μ_{opt}

	Temperature (°C)	pH	a_w
Minimal	-3.0		
Optimal	37.0	7.10	0.997
Maximal	45.5	9.61	1.000

➤ Estimation of K

Lag values previously obtained by fitting experimental data were compared with those predicted by the Augustin model as described for μ_{max} . As K is depending of the physiological state of the bacteria, for each of the 4 steam process tested, according to values of pH_{min} , a_w min and μ_{opt} obtained, value of K was optimised.

Results

1 Growth / no growth interface

Four graphs (one for each steam condition tested) representing the growth / no growth interface of *Lm* were obtained (example for 4h/42°C Figure 1). We first notice that whatever the steam process the minimal pH where a growth is observed decreases when the a_w increases. In the same way, the minimum a_w decreases when pH increases. Secondly, some small differences are observed between interfaces of the four steam conditions. Nevertheless, the analysis of variance ($P < 0.05$) realised proved that the steam process is not effective on this interface.

Moreover in order to study the influence of pH, a_w and steam process on μ_{max} and lag values during *Lm* growth, two combinations of formulation were selected. Thus growth curves were realised for pH 5.6/ a_w 0.95 and for pH 6.2/ a_w 0.97 for the four steam treatments.

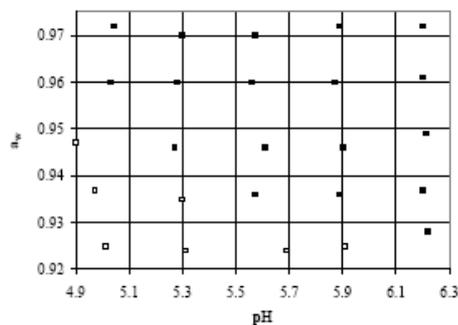


Figure 1: growth / no growth interfaces for *Lm* as a function of a_w and pH for the 4h/42°C steam process (■ growth, $GCT_0/t_0 > 1.0$, □ no growth $GCT_0/t_0 = 1.0$)

2 Estimation of the parameters for the Augustin Model.

After fits of the 24 kinetics curves realised, we obtain a pH_{min} of 4.343, an a_w min of 0.89 and a μ_{opt} of $1.343h^{-1}$. Values of K obtained for each steam treatment were presented Table 2.

Table 2: values of K obtained for each steam conditions tested

	$K_{24h/20^\circ C}$	$K_{4h/42^\circ C}$	$K_{1h/48^\circ C}$	$K_{1h/53^\circ C}$
values	2.95	0.36	1.31	1.07

Values of K obtained for steam 1h/48°C and 1h/53°C are closed, on the contrary the $K_{24h/20^\circ C}$ is upper and value for 4h/42°C is very low.

3 Performance evaluation of the Augustin model

In order to test the performance of the model, the data collected during the first stage experiments (100 conditions tested) were compared with the growth curves predicted by the model. For steam process 24h/20°C the 4 enumerations were taking into account, for the 3 others, only enumerations realised after the steam were used. When the prediction conduced to an estimation of the *Lm* number different from the experimental data more than +/- 0.5 log, it was considered as bad. In other cases, predicted were considered as good (Figure 2).

