

THESE

Présentée devant

L'UNIVERSITÉ DE BRETAGNE OCCIDENTALE
U.F.R. Sciences et techniques

Pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ
DE BRETAGNE OCCIDENTALE**
Mention Microbiologie

Par

Olivier COUVERT

PRISE EN COMPTE DE L'INFLUENCE DU PH DANS L'OPTIMISATION DES TRAITEMENTS THERMIQUES

Soutenue le 2 avril 2002 devant la commission d'examen :

A. BINET	Professeur, Université de Bretagne Occidentale
P. DANTIGNY	Maître de conférence, Université de Dijon
I. LEGUERINEL	Maître de conférence, Université de Bretagne Occidentale
P. MAFART	Professeur, Université de Bretagne Occidentale
Y. PEIGNE	Responsable Qualité, Saupiquet
L. ROSSO	Directeur adjoint de la programmation des laboratoires (AFSSA)
M. ZWIETERING	Ingénieur de recherche, Danone Vitapole

REMERCIEMENTS

Les travaux de recherches présentés dans ce manuscrit ont été réalisés au Laboratoire Universitaire de Microbiologie Appliquée de Quimper (LUMAQ) dirigé par le Professeur Adrien BINET, et en collaboration avec l'entreprise Saupiquet.

Toute ma reconnaissance va au Professeur Pierre MAFART, mon Directeur de thèse, qui durant ces trois années, a supporté et orienté mon travail avec patience et dévouement. Je tiens à lui exprimer toute ma gratitude pour m'avoir fait découvrir dès mon DEA, les agréments et les charmes de la modélisation. Son expérience et ses critiques m'ont permis d'éviter bien de écueils. Pour cela, je le remercie sincèrement et lui exprime tout mon respect.

Ma reconnaissance va également au Docteur Laurent ROSSO, directeur adjoint de la programmation des laboratoires au comité de direction de l'AFSSA, et au docteur Philippe DANTIGNY, maître de conférence à l'université de Bourgogne d'avoir accepté la charge de rapporteur. Je leur sais gré de m'avoir accordé une partie de leur temps pour juger ce travail.

Je remercie également le Docteur Marcel ZWIETERING, ingénieur de recherches (Danone vitapole), et Yannick PEIGNE, responsable qualité (Saupiquet), et Adrien Binet, professeur à l'université de Bretagne Occidentale, pour avoir accepté d'examiner ce travail.

Je tiens également à remercier le Docteur Ivan LEGUERINEL pour le temps consacré et les conseils qu'il m'a apportés dans différents domaines.

Ma reconnaissance va également à M. Laurent VENAILLE, Directeur R&D Saupiquet, de m'avoir permis d'intégrer son équipe. Je remercie plus particulièrement Mme Véronique VOISSE, Mme Liliane GUELLEC et M. Jean-Luc DOUADY pour l'intérêt avec lequel ils ont suivi le déroulement de cette étude.

Les connaissances statistiques que Nicolas SAVY a pu m'apporter m'ont souvent été d'un grand secours. Je lui en suis extrêmement reconnaissant.

Pareillement, je souhaiterais remercier chaleureusement tous les membres du laboratoire qui m'ont, chacun à leur manière, soutenu, aidé et encouragé dans ce travail, en particulier Anne-Gabrielle MATHOT, Stéphane GAILLARD, Yannick FLEURY et Louis COROLLER.

Enfin, ces remerciements vont à mon amie Maryam et à ma famille qui m'ont toujours soutenu, ainsi qu'aux plongeurs, quakers et assimilés pour leur soutien moral. Cette thèse leur est dédiée.

TABLE DES MATIERES

Introduction.....	1
Chapitre 1	
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....	5
1.1. Généralités sur les spores bactériennes.....	5
1.1.1. l'endospore bactérienne.....	5
1.1.2. Morphologie et structure.....	6
1.1.3. Stabilité et résistance aux températures élevées.....	7
1.2. Historique et rappel des bases classiques du calcul des traitements thermiques.....	10
1.2.1. Effet du temps d'exposition à la chaleur.....	11
1.2.1.1. Cas général : cinétique de destruction d'ordre un.....	11
1.2.1.2. Cas particuliers de destruction non logarithmique.....	12
1.2.2. Effet de la température sur les paramètres des modèles primaires.....	18
1.2.3. Quantification des traitements thermiques.....	20
1.2.3.1. Nombre n de réductions décimales.....	20
1.2.3.2. Notion de valeur stérilisatrice (F).....	20
1.2.3.3. Notion de valeur de destruction biologique (VDB).....	21
1.2.3.4. Relation avec la durée de réduction décimale.....	21
1.3. Effet du pH sur la thermorésistance.....	22
1.3.1. Le facteur pH de traitement.....	22
1.3.1.1. Influence de l'acidification du milieu de traitement.....	22
1.3.1.2. Influence de la nature de la matrice.....	25
1.3.1.3. Influence de la nature de l'acidifiant.....	26
1.3.1.4. Interaction entre les facteurs température et pH.....	27
1.3.2. Le facteur pH de recouvrement.....	28
1.4. Modèles multifactoriels intégrant le pH.....	31
1.4.1. Modèles intégrant le pH de traitement.....	32
1.4.2. Modèles intégrant le pH de recouvrement.....	34

Chapitre 2

MATERIEL ET METHODES..... 37

2.1. Acquisition des données.....	37
2.1.1. Matériel biologique.....	37
2.1.1.1. Choix des souches.....	37
2.1.1.2. Préparation des suspensions de spores.....	38
2.1.1.2.1. <i>Spores de Clostridium sporogenes</i>	38
2.1.1.2.2. <i>Spores de Bacillus</i>	39
2.1.2. Traitement thermique.....	39
2.1.3. Confection des milieux.....	40
2.1.3.1. Milieu de suspension lors du traitement thermique.....	40
2.1.3.2. Milieu de récupération des spores (recouvrement).....	41
2.1.4. Plans expérimentaux.....	41
2.2. Traitement des données expérimentales.....	42
2.2.1. Ajustement des modèles.....	42
2.2.1.1. Modèles primaires.....	42
2.2.1.1.1. <i>Modèle de Rodriguez et al. (1988)</i>	42
2.2.1.1.2. <i>Modèle de Mafart et al. (2002)</i>	43
2.2.1.2. Modèles secondaires.....	44
2.2.1.2.1. <i>Modèle de Bigelow (1921)</i>	44
2.2.1.2.2. <i>Modèle de Mafart et al. (2001)</i>	44
2.2.1.2.3. <i>Modèle de Couvert et al. (1999)</i>	44
2.2.2. Evaluation des modèles.....	46
2.2.2.1. Critère quantitatif d'ajustement global.....	46
2.2.2.2. Examen des résidus.....	46
2.2.2.2.1. <i>Hétéroscédasticité</i>	46
2.2.2.2.2. <i>Test de normalité</i>	46
2.2.2.2.3. <i>Test d'autocorrélation</i>	47
2.2.2.3. Projection des régions de confiance.....	47
2.2.3. Tirage aléatoire d'une matrice possédant la même structure de corrélation qu'une matrice expérimentale.....	49
2.3. Validation sur un produit industriel.....	51
2.3.1. Mesure des variations de la valeur des facteurs au cours de la stérilisation et du stockage.....	52
2.3.1.1. Facteur température.....	52
2.3.1.1.1. <i>Suivi de la température au cours de la stérilisation</i>	52
2.3.1.1.2. <i>Modélisation du suivi de température</i>	53
2.3.1.1.3. <i>Intervalle de confiance des paramètres du modèle de Ball</i>	53
2.3.1.2. Facteur pH.....	54
2.3.1.2.1. <i>Suivi du pH au cours du traitement</i>	54
2.3.1.2.2. <i>Suivi du pH après la stérilisation (stockage)</i>	55
2.3.1.2.3. <i>Régions de confiance d'une droite de régression</i>	55
2.3.2. Mesure du temps minimum de stérilisation.....	56
2.3.2.1. Préparation et inoculation des boîtes.....	56
2.3.2.2. Stérilisation.....	57
2.3.2.3. Mise en évidence de la stérilité des boîtes.....	57

Chapitre 3

VALIDATION DU CHOIX DES MODELES PRIMAIRES..... 59

3.1. Souches aux courbes de survie log-linéaires.....	59
3.1.1. Collecte de données expérimentales.....	59
3.1.2. Evaluation de la qualité d'ajustement.....	60
3.2. Souches aux courbes de survie non log-linéaires.....	62
3.2.1. Courbe de survie de <i>C. sporogenes</i> Pasteur 79.3.....	62
3.2.1.1. Estimation des paramètres.....	62
3.2.1.2. Evaluation de la qualité d'ajustement et examen des résidus.....	65
3.2.1.3. Projection des régions de confiance.....	67
3.2.2. Courbe de survie de <i>Bacillus pumilus</i> origine industrielle.....	68
3.2.2.1. Estimation des paramètres.....	68
3.2.2.2. Evaluation de la qualité d'ajustement.....	72
3.2.2.2.1. Représentation de l'ajustement global.....	72
3.2.2.2.2. Examen des résidus.....	72
3.2.2.2.3. Projection des régions de confiance.....	74
3.3. Discussion.....	74
3.3.1. Le modèle de Rodriguez <i>et al.</i> (1988)	75
3.3.2. Le modèle de Mafart <i>et al.</i> (2002).....	77
3.3.3. Effet global du pH sur les paramètres de thermorésistance.....	80

Chapitre 4

MODELISATION SECONDAIRE..... 83

4.1. Effet de la température.....	83
4.1.1. Estimation de la valeur des paramètres du modèle de Bigelow.....	83
4.1.2. Evaluation de la qualité d'ajustement.....	84
4.1.3. Analyse des résidus.....	84
4.2. Effet du pH.....	85
4.2.1. Effet du pH du milieu de traitement.....	85
4.2.1.1. Choix du modèle.....	85
4.2.1.2. Estimation des paramètres du modèle linéaire.....	86
4.2.1.3. Analyse des résidus et régions de confiance.....	86
4.2.2. Effet du pH du milieu de recouvrement.....	88
4.2.2.1. Vérification de l'effet létal du pH de recouvrement.....	88
4.2.2.2. Modélisation de cet effet sur la thermorésistance.....	89
4.2.2.3. Estimation des paramètres.....	90
4.2.2.4. Evaluation de la qualité d'ajustement et analyse des résidus.....	92
4.2.2.5. Simplification du modèle.....	92
4.2.2.6. Estimation des paramètres du modèle simplifié et analyse des résidus.....	95

4.3. Modèle global	96
4.3.1. Estimation globale des paramètres.....	97
4.3.2. Analyse des résidus.....	97
4.4. Interactions entre les facteurs	99
4.4.1. Interactions entre température et pH de traitement.....	99
4.4.1.1. Influence du pH sur z_T	99
4.4.1.2. Influence de la température sur z_{pH}	99
4.4.1.3. Analyse de variance.....	101
4.4.2. Interactions entre pH de traitement et pH de recouvrement.....	101
4.4.2.1. Influence du pH de traitement sur z'_{pH}	101
4.4.2.2. Influence du pH' de recouvrement sur z_{pH}	102
4.4.2.3. Analyse de variance.....	103
4.5. Discussion	104
4.5.1. Le modèle de Bigelow.....	104
4.5.2. Modélisation de l'effet du pH de traitement.....	105
4.5.3. Modélisation de l'effet du pH de recouvrement.....	105
4.5.4. Modèle global et interactions.....	107
4.5.5. Extension des concepts classiques.....	109
4.5.5.1. Extension de la méthode de Bigelow.....	111
4.5.5.2. Extension de la méthode de Ball.....	113
4.5.5.3. Combinaison des méthodes de Ball et de Bigelow.....	115

Chapitre 5

APPLICATION DES MODELES A UN PRODUIT INDUSTRIEL..... 117

5.1. Recueil de données et résultats	117
5.1.1. Etude des variations des facteurs du produit aux points critiques.....	117
5.1.1.1. Le facteur température.....	119
5.1.1.2. Le facteur pH.....	120
5.1.1.2.1. <i>Saladière Western</i>	120
5.1.1.2.2. <i>Saladière Mexicana</i>	122
5.1.1.3. Localisation du point défavorable.....	123
5.1.2. Validation.....	123
5.1.2.1. Construction d'une feuille de calcul de barème.....	123
5.1.2.2. Application au produit <i>Saladière</i>	127
5.1.2.3. Résultats.....	128
5.1.2.3.1. <i>Saladière Western</i>	130
5.1.2.3.2. <i>Saladière Mexicana</i>	132
5.1.3. Détermination des barèmes pour les deux <i>Saladières</i>	133
5.1.3.1. Les calculs standards.....	133
5.1.3.2. Les calculs personnalisés.....	134
5.1.3.3. Paramètres propres au process.....	136
5.1.3.4. Proposition de barèmes.....	137

5.1.4. Simulations par la methode de Monte Carlo.....	138
5.1.4.1. Principe de la méthode de Monte Carlo.....	138
5.1.4.2. Estimation de la valeur des parametres et de leur loi de répartition...	139
5.1.4.3. Programmation informatique du calcul.....	142
5.1.4.4. Résultats.....	143
5.2. Discussion.....	145
5.2.1. Caractérisation du produit.....	145
<i>localisation du point critique</i>	
<i>suivi du pH au cours du traitement thermique</i>	
<i>Le pH de recouvrement</i>	
5.2.2. Validation et optimisation des barèmes.....	146
<i>Interprétation des écarts entre barèmes prédits et barèmes observés</i>	
<i>Optimisation des barèmes des Saladières Western et Mexicana</i>	
<i>Simulation et évolution du process</i>	
 Conclusion et perspectives.....	 153
Nomenclature.....	157
Références bibliographiques.....	159
Articles et communications.....	171
Annexes.....	173

INTRODUCTION

Selon les documents les plus anciens, les hommes pratiquaient la désinfection bien avant que l'existence des micro-organismes ne fut connue. Les Egyptiens utilisaient le feu et des désinfectants pour embaumer les corps, tandis que la loi mosaïque commandait aux Hébreux de brûler tout vêtement suspect d'être contaminé par la lèpre.

Pour accroître la durée de conservation de la nourriture, de nouveaux moyens de conservation tels que le fumage ou l'ajout de sel étaient utilisés pour protéger la viande et le poisson de la putréfaction. Dès 3000 av. J.C., des productions de fromages, de laits caillés ou encore de vin voyaient le jour au Moyen-Orient.

En dépit d'une longue tradition d'efforts pour empêcher la détérioration de la nourriture, ce n'est qu'au XIX^e siècle, avec les travaux de Nicolas Appert (1809), qu'une nouvelle méthode de conservation était mise au point : la stérilisation des aliments en bouteilles scellées. Mais il faudra attendre les travaux de Pasteur (1861 - 1864) pour la comprendre, et le XX^e siècle pour moderniser la technologie, intensifier la production et améliorer la qualité. Ce n'est qu'au début des années 1920 qu'une modélisation couplant des cinétiques de destruction thermique des spores bactériennes et les transferts de chaleur, permettra les premières simulations et les premières optimisations de traitements.

De nos jours, l'industrie de la conserve n'a cessé de chercher à se diversifier et à faire évoluer ses produits. Les industriels n'ont pas manqué d'imagination pour mettre au point des gammes de produits très variés allant de la conserve de fruits et légumes au plat mijoté traditionnel. Cependant, le développement de ce procédé de conservation des aliments se trouve confronté à une limite qui est la base même de son existence : le traitement thermique. Ce traitement physique responsable de l'élimination totale des micro-organismes entraîne néanmoins bon nombre de dommages sur la qualité du produit lui-même. La destruction des micro-organismes par la chaleur se fait souvent au détriment des qualités nutritives et organoleptiques de l'aliment. Les vitamines et les protéines sont peu stables aux fortes températures et des goûts de cuit et des modifications de la texture peuvent apparaître. Ces effets

secondaires du traitement thermique font de la conserve un produit de moins en moins attrayant pour le consommateur, au bénéfice des produits frais malgré leur durée limite de consommation réduite. La volonté actuelle des conserveurs est de tendre vers une réduction des barèmes de stérilisation pour améliorer la qualité finale de leurs produits, tout en maintenant la sécurité microbiologique. Cette optimisation des barèmes de stérilisation revient donc, dans une première phase, à déterminer le traitement thermique minimal à appliquer au produit pour atteindre le taux de réduction microbienne souhaité. La valeur stérilisatrice ainsi déterminée, la seconde phase consiste à calculer les modalités optimales d'application de cette valeur stérilisatrice (couple temps et température en conditions isothermes ; couple barème de stérilisation et température de l'autoclave en conditions dynamiques).

Depuis le début du siècle, les connaissances et les méthodes utilisées pour détruire les micro-organismes ont évolué. Les recherches menées notamment dans le domaine de la thermo-résistance permettent de mieux comprendre le comportement d'une population bactérienne pendant un traitement thermique, ainsi que sa capacité à se développer dans l'aliment après avoir subi ces dommages thermiques. C'est alors qu'il devient nécessaire d'établir des modèles mathématiques afin de faciliter l'application dans le domaine industriel.

L'introduction de la microbiologie prévisionnelle remonte aux années 1920 avec notamment les travaux de Bigelow sur les destructions thermiques. A cette époque, les modèles sont basés sur des cinétiques de destruction d'ordre un et sur des modèles ne prenant en compte que la température (modèles d'Arrhénius et de Bigelow). Un regain d'intérêt pour la microbiologie prévisionnelle est apparu à la fin des années 70, avec l'utilisation de modèles de croissance, et de modèles secondaires multifactoriels prenant en compte d'autres facteurs environnementaux que la température, dont un des principaux est le pH.

Les barèmes actuellement appliqués pour la stérilisation sont établis en grande partie d'après l'expérience de l'entreprise. Ils sont déterminés à partir de la valeur de thermorésistance la plus élevée rencontrée dans la littérature ou le cas échéant, à partir d'une valeur déterminée sur un micro-organisme, ayant causé dans le passé un accident de stérilisation. Le modèle de Bigelow qui permet de décrire l'effet de la température, est préféré à celui d'Arrhénius dans le domaine de l'industrie alimentaire. Quant à la prise en compte du pH, seules des données bibliographiques, dont une exploitation directe par l'entreprise reste difficile, ainsi que des données historiques de l'entreprise permettent de moduler empiriquement les barèmes. Dans ces conditions, le

nombre de réductions décimales atteint est difficilement calculable et par conséquent, l'optimisation reste difficile.

L'objectif de ce travail est de réaliser une étude complète de la destruction des micro-organismes soumis à un traitement thermique, en prenant en compte la température et la durée du traitement, ainsi que l'influence du pH de l'aliment agissant sur la vitesse de destruction pendant et surtout après le traitement thermique, étape jusqu'alors négligée. Les connaissances acquises permettront d'approcher encore un peu plus de l'optimisation des barèmes de stérilisation. L'objectif final est la mise au point d'une méthode de calcul permettant d'estimer les barèmes de stérilisation, conduisant précisément au nombre de réductions décimales souhaité. Le calcul ne doit pas surévaluer le barème afin de préserver au mieux les qualités nutritives et organoleptiques du produit, mais ne doit pas non plus le sous estimer afin de respecter la sécurité microbiologique imposée par l'entreprise.

Le premier chapitre sera consacré à un état des lieux du sujet dans le contexte de la microbiologie prévisionnelle actuelle. L'aspect biologique de la destruction sera d'abord rapidement présenté. Le vif du sujet sera abordé par une présentation de l'évolution suivie par la microbiologie prévisionnelle pour arriver aux modèles actuels, exprimant l'effet de la température et du pH sur la thermorésistance des micro-organismes.

Après un chapitre détaillant les matériels et méthodes mis en œuvre dans ce travail, l'ensemble des données expérimentales collectées (effets de la température et du pH sur la thermorésistance) seront examinées. Les résultats seront exprimés sous la forme d'un modèle primaire adapté à chaque souche.

Le quatrième chapitre analysera les données issues de la modélisation primaire afin d'établir un modèle secondaire global interprétant en plus de la température, le pH du milieu de traitement et le pH du milieu de recouvrement, étant entendu que ces deux milieux simulent en réalité un seul milieu constitué par l'aliment, appertisé puis stocké.

Enfin, un dernier chapitre sera consacré à l'application des résultats obtenus et au développement d'une nouvelle méthode de calcul pour l'estimation des barèmes. Une validation sur un produit industriel sera présentée.

Chapitre 1

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

1.1. Généralités sur les spores bactériennes

1.1.1. L'endospore bactérienne

Dans la seconde moitié du XIX^e siècle, Tyndall, Cohn et Koch mettent en évidence le fait que certaines espèces de bactéries peuvent passer une partie de leur vie sous forme de structure cellulaire dormante, connue aujourd'hui sous le nom d'endospore (Prescott *et al.*, 1995). Ces bactéries Gram-positives qui ont le pouvoir de se transformer en petites unités ovales ou sphériques, sont douées d'une résistance extrêmement élevée. L'endospore n'est pas un mode de reproduction. Une bactérie produit une seule spore qui redonnera une bactérie. Il s'agit d'un état de "dormance", dépourvu d'activité métabolique, dans lequel va entrer la bactérie lorsque les conditions physico-chimiques de son environnement vont devenir hostiles à sa survie. L'Institut Pasteur démontre leur exceptionnelle résistance en prélevant des spores à l'intérieur de momies embaumées depuis plusieurs millénaires ; en quelques heures d'incubation à 37°C dans un milieu favorable, la germination puis la croissance de ces spores conduisent à d'abondantes cultures (Leclerc *et al.*, 1995).

Les endospores se développent à partir de cellules végétatives de cinq genres bactériens : *Alicyclobacillus*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Sporolactobacillus* et *Sporosarcina* (Meyer *et al.*, 1991 ; Wisotzkey *et al.*, 1992). Ces structures sont douées d'une résistance extraordinaire aux agressions de l'environnement telles que la chaleur, les radiations ultra violettes, les désinfectants chimiques et la dessiccation. Les endospores sont d'une grande importance en microbiologie industrielle alimentaire du fait d'une part de leur résistance, et d'autre part du caractère pathogène de certaines souches (ex : *Clostridium botulinum*).

La résistance thermique des spores varie fortement en fonction de l'espèce. Chez *Bacillus*, la résistance est liée à la température optimale de croissance de la forme végétative (Gombas, 1983). Les spores de thermophiles seront généralement plus résistantes à la chaleur que celle de mésophiles.

1.1.2. Morphologie et structure

Selon Henriques et Moran (2000), l'architecture de base de l'enveloppe des endospores est probablement conservée en fonction des espèces. La figure I.1 schématise la structure de l'enveloppe sporale.

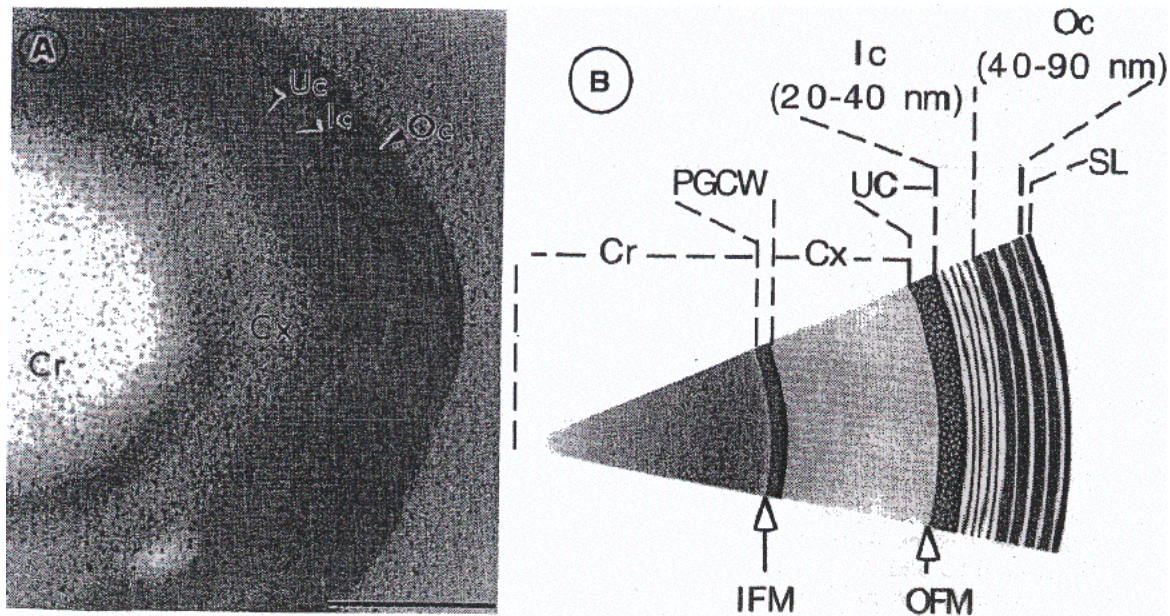


Figure I.1 : A. Photo de microscopie électronique d'une coupe d'une endospore de *Bacillus subtilis*. B. Représentation schématisée de la photo. Cr : Cœur sporale ; IFM : Inner Forespore Membrane ; PGCW : Primordial Germ Cell Wall ; Cx : Cortex ; OFM : Outer Forespore Membrane ; UC : Undercoat ; IC : Inner coat ; OC : Outer Coat ; SL : Surface Layer. Echelle (0,2 µm) - Schéma selon Henriques et Moran (2000). Bar = 0,2 µm.

Le cœur de la spore (Core) contenant notamment le chromosome, est délimité par une membrane interne (IFM), elle-même recouverte d'un mince mur cellulaire (PGCW). Cette structure de base est ensuite enveloppée des couches protectrices.

Les enveloppes constituées autour de la membrane sporale ont des structures et des compositions variées :

- La **paroi sporale PGCW** (ou mur cellulaire), contenant le peptidoglycane normal, qui deviendra après germination de la spore, la paroi de la cellule végétative ;
- Le **cortex Cx**, qui représente 10 à 20% de l'ensemble, est une couche épaisse d'aspect monomorphe, très transparente aux électrons ; il est formé d'un peptidoglycane inhabituel avec beaucoup moins de liaisons internes et très sensible aux lysozymes. Il contient une forte proportion de dipicolinate

de calcium. Son autolyse constitue une étape déterminante de la germination ;

- Les **tuniques interne Ic** et **externe Oc**, représentent 20 à 35% de l'ensemble ; elles sont composées d'une protéine de type kératine riche en liaisons disulfures. Imperméables, elles sont responsables de la résistance aux agents chimiques ;
- L'**exosporium SL** (couche la plus externe) est une membrane lipoprotéique contenant 20% de sucres. Il n'est pas essentiel à la survie de la spore.

1.1.3. Stabilité et résistance aux températures élevées

Les endospores bactériennes sont douées d'une résistance thermique exceptionnelle. Dès 1951, Sugiyama montre que leur faible teneur en eau est probablement la base de cette très forte résistance. Les spores chauffées dans un milieu composé d'acides gras ont une thermo-résistance supérieure à celles chauffées dans un milieu aqueux. De plus, si le milieu de sporulation contient des acides gras, les spores verront leurs membranes et parois enrichies en lipides, et par conséquent resteront moins perméables à l'eau. Il en résulte une augmentation de la résistance de ces spores aux fortes températures.

La forte teneur en calcium doit également intervenir sur la structure spatiale des molécules en liant les groupes chargés négativement.

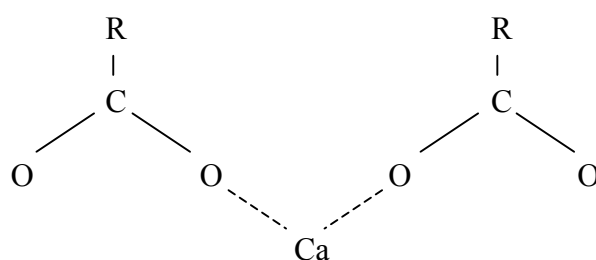


Figure I.2 : Stabilisation de la structure spatiale des macromolécules par les ions Ca^{2+} .

Par le même mécanisme, le calcium peut relier deux groupes chargés négativement sur la même chaîne peptidique, repliée sur elle-même, ce qui lui confère une meilleure résistance aux déformations engendrées par les traitements thermiques. Ceci constituerait également une meilleure résistance thermique des spores (Meyer *et al.*, 1991).

Aujourd'hui encore, on ne sait pas de façon précise pourquoi les endospores sont aussi résistantes à la chaleur et autres agressions extrinsèques. Cependant, cette thermorésistance est en rapport avec la présence d'un constituant chimique spécifique, absent des cellules végétatives : l'acide dipicolinique DPA (acide pyridine-2-6-dicarboxilique).

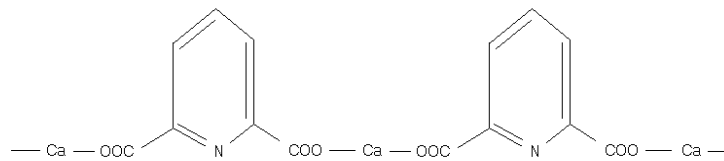


Figure I.3 : Formule chimique de l'acide dipicolinique

L'acide dipicolinique, constituant près de 15 % du poids sec de la spore, est formé exclusivement au cours de la sporulation à partir de l'acide diaminopimélique. Il se trouve complexé à des ions calcium, et serait en partie responsable de la stabilité des composés comme l'ADN (Prescott *et al.*, 1995). Cependant, d'autres mécanismes de résistance entrent en jeu puisque des mutants résistant à la chaleur et dépourvu d'acide dipicolinique ont été isolés. Un autre constituant, l'acide N-succinyl-glutamique, inexistant dans les cellules végétatives et synthétisé dès les premiers stades de la sporulation, est également susceptible de jouer un rôle dans la thermorésistance.

L'état déshydraté des constituants cytoplasmiques, et l'imperméabilité des enveloppes semblent jouer le rôle le plus important. Le contenu en eau de la spore est extrêmement bas, entre 15 à 20% du poids, alors que celui de la cellule végétative est d'environ 80%. Il a été montré que la température de dénaturation de protéines et des acides nucléiques augmente avec le niveau de déshydratation du milieu dans lequel elles sont chauffées. Le maintien de la pression osmotique interne serait assuré par l'acide dipicolinique (par fixation des ions calcium) nécessaire à la conservation de l'état de déshydratation du cœur sporal. En résumé, la résistance de la spore à la chaleur serait due à plusieurs facteurs :

- ⇒ la protection des acides nucléiques grâce au complexe acide dipicolinique – Ca⁺⁺
- ⇒ la stabilisation de la structure spatiale des protéines par l'état de déshydratation
- ⇒ une stabilité accrue des protéines cellulaires chez les bactéries thermophiles.

La sporulation

La spore qui prend naissance à l'intérieur même de la cellule végétative est une cellule entièrement nouvelle et différente du point de vue structure, composition chimique et enzymatique. Le phénomène de sporulation est déclenché par l'épuisement des ressources nutritives dans un contexte physico-chimique qui peut être variable suivant les espèces (Leclerc *et al.*, 1995).

La germination

Les conditions de culture pour le dénombrement des spores sont imposées par les exigences particulières qui se manifestent pendant la transformation de la spore en nouvelle cellule végétative, c'est-à-dire la germination. Cette dernière comprend 2 phases :

- ⇒ La germination proprement dite, pendant laquelle la spore se réhydrate (elle perd alors sa thermo-résistance) et remet en fonction la machinerie des synthèses des acides nucléiques et protéines ;
- ⇒ L'émergence de la cellule hors de l'enveloppe de la spore, et la croissance de la cellule jusqu'au stade de la première division.

La germination non spontanée des spores exige l'apport de composés de faibles poids moléculaires et plus ou moins spécifique de l'espèce et de la souche, tels que le glucose, certains acides aminés dont la L-alanine, des nucléotides (Leclerc *et al.*, 1995 ; Meyer *et al.*, 1991). Le milieu de culture utilisé pour le dénombrement des spores doit contenir ces agents de germination, condition qui est généralement remplie du fait de la composition complexe des milieux habituellement utilisés. Le temps exigé pour la germination complète varie d'une spore à l'autre : il peut atteindre plusieurs jours à plusieurs semaines. Il est fréquent que la vitesse de germination ainsi que le taux de spores germées augmentent à la suite d'un chauffage modéré (on parle alors d'activation par la chaleur). Cette activation est apportée lors de l'appertisation.

1.2. Historique et rappel des bases classiques du calcul des traitements thermiques

Les traitements thermiques sont utilisés en industrie alimentaire pour maîtriser la conservation, et en particulier la qualité sanitaire des produits. Ils peuvent être qualifiés de « pasteurisation » lorsque leur rôle est limité à l'élimination des formes végétatives des germes pathogènes et la plupart des non pathogènes, ou de « stérilisation » lorsque le traitement élimine toute entité viable. Ces traitements de stérilisation appliqués à des doses trop faibles par souci d'économie ou pour préserver la qualité organoleptique des produits, peuvent conduire à une destruction incomplète des micro-organismes. Après une lente récupération au sein de l'aliment, certaines de ces cellules pourront se développer et être la cause d'intoxication alimentaire ou d'altération du produit. Il est donc important pour l'industriel de connaître et de comprendre ces phénomènes d'endommagement infligés aux micro-organismes, afin d'en tenir compte dans l'application des barèmes de traitements en usine.

C'est au début du XIXe siècle, avec les travaux de Nicolas Appert que de nouveaux procédés de conservation des aliments voient le jour. Encore mal maîtrisée, cette nouvelle méthode entraîna de nombreuses intoxications alimentaires graves. Motivée par un grand nombre de décès dus à la consommation de toxines botuliques débute une course pour mieux comprendre et maîtriser l'exceptionnelle résistance thermique de *Clostridium botulinum*, autrefois appelé *Bacillus botulinus*. Les premières investigations remontent à la fin du XIXe siècle. Mais c'est à la suite des travaux de Bigelow et de ses collaborateurs (1920) que perce véritablement la microbiologie prévisionnelle, avec l'application de ces études dans l'établissement des barèmes de stérilisation.

Les premiers travaux dans ce domaine mesuraient la résistance thermique d'une suspension bactérienne en terme de temps de traitement à une température donnée nécessaire pour inactiver cette suspension. On parle alors de « Thermal Death Point ». La procédure usuelle pour déterminer le Thermal Death Point de spores bactériennes est de soumettre une suspension en tubes scellés à une température létale donnée pendant différents temps de traitement. Une subculture permet ensuite de mettre en évidence les tubes devenus stériles, et par conséquent le temps nécessaire pour atteindre la destruction totale (Bigelow *et al.*, 1920 ; Weiss, 1921 ; Esty et Williams, 1924 ; Williams, 1929).

1.2.1. Effet du temps d'exposition à la chaleur

1.2.1.1. Cas général : cinétique de destruction d'ordre un

La découverte de la destruction d'ordre un est souvent attribuée à Madsen et Nyman (1907). Le travail de Chick (1910) sur les cellules végétatives de différentes espèces soumises à des traitements thermiques ou des désinfectants chimiques, ainsi que les travaux de Esty et Meyer (1922), ont universellement accrédité cette loi de destruction exponentielle des micro-organismes, décrite par l'équation :

$$N = N_0 \cdot e^{-kt} \quad \text{Equation I.1}$$

Où N_0 est la taille de la population initiale traitée, N celle de la population survivante au temps t , et k la constante de vitesse de destruction.

L'article de Esty et Williams (1924) montre nettement que la destruction de la population est progressive. On peut suivre l'évolution de la destruction en dénombrant le pourcentage de tube positif après différents temps de traitement. De plus, un nombre connu de spores est introduit dans les tubes scellés. De cette manière, ces auteurs mettent en évidence le fait que la destruction d'une population soit exponentielle, et qu'il est théoriquement impossible de détruire complètement les micro-organismes d'un échantillon, même par un traitement thermique prolongé.

Cependant, il faut attendre 1943 pour que Katzin *et al.* introduisent la notion de « Decimal Reduction Time », encore notée DRT, et enfin 1957 pour que Ball et Olsen notent désormais cette durée de réduction décimale par la lettre D , qui sera universellement adoptée. De ce fait, l'équation log-linéaire est aujourd'hui mieux connue sous cette forme décimale :

$$\log N = \log N_0 - \frac{t}{D} \quad \text{Equation I.2}$$

Cette dernière forme reste actuellement la plus populaire pour au moins deux raisons :

- ⇒ La forme logarithmique a pour double avantage de rendre l'équation linéaire (Estimation des paramètres N_0 et D par simple régression linéaire) et de stabiliser la variance.
- ⇒ Le choix de la forme décimale offre l'avantage d'engendrer un paramètre de thermorésistance D ayant la dimension d'un simple temps et immédiatement interprétable : temps de traitement conduisant à une réduction de la population survivante d'un facteur 10.

Les paramètres D et k sont liés par la relation :

$$D = \frac{\ln 10}{k} \quad \text{Equation I.3}$$

Aujourd'hui, les résultats concernant la destruction des micro-organismes par un traitement létal sont très souvent représentés sur graphique semi-logarithmique, et appelés courbes de survies. L'inverse de la pente (en valeur absolue) est alors appelée temps de réduction décimale et notée D. Or, cette destruction semi-logarithmique implique que la durée de réduction décimale reste constante au cours du traitement ce qui ne s'applique pas à tous les cas de figure.

1.2.1.2. Cas particuliers de destruction non log-linéaires

Dans de nombreux cas, on observe des déviations à ce modèle. Les populations composées de micro-organismes aux thermo-résistances variables ne suivront plus la destruction d'ordre un. En 1977, Cerf met en garde contre une utilisation abusive des équations I.1 et I.2 pour l'estimation de barèmes de stérilisation en entreprises alimentaires ou pharmaceutiques.

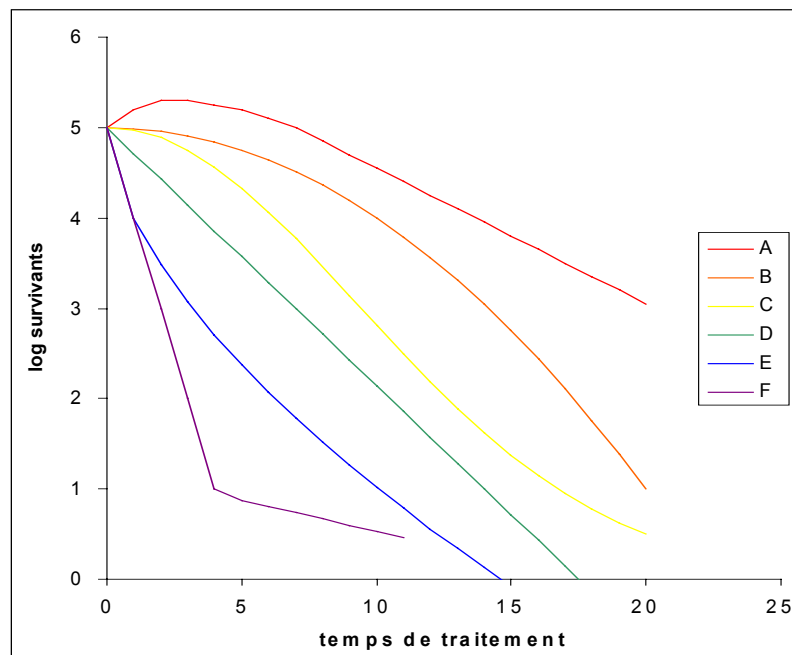


Figure I.4 : Les différents profils de destruction de populations bactériennes par la chaleur d'après Cerf (1977), en log CFU en fonction du temps de traitement thermique (en min).

Les cinétiques rencontrées Figure I.4 laissent généralement apparaître un délai en début de destruction, voire une activation (cinétiques A & B). On dit alors que la cinétique forme un épaulement. A l'inverse, on observe parfois une queue, encore appelée traînée, où le taux de destruction diminue au cours du traitement thermique (cinétiques E & F). Il s'agit d'un ralentissement de la vitesse de destruction au cours du traitement thermique. Enfin, ces deux phénomènes peuvent être rencontrés sur une même cinétique. La courbe prend alors une allure sigmoïdale (cinétique C).

Par la suite plusieurs auteurs se sont intéressés à ces courbes de survie non linéaires et quelques modèles nouveaux ont vu le jour. On ne présentera ici que les modèles primaires utilisés dans le cadre de ce travail.

❑ *L'activation thermique*

La figure I.5 montre que le profil de destruction de cette souche n'est pas linéaire au cours des premières minutes du traitement. Ceci s'explique par le fait que pour permettre leur germination, certaines spores nécessitent une activation qui peut être engendrée par un choc physique ou chimique, tel que le choc thermique ou osmotique. Un traitement thermique infligé à une population de spores pourra avoir, dans un premier temps, deux effets simultanés : Une activation thermique des spores couplée à une destruction. Les auteurs ayant modélisés ces cinétiques se sont appuyés sur des raisonnements mécanistes. Le modèle le plus simple (Schull et *al.*, 1963)

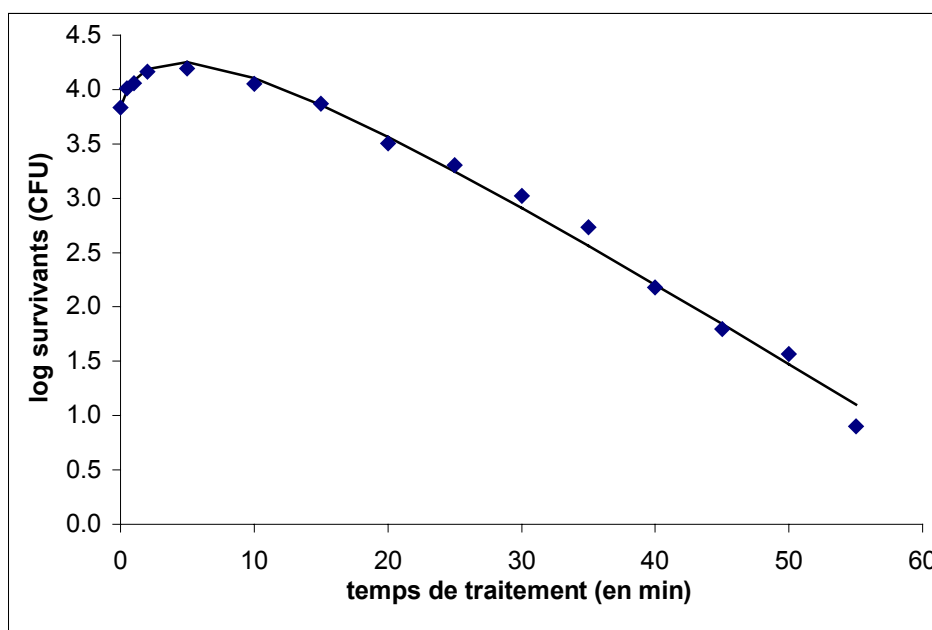


Figure I.5 : cinétique de destruction d'un *Bacillus stearothermophilus* à 113°C

suppose que la population de spores dormantes ne peut être détruite qu’après avoir été activée. Rodriguez *et al.* (1988, 1992) suppose que les spores dormantes, tout en étant thermiquement activées, subissent un même taux de destruction que les spores actives. Le modèle le plus complet est celui de Sapru (1993) qui ne diffère du précédent que par un taux de destruction des spores actives différent du taux de destruction des spores dormantes.

Le modèle s’écrit :

$$N = X_0.e^{-k_1t} + Y_0 \frac{h}{k_2 - k_1 + h} \left(e^{-k_1t} - e^{-(k_2+h).t} \right) \quad \text{Equation I.4}$$

où X_0 et Y_0 sont respectivement les populations initiales de spores actives et dormantes, h est le taux d’activation, k_1 et k_2 sont respectivement les taux de destruction des populations actives et dormantes.

□ *Les populations hétérogènes*

L’étude de la thermorésistance de la souche de *Bacillus cereus* B_{2ac} par Rajkowski (1987) a conduit à des profils de destruction en deux parties distinctes. La cinétique de destruction à 102,5°C est représentée figure I.6. Il s’agit d’une souche dont la cinétique laisse apparaître une « cassure » de pente. Ceci est interprété par une sporulation conduisant à deux familles de spores qui possèdent chacune une thermorésistance propre. Nous pouvons alors déterminer une durée de réduction décimale pour chacune des deux sous-populations.

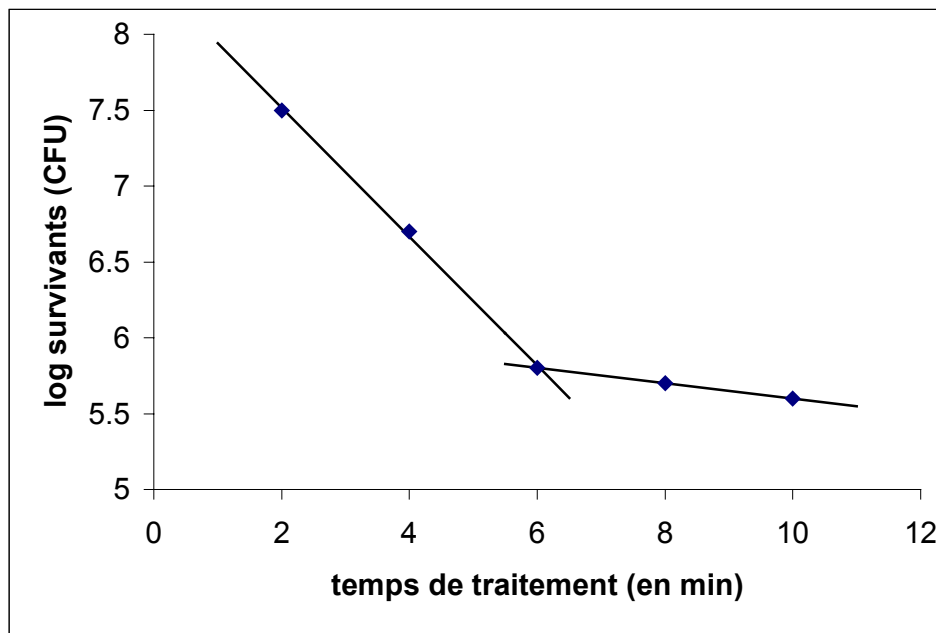


Figure I.6 : Cinétique de destruction de *Bacillus cereus* B₂ac à 105,5°C (Rajkowski, 1987)

□ Les populations hétérogènes avec activation thermique

Il s'agit d'une combinaison des deux cas précédents. La courbe de survie laisse apparaître deux sous-populations de spores, mais la plus thermorésistante ne suit pas une destruction log-linéaire, et nécessite une activation thermique. Rodriguez *et al.* (1988) reprennent l'équation 4 et lui ajoutent un terme correspondant à la destruction log-linéaire de la population thermosensible. L'équation devient :

$$N = Z_0 \cdot e^{-k_1 t} + X_0 \cdot e^{-k_2 t} + Y_0 \left(e^{-k_2 t} - e^{-(k_2 + h) \cdot t} \right) \quad \text{Equation I.5}$$

- où
- Z_0 est le nombre de spores de la population thermosensible initiale
 - X_0 est le nombre de spores actives de la population thermorésistante
 - Y_0 est le nombre de spores inactives de la population thermorésistante
 - k_1 est la constante de destruction de la population thermosensible
 - k_2 est la constante de destruction de la population thermorésistante
 - h est la constante de vitesse à laquelle les spores Y s'activent en X .