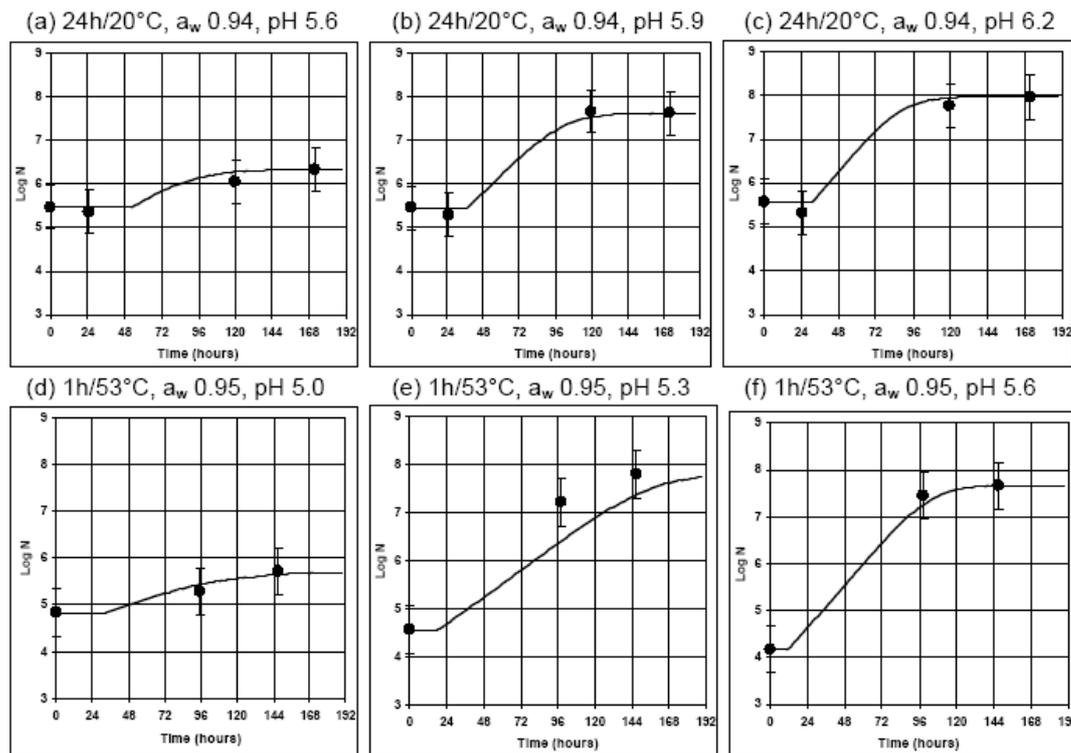


Figure 2: comparison of experimental data (●) and predicted kinetics curves with Augustin model (—) |—| represents the maximal error tolerated: $\pm 0.5 \log$

Figures (2a) and (2d) represent conditions where no significant growth is observed with a correct prediction of the model. On the figures (2b), (2c) and (2f) good predictions of the *Lm* growth are also observed. On the contrary, the growth of *Lm* in the conditions of the figure (2e) is bad predicted by the model.

Figure 3 represents a summary graph for all of the 100 conditions where predicted values were compared with experimental data.

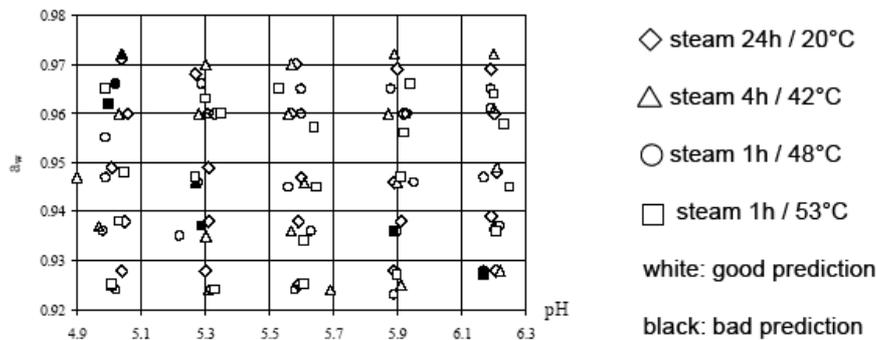


Figure 3: evaluation of the performance of the Augustin model as a function of pH, a_w and steam process

Discussion

Interactions between pH and a_w , which are frequently used to limit the bacterial growth in meat product³, as described by Leistner⁹, were underlined during the study of the growth / no growth interface. This first result confirms the fact that for good predictions, especially near the interface, the use of a model that takes into account interactions is essential. Moreover re-estimation of some parameters of a model before its use is also necessary in order to take into account the specificity of the strain and the subculture conditions. In this work, we obtain for pH_{min} ² and $a_{w \min}$ ² values

respectively of 4.343 and 0.89. Such values are near those obtained by Le Marc¹⁰ which found for two strains of *Lm* a $\text{pH}_{\text{min}}^{\circ}$ of 4.24 and 4.27 using HCl for pH adjustment. Using the same acid, Augustin¹¹ found a $\text{pH}_{\text{min}}^{\circ}$ of 4.38 and a $\text{a}_{\text{w},\text{min}}^{\circ}$ of 0.913 with NaCl. As the nature of the medium has a great influence on the bacterial growth^{12,13}, it is also indispensable to take its effect into account. Therefore the μ_{opt} was calculated for ground pork. We obtain a value of 1.343h^{-1} which is near this found by Augustin¹¹: 1.3728h^{-1} . Using this re-parameterized model gives good predictions: ninety kinetics are correctly predicted. The ten (four corresponds to steam 1h/53°C, four to 4h/42°C) others conditions are all located near the growth / no growth interface indicating the difficulty to predict the development of bacteria in such area.

Conclusion

The Augustin γ -concept model can describe with a good accuracy the effect of pH, a_{w} and steam process on the kinetics of *Lm* in ground pork. Nevertheless, near the growth / no growth interface, the performance of this model is not as satisfactory as in the growth or no growth areas.

Reference List

1. Bégot, C., Lebert, I., Lebert, A. Variability of the response of 66 *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* strains to different growth conditions. *Food Microbiology* 14, 5, 403-412, 1997.
2. Zuliani, V., Garry, P., Vendevre, J.L., Augustin, J.C., Lebert, I., Lebert, A. Growth of *Listeria monocytogenes* in ground pork as a function of pH and water activity. 4th International Conference, Predictive modelling in foods, Quimper, France.
3. Pidcock, K., Heard, G.M., Henriksson, A. Application of nontraditional meat starter cultures in production of Hungarian salami. *International Journal of Food Microbiology*, 76, 1-2, 75-8, 2002.
4. Cole, M.B., Jones, M.V., Holyoak, C. The effect of pH, salt concentration and temperature on the survival and growth of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Applied Bacteriology* 69, 63-72, 1990.
5. Buchanan, R.L., Stahl, H.G., Whiting, R.C. Effects and interactions of temperature, pH, atmosphere, sodium chloride, and sodium nitrite on the growth of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection* 52, 12, 844-851, 1989.
6. Rosso, L., Bajard, S., Flandrois, J.P., Lahellec, C., Fournaud, J., Veit, P. Differential growth of *Listeria monocytogenes* at 4 and 8°C : consequences for the shelf life of chilled products. *Journal of Food Protection* 59, 944-949, 1996.
7. Augustin, J.C. and Carlier, V. Modelling the growth rate of *Listeria monocytogenes* with a multiplicative type model including interactions between environmental factors. *International Journal of Food Microbiology*, 56, 1, 53-70, 2000.
8. Shadbolt, C.T., Ross, T., McMeekin, T.A. Nonthermal death of *Escherichia coli*. *International Journal of Food Microbiology*, 49, 129-138, 1999.
9. Leistner, L. Combined Methods for Food Preservation. *Handbook of Food Preservation*, 457-485, New York. 1999.
10. Le Marc Y. Développement d'un modèle modulaire décrivant l'effet des interactions entre les facteurs environnementaux sur les aptitudes de croissance de *Listeria*. Thèse de docteur de l'université de Bretagne Occidentale, mention microbiologie, Université de Bretagne Occidentale, 2001.
11. Augustin J.C. Modélisation de la dynamique de croissance des populations de *Listeria monocytogenes* dans les aliments. Thèse de docteur ès sciences, Université Claude Bernard Lyon 1, 1999.
12. Robins, M.M. and Wilson, P.D.G. Food structure and microbial growth. *Trends in Food Science & Technology* 5, 9, 289-293, 1994.
13. Wilson, P.D., Brocklehurst, T.F., Arino, S., Thuault, D., Jakobsen, M., Lange, M., Farkas, J., Wimpenny, J.W., Van Impe, J.F. Modelling microbial growth in structured foods: towards a unified approach. *International Journal of Food Microbiology*. 73, 275-89, 2002.