Lorsque les deux sous-populations suivent une destruction log-linéaire (figure I.6), c'est-à-dire sans activation thermique nécessaire ($h = 0$), le modèle devient :

$$N = Z_0 \cdot e^{-k_1 t} + X_0 \cdot e^{-k_2 t} \quad \text{Equation I.6}$$

□ *L'épaulement et la traînée*

L'épaulement ou la traînée sont caractérisés par une thermorésistance qui varie au cours du traitement thermique.

La figure I.7 représente une cinétique de destruction de *Clostridium botulinum* à une température de traitement de 90°C (Stringer, 1996). On observe une traînée, c'est à dire une destruction beaucoup plus lente en fin de traitement. Ceci traduit une distribution très hétérogène de la thermo-résistance au sein de la population.

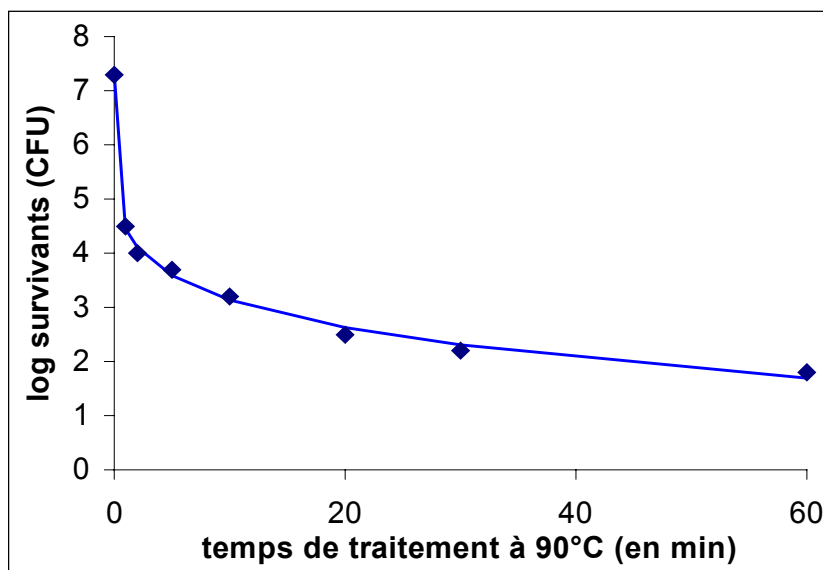


Figure I.7 : Cinétique de destruction de *Clostridium botulinum* (Stringer, 1996)

L'Haridon et Cerf (1978) proposent un modèle simple pour décrire la cinétique de type épaulement ou traînée :

$$\log N = -\frac{t}{D} + a \quad \text{Equation I.7}$$

Où l'ordonnée à l'origine a correspond à la population initiale virtuelle que l'on obtiendrait par extrapolation de la droite vers l'origine. Mais ce modèle se limite à la partie linéaire de la cinétique, qui n'est pas toujours bien définie.

Anderson *et al.* (1996) étudient la destruction d'une population de *Clostridium botulinum* 213B à des températures de traitement variant de 101 à 121°C. Ils montrent pour chaque température testée, que les courbes de survie divergent de la forme logarithmique prévue par le modèle traditionnel d'ordre un. Ces résultats suggèrent que toutes les spores de la population ne possèdent pas une thermorésistance identique. Dans le cas de l'épaule ou de la traînée, les individus de la population traitée n'ont pas une thermo-résistance identique, et ces différences sont permanentes.

Postulant que la distribution des valeurs de thermo-résistance au sein d'une population sont hétérogènes, certains auteurs (Fernandez, 1999 ; Peleg et Cole, 1998 et 2000) mettent en évidence une distribution des thermo-résistances de Weibull, dont l'intégration correspondrait à la population survivante en fonction du temps de traitement :

$$N = N_0 \cdot e^{-kt^p} \quad \text{Equation I.8}$$

Où k et p sont deux paramètres empiriques caractérisant la distribution des thermo-résistances.

Peleg et Cole (1998) présenteront ce modèle sous sa forme logarithmique. L'intérêt de ce modèle est de ne comporter que de trois paramètres.

Mafart *et al.* (2002) vont plus loin en reparamétrant l'équation afin de donner une signification physique à chacun des paramètres :

$$\log N = \log N_0 - \left(\frac{t}{\delta} \right)^p \quad \text{Equation I.9}$$

où δ remplace la traditionnelle valeur D . Il s'agit de la durée de la première réduction décimale de la cinétique. Le paramètre p reflète la répartition des thermo-résistances au sein de la population. La valeur de p est très stable et varie peu en fonction de la température et des autres facteurs environnementaux. Pour une population donnée, p peut alors être fixé quelles que soient les conditions environnementales.

L'intérêt de ce modèle est de s'adapter facilement à de nombreuses cinétiques de destruction non linéaire. De façon générale, les courbes convexes sont ajustées par un $p > 1$, et les courbes concaves par un $p < 1$. Quand la destruction est linéaire, p prend

la valeur de 1, conduisant au modèle classique log-linéaire ($\delta = D$). Ainsi il a été vérifié que δ obéit à la relation de Bigelow, au même titre que D.

Un grand nombre de modèles autres que ceux présentés ci-dessus ont été proposés. La plupart sont mécanistes ou pseudo-mécanistes. Citons pour conclure la revue exhaustive de Geeraerd *et al.* (2000) reprenant l'ensemble de ces modèles.

Cependant aujourd'hui encore, les cycles de stérilisation des industries alimentaires ou pharmaceutiques sont basés sur la loi de destruction exponentielle. Dans les cas où la durée de réduction décimale diminue au cours du traitement, la réduction effectuée sera supérieure à celle prévue par le modèle linéaire. Mais si la durée de réduction décimale augmente au cours du traitement (Fig I.4, courbes C et E), la destruction effectuée devient inférieure à l'estimation, pouvant alors engendrer des accidents de stérilisation. Anderson (1996) va même plus loin en montrant que les cinétiques « concaves » telles que la courbes E (fig I.4) vont tendre vers une asymptote, et qu'il devient impossible d'atteindre le « minimum *botulinum* cook » correspondant aux 12 réductions décimales. Ainsi, le travail présenté prédit qu'un traitement de 3 min à 121,1°C sur la souche de *Clostridium botulinum* utilisée engendre seulement 7 réductions décimales, ce qui prouve que dans ce cas le « *botulinum* cook » n'est pas respecté.

1.2.2. Effet de la température sur les paramètres des modèles primaires

Pendant longtemps, la modélisation secondaire est restée au stade monofactoriel, où seule la température de traitement était prise en compte. Deux modèles, pourtant incompatibles entre eux, présentent la même qualité d'ajustement remarquable :

Le modèle d'Arrhenius (1889)

L'équation décrit l'effet de la température sur la valeur de la constante de destruction k :

$$k = B.e^{-\frac{E_a}{RT}} \quad \text{Equation I.10}$$

Où T est la température absolue de traitement, E_a l'énergie d'activation, R la constante des gaz parfaits, et B une constante empirique.

L'inconvénient de ce modèle est que B n'a aucune signification physique, et un ordre de grandeur difficile à concevoir. C'est pourquoi le modèle est souvent reparamétrisé sous la forme :

$$k = k^* . e^{-\frac{E_a}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T^*} \right)} \quad \text{Equation I.11}$$

Où k^* représente alors le taux de destruction à la température de référence T^* .

Le modèle de Bigelow (1921)

Cette équation repose sur l'observation selon laquelle le logarithme de la durée de réduction décimale évolue de façon linéaire en fonction de la température. Il s'écrit sous la forme :

$$\log D = \log D^* - \frac{T - T^*}{z} \quad \text{Equation I.12}$$

Où D^* représente la durée de réduction décimale à la température T^* , tandis que z représente l'écart de température induisant une variation de D d'un facteur dix.

Contrairement à leurs apparences très différentes, il est difficile de départager ces deux modèles tant leurs qualités d'ajustement sont proches. Le premier caractérise la thermosensibilité d'un micro-organisme à partir des paramètres E_a et k^* , tandis que le second exprime la thermorésistance par les paramètres D^* et z . Dans les milieux agroalimentaires, le modèle de Bigelow est pourtant préféré, compte tenu de son paramètre z plus tangible que l' E_a du modèle d'Arrhenius.

1.2.3. Quantification des traitements thermiques

1.2.3.1. Nombre n de réductions décimales

La manière la plus directe de quantifier un traitement thermique est de caractériser celui-ci par son **efficacité** sur une souche cible donnée, c'est-à-dire par le taux de réductions atteint (N/N_0) après le traitement. Cette efficacité est souvent exprimée par le taux de réduction décimal noté n et défini par :

$$n = \log \frac{N_0}{N} \quad \text{Equation I.13}$$

1.2.3.2. Notion de valeur stérilisatrice (F)

La valeur stérilisatrice est un concept répandu dans l'industrie de la pasteurisation et de l'appertisation. Elle est utilisée pour quantifier un traitement thermique indépendamment de la cible visée. Elle correspond à tout traitement entraînant le même taux de destruction qu'un traitement à la température de référence (121,1°C) pendant t minutes :

$$F = t_{121,1^\circ\text{C}} \quad \text{Equation I.14}$$

Lorsque le traitement est réalisé à une température différente de 121,1°C, le temps nécessaire pour atteindre la valeur stérilisatrice F souhaitée est, selon la relation de Bigelow :

$$t = F_{T^*} \cdot 10^{\frac{T-T^*}{z}} \quad \text{Equation I.15}$$

Où t est le temps de traitement à la température T pour atteindre la valeur stérilisatrice $F_{121,1}$.

La valeur de z est conventionnellement fixée à dix (en référence à la valeur relative à *Clostridium botulinum*).

1.2.3.3. Notion de valeur de destruction biologique (VDB)

On définit la valeur de destruction biologique, notée L_T , par le rapport entre la fragilité des spores à la température T et la fragilité des mêmes spores à la température de référence T^* :

$$L_T = \frac{1/D}{1/D^*} = \frac{D^*}{D} \quad \text{Equation I.16}$$

Par conséquent, selon la relation de Bigelow,

$$L_T = 10^{\frac{T-T^*}{z}} \quad \text{Equation I.17}$$

Les traitements thermiques sont généralement réalisés en conditions dynamiques, c'est-à-dire à des températures variant du début à la fin du traitement. La valeur stérilisatrice devient alors :

$$F_{T^*} = \int_{t_0}^{t_f} L_T . dt \quad \text{Equation I.18}$$

1.2.3.4. Relation avec la durée de réduction décimale

Par définition, la durée de réduction décimale D_T est le temps de traitement à la température T nécessaire pour réduire une population d'un facteur 10. On peut alors écrire :

$$\log \frac{N_0}{N} = \frac{t}{D_T} = n \quad \text{Equation I.19}$$

Où n est le nombre de réductions décimales appliqué. On en déduit :

$$t_T = n . D_T \quad \text{Equation I.20}$$

L'équation I.20 devient dans les conditions standards de température :

$$t_{T^*} = F_{T^*} = n.D_{T^*} \quad \text{Equation I.21}$$

1.3. Effet du pH sur la thermorésistance

La résistance thermique d'un micro-organisme varie en fonction des conditions physiologiques et physico-chimiques dans lesquelles il se trouve avant, pendant et après le traitement thermique. Les facteurs modifiant éventuellement l'allure de la destruction thermique des micro-organismes sont :

- *des facteurs intrinsèques* : thermo-résistance variable selon les espèces, les individus, les formes végétatives ou sporulées, l'âge, l'état physiologique ...
- *des facteurs environnants* : pH, l'activité de l'eau, présence de lipides et de protéines, pression osmotique, les sels minéraux.

Pour chaque facteur physique ou chimique du milieu de traitement jouant un rôle sur la thermo-résistance des micro-organismes, on peut mettre en évidence deux effets distincts. D'une part, on observe un effet s'exerçant sur les spores au moment du traitement thermique. D'autre part, la germination et la recroissance qui suit le traitement thermique sont également influencées par la composition physico-chimique du milieu.

Notre travail est consacré à l'étude complète d'un de ces facteurs : le pH. L'influence du pH est étudiée d'une part au cours du traitement thermique, et d'autre part après ce traitement, que l'on désignera par recouvrement. Ces deux effets peuvent être indépendants et constituent deux facteurs distincts. La présentation ci-après dissociera l'effet du pH de traitement de celui du pH de recouvrement.

1.3.1. Le facteur pH du milieu de traitement

1.3.1.1. Influence de l'acidification du milieu de traitement

Sur la multitude de facteurs pouvant influencer la résistance thermique des micro-organismes, qu'ils soient physiques, chimiques ou biologiques, certains se distinguent par leur effet prépondérant. Parmi eux, le pH du milieu est probablement le

facteur concernant le plus l'industrie alimentaire, compte tenu de l'acidité d'une grande majorité des produits alimentaires et de son effet substantiel sur les spores bactériennes chauffées.

L'effet du pH a été mis en évidence très tôt. Les premières données publiées sur cette influence sur les cinétiques de destruction thermique remontent à près d'un siècle. Souvent, l'influence du pH est illustrée indirectement par des études effectuées sur des jus acides (ex : jus de fruits). Dickson (1919) qualifie de remarquable l'effet produit par l'ajout de jus de citrons sur la résistance thermique de suspensions de spores.

En 1920, Bigelow et Esty font varier progressivement le pH de leur milieu de traitement de 4,5 à 6,5. Le Thermal Death Point est évalué à différents pH pour cinq souches thermophiles. Malgré une forte hétérogénéité des valeurs de thermorésistance, la même tendance est mise en évidence pour toutes les souches.

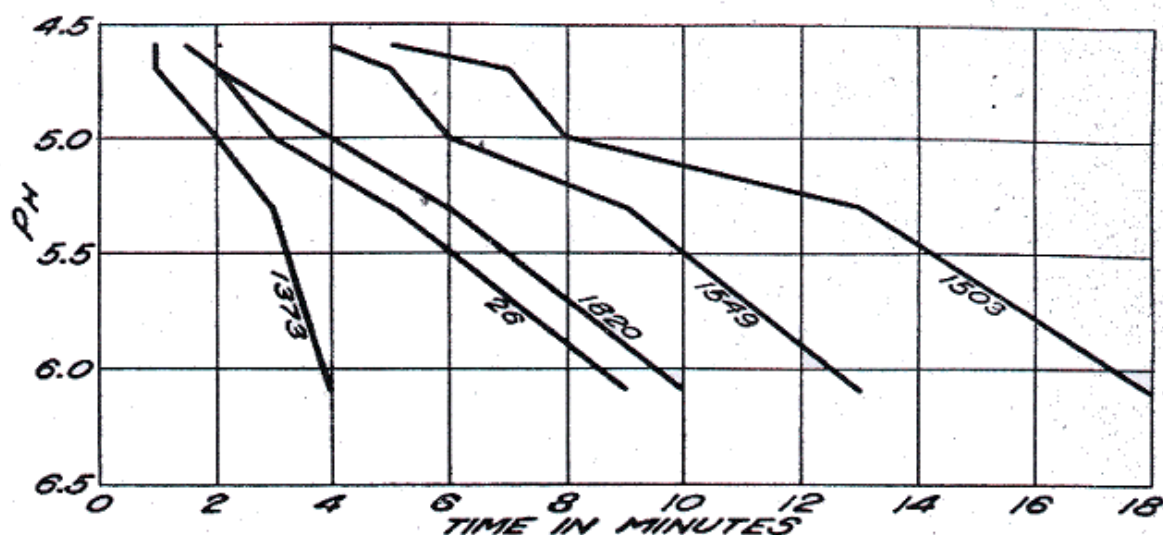


Figure I.8 : Influence du pH sur le temps nécessaire pour détruire des spores de cinq souches thermophiles différentes chauffées à 120°C, d'après Esty et Bigelow (1920).

L'effet d'une acidification sur la thermorésistance des spores est clairement illustré par la figure I.8. Des temps de traitement de 4 minutes à pH 6,1 entraînent un même taux de destruction qu'un traitement d'une minute à pH 4,6 pour la souche 1373. Si l'on considère la souche 1503, un traitement de 18 minutes à pH 6,1 est réduit à 5 minutes à pH 4,6. Autrement dit, pour toutes ces souches, l'acidification du milieu de 1,5 unités de pH rend les traitements thermiques quatre fois plus efficace en termes de destruction microbienne.

Esty et Meyer (1922) déterminent le « Thermal Death Point » dans deux milieux différents à des pH variant de 3,5 à 9. Les variations de thermorésistance engendrées par les acidifications ou alcalinisation sont particulièrement nettes. De plus, on observe déjà une valeur de pH pour laquelle la thermo-résistance est optimale. Ce pH provoquant la destruction bactérienne la plus lente se situe près de la neutralité. La figure I.9 illustre l'influence du pH du milieu sur le Thermal Death Point, avec une valeur de pH de thermo-résistance optimale voisine de 7.

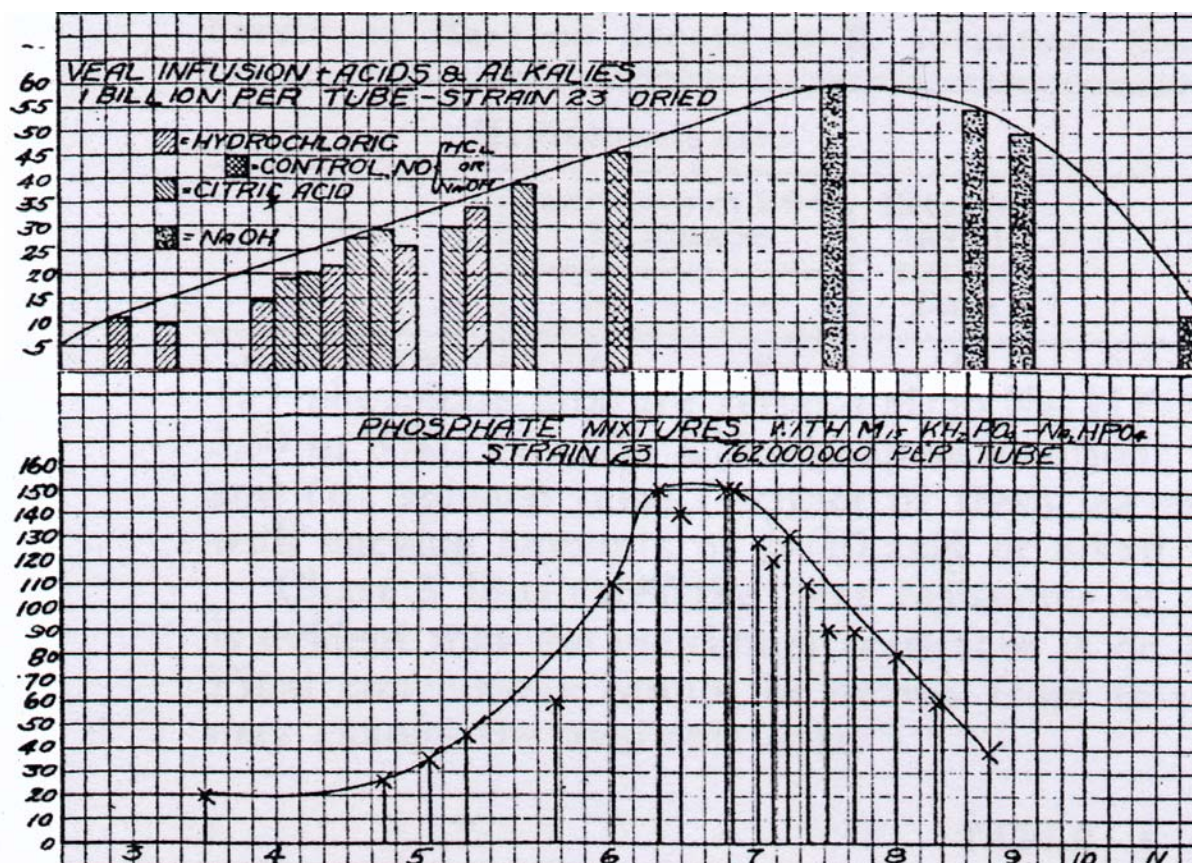


Figure I.9 : Influence du pH (en abscisse) sur le Thermal Death Point (en ordonnée, exprimée en mn) d'après Esty *et al.* (1922)

Sur les deux graphiques, nous pouvons lire qu'un traitement thermique effectué à pH 4,5 inactive complètement une population bactérienne en 10 fois moins de temps qu'un même chauffage opéré dans un milieu à pH 6,5.

Contrairement au traitement en milieu phosphate, le traitement dans l'infusion de veau laisse apparaître une linéarité très nette entre le temps d'inactivation et le pH du milieu.

L'année précédente, Harry Weiss obtenait des résultats similaires sur une souche de *Clostridium botulinum* traitée à des pH variant de 1,5 à 11,5. Le pH optimum de thermo-résistance était encore une fois proche de la neutralité.

Puis, cette observation a ensuite été confirmée à de nombreuses reprises (tableau I.1). Schmidt (1957) rapporte que la résistance thermique maximale pour les spores se situe généralement entre 6 et 8.

Tableau I.1 : exemple bibliographique de pH optimum de thermo-résistance

souches	pH optimum	référence
<i>Clostridium botulinum</i>	7,2	Weiss (1921)
<i>Clostridium tetani</i>	7	Murray et Headlee (1931)
<i>Bacillus anthracis</i>	8	Murray (1931)
<i>Clostridium perfringens</i>	5	Headlee (1931)
<i>Bacillus cereus</i>	7	Vas et Prosz (1955)
<i>Bacillus cereus</i>	7,5	Gaillard <i>et al.</i> (1998b)
<i>Bacillus cereus</i>	7,15	Couvert <i>et al.</i> (1999)

Les nombreuses études qui ont suivi, portant sur l'influence du pH sur la thermorésistance, sont unanimes : l'acidification du milieu de traitement entraîne une diminution notable de la durée de réduction décimale des micro-organismes chauffés (Cook et Gilbert, 1968 ; Lowik et Anema, 1971 ; Lynch et Potter, 1988 ; Silla Santos *et al.*, 1992, 1993, 1995 ; Lopez *et al.*, 1994, 1996 ; Fernandez *et al.*, 1996).

1.3.1.2. Influence de la nature de la matrice

Des études menées sur le pH se dégagent l'importance de la nature des matrices alimentaires sur trois souches de *Bacillus cereus* (Mazas *et al.*, 1998). La souche 4342 voit sa thermorésistance varier en fonction de la nature de l'aliment dans lequel elle est chauffée (figure I.10). Près d'un demi log sépare les valeurs de D déterminées dans un tampon de Mac Ilvaine à celles déterminées dans un bouillon de riz. On a également observé que les variations de D en fonction du pH sont identiques, quelle que soit la nature de la matrice. Les effets du pH et de la matrice sont à priori indépendants.

Mais ces effets restent particuliers à une seule des trois souches de *Bacillus cereus* étudiées par ces auteurs. Pour les deux autres souches, aucun effet de la matrice n'est mis en évidence. Il s'agit donc d'un effet propre à certaines souches et ne peut à priori être généralisé.

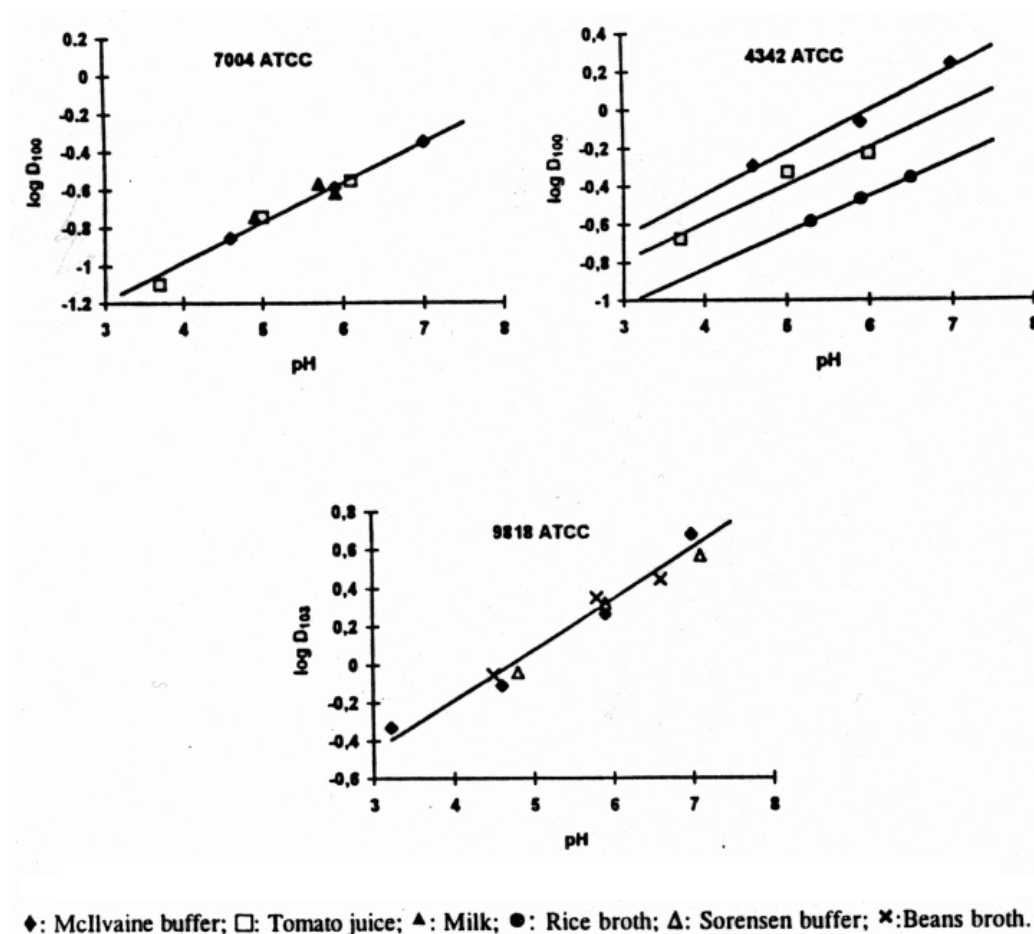


Figure I.10 : Influence du pH et du milieu de suspension sur la thermorésistance de spores de *Bacillus cereus* (Mazas et al., 1998). Valeurs de D exprimée en min.

1.3.1.3. Influence de la nature de l'acidifiant

L'ajout d'un acide dans le milieu de traitement va engendrer, en plus de l'acidification par libération de protons, une modification de la composition du milieu par apport de sa base conjuguée. La base conjuguée pourra être minérale ou organique. Silla Santos (1992, 1995) compare les effets de l'acidification d'une purée d'asperge par de la glucono- δ -lactone et de l'acide citrique sur la thermorésistance d'une suspension de *Clostridium sporogenes* PA 3679. La comparaison des valeurs de D obtenues selon le type d'acidifiant montre que l'acide citrique réduit plus fortement la durée de réduction décimale que la glucono- δ -lactone à un même pH. D'autres auteurs ont également mis en évidence cet effet du type d'acide (Lynch et Potter, 1988 ; Brown et Martinez, 1992).

Leguérinel et Mafart (2001) publient les résultats d'une étude comparant l'effet de neuf acides organiques différents sur la valeur de D d'une souche de *Bacillus*

cereus. Chaque acide, par son acidification, va entraîner une diminution de la valeur de D. Mais pour une même valeur de pH, deux acides différents ne vont pas conduire à la même valeur de D. Ces auteurs montreront qu'il existe une relation linéaire entre le pKa de l'acide et son incidence sur D : Plus le pKa de l'acide est élevé et plus son effet sur la thermo-résistance est important (Anderson *et al.*, 1949 ; Leguerinel et Mafart, 2001 ; Pontius *et al.*, 1998).

1.3.1.4. Interaction entre les facteurs température et pH

Silla Santos *et al.* (1993) remettent en cause l'influence du pH aux fortes températures (>130°C). Selon ces auteurs, une acidification de la purée d'asperge par l'acide citrique entraîne une nette réduction des valeurs de D à 121°C. Mais cet effet devient moins marqué lorsque le traitement est effectué à des températures supérieures à 130°C.

Ces résultats font ressortir la présence d'interactions entre les facteurs pH et Température. D'autres auteurs exposent des résultats similaires : les effets des facteurs pH et Température tendent à s'atténuer lorsque leurs valeurs s'éloignent des conditions favorables à la survie des micro-organismes. (Anderson et Friesen, 1974). De même, Rodrigo *et al.* (1993) observe que le pH n'a pas d'effet sur la thermorésistance de spores de *Bacillus stearothermophilus* et *Clostridium sporogenes* quand elles sont chauffées en HTST (High Temperature Short Time). Ces mêmes résultats sont confirmés par Ocio *et al.* (1994) et Fernandez *et al.* (1994) sur *Bacillus stearothermophilus*, puis par Mazas *et al.* (1998) sur *Bacillus cereus*.

Cependant, *Clostridium sporogenes* semble faire exception à cette règle puisque plusieurs auteurs révèlent que pour cette espèce, la valeur de z n'est pas influencée par le pH (Silla Santos *et al.*, 1995 ; Cameron, 1980). De plus, les résultats de ces derniers auteurs semblent montrer que *Clostridium sporogenes* est plus sensible à l'effet du pH aux températures les plus élevées.

D'après les travaux de Silla Santos *et al.* (1992), l'acidification d'une purée d'asperge par de l'acide citrique ou de la glucono-δ-lactone entraîne une diminution de la durée de réduction décimale pour *Clostridium sporogenes* PA 3679. Cependant, l'effet du pH sur D diminue lorsque la température de traitement augmente. A 118°C et 121°C, cet effet devient négligeable lorsque l'acide citrique est utilisé. Par ailleurs, l'effet de la glucono-δ-lactone se maintient partiellement aux fortes températures.

Cette action de la température sur l'effet du pH semble donc dépendre de l'acide utilisé. Ceci est confirmé par les résultats de Lowik et Anema (1972) obtenus sur une souche de *Clostridium sporogenes* traitée dans de la viande hachée. Leur

domaine d'étude s'étend de 110 à 120°C, et de pH 4,8 à 6. De même, l'influence du pH est plus accentuée aux basses températures.

Toutes ces données bibliographiques nous montrent que les deux facteurs appliqués simultanément tendent souvent à s'atténuer mutuellement. En d'autres termes, leurs effets simultanés sont inférieurs à la somme de leurs effets étudiés indépendamment. Ces interactions ont évidemment des conséquences pratiques qui doivent être prises en compte.

1.3.2. Le facteur pH du milieu de recouvrement

Mallidis (1986) rapporte que les spores survivantes à un traitement thermique sont souvent plus exigeantes d'un point de vue nutritionnel que les spores non traitées. La nature du milieu de recouvrement peut alors affecter significativement le taux de survivants à un traitement thermique.

Les premières études concernant le facteur pH furent menées en tubes thermoscellés. Le milieu de traitement ajusté au pH étudié, puis inoculé par une suspension de spores, était introduit dans des tubes, scellés à la flamme, et portés à la température de traitement souhaitée dans des bains thermostatés. En fin de traitement thermique, les tubes étaient incubés en l'état. Le recouvrement se faisait donc dans le même milieu et au même pH que le traitement. Les tubes positifs étaient ensuite révélés.

Ce n'est qu'en 1950 que Olsen et Scott réalisent des traitements thermiques sur des spores de *Clostridium botulinum* suspendues dans un tampon phosphate à pH7. A l'issue du traitement, les spores sont mises en incubation dans différents milieux nutritifs ajustés à des pH variant de 5 à 9. On observe alors un taux de spores qui varie avec le pH de recouvrement, bien qu'ayant subi des traitements thermiques rigoureusement identiques (figure I.11). Le pH du milieu post traitement joue donc un rôle sur la thermo-résistance apparente des spores bactériennes.

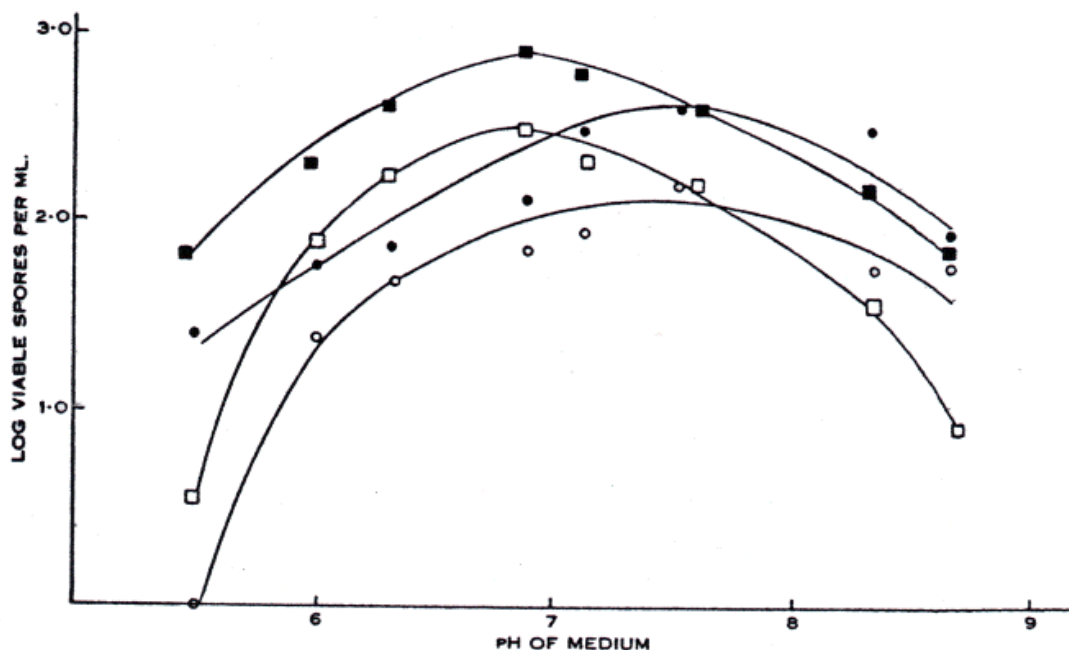


Figure 1.11 : représentation du nombre de spores viables de deux souches de *Clostridium botulinum* en fonction du pH de recouvrement dans deux milieux (selon Olsen et Scott (1950). Cercle : souche 1 ; Carré : souche 2 ; Noir : milieu 1 ; Blanc : milieu 2.

Malgré l'effet considérable du pH du milieu post-traitement sur le recouvrement des spores, peu d'articles reprennent ce sujet pendant les décennies suivantes.

Cook et Brown (1965) précisent qu'une différence de 0,5 unités de pH affecte significativement le recouvrement de spores traitées. Ils observent également une différence entre les spores traitées et non traitées. Ainsi, le taux maximum de germination de spores de *Bacillus stearothermophilus* non traitées est obtenu dans un milieu à pH voisin de 6,5 alors que les spores ayant subi un traitement thermique germent plus abondamment à des pH compris entre 7 et 7,3. Ces observations traduisent une réorientation du métabolisme chez les spores devant réparer des dommages endurés lors d'un passage à des températures létales.

Feeherry (1987) confirme ces résultats sur des spores de *Bacillus stearothermophilus*. Le taux de spores capables de germer et de proliférer à pH 5,8 par rapport au pH optimum de 6,9 est de 1%. Cet effet du pH de recouvrement s'avère donc encore plus drastique que celui du pH de traitement, d'où le grand intérêt de le prendre en compte dans les études de stérilisations de produits à caractère acide.

Depuis, de nombreuses publications ont décrit cet effet du pH du milieu de recouvrement sur la thermorésistance (Mallidis et Scholefield, 1986 ; Sanchez *et al.*, 1995 ; Fernandez *et al.*, 1994 ; Silla Santos *et al.*, 1995 ; Gonzales *et al.*, 1995 ; Santos et Zarzo, 1996 ; Lopez *et al.*, 1997 ; Couvert *et al.*, 1999 ; Leguérinel *et al.*, 2000).

Le recouvrement dans un milieu dont le pH est inférieur au pH optimum (généralement voisin de 7) réduit le taux de survie du nombre de micro-organismes que Mafart et Leguérinel (1997) qualifient d'apparent, et qu'ils notent N' . De même, ces auteurs notent D' la durée de réduction décimale apparente déterminée à des pH de recouvrement différents du pH pour lequel le taux de survie est maximal. Par conséquent :

$$N' = N_0 \cdot 10^{-\frac{t}{D'}} \quad \text{Equation I.22}$$

Les derniers auteurs cités ont montré que D' et α , taux de viabilité N'/N , étaient liés selon l'équation :

$$\log \alpha = -\left(\frac{D}{D'} - 1\right) \frac{F_{121,1^\circ C}}{D_{121,1^\circ C}} \quad \text{Equation I.23}$$

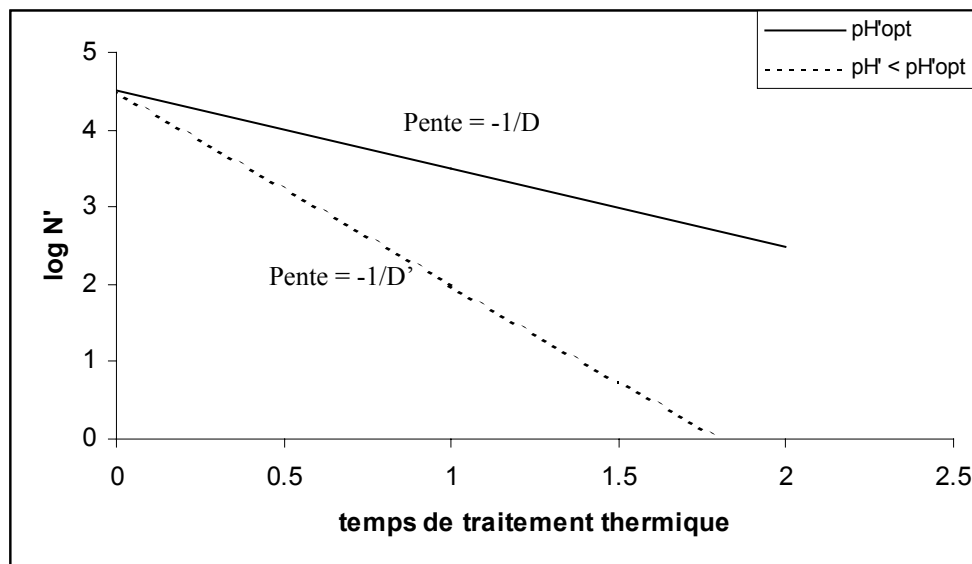


Figure I.12 : Représentation du logarithme de N' (taille de la population survivante) en fonction du temps de traitement (en min). La durée de réduction décimale est notée D pour un recouvrement au pH optimum, et D' pour un pH différent.

Palop (1999) souligne l'importance de l'effet du milieu dans lequel sont recueillies les spores après un traitement thermique. Il est vrai que la destruction des micro-organismes assure la sécurité alimentaire et la stabilité microbiologique de l'aliment dans le temps, mais il en résulte souvent une application de traitement thermique trop soutenu entraînant une perte des qualités du produit. Or, dans la plupart des cas, la destruction totale bactérienne n'est pas nécessaire pour que l'aliment soit sain, car la croissance des spores survivantes peut être inhibée par des facteurs environnementaux. Dans ce cas, les micro-organismes survivants peuvent être incapables de se développer, permettant des traitements de stérilisation moins drastiques. Ces facteurs environnementaux sont principalement les basses températures de stockage, les basses activités de l'eau et les pH acides.

1.4. Modèles multifactoriels intégrant le pH

La microbiologie prévisionnelle ne se limite pas à l'étude qualitative des effets des facteurs environnementaux sur la thermorésistance. Son principal objectif consiste en une description quantitative de ces effets et en leur mise en équations. Les qualités recherchées lors de l'élaboration d'un modèle sont essentiellement :

⇒ **La qualité d'ajustement** : l'écart entre les valeurs expérimentales et les valeurs calculées selon le modèle doit être minimal. Un des critères quantitatifs permettant de tester la qualité d'ajustement est la moyenne des carrés des écarts entre les valeurs observées et calculées. Les coefficients de détermination ou de corrélation peuvent également témoigner de la qualité d'ajustement ;

⇒ **L'homocédasticité, la normalité et l'indépendance des résidus** : la répartition des résidus doit être aléatoire et suivre une loi normale.

⇒ **La parcimonie** : Elle se traduit par un nombre de paramètres minimum.

⇒ **L'interprétabilité des paramètres**, qu'elle soit physique, chimique ou biologique ;

⇒ **La robustesse** : un modèle robuste est un modèle qui, établi sur un jeu de données expérimentales, s'adapte aussi bien aux points issus d'une autre manipulation. La robustesse est généralement liée à la parcimonie. En général, plus un modèle est complexe, meilleure est sa qualité d'ajustement sur le jeu de données ayant servi à l'établir, au détriment de sa robustesse ;

⇒ **L'absence de corrélation structurelle** : les paramètres ne doivent pas être corrélés entre eux. L'indépendance des paramètres assure une meilleure stabilité et améliore la robustesse ; une autocorrélation marquée entre les paramètres d'un modèle peut être le signe d'une surparamétration.

Ce n'est que dans les années 80 que les modèles ont progressivement intégré plusieurs facteurs, ajoutant à la température, le pH, puis l' a_w , etc...

Les modèles présentés dans la littérature sont à de très rares exceptions près (Reichart *et al.*, 1994) linéaires et assimilables à des modèles polynomiaux. On peut systématiquement les classer selon les trois catégories suivantes :

φ les modèles quadratiques complets

L'ajustement de ces modèles est souvent très bon, mais le manque de robustesse du à la surparamétration, est leur principal défaut. Citons à titre d'exemple le modèle quadratique de Fernandez (1996) appliqué à *Bacillus stearothermophilus* et *Clostridium sporogenes*, décrivant le taux de destruction k en fonction du pH et de la température :

$$\log k = a + b \times T + c \times pH + d \times (T \times pH) + e \times T^2 + f \times pH^2 \quad \text{Equation I.24}$$

Où T et pH sont les deux facteurs
a, b, c, d, e et f sont les paramètres estimés
k est le taux de destruction

φ les modèles polynomiaux réduits

Il s'agit des modèles précédents auxquels ont été supprimés les termes non significatifs. A titre d'exemple, le modèle de Davey *et al.* (1978), puis celui de Cerf *et al.* (1996) peuvent être considérés comme des modèles polynomiaux réduits débarrassés des termes non significatifs et des termes d'interactions.

φ les modèles reparamétrés

Les modèles précédents sont remaniés afin de remplacer les coefficients des polynômes par des paramètres à signification physique ou biologique. En contrepartie, de tels modèles ne sont plus linéaires vis à vis de leurs paramètres. A titre d'exemple, on citera le modèle de Mafart et Leguérinel (1998) où chaque paramètre est interprétable (équation I.26).

1.4.1. Modèles intégrant le pH de traitement

Outre les modèles polynomiaux quadratiques (Fernandez *et al.*, 1996 ; Tejedor *et al.*, 2001), peu de modèles décrivant l'influence du pH ont été présentés. Davey *et*

al. (1978) sont les premiers à proposer un modèle exprimant le taux de destruction du modèle primaire d'ordre un en fonction des facteurs température et pH. Le modèle est présenté comme une extension de l'équation d'Arrhénius :

$$\ln k = C_0 + \frac{C_1}{T} + C_2 pH + C_3 pH^2 \quad \text{Equation I.25}$$

Il s'agit d'un modèle quadratique tronqué des termes $1/T^2$ et interaction pH-température que les auteurs estiment négligeables. L'intérêt de ce modèle vient de la simplification suivante : il ne met en jeu que quatre paramètres (mais sans signification physique) pour deux facteurs. De plus, son ajustement est possible par régression linéaire multiple, et sa qualité d'ajustement, satisfaisante dans la plupart des cas, traduit une bonne robustesse.

Cependant, Mafart (1999) démontre que ce modèle reste surparamétré, en raison de ses paramètres C_2 et C_3 étroitement corrélés. Parallèlement, Mafart et Leguérinel (1998) proposent un autre modèle dérivé du modèle de Bigelow, établi à partir de jeux de données empruntés à la littérature :

$$\log D = \log D^* - \frac{T - T^*}{z_T} - \left(\frac{pH - pH^*}{z_{pH}} \right)^2 \quad \text{Equation I.26}$$

Où T^* et pH^* sont respectivement les valeurs de référence de la température (121,1°C) et du pH (pH7). D^* représente la durée de réduction décimale à la température et au pH de référence. Les paramètres z_T (classique du modèle de Bigelow) et z_{pH} (par analogie au précédent), expriment les écarts de température ou de pH (par rapport à pH^*) induisant une variation de la durée de réduction décimale D d'un facteur 10.

Comme le modèle de Davey, le modèle de Mafart et Leguérinel est linéaire, et par conséquent ajustable par régression linéaire multiple. Son atout est qu'il ne possède plus que trois paramètres (D^* , z_T , z_{pH}).

Un point faible de ce modèle est pourtant discuté dans un article de Mafart *et al.* (2001) : le modèle attribue en effet une relation quadratique entre le $\log D$ et le pH. Or plusieurs auteurs ont mis en évidence une relation linéaire simple (Esty *et al.*, 1922 ; Jordan et Jacob, 1948 ; Fernandez *et al.*, 1996 ; Mazas *et al.*, 1998 ; Pirone *et al.*, 1987). L'exposant du troisième terme du modèle peut donc osciller entre 1 et 2 selon les populations microbiennes étudiées, ce qui porterait le modèle à quatre

paramètres et entraînerait la perte de linéarité du modèle. Les auteurs ont donc pris le parti de conserver la version à trois paramètres, quitte à la décliner en une forme du premier degré et une forme du second degré.

Cependant tous ces modèles ne prennent en compte que l'influence des facteurs environnementaux au cours du traitement thermique, supposant que les spores bactériennes se retrouvent après traitement dans un milieu propice à la recroissance, ignorant ainsi l'influence du milieu de recouvrement sur la viabilité. Or, si l'on considère la stérilisation d'un produit alimentaire, les facteurs physico-chimiques de l'aliment restent les mêmes pendant et après le traitement thermique.