MODELISATION DES CONDITIONS DE CROISSANCE ET DE SURVIE DE *LISTERIA MONOCYTOGENES* DANS LA VIANDE DE PORC TRAITEE EN SALAISON.

V. ZULIANI, P. GARRY, A. LEBERT

Les toxi-infections dues à des contaminations de denrées par des microorganismes pathogènes constituent un problème majeur pour l'industrie agroalimentaire. En 2001, 559 foyers de toxi-infections alimentaires collectives (TIAC) ont été recensés en France, 10 % des aliments identifiées à l'origine de ces TIAC étant des produits de charcuterie / salaison. Parmi les microorganismes pathogènes impliqués, *Listeria monocytogenes* (*Lm*) est responsable d'infections pouvant être mortelles dans 20 à 30% des cas.

Malgré un regain d'intérêt pour cette bactérie, peu de travaux s'intéressent aujourd'hui à comprendre et modéliser le comportement de ce pathogène en fonction de facteurs environnementaux comme le pH, l'activité de l'eau (a_w) et de facteurs technologiques liés au procédé de fabrication des produits. Or seule la maîtrise de la formulation (ajustement rigoureux du pH, de l' a_w , des concentrations en additifs...) et des procédés de fabrication permet aux professionnels de garantir la sécurité sanitaire de leur produit.

Notre travail consiste à mesurer puis modéliser la croissance de *Lm* dans de la viande de porc hachée, un produit modèle proche des lardons. Un plan factoriel complet croisant 5 niveaux de pH, 5 niveaux d' a_w et 4 conditions d'étuvage encadrant les valeurs rencontrées dans l'industrie a été mis en place.

L'influence de ces 3 facteurs sur l'interface croissance / non croissance et sur la cinétique de développement de la bactérie est étudiée ainsi que la performance d'un modèle de microbiologie. Le modèle donne de bons résultats puisque plus de 80% expériences sont correctement décrites. Le travail se poursuit afin de décrire:

- 1) le développement bactérien lorsque l'on se rapproche de l'interface croissance / non croissance.
- 2) l'influence d'additifs sur la position d'interface.

Growth of *Listeria monocytogenes* in ground pork as a function of pH and water activity.

V. Zuliani¹, P. Garry¹, J.L. Vendevre¹, J.C. Augustin², I. Lebert³ and A. Lebert³

¹ Centre Technique de la Salaison, de la Charcuterie et des Conserves de Viandes, 7 avenue du Général de Gaulle, F- 94704 Maisons-Alfort Cedex, France (vzuliani@clermont.inra.fr)

² Service d'Hygiène et Industrie des Denrées Alimentaires d'Origine Animale, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, 7 avenue du Général de Gaulle, F- 94704 Maisons-Alfort Cedex, France

³ Station de Recherche sur la Viande, Institut National de la Recherche Agronomique, Centre de Clermont-Ferrand / Theix, F-63122 Saint-Genès Champanelle, France

Introduction

Listeria monocytogenes is a well known foodborne pathogen which has been isolated from various foodstuffs such as meat, poultry, eggs, seafood and vegetables (Membré et al., 1997). Due to the ubiquitous nature of this bacterium in the slaughterhouse and in the meat packaging environments, the behaviour of *L. monocytogenes* in meat product is receiving increasing attention (Mbandi and Shelef, 2002). Indeed, it has been extensively studied for the last twenty years and numerous predictive models have been published. Most of these mathematical models were performed based on laboratory media experiments and were elaborated from data coming from "kinetic growth", therefore models can have difficulties in making accurate predictions from actual food products. Predictive microbiology is a useful tool to anticipate contamination of food because it can identify combinations of environmental variables that just permit or just prevent growth. Moreover these parameters have to be chosen according to the sensory quality of the product.

The purpose of this work was to determine the interface between growth and survival of *L. monocytogenes* in ground pork.