Dès 1950, Olsen et Scott montrent un effet du milieu de culture post-traitement thermique sur le taux de spores capables de germer et de proliférer. La thermo-résistance apparente est alors directement affectée puisque le taux de survivants varie selon le milieu gélosé utilisé pour le dénombrement, bien que les suspensions de spores aient rigoureusement subi le même traitement, dans les mêmes conditions.

Cet effet peut être interprété comme une étape supplémentaire que les spores, déjà endommagées par un traitement thermique, doivent subir lors de la germination et de la recroissance.

Il est étonnant de constater le désintérêt de la microbiologie prévisionnelle vis-à-vis des facteurs environnementaux post-traitement thermique.

1.4.2. Modèles intégrant le pH de recouvrement

En 1999, Couvert *et al.* supposent un effet du pH de recouvrement pouvant s'ajouter à celui du pH de traitement déjà décrit par le modèle de Mafart et Leguérinel (1998). Ce dernier peut s'écrire sous la forme condensée:

$$D = f(pH)D^* \quad \text{Equation I.27}$$

Où D^* est la durée de réduction maximale obtenue à un pH de référence.

L'effet du pH de recouvrement peut être décrit de la même façon :

$$D' = f'(pH')D \quad \text{Equation I.28}$$

Où D' est la durée de réduction décimale apparente au pH' (pH de recouvrement).

Si on admet un effet multiplicatif des deux facteurs, on obtient :

$$D' = f(pH)f'(pH')D^* \quad \text{Equation I.29}$$

La fonction $f(pH)$ s'écrit selon le modèle de Mafart et Leguérinel (1998) :

$$f(pH) = 10^{-\left(\frac{pH - pH^*}{z_{pH}}\right)^2} \quad \text{Equation I.30}$$

Compte tenu de la similitude des courbes de survie observées entre le logarithme de D en fonction du pH de traitement et le logarithme de D' en fonction du pH de recouvrement, les auteurs proposent une valeur de $f'(pH')$ bâtie sur le même modèle que $f(pH)$:

$$f'(pH') = 10^{-\left(\frac{pH' - pH'_{opt}}{z'_{pH}}\right)^2} \quad \text{Equation I.31}$$

Où le pH' est le pH du milieu de recouvrement, et pH'_{opt} le pH de recouvrement pour lequel est observée la durée de réduction décimale la plus élevée, généralement voisin ou égal à 7. Le paramètre z'_{pH} représente l'écart de pH' par rapport à pH'_{opt} qui conduit à une réduction de D d'un facteur 10.

Un modèle global prenant en compte à la fois l'influence du pH de traitement et le pH de recouvrement sur la durée de réduction décimale peut alors être proposé :

$$D = D^* \cdot 10^{-\left(\frac{pH - pH^*}{z_{pH}}\right)^2} \cdot 10^{-\left(\frac{pH' - pH'_{opt}}{z'_{pH}}\right)^2} \quad \text{Equation I.32}$$

Etabli sur une souche de *Bacillus cereus*, ce modèle a été validé selon des données bibliographiques obtenues sur *Bacillus stearothermophilus* (Lopez *et al.*, 1996, 1997). Il néglige les éventuelles interactions entre ces deux facteurs que sont le pH de traitement et le pH de recouvrement.

L'équation I.32, qui n'est qu'une extension du modèle de Mafart et Leguérinel, ne comporte que quatre paramètres ajustés (D^* , z_{pH} , z'_{pH} , pH'_{opt}) qui possèdent tous une signification physique ou biologique.

L'ajustement se fait par régression linéaire multiple et prend en compte un facteur environnemental de plus que le modèle de Mafart et Leguérinel pour seulement deux paramètres supplémentaires. Ce terme relatif au pH de recouvrement considère que le logarithme de D évolue de façon quadratique en fonction du pH. Dans le cas où les paramètres pH^* et pH'_{opt} sont estimés, le modèle perd sa linéarité et doit alors être ajusté par minimisation de la somme des carrés des écarts.

Il s'agit aujourd'hui du seul modèle permettant d'estimer la thermorésistance apparente des spores en fonction du pH du milieu de recouvrement. Pourtant, le pH du milieu post-traitement a le plus souvent une importance plus grande que le pH de traitement, à en croire les valeurs de z'_{pH} généralement plus faible que celles de z_{pH} . Couvert *et al.* (1999) déterminent pour une souche de *Bacillus cereus*, un z_{pH} de 2,57 et un z'_{pH} de 2,03. En d'autres termes, ces valeurs signifient qu'un écart de pH de traitement de 2,57 (par rapport au pH^*) est nécessaire pour réduire la valeur de D par 10, alors qu'un écart de pH de recouvrement de 2,03 suffit pour le même résultat.

Citons à titre d'exemple des valeurs de z_{pH} et z'_{pH} déterminées à partir de résultats obtenus sur *Bacillus stearothermophilus*, d'après Lopez *et al.* (1996, 1997) :

Tableau I.2 : valeurs de z_{pH} et z'_{pH} estimées selon les données bibliographiques de Lopez *et al.* (1996, 1997) sur *Bacillus stearothermophilus* (Couvert *et al.*, 1999).

souche	z_{pH}	z'_{pH}
12980	3,82	3,06
7953	3,97	3,80
15951	3,45	3,21
15952	4,12	2,94

Chapitre 2

MATERIEL ET METHODES

2.1. Acquisition des données

La première partie de l'étude a consisté en la collecte de données expérimentales sur les variations de thermorésistance de spores bactériennes en fonction de la température et de pH.

2.1.1. Matériel biologique

2.1.1.1. Choix des souches

Dans l'optique d'une application ultérieure à des produits appertisés relativement acides, les souches bactériennes sélectionnées pour cette étude auront pour certaines une résistance thermique élevée tandis que d'autres présenteront une meilleure résistance aux bas pH.

En tête des espèces bactériennes thermorésistantes les plus répandues arrive *Bacillus stearothermophilus*. Espèce référence dans l'établissement des barèmes des produits appertisés, nous ne pouvions l'écarter de notre étude. Une souche de référence (ATCC 12980) ainsi qu'une souche isolée de produits industriels ont été choisies.

Pour ce qui est des espèces certes moins résistantes aux fortes températures, mais d'une meilleure tolérance aux pH acides, nous avons retenu deux espèces sporulées acidophiles. La première, *Bacillus coagulans*, est capable de se développer à des pH acides (4,5) et forme des spores d'une résistance qui selon les espèces, peut être qualifiée de moyenne. La seconde, *Alicyclobacillus acidoterrestris*, reste beaucoup plus rare. Ce thermophile a retenu notre attention par son acidophilie remarquable et ses récentes implications dans des accidents de stérilisation de jus de fruits acides (Splittstoesser *et al.*, 1998 ; Walls et Chuyate, 1998). Cette espèce forme des spores d'une thermorésistance qui peut dépasser celle de *Bacillus stearothermophilus* lorsque le pH est inférieur à 4.

Toutes les espèces citées précédemment ne sont cependant ni pathogènes, ni toxinogènes. Or le contexte est différent lorsqu'on aborde les espèces pathogènes,

telles que *Clostridium botulinum*. Cette dernière nécessite une attention particulière tant sa toxine est puissante. L'introduction de *Clostridium botulinum* dans notre étude aurait pu s'avérer très intéressante. Mais compte tenu des normes qui régissent sa manipulation, *Clostridium sporogenes* a été choisi en remplacement comme germe sporulé anaérobie stricte et thermorésistant.

Enfin, *Bacillus pumilus* étant une espèce couramment rencontrée dans les ingrédients Saupiquet, a été ajouté à la liste de nos souches afin d'élargir la gamme des espèces étudiées.

Tableau II.1 : Souches étudiées et leurs provenances

souche	source
<i>Bacillus stearothermophilus</i> ATCC 12980	Collection de l'Institut Pasteur
<i>Bacillus stearothermophilus</i> Saupiquet	Isolé de produit industriel
<i>Bacillus coagulans</i> ATCC 7050	Collection de l'Institut Pasteur
<i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> ATCC 49025	Collection de l'Institut Pasteur
<i>Clostridium sporogenes</i> Pasteur 79.3	Collection de l'Institut Pasteur
<i>Clostridium sporogenes</i> Saupiquet	Isolé de produit industriel
<i>Bacillus pumilus</i> Saupiquet	Isolé de produit industriel

2.1.1.2. Préparation des suspensions de spores

2.1.1.2.1. Spores de *Clostridium sporogenes*

Le protocole proposé par Goldoni *et al.* (1980) est suivi (milieu à base de cœur de bœuf). Il permet de produire une suspension bactérienne en milieu liquide avec un fort rendement de sporulation.

Récolte des spores

Le milieu de croissance des spores est filtré aseptiquement. Le filtrat est transféré dans des tubes à centrifuger de 50 mL, remplis au 3/4. Les tubes sont centrifugés à 4°C, pendant 10 mn à 8000 rpm (10 400 Relative Centrifugal Force, centrifugeuse Bioblock scientific : SIGMA 3K30).

Le surnageant est éliminé et les culots contenant les spores sont remis en suspension dans un tampon phosphate stérile pH 7 à une concentration de 0,07 molaire. Les contenus des tubes sont rassemblés.

L'opération est répétée encore 2 fois pour laver les culots. Les culots de spores sont remis en suspension dans un tampon phosphate et transférés dans des tubes eppendorfs pour le stockage à 4°C.

La concentration en spores est déterminée par dénombrement des colonies en milieu gélosé après activation des spores par choc thermique. Les cultures sont incubées 7 jours à 25°C en jarres anaérobies.

2.1.1.2.2. Spores de *Bacillus*

Les spores sont mises en culture dans un bouillon cœur-cerveille, 24 heures à la température de 55°C par les souches de *Bacillus stearothermophilus*, 45°C pour la souche de *Alicyclobacillus acidoterrestris*, 37°C pour *Bacillus coagulans* et 25°C pour *Bacillus pumilus*. Des boîtes de gélose nutritive serontensemencées en surface à partir de la préculture obtenue et mises à incuber 5 jours aux mêmes températures que la préculture en BHI. Les spores sont récupérées par lavage de la surface de la gélose, puis sont mises en suspension dans deux tubes à centrifuger contenant chacun 20 ml de tampon phosphate.

Une première centrifugation de 10 mn à 8.000 rpm est réalisée. Les culots de spores sont remis en suspension dans un tampon phosphate (pH7, 0,07M) et lavés 3 fois. Une centrifugation dans les mêmes conditions est effectuée. Les culots sont repris par un mélange Tampon phosphate – éthanol (50% - 50%) et placés à 4 °C pendant 12 heures afin d'éliminer les cellules végétatives.

Les tubes sont à nouveau centrifugés, le culot est ensuite lavé trois fois par un tampon phosphate pH7 stérile dans les mêmes conditions de centrifugation. Enfin, les culots de spores sont remis en suspension dans un volume minimum de tampon phosphate et transférés dans des tubes eppendorfs pour le stockage à 4°C.

La concentration en spores est déterminée par dénombrement en milieu gélosé après avoir activé les spores par choc thermique.

2.1.2. Traitement Thermique

Le traitement thermique est réalisé à partir de la suspension de spores précédemment obtenue, diluée au 1/50^e dans le milieu de traitement étudié. 10µL de cette solution sont ensuite introduits dans des tubes capillaires calibrés, d'une longueur de 125 mm et d'un diamètre interne de 0,73 mm. Les extrémités des tubes sont soudées à la flamme. Ces tubes capillaires sont plongés dans un bain glycérol-eau (50% - 50%) thermostaté à la température étudiée. Les tubes sont refroidis immédiatement dans un bain d'eau glacée pendant 30 secondes.

Les extrémités de ces tubes sont rayées à l'aide d'une scie à verre, flambées, puis cassées. Le contenu des tubes est chassé par 1 ml de milieu de dilution

(1% tryptone - 1% NaCl) vers un tube contenant 9 ml du même milieu, à l'aide d'une seringue stérile munie d'une aiguille (TERUMO 1ml). Des dilutions successives de 1/10^e pourront alors être réalisées pour le dénombrement sur boîte de pétri sur un milieu de recouvrement dont le pH aura été ajusté à la valeur souhaitée.

Dénombrement des survivants

Le dénombrement des spores viables est réalisé par ensemencement sur gélose en boîtes de pétri 90 mm. 0,5 ml des solutions diluées recueillies après le traitement thermique sont alors déposées dans une boîte de pétri où de la gélose est coulée pour un ensemencement dans la masse.

Les boîtes sont incubées à une température et pendant le temps indiqué dans le tableau II.2. Les anaérobies sont placées dans des jarres hermétiques contenant un absorbeur d'oxygène Anaerocult (Merck). Le nombre de colonies par boîte doit être compris entre 30 et 300 pour être pris en compte.

Tableau II.2 : conditions d'incubation des souches étudiées

souche	température	temps	oxygène
<i>Bacillus stearothermophilus</i> ATCC 12980	55°C	2 jours	+
<i>Bacillus stearothermophilus</i> Industrielle A36	55°C	2 jours	+
<i>Bacillus coagulans</i> ATCC 7050	37°C	3 jours	+
<i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> ATCC 49025	45°C	4 jours	+
<i>Clostridium sporogenes</i> ATCC 19404	25°C	7 jours	-
<i>Clostridium sporogenes</i> Industrielle A27	25°C	7 jours	-
<i>Bacillus pumilus</i> Industrielle A40	25°C	3 jours	+

2.1.3. Confection des milieux

2.1.3.1. Milieu de suspension lors du traitement thermique

Le milieu de base utilisé pour suspendre les spores lors du traitement thermique sera composé de :

- 1 % de Tryptone (10g / L)
- 1% de NaCl (10g / L)

Ce milieu permettra de maintenir une pression osmotique faible, mais non nulle. La tryptone tamponne sensiblement le milieu permettant de stabiliser le pH lors de l'étude de l'acidité, afin de rendre inutile l'ajout de tampon salin susceptible de jouer un rôle indésirable sur la thermorésistance. Le pH de ce milieu sera ajusté par :

- acide fort (H₂SO₄)
- base forte (NaOH)

2.1.3.2. Milieu de récupération des spores (recouvrement)

✓ dénombrement de *Clostridium ssp*

Le milieu de base, proposé par Grischy *et al.* (1983) est constitué de

- 1 % de Tryptone (Biokar)
- 0.2% d'amidon soluble (Sigma)
- 0.2% de K₂SO₄ (Fisher)
- 0.2 % d'extraits de levure (Biokar)
- 1.5 % d'agar type E (Biokar)

✓ dénombrement de *Bacillus ssp*

Le milieu utilisé est une gélose nutritive (Biokar).

✓ dénombrement de *Alicyclobacillus acidoterrestris*

La croissance est obtenue sur un milieu gélosé à base de pomme de terre : potato dextrose agar (Biokar).

Le pH de ces milieux de base sera ajusté à l'aide de :

- acide fort (H₂SO₄)
- base forte (NaOH)

2.1.4. Plans expérimentaux

Pour chacune des souches, les facteurs étudiés sont :

- la température de traitement thermique
- le pH du milieu de traitement
- le pH du milieu de recouvrement

Un plan monofactoriel est effectué par facteur et par souche. Afin de détecter d'éventuelles interactions, ces plans sont complétés par des plans factoriels complets à deux facteurs dans les cas suivants :

❶ Plan multifactoriel entre la température et le pH de traitement pour la souche de *Bacillus coagulans* ATCC 7050, et les souches industrielles de *Bacillus stearothermophilus* et *Clostridium sporogenes*.

❷ Plan multifactoriel entre le pH de traitement et le pH de recouvrement pour les souches de *Bacillus stearothermophilus* ATCC 12980 et *Bacillus coagulans* ATCC 7050.

2.2. traitement des données expérimentales

2.2.1. Ajustement des modèles

2.2.1.1. Modèles primaires

2.2.1.1.1. Modèle de Rodriguez *et al.* (1988)

Ce modèle est appliqué pour l'ajustement de courbe de survie de populations hétérogènes présentant deux sous populations de thermorésistances différentes : une population thermosensible X_0 et une thermorésistante Y_0 .

Cette dernière nécessite une activation thermique pour être dénombrée sur gélose. Le passage de spores inactives Y en spores actives Z suit une constante de vitesse h . La population N dénombrée sur gélose correspond alors à la somme des populations X et Z . Les constantes de vitesse de destruction des populations thermosensible et thermorésistante sont respectivement k_1 et k_2 .

$$N = X_0 \cdot e^{-k_1 t} + Z_0 \cdot e^{-k_2 t} + Y_0 \cdot (e^{-k_2 t} - e^{-(k_2 + h)t}) \quad \text{Equation II.1}$$

L'ajustement du modèle est effectué par minimisation de la somme des carrés des écarts sous Matlab 6.1 par la fonction `lsqcurvefit`.

Extension de l'application du modèle

Dans certaines conditions de traitement thermique, la phase d'activation de la population thermorésistante est masquée par la courbe de destruction de la population thermosensible. L'allure des cinétiques se rapproche alors fortement de deux segments de droite. Dans ce cas, on peut supposer que l'activation thermique n'existe plus, et que l'ensemble des spores de la population thermorésistante se trouve initialement sous forme activée ($Y_0 = 0$). Le paramètre h s'annule avec, par voie de conséquence, le dernier terme de l'équation. Le modèle s'ajuste alors avec seulement quatre paramètres.

2.2.1.1.2. Modèle de Mafart *et al.* (2002)

$$\log N = \log N_0 - \left(\frac{t}{\delta} \right)^p \quad \text{Equation II.2}$$

Deux variantes de ce modèle peuvent être proposées :

Ajustement avec un paramètre p variable

Le paramètre p est jugé *a priori* dépendant des conditions de traitement. Il est alors réestimé pour chaque cinétique. Les trois paramètres sont estimés par minimisation de la SCE sous Matlab 6.1 par la fonction lsqcurvefit.

Ajustement avec un paramètre p constant

Le paramètre p reflète la distribution des thermorésistances au sein de la population microbienne selon la distribution de Weibull.

Le paramètre p a été jugé *a posteriori* indépendant des conditions de traitement. Sa valeur doit être la même pour toutes les cinétiques. Son estimation est effectuée en prenant en compte l'ensemble des cinétiques.

L'ajustement est effectué par minimisation de la SCE de l'ensemble des j cinétiques comprenant chacune n points à l'aide de la fonction fmincon sous Matlab :

$$SCE_{\text{globale}} = \sum_{j=1}^{31} \left(\sum_{i=1}^n \left(\log N_{ij} - \log N_{0j} - \left(\frac{t_i}{\delta_j} \right)^p \right)^2 \right) \quad \text{Equation II.3}$$

2j+1 paramètres sont estimés simultanément.

Les paramètres en entrée de la fonction fmincon sont tirés aléatoirement selon une loi uniforme et la minimisation de la SCE est réitérée 5000 fois afin de détecter d'éventuels minima locaux.

2.2.1.2. Modèles secondaires

2.2.1.2.1. Modèle de Bigelow (1921)

Le modèle est ajusté par régression linéaire (fonction *polyfit*, Matlab 6.1) où la variable est $T-T^*$ et la réponse le logarithme de D estimé à partir des modèles primaires. Les paramètres D^* et z_T sont directement liés à l'ordonnée à l'origine et à la pente :

$$D^* = 10^{\text{ord. origine}} \quad z_T = -\frac{1}{\text{pente}}$$

2.2.1.2.2. Modèle de Mafart *et al.* (2001)

Comme pour le modèle précédent, l'ajustement est effectué par régression linéaire (fonction *polyfit*, Matlab 6.1) où cette fois, la variable est pH^*-pH :

$$D^* = 10^{\text{ord. origine}} \quad z_{pH} = \frac{1}{\text{pente}}$$

2.2.1.2.3. Modèle de Couvert *et al.* (1999)

□ Estimation des paramètres

$$\log D' = \log D'_{opt} - \left(\frac{pH' - pH'_{opt}}{z'_{pH}} \right)^2 \quad \text{Equation II.4}$$

Il s'agit d'un modèle pouvant être développé sous la forme linéaire :

$$a pH'^2 + b pH' + c = \log D$$

$$\text{où} \quad a = -\frac{1}{z_{pH}^2} \quad b = 2 \frac{pH^*}{z_{pH}^2} \quad c = \log D^* - \frac{pH^*}{z_{pH}^2}$$

Les paramètres sont estimés par régression linéaire (fonction *polyfit*, Matlab 6.1).

□ *Simplification du modèle*

Le pH optimum de thermorésistance pH'_{opt} estimé reste voisin de 7 dans la plupart des cas. Ce paramètre peut alors être fixé à cette valeur. Le paramètre pH'_{opt} s'écrit alors pH^* (pH de référence), et D'_{opt} devient D^* . Le modèle ne comporte alors plus que deux paramètres qui seront estimés par régression linéaire (fonction *polyfit*, Matlab 6.1) où la réponse est le log D' et la variable est $(pH-pH^*)^2$.

$$D^* = 10^{ord.origine} \quad z'_{pH} = \sqrt{-\frac{1}{pente}}$$

□ *Choix du modèle le plus adapté*

Un test statistique permet de vérifier si la qualité d'ajustement engendrée par la suppression d'un paramètre d'un modèle est justifiée (Bates et Watts, 1988 ; Rosso, 1995). Ce test révèle la surparamétration d'un modèle compte tenu de la qualité du jeu de données.

Le surcroît de complexité du modèle n'est pas justifié vis à vis de la qualité d'ajustement si l'inéquation II.5 est vérifiée :

$$F_{(p_c - p_p; n - p_c; \alpha = 0,05)} \geq \frac{n - p_c}{p_c - p_p} \frac{SCE_{\min p} - SCE_{\min c}}{SCE_{\min c}} \quad \text{Inéquation II.5}$$

Où n est le nombre de points décrivant la cinétique, p_c et p_p sont les nombres respectifs de paramètres des modèles complet et partiel, $SCE_{\min c}$ et $SCE_{\min p}$ sont les sommes des carrés des écarts minimales obtenues après ajustement des modèles complet et partiel. Enfin, le premier membre de l'inéquation correspond à une valeur seuil issue de la table de Fisher dont les degrés de liberté sont $p_c - p_p$ et $n - p_c$ et la probabilité de 95%.

2.2.2. Evaluation des modèles

2.2.2.1. Critère quantitatif d'ajustement global

Le critère du $R^2_{ajusté}$ permet d'estimer la qualité globale de l'ajustement, en tenant compte du nombre de paramètres et du nombre de points du jeu de données. Plus la valeur du coefficient est proche de 1 et meilleur est l'ajustement du modèle.

$$R^2_{ajusté} = 1 - \frac{n-1}{n-p} \frac{SCE_{résiduelle}}{SCE_{totale}} \quad \text{Equation II.6}$$

2.2.2.2. Examen des résidus

2.2.2.2.1. Hétéroscédasticité

L'hétéroscédasticité traduit une hétérogénéité de la variance des résidus, et peut s'estimer visuellement sur la représentation graphique des valeurs résiduelles normalisées en fonction des valeurs prédites. En cas d'hétéroscédasticité, on observe une dispersion croissante ou décroissante des résidus en fonction des valeurs prédites.

2.2.2.2.2. Test de normalité

Les résidus sont supposés suivre une loi normale. Le test de Shapiro-Wilk permet de vérifier la normalité des résidus, et est particulièrement adapté pour les petits échantillons (<50).

Les résidus doivent être triés par ordre croissant. La valeur calculée par le test est donnée par :

$$W_c = \frac{\left(\sum_{j=1}^k a_j d_j \right)^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} \quad \text{Avec} \quad \begin{array}{ll} k = n / 2 & \text{si } n \text{ est pair} \\ k = (n-1) / 2 & \text{si } n \text{ est impair} \end{array}$$

Les coefficients a_j sont lus dans une table (annexe 10) et les coefficients d_j sont définis par : $d_j = x_{n+1-j} - x_j \quad j = 1, \dots, k$

La prise de décision est effectuée par comparaison à deux valeurs seuils W_1 et W_2 fournie par la table (annexe 10). La population suit une loi normale si $W_1 < W_c < W_2$.

2.2.2.2.3. Test d'autocorrélation

Les résidus doivent être indépendants. Le test usuel mettant en évidence l'autocorrélation de la distribution des résidus est celui de Durbin-Watson. La fonction discriminante de ce test est donnée par :

$$d_c = \frac{\sum_{i=2}^n (e_i - e_{i-1})^2}{\sum_{i=2}^n e_i^2} \quad \text{Equation II.7}$$

Sous l'hypothèse H_0 selon laquelle les résidus sont indépendants, la loi de D_c est connue et tabulée. Cette table fournit deux valeurs seuil d_1 et d_2 . Les conclusions sont :

- si $d_c < d_1$, on rejette H_0 au risque de 5%,
- si $d_c > d_2$, on accepte H_0 au risque de 5%,
- si $d_1 < d_c < d_2$, on ne peut pas conclure

Le test nécessite un échantillon d'au moins 15 valeurs. Pour les petits échantillons, ce test est substitué par une analyse graphique. Il y a autocorrélation lorsque l'on peut mettre en évidence un lien entre les valeurs de Y et la distribution des écarts positifs et négatifs par rapport au modèle de régression.

2.2.2.3. Projection des régions de confiance

L'estimation des intervalles de confiance des paramètres, ainsi que la corrélation structurelle des paramètres est étudiée. Selon Beale (1960), un vecteur de paramètres Θ d'un modèle se trouve dans la région de confiance à la probabilité α s'il vérifie l'inéquation :

$$SCE_{\Theta} \leq SCE_{\min} \left(1 + \frac{p}{n-p} F_{p, n-p, \alpha} \right) \quad \text{Inéquation II.8}$$

Où n est le nombre de points expérimentaux, p le nombre de paramètres, F la distribution de Fisher pour le niveau α à p et $n-p$ degrés de liberté, la SCE_{Θ} est la somme des carrés des écarts calculée avec le vecteur de paramètre Θ .

La détermination des régions de confiance est définie selon la méthode de Lobry *et al.* (1991). Les vecteurs Θ vérifiant l'inéquation II.8 constituent un

hypervolume dont le nombre de dimension correspond au nombre de paramètres. Les intervalles de confiance des paramètres sont indiqués par les limites de l'hypervolume.

La projection de l'hypervolume sur plan permet de mettre en évidence d'éventuelles corrélations structurelles entre les paramètres. A un risque fixé, plus les paramètres sont corrélés, plus leurs valeurs se compensent entraînant des intervalles de confiance étendus, voire infinis.

Détermination de l'hypervolume

L'hypervolume est déterminé par un programme informatique effectuant des tirages de vecteurs de paramètres aléatoires dans un hypercube dont la dimension est supérieure à celle de l'hypervolume à déterminer. Chaque vecteur de paramètre satisfaisant l'inéquation II.8 entre dans la constitution de l'hypervolume. C'est l'ensemble de ces points qui va décrire l'hypervolume.

Le nombre de points nécessaires à la constitution de cet hypervolume dépend à la fois de la répartition des points et du nombre de dimensions dans lequel il est décrit.

Cas particulier du modèle de Mafart et al. (2002)

Le modèle primaire décrivant la cinétique de destruction de la souche *Bacillus pumilus* est constitué de trois paramètres, dont deux (δ et N_0) varient en fonction des conditions de traitement thermique (température, pH...), et un troisième (p) fixe pour l'ensemble des cinétiques. Ce troisième paramètre dépendant de toutes les cinétiques implique un calcul global faisant entrer tous les jeux de données de la souche en même temps. Dans notre cas, nous disposons de 31 cinétiques de destruction, soit 31 valeurs de δ , 31 valeurs de N_0 et une valeur de p , soit un total de 63 paramètres. La région de confiance décrit alors un hypervolume dans un espace à 63 dimensions. La méthode consistant à mesurer l'hypervolume par tirage aléatoire des paramètres n'est plus réalisable en raison du temps de calcul informatique qu'un tel programme demanderait. Par conséquent, nous adopterons une méthode selon laquelle les régions de confiance des valeurs des paramètres de chaque cinétique sont déterminées individuellement tel que :

$$SCE\Theta_i \leq SCE_{\min} \left(1 + \frac{63}{294 - 63} F_{0,95;63;231} \right) \quad \text{Equation II.9}$$

Où Θ_i est un vecteur de paramètres (N_0, δ, p) de la $i^{\text{ème}}$ cinétique (sur 63), et $SCE_{\min}$ la somme des carrés des écarts minimale entre les valeurs observées et les valeurs calculées par le modèle ajusté sur l'ensemble des jeux de données. Il en résulte i régions de confiance pouvant être représentées dans un espace à trois dimensions. Les régions de confiance pour la valeur des paramètres sont matérialisées par projections sur les plans dans l'espace des paramètres.

2.2.3. Tirage aléatoire d'une matrice possédant la même structure de corrélation qu'une matrice expérimentale

La méthode que nous allons considérer consiste à reproduire une matrice par tirage aléatoire de chaque paramètre selon une loi normale ($N_{\mu,\sigma}$) en conservant les mêmes structures de corrélation que le jeu de données initial. Cette méthode s'inspire de l'ACP (Analyse en Composante Principale) :

Le but est de créer une matrice (4 x 100 000) par tirage aléatoire, conservant la même structure de corrélation que la matrice de données initiale (4 x 20).

Il est facile, en utilisant des logiciels mathématiques (Matlab) de générer des séries de valeurs indépendantes. Malheureusement, vue la structure de corrélation des données expérimentales X (tableau 1), cela pose un problème et il serait excessif de vouloir négliger la corrélation entre les variables comme le montre le tableau 2.

La répartition des marginales de la loi de ($F_h, J_h \text{ corr}, F_c, j_c$) laisse pressentir une répartition Normale en 4 dimensions de cette variable (tableau 5). Nous supposons cette hypothèse satisfaite ce qui est tout à fait raisonnable.

La question centrale est maintenant de générer des valeurs ayant la même structure de covariance que les valeurs expérimentales (tableau 1 et 2). Pour ce faire, nous allons utiliser l'analyse en composantes principales sous un angle un peu particulier : il est en effet connu que les composantes principales sont des variables indépendantes.

La décomposition en composantes principales nous fournit une matrice P dite de passage et telle que

$$C = P Z$$

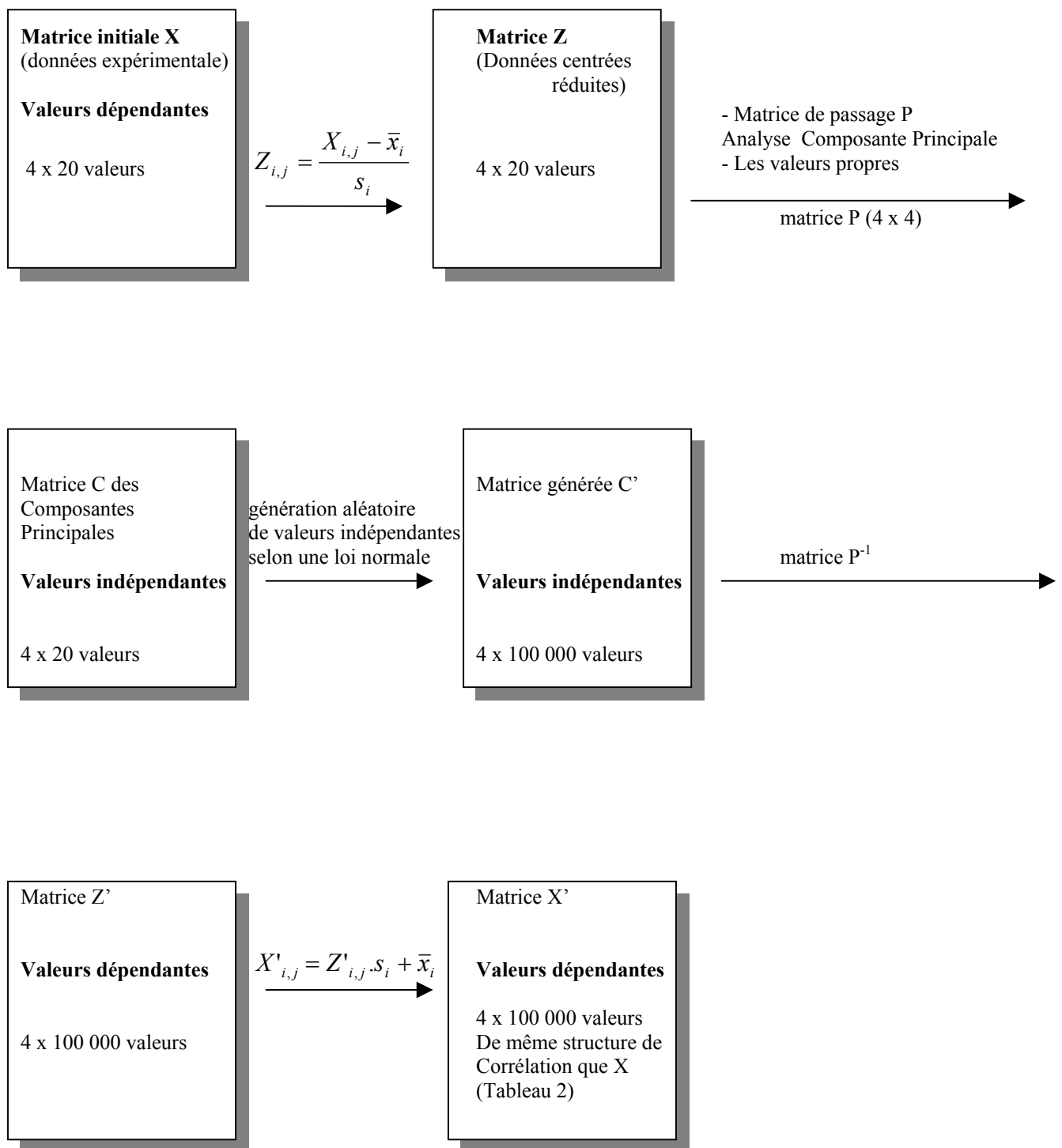


Figure II.1 : Schéma explicatif de la méthode dérivée de l'ACP

Avec C la matrice des composantes principales et Z la matrice des données centrées réduites

$$Z = R (X - M)$$

Avec R la matrice ayant les inverses des écarts-type sur la diagonale et M la matrice ayant toutes les lignes (20) égales à (m1,m2,m3,m4) les moyennes des différentes variables.

Remarque : Les matrices C et P sont données par le logiciel Matlab.

La matrice C a pour matrice de corrélation une matrice diagonale ayant sur la diagonales les valeurs propres issues de l'ACP. Il suffit alors de générer 100 000 valeurs selon une loi normale centrée et de variance les différentes valeurs propres (4 x 100 000). C'est la matrice C' des « composantes principales générées ». Il suffit ensuite de restituées les données centrées réduites au moyen de P^{-1} :

$$Z' = P^{-1} C'$$

Remarque : L'inversion de P se fait au moyen de Matlab.

Et enfin les valeurs générées sont données par :

$$X' = R^{-1} Z' + M'$$

Avec M' la matrice ayant toutes les lignes (100 000) égales à (m1,m2,m3,m4) les moyennes des différentes variables.

2.3. Validation sur un produit industriel

Le produit choisi pour l'application et la validation de notre étude en conditions industrielles est un produit complexe dans le sens où il est élaboré à partir de matière première très variée, aux pH initiaux extrêmement dispersés. Il s'agit de deux salades composées : les *Saladières Western* et *Mexicana* de marque Saupiquet. Ces salades sont composées d'une galette de thon posée au fond de la boîte, recouverte d'une sauce acide de type vinaigrette et complétée d'un mélange de légumes. L'étude se limitera au format de boîte 1/3, type bol (fond arrondi).

2.3.1. Mesure des variations de la valeur des facteurs au cours de la stérilisation et du stockage

En ce qui concerne les cinétiques de destructions bactériennes, le point critique est le point qui présentera les paramètres environnementaux les plus favorables à la survie bactérienne : température la plus basse et/ou pH le plus élevé. La première étape de l'étude consiste à localiser ce point et à mesurer l'évolution de la valeur des facteurs à ce niveau.

2.3.1.1. Facteur température

2.3.1.1.1. Suivi de la température au cours de la stérilisation

Les sondes, d'un diamètre de 1 mm, sont placées dans un doigt de gant afin d'assurer l'étanchéité. Le contenu de la boîte étant très hétérogène, les sondes de température sont placées à différents niveaux afin de déterminer le point froid. Nous distinguons alors quatre niveaux :

- ⇒ mesure au niveau de la galette de thon
- ⇒ mesure à cœur de la boîte
- ⇒ mesure au tiers haut de la boîte
- ⇒ mesure en surface

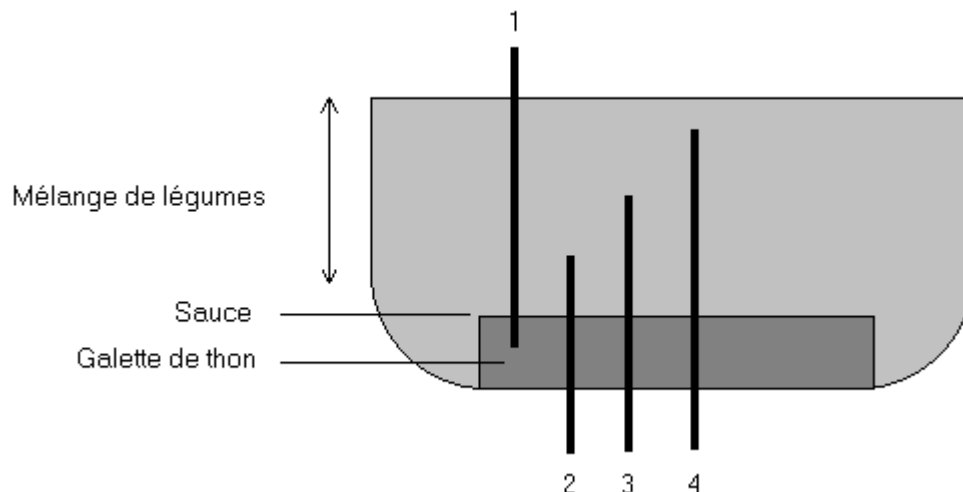


Figure II.2 : Schématisation du contenu Saladière format 1/3 type bol avec l'emplacement des sondes de température.

La boîte bol format 1/3 présente une hauteur de 49 mm et d'une longueur de 105 mm. La sonde de température notée n°1 pénètre dans la boîte par l'opercule. La longueur de cette sonde est de 43 mm. Les trois autres sondes notées n°2, 3 et 4

pénètrent la boîte par le fond. Leurs longueurs respectives sont de 26, 33 et 43 mm. Les sondes sont reliées à un enregistreur Elab connecté au logiciel TPRO qui recueille une mesure toutes les 30 secondes.

2.3.1.1.2. Modélisation du suivi de température

Le modèle de Ball (1923), rappelé en annexe, est utilisé. Le chauffage s'appuie sur l'équation :

$$\log \frac{T_{\infty} - T_0}{T_{\infty} - T} = \frac{1}{f_h} t - \log j_h \quad \text{Equation II.10}$$

Où T_{∞} et T_0 sont respectivement la température de palier dans l'autoclave et la température initiale du produit. Les facteurs t et T sont respectivement le temps de traitement et la température au temps t . les paramètres f_h et j_h caractérisent à eux seuls la cinétique de montée en température.

La phase de refroidissement est décrite par l'équation :

$$-\log \frac{T_g - T_c}{T - T_c} = -\frac{t}{f_c} + \log j_c \quad \text{Equation II.11}$$

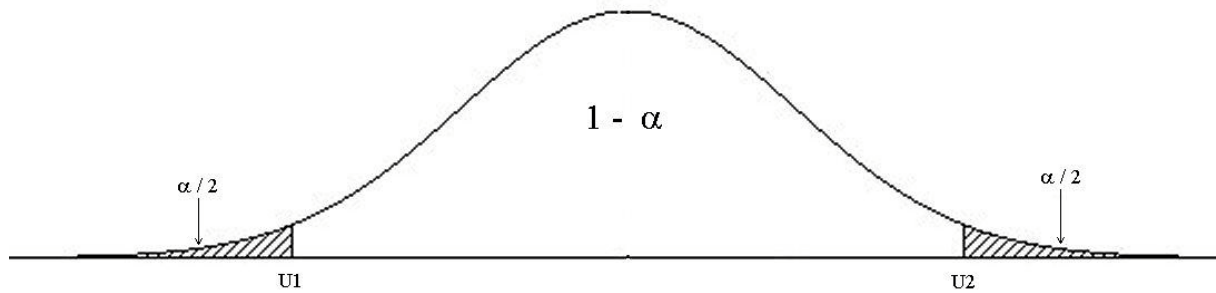
Où T_g et T_c sont respectivement la température de fin de phase de chauffage et la température de l'eau refroidissement. Les paramètres f_c et j_c caractérisent la phase de refroidissement.

2.3.1.1.3. Intervalle de confiance des paramètres du modèle de Ball

Quatre échantillons de valeurs f_h , j_h , f_c et j_c sont déterminés sur plusieurs suivis de température. Pour chaque échantillon, un intervalle de confiance est estimé. On doit poser l'hypothèse que notre échantillon est représentatif de la population, notée Φ . On le considère comme référence. La normalité de l'échantillon est vérifiée par le test de Shapiro-Wilk. Par conséquent, si μ est la moyenne de l'échantillon et σ son écart type, la population Φ suit une loi normale $N(\mu, \sigma)$.

$\Phi \sim N(\mu ; \sigma)$ par conséquent, $U = \frac{\Phi - \mu}{\sigma} \sim N(0 ; 1)$

U est tabulée. Pour un α donné, la table donne deux valeurs u_1 et u_2 telles que :



On a donc deux valeurs φ_1 et φ_2 telles que $P(\varphi_1 < \Phi < \varphi_2) = 1 - \alpha$

$$\varphi_1 = \mu + u_1 \sigma$$

$$\varphi_2 = \mu + u_2 \sigma$$

Et pour $\alpha = 0,05$ on a $u_1 = -1,96$ et $u_2 = 1,96$

2.3.1.2. Facteur pH

2.3.1.2.1. Suivi du pH au cours du traitement

Les mesures de pH pendant la stérilisation ne sont pas réalisables dans de telles conditions de température et de pression. Les mesures ont donc été réalisées à température ambiante. Les boîtes suivent un cycle de stérilisation « classique ». Les montées et descentes en température du stérilisateur sont identiques à celles d'un cycle de stérilisation appliqué en usine. Seul le temps de palier varie. En fin de cycle, les boîtes sont immédiatement ouvertes et le pH mesuré.

Des mesures préliminaires ont montré que le process de préparation des légumes (mélange, pressage) fait que tous les légumes possèdent un pH identique au moment de l'emboîtement. Par conséquent, les légumes seront considérés comme un composé homogène en pH. Seule leur localisation dans la boîte jouera sur leur pH.

Les mesures sont réalisées immédiatement après la sortie du pilote de stérilisation sur cinq zones de la boîte : la galette de thon ainsi que la sauce représentent les deux premières. Les trois autres zones correspondent à des tranches

transversales du mélange de légumes : deux tranches supérieures (de 40 grammes environ) et la tranche la plus basse en contact avec la sauce (80 grammes).

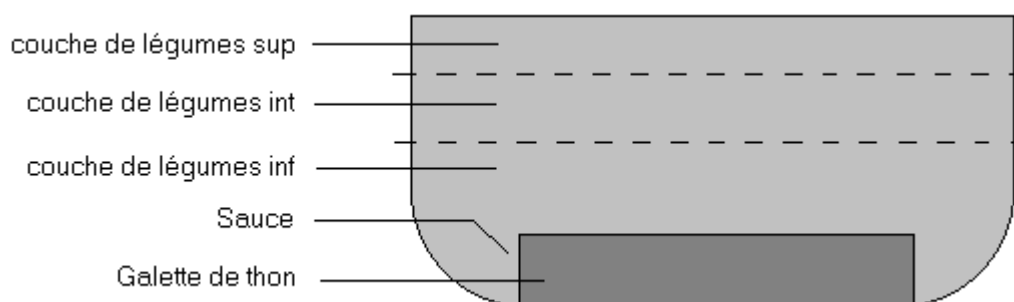


Figure II.3 : Schéma de la subdivision de la boîte en cinq zones de suivi de pH

En fin de cycle de stérilisation, les boîtes sont immédiatement ouvertes, les cinq zones de mesure sont séparées et placées sur des tamis. Les légumes couverts de sauce sont rincés rapidement à l'eau courante. Chaque zone est mixée au broyeur rotatif, puis le pH est mesuré.

2.3.1.2.2. Suivi du pH après la stérilisation (stockage)

Le pH post traitement est important compte tenu de son influence sur le recouvrement des spores bactériennes, et indirectement de son action sur la thermorésistance.

Les boîtes stérilisées sont stockées dans la même position que lors de la stérilisation (opercule en haut). Des mesures de pH de chacune des cinq zones schématisées figure II.2 sont réalisées à intervalles de temps réguliers jusqu'à l'équilibre total du pH dans la boîte.

2.3.1.2.3. Régions de confiance d'une droite de régression

Le suivi de pH de la *Saladière* au cours de la stérilisation peut être assimilée à une loi linéaire. Une région de confiance sera déterminée de part et d'autre de cette droite.

L'intervalle de confiance au risque α d'une valeur seule correspondante à la valeur x_0 de X est donnée par :

$$\bar{y}_0^- \leq Y_0 \leq \bar{y}_0^+$$

Avec :

$$\bar{y}_0^- = \hat{y}_0 - t_{\frac{\alpha}{2}}^{(n-2)} S_{resid} \sqrt{1 + \frac{1}{n} + \frac{(x_0 - \bar{x})^2}{\sum_{i=1}^k (x_i - \bar{x})^2}} \quad \text{Equation II.12}$$

$$\bar{y}_0^+ = \hat{y}_0 + t_{\frac{\alpha}{2}}^{(n-2)} S_{resid} \sqrt{1 + \frac{1}{n} + \frac{(x_0 - \bar{x})^2}{\sum_{i=1}^k (x_i - \bar{x})^2}} \quad \text{Equation II.13}$$

2.3.2. Mesure du temps minimum de stérilisation

L'objectif de cette étape est de mesurer le temps minimum de chauffage pour réduire une population de spores bactériennes de concentration connue dans une boîte à moins de une spore survivante par boîte. Autrement dit, on détermine le temps de traitement thermique nécessaire pour atteindre un nombre n de durée de réduction décimale connue ($n = \log$ de la population initiale / population finale). On peut le comparer au nombre de réduction décimal calculé.