Materials and methods

Organism and culture conditions

L. monocytogenes 14, serotype 4b, was used throughout these experiments. It is a fast growing strain (Bégot et al., 1997), isolated from an industrial pork batter {Bégot, Lebert, et al. 1997 #1453}. It was stored on glass beads at -20°C.

A 3 – 4 hours stationary phase inoculum containing about 10⁹CFU/mL was obtained after 3 subcultures in 10 ml Brain Heart Infusion (BHI; Oxoid) at 37°C on a rotary shaker (Novotron, Infors, France) at 150 rpm.

Meat decontamination

The fat was removed from shank-free shoulders of pork. The meat was minced. Rectangle samples (20 x 15 x 1.3 cm) of about 400g were vacuum packed and frozen at -20°C. In order to work with meat samples which have equal and poor initial contamination, frozen samples were irradiated to a dose of 10 kGy with high electrons energies (AERIAL, France). It is the minimum dose which allowed the reduction of the number of bacteria without forming a lot of oxidation compounds (Farkas, 1998). Indeed, these compounds have a positive influence on the growth of *L. monocytogenes*

Adjusting a_w

After meat thawing at 4°C, the a_w was adjusted with NaCl (Normapur, PROLABO, France). NaCl was sterilized by autoclaving for 15 min at 121°C.

The a_w of meat was measured at 20°C with an electric hygrometer (a_w -sprint TH500, Novasina, Roucaire, France)

Adjusting pH

After adjusting the a_w , pH was adjusted by addition of sterilized (15 min / 121°C) HCl, 1N or NaOH, 1N volumes.

The pH of the meat was measured using a MP230 pH meter (Mettler Toledo, France) and an Inlab 427 penetration probe (Inlab, France). The temperature was controlled with a probe (30K NTC, Mettler Toledo) connected to the pH meter.

About three grammes of each meat blatter adjust to different pH was removed and used to measured a_w .

Experimental design

A factorial design with 2 factors (pH and a_w) at 5 levels each (complete block factorial experiment) was chosen in order to comply with actual values in the meat processing industry.

The twenty five conditions of (pH, a_w) were tested for pH = 5.0 , 5.3 , 5.6 , 5.9 , 6.2 and a_w = 0.93 , 0.94 , 0.95 , 0.96 , 0.97.

Experimental procedure

120g of meat were used for each tested condition. After adjusting a_w and pH, enumeration of total count was made, then meat was inoculated with the stationary phase third subculture to reach 10^5 cells per gram. Meat samples were stored at 20°C. On days 0, 1, 4 and 6 of incubation enumeration of *L. monocytogenes* was made.

20g of meat was aseptically removed from the packages and placed into stomacher bags (InterScience, France) with 180 ml of tryptone (0.85 %)-salt (0.01 %) water. Samples were then stomached in a Model 400 Lab Stomacher (InterScience, France) for 1 min and serial dilutions were made. Subsequent duplicate plating was made on Palcam (Biokar, France) for enumeration of *L. monocytogenes* and on Plate Count Agar (Biokar, France) for total count using a spiral Plater (SpiralSysteme DS, InterScience). Plates were incubated for 24h at 37°C for *L. monocytogenes*, 72h at 30°C for total count and then enumerated. Counts were recorded as a logarithm of colony forming units per gram (CFU/g).

Data analysis

The differences, expressed in log, between the initial (day 0) and the final (day 6) enumerations of *L. monocytogenes* were calculated.

Conditions resulting in log increases > 1.0 compared to the initial inoculum level were classified as positive for growth. Other conditions were considered as positive for survival or decrease.

Results and discussion

Experimental design range was well chosen because it allowed (Leistner, 1999) the observations of the growth limits of *L. monocytogenes* in pork meat at 20°C. In Figure 1, three zones are distinguished :

- a zone where $a_w > 0.945$ and $pH > 5.0$: in those conditions growth were always observed.
- a zone where $a_w < 0.930$ and $pH < 6.2$: in those conditions no growth were observed.
- an intermediate zone where $0.930 \leq a_w \leq 0.945$ and $5.0 \leq pH \leq 6.2$ in which growth and no growth were observed. This zone illustrated the so-called hurdle effect (Leistner, 1999) : the minimal value for growth of an environmental factor changes if another factor is near (but upper) its critical value. This can be put down to interactions between the different environmental factors which influence development of bacteria.