2.3.2.1. Préparation et inoculation des boîtes

La contamination initiale des boîtes doit être connue. Etant donné que l'on ne peut stériliser préalablement les ingrédients en raison des modifications physico-chimiques qu'un tel traitement pourrait engendrer, les boîtes sont très fortement inoculées afin de pouvoir ensuite négliger la contamination apportée par les aliments. Le taux de contamination choisi s'élève à 10^5 spores de souches thermorésistantes par gramme de produit, soit $2,5 \cdot 10^7$ spores par Saladière. La contamination est répartie le plus uniformément possible dans la boîte. Pour cela, un inoculum de $5 \cdot 10^6$ spores par mL d'eau distillée est préparé et réparti de la façon suivante :

Thon : le thon est réduit en fines miettes. 1,02 mL de l'inoculum est réparti sur le maximum de surface des 51 g de fines miettes. Les miettes sont ensuite compactées en galettes.

Sauce : L'inoculum est directement ajouté à la sauce à hauteur de 0,88 mL pour 44g de sauce.

Légumes : 3,16 mL de l'inoculum est ajouté aux 157 g de légumes d'une boîte. Une moitié de l'inoculum est déposé en surface alors que l'autre moitié est injectée au

cœur d'une vingtaine de légumes choisis au hasard à l'aide d'une seringue montée d'une aiguille.

Au total, près de cinq millilitres de suspension sont répartis de cette façon dans chaque boîte préparée

En parallèle, des boîtes témoin non inoculées sont préparées. Elles permettront de montrer que les boîtes non stériles sont bien liées à la souche inoculée, et non à la contamination initialement présente sur les ingrédients entrant dans la composition de la boîte.

2.3.2.2. Stérilisation

Ces boîtes sont introduites dans un pilote de stérilisation (Multiprocess Barriquand). Le cycle choisi garde pour toutes les stérilisations, la même montée en température et le même refroidissement. Seul le temps de palier varie.

Pour chaque temps de stérilisation, trois boîtes inoculées ainsi que deux boîtes témoins non inoculées sont traitées.

2.3.2.3. Mise en évidence de la stérilité des boîtes

Après le cycle de stérilisation, les boîtes sont incubées 10 jours à la température optimale de croissance de la bactérie inoculée.

Au terme de la phase d'incubation, le contenu total de la boîte est introduit dans un sac stérile auquel est ajouté 250 mL de Tryptone sel. Le sac est placé dans un broyeur Stomacher et broyé 2 min. Un millilitre de ce broyat est déposé en boîte de pétri, coulé en gélose et incubé à la température optimale de croissance de la bactérie recherchée. La non stérilité est détectée par la croissance de colonies.

Chapitre 3

VALIDATION DU CHOIX DES MODELES PRIMAIRES

Les sept souches étudiées ne présentent pas toutes le même type de cinétique de destruction. Par conséquent, un modèle primaire est ajusté pour chaque souche en fonction de l'allure de sa courbe de survie parmi les modèles primaires présentés dans la partie bibliographique.

Le profil des courbes de survie est souvent linéaire. Cependant, les exceptions à cette règle ne sont pas rares. Cela a été le cas pour deux des sept souches que nous avons étudiées : *Clostridium sporogenes* Pasteur 79.3 pour laquelle on observe une cinétique « biphasée » et *Bacillus pumilus* qui présente une cinétique curviligne.

3.1. Souches aux courbes de survie log-linéaires

Il s'agit de l'allure de courbe de survie la plus couramment rencontrée dans le monde bactérien. C'est le cas de cinq de nos sept souches : *Bacillus stearothermophilus* ATCC 12980, *Bacillus stearothermophilus* A36, *Bacillus coagulans*, *Clostridium sporogenes* A27 et *Alicyclobacillus acidoterrestris*.

3.1.1. Collecte des données expérimentales

L'ensemble des données est obtenu par réalisation de traitements thermiques dans différentes conditions environnementales (température, pH de traitement et pH de recouvrement), présenté dans la partie matériel et méthodes. Nous disposons au total de 351 cinétiques avec une moyenne de 6,8 points chacune (tableau III.1).

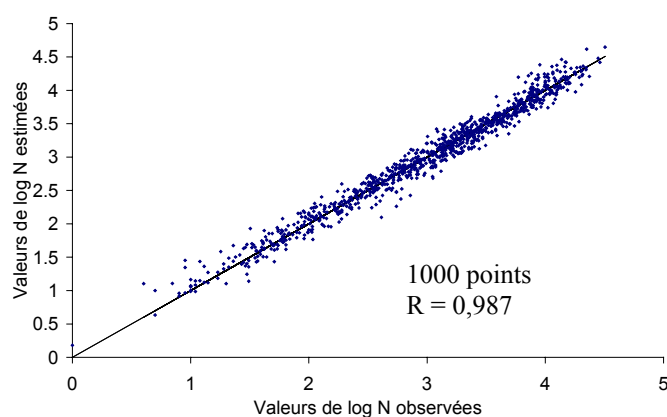
Tableau III.1 : Quantité de jeux de données pour les cinq souches présentant une destruction log-linéaire

Souche	Nb de cinétiques	Nb de points par cinétique
<i>Bacillus stearothermophilus</i> ATCC 12980	130	7,7
<i>Bacillus stearothermophilus</i> A36	56	6,5
<i>Bacillus coagulans</i>	47	6,9
<i>Clostridium sporogenes</i> A27	63	6,4
<i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i>	55	6,4

3.1.2. Evaluation de la qualité d'ajustement

Les paramètres N_0 et D sont estimés par régression linéaire. L'observation des $R^2_{\text{ajusté}}$ moyens de l'ensemble des souches montre un bon ajustement général du modèle log linéaire. Une analyse des $R^2_{\text{ajusté}}$ de chaque cinétique de destruction est effectuée et donne les valeurs moyennes, minimales, maximales ainsi que l'écart type. Nous illustrons graphiquement ce bon ajustement en traçant les valeurs estimées en fonction des valeurs observées :

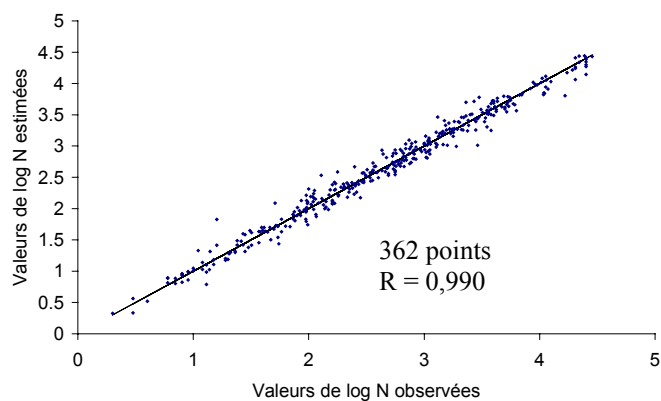
Bacillus stearothermophilus ATCC 12980



Analyse des R^2_{ajust} (par courbe de survie)

R^2_{ajust} moyen	0,938
R^2_{ajust} min	0,334
R^2_{ajust} max	1,000
Ecart type	0,102

Bacillus stearothermophilus A36

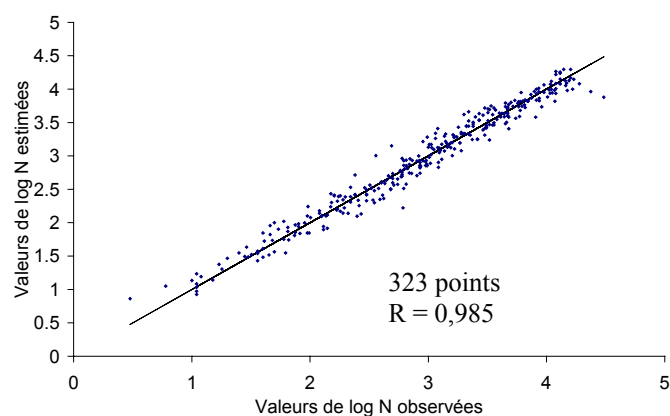


Analyse des R^2_{ajust}

(par courbe de survie)

R^2_{ajust} moyen	0,957
R^2_{ajust} min	0,758
R^2_{ajust} max	0,999
Ecart type	0,050

Bacillus coagulans

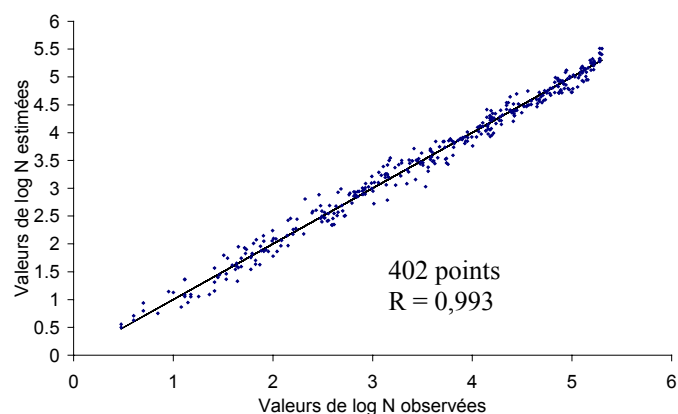


Analyse des R^2_{ajust}

(par courbe de survie)

R^2_{ajust} moyen	0,950
R^2_{ajust} min	0,796
R^2_{ajust} max	0,997
Ecart type	0,047

Clostridium sporogenes A27

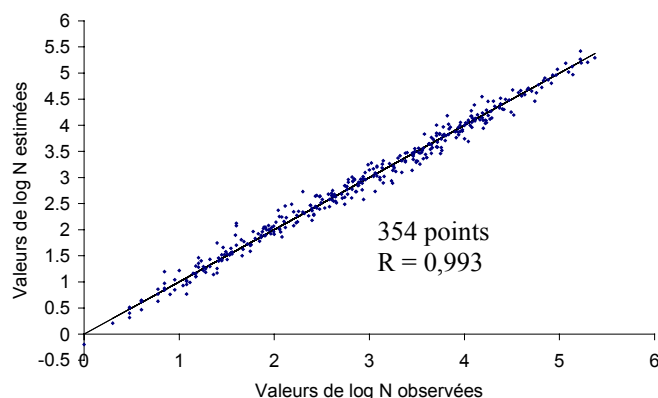


Analyse des R^2_{ajust}

(par courbe de survie)

R^2_{ajust} moyen	0,969
R^2_{ajust} min	0,825
R^2_{ajust} max	1,000
Ecart type	0,032

Alicyclobacillus acidoterrestris



Analyse des R^2_{ajust} (par courbe de survie)

R^2_{ajust} moyen	0,966
R^2_{ajust} min	0,789
R^2_{ajust} max	0,999
Ecart type	0,043

Ces représentations graphiques des valeurs estimées en fonction des valeurs observées confirment la très bonne qualité d'ajustement du modèle log-linéaire, validant l'utilisation de ce modèle. Ceci s'explique d'un point de vue biologique par une répartition homogène des thermorésistances entre les différents individus de la population bactérienne considérée.

3.2. Souches aux courbes de survie non log-linéaires

3.2.1. Courbe de survie de *C. sporogenes* Pasteur 79.3

3.2.1.1. Estimation des paramètres

Les profils de destruction (figure III.1) indiquent que notre souche comprend deux sous populations : une première thermosensible rapidement détruite et une seconde thermorésistante.

La population thermosensible suit une loi de destruction d'ordre un, tandis que la thermorésistante nécessite une activation avant sa destruction également d'ordre un.

La partie de courbe correspondant à la phase d'activation de la population thermorésistante n'apparaît sur le graphique que lorsque la destruction de la population thermosensible est rapide, c'est-à-dire à haute température. C'est le cas des cinétiques obtenues à des températures de traitement de 101, 104, 107 et 110°C. Dans tous les autres cas, la courbe correspondant à la destruction de la population thermosensible masque cette phase d'activation. L'allure générale du graphique ne correspond alors plus qu'à deux segments de droite.

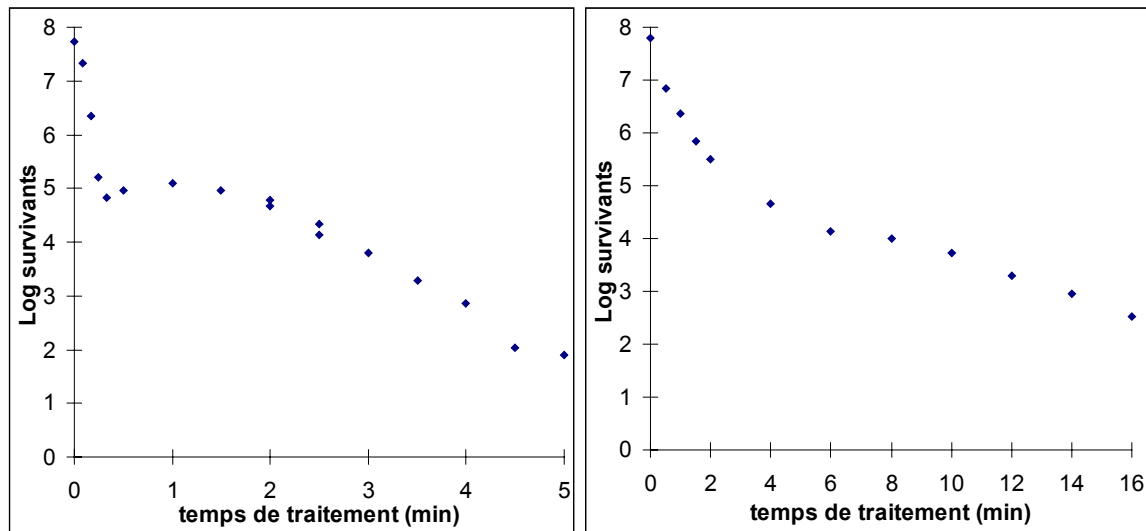


Figure III.1 : Cinétique de destruction de la souche de *Clostridium sporogenes* Pasteur 79.3 à 104°C (à gauche) et à 98°C (à droite).

Sur l'ensemble des courbes de survie réalisées, nous pouvons en fait observer trois profils de destruction différents :

❶ Un premier profil (figure III.1, graphique de gauche), observable à température de traitement élevée, lorsque la destruction rapide de la population thermosensible laisse apparaître une activation de la population thermorésistante (cas des cinétiques réalisées à 101, 104, 107 et 110°C). Le modèle de Rodriguez (1988) est ajusté. On suppose que la population thermorésistante se trouve entièrement sous sa forme inactive au début du traitement thermique.

$$N = X_0 \cdot e^{-k_1 t} + Y_0 \cdot (e^{-k_2 t} - e^{-(k_2 + h)t}) \quad \text{Equation III.1}$$

où N est le nombre de spores dénombré (active)
 X_0 est la population thermosensible initiale
 Y_0 est la population thermorésistante inactive initiale
 k_1 est le taux de destruction de la population X
 k_2 est le taux de destruction de la population Y
 h est le taux d'activation de la population Y

❷ Un second profil (figure III.1, graphique de droite) ne laissant apparaître que deux segments de droite correspondant une destruction log-linéaire de chacune des deux sous populations. Une variante du modèle de Rodriguez (1988) est adoptée. Le paramètre correspondant à la vitesse d'activation de la population thermorésistante est supprimé ($h = 0$).

Tableau III.2 : Valeurs des paramètres D (en min) propres à chaque sous population ajustées par minimisation de la somme des carrés des écarts (D_1 : population sensible ; D_2 : population résistante). Les intervalles de confiance à 95% sont indiqués entre parenthèses. INF : infinis.

Plan monofactoriel Température (pH et pH' neutre)				
température	nb points	D_1	D_2	R^2_{ajust}
90	9	52,77 (42,38 - 69,88)	---	0,951
92	9	25,30 (19,01 - 37,88)	---	0,914
95	12	1,71 (0,79 - 2,98)	8,35 (6,82 - 12,52)	0,992
98	12	0,81 (0,55 - 1,16)	5,85 (4,58 - 8,12)	0,994
101	8	0,23 (0,16 - 0,34)	4,77 (2,89 - 16,96)	0,994
101	10	0,19 (INF)	2,66 (INF)	0,964
104	17	0,090 (INF)	1,07 (INF)	0,967
107	14	0,068 (INF)	0,47 (INF)	0,963
110	10	0,0065 (INF)	0,22 (INF)	0,923
113	5	---	0,11 (INF)	0,994
116	5	---	0,066 (INF)	0,939

Plan monofactoriel pH de traitement ($T^\circ = 95^\circ\text{C}$; pH' neutre)				
pH	nb points	D_1	D_2	R^2_{ajust}
3,56	3	---	1,42 (INF)	0,924
4,02	5	---	1,45 (1,26 - 1,70)	0,995
4,03	3	0,074 (INF)	---	0,943
4,23	13	0,071 (0,038 - 0,16)	2,70 (2,06 - 4,00)	0,973
4,25	11	0,078 (0,050 - 0,13)	3,19 (2,07 - 8,12)	0,980
4,5	4	---	1,58 (0,85 - 10,57)	0,945
4,54	4	0,089 (0,051 - 0,39)	---	0,954
5,04	5	---	2,85 (INF)	0,789
5,08	8	0,15 (INF)	5,73 (INF)	0,944
5,08	4	0,17 (0,13 - 0,26)	---	0,991
5,24	12	0,21 (0,16 - 0,29)	9,08 (6,06 - 13,39)	0,991
5,25	10	0,27 (0,22 - 0,34)	5,03 (3,20 - 14,68)	0,996
5,5	10	0,16 (0,10 - 0,34)	6,38 (INF)	0,963
6	10	0,40 (0,25 - 0,63)	4,41 (2,44 - 33,87)	0,988
6	7	0,40 (0,19 - 0,90)	4,01 (INF)	0,988
6,06	6	---	5,68 (4,84 - 6,86)	0,989
6,2	9	0,77 (0,57 - 1,02)	4,42 (INF)	0,995
6,24	16	0,48 (0,29 - 0,86)	4,97 (3,79 - 7,74)	0,979
6,5	9	0,88 (0,43 - 1,43)	9,46 (INF)	0,985
6,79	11	1,25 (0,79 - 2,01)	8,54 (7,05 - 11,25)	0,996
7	8	1,24 (0,64 - 2,16)	6,48 (5,02 - 10,48)	0,996
7,5	8	2,23 (0,75 - 7,27)	11,08 (9,01 - 15,64)	0,994
8	9	2,87 (0,081 - 7,93)	14,12 (12,07 - 18,99)	0,996

Plan monofactoriel pH de recouvrement ($T^\circ = 95^\circ\text{C}$; pH neutre)				
pH'	nb points	D_1	D_2	R^2_{ajust}
5,74	5	---	0,32 (0,23 - 0,52)	0,970
5,85	6	---	0,27 (0,21 - 0,38)	0,969
6,14	6	0,64 (INF)	2,12 (INF)	0,998
6,55	8	0,59 (0,27 - 1,21)	3,50 (2,52 - 6,46)	0,993
6,55	14	0,49 (0,32 - 0,49)	3,35 (3,53 - 13,65)	0,979
6,85	11	1,73 (0,51 - 3,37)	7,57 (6,11 - 11,06)	0,991
7	7	1,78 (INF)	6,33 (INF)	0,993
7	17	1,38 (0,73 - 2,30)	11,91 (7,79 - 29,34)	0,961
7,45	15	9,87 (8,06 - 12,74)	---	0,914
7,48	6	---	5,34 (3,95 - 8,28)	0,965
7,5	9	---	7,28 (5,75 - 9,91)	0,943
7,85	16	11,22 (9,01 - 14,87)	---	0,891

③ Un troisième où seulement une droite peut être distinctement identifiée en raison de points mal répartis ou en faible nombre. Le modèle log-linéaire est ajusté.

Le tableau III.2 indique les valeurs de l'ensemble des paramètres. Afin de garder une cohérence avec les souches précédentes, les constantes de cinétique de k du modèle de Rodriguez seront données sous forme de durée de réduction décimale D .

Nous noterons D_1 et D_2 les durées de réduction décimale respectives des populations sensibles et thermorésistantes.

$$D = \frac{\ln 10}{k}$$

3.2.1.2. Evaluation de la qualité d'ajustement & Examen des résidus

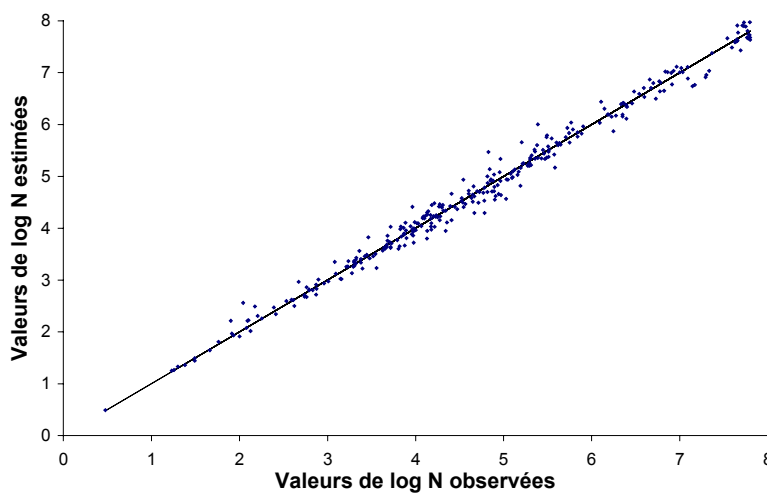


Figure III.2 : Représentation graphique de la qualité d'ajustement du modèle de Rodriguez (1988) sur les courbes de survie de *Clostridium sporogenes* Pasteur 79.3

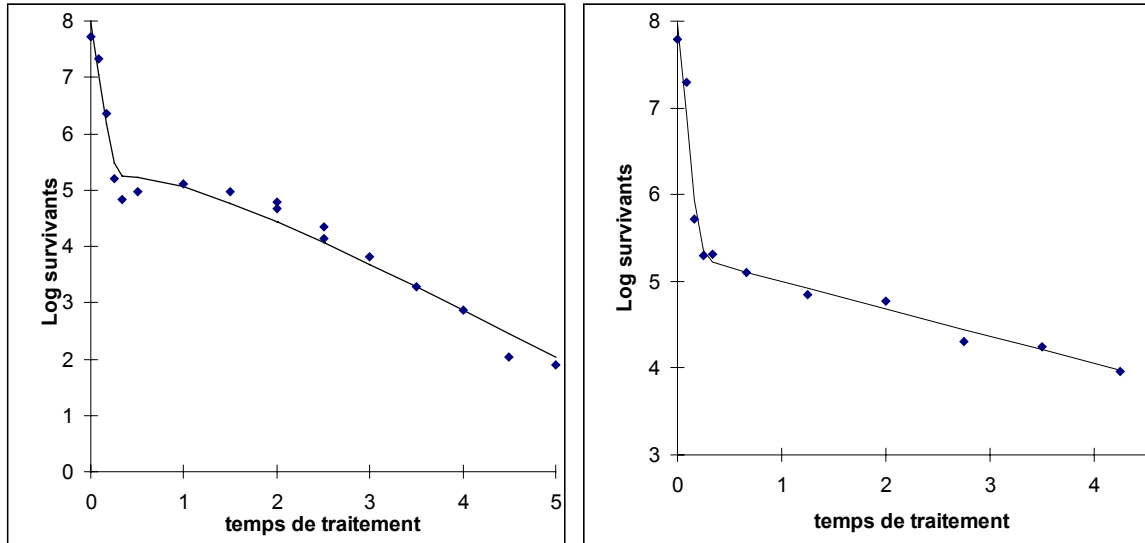


Figure III.3 : Représentation de l'ajustement du modèle de Rodriguez sous sa forme initiale à cinq paramètres (à gauche, 104°C – pH7), et sous sa forme à 4 paramètres (à droite, 95°C – pH 4,25).

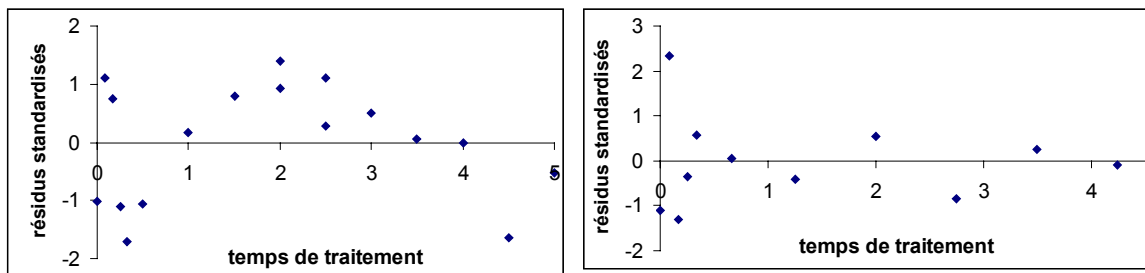


Figure III.4 : Représentation des résidus standardisés en fonction du temps de traitement (en min)

La qualité d'ajustement est acceptable. Le $R^2_{\text{ajusté}}$ moyen est de 0,966 avec un écart type de 0,038. La représentation graphique (figure III.3) illustre cette qualité d'ajustement.

Le test de Shapiro-Wilk indique que les résidus de la quasi-totalité des jeux de données sont gaussiens. Le test de Durbin-Watson usuellement appliqué pour mettre en évidence l'autocorrélation nécessitant plus de points, nous nous limiterons à l'analyse graphique. Les représentations graphiques 4 et 5 sont très représentatives de l'ensemble des résultats. D'une part, nous ne mettons en évidence aucune hétéroscédasticité. D'autre part, une autocorrélation importante des résidus apparaît sur le graphique de gauche (figure III.4). Ceci se réitère pour les quatre jeux de données où le modèle de Rodriguez à 5 paramètres est utilisé.

3.2.1.3. Projection des régions de confiance

La projection des régions de confiance indique que le modèle de Rodriguez à 5 paramètres présente des corrélations structurelles très fortes, avec des régions de confiance s'étendant à l'infini. Les intervalles de confiance pour la valeur de paramètres ne peuvent donc pas être déterminés pour les cinétiques en question (température de traitement de 101, 104, 107 et 110°C).

Le modèle de Rodriguez réduit à quatre paramètres perd ces intervalles de confiance s'étendant à l'infini (figure III.5). Cependant, il conserve des corrélations structurelles assez forte entre les paramètres X_0 et D_1 d'une part, et entre Y_0 et D_2 d'autre part, traduites par les formes allongées des régions de confiance.

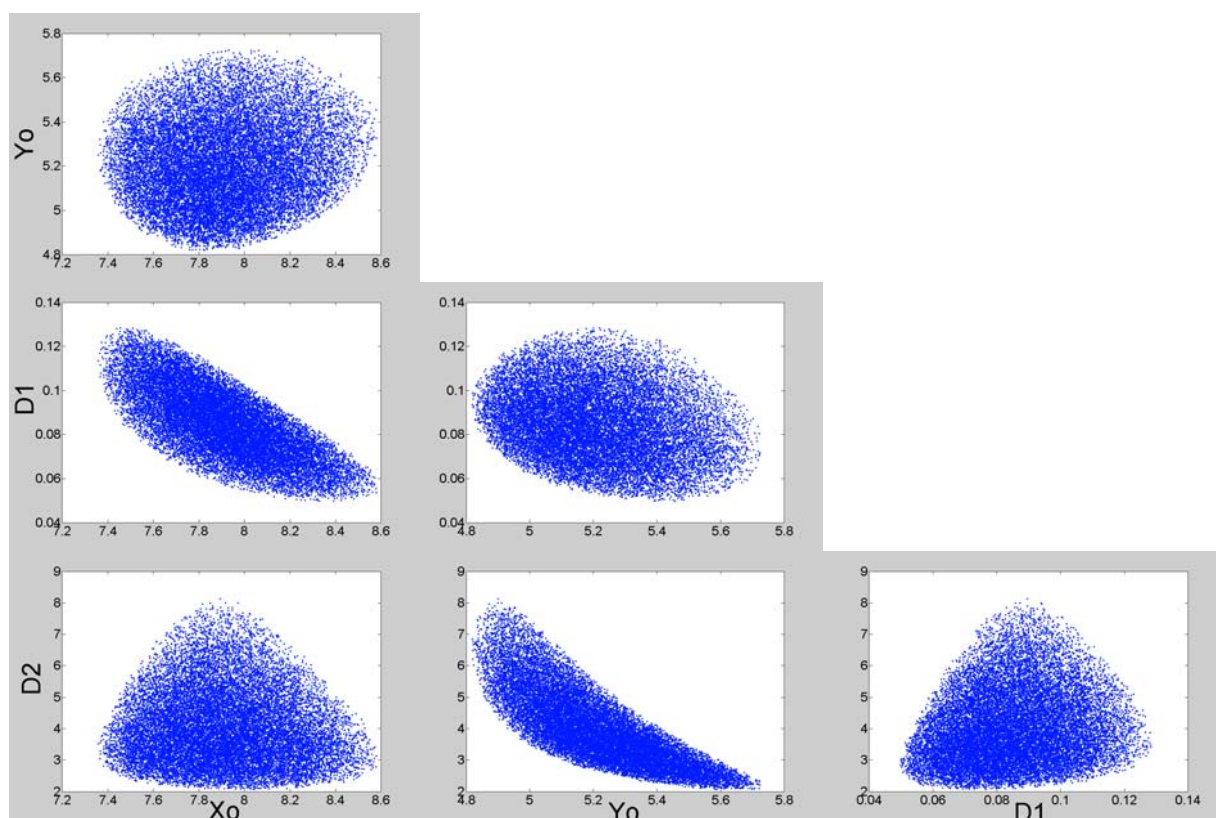


Figure III.5 : projection des régions de confiance pour la valeur des paramètres du modèle de Rodriguez à quatre paramètres (cinétique 95°C – pH4,25). Les populations X_0 et Y_0 sont exprimées sous leur forme logarithmique.

3.2.2. Courbe de survie de *Bacillus pumilus*

3.2.2.1. Estimation des paramètres

Le modèle primaire ajusté sur les courbes de survie de *Bacillus pumilus* est le modèle de Peleg *et al.* (1998) reparamétrisé par Mafart *et al.* (2002).

$$\log N = \log N_0 - \left(\frac{t}{\delta} \right)^p \quad \text{Equation III.2}$$

Où N_0 est la population initiale
 δ est la durée de la première réduction décimale
 p est un paramètre empirique

L'estimation des paramètres N_0 , δ et p est effectuée pour chaque cinétique par minimisation de la somme des carrés des écarts. L'algorithme ne rencontre aucun problème de convergence.

Nous observons que la valeur de p ne varie que très peu en fonction des conditions environnementales. Le coefficient de corrélation calculé entre le paramètre p et les facteurs température, pH de traitement et pH de recouvrement sont relativement faibles (respectivement, le r est égal à 0,828 0,761 et 0,716). Mais selon la table de Fisher et Yates, ces coefficients sont significatifs à 95%.

La figure III.6 représente les valeurs de p ainsi que ses intervalles de confiance en fonction des 3 facteurs environnementaux. Nous pouvons noter que 5 intervalles de confiance sont très importants et ne peuvent être représentés sur la zone de graphique. Nous pouvons visualiser la faible corrélation entre le p et les trois facteurs environnementaux, malgré une légère tendance décroissante de la valeur de p en fonction de la température, et croissante en fonction du pH. De plus, leurs régions de confiance encadrent dans 29 cas sur 31 la valeur de p moyen. Nous en concluons que les facteurs température et pH ont peu d'influence sur le paramètre p .

La projection des régions de confiance déterminées sur 31 cinétiques de destruction indique une corrélation structurelle importante entre les paramètres (notamment p et δ), traduite par une forme elliptique très allongée des régions de confiance. La figure III.7 représente la projection des régions de confiance des trois paramètres déterminées selon la méthode de Lobry *et al.* (1991). La forme des régions de confiance de la cinétique représentée (101°C, pH7) caractérise l'ensemble des observations réalisées sur les autres cinétiques.

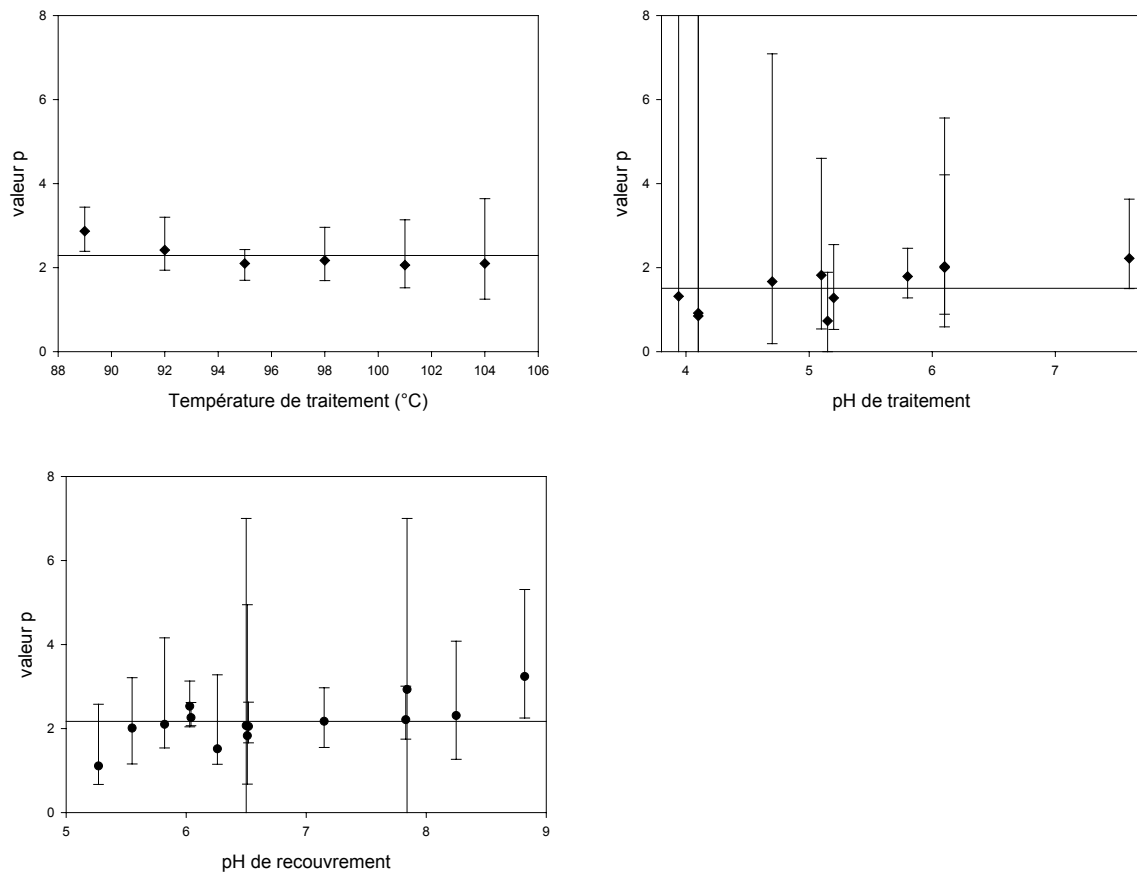


Figure III.6 : Représentation du paramètre p en fonction des facteurs environnementaux (température, pH de traitement et pH de recouvrement) ainsi que ses indices de confiance à 95% déterminés par la méthode de Lobry *et al.* (1991). La moyenne des valeurs de p est tracée.

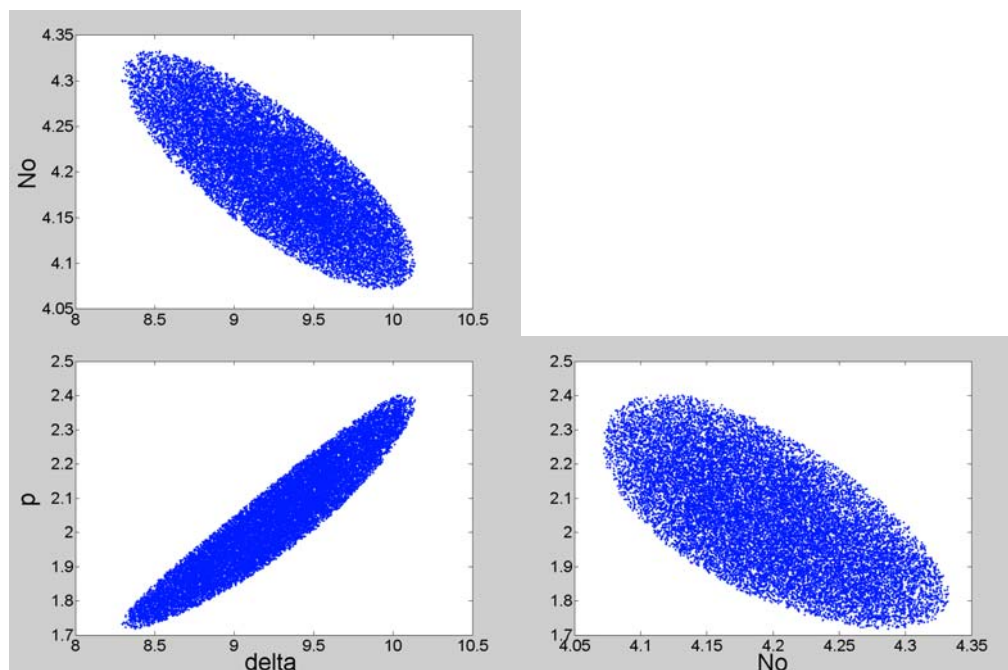


Figure III.7 : Projection des régions de confiance des paramètres N_0 , δ et p (température de traitement : 101°C , pH7). La population N_0 est exprimée sous sa forme logarithmique.

Compte tenu de la faible variabilité de p en fonction des facteurs, ainsi que de la forte corrélation structurelle avec δ , ce paramètre qui reflète la distribution des thermo-résistances au sein de la population, peut donc être fixé pour toutes les cinétiques de cette souche de *Bacillus pumilus*. Le modèle s'ajuste alors avec seulement deux paramètres, et de surcroît devient linéaire. Les corrélations structurelles sont supprimées.

Ceci nous conduit à un nouvel ajustement du modèle où deux paramètres varient en fonction des facteurs environnementaux, et un troisième fixe pour l'ensemble des cinétiques. En raison de ce troisième paramètre que l'on peut considérer en première approximation comme caractéristique de la souche, et indépendant de la température et du pH, l'ajustement doit être réalisé en une seule régression sur l'ensemble des 31 cinétiques, en imposant une valeur de p fixe (matériel et méthodes).

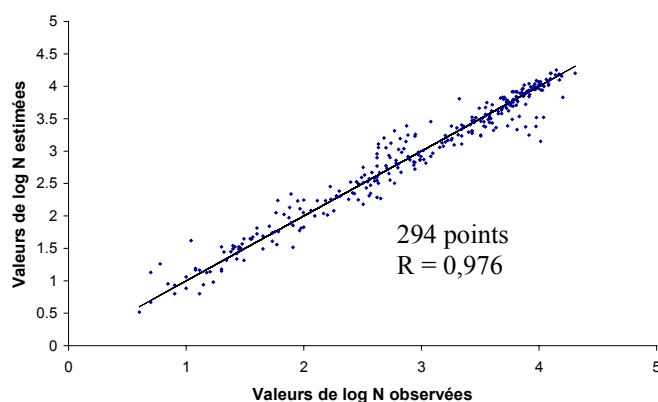
Cet ajustement est réalisé par minimisation de la somme des carrés des écarts. Compte tenu du grand nombre de paramètres à ajuster simultanément, le risque que l'algorithme converge vers un minimum local est important. Afin de le vérifier, le calcul de minimisation est répété 5000 fois à partir de paramètres initiaux tirés aléatoirement. L'algorithme converge dans une très grande majorité des tirages vers une somme des carrés des écarts unique, avec des paramètres ajustés identiques dans tous les cas. La valeur de p est alors de 2,03. Les valeurs estimées des paramètres sont présentées dans le tableau III.3.

Tableau III.3 : Estimation des paramètres du modèle de Mafart *et al.* (2002) sur les cinétiques obtenues sur *Bacillus pumilus*. Les intervalles de confiance à 95% sont indiqués entre parenthèses pour chaque paramètre. INF : infini.

température	nb points	δ en min	log N_0 (en CFU)	R^2_{ajust}
89	8	42,71 (31,68 – 85,79)	4,25 (3,24 – 5,25)	0,971
92	9	17,29 (12,78 – 37,43)	3,92 (2,93 – 4,89)	0,983
95	18	9,24 (7,52 – 12,18)	4,20 (3,58 – 4,83)	0,992
98	12	3,70 (2,84 – 6,24)	4,09 (3,23 – 4,95)	0,984
101	10	1,46 (1,08 – 3,18)	3,97 (3,06 – 4,87)	0,985
104	7	0,55 (0,42 – 0,90)	4,08 (3,01 – 5,17)	0,985
pH trait ^{ment}	nb points	δ en min	log N_0 (en CFU)	R^2_{ajust}
3,94	9	2,10 (1,49 – 11,40)	3,25 (2,38 – 4,12)	0,779
4,10	10	1,92 (INF)	3,38 (INF)	0,311
4,10	6	1,57 (INF)	3,15 (INF)	0,286
4,70	9	2,74 (1,95 – 9,56)	3,33 (2,38 – 4,28)	0,826
5,10	12	4,07 (3,09 – 7,16)	3,52 (2,63 – 4,42)	0,902
5,15	5	3,26 (INF)	3,83 (INF)	0,596
5,20	8	2,91 (2,19 – 5,20)	3,52 (2,61 – 4,44)	0,907
5,80	8	3,98 (3,04 – 6,77)	3,94 (2,93 – 4,95)	0,988
6,10	6	5,60 (3,98 – 19,13)	4,12 (2,65 – 5,58)	0,960
6,10	10	5,23 (4,01 – 8,54)	3,99 (3,07 – 4,90)	0,932
7,60	8	10,52 (INF)	4,04 (INF)	0,981
pH recouv ^{nt}	nb points	δ en min	log N_0 (en CFU)	R^2_{ajust}
5,27	10	1,51 (1,14 – 2,68)	3,58 (2,63 – 4,53)	0,912
5,55	7	2,68 (2,00 – 5,26)	4,03 (2,84 – 5,23)	0,989
5,82	12	3,34 (2,55 – 5,58)	3,91 (3,07 – 4,76)	0,977
6,03	8	4,50 (3,26 – 11,17)	4,10 (3,09 – 5,10)	0,986
6,04	13	5,66 (4,25 – 10,72)	4,07 (3,25 – 4,89)	0,993
6,26	13	4,63 (3,54 – 7,79)	3,80 (2,90 – 4,70)	0,977
6,50	7	5,32 (3,89 – 11,81)	3,85 (2,27 – 5,43)	0,904
6,51	6	5,70 (4,25 – 10,78)	4,01 (2,86 – 5,16)	0,987
6,52	11	6,05 (4,40 – 14,68)	4,00 (3,13 – 4,87)	0,993
7,15	12	7,72 (5,98 – 12,22)	3,94 (3,14 – 4,74)	0,987
7,83	11	8,37 (6,47 – 13,23)	3,97 (3,14 – 4,82)	0,990
7,84	5	7,53 (INF)	4,02 (INF)	0,969
8,25	12	6,99 (2,24 – 12,76)	3,83 (2,85 – 4,81)	0,932
8,82	12	5,20 (4,00 – 8,54)	3,84 (2,90 – 4,78)	0,917
p global : 2,03			IC_{95%} : 1,78 – 2,23	

3.2.2.2. Evaluation de la qualité d'ajustement

3.2.2.2.1. Représentation de l'ajustement global



Analyse des R^2_{ajust}	
R^2_{ajust} moyen	0,899
R^2_{ajust} min	0,286
R^2_{ajust} max	0,993
Ecart type	0,180

Figure III.8 : représentation de l'ajustement du modèle de Mafart *et al.* (2002) sur l'ensemble des cinétiques obtenues sur *Bacillus pumilus*

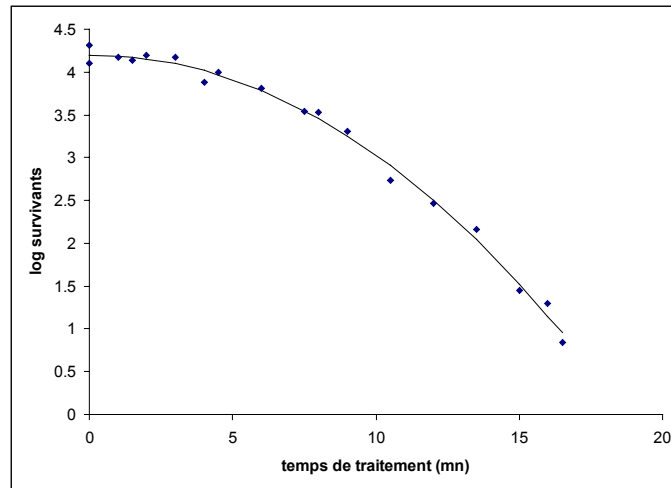
Les représentations graphiques de la qualité d'ajustement sur les figures III.3 et III.8 sont satisfaisantes. La valeur moyenne du R^2_{ajust} est de 0,892 avec un écart type de 0,182.

3.2.2.2.2. Examen des résidus

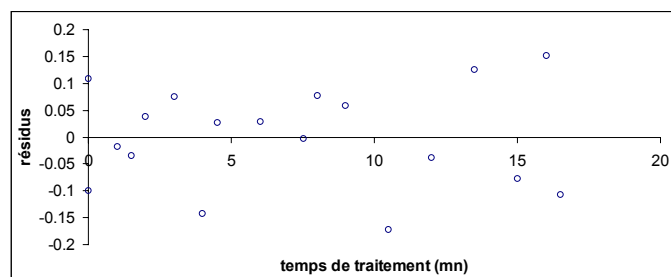
L'analyse graphique (figure III.9.B) témoigne d'une répartition aléatoire des résidus et met en évidence une bonne homocédasticité. Le test numérique de Shapiro-Wilk atteste que la répartition des résidus est gaussienne pour 27 cinétiques sur 31. Seules les cinétiques réalisées à 98°C et celles réalisées à pH de traitement 4,70, 5,20 et 7,60 ne répondent pas à ce critère.

La mise en évidence d'autocorrélation est effectuée graphiquement, car le faible nombre de points ne permet pas d'appliquer le test usuel de Durbin-Watson qui requiert un minimum de 15 points. Pour certaines cinétiques, l'observation graphique laisse apparaître une autocorrélation des résidus, c'est-à-dire que ces derniers ne sont pas totalement indépendant du temps de traitement. Ceci peut être expliqué par le fait de la fixation du paramètre p pour l'ensemble des jeux de données. Pour certaines cinétiques, cette valeur de p fixée est légèrement sous ou surestimée créant une partie de la réponse non expliquée par le modèle.

A.



B.



C.

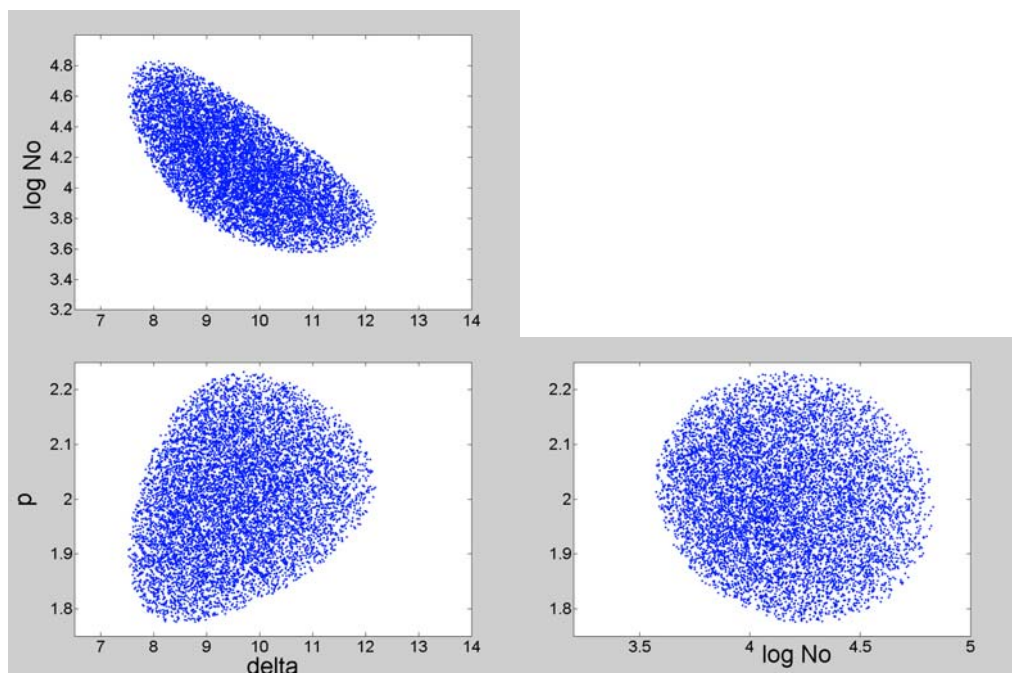


Figure III.9 : A. ajustement du modèle de Mafart *et al.* (2002) sur la cinétique de destruction réalisée à 95°C et pH neutre. B. répartition des résidus. C. Projection des régions de confiance pour la valeur des paramètres sur plans.

Nous choisissons de représenter graphiquement la cinétique composée du plus grand nombre de points, dont les conditions de traitement sont 95°C et pH 7 (figure III.9).

3.2.2.2.3. projection de la région de confiance

La détermination des régions de confiance des 63 paramètres (31 valeurs de N_0 , 31 valeurs de δ et une valeur de p) a été effectuée par la méthode de Lobry *et al.* (1991). Compte tenu du très grand nombre de paramètres, la méthode de calcul de l'hypervolume par tirage aléatoire de l'ensemble des paramètres demande un temps de calcul trop long pour pouvoir être réalisé par les outils informatiques dont nous disposons. Une méthode détournée est alors adoptée où le tirage aléatoire ne s'effectue que sur un seul triplet de paramètre (N_0 , δ et p) appartenant à une même cinétique, pendant que tous les autres paramètres sont fixés à leurs valeurs (c'est-à-dire aux valeurs où la somme des carrés des écarts est minimale). Le temps de calcul devient alors plausible pour 20000 points tirés par cinétique (cf matériel et méthodes). Les projections des régions de confiance sur plan sont représentées figure III.9.C pour la cinétique réalisée à 95°C.

3.3. Discussion

La plupart des populations de spores exposées à la chaleur suivent une destruction log-linéaire. Sur les sept souches étudiées, cinq suivent ce profil de destruction. Notre choix du modèle log-linéaire est largement justifié par les valeurs de $R^2_{\text{ajusté}}$ relativement élevées.

Mais d'autres souches se distinguent en suivant des cinétiques de destruction particulières. C'est le cas des souches de *Clostridium sporogenes* Pasteur 79.3 et *Bacillus pumilus* d'origine industrielle. Ces souches nécessitent des modèles plus élaborés, comportant généralement plus de paramètres. Les modèles surparamétrés offrent généralement une meilleure qualité d'ajustement, au dépend de la robustesse. Le choix des modèles s'est alors orienté vers ceux offrant le meilleur compromis entre qualité d'ajustement et robustesse.

3.3.1. Le modèle de Rodriguez (1988)

La courbe de survie de *Clostridium sporogenes* Pasteur 79.3 présente deux parties distinctes correspondant à chacune des deux sous populations. Deux modèles indépendants sont associés pour décrire cette cinétique. Le premier est le modèle log-linéaire classique. Le second est un modèle décrivant une activation des spores en début de traitement, associée à une destruction log-linéaire. Ce dernier modèle a d'abord été proposé sous sa forme la plus simple par Schull (1963), selon lequel la population ne peut être détruite qu'après avoir été activée. Pour Rodriguez (1988), les spores dormantes, tout en étant activées, subissent une destruction thermique selon le même taux de destruction que les spores actives. Le modèle le plus complet est proposé par Sapru (1992) pour qui le taux de destruction des spores actives est différent de celui des spores dormantes, nécessitant ainsi un paramètre supplémentaire. Nous avons préféré le modèle de Rodriguez, moins paramétré que celui de Sapru, sans perte de qualité d'ajustement.

Pourtant le modèle de Rodriguez reste fortement paramétré. Pas moins de six paramètres entre dans sa constitution initiale présentée en 1988 :

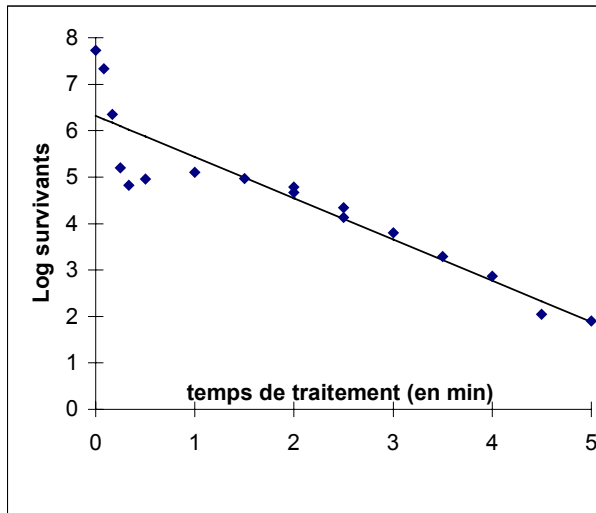
$$N = Z_0 \cdot e^{-k_1 t} + X_0 \cdot e^{-k_2 t} + Y_0 \left(e^{-k_2 t} - e^{-(k_2 + h) \cdot t} \right) \quad \text{Equation III.3}$$

où Z_0 est la population thermosensible initiale, X_0 et Y_0 sont respectivement les spores actives et non actives de la population thermorésistante, k_1 et k_2 sont les constantes de destruction respectives des populations thermosensible et thermorésistante, tandis que h est la constante de vitesse à laquelle les spores s'activent.

La projection des régions de confiance laissent apparaître de fortes corrélations structurelles. De plus, l'algorithme de minimisation converge souvent vers un des nombreux minima locaux. Ce problème peut être biaisé par suppression des paramètres jugés inutiles. En supposant que l'intégralité de la population thermorésistante se trouve sous sa forme inactive en début de traitement, X_0 est nul. L'algorithme de minimisation converge alors toujours vers la même valeur. La qualité d'ajustement reste satisfaisante, mais les corrélations structurelles demeurent très importantes : les intervalles de confiance peuvent tendre vers l'infini.

Exemple

Si la destruction d'une population tend vers l'infini, elle est alors considérée comme inexistante. La seconde va compenser en s'ajustant sur tous les points. On observe alors graphiquement une simple droite (fig III.10) dont la SCE vérifie l'inéquation de Beale (Inéquation II.8). Et par définition, les valeurs des paramètres de cette droite entrent alors dans l'intervalle de confiance à 95%.



$$\begin{array}{lll} X_0 & \rightarrow & 0 \\ D_1 & \rightarrow & \infty \\ h & \rightarrow & \infty \end{array}$$

Y_0 et D_2 forment une droite vérifiant l'équation II.8

Figure III.10 : exemple des fortes corrélations structurelles du modèle de Rodriguez.

Cas de la figure III.3 (graphique de droite)

Sur ce profil de destruction, la phase d'activation de la population thermorésistante n'apparaît pas. On peut alors réduire le modèle d'un nouveau paramètre : en supposant que la population thermorésistante est immédiatement activée, le paramètre h disparaît. Le modèle ne comportant plus que quatre paramètres perd alors les corrélations structurelles.

Compte tenu des difficultés auxquelles nous sommes confrontés lors de l'ajustement d'un tel modèle, nous pouvons nous interroger sur l'intérêt de modéliser entièrement la courbe de survie. Dans le cadre de notre étude, seule la population la plus thermorésistante est réellement intéressante. Sur cette dernière population, la phase d'activation n'a guère d'importance. Nous concluons que l'intérêt d'un tel modèle reste limité en raison d'une part des fortes corrélations structurelles qu'il présente, et d'autre part de la portée limitée dans notre étude. Une modélisation de la partie linéaire suivant la phase d'activation de la population thermorésistante serait alors suffisante, encore faut-il que cette partie linéaire soit suffisamment nette pour être exploitée.

3.3.2. Le modèle de Mafart *et al.* (2002)

La courbe convexe de destruction de *Bacillus pumilus* nous a conduit dans un premier temps au modèle de L'Haridon et Cerf (1978) qui consiste à déterminer la durée de réduction décimale sur la partie linéaire de la cinétique et à en déterminer l'ordonnée à l'origine. Or cette partie linéaire est souvent difficile à délimiter. Nous nous sommes alors intéressés à un autre type de modèle postulant une dispersion des thermorésistance au sein de la population suivant une distribution de Weibull dont la forme cumulative s'écrit :

$$N = N_0 \cdot e^{-kt^p} \quad \text{Equation III.4}$$

Où N représente le nombre de survivants au temps t de traitement, N_0 est le nombre initial d'individus composant la population. k et p sont deux paramètres de la distribution.

Peleg et Cole reparamètrent le modèle sous sa forme logarithmique décimale :

$$\log \frac{N}{N_0} = -b \cdot t^p \quad \text{Equation III.5}$$

Le paramètre b de ce modèle ne revêt aucune signification physique et n'est pas immédiatement interprétable. Nous préférons reparamétriser ce modèle en :

$$n = \log \frac{N_0}{N} = \left(\frac{t}{\delta} \right)^p \quad \text{Equation III.6}$$

Où n représente le nombre de réduction décimale. Le paramètre δ représente un temps, correspondant à la durée de la première réduction décimale, c'est-à-dire le temps pour lequel $N = N_0 / 10$. Le paramètre p reste un paramètre sans signification directement interprétable, mais correspond à un facteur de forme.

Ces modèles permettent d'ajuster de façon générale des courbes de survie concaves ou convexes, sans plage linéaire. Ce dernier modèle a été ajusté avec succès sur les cinétiques de destruction de la souche de *Bacillus pumilus*.

Fixation de la valeur de p

Comme nos résultats l'indiquent (fig III.6), la valeur de p décroît légèrement avec la température, et augmente avec le pH. Il semble donc que globalement, p augmente avec l'hostilité du milieu. Le choix de fixer p pour une souche donnée (comme nous l'avons fait) semble donc à priori nuire à la qualité d'ajustement. La

figure III.11 compare graphiquement les deux ajustements. La valeur de p du premier modèle est estimée sur l'ensemble des 31 cinétiques, tandis que le second est ajusté sur la cinétique considérée.

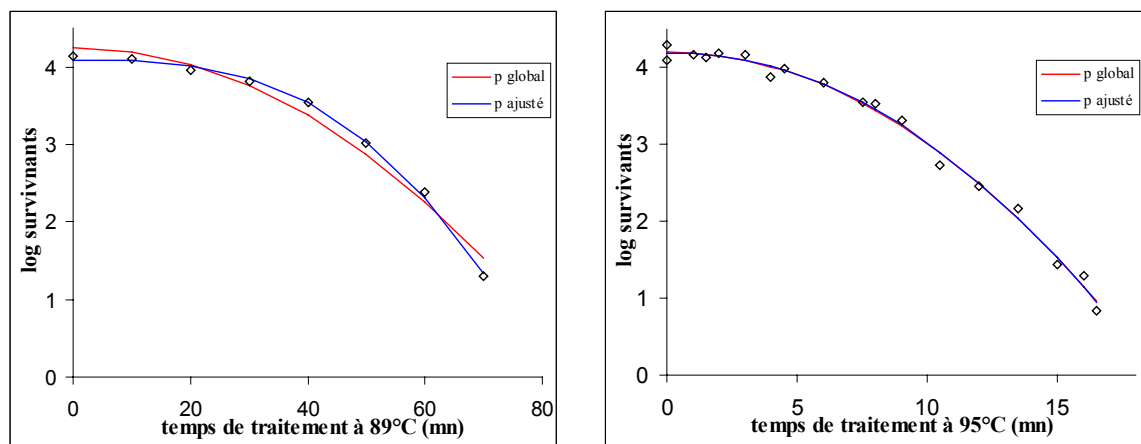


Figure III.11 : comparaison graphique des deux ajustements du modèle. En rouge, ajustement du paramètre p sur l'ensemble des jeux de données. En bleu, ajustement du paramètre p sur le jeu indépendamment des autres.

La valeur de p estimée sur la cinétique à 89°C est particulièrement éloignée de la valeur de p globale ($p_{89} = 2,87$; $p_{global} = 2,03$). La conséquence immédiate est une qualité d'ajustement nettement moins bonne, traduite par le coefficient de détermination diminuant de 0,998 à 0,979, mais restant satisfaisant. Cependant, la plupart des cinétiques se rapprochent du second cas présenté (à droite, fig III.11), c'est-à-dire des ajustements de modèles pour lesquels les valeurs de p ne diffèrent pas de façon significative d'un modèle à l'autre.

Les avantages tirés de la fixation de p pour une souche compensent largement les inconvénients cités précédemment. Lorsque p est estimé cinétique par cinétique, on observe une forte corrélation structurelle entre les paramètres p et δ (fig III.7), ce qui est le signe d'une surparamétration justifiant la fixation de p .

Enfin, l'ajustement des deux autres paramètres δ et N_0 peut s'effectuer par régression linéaire du $\log N$ en fonction du t^p .

Détermination de la valeur de p

Dans le cadre de notre étude, p a été ajusté par minimisation de la SCE sur l'ensemble des jeux de données collectés dans les différentes conditions de traitement

et de recouvrement. Cette méthode permet d'obtenir une valeur moyenne tenant compte de l'ensemble des résultats expérimentaux.

Dans ces conditions, la détermination de ce paramètre demande une quantité de résultats expérimentaux importante, difficile à mettre en œuvre. Une méthode plus rapide peut être proposée : si on postule que le paramètre p est indépendant des facteurs environnementaux, sa valeur peut théoriquement être fixée sur une cinétique effectuée dans une seule condition environnementale (choisie dans la zone médiane de la gamme des facteurs étudiée. Ex : pH 6 pour une gamme d'étude entre 5 et 7).

La qualité de la cinétique sur laquelle est estimée la valeur de p est capitale quant à la qualité d'ajustement du modèle, et par conséquent la manipulation demande à être réalisée plusieurs fois. Nous préconisons cinq répétitions d'une même cinétique de destruction pour une estimation correcte de la valeur du paramètre p .

Intérêts du modèle

Le traditionnel D est remplacé par le nouveau paramètre δ dont la signification reste voisine du concept de durée de réduction décimale. Les propriétés de ce modèle divergent du modèle log-linéaire par l'exposant p , pouvant être qualifié de paramètre régissant la courbure de la cinétique. Lorsque $p > 1$, la courbe est convexe. Ceci traduit une augmentation de la vitesse destruction au cours du traitement thermique. Lorsque $p < 1$, on observe l'inverse. Enfin le modèle de destruction log-linéaire se retrouve lorsque $p = 1$. δ est alors notée D .

Dans la seconde partie de ce manuscrit, un autre avantage remarquable de ce modèle sera mis en évidence : le paramètre δ obéit, au même titre que D , à la relation de Bigelow en fonction de la température (loi du z).

Inconvénient du modèle

Le principal inconvénient concerne son application aux calculs de valeurs stérilisatrices. Dans le cadre de ce modèle, ces dernières ne sont plus additives, invalidant les méthodes de calcul classique (méthode de Bigelow, méthode de Ball). Si l'on considère deux traitements thermiques successifs dont les VS sont F_1 et F_2 , la VS globale F devient :

$$F^p = F_1^p + F_2^p \quad \text{Equation III.7}$$

3.3.3. Effet global du pH sur les paramètres de thermo-résistance

Au cours du traitement thermique réalisé sur une population N_0 , une acidification du milieu va augmenter la vitesse de destruction en déstabilisant la structure de l'édifice sporal. A l'issue du traitement, une partie des spores constituant la population initiale est morte (inactivation irréversible). Les spores survivantes auront été endommagées par la chaleur. Elle constitue la population N_1 .

$$\log \frac{N_1}{N_0} = -\frac{t}{D} \quad \text{Si la cinétique suit le modèle log-linéaire}$$

ou

$$\log \frac{N_1}{N_0} = -\left(\frac{t}{\delta}\right)^p \quad \text{Si la cinétique suit le modèle de Mafart *et al.* (2002)}$$

Ces spores survivantes sont fragilisées et sont plus exigeantes vis-à-vis du milieu pour germer et proliférer. Le milieu de recouvrement, et notamment le pH, va alors jouer un rôle sélectif sur ces spores endommagées. Plus le milieu sera hostile, et plus le nombre de spores survivantes capables de proliférer sera faible. Il s'agit de la population N_2 (figure III.12).

$$\log \frac{N_2}{N_0} = -\frac{t}{D'} \quad \text{ou} \quad \log \frac{N_2}{N_0} = -\left(\frac{t}{\delta'}\right)^p$$

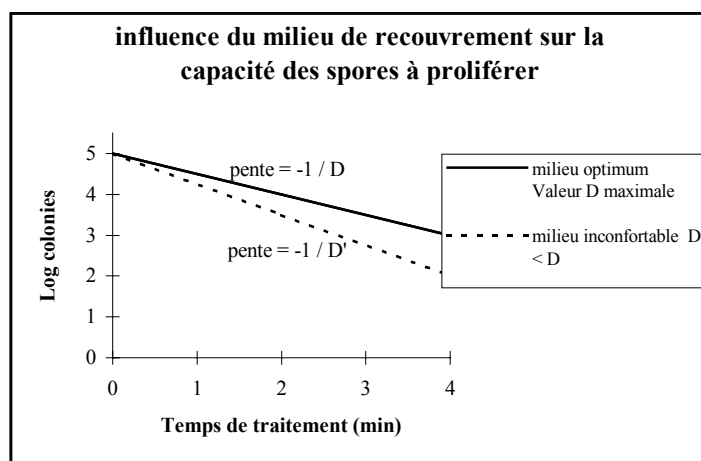
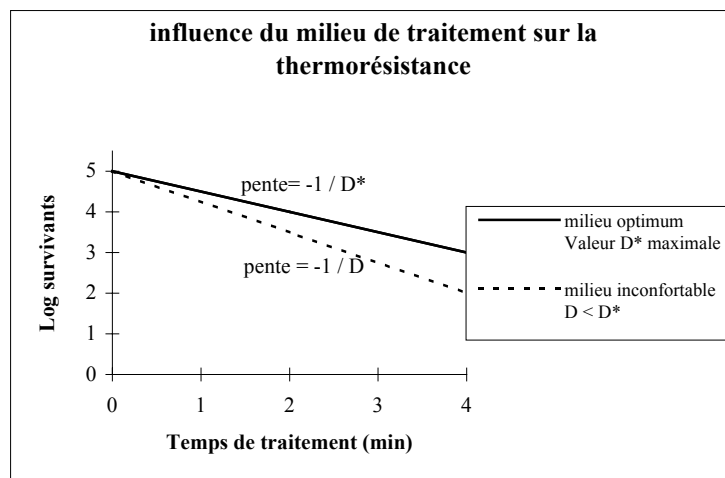
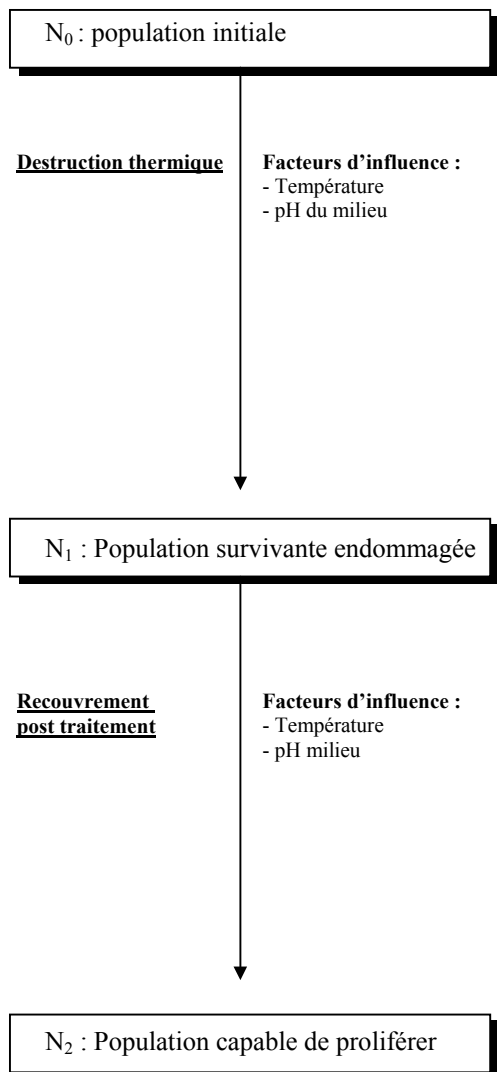


Figure III.12 : Schématisation de l'influence des facteurs du milieu de suspension sur des spores bactériennes soumises à un traitement thermique.

Chapitre 4

MODELISATION SECONDAIRE

4.1. Effet de la température

4.1.1. Estimation de la valeur des paramètres du modèle de Bigelow

Les paramètres indiqués dans le tableau IV.1 sont estimés à partir de plans d'expérience monofactoriels. Le pH des milieux de traitement et de récupération est fixé à 7 pour toutes les souches, sauf *Alicyclobacillus acidoterrestris* (pH 5,6).

Tableau IV.1 : Valeurs des paramètres estimés du modèle de Bigelow (1921). Les intervalles de confiance à 95% sont indiqués entre parenthèses.

souches	Nombre valeurs	Gamme de T° (°C)	D* ou δ^* (en min)	z_T	R^2_{aj}
<i>B. stearoth.</i> ATCC 12980	8	104 - 125	$D_{121,1} = 1,02$ (0,69 – 1,52)	8,33 (7,24 – 9,81)	0,985
<i>B. stearoth.</i> A36	8	104 - 125	$D_{121,1} = 0,38$ (0,30 – 0,48)	7,51 (6,97 – 8,15)	0,996
<i>B. coagulans</i> ATCC 7050	6	91 - 109	$D_{100} = 3,17$ (2,74 – 3,68)	8,92 (8,18 – 9,79)	0,997
<i>A. acidoterrestris</i>	5	89 - 101	$D_{100} = 0,56$ (0,25 – 1,26)	6,32 (4,82 – 9,54)	0,977
<i>C. sporogenes</i> A27	11	94 - 106	$D_{100} = 3,33$ (2,44 – 4,55)	6,40 (5,30 – 8,42)	0,936
<i>C. sporogenes</i> P 79.3 (pop 1)	9	90 - 110	$D_{100} = 0,48$ (0,25 – 0,91)	5,48 (4,41 – 7,23)	0,952
<i>C. sporogenes</i> P 79.3 (pop 2)	9	95 - 116	$D_{100} = 3,30$ (2,26 – 4,81)	9,09 (7,71 – 11,08)	0,973
<i>B. pumilus</i> A40	6	89 - 104	$\delta_{100} = 1,91$ (1,56 – 2,35)	8,03 (7,20 – 9,07)	0,995

4.1.2. Evaluation de la qualité d'ajustement

Nous observons par l'intermédiaire des coefficients $R^2_{\text{ajustés}}$ un bon ajustement du modèle. La représentation (figure IV.1) confirme la qualité de l'ajustement.

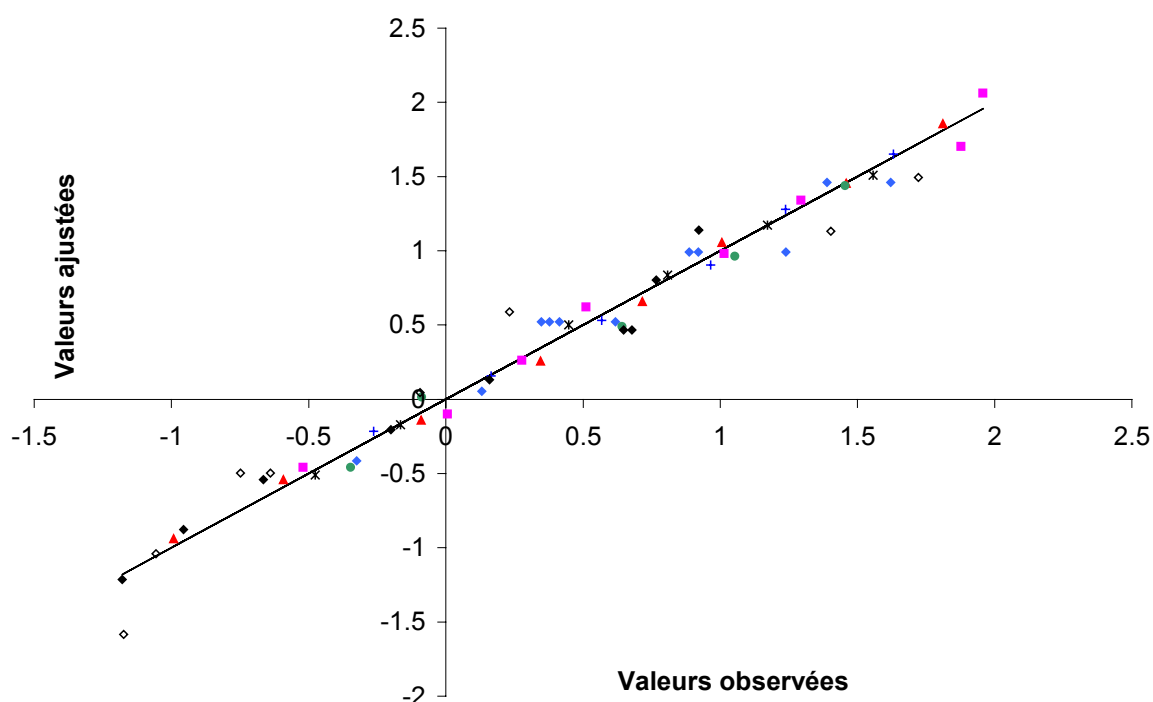


Figure IV.1 : Représentation de la qualité d'ajustement du modèle de Bigelow pour toutes les souches étudiées (♦) *Clostridium sporogenes* Pasteur 79.3 (■) *Bacillus stearothermophilus* ATCC 12980 (●) *Alicyclobacillus* (*) *Bacillus coagulans* (▲) *Bacillus stearothermophilus* A36 (+) *Bacillus pumilus* (◆) *Clostridium sporogenes* Pasteur 79.3 (pop 1) ◇ *Clostridium sporogenes* Pasteur 79.3 (pop 2).

4.1.3. Analyse des résidus

Ce modèle très utilisé dans le monde de la pasteurisation et de la stérilisation confirme une fois de plus sa qualité. L'analyse des résidus ne laisse apparaître aucune hétéroscédasticité ni autocorrélation. Leur répartition est normale.

4.2. Effet du pH

4.2.1. Effet du pH du milieu de traitement

4.2.1.1. Choix du modèle

L'aspect quantitatif a été traité par plusieurs auteurs, qui ont pu modéliser l'évolution de la valeur de D en fonction du pH de traitement. Parmi les modèles présentés dans le chapitre 1, nous avons choisi d'exprimer nos résultats par le modèle de Mafart et Leguérinel (1998). En effet, il s'agit du modèle le plus adapté à notre étude en raison de sa robustesse, sa parcimonie et de la signification physique ou biologique de ses paramètres.

Mais ce modèle, sous sa forme originelle, suppose une relation quadratique entre le log de D et le pH. Or, pour les sept souches étudiées, le logarithme de D évolue linéairement en fonction du pH du milieu de traitement. On appliquera donc la forme du premier degré du modèle (Mafart *et al.*, 2001) :

$$\log D = \log D^* - \frac{pH^* - pH}{z_{pH}} \quad \text{Equation IV.1}$$

où pH* correspond au pH neutre, et D* à la durée de réduction décimale à ce pH*. La valeur z_{pH} représente l'écart de pH qui engendre une réduction de la durée de réduction décimale d'un facteur dix.

Il convient cependant de noter que la linéarité entre le logarithme de D et le pH ne se maintient que pour une zone de pH limitée, inférieure à un pH optimum de thermorésistance. Au-delà de cette valeur, la durée de réduction décimale décroît rapidement. Cependant, dans tous les cas observés cette valeur optimale de pH se situe en zone alcaline. Le pH des aliments est à de rares exceptions près (jaune d'œuf, crustacés...) inférieurs à 7. Par conséquent, l'équation IV.1 décrit de manière satisfaisante l'effet du pH sur la thermorésistance dans les aliments. La comparaison des deux formes de modèle (version originale du second degré et version modifiée du premier degré) a fait l'objet d'une discussion (Mafart *et al.*, 2001).

Les paramètres D* et z_{pH} sont déterminés à partir de jeux de données issus de plans monofactoriels où seul le pH de traitement varie. Les valeurs des autres facteurs (fixées) sont indiquées dans le tableau IV.2.

Tableau IV.2 : Valeurs des facteurs Température et pH de recouvrement lors de l'étude de l'effet du pH de traitement.

Facteurs autres que le pH de traitement définissant D*		
	Température	pH de recouvrement
<i>B. stearothermophilus</i> ATCC 12980	113 °C	7
<i>B. stearothermophilus</i> A36	113 °C	7
<i>B. coagulans</i> ATCC 7050	95 °C	7
<i>A. acidoterrestris</i> ATCC 49025	95 °C	5,6
<i>C. sporogenes</i> A27	100 °C	7
<i>C. sporogenes</i> Pasteur 79.3 (pop 1)	95 °C	7
<i>C. sporogenes</i> Pasteur 79.3 (pop 2)	95 °C	7
<i>Bacillus pumilus</i> A40	95 °C	7

4.2.1.2. Estimation des paramètres du modèle linéaire

Les résultats sont présentés dans le tableau IV.3. Les valeurs de z_{pH} varient largement en fonction des souches. Elles évoluent de 1,42 à 5,17.

Tableau IV.3 : Valeurs des paramètres estimés du modèle de Mafart *et al.* (2001). Les intervalles de confiance à 95% sont indiqués entre parenthèses.

souches	Nombre valeurs	Gamme de pH	D* (en min) conditions tableau IV.2	z_{pH}	R^2_{aj}
<i>B. stearoth.</i> ATCC 12980	9	3,48 – 8,07	11,59 (9,33 – 14,40)	3,23 (2,79 – 3,82)	0,980
<i>B. stearoth.</i> A36	12	3,00 – 8,50	5,56 (4,29 – 7,22)	3,56 (3,00 – 4,38)	0,955
<i>B. coagulans</i> ATCC 7050	9	4,10 – 6,95	16,58 (13,29 – 20,69)	2,53 (2,18 – 3,02)	0,978
<i>A. acidoterrestris</i> ATCC 49025	11	3,00 – 7,00	12,25 (7,62 – 19,69)	3,45 (2,60 – 5,12)	0,887
<i>C. sporogenes</i> A27	9	5,91 – 7,50	3,42 (2,76 – 4,23)	1,42 (1,18 – 1,77)	0,967
<i>C. sporogenes</i> Pasteur 79.3 (pop1)	18	4,03 – 8,00	1,24 (1,01 – 1,51)	2,26 (2,02 – 2,56)	0,969
<i>C. sporogenes</i> Pasteur 79.3 (pop2)	21	3,56 – 8,00	8,34 (6,10 – 11,39)	5,17 (3,69 – 8,65)	0,679
<i>Bacillus pumilus</i> A40	11	3,94 – 7,60	7,99 (6,30 – 10,12)	4,75 (3,82 – 6,25)	0,936

4.2.1.3. Analyse des résidus – Région de confiance

L'étude de la répartition des résidus montre une distribution relativement homogène, laissant apparaître une bonne homocédasticité, sauf pour la souche de *Bacillus pumilus*. Le test de Shapiro-Wilk conclue à une distribution gaussienne des résidus. L'analyse graphique ne présente pas d'autocorrélation.

La détermination des régions de confiance par la méthode de Lobry et leur projection sur plan dévoilent des formes elliptiques traduisant une légère corrélation structurelle entre les deux paramètres du modèle.

En exemple, les représentations graphiques de la souche *Clostridium sporogenes* A27 sont indiquées figure IV.2.

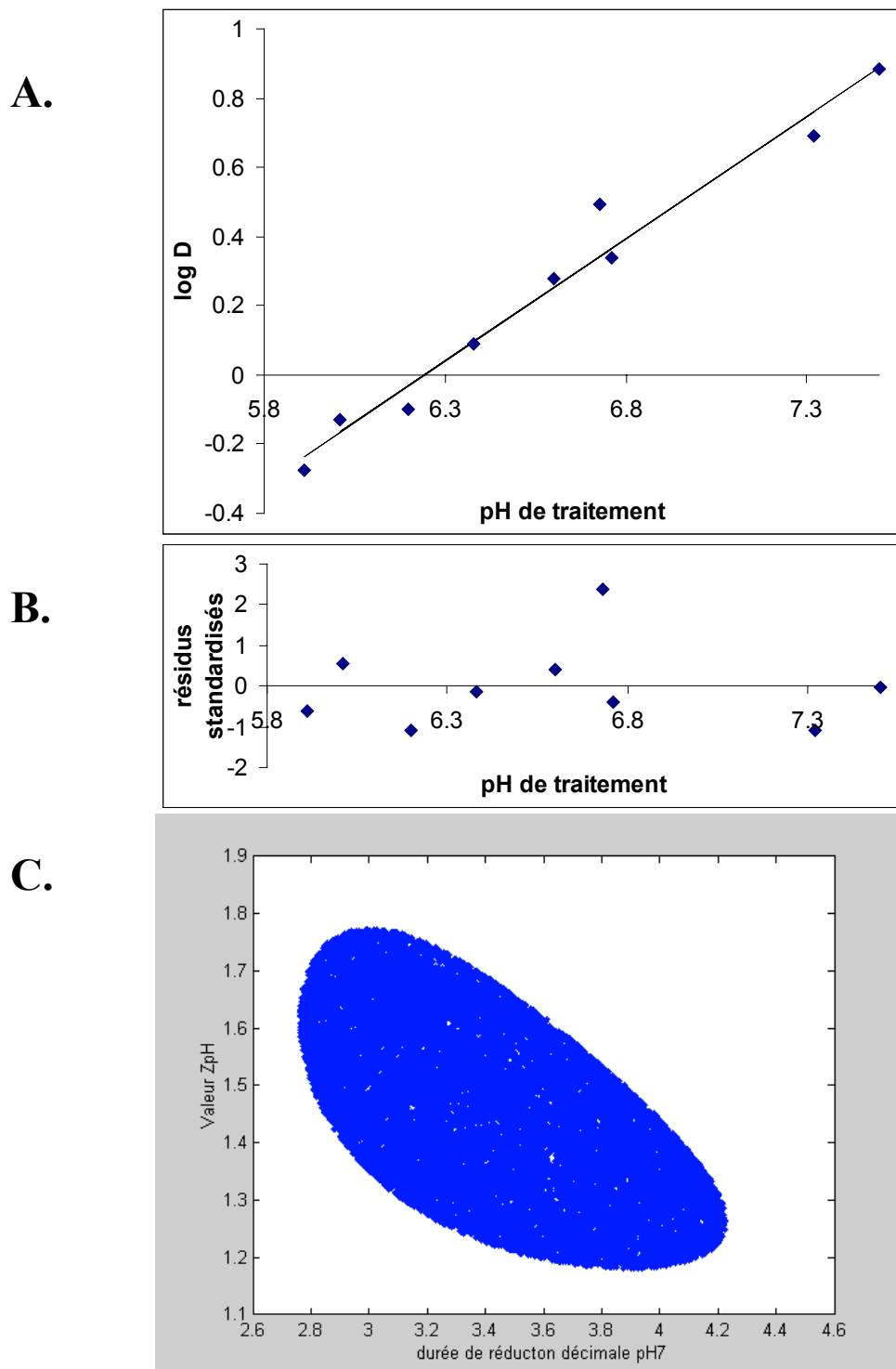


Figure IV.2 : A. Ajustement du modèle de Mafart *et al.* (2001) sur les jeux de données de la souche de *Clostridium sporogenes* A27. B. répartition des résidus entre les valeurs observées et les valeurs théoriques. C. région de confiance à 95% pour la valeur des paramètres sur plan.

4.2.2. Effet du pH du milieu de recouvrement

A l'inverse du pH de traitement, peu de travaux ont porté sur l'aspect quantitatif de l'effet du pH de recouvrement, et aucun modèle n'est couramment utilisé comme peuvent l'être celui de Bigelow pour l'effet température, et peu à peu ceux de Davey ou de Mafart et Leguérinel pour l'effet du pH de traitement. L'étude que nous porterons sur le pH de recouvrement tentera de quantifier son effet sur la thermorésistance des spores bactériennes.

4.2.2.1. Vérification de l'effet létal du pH de recouvrement

Le pH est un des facteurs du milieu de récupération jouant un rôle important sur la germination et la prolifération des spores après le traitement. Mais avant de commencer toute investigation, la première question à se poser est de vérifier quelle est la véritable action du pH de recouvrement sur des spores bactériennes endommagées par un traitement thermique. En effet, l'influence des bas pH joue-t-elle un rôle de destruction définitive des spores bactériennes endommagées par le traitement thermique ou bien un simple rôle d'inhibition de croissance, auquel cas un retour des spores à un pH plus confortable permettrait à nouveau la croissance.

Pour vérifier la perte définitive de viabilité de spores soumises à un pH acide après traitement thermique, une expérience a été menée sur *Bacillus stearothermophilus* ATCC 12980.

Deux lots de spores sont traités 10 min pour l'un, 30 min pour l'autre, à 113°C dans un milieu Tryptone 1% - NaCl 1% pH7. Un troisième lot témoin n'est pas soumis à la chaleur. Ces trois lots sont incubés à 55°C en bouillon nutritif au pH minimum de croissance (pH 5,3). La viabilité des spores de chacun des lots est suivie au cours du stockage sur plusieurs jours par dénombrement sur gélose nutritive pH 7 à 55°C. Les résultats sont présentés dans le tableau IV.4.

Tableau IV.4 : Evolution de la viabilité de spores stockées à un pH acide après traitement thermique (en CFU)

temps de stockage dans le bouillon nutritif à pH 5,3	Temps de traitement à 113°C		
	0 min	10 min	30 min
15 min	780	310	15
3 heures		184	4
6 heures	770	227	3
24 heures	830	161	7
2 jours	660	57	1
3 jours	790	27	2
5 jours	800	13	0
8 jours		4	0
15 jours	830	0	0

Le stockage en bouillon nutritif acide n'affecte aucunement la viabilité des spores de *Bacillus stearothermophilus* non traitées thermiquement. Cependant, les spores ayant subies les dommages d'un traitement thermique voient leur viabilité chuter rapidement pendant le stockage en milieu acide.

L'action du pH de recouvrement est ici clairement mise en évidence. Comme pour le pH du milieu de traitement, l'acidité du milieu de recouvrement va augmenter la vitesse d'inactivation apparente des spores bactériennes ayant subies un traitement thermique. Cette inactivation n'est pas réversible par retour à un pH optimum de croissance de 7.

4.2.2.2. Modélisation de cet effet sur la thermorésistance

L'évolution du logarithme de la durée de réduction décimale ($\log D$) en fonction du pH de recouvrement présente une allure commune pour les sept souches. Les graphiques présentés figure IV.3 montrent ces variations du $\log D$ en fonction du pH déterminées pour quatre de nos souches. Dans tous les cas, l'élévation du pH entraîne une augmentation progressive du $\log D$ jusqu'à une valeur maximale voisine du pH neutre. Au-delà de ce pH (noté pH_{opt}), le $\log D$ diminue. On peut observer une symétrie approximative selon un axe vertical passant par l'optimum. Cette allure peut être caractérisée par trois valeurs, dont deux sont graphiquement interprétables, à savoir la valeur maximale atteinte par le $\log D$, ainsi que le pH optimal de thermorésistance. Une troisième valeur correspondant au degré de sensibilité des spores au pH peut être ajoutée pour compléter la caractérisation de ces courbes.

L'allure générale ainsi que la symétrie par rapport au pH_{opt} rappelle celle observée par Mafart et Leguérinel (1998) et Gaillard *et al.* (1998) concernant leurs études sur l'effet du pH du milieu de traitement. Un modèle parabolique analogue au précédent peut donc être envisagé :

$$\log D' = \log D'_{\max} - \left(\frac{pH' - pH'_{opt}}{z'_{pH}} \right)^2 \quad \text{Equation IV.2}$$

Où le pH'_{opt} est le pH auquel la thermorésistance est maximale, $D'_{\max}$ représente la durée de réduction décimale à cette valeur de pH_{opt} , tandis que z'_{pH} exprime l'écart de pH par rapport à pH'_{opt} induisant une réduction de D d'un facteur 10. Ce modèle a fait l'objet d'une publication (Couvert *et al.*, 1999).

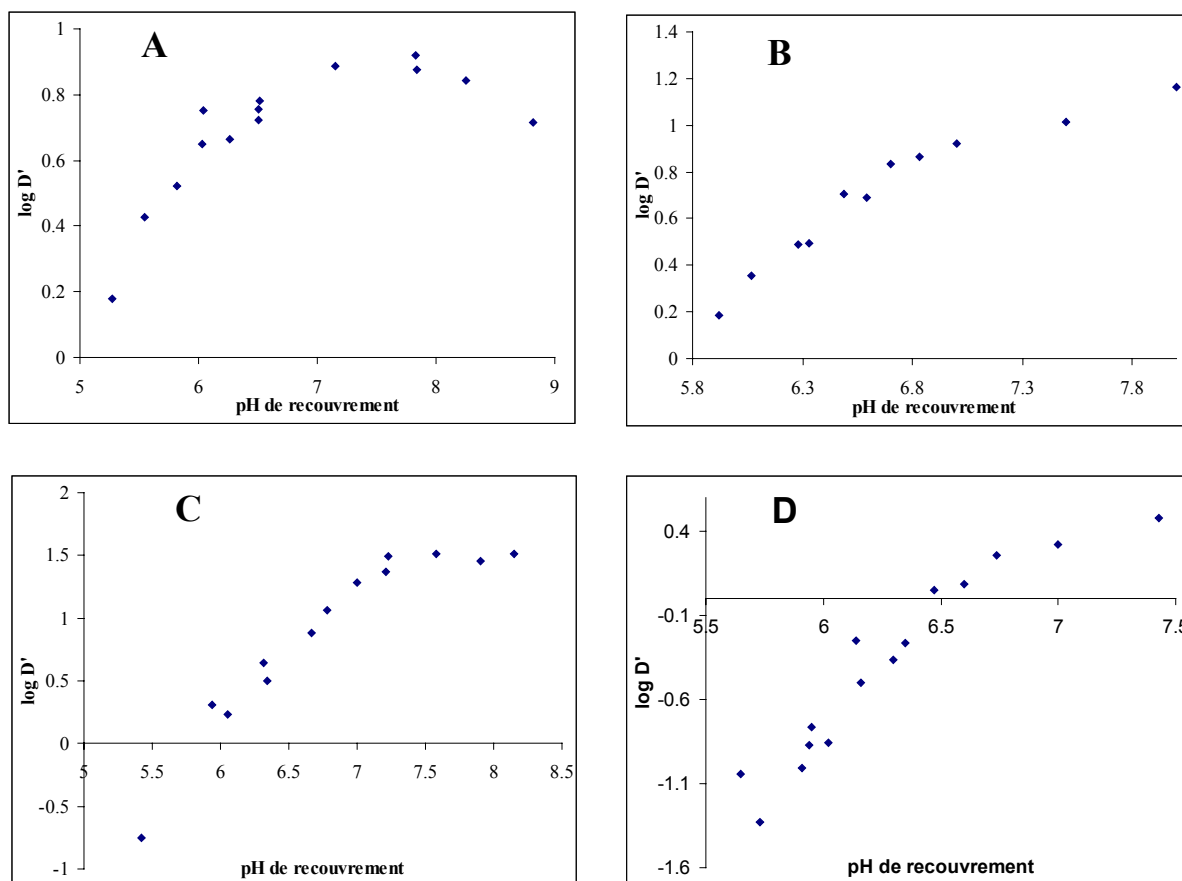


Figure IV.3 : Evolution du log de D' en fonction du pH du milieu de recouvrement pour quatre souches différentes. A. *Bacillus pumilus*. B. *Bacillus stearothermophilus* A36. C. *Bacillus stearothermophilus* ATCC 12980. D. *Clostridium sporogenes* A27.

4.2.2.3. Estimation des paramètres

La linéarité est un des avantages de ce modèle (cf § 2.2.1.2.3). Une simple régression linéaire permet son ajustement. Les régions de confiance sont déterminées par la méthode de Lobry *et al.* (1991).

Les paramètres sont déterminés à partir d'un plan d'expérience monofactoriel où le pH de recouvrement est le facteur variable. Tous les autres facteurs sont fixes. Les valeurs de température et de pH de traitement sont indiqués dans le tableau IV.5.

Les valeurs des paramètres estimées sont présentées dans le tableau IV.6.