The pH in raw salted pork in the marketplace ranges from 5.8 to 6.1, the a_w from 0.955 to 0.965. Those values are compatible with the growth of *L. monocytogenes*. Nevertheless, the present study confirms that reducing a_w and/or pH by adding NaCl and acid is an important food preservation technique (Presser et al., 1998) which could result in "non thermal inactivation"(Ross et al., 2000).

J.F.M. Van Impe, A.H. Geeraerd, I. Leguérinel and P. Mafart (Eds.), Predictive Modelling in Foods - Conference Proceedings, Katholieke Universiteit Leuven/BioTeC, Belgium (ISBN 90-5682-400-7)

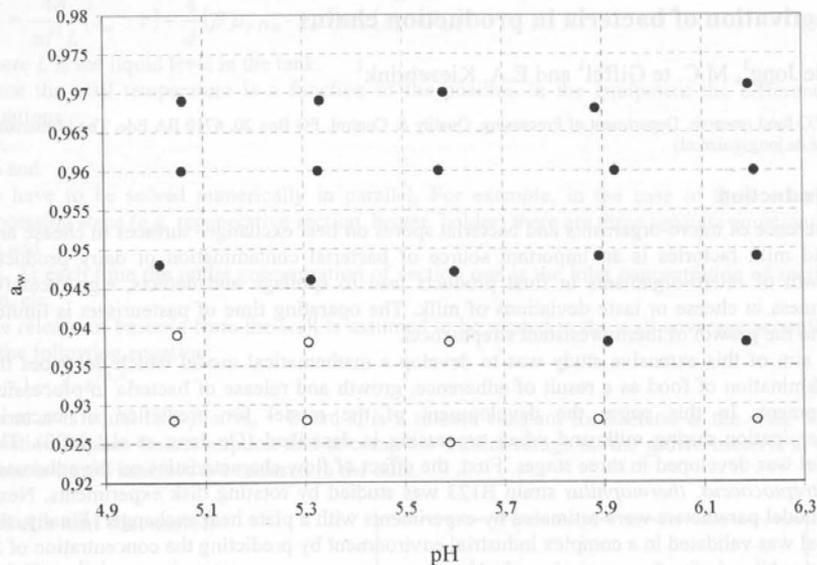


Figure 1: Observation of growth or no growth of *Listeria monocytogenes* in pork meat at 20°C as a function of a_w and pH: • growth observed after 7 days; o no growth observed after 7 days.

Reference

- Bégot C., Lebert I. and Lebert A. (1997) Variability of the response of 66 *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* strains to different growth conditions. *Food Microbiology* 14 (5), 403-412.
- Farkas J. (1998) Irradiation as a method for decontaminating food. A review. *International Journal of Food Microbiology* 44 (3), 189-204.
- Leistner L. (1999) Combined Methods for Food Preservation. In: Dekker, M (Eds) *Handbook of Food Preservation*, 457-485 pp.
- Mbandi E. and Shelef L.A. (2002) Enhanced antimicrobial effects of combination of lactate and diacetate on *Listeria monocytogenes* and *Salmonella spp.* in beef bologna. *International Journal of Food Microbiology* 76 (3), 191-198.
- Membre J.M., Thurette J. and Cateau M. (1997) Modelling the growth, survival and death of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Applied Microbiology* 82 (3), 345-350.
- Presser K.A., Ross T. and Ratkowsky D.A. (1998) Modelling the growth limits (growth/no growth interface) of *Escherichia coli* as a function of temperature, pH, lactic acid concentration, and water activity. *Applied Environmental Microbiology* 64 (5), 1773-1779.
- Ross T., Dalgaard P. and Tienungoon S. (2000) Predictive modelling of the growth and survival of *Listeria* in fishery products. *International Journal of Food Microbiology* 62 (3), 231-45.