Tableau IV.5 : Valeurs des facteurs température et pH de traitement fixées pour l'étude du pH de recouvrement

souches	température	pH de traitement
<i>B. stearothermophilus</i> ATCC 12980	113 °C	7
<i>B. stearothermophilus</i> A36	107 °C	7
<i>B. coagulans</i>	95 °C	7
<i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i>	95 °C	4,6
<i>Clostridium sporogenes</i> A27	100 °C	7
<i>C. sporogenes</i> Pasteur 79.3 (pop 2)	95 °C	7
<i>Bacillus pumilus</i>	95 °C	7

Tableau IV.6 : Valeurs des paramètres estimés selon le modèle de Couvert *et al.* (1999) pour chacune des souches étudiées. Les intervalles de confiance à 95% sont indiqués entre parenthèses. INF : infini.

souches	D' _{max}	Z' _{pH}	pH' _{opt}
<i>B. stearothermophilus</i> ATCC 12980	D' ₁₁₃ = 13,71 (10,50 – 25,76)	2,13 (1,69 – 3,18)	7,98 (7,57 – 9,27)
<i>B. stearothermophilus</i> A36	D' ₁₀₇ = 33,97 (24,28 – 57,04)	1,64 (1,40 – 2,06)	7,88 (7,57 – 8,52)
<i>B. coagulans</i>	D' ₉₅ = 15,15 (INF)	1,35 (INF)	6,73 (INF)
<i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i>	D' ₉₅ = 54,84 (INF)	9,25 (INF)	15,66 (INF)
<i>Clostridium sporogenes</i> A27	D' ₁₀₀ = 3,33 (INF)	1,41 (INF)	7,56 (INF)
<i>C. sporogenes</i> Pasteur 79.3 (pop 2)	D' ₉₅ = 8,02 (4,78 – 21,93)	1,14 (0,88 – 2,18)	7,14 (6,88 – 8,56)
<i>Bacillus pumilus</i>	D' ₉₅ = 8,22 (7,00 – 9,64)	2,76 (2,39 – 3,42)	7,54 (7,34 – 7,87)

Tableau IV.7 : Indication sur les jeux de données utilisés pour estimer les valeurs du modèle de Couvert *et al.* (1999). La qualité d'ajustement est représenté par le coefficient R²_{aj}.

souches	Nombre valeurs	Gamme de pH' étudiée	R ² _{aj}
<i>B. stearothermophilus</i> ATCC 12980	11	5,92 – 8,00	0,976
<i>B. stearothermophilus</i> A36	13	5,42 – 8,15	0,981
<i>B. coagulans</i>	5	5,00 – 7,00	0,987
<i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i>	9	3,65 - 7	0,948
<i>Clostridium sporogenes</i> A27	15	5,65 – 7,43	0,931
<i>C. sporogenes</i> Pasteur 79.3 (pop 2)	10	5,74 – 7,50	0,928
<i>Bacillus pumilus</i>	14	5,27 – 8,82	0,936

4.2.2.4. Evaluation de la qualité d'ajustement - Analyse des résidus

Comme le montrent les valeurs de $R^2_{\text{ajusté}}$ déterminés pour chaque ajustement du modèle, la qualité d'ajustement reste très bonne (figure IV.4.A et IV.5.A). Le $R^2_{\text{ajusté}}$ minimum rencontré est de 0,928 (Nous notons que les paramètres du modèle n'ont pas été estimés pour la population 1 de la souche *Clostridium sporogenes* Pasteur 79.3. Sa grande sensibilité au pH a rendu la zone étudiée trop étroite pour que l'ajustement soit correct). On remarque cependant que malgré un bon ajustement du modèle, la signification des paramètres n'est pas conservée pour la souche d'*Alicyclobacillus acidoterrestris*.

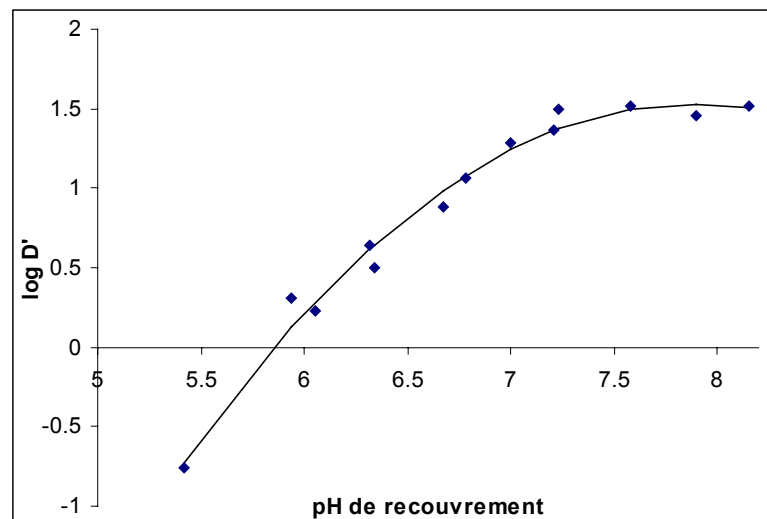
L'analyse graphique des résidus (figures IV.4.B et IV.5.B) ne présente aucune d'hétéroscédasticité, ni autocorrélation, quelle que soit la souche étudiée. Le test de Shapiro-Wilk appliqué aux différents jeux de données, témoigne de la répartition normale des résidus au risque de 5%.

La projection des régions de confiance (figures IV.4.C et IV.5.C) indique une corrélation entre le pH'_{opt} et le z'_{pH} . Cette corrélation s'accroît fortement lorsque la gamme de pH étudiée est faible et ne dépasse pas la valeur du pH'_{opt} . Dans ce cas, les points forment une ligne peu courbée, engendrant un intervalle de confiance du pH'_{opt} qui augmente fortement puis une compensation des autres paramètres. Pour trois des six souches étudiées, les régions de confiance tendent vers l'infini, et ne sont donc pas déterminables.

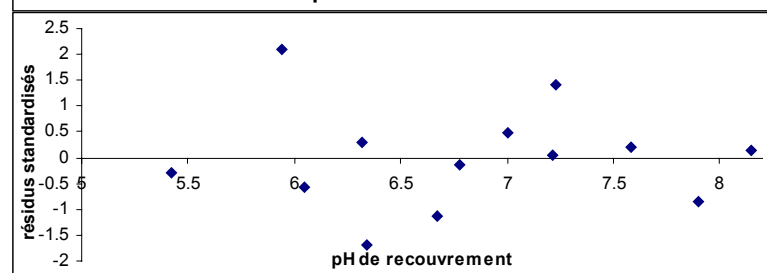
4.2.2.5. Simplification du modèle

Ce modèle présente toutefois l'inconvénient de comporter trois paramètres d'ajustement. Or nous remarquons que la valeur de pH'_{opt} reste relativement voisine de 7. Nous pouvons proposer un modèle simplifié, ne comportant plus que deux paramètres, en fixant le pH'_{opt} à 7. Au prix d'une perte de qualité d'ajustement, la suppression de paramètre entraîne un gain de robustesse et l'application en milieu industriel demande alors moins de connaissance de paramètres. L'inconvénient est que ce modèle simplifié où la valeur de thermo-résistance maximale est considérée pour un pH 7, suppose que la thermorésistance diminue au-delà de ce pH, ce qui ne se vérifie pas pour la plupart de nos souches où le pH'_{opt} est légèrement supérieur à 7. Pour lever ce problème, nous devons imposer au modèle simplifié la contrainte de ne pouvoir être appliqué qu'aux pH inférieurs à 7 (pH de la majorité des aliments).

A.



B.



C.

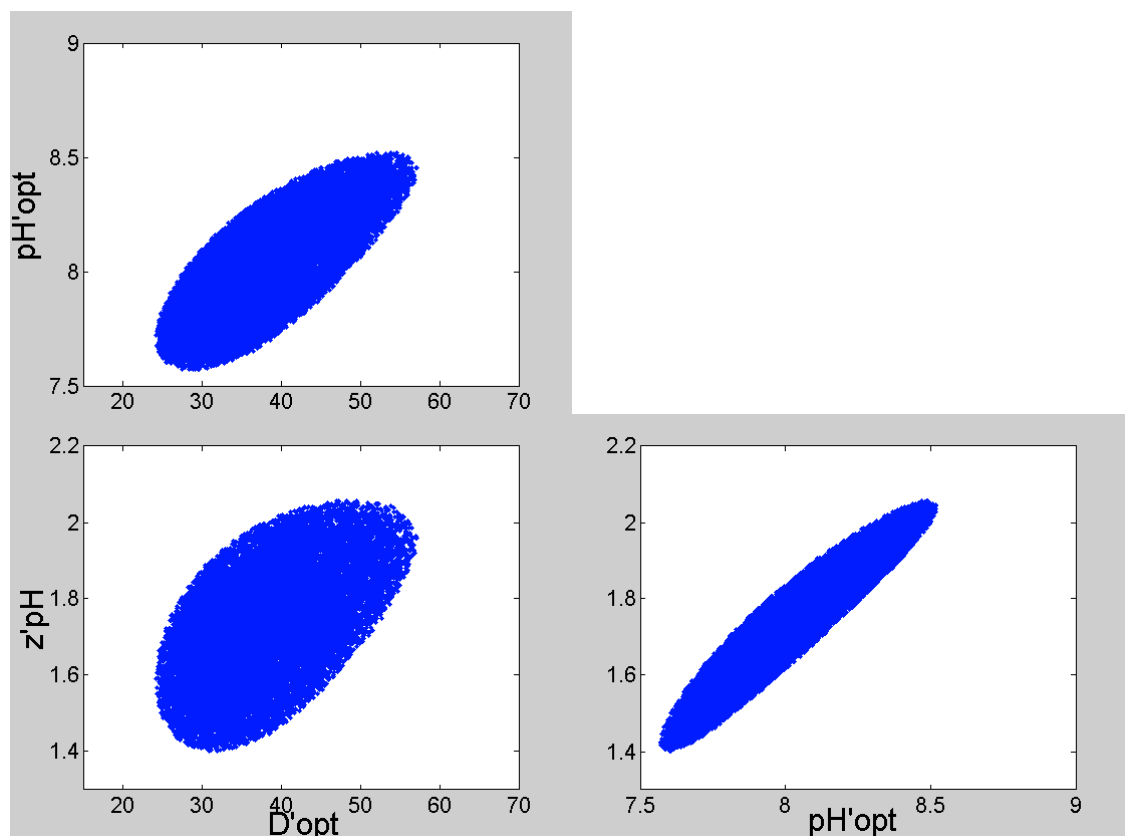
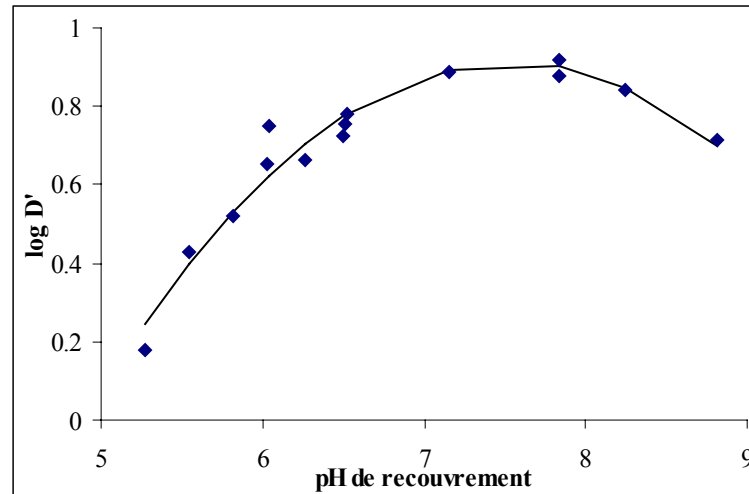
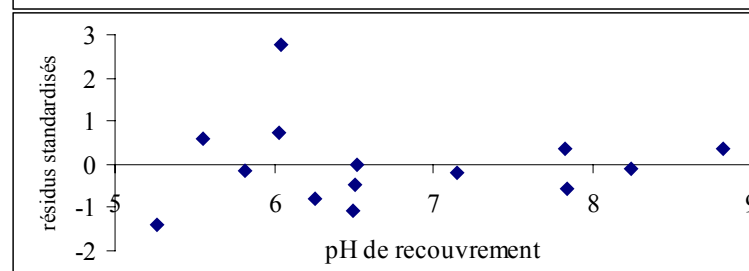


Figure IV.4 : A. Ajustement du modèle de Couvert *et al.* (1999) sur les jeux de données de la souche de *Bacillus stearothermophilus* A36. B. répartition des résidus entre les valeurs observées et les valeurs théoriques. C. région de confiance à 95% pour la valeur des paramètres sur plan.

A.



B.



C.

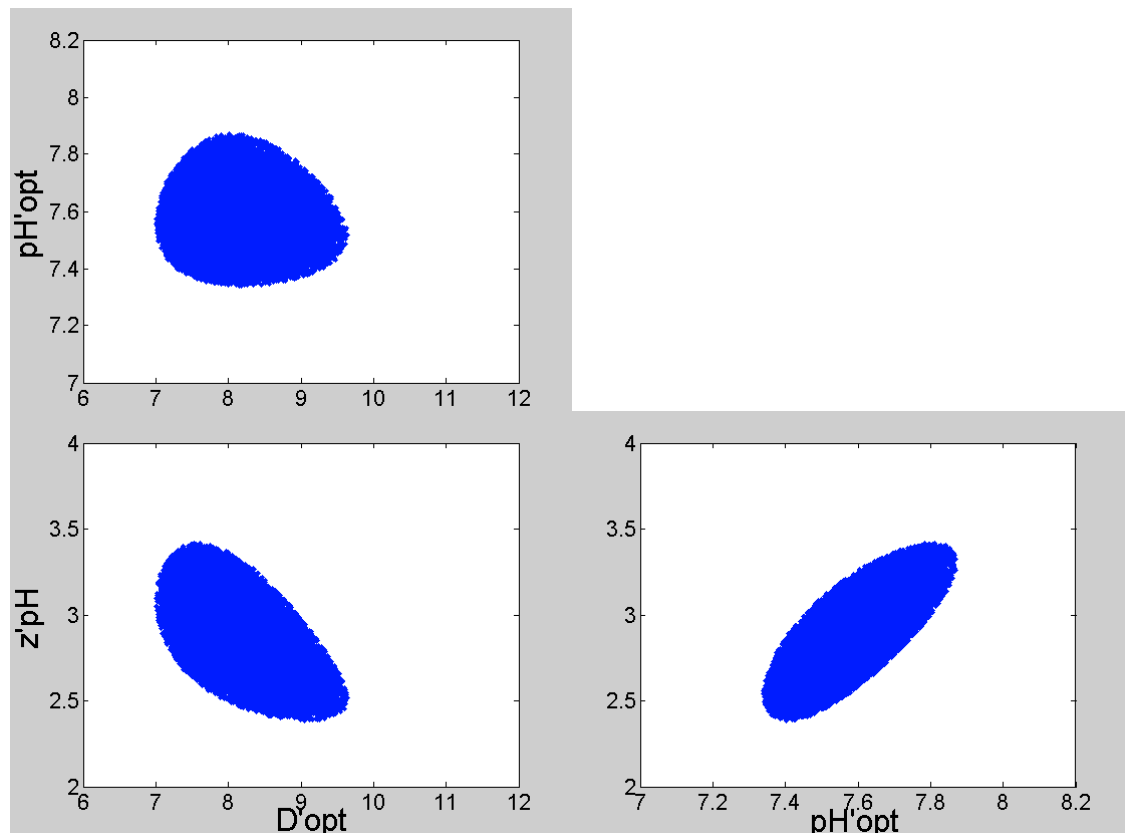


Figure IV.5 : A. Ajustement du modèle de Couvert *et al.* (1999) sur les jeux de données de la souche de *Bacillus pumilus*. B. répartition des résidus entre les valeurs observées et les valeurs théoriques. C. région de confiance à 95% pour la valeur des paramètres sur plan.

Le test statistique de Bates et Watts (1988) permet de trancher pour un modèle entre sa forme complète et sa forme partielle à laquelle on a retiré un ou plusieurs paramètres considérés comme superflu. Pour chacune des souches étudiées, le test de Bates et Watts indique que le surcroît de complexité apporté par le paramètre pH'_{opt} n'est pas justifié vis-à-vis de la qualité d'ajustement.

Le paramètre correspondant à la durée de réduction décimale de référence du modèle, déterminée au pH de référence alors fixé à 7, ne correspond plus à la durée de réduction décimale maximale de la souche. Nous ne pouvons plus l'appeler D'_{max} . Nous le noterons alors D'^* .

4.2.2.6. Estimation des paramètres du modèle simplifié & Analyse des résidus

On remarque par l'intermédiaire du $R^2_{ajusté}$ que l'ajustement reste très bon lorsque la valeur du paramètre pH'_{opt} est fixée à 7, et ceci même pour les souches de *Bacillus stearothermophilus* ou d'*Alicyclobacillus* pour lesquelles le pH'_{opt} ajusté était très élevé.

Tableau IV.8 : Valeurs des paramètres estimés du modèle de Couvert *et al.* (1999) simplifié. Les intervalles de confiance à 95% sont indiqués entre parenthèses.

souches	D'^* (en min)	z'_{pH}	$R^2_{ajusté}$
<i>B. stearothermophilus</i> ATCC 12980	$D'_{113} = 7,17$ (5,90 – 8,72)	1,28 (1,14 – 1,48)	0,947
<i>B. stearothermophilus</i> A36	$D'_{107} = 10,83$ (6,23 – 18,85)	1,16 (1,02 – 1,40)	0,937
<i>B. coagulans</i>	$D'_{95} = 17,08$ (8,96 – 32,57)	1,55 (1,35 – 1,88)	0,979
<i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i>	$D'_{95} = 5,96$ (3,96 – 8,97)	3,81 (3,21 – 4,93)	0,877
<i>Clostridium sporogenes</i> A27	$D'_{100} = 1,61$ (0,99 – 2,63)	1,06 (0,95 – 1,23)	0,901
<i>C. sporogenes</i> Pasteur 79.3 (pop 2)	$D'_{95} = 7,27$ (4,08 – 12,96)	1,04 (0,89 – 1,28)	0,925
<i>Bacillus pumilus</i>	$D'_{95} = 6,62$ (5,40 – 8,11)	2,23 (1,94 – 2,69)	0,922

Les valeurs de D'^* sont réduites par rapport au D'_{max} du modèle à 3 paramètres, car ne correspondent plus au pH optimum de thermorésistance. De même, les valeurs de z'_{pH} diminuent, car la courbure graphique du modèle est augmentée.

D'une part, l'étude numérique des résidus par le test de Shapiro-Wilk indique que la distribution des résidus suit dans cinq cas sur six une répartition normale. D'autre part, l'analyse graphique présente dans tous les cas une répartition d'apparence aléatoire, sans hétéroscédasticité apparente. Cependant, une autocorrélation évidente des résidus ressort pour les deux souches de *Bacillus stearothermophilus*. Les limites de cette simplification du modèle apparaissent ici pour les deux souches dont le pH optimum de thermorésistance est le plus éloigné de 7.

4.3. Modèle global

Les auteurs de modèles de type modulaire considèrent généralement que l'influence des facteurs environnementaux est multiplicative. Le modèle de croissance de Ratkowsky *et al.* (1982) ne prenant en compte que la température, est complété par ajout multiplicatif des effets du pH et de l' a_w (Mc Meekin *et al.*, 1993 ; Wijtzes *et al.*, 1995). De même, Zwietering *et al.* (1992) construit son concept γ sur cet effet multiplicatif des facteurs.

Dans le domaine des courbes de survies, Davey *et al.* (1978), puis Mafart et Leguérinel (1998) bâtissent leurs modèles sur ce même concept en multipliant les effets de la température et du pH. Un an plus tard, Gaillard *et al.* (1998) montrent que l'effet du facteur a_w (Activité de l'eau) est également multiplicatif. Enfin, Coroller *et al.* (2000) parviennent à la même conclusion pour les facteurs a_w de traitement et a_w de recouvrement.

Si nous émettons l'hypothèse que nos trois facteurs température, pH de traitement et pH de recouvrement sont aussi multiplicatifs, un modèle global peut alors s'écrire :

Equation IV.3 :

$$\log D = \log D^* - \underbrace{\frac{T - T^*}{z_T}}_{\text{effet .température}} - \underbrace{\frac{pH^* - pH}{z_{pH}}}_{\text{effet .pH .traitement}} - \underbrace{\left(\frac{pH' - pH'^*}{z'_{pH}} \right)^2}_{\text{effet .pH .recouvrement}}$$

Où T^* est la température de référence, pH^* et pH'^* sont les pH de référence respectivement pour le traitement et le recouvrement (pH neutre), les paramètres z_T , z_{pH} et z'_{pH} correspondent aux écarts par rapport à T^* et pH^* entraînant une diminution de D^* d'un facteur dix. D^* correspond à la durée de réduction décimale à la température T^* et aux pH^* et pH'^* .

4.3.1. Estimation globale des paramètres

Le modèle est ajusté par minimisation de la somme des carrés des écarts. Les résultats sont présentés dans le tableau IV.9.

Tableau IV.9 : Valeurs des paramètres du modèle global estimés par minimisation de la somme des carrés des écarts. Les intervalles de confiance à 95% sont indiqués entre parenthèses.

souches	D* ou δ^* (en min)	nombre de points	R ² _{ajusté}
<i>B. stearothermophilus</i> ATCC 12980	D _{121,1} = 1,01 (0,72 – 1,41)	26	0,968
<i>B. stearothermophilus</i> A36	D _{121,1} = 0,49 (0,26 – 0,92)	28	0,981
<i>B. coagulans</i>	D ₁₀₀ = 3,64 (2,91 – 4,57)	20	0,977
<i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i>	D ₁₀₀ = 2,58 (1,04 – 6,46)	25	0,871
<i>Clostridium sporogenes</i> A27	D ₁₀₀ = 2,83 (2,15 – 3,77)	34	0,939
<i>C. sporogenes</i> Pasteur 79.3 (pop 2)	D ₁₀₀ = 2,86 (2,26 – 3,62)	35	0,938
<i>Bacillus pumilus</i>	δ_{100} = 1,83 (1,49 – 2,23)	26	0,973

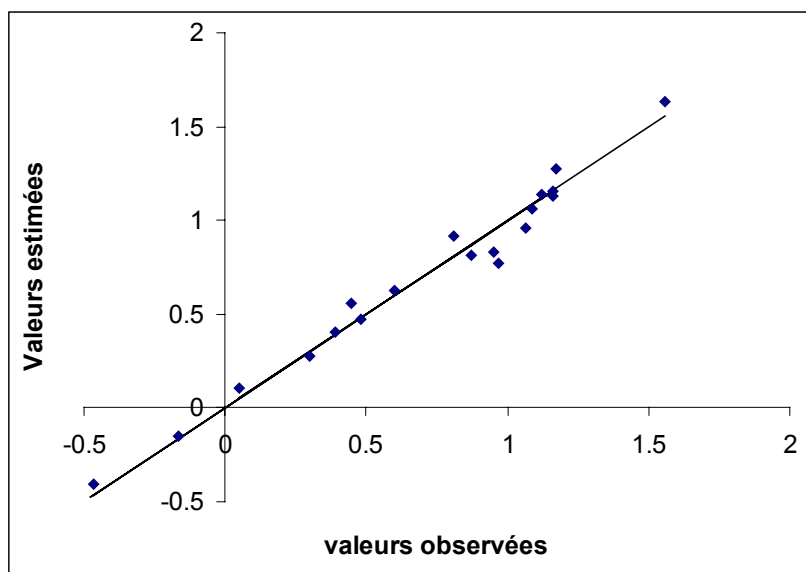
souches	Z _T	Z _{pH}	Z' _{pH}
<i>B. stearothermophilus</i> ATCC 12980	8,36 (7,31 – 9,73)	3,62 (2,94 – 4,69)	1,14 (1,01 – 1,37)
<i>B. stearothermophilus</i> A36	8,77 (7,20 – 11,49)	4,08 (2,96 – 6,50)	1,05 (0,93 – 1,23)
<i>B. coagulans</i>	8,38 (7,31 – 9,80)	2,76 (2,24 – 3,59)	1,60 (1,47 – 1,77)
<i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i>	6,32 (4,62 – 10,04)	3,97 (2,72 – 7,34)	4,25 (3,25 – 8,05)
<i>Clostridium sporogenes</i> A27	6,17 (4,76 – 8,60)	1,59 (1,10 – 3,10)	0,95 (0,88 – 1,06)
<i>C. sporogenes</i> Pasteur 79.3 (pop 2)	10,10 (8,74 – 11,99)	6,63 (4,24 – 15,71)	0,99 (0,90 – 1,13)
<i>Bacillus pumilus</i>	8,12 (7,21 – 9,29)	4,98 (4,20 – 6,17)	2,07 (1,86 – 2,39)

4.3.2. Analyse des résidus

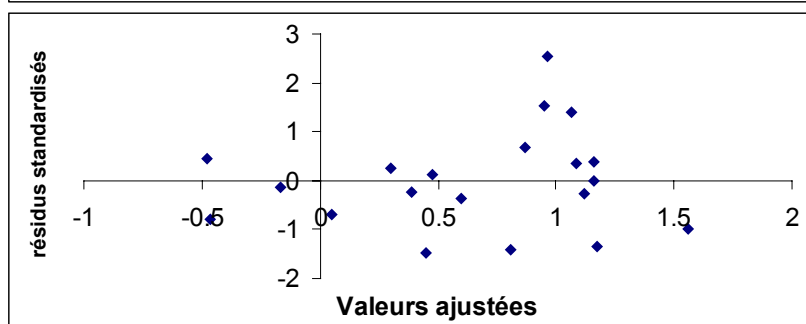
L'analyse graphique des résidus ne laisse apparaître aucune hétéroscédasticité. D'une part, l'étude numérique par le test de Shapiro-Wilk montrent que la répartition des résidus suit une loi normale ; d'autre part, le test de Durbin-Watson met en évidence une autocorrélation pour une des sept souches (*Bacillus stearothermophilus* A36).

La projection des régions de confiance ne met en évidence aucune corrélation importante entre les paramètres (figure IV.6).

A.



B.



C.

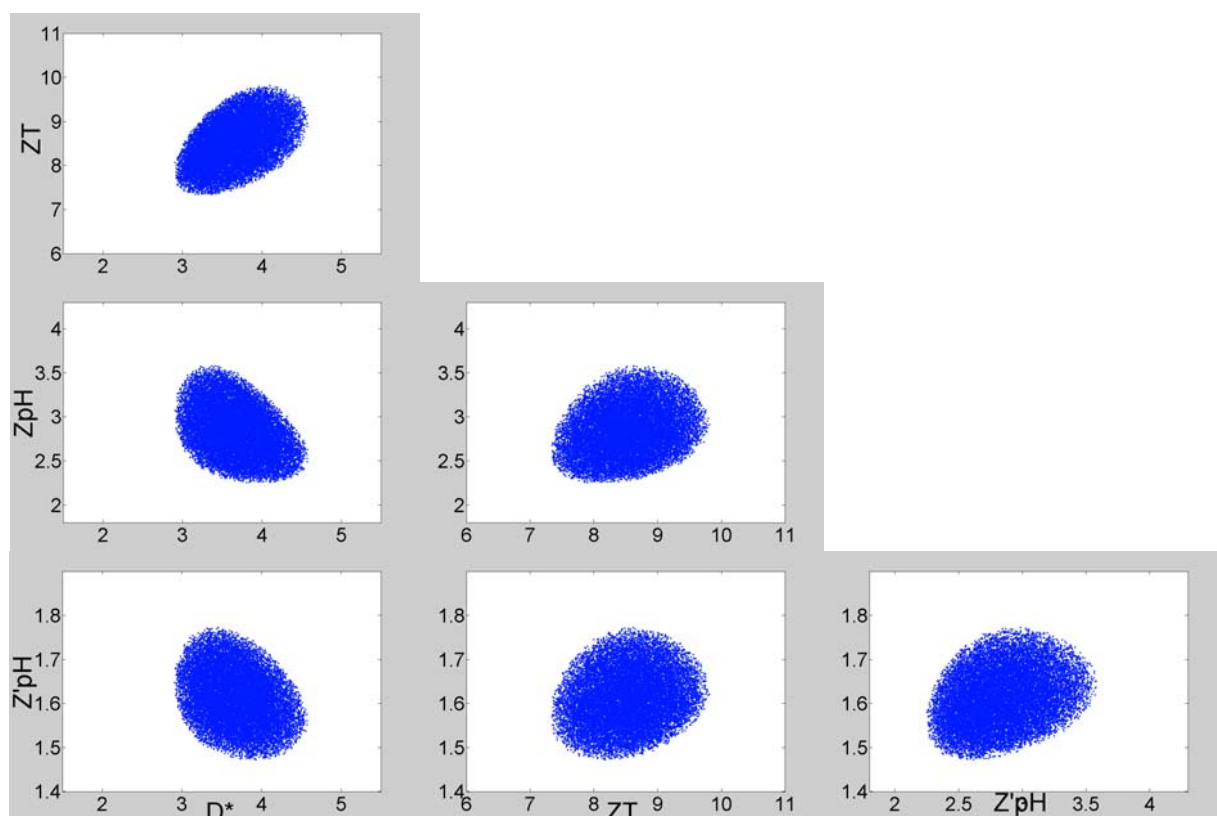


Figure IV.6 : A. Ajustement du modèle global sur les jeux de données de la souche de *Bacillus coagulans* B. répartition des résidus entre les valeurs observées et les valeurs théoriques. C. région de confiance à 95% pour la valeur des paramètres sur plan.

4.4. Interaction entre les facteurs

Les paramètres z ci-dessus ont été déterminés suivant des plans monofactoriels. L'avantage de ce type de plan est une estimation du paramètre avec peu de manipulations. Cependant, les interactions éventuelles entre facteurs ne peuvent être mises en évidence, c'est pourquoi plusieurs plans factoriels complets ont été réalisés pour évaluer l'importance de ces interactions.

4.4.1. Interactions entre température et pH de traitement

Nombreux sont les auteurs à avoir montré une dépendance du z_T par rapport au pH du milieu de traitement, mais aucun modèle caractérisant ces interactions n'a été proposé. Afin de mieux cerner leur importance quantitative, trois plans factoriels complets ont été menés sur trois souches différentes : *Bacillus stearothermophilus* Saupiquet, *Bacillus coagulans* et *Clostridium sporogenes* Saupiquet.

4.4.1.1. Influence du pH sur z_T

Nous remarquons que l'acidification du milieu réduit l'influence d'une augmentation de température sur D pour deux des trois souches. La valeur de z_T passe de 7 à 11 pour les deux souches de *Bacillus* lorsque le pH est réduit de 7 à 4 (figure IV.7). Cependant, aucune variation du z_T en fonction du pH de traitement n'est mise en évidence pour la souche de *Clostridium sporogenes*.

4.4.1.2. Influence de la température sur z_{pH}

Comme précédemment, l'influence de la température de traitement sur le z_{pH} n'est sensible que pour les deux souches de *Bacillus*.

Graphiquement, on n'observe aucune influence de la température sur le z_{pH} pour la souche de *Clostridium sporogenes*. Mais pour les deux autres souches, l'effet est sensible puisque le z_{pH} de *Bacillus coagulans* double et celui de *Bacillus stearothermophilus* triple lorsque la température augmente de 15°C.

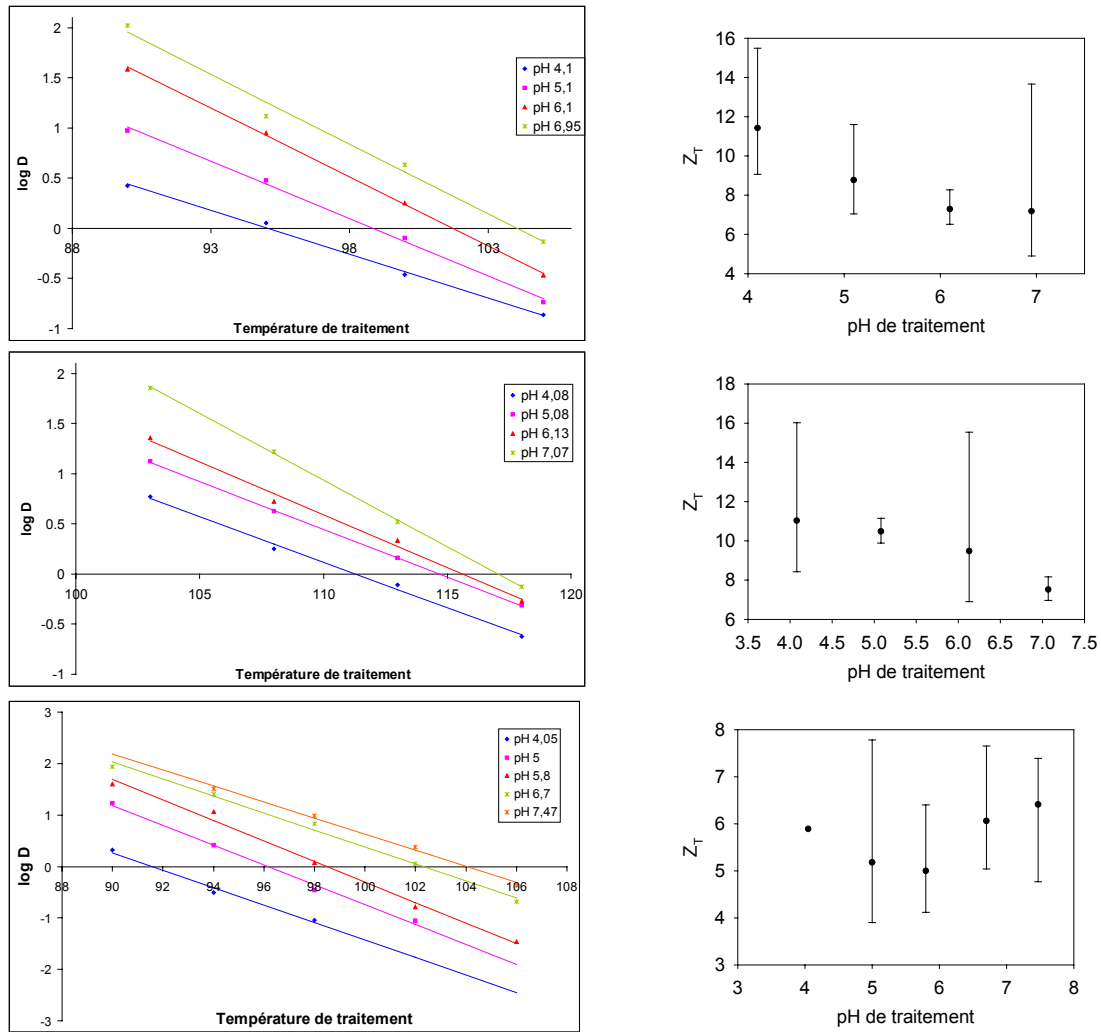


Figure IV.7 : Interactions du pH de traitement sur la valeur du z_T , de haut en bas, chez *Bacillus coagulans*, chez *Bacillus stearothermophilus* A36 et chez *Clostridium sporogenes* A27.

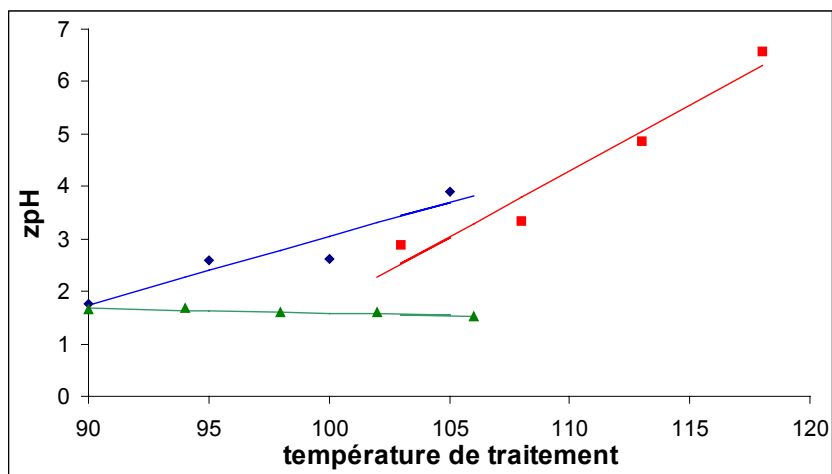


Figure IV.8 : Influence de la température de traitement sur la valeur du z_{pH} .
 ▲ *Clostridium sporogenes* - 6 *Bacillus coagulans* - ■ *Bacillus stearothermophilus*

4.4.1.3. Analyse de variance

L'analyse de variance présentée dans le tableau IV.10 montre pourtant que l'effet des interactions est négligeable par rapport à l'effet des facteurs : seulement moins de 2% de la SCE est attribuée aux interactions.

Tableau IV.10 : Analyse de variance. Valeur de la SCE (somme des carrés des écarts) attribuée à chaque facteur, et son % par rapport à la SCE totale.

Facteurs	<i>B. stearothermophilus</i>		<i>B. coagulans</i>		<i>C. sporogenes</i>	
	SCE	% d'expli	SCE	% d'expli	SCE	% d'expli
Totale	7,09	100	10,29	100	19,96	100
Température	5,63	79,5	7,14	69,4	10,63	53,3
pH de traitement	1,27	17,9	2,89	28,1	8,87	44,4
Interaction (T x pH)	0,12	1,6	0,20	2,0	0,00	0,0
résiduelle	0,07	1,0	0,058	0,6	0,453	2,3

De plus, l'évolution des paramètres z_T et z_{pH} en fonction respectivement des facteurs pH de traitement et température présentent des allures différentes pour les trois souches. Par conséquent, il semble difficile de proposer un modèle applicable à toutes ces souches avec peu de paramètres pour ne pas alourdir notre modèle global. Une modélisation tertiaire ne ferait que nuire à la robustesse du modèle. Nous nous limiterons donc à signaler ces interactions.

4.4.2. Interactions entre les pH de traitement et de recouvrement

Ces interactions sont évaluées sur deux souches bactériennes (*Bacillus stearothermophilus* ATCC 12980 et *Bacillus coagulans*) pour lesquelles un plan factoriel complet à été réalisé entre les facteurs pH de traitement et pH de recouvrement.

4.4.2.1. Influence du pH de traitement sur le z'_{pH}

La représentation graphique (figure IV.9) de l'évolution du z'_{pH} en fonction du pH de traitement ne laisse pas apparaître de tendance marquée. Le z'_{pH} varie de 1,55 à 2,10 pour le *Bacillus coagulans* et de 1,57 à 2,05 pour le *Bacillus stearothermophilus*. L'influence du pH de recouvrement, caractérisé par le z_{pH} , est donc relativement constante quel que soit le pH de recouvrement.

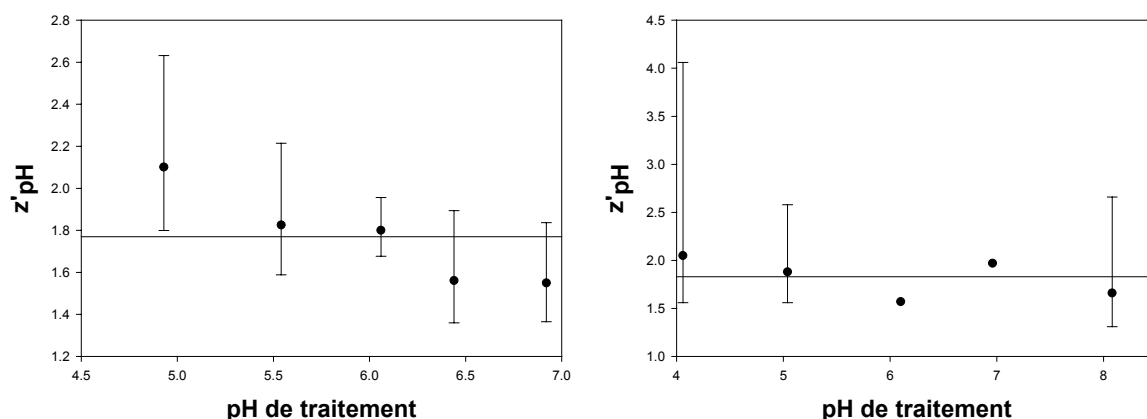


Figure IV.9 : Représentation des variations du z'_{pH} en fonction du pH de traitement chez *Bacillus coagulans* (à droite) et *Bacillus stearothermophilus* (à gauche). Les intervalles de confiance des pH 6,10 et 6,96 (à droite) ne sont pas représentés car ils dépassent largement l'échelle du graphique.

4.4.2.2. Influence du pH' de recouvrement sur z_{pH}

La représentation du log de D en fonction du pH de traitement montre, dans le cas de *Bacillus coagulans*, que la pente des droites de régression varie en fonction du pH de recouvrement. Or la pente de ces droites est directement liée à la valeur du z_{pH} (figure IV.10). La valeur de z_{pH} (écart de pH induisant une variation de D d'un facteur 10) atteint même une valeur de 24 à pH de recouvrement très acide chez *Bacillus coagulans*. En revanche, chez *Bacillus stearothermophilus*, l'effet du pH de recouvrement sur le z_{pH} semble peu marqué.

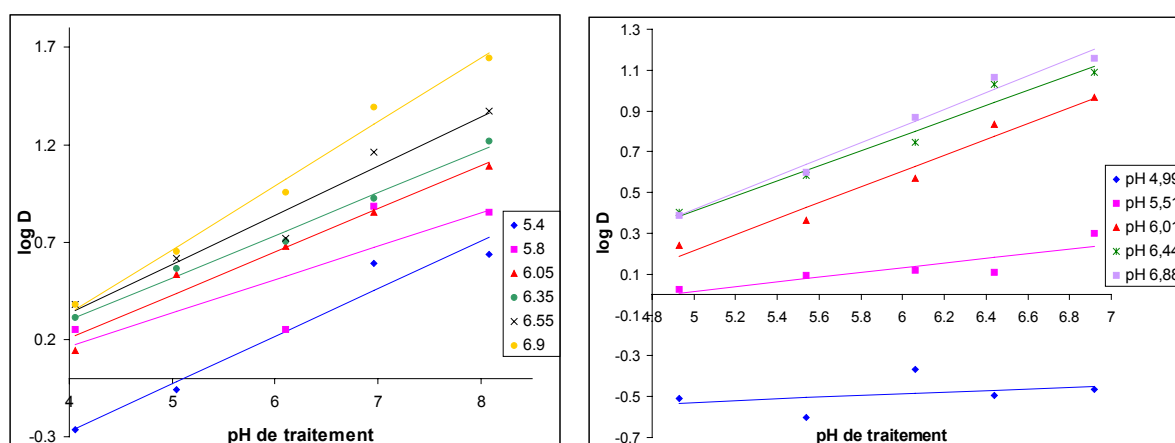


Figure IV.10 : Représentation du log de D (min) en fonction du pH de traitement, à différents pH de recouvrement pour les souches de *Bacillus stearothermophilus* ATCC 12980 (à gauche) et de *Bacillus coagulans* ATCC 7050 (à droite).

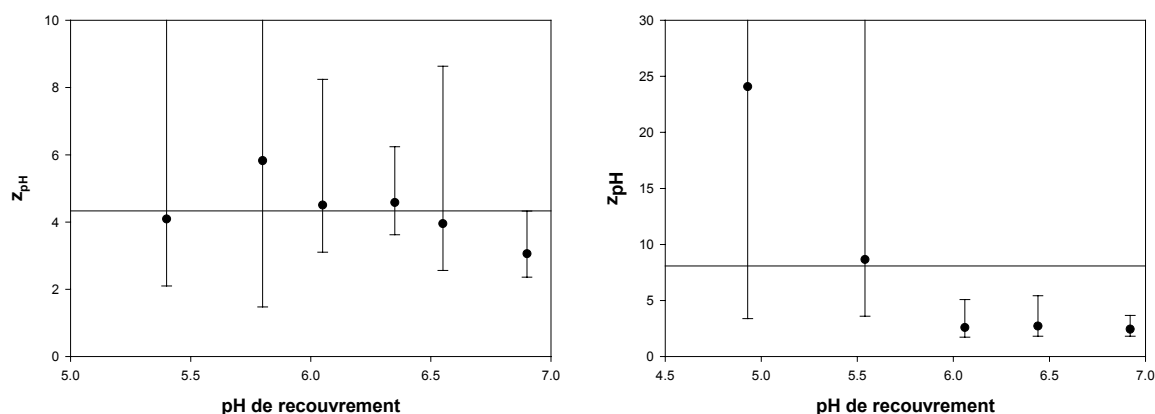


Figure IV.11 : Evolution de la valeur du paramètre z_{pH} en fonction du pH de recouvrement pour les souches de *Bacillus stearothermophilus* ATCC 12980 (à gauche) et de *Bacillus coagulans* ATCC 7050 (à droite). Les intervalles de confiance des deux pH de recouvrement les plus acides sortent de la zone de graphique.

4.4.2.3. Analyse de variance

Afin de vérifier les conclusions tirées de l'observation graphique, une analyse de variance est effectuée et présentée dans le tableau IV.11. Seulement moins de 4% de la somme des carrés des écarts ne sont attribués aux interactions.

Tableau IV.11 : Analyse de variance. Valeur de la SCE (somme des carrés des écarts) attribuée à chaque facteur, et son % par rapport à la SCE totale.

Facteurs	<i>B. stearothermophilus</i>		<i>B. coagulans</i>	
	SCE	% d'expli	SCE	% d'expli
Totale	8,77	100	7,22	100
pH de traitement	5,57	63,5	0,84	11,6
pH de recouvrement	1,98	22,6	5,99	83,0
Interaction (pH _T x pH _R)	0,07	0,8	0,26	3,6
résiduelle	1,15	13,1	0,13	1,8

Compte tenu du faible poids des interactions, nous ne les intégrerons pas à notre modèle global. La perte de robustesse ne serait compensée que par un faible gain de qualité d'ajustement.

4.5. Discussion

4.5.1. Le modèle de Bigelow

Le modèle de Bigelow proposé dès 1921, traduit la relation log-linéaire entre la durée de réduction décimale et la température. Il fut depuis, conforté et validé à de nombreuses reprises. Une fois de plus, nous confirmons la très bonne qualité d'ajustement sur une gamme de souches pour lesquelles le modèle s'ajuste avec des coefficients de détermination oscillant entre 0,936 et 0,997.

En se référant aux sept souches étudiées, la valeur de z varie de 6,32 à 9,09. Leur attribuer la valeur conventionnelle de dix engendrerait une erreur dans l'estimation de la durée de réduction décimale à une température T .

La figure IV.12 représente graphiquement l'erreur engendrée par une valeur de z fixée à dix sur l'estimation de la durée de réduction décimale de *Clostridium sporogenes* A27 en fonction de la température.

Exemple : *Clostridium sporogenes* A27

$$D_{100} = 2,83 \text{ min}$$

$$z_T = 6,17$$

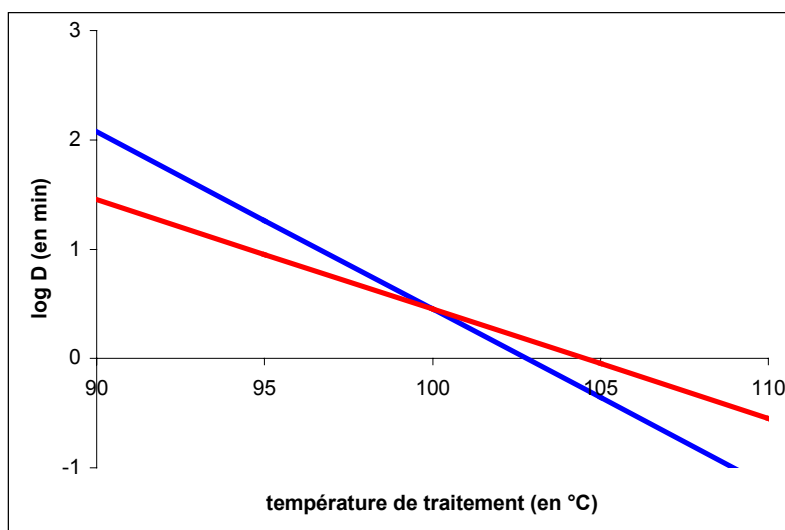


Figure IV.12 : représentation de l'erreur sur l'estimation du log D entre la valeur de z réelle ($z = 6,17$, en bleu) et la valeur conventionnelle ($z = 10$, en rouge).

Dans la plupart des cas rencontrés, la valeur de z estimée est inférieure à la valeur de z conventionnelle. Par conséquent, les calculs de D à des températures inférieures à la température T^* de référence sous-estiment la thermo-résistance.

4.5.2. Modélisation de l'effet du pH de traitement

Nous avons d'abord tenté d'ajuster nos données sur le modèle de Mafart et Leguérinel (1998). Mais la qualité d'ajustement est faible, remettant en question le caractère quadratique de l'évolution du log D en fonction du pH du modèle initial (Mafart *et al.*, 2001). L'exposant du modèle fixé à 2 par les auteurs serait en fait variable selon les souches bactériennes. Le modèle pourrait alors être généralisé en :

$$\log D = \log D^* - \left| \frac{pH - pH^*}{z_{pH}} \right|^\alpha \quad \text{Equation IV.4}$$

Le modèle de Mafart et Leguérinel (1998) serait alors généralisé par l'adjonction d'un paramètre supplémentaire, perdant de sa parcimonie, ainsi que sa linéarité. Mafart *et al.* (2001) indiquent que la valeur de α estimée sur neuf souches, varie de 0,9 à 2,35. Cette dispersion n'est pas seulement due à la nature des souches, mais également à la surparamétration du modèle et à la corrélation structurelle entre z_{pH} et α .

Afin de conserver la parcimonie et surtout la linéarité, nous avons pris le parti de ne pas estimer α , mais de le fixer à 1 ou à 2.

4.5.3. Modélisation de l'effet du pH de recouvrement

Le test statistique de Bates et Watts démontre, d'après les jeux de données collectés sur chaque souche, que la différence de qualité d'ajustement entre les deux modèles ne justifie pas l'ajustement du paramètre pH'_{opt} . Ces différences de qualité d'ajustement sont exprimées par intermédiaire du $R^2_{ajusté}$ et de la SCE (tableau IV.12).

Tableau IV.12 : comparaison des qualités d'ajustement entre le modèle de Couvert *et al.* (1999) et le modèle simplifié. Les modèles sont ajustés sur les valeurs de D déterminés aux pH inférieurs à 7.

souches	Modèle Couvert <i>et al.</i> (1999)		Modèle simplifié	
	SCE	R ² _{ajusté}	SCE	R ² _{ajusté}
<i>B. stearothermophilus</i> ATCC 12980	0,009	0,975	0,023	0,947
<i>B. stearothermophilus</i> A36	0,122	0,944	0,161	0,937
<i>B. coagulans</i> ATCC 7050	0,013	0,987	0,030	0,979
<i>B. pumilus</i> A40	0,016	0,934	0,021	0,922
<i>A. acidoterrestris</i> ATCC 49025	0,031	0,953	0,093	0,877
<i>C. sporogenes</i> A27	0,159	0,948	0,558	0,832
<i>C. sporogenes</i> Pasteur 79.3 (pop 2)	0,140	0,925	0,170	0,925

Le tableau IV.12 indique une certaine perte de qualité d'ajustement due à la simplification du modèle. Mais les contaminations des aliments sont souvent d'origines diverses, et les industriels ne disposent que d'informations très vagues sur les paramètres de thermorésistance des micro-organismes présents dans ses produits. Parmi les modèles disponibles, le choix s'orientera souvent vers les modèles plus simples, peut être moins précis, mais demandant moins d'estimation de paramètres. Avec seulement deux paramètres, la qualité d'ajustement du modèle reste convenable. De plus, les corrélations structurelles entre les paramètres z'_{pH} et le pH^* de référence sont supprimées, stabilisant ainsi l'ensemble du modèle.

Validation du modèle simplifié à partir de données bibliographiques :

La qualité d'ajustement du modèle simplifié est vérifiée sur des jeux de données extraits de la littérature (tableau IV.13).

Tableau IV.13 : Estimation de la valeur des paramètres du modèle simplifié selon les données bibliographiques de Lopez *et al.* (1997) obtenues sur quatre souches de *Bacillus stearothermophilus*. Les valeurs de D sont estimées à cinq valeurs de pH, de 5 à 7. La qualité d'ajustement est exprimée par l'intermédiaire du R²_{ajusté}.

souches	D _{120°C} (en min)	z'_{pH}	R ² _{ajusté}
ATCC 12980	2,41	3,06	0,978
ATCC 7953	2,19	3,80	0,993
ATCC 15951	2,35	3,21	0,993
ATCC 15952	1,67	4,12	0,993

On observe des valeurs de z'_{pH} très élevées par rapport à celle relevées sur nos souches de *Bacillus stearothermophilus*. L'explication peut venir des souches elles-

mêmes, ainsi que du milieu de recouvrement différent de celui que nous avons utilisé (ex : ajout de Ca^{2+} , acidification par HCl ...).

4.5.4. Modèle global et interactions

La modélisation successive des trois facteurs température, pH de traitement et pH de recouvrement telle que nous l'avons présentée ne peut être appliquée que lorsqu'un seul facteur du milieu varie (étude monofactorielle). De plus, ces modèles successifs et indépendants intègrent un paramètre commun : le D^* de référence. Il s'agit de la valeur de D estimée dans des conditions standards de température et de pH. En théorie, les valeurs de D^* obtenues par chaque modèle monofactoriel doivent être identiques. Or ces valeurs restent voisines, mais différentes.

L'estimation globale des paramètres conduit à des valeurs proches des valeurs déterminées lors de l'étude facteur par facteur. Dans chaque cas, les intervalles de confiance des paramètres sont estimés par les deux modèles (mono ou tri factoriel) présentent des régions communes. Ceci montre que le plan d'expérience suivi est valide et qu'à priori, aucune interaction entre les facteurs n'est perceptible.

Afin de vérifier cette absence apparente d'interaction, plusieurs plans factoriels complets ont été réalisés entre d'une part, la température et le pH de traitement, et d'autre part entre le pH de traitement et le pH de recouvrement.

Les déterminations des valeurs de z dans les différentes conditions environnementales semblent mettre en évidence d'importantes interactions entre les facteurs. En effet, les valeurs de z peuvent doubler en fonction des autres facteurs (figures IV.7, IV.8, IV.9, IV.10 et IV.11). L'exemple le plus marquant est l'augmentation de z_{pH} de 2,44 à 24,08 lorsque le pH de recouvrement est acidifié de 6,92 à 4,93.

Malgré ces fortes variations, l'analyse de variance ne laisse aux interactions qu'une part relativement faible ne dépassant pas les 3,6% d'explication estimés entre les pH de traitement et de recouvrement.

Ces résultats sont en accord avec les données bibliographiques (Lopez *et al.*, 1996 ; Silla Santos *et al.*, 1992, 1993 ; Anderson *et al.*, 1974 ; Fernandez *et al.*, 1994). L'ajustement de nos modèles monofactoriels sur les valeurs de D déterminées par quatre souches de *Bacillus stearothermophilus* (Lopez *et al.*, 1996) montrent les z_T et z_{pH} varient respectivement en fonction du pH de traitement et de la température

(Tableaux IV.14 et IV.15). Comme pour nos résultats, z_T augmente lorsque le pH diminue et z_{pH} augmente quand la température augmente. En d'autres termes, plus un facteur est hostile à la survie, et moins l'influence de l'autre est marquée.

Tableau IV.14 : valeur de z_{pH} en fonction de la température, selon les données de Lopez *et al.* (1996) collectées sur quatre souches de *Bacillus stearothermophilus*.

Souches de <i>Bacillus stearothermophilus</i>				
Température	ATCC 7953	ATCC 12980	ATCC 15951	ATCC 15952
115°C	3,71	3,41	3,08	2,30
120°C	4,18	4,42	3,38	3,00
125°C	4,20	4,36	3,79	2,84
130°C	6,38	5,05	4,28	3,27
135°C	7,11	7,86	6,19	10,19

Tableau IV.15 : Valeurs de z_T (en °C) en fonction du pH de traitement, selon les données de Lopez *et al.* (1996) collectées avec quatre souches de *Bacillus stearothermophilus*.

Souches de <i>Bacillus stearothermophilus</i>				
pH	ATCC 7953	ATCC 12980	ATCC 15951	ATCC 15952
7	8,16	7,58	7,74	7,77
6	9,84	9,20	8,94	8,51
5	9,83	8,89	9,29	8,97
4	10,02	9,37	9,55	9,62

Malgré ces variations sensibles des valeurs de z_T et z_{pH} , l'importance des interactions estimée par analyse de variance reste faible. Le tableau IV.16 indique le pourcentage d'explication de chacun des termes.

Tableau IV.16 : Analyse de variance sur l'ajustement du modèle global (d'après les données de Lopez *et al.*, 1996).

Souches de <i>Bacillus stearothermophilus</i>				
terme	ATCC 7953	ATCC 12980	ATCC 15951	ATCC 15952
$T - T^*$	90,12	90,69	87,25	86,20
$pH^* - pH$	8,69	7,91	11,11	10,62
$(T - T^*) \times (pH^* - pH)$	0,46	0,44	0,51	0,84
résiduelle	0,73	0,96	1,13	2,34

Tableau IV.17 : Valeurs de paramètres estimées sur le modèle global (d'après les données de Lopez *et al.*, 1996). D^* est déterminé à 121,1°C, pH7. Le pH de recouvrement est neutre.

souches	D^*	z_T	z_{pH}	$R^2_{\text{ajusté}}$
ATCC 7953	1,54	8,55	4,26	0,991
ATCC 12980	1,75	7,94	4,12	0,989
ATCC 15951	1,74	8,00	3,50	0,987
ATCC 15952	1,69	7,75	2,75	0,982

Une modélisation tertiaire de type $z_T = f(pH)$ ou $z_{pH} = f(T^\circ)$ rendant compte des interactions serait théoriquement possible. Compte tenu du poids relativement faible de ces interactions et compte tenu du fait que la nature de ces interactions varie sensiblement d'une espèce à l'autre, nous pensons qu'une telle modélisation présenterait peu d'intérêt.

4.5.5. Extension des concepts classiques

Par définition, la VDB est la valeur de destruction biologique quantifiant le degré de létalité du facteur appliqué. L'unique facteur actuellement pris en compte dans cette notion est la température. Or, le pH a également un effet sur la thermorésistance des spores, et par conséquent peut être intégré dans la notion de VDB au même titre que la température.

La VDB peut être définie comme :

$$L_T = \frac{D^*}{D} \quad \text{Equation IV.5}$$

Où D^* et D sont respectivement les durées de réduction décimale à la température T^* (121,1°C) et à la température T . Par conséquent, d'après le modèle de Bigelow :

$$L_T = 10^{\frac{T-T^*}{z_T}} \quad \text{Equation IV.6}$$

Suivant le modèle que nous avons établi, la VDB, dans son acception élargie, s'écrit :

$$L_{T,pH,pH'} = \frac{D^*}{D} = 10^{\frac{T-T^*}{z_T} + \frac{7-pH}{z_{pH}} + \left(\frac{7-pH'}{z'_{pH}}\right)^2} \quad \text{Equation IV.7}$$

Les valeurs D^* et D sont alors respectivement les durées de réduction décimale aux pH et température de référence (121,1°C, pH 7) et aux pH et températures étudiés (T , pH).

La VDB globale résulte donc de trois VDB partielles :

$$L_{T,pH,pH'} = \lambda_T \cdot \lambda_{pH} \cdot \lambda_{pH'} \quad \text{Equation IV.8}$$

Ce qui conduit à la détermination de la valeur stérilisatrice F sous la forme suivante :

$$F = \int_{t_0}^{t_f} L_{T,pH,pH'} \cdot dt = \int_{t_0}^{t_f} \lambda_T \cdot \lambda_{pH} \cdot \lambda_{pH'} \cdot dt \quad \text{Equation IV.9}$$

Cette intégration n'est valable que pour les souches dont les courbes de survies sont log-linéaires (cas de *B. stearothermophilus*). Dans le cas contraire, les valeurs stérilisatrices ne sont plus additives et ne peuvent être intégrées de la sorte.

Nous pouvons alors distinguer deux cas. Le cas général où le pH n'évolue pas au cours de la stérilisation, et le cas particulier où l'on observe une variation du pH (ex : Saladière *Western*) :

❶ Cas le plus courant où le pH est constant tout au long de la stérilisation. Par conséquent, on a $pH = pH' = \text{constante}$, et le seul facteur variable est la température.

Les valeurs de destruction biologique relative au pH (L_{pH} et $L_{pH'}$) sont constantes en fonction du temps. On peut donc écrire :

$$F = \lambda_{pH} \cdot \lambda_{pH'} \int_{t_0}^{t_f} \lambda_T \cdot dt \quad \text{Equation V.10}$$

La valeur stérilisatrice corrigée F' est alors :

$$F' = \frac{F}{\lambda_{pH} \cdot \lambda_{pH'}} = \int_{t_0}^{t_f} \lambda_T \cdot dt \quad \text{Equation V.11}$$

❷ Cas particulier où l'on observe une variation de pH au cours de la stérilisation. Le pH de recouvrement reste constant, mais la valeur de destruction biologique L_{pH} doit être intégrée en fonction du temps. La valeur stérilisatrice corrigée F' devient :

$$F' = \frac{F}{\lambda_{pH'}} = \int_{t_0}^{t_f} \lambda_T \cdot \lambda_{pH} \cdot dt \quad \text{Equation V.12}$$

4.5.5.1. Extension de la méthode de Bigelow

La méthode de Bigelow permet d'estimer la valeur stérilisatrice F appliquée à partir d'un suivi de température en évaluant la valeur de l'intégrale :

$$F = \int_{t_0}^{t_f} \lambda_T \cdot dt \quad \text{Equation V.13}$$

La méthode consiste à incrémenter le traitement en Δt . L'équation V.13 s'écrit alors :

$$F = \sum_{t_0}^{t_f} \lambda_{iT} \cdot \Delta t \quad \text{Equation V.14}$$

Cette méthode peut être étendue afin de prendre en compte l'effet du pH au cours de la destruction. On distingue de nouveau les deux cas présentés ci dessus :

❶ Cas le plus courant où le pH est constant tout au long de la stérilisation.

$$F' = \frac{F}{\lambda_{pH} \cdot \lambda_{pH'}} = \int_{t_0}^{t_f} \lambda_T \cdot dt \quad \text{Equation V.15}$$

ce qui équivaut à :

$$F' = \frac{nD^*}{10^{\frac{7-pH}{z_{pH}} + \left(\frac{7-pH'}{z'_{pH}}\right)^2}} = \int_{t_0}^{t_f} 10^{\frac{T-T^*}{z_T}} .dt \quad \text{Equation V.16}$$

Le facteur variable est la température T. Cette température est suivie au cours du temps. Une mesure est effectuée toutes les 30 secondes. Par incrémentation, on obtient :

$$F' = \sum_{t_0}^{t_f} 10^{\frac{T_i-T^*}{z_T}} .\Delta t_i \quad \text{Equation V.17}$$

Ce qui revient à la méthode de base de Bigelow.

❷ Cas particulier où l'on observe un glissement de pH au cours de la stérilisation. Cette fois, deux facteurs variables doivent être intégrés.

$$F' = \frac{F}{\lambda_{pH'}} = \int_{t_0}^{t_f} \lambda_T . \lambda_{pH} .dt \quad \text{Equation V.18}$$

Par incrémentation, on obtient :

$$F' = \frac{nD^*}{10^{\left(\frac{7-pH'}{z_{pH}}\right)^2}} = \sum_{t_0}^{t_f} 10^{\frac{T_i-T^*}{z_T}} . 10^{\frac{7-pH_i}{z_{pH}}} .\Delta t_i \quad \text{Equation V.19}$$

On considère un Δt_i de 30 secondes, ce qui implique une mesure de température et de pH toutes les 30 secondes.

La méthode est adaptée sur un tableur informatique (Excel 97) de la façon suivante :

- colonne 1 : temps de traitement (incrément de 30 secondes)
- colonne 2 : Température au point froid de la boîte au Δt_i
- colonne 3 : pH selon le modèle ajusté, au Δt_i
- colonne 4 : VDB au Δt_i
- colonne 5 : Valeur stérilisatrice F cumulée entre t_0 et t.

Cette méthode permet de calculer le nombre de réductions décimales appliquées pour un barème donné dont on connaît le suivi de température. Ceci implique de réaliser le suivi pour tous les barèmes pour lesquels on souhaite connaître le nombre de réduction décimale engendré. Mais cette méthode ne peut pas être utilisée « à l'envers », c'est-à-dire déterminer le barème de stérilisation à appliquer pour atteindre un nombre de réductions décimales préalablement choisi.

4.5.5.2. Extension de la méthode de Ball

La méthode de Ball consiste à calculer F de façon semi-analytique à l'aide d'un changement du facteur température qui devient alors une fonction du temps. Comme précédemment, on distingue deux cas :

❶ Cas le plus courant où le pH est constant tout au long de la stérilisation. A pH de traitement constant, le calcul de F' suit la méthode de base de Ball.

$$F' = \frac{nD^*}{10^{\frac{7-pH}{z_{pH}} + \left(\frac{7-pH'}{z'_{pH}}\right)^2}} = \int_{t_0}^{t_f} 10^{\frac{T-T^*}{z_T}} .dt \quad \text{Equation V.20}$$

La température T est une fonction du temps modélisée par :

⇒ au cours du chauffage :

$$\log \Theta_h = \log \frac{T_p - T_0}{T_p - T} = \frac{1}{f_h} t - \log j_h \quad \text{Equation V.21}$$

L'isolement de la température donne :

$$T = T_p - j_h (T_p - T_0) . 10^{-\frac{t}{f_h}} \quad \text{Equation V.22}$$

- où
- T_p est la température de palier
 - T_0 est la température initiale
 - f_h et j_h sont les paramètres estimés du modèle

⇒ au cours du refroidissement :

$$\log \Theta_c = \log \frac{T_g - T_c}{T - T_c} = \frac{1}{f_c} t - \log j_c \quad \text{Equation V.23}$$

L'isolement de la température donne :

$$T = T_c + j_c (T_g - T_c) 10^{\frac{t}{f_c}} \quad \text{Equation V.24}$$

- où
- T_g est la température du produit en début de refroidissement
 - T_c est la température de l'eau froide du refroidissement
 - f_c et j_c sont les paramètres estimés du modèle

Avec ce changement de variable, Ball détermine alors, à partir d'un seul suivi de température, les valeurs des quatre paramètres caractéristiques des variations de température au point froid du produit. Ces quatre paramètres vont permettre de simuler des suivis de température à n'importe quel barème.

❷ Cas particulier où le pH évolue au cours de la stérilisation. Cette fois, le facteur pH est fonction du temps et doit être intégré :

$$F' = \frac{F}{\lambda_{pH'}} = \int_{t_0}^{t_f} \lambda_T \cdot \lambda_{pH} \cdot dt \quad \text{Equation V.25}$$

Soit :

$$F' = \frac{nD^*}{10^{\left(\frac{\gamma - pH'}{z'_{pH}}\right)^2}} = \int_{t_0}^{t_f} 10^{\frac{T - T^*}{z_T}} \cdot 10^{\frac{\gamma - pH}{z_{pH}}} \cdot dt \quad \text{Equation V.26}$$

Le calcul de F' est une intégration du produit de deux fonctions du temps probablement difficile à résoudre analytiquement.

4.5.5.3. Combinaison des méthodes de Ball et de Bigelow

La méthode de Bigelow permet de résoudre de manière numérique l'intégration des valeurs de destruction biologique relatives à la température et au pH. Cependant, la méthode nécessite d'être réalisée à partir d'un suivi expérimental de température. Par conséquent, il n'est pas possible d'utiliser cette méthode « à l'envers », c'est-à-dire de déterminer un barème (et donc un suivi de température) en partant d'un nombre de réduction décimal que l'on souhaite imposer (sauf dans le cas particulier où la température à cœur atteint celle du palier de l'autoclave).

Pour résoudre ce problème, cette méthode de Bigelow peut être modifiée de sorte que l'on n'utilise non plus d'un suivi expérimental de température, mais d'une simulation de ce suivi à l'aide du modèle de Ball. Dès lors que les paramètres de Ball sont déterminés (un seul suivi de température suffit), l'avantage de cette modélisation est qu'il est possible de déterminer par le calcul les cinétiques de température, quel que soit le barème.

Chapitre 5

APPLICATION DES MODELES A UN PRODUIT INDUSTRIEL

La microbiologie prévisionnelle repose généralement sur des bases de données obtenues en laboratoire à partir de milieux de suspension et de culture dont les facteurs physico-chimiques sont maîtrisés. L'application des modèles de thermorésistance établis dans ces milieux standards vers des milieux alimentaires nécessite une étape de validation.

Dans le cadre de notre étude, nous avons choisis de réaliser ces validations sur un produit complexe par sa composition variée et l'hétérogénéité du pH de ses ingrédients. Il s'agit de la gamme *Saladière* produite par *Saupiquet*. Ce produit est composé de thon, de légumes et d'une sauce acide de type vinaigrette. Chacun de ces trois composants principaux possède à l'emboîtement, un pH propre qui va évoluer au cours du temps de chauffage. La complexité de l'étude vient donc du fait que nous nous trouvons ici dans des conditions dynamiques où la stérilisation sera accompagnée de variations de température et de pH. Deux recettes de *Saladières* seront étudiées : la *Western* et la *Mexicana*.

5.1. Recueil de données et résultats

5.1.1. Etude des variations des facteurs du produit aux points critiques

Une simulation de la destruction des micro-organismes au cœur d'un tel produit nécessite une connaissance précise des évolutions de température et de pH au cours du processus de stérilisation.

La première étape consiste à mettre en évidence le(s) point(s) de la boîte au(x)quel(s) les conditions de pH et de température restent les plus défavorables à la destruction microbienne, puis de suivre l'évolution de ces facteurs au cours de la stérilisation. Bien entendu, si les points défavorables de température et de pH sont

localisés à deux endroits différents, l'étude doit se faire simultanément sur ces deux points afin de déterminer ensuite quel sera le plus propice à la survie bactérienne.

5.1.1.1. Le facteur température

Dans un produit homogène (ex : compote), le point froid se trouve approximativement au centre géométrique de la boîte. Pour le produit hétérogène que nous étudions, la recherche du point froid doit être effectuée en plaçant des sondes de température à différents niveaux. Les enregistrements (figure V.1) permettent de comparer les suivis et de mettre en évidence le point où la température reste la plus basse pendant tout le traitement. Il s'agit d'un point se situant au tiers haut de la boîte. Nous considérons ce point comme la zone où la destruction microbienne par la température est la plus faible.

Plusieurs répétitions de suivis sont effectuées. Les paramètres du modèle de Ball sont estimés et présentés dans les tableaux V.1 et V.2. Leurs écarts type restent faibles. Les intervalles de confiance à 95% sont également indiqués.

Les différentes phases du cycle de stérilisation sont présentées tableau V.3.

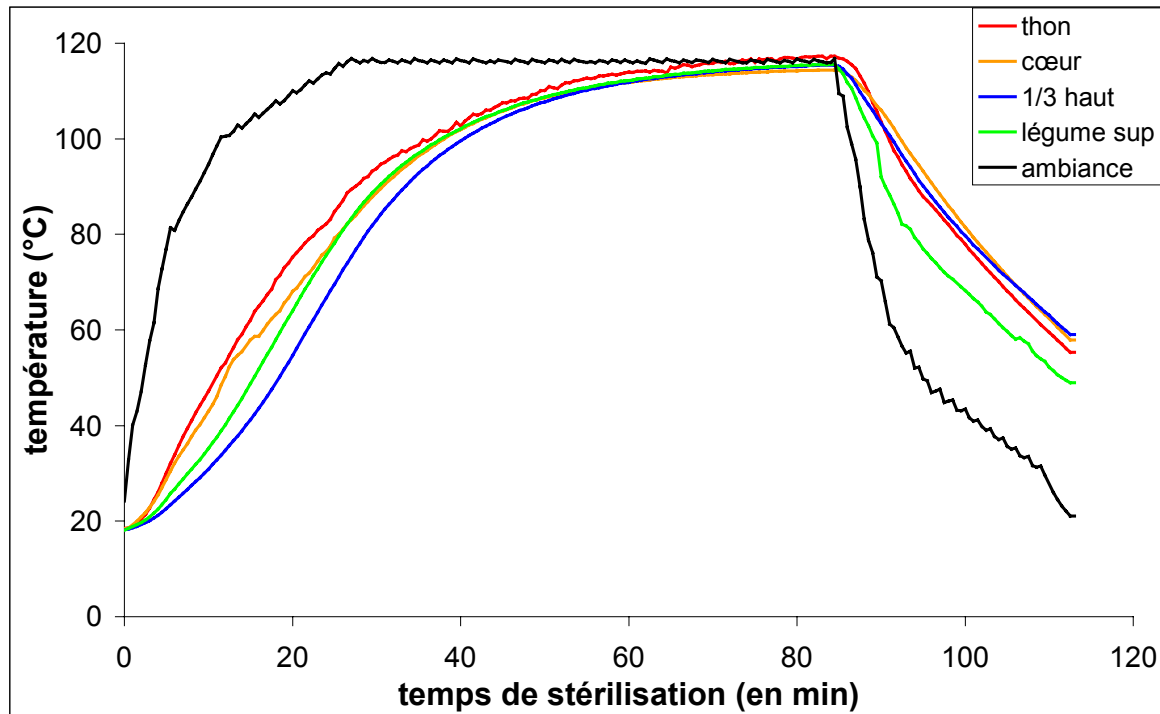


Figure V.1 : Suivi de la température dans une boîte *Western*. Le schéma de la boîte indiquant les différents niveaux est représenté p.50 (figure II.1).

Tableau V.1 : Paramètres estimés du modèle de Ball sur les suivis de température effectués au point froid de la *Saladière Western* (tiers haut). La moyenne, l'écart type et l'intervalle de confiance à 95% sont indiqués pour chaque paramètre.

n° de suivi	f_h	j_h corr	f_c	j_c
1	33,80	0,81	82,39	1,08
2	33,67	0,82	74,51	1,08
3	34,40	0,79	73,67	1,10
4	31,72	0,70	74,60	1,05
5	30,35	0,85	65,88	1,01
6	31,74	0,74	79,31	1,10
7	34,99	1,03	75,08	1,07
8	34,16	0,92	69,79	1,13
9	34,78	0,84	73,45	1,07
10	31,44	0,73	69,68	1,08
11	32,46	0,83	71,35	0,94
12	33,13	0,81	73,75	1,00
13	34,90	1,03	75,48	1,05
14	33,74	0,81	73,83	1,09
15	35,04	0,83	79,05	1,06
16	33,35	0,82	72,47	1,08
17	31,96	0,73	71,43	1,11
18	31,65	0,73	72,10	1,06
19	33,98	0,80	73,14	1,08
20	34,00	0,93	70,40	1,13
moyenne	33,26	0,83	73,57	1,07
écart type	1,39	0,091	3,70	0,045
Interv. Conf. 95%	30,36 – 36,16	0,64 – 1,02	65,82 – 81,32	0,98 – 1,16

Tableau V.2 : Paramètres estimés du modèle de Ball sur les suivis de température effectués au point froid de la *Saladière Mexicana* (tiers haut). La moyenne, l'écart type et l'intervalle de confiance à 95% sont indiqués pour chaque paramètre.

n° de suivi	f_h	j_h corr	f_c	j_c
1	30,63	0,69	61,27	1,04
2	34,84	0,84	67,20	1,07
3	35,59	0,91	69,85	1,09
4	33,62	0,69	67,44	1,10
moyenne	33,67	0,78	66,44	1,07
écart type	2,18	0,11	3,65	0,03
Interv. Conf. 95%	29,1 – 38,2	0,55 – 1,01	70,4 – 77,2	1,05 – 1,10

Tableau V.3 : phases de chauffage et de refroidissement du cycle du pilote de stérilisation (Multiprocess Barriquand). La durée B correspond au barème appliqué (seule variable).

n° phase	Température (stérilisateur)	Durée phase (min)	Durée totale (min)
1	40°C	1	1
2	80°C	4	5
3	100°C	6	11
4	110°C	9	20
5	114°C	4	24
6	116°C	2	26
7	116°C	B	26 + B
8	100°C	2	28 + B
9	80°C	2	30 + B
10	60°C	3	33 + B
11	50°C	4	37 + B
12	30°C	15	52 + B
13	15°C	5	57 + B

5.1.1.2. Le facteur pH

5.1.1.2.1. La *Saladière Western*

Les pH initiaux des ingrédients s'échelonnent de 2,7 (sauce) à près de 9 (Olives) comme l'indique le tableau V.4. Des variations de pH peuvent être observées à partir du moment où les ingrédients sont mis en contact et avant même la montée en température. Ainsi, les légumes coupés en morceaux sont préalablement mélangés et pressés pour éliminer le surplus d'eau. Cette opération montre que le pH de chaque légume atteint un pH d'équilibre proche de 7 avant le début du traitement thermique.

Tableau V.4 : pH initiaux des ingrédients entrant dans la composition de la *Saladière Western*

Ingrédients	pH initiaux
Sauce	2,7
Thon	5,9
Maïs	7,6
Carottes	6,6
Pois	6,8
Poivrons	5,2
Oignons	5,9
Olives	8,9
Cornichons	4,5
Persil	5,8
Mélange légume	7

Après la mise en boîte des ingrédients, un gradient de pH s'établit entre le fond de la boîte (présence de la sauce acide) et la surface. Le suivi du pH au cours du traitement thermique indique une acidification progressive de l'ensemble de la boîte par la sauce. Ces évolutions de pH sont suivies à cinq niveaux différents, correspondant à des couches horizontales (figure II.2, p.52) :

- la galette de thon
- la sauce
- la couche inférieure de légumes (proche de la sauce)
- la couche intermédiaire de légumes
- la couche supérieure de légumes

Ces suivis indiquent clairement que la zone la plus défavorable à la destruction microbienne (pH le moins acide) est la couche de légumes supérieure, zone la plus éloignée de la sauce acide. Par conséquent, des mesures ont été répétées afin de suivre l'évolution du pH dans cette zone (figure V.2).

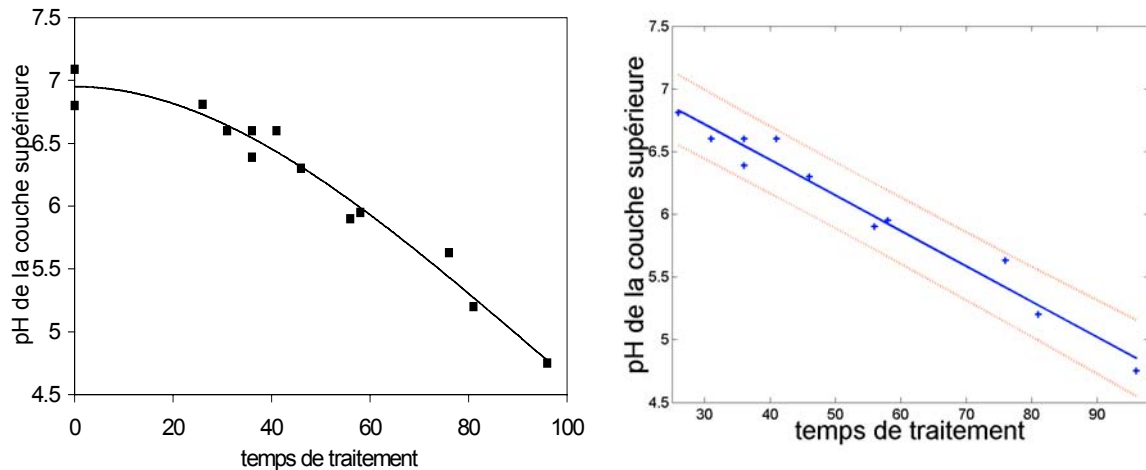


Figure V.2 : Evolution du pH de la couche supérieure de légumes en fonction du temps de chauffage (en min). A gauche, modélisation polynomiale au 3^e degré. A droite, modélisation réduite à la partie linéaire avec sa région de confiance à 95%

La période intéressante du suivi, c'est-à-dire lorsque la température atteint des valeurs létales (après 30 min de chauffage) peut être en première approximation assimilée à une loi linéaire. Nous nous limiterons donc à ce modèle linéaire pour exprimer l'acidification de la couche supérieure de légumes pour des temps de traitement compris entre 30 et 98 min. Les paramètres de cette droite sont :

$$pH = -0,028t + 7,56$$

Où t est le temps de traitement en minutes.

Mais cette évolution de pH n'est en fait qu'un suivi « différé » : la valeur de pH n'est pas mesurée au temps indiqué, mais après un cycle de refroidissement de 31 min afin que les conditions de température et de pression permettent la mesure.

Les mesures de pH en temps réel (comme pour la température) n'est pas possible techniquement. La taille démesurée des sondes supportant ces conditions de mesure ne permet pas un suivi local. Par conséquent, nous ne pouvons prendre en compte les évolutions de pH au cours de traitement. Pour les calculs de barèmes de stérilisation, nous n'avons le choix qu'entre deux valeurs mesurées : le pH initial de traitement et le pH final. Nous choisissons le moins acide, qui dans notre cas, est le pH initial (pH 6,95).

Les mesures de pH étant réalisées en fin de cycle de refroidissement, le suivi réalisé correspond à l'évolution du pH de recouvrement en fonction du barème appliqué.

Evolution post-traitement thermique

Nous avons montré que le pH continue d'évoluer après le traitement thermique jusqu'à ce que tous les ingrédients atteignent un même pH d'équilibre (figure V.3). Cet équilibre n'est atteint qu'au bout de quelques semaines.

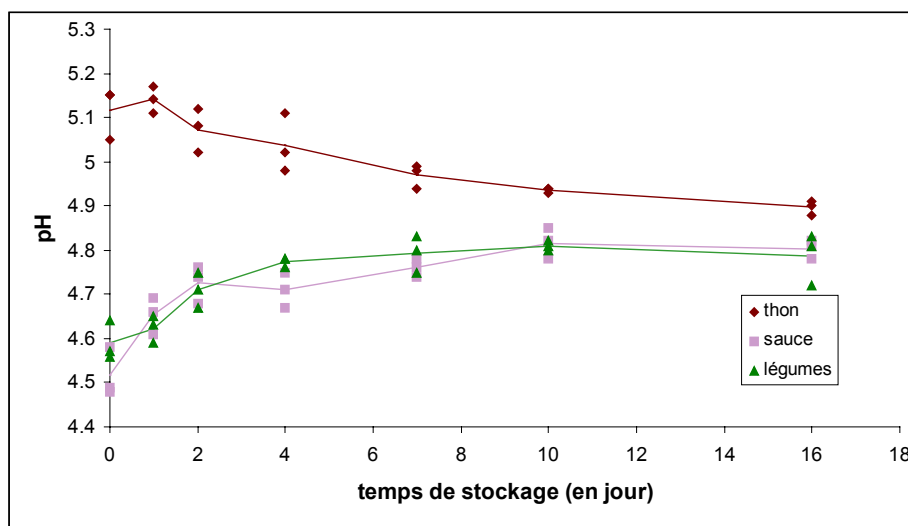


Figure V.3 : Suivi du pH au cours du stockage post traitement thermique.
Saladière Western

Compte tenu de l'évolution très lente du pH après le traitement thermique, le pH de recouvrement pris en compte dans le modèle correspondra au pH de fin de stérilisation.

5.1.1.2.2. La *Saladière Mexicana*

La présentation générale de cette seconde *Saladière* est identique à la *Western*. Seule la composition de la sauce et du mélange de légume diffère.

Contrairement à la *Saladière* précédente, le pH de la *Mexicana* s'équilibre très vite. La zone critique est constituée par la couche de légume supérieure dont le pH atteint rapidement 5,5 en début de traitement, puis reste stable. Le pH de recouvrement sera alors indépendant du temps de stérilisation. Quel que soit le barème, le pH de recouvrement sera de 5,5. En raison du faible nombre de suivis réalisés, la région de confiance n'a pu être déterminée. D'autres suivis devront à ce titre être réalisés.

Le pH de traitement correspondra au pH défavorable initial, soit le pH du mélange de légume égal à 6,3.

5.1.1.3. Localisation du point défavorable

Dans le cas des *Saladières*, la zone critique est la même, aussi bien pour le pH que pour la température. La Figure V.4 permet de situer la région à étudier.

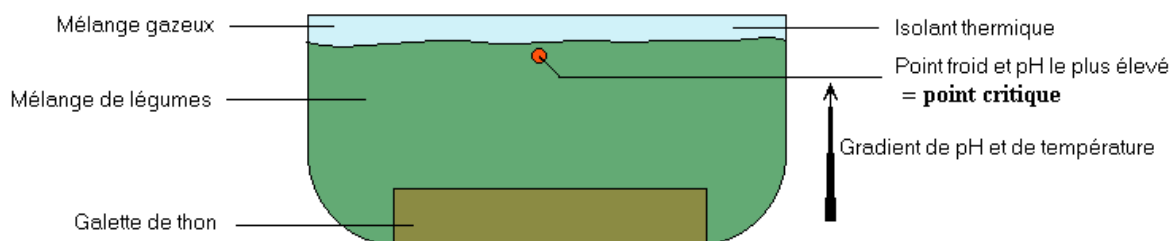


Figure V.4 : Schéma d'une coupe transversale d'une boîte *Saladière* format bol. Localisation en rouge du point critique (zone où destruction bactérienne est la plus lente, selon les facteurs température et pH).

Un gradient de température et de pH s'établit. Il s'explique d'une part, par le mélange gazeux de surface jouant le rôle d'isolant thermique. L'échauffement se fait en majorité par le fond et par les cotés de la boîte. D'autre part, la sauce acide se trouvant au fond de la boîte, va lentement acidifier l'ensemble des légumes, de bas en haut.

Des suivis de température et de pH au niveau du point critique permettront de simuler par la suite, la destruction bactérienne à l'aide du modèle global (Equation IV.3, p.94).

5.1.2. Validation

5.1.2.1. Construction d'une feuille de calcul

Dans le but d'automatiser le calcul de détermination de barème en tenant compte de la température et du pH, une feuille de calcul est construite sur le logiciel Excel 97. Les calculs sont basés sur l'association des méthodes de Bigelow et de Ball (§ 4.5.5.3.).

Cette feuille demande en paramètres d'entrée :

- Les paramètres relatifs au suivi de température : $f_h, j_h, f_c, j_c, T_p, T_0, T_c$
- Les paramètres relatifs au suivi de pH : pente et ordonnée à l'origine lorsqu'il s'agit d'une droite (cas de la *Saladière Western*)
- Les paramètres de thermorésistance de la souche considérée : $D^*, z_T, z_{pH}, z'_{pH}$
- Le nombre de durées de réduction décimale visé.

Les calculs de F' pendant le chauffage et pendant le refroidissement sont dissociés l'un de l'autre et notés respectivement F'_1 et F'_2 .

Calcul de F'_1 (Chauffage) :

Le calcul est réparti sur cinq colonnes :

➤ **1^{ère} colonne** : temps de stérilisation

Cette colonne débute au temps zéro et est incrémenté en Δt de 30 secondes.

➤ **2^e colonne** : suivi de température

La valeur de température est recalculée à chaque Δt par application du modèle de Ball tel que :

$$T = T_p - j_h (T_p - T_0) \cdot 10^{-\frac{t}{f_h}} \quad \text{Equation V.1}$$

➤ **3^e colonne** : suivi de pH

La valeur de pH est recalculée à chaque Δt à l'aide du modèle de suivi déterminé préalablement. Pour la *Saladière Western*, il s'agit d'une décroissance linéaire du pH au cours du temps de stérilisation de la 30^e à la 98^e minute. Dans le cas de la *Saladière Mexicana*, aucune variation de pH n'est observée au cours de la stérilisation.

➤ **4^e colonne** : Valeur de destruction biologique (VDB)

A chaque Δt_i , la VDB varie avec la température et le pH tel que :

$$L_{T_i, pH_i} = 10^{-\frac{T_i - T^*}{z_T} - \frac{7 - pH_i}{z_{pH}}} \quad \text{Equation V.2}$$

↘ **5^e colonne** : Calcul cumulé de F'_1

A chaque Δt est recalculé le F' correspondant à l'incrément de 30 secondes et est cumulé aux valeurs précédentes :

$$F'_1 = \sum_{i=1}^n L_{T_i, pH_i} \times 0,5 \quad \text{Equation V.3}$$

Calcul de F'_2 (Refroidissement) :

Seul le calcul de la température (colonne 2) diffère du calcul de F'_1 . L'équation devient :

$$T = T_c + j_c (T_g - T_c) \cdot 10^{-\frac{t}{f_c}} \quad \text{Equation V.4}$$

L'origine du temps ($t = 0$) correspond alors au temps de fin de palier (= début du refroidissement). De même :

$$F'_2 = \sum_{i=n}^{n'} L_{T_i, pH_i} \times 0,5 \quad \text{Equation V.5}$$

Principe du calcul du barème

La valeur de F' (définie au paragraphe 4.5.5.) correspond à la somme des valeurs F'_1 et F'_2 . Le calcul repose donc sur la recherche du temps de chauffage du stérilisateur qui satisfera cette égalité. Cette recherche est automatisée sur le tableur.

On en déduit le barème B (temps de palier du stérilisation) en ôtant le CUT de 26 min du temps de chauffage.

La feuille de calcul est représentée p.126, fig IV.5.

Paramètres du suivi de température					paramètres de thermorésistance				
fh	34				D*	2.3			
Jh _{corr}	2.57				Z _T	8.4			
fc	70.4				Z _{pH}	3.5			
jc	1.06				Z' _{pH}	1.6			
To (°C)	16.5				T*	121.1			
Tp (°C)	116								
Tc (°C)	20								
Paramètres du suivi de pH					paramètres de la stérilisation				
pente	-0.028				CUT (min)	26			
origine	7.56				n	5			
Calcul des fonctions utiles					paramètres variables divers				
LpH'	4.16				pH'	5.74			
F'	2.77				g	3.24			
F' chauffage	2.01				Tg	112.76			
F' refroidiss.	0.76								
Barème									
test	38.5	en min							
Chauffage					Refroidissement				
temps	T(t)	pH(t)	Lti,pHi	F'1	temps	T(t)	pH(t)	Lti,pHi	F'2
0	-139.72	6.95	0.00	0.00	0	112.76	5.74	0.23	0.12
0.5	-131.20	6.95	0.00	0.00	0.5	112.76	5.74	0.23	0.23
1	-122.97	6.95	0.00	0.00	1	112.76	5.74	0.23	0.35
1.5	-115.01	6.95	0.00	0.00	1.5	112.76	5.74	0.23	0.47
2	-107.32	6.95	0.00	0.00	2	112.10	5.74	0.19	0.56
2.5	-99.89	6.95	0.00	0.00	2.5	110.60	5.74	0.13	0.63
3	-92.70	6.95	0.00	0.00	3	109.13	5.74	0.09	0.67
3.5	-85.75	6.95	0.00	0.00	3.5	107.69	5.74	0.06	0.70
4	-79.03	6.95	0.00	0.00	4	106.27	5.74	0.04	0.72
4.5	-72.54	6.95	0.00	0.00	4.5	104.87	5.74	0.03	0.73
5	-66.26	6.95	0.00	0.00	5	103.49	5.74	0.02	0.74
...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
39	97.77	6.46	0.00	0.01	39	47.46	5.74	0.00	0.76
39.5	98.38	6.45	0.00	0.01	39.5	47.01	5.74	0.00	0.76
40	98.97	6.43	0.00	0.01	40	46.58	5.74	0.00	0.76
...	...	...	...	...					
...	...	...	...	...					
99	115.69	4.77	0.99	22.78					
99.5	115.70	4.75	1.00	23.28					
100	115.71	4.74	1.01	23.78					

Fig V.5 : Représentation de la feuille de calcul permettant l'estimation rapide d'un barème de stérilisation en tenant compte de la température et du pH.

5.1.2.2. Application au produit *Saladière*

Les *Saladières Western* et *Mexicana* sont inoculées uniformément par 10^5 spores par gramme d'une souche sporulée dont les paramètres de thermorésistance sont connus (Matériel et Méthodes § 2.3.2).

Le principe de cette validation est de déterminer d'une part par le calcul, et d'autre part par l'expérience, le barème de stérilisation nécessaire pour réduire la population inoculée à 0,5 spore survivante par boîte (soit une boîte sur deux non stérile).

➤ *Détermination du barème par le calcul*

Le produit est inoculé à un taux de 10^5 spores par gramme, soit $2,52 \cdot 10^7$ spores par boîte. Le nombre de réductions décimales n à réaliser pour atteindre 0,5 spore survivante par boîte est :

$$n = \log \frac{N_0}{N} = \log \frac{2,52 \cdot 10^7}{0,5} = 7,7$$

L'estimation du barème théorique est effectuée à partir de la feuille de calcul Excel (p.126). Les paramètres de thermorésistance sont ceux estimés par ajustement du modèle global (tableau IV.9, p.95).

Les valeurs des paramètres du modèle de Ball sont les valeurs moyennes obtenues sur plusieurs suivis (tableau V.1 et V.2, p.119). De même, les paramètres du suivi de pH ont été déterminés par l'expérience (§ 5.1.1.2.). Le calcul, basé sur les caractéristiques de la zone critique, néglige donc les gradients de température et de pH, de sorte qu'il sous-estime en principe le taux de destruction, ce qui revient à surestimer les barèmes à appliquer.

➤ *Détermination du barème par l'expérience*

Les boîtes inoculées (Matériel et Méthodes § 3.2.) sont stérilisées selon le cycle classique (tableau V.3, p.120). Les phases de chauffage et de refroidissement sont identiques pour tous les cycles. Seul le temps de palier du stérilisateur (Barème) est modifié d'un cycle à l'autre. Les boîtes ainsi traitées sont incubées dix jours à la température optimale de la souche étudiée afin qu'elles se trouvent dans les mêmes

conditions optimales de température que lors des études de thermorésistance en milieu contrôlé de laboratoire.