Résumé

En France, les récentes épidémies de listériose ont conduit les professionnels de la charcuterie/salaison à étudier les potentialités de croissance, de survie et de destruction de *Listeria monocytogenes*, au cours de la fabrication et de la conservation de leurs produits. La microbiologie prévisionnelle est un outil qui peut les aider à atteindre cet objectif. Dans ce travail, un modèle a été développé pour prédire l'évolution de contamination de *L. monocytogenes*, dans de la viande de porc, soumise au procédé de fabrication des lardons (saumurage avec ajout d'inhibiteur(s), fumage, étuvage). Les étapes de ce procédé font évoluer les propriétés physico-chimiques de la viande (température, activité de l'eau, pH, concentrations en inhibiteur(s)), propriétés qui influencent le développement bactérien. Les expériences de cette étude ont été réalisées dans de la viande de porc hachée et ionisée (aliment modèle pour l'étude des lardons). Elles ont été utilisées pour développer un modèle combiné composé :

- d'un modèle de transfert thermique, qui prédit l'évolution de la température, en tout point de l'aliment modèle, en fonction des procédés d'étuvage et de stockage,
- de modèles de microbiologie prévisionnelle, prédisant la destruction thermique et la croissance de *L. monocytogenes*, en fonction des propriétés physico-chimiques de l'aliment modèle.

Après l'étuvage, les bactéries ayant survécu se développent plus rapidement que celles qui n'ont pas subi de traitement thermique. Ensuite, la conservation de l'aliment modèle à température de réfrigération, couplée à l'ajout de sel(s) d'acide(s) organique(s) dans la saumure, inhibe ou limite la croissance de *L. monocytogenes*.

L'évolution de température dans la mûlée en fonction des procédés d'étuvage et de stockage est correctement prédite par le modèle de transfert de chaleur. Le modèle combiné prédit correctement, dans de nombreuses conditions, la destruction thermique de *Listeria*, puis sa croissance ou sa survie, en fonction de la température, du pH, de l' a_w , de la nature et de la concentration en inhibiteur(s). Le modèle combiné prédit également la frontière entre les domaines de croissance et d'absence de croissance. Il peut être appliqué pour déterminer la date limite de consommation des produits de charcuterie/salaison, en fonction des paramètres du procédé.

Prediction of the bacterial contamination during the manufacturing and the storage of food product. Application to pork meat contaminated with *L. monocytogenes*

In France, recent listeriosis epidemics lead delicatessen producers to study the growth, survival and inactivation of *L. monocytogenes* during the manufacture and the storage of their products. Predictive microbiology is a tool which can help them to achieve this aim. In the present work, a model was developed to predict *L. monocytogenes* kinetics in ground pork subjected to the diced bacon process (brining with addition of inhibitor(s), smoking, heating process). The different stages of the process modify physicochemical properties of the meat (temperature, water activity, pH, concentration of inhibitor(s)), such properties influence the bacterial behavior. Experiments of this work were carried out in minced and irradiated pork meat (food model for the study of diced bacon). They were used to develop an overall model with:

- a heat transfer model which predicts the evolution of the temperature according to heat process phase and storage process,
- predictive microbiology models which predict thermal inactivation and growth of *L. monocytogenes* according to physicochemical properties of the food model.

After the heat process phase, bacteria which survived grow faster than bacteria which were not subjected to the heat treatment. Then, the storage of the food model at cold temperature, combined with the use of organic(s) acid(s) salt(s) in the brine, limits or inhibits the bacterial growth.

Evolution of the temperature in the meat batter according to heat process and storage process is well predicted by the heat transfer model. The overall model correctly predicts, in several conditions, the thermal inactivation of *Listeria* and its growth or survival as a function of temperature, pH, a_w , nature and concentration of inhibitor(s). The overall model also predicts the boundary between the growth and the no growth areas. It can be used to determine the use-by-date of delicatessen products according to the parameters of the process.

Spécialité : Sciences des Aliments

Mots-clés : *Listeria monocytogenes*, charcuterie, microbiologie prévisionnelle, transfert thermique, a_w , pH, inhibiteur