A l'issu de cette incubation, la stérilité des boites est vérifiée par ensemencement sur milieu gélosé (§ 2.3.2.3.).

Afin de mettre en évidence l'influence du pH d'une manière expérimentale, des *Saladières Western* sont confectionnées à partir d'ingrédients dont le pH est réajusté à 7. De même que pour les boites au pH naturel, ces salades sont inoculées puis stérilisées à différents temps de traitement afin de mettre en évidence le temps nécessaire pour réduire l'inoculum à 0,5 spore survivante par boite.

5.1.2.3. Résultats

Les résultats bruts des analyses bactériologiques (croissance ou non croissance) après incubation montrent que le passage de la stérilité à la non stérilité n'est pas franc, et s'étale souvent sur plusieurs minutes. Pour déterminer un temps unique, nous avons recours à la régression logistique. La réponse est donnée sous forme binomiale (croissance = 1 ; non croissance = 0). La fonction permet de déterminer le temps statistique où la réponse est 0,5, c'est-à-dire le temps théorique auquel 50% des boites sont stériles. La fonction logistique se linéarise de la façon suivante (Falissard, 1998) :

$$\ln \frac{p}{1-p} = at + b \quad \text{Equation V.6}$$

Où t est le temps de chauffage
p est la probabilité d'un résultat positif au temps t
a et b sont deux paramètres estimés

Par développement mathématique, une fonction décrivant la probabilité p en fonction du temps est obtenue :

$$p = \frac{1}{1 + e^{-(at+b)}} \quad \text{Equation V.7}$$

Les paramètres a et b sont estimés par minimisation de la somme des carrés des écarts par la fonction lsqcurvefit sous Matlab.

En exemple, la détermination par régression logistique du temps auquel 50% des boîtes sont stériles, est représenté figure V.6 pour la souche de *Bacillus stearothermophilus* A36 sur la *Saladière Western*.

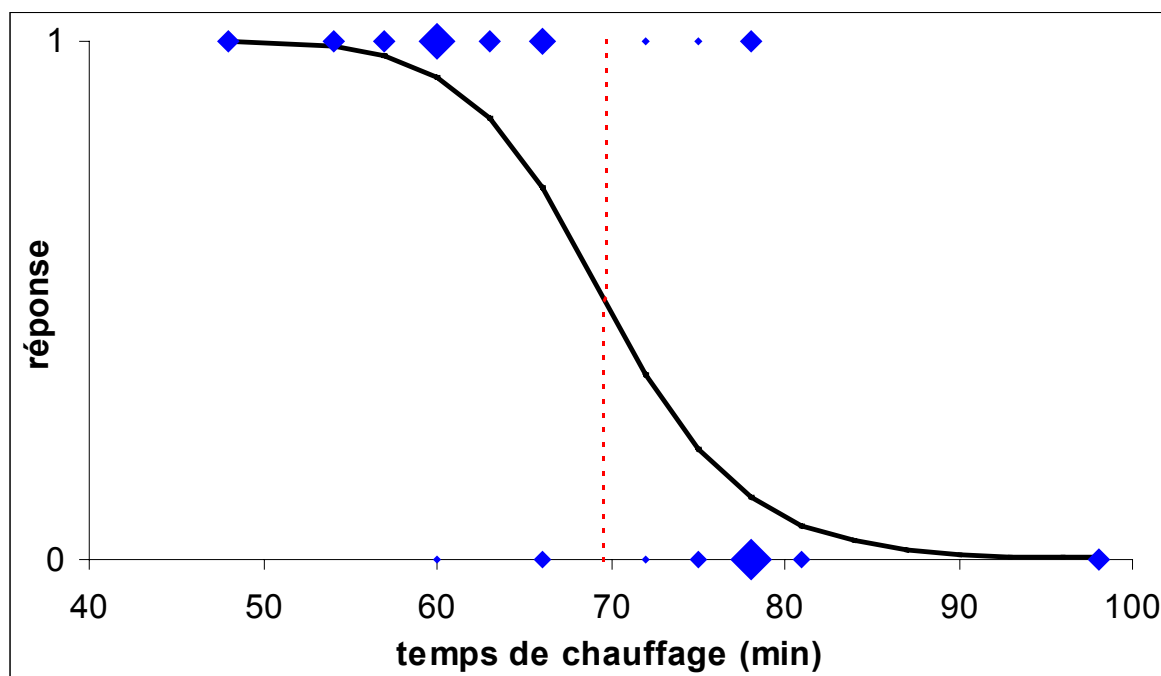


Figure V.6 : Détermination par régression logistique du temps de chauffage permettant d'atteindre une probabilité de 50% de boîtes stériles. Résultats obtenus sur *Bacillus stearothermophilus* A36. La taille du point est proportionnelle au nombre de boîtes exprimant la réponse :

- ◆ 6 boîtes
- ◆ 3 boîtes
- ◆ 1 boîtes

Le temps auquel la probabilité de stérilité est égale à 0,5 est donnée par :

$$t = -\frac{b}{a}$$

5.1.2.3.1. Saladière Western

Les barèmes déterminés par le calculs et par l'expérience sont regroupés dans les tableaux V.5 pour les *Saladières* confectionnée au pH naturel, et V.6 pour celles confectionnées à pH neutre. La représentation de la figure V.7 illustre ces résultats.

Tableau V.5 : *Saladières* confectionnées au pH naturel. Les valeurs des barèmes calculés et observés sont indiquées.

Souche	Barème en min	
	Estimé	Observé
<i>B. stearothermophilus</i> ATCC 12980	32,5	36,2
<i>B. stearothermophilus</i> A36	27,5	43,6
<i>B. coagulans</i> ATCC 7050	16,5	15,9
<i>C. sporogenes</i> A27	14,0	12,9
<i>C. sporogenes</i> Pasteur 79.3	14,0	13,8
<i>Alicyclobacillus</i> ATCC 49025	16,0	10,0

Tableau V.6: *Saladières* confectionnées à partir d'ingrédients dont le pH est ajusté à 7. Les valeurs des barèmes calculés et observés sont indiquées. Le barème observé pour la souche de *Bacillus stearothermophilus* ATCC 12980 n'a pas été déterminé car toutes les boîtes sont restées positives jusqu'à 84 min, temps le plus long réalisé.

Souche	Barème en min	
	Estimé	Observé
<i>B. stearothermophilus</i> ATCC 12980	69,5	> 84
<i>B. stearothermophilus</i> A36	49,0	77,8
<i>B. coagulans</i> ATCC 7050	18,0	22,3
<i>C. sporogenes</i> A27	16,5	19,0
<i>C. sporogenes</i> Pasteur 79.3	17,5	19,3

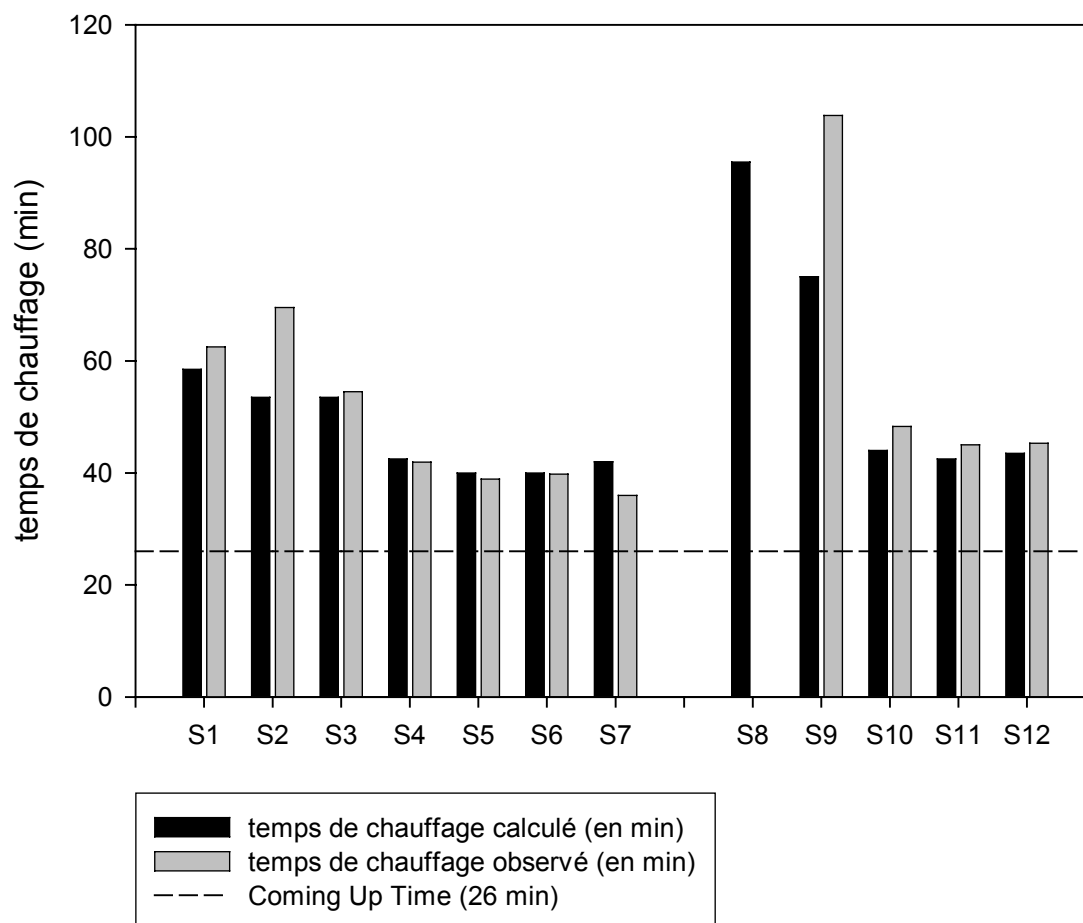


Figure V.7 : Comparaison graphique de l'ensemble des temps de stérilisation calculés et observés

Légende

S1 à S7 : Validation sur boîtes à pH naturel

S8 à S12 : Validation sur boîtes à pH neutre

S3 : Boîtes réalisées avec une sauce dépourvue d'huile

S1 : <i>Bacillus stearothermophilus</i> ATCC 12980	pH naturel	Sans huile
S2 : <i>Bacillus stearothermophilus</i> A36	pH naturel	
S3 : <i>Bacillus stearothermophilus</i> A36	pH naturel	
S4 : <i>Bacillus coagulans</i> ATCC 7050	pH naturel	
S5 : <i>Clostridium sporogenes</i> A27	pH naturel	
S6 : <i>Clostridium sporogenes</i> Pasteur 79.3	pH naturel	
S7 : <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> ATCC 49025	pH naturel	
S8 : <i>Bacillus stearothermophilus</i> ATCC 12980	pH neutre	
S9 : <i>Bacillus stearothermophilus</i> A36	pH neutre	
S10 : <i>Bacillus coagulans</i> ATCC 7050	pH neutre	
S11 : <i>Clostridium sporogenes</i> A27	pH neutre	
S12 : <i>Clostridium sporogenes</i> Pasteur 79.3	pH neutre	

5.1.2.3.2. Saladière Mexicana

Pour cette seconde *Saladière*, les estimations de barèmes n'ont été effectuées qu'au pH naturel. Les résultats sont présentés dans le tableau V.7 et illustrés figure V.8.

Tableau V.7 : *Saladières* réalisées au pH naturel. Les valeurs des barèmes calculés et observés sont indiquées.

Souche	Barème en min	
	Estimé	Observé
<i>B. stearotherophilus</i> ATCC 12980	18	49,6
<i>B. stearotherophilus</i> A36	12	18,3
<i>Alicyclobacillus</i> ATCC 49025	14	13,7

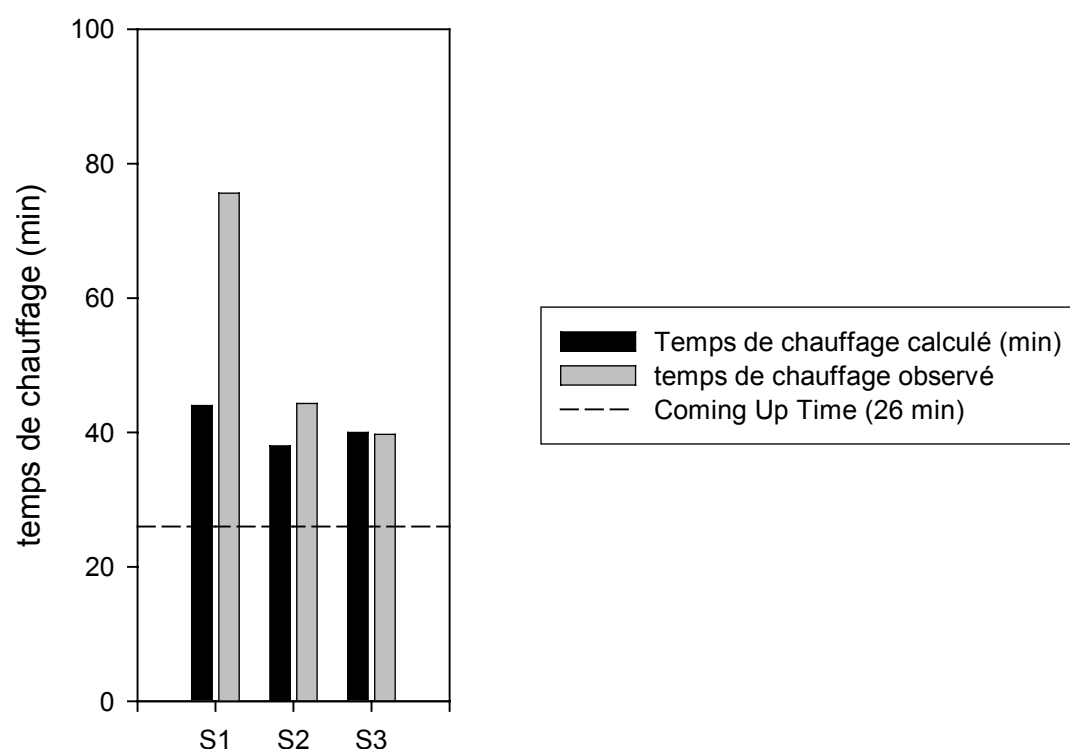


Figure V.8 : Comparaison graphique des barèmes des temps de stérilisation calculés et observés

Légende

S1 : *Bacillus stearotherophilus* ATCC 12980 pH naturel
 S2 : *Bacillus stearotherophilus* A36 pH naturel
 S3 : *Alicyclobacillus acidoterrestris* ATCC 49025 pH naturel

5.1.3. Détermination des barèmes pour les 2 *Saladières*

On peut classer les calculs de traitements thermiques en deux catégories :

- les calculs standards, au domaine d'application très large, dont le principal défaut est de conduire à des barèmes trop sévères.
- les calculs personnalisés, adaptés à un produit et à une cible bactérienne.

5.1.3.1. Les calculs standards

Ces calculs sont fondés sur un système de références standards (température de référence T^* de 121,1°C, 12 réductions décimales) visant à détruire une souche de *Clostridium botulinum* « idéale » aux caractéristiques de thermorésistance standards (courbe de survie linéaire, valeur de z_T de 10°C). La durée de réduction décimale standard généralement adoptée pour ces calculs avoisine 0,2 min. On en déduit alors une valeur stérilisatrice minimale à atteindre, assurant un niveau de sécurité, indépendamment de la contamination présente avant stérilisation :

$$F = n.D_{121,1} = 12 \times 0,2 = 2,4 \text{ min}$$

Ces calculs préconisent donc une valeur stérilisatrice minimale de 2,4 min indépendamment de la nature du produit et de sa contamination. Il est ensuite possible d'en déduire le barème en se référant aux suivis de température du produit tel que :

$$F = \int_{t_0}^{t_f} L_T . dt = \int_{t_0}^{t_f} 10^{\frac{T-T^*}{z_T}} . dt$$

Ces calculs sont aujourd'hui les plus utilisés, et leur efficacité a été maintes fois vérifiée. Cependant, ils conduisent généralement à des barèmes draconiens. Le fait qu'aucun autre facteur que la température ne soit aujourd'hui intégré dans ces calculs standards accentue la sévérité des traitements en milieux acides ou dont l' a_w est réduite.

Comme la valeur de z_T a conventionnellement été fixée à 10°C, pourquoi les valeurs de z_{pH} et z'_{pH} ne seraient-elles pas à leur tour standardisées ? Certaines études portant sur l'effet du pH de traitement chez *Clostridium botulinum* pourraient permettre de fixer la valeur de z_{pH} , souvent de l'ordre de 3,5 (tableau V.8)

Tableau V.8 : Valeur de z_{pH} estimées par Mafart et Leguérinel (1998) à partir de données expérimentales de Xezones et Hutchings (1965) collectées sur *Clostridium botulinum*.

Température (°C)	Spaghetti	Macaroni	Riz
110	3,48	3,43	3,44
112,8	3,52	3,45	3,46
115,6	3,74	3,61	3,56
118,3	3,72	3,70	3,62

La bibliographie concernant l'effet du pH de recouvrement chez *Clostridium botulinum* est inexistante. Aujourd'hui, les travaux disponibles ne permettent pas déterminer la valeur de z'_{pH} de cette espèce bactérienne.

5.1.3.2. Les calculs personnalisés

Ces calculs sont basés sur la destruction d'une (ou plusieurs) cible bactérienne dépendant du contexte de fabrication étudié. Ils sont mieux adaptés, mais demandent un certain nombre de renseignements parfois difficiles à collecter.

✪ *Choix des souches cibles*

Dans l'industrie de la conserve, deux souches cibles sont généralement prise en compte :

- Une souche non pathogène (*Bacillus stearothermophilus*) très thermorésistante, mais ne présentant aucun risque pour la santé publique. Un nombre de réduction décimale relativement faible peut alors être adopté, choisi par l'industriel en fonction du taux de contamination de la matière première.
- Une souche pathogène (*Clostridium botulinum*) moins thermorésistante que la précédente mais dont la toxine justifie un nombre élevé de réductions décimales.

➤ *Bacillus stearothermophilus*

Dans ce manuscrit, seulement deux souches de *Bacillus stearothermophilus* ont été étudiées. Ces souches présentent des valeurs de D^* de 0,49 et 1,01 min. Or dans la littérature, l'ordre de grandeur généralement attribué est de 3 min à 121,1°C et pH 7 (Feeherry *et al.*, 1986 ; Fernandez *et al.*, 1994 ; Lopez *et al.*, 1996, 1997). Par conséquent, nous adoptons une valeur de D^* de 3 min pour estimer le barème de la souche non pathogène.

Pour les valeurs de z_T , z_{pH} et z'_{pH} , notre choix s'oriente vers les paramètres de notre souche de *Bacillus stearothermophilus* A36, qui fait partie des souches les plus résistantes isolées par Saupiquet. Cette souche semble donc convenir pour un calcul personnalisé de traitement thermique.

En accord avec l'entreprise, et compte tenu des taux de contaminations des ingrédients entrant dans la composition des *Saladières*, cinq réductions décimales seront visées.

➤ *Clostridium botulinum*

N'ayant pu étudier cette espèce, nous nous référons intégralement aux sources bibliographiques disponibles pour évaluer sa valeur de D^* . On donne généralement 0,21 min (Mafart, 1996). Mais Casolari (1994) étudie un certain nombre de souches et montre ainsi que le D^* de *Clostridium botulinum* varie de 0,13 à 0,8 selon les publications. Nous opterons pour la valeur la plus défavorable de 0,8 pour l'estimation du barème de la souche pathogène.

Comme pour *B. stearothermophilus*, nous estimerons le barème des *Saladières Western* et *Mexicana* à partir des paramètres z d'une souche unique. Mais notre étude ne nous fournit aucune valeur de paramètre pour *Clostridium botulinum*. Parmi les souches dont nous disposons, *Clostridium sporogenes* s'en rapproche le plus d'un point de vue taxonomique. Par conséquent, à défaut de valeurs propres à *Clostridium botulinum*, nous choisissons d'utiliser des paramètres z de la souche de *Clostridium sporogenes* A27 pour évaluer le barème minimal à appliquer pour réduire une population de *Clostridium botulinum* de 12 réductions décimales ($\times 10^{-12}$).

★ *Tableau de synthèse des valeurs des paramètres des souches cibles*

Le tableau V.9 résume l'ensemble des paramètres de thermorésistance proposés précédemment. Il est ici important de rappeler que les paramètres choisis sont ceux déterminés sur une souche de *C. sporogenes* à défaut de valeurs propre à *C. botulinum*. Le calcul ne sera donc réalisé qu'à titre indicatif.

Tableau V.9: Valeurs des paramètres utilisés pour déterminer le nouveau barème de stérilisation des *Saladières Western* et *Mexicana*. Les non pathogène et pathogène choisis sont respectivement *Bacillus stearothermophilus* et *Clostridium botulinum*.

paramètres	Non pathogène	pathogène
D*	3	0,8
Z _T	8,77	6,17
Z _{pH}	4,08	1,59
Z' _{pH}	1,05	0,95
n	5	12

5.1.3.3. Paramètres propres au process

Quatre paramètres sont permettent de caractériser le cycle de l'autoclave :

★ T₀ : température du produit à l'entrée du stérilisateur. Le cahier des charges impose une température comprise entre 0 et 5°C. La valeur de 0°C (plus défavorable) sera préférée pour les calculs.

★ T_p : température de palier du stérilisateur fixée à 116°C.

★ T_C : température du circuit d'eau de refroidissement du stérilisateur en fin de palier de stérilisation. La température de 25°C est adoptée.

★ CUT : Coming Up Time. Il s'agit du temps entre le début de la phase de chauffage et le début du palier de stérilisation. Ce temps est imposé par le process de stérilisation (tableau V.3, p.120). Le CUT est de 26 min.

5.1.3.4. proposition des barèmes

Pour chacune des deux *Saladières*, trois barèmes sont proposés :

⇒ **Le barème standard B*** : il s'agit d'un barème estimé par la méthode « traditionnelle », c'est-à-dire sans prise en compte du pH. Il n'est basé que sur les paramètres standards de *Clostridium botulinum*, c'est-à-dire une durée de réduction décimale de 0,2 min et une valeur de z_T de 10°C. La valeur de destruction biologique n'est définie que par L_T .

⇒ **Le barème personnalisé B₁**, sans prise en compte du pH. Les valeurs de D^* et z_T sont des valeurs personnalisées indiquées dans le tableau V.9

⇒ **Le barème personnalisé B₂** : ce barème est estimé à partir des valeurs des paramètres de thermorésistance figurant dans le tableau V.9 et des suivis moyens de température et de pH.

⇒ **Le barème personnalisé B₃** : ce barème est estimé à partir des bornes défavorables des intervalles de confiance des suivis de température et de pH (Rappelons que la région de confiance du suivi de pH de la *Mexicana* n'a pas été déterminée en raison d'une trop faible quantité de données expérimentales).

Les estimations de ces barèmes sont indiquées dans le tableau V.10.

Tableau V.10 : temps en minute des quatre barèmes définis ci-dessus pour deux *Saladières*.

Barème	<i>Saladière Western</i>		<i>Saladière Mexicana</i>	
	Non pathogène	Pathogène	Non pathogène	Pathogène
B*	---	39,5	---	39,5
B₁	97,5	110,0	97,5	110,0
B₂	34,0	34,5	19,0	19,0
B₃	44,0	44,6	27,5	27,5

En production industrielle, les *Saladières* sont aujourd'hui soumises à un barème de 72 min. D'après les résultats du tableau V.10, on s'aperçoit que ce barème est très sévère. D'une part, le barème standard souvent qualifié de très sécuritaire, et d'autre part les barèmes personnalisés B₂ et B₃ prenant en compte le pH sont largement couverts puisqu'ils ne dépassent pas 45 min.

5.1.4. Simulations par la méthode de Monte Carlo

Le calcul d'un barème de stérilisation nécessite l'emploi de plusieurs paramètres préalablement estimés par l'expérience. Il y a les paramètres relatifs aux cinétiques de température (paramètres du modèle de Ball), ceux relatifs aux cinétiques de pH au cours de la stérilisation, auxquels s'ajoutent les paramètres de thermorésistance d'une souche bactérienne choisie en référence (D^* , z_T , z_{pH} et z'_{pH}).

Pour chaque paramètre, une valeur moyenne est estimée, ainsi qu'un intervalle de confiance à 95%.

Or, il est bien évident que le calcul du barème, lorsqu'il intègre les valeurs moyennes de chacun des paramètres d'entrée, ne conduit qu'à une valeur moyenne du barème de stérilisation recherché sans aucune indication concernant l'intervalle de confiance.

5.1.4.1. Principe de la méthode de Monte Carlo

Il s'agit d'une méthode de simulation numérique, c'est-à-dire une méthode utilisant des tirages aléatoires des paramètres selon leur loi de distribution. Le traitement informatique permet de réitérer le calcul un grand nombre de fois et d'estimer la répartition statistique de la réponse.

Dans notre cas, cette méthode permet de déterminer la répartition du taux de réduction décimale obtenue pour un barème de stérilisation donné, et d'apprécier le risque qui en découle.

Calcul du taux de réduction décimal

Par définition :

$$F = n.D^* = F' \cdot \lambda_{pH} \cdot \lambda_{pH'} \quad \text{Equation V.8}$$

Par conséquent :

$$n = \frac{F' \cdot \lambda_{pH} \cdot \lambda_{pH'}}{D^*} \quad \text{Equation V.9}$$

Où F' est la valeur stérilisatrice corrigée par les fonction λ_{pH} et $\lambda_{pH'}$ qui sont respectivement les valeurs de destruction biologiques relative au pH de traitement et au pH de recouvrement. Les paramètres n et D^* sont respectivement le taux de

réduction décimal et la durée de réduction décimale dans les conditions standards de température et de pH.

Les paramètres intervenant dans l'équation V.9 sont au nombre de quinze :

- les paramètres de thermorésistance D^* , z_T , z_{pH} et z'_{pH} estimée sur la souche bactérienne choisie en référence pour le calcul
- les paramètres du suivi de température issus du modèle de Ball (f_h , j_h , f_c , j_c , T_0 , T_C , T_p et CUT)
- les paramètres de cinétique de pH au cours de la stérilisation (Suivi linéaire défini par deux paramètres a et b dans le cas de la *Saladière Western*)
- Le barème B pour lequel on souhaite connaître la répartition du taux de réduction décimale

5.1.4.2. Estimation de la valeur des paramètres et de leur loi de répartition

La valeur et la répartition de chaque paramètres sont déterminées par l'expérience. Toutefois, toutes ne sont pas estimées suivant la même méthode. Nous pouvons alors les classer selon quatre groupes.

⇒ Groupe ❶ : Les paramètres estimés du modèle de Ball (f_h , j_h , f_c et j_c)

Un seul suivi de température permet théoriquement d'estimer la valeur de chacun de ces quatre paramètres. Cependant, plusieurs mesures doivent être réalisées pour estimer un intervalle de confiance. Le tableau V.1. p.117, regroupe l'ensemble des valeurs des paramètres estimées sur la *Saladière Western*.

La normalité est vérifiée pour chaque échantillon de valeurs par le test de Shapiro-Wilk. Le tableau V.11 indique les coefficients de corrélation entre chacun des paramètres. Ces résultats montrent que nous ne pouvons pas conclure à l'indépendance des paramètres.

Tableau V.11 : Coefficient de corrélation entre chaque paramètre

	f_h	j_h corr	f_c
j_h corr	0,629		
f_c	0,417	-0,032	
j_c	0,279	0,015	0,115

Par conséquent, le tirage aléatoire des paramètres va s'inspirer de l'ACP (Analyse en Composantes Principales). La méthode consiste à reproduire une matrice aléatoire de chaque paramètre selon une loi normale ($N_{\mu,\sigma}$) en conservant la même structure de corrélation que le jeu de données initial (Matériel et méthodes, p. 49 § 2.2.3.)

⇒ **Groupe ② : Les paramètres du suivi de pH de recouvrement en fonction du barème**

Le pH de recouvrement évolue de façon linéaire en fonction du barème, de pente a et d'ordonnée à l'origine b . On suppose que la répartition des valeurs de pH de part et d'autre de cette droite suit une loi normale.

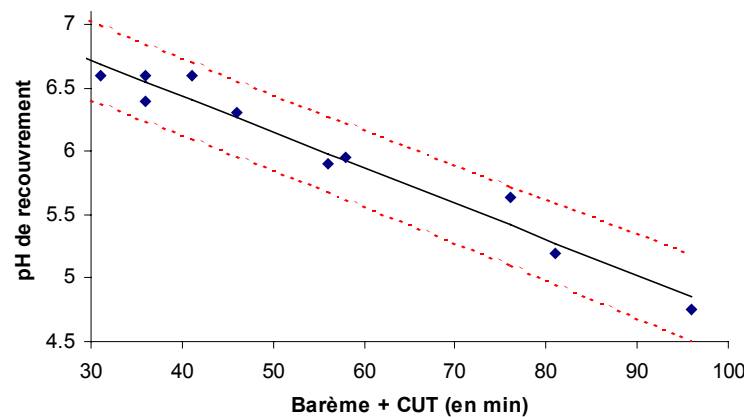


Figure V.9 : Evolution du pH de recouvrement en fonction du temps de stérilisation
 $a = -0,028$ (pente) ; $b = 7,56$ (ordonnée à l'origine)

Par conséquent, pour un barème B donné, l'espérance μ est définie par l'équation de droite :

$$pH = a.B + b \quad \text{Equation V.10}$$

L'écart type sigma varie également en fonction du barème et est calculé par :

$$\sigma_x = S_{resid} \sqrt{1 + \frac{1}{n} + \frac{(x_0 - \bar{x})^2}{\sum_{i=1}^k (x_i - \bar{x})^2}} \quad \text{Equation V.11}$$

Où S_{resid} est la racine carrée de la variance résiduelle de la régression linéaire
 n est le nombre de mesures expérimentales
 x est le temps de stérilisation

⇒ **Groupe ③ : Les paramètres de thermorésistance (D^* , z_T , z_{pH} et z'_{pH})**

Il s'agit des paramètres du modèle global prenant en compte les effets de la température et du pH sur la thermorésistance. Le modèle est ajusté par minimisation de

la somme des carrés des écarts. Les intervalles de confiance sont estimés par la méthode de Lobry *et al.* (1991). Cette méthode permet de définir dans l'espace des paramètres la région de confiance des paramètres du modèle par tirage aléatoire de 50000 points. Ces points, par projection sur les plans de chaque couple de paramètre, renseignent sur la corrélation structurelle du modèle (figure V.10). Les projections de formes arrondies témoignent de l'indépendance entre les paramètres. Le tirage des 50000 points permet également de déterminer la répartition sur l'axe d'un paramètre (figure V.11).

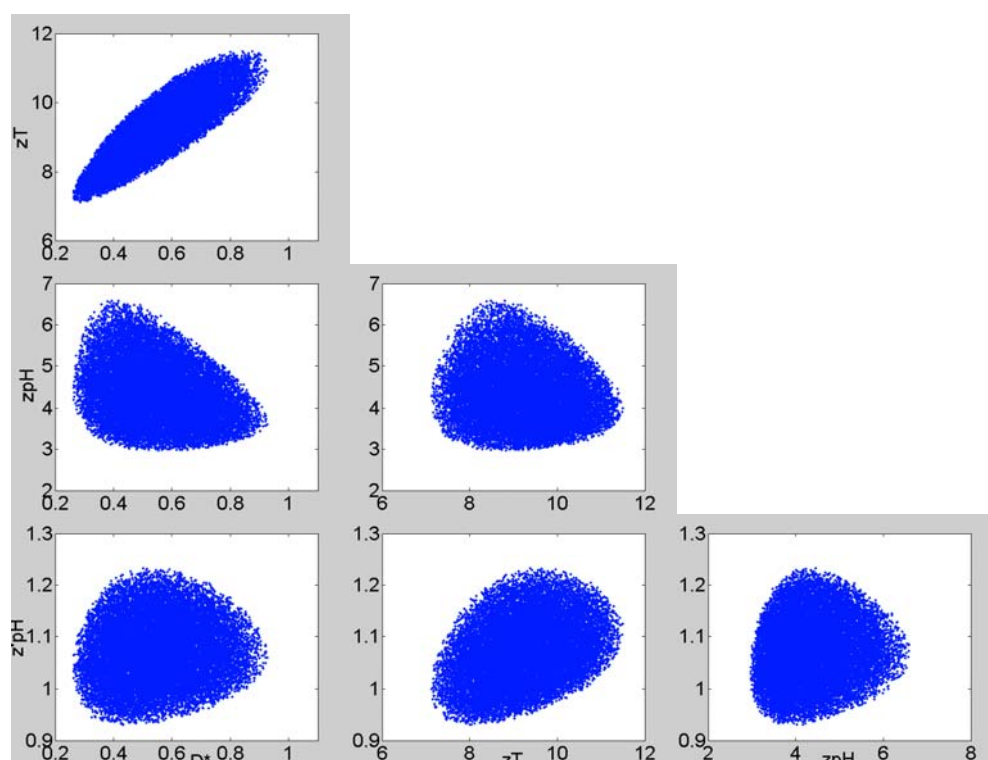


Figure V.10 : projection des régions de confiance du modèle global ajusté sur la souche de *Bacillus stearothermophilus* industrielle

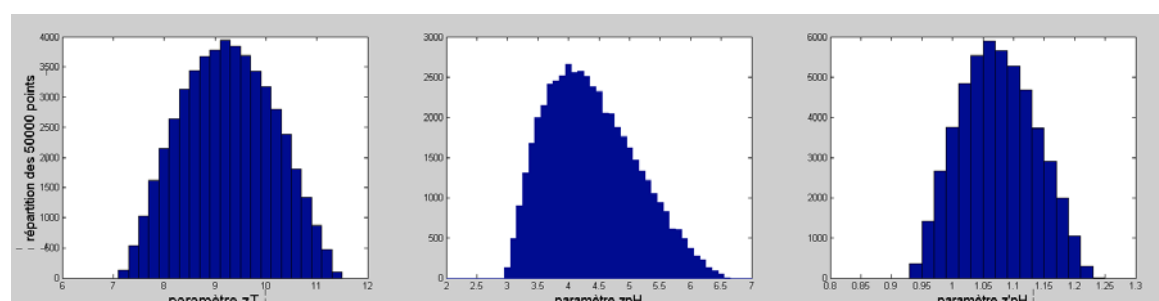


Figure V.11 : densité de répartition des paramètres z du modèle global.

La figure V.11 permet d'estimer visuellement la normalité de la répartition de la valeur du paramètre dans son intervalle de confiance. Le test de Kolmogorov-Smirnov permet de confirmer de façon statistique cette normalité au niveau de confiance 95%.

Les formes arrondies des projections de confiance témoignent d'une absence de corrélation entre les paramètres (indépendance). Seule la corrélation entre D^* et z_T est observée. Mais cette corrélation reste sans conséquence, car le paramètre D^* est fixé à 3 min.

⇒ Groupe ❶ : *Les paramètres divers : T_0 , T_C , T_P , CUT*

Certains paramètres sont fixés par le cahier des charges. La température de palier est maintenue à 116°C et le CUT est imposé à 26 minutes.

Les paramètres T_0 et T_C ne sont pas contrôlés. Le cahier des charges impose une température initiale T_0 comprise entre 0 et 5°C, tandis que la température de l'eau de refroidissement du pilote n'est pas contrôlée. Par conséquent, nous choisissons de tirer aléatoirement les valeurs de T_0 et T_C selon deux lois uniformes dont les bornes sont respectivement comprises entre 0 et 5°C, et 20 et 30°C.

5.1.4.3. Programmation informatique du calcul

Les simulations de Monte Carlo reposent sur la répétition d'un même calcul mettant en jeu des valeurs de paramètres tirées aléatoirement selon leurs lois. Plus le nombre de répétition est important, et plus le résultats est fiable. Nous choisissons de réaliser ainsi 100 000 fois le calcul du taux de réduction décimale afin d'obtenir une répartition précise.

La première étape consiste à tirer aléatoirement 100 000 valeurs de chaque paramètres selon leur distribution. Le tirage est réalisé par Matlab (fonction random). On obtient alors une matrice de p paramètres (colonnes) sur 100 000 valeurs (lignes).

La seconde étape correspond au calcul de la valeur du taux de réduction n pour chaque ligne de la matrice selon l'équation V.9. Les 100 000 valeurs de n sont alors présentées sous la forme d'un histogramme.

5.1.4.4. Résultats

La méthode de calcul présentée paragraphe 5.1.3. conduit à l'estimation de deux barème personnalisés B_2 et B_3 .

Ces deux barèmes ne prennent pas en compte la répartition des paramètres, et ne renseignent nullement sur la répartition du taux de réduction décimale. Les simulations par la méthode de Monte Carlo permettent d'estimer cette répartition.

Les résultats de la simulation effectuée pour ces deux barèmes est présentée figure V.12

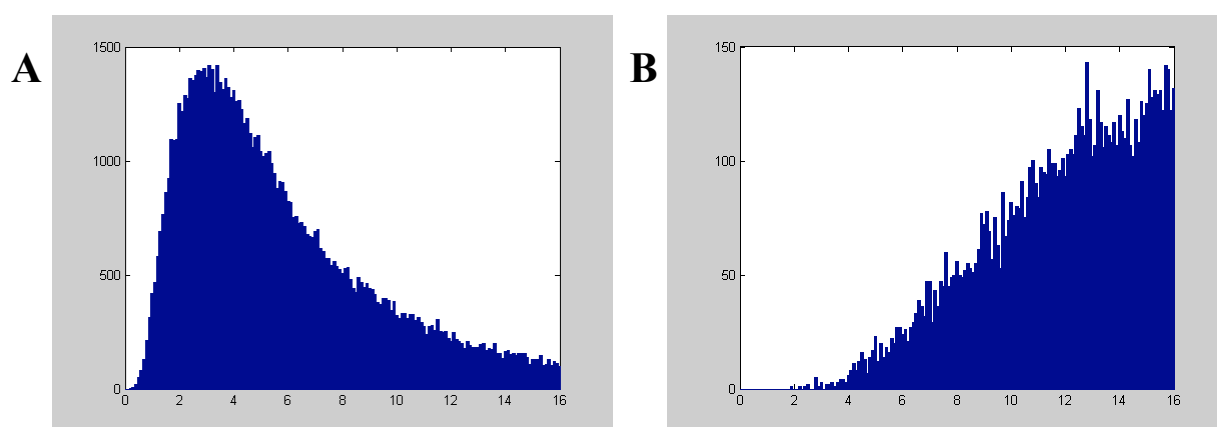


Figure V.12 : répartition du taux de réduction décimale pour un barème B2 de 34 min (à gauche) et un barème B3 de 44 minutes (à gauche). Simulations effectuées sur la *Saladière Western*, souche non pathogène, pour 100 000 tirages.

Le barème B_2 , calculé à partir des valeurs moyennes des paramètres, visait cinq réductions décimales. On s'aperçoit sur le profil A de la figure V.13, que ces cinq réductions décimales ne sont qu'une moyenne. En effet, l'intégration de la distribution indique que près de la moitié de la surface (48%) se trouve à des valeurs inférieures à 5 réductions décimales. Ces résultats indiquent également qu'un tel barème ne peut être satisfaisant, car près de 1 % des tirages conduisent à un n inférieur à une réduction décimale.

Le barème B_3 présente un profil plus raisonnable, car seulement 0,16 % de la surface reste inférieure aux cinq réductions décimales recherchées.

A partir de ces données, une proposition d'un nouveau barème peut être effectuée. Selon la méthode de calcul du barème B_2 , le nombre de réduction décimale demandé n'est atteint que dans 50% des cas, ce qui paraît insuffisant. Nous proposons que ce taux de réduction décimal doit être atteint dans 95% des cas. Le nouveau barème

satisfaisant cet objectif est de 39,5 min (figure V.13). Les surfaces cumulées sont présentées dans le tableau V.12.

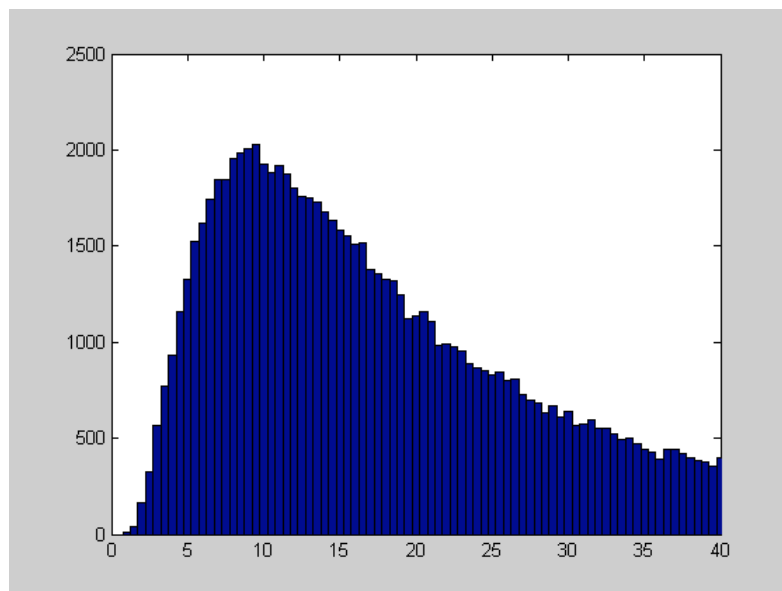


Figure V.13 : distribution du taux de réduction décimale pour un barème de 39,5 min. Simulations effectuées sur la *Saladière Western*, souche non pathogène, pour 100 000 tirages.

Tableau V.12 : valeur de l'intégration de la distribution de la figure V.13

Inférieur à	Surface (%)
1 n	0,00
2 n	0,12
3 n	0,78
4 n	2,31
5 n	4,60
7 n	11,07
10 n	22,79

5.2. Discussion

5.2.1. Caractérisation du produit

Localisation du point critique

Des suivis de température et de pH à différents niveaux de la boîte permettent aisément de localiser d'une part le point froid, et d'autre part la zone où le pH est le moins acide. Ces deux points sont couramment qualifiés de critiques, car ils représentent les zones où les chances de survies des micro-organismes sont statistiquement les plus fortes.

De ces deux points critiques, il n'est *a priori* pas possible de distinguer lequel des deux est le plus défavorable, car cela ne dépend plus seulement des caractéristiques physico-chimiques du produit (température et pH), mais également de la thermorésistance de la souche cible que l'on choisira en référence pour l'estimation des barèmes. Par exemple, une souche dont la thermorésistance est fortement influencée par le pH (z_{pH} et z'_{pH} faible) sera plus résistante au niveau du point critique propre au pH, et inversement si la souche est sensible à la température.

Par conséquent, les deux points critiques doivent être étudiés en parallèle jusqu'à la détermination finale du barème au niveau de chacun. Les suivis de pH et de température doivent alors être réalisés aux deux endroits.

Le cas des *Saladières* est particulier dans le sens où un point unique est à la fois critique vis à vis de la température et du pH.

Suivi du pH au cours du traitement

Le suivi du pH au cours de la stérilisation ne peut être effectué en temps réel, comme l'est celui de la température, par un système de sondes embarquées. Les mesures ne sont effectuées qu'après un temps de refroidissement du stérilisateur pendant lequel le pH continu probablement d'évoluer.

La cinétique $pH = f(\text{barème})$ qui en résulte ne correspond donc pas au suivi du pH de traitement au cours de la stérilisation, mais au suivi du pH de recouvrement.

Les seules mesures disponibles sur le pH de traitement sont la valeur initiale (avant stérilisation) et la valeur finale (après stérilisation). Ne connaissant pas son évolution entre ces deux mesures, nous choisirons pour les calculs la valeur la plus défavorable des deux, qui dans le cas de la *Saladière*, est la valeur initiale.

Le pH de recouvrement

En fin de stérilisation, le pH de la boîte n'est pas encore homogène. L'équilibre global ne sera atteint qu'au bout de quelques semaines à cause d'un fort effet tampon des protéines du thon (figure V.13). Ces variations post-traitement sont trop lentes pour être prises en compte dans l'estimation du pH de recouvrement. En effet, les éventuels survivants aux traitements thermiques auront le temps de se développer avant que le pH ait atteint son équilibre final. Par conséquent, le pH de recouvrement utilisé pour les calculs est le pH mesuré en fin de stérilisation.

5.2.2. Validation et optimisation des barèmes

Les valeurs observées restent globalement proches des valeurs prédites. Nous notons cependant que les écarts constatés sont dans la majorité des cas orientés dans le même sens : les valeurs prédites sont sensiblement inférieures aux valeurs observées.

Interprétation des écarts entre barèmes prédits et barèmes observés

Il est souvent admis que les principaux facteurs influençant la thermostabilité microbienne, hormis la température, sont le pH et l'activité de l'eau. Viennent ensuite une multitude de facteurs dont les effets peuvent être plus ou moins marqués selon l'espèce ou la souche de micro-organisme. Parmi ces facteurs sont souvent cités l'huile (Ababouch *et al.*, 1987 et 1995), la nature de l'acide (Leguérinel et Mafart, 2001), l'amidon (Olsen et Scott, 1946). On ne s'étonne donc pas de voir ces différences entre les barèmes prédits et observés sur des produits tels que les *Saladières Western et Mexicana*.

Une récente étude menée dans le cadre d'un contrat ACTIA (non publiée) met en évidence ces effets de la matrice. La durée de réduction décimale de *Bacillus cereus* inoculé dans diverses confitures s'avère deux fois supérieure à celle prévue par les modèles dont les paramètres avaient été estimés en milieu liquide. Dans le cas des compotes, ce rapport atteint presque quatre. En revanche, les prévisions de durée de réduction décimales restent proches des valeurs observées pour des produits plus acides tels que le ketchup, le coulis de tomate ou la sauce hollandaise. Les modèles font donc preuve d'une bonne valeur prédictive, à une constante multiplicative près qui semble caractéristique de la famille de produits. En d'autres termes, l'effet de la matrice jouerait plutôt sur la valeur du D^* , sans influencer les valeurs de z .

En toute rigueur, nous devrions alors noter :

$$D_{\text{observé}} = D_{\text{estimé}} - \Delta \quad \text{Equation V.12}$$

Cette valeur de Δ doit être un résidu faible et aléatoire si seuls les facteurs température et pH interviennent sur la thermorésistance. Dans le cas d'un produit complexe tel que la *Saladière*, beaucoup d'autres facteurs que l'on peut qualifier de secondaires de par leur influence démontrée plus faible que le pH ou la température, vont également intervenir. Le modèle global peut alors être corrigé en :

$$\log D = \log D^* - \underbrace{\frac{T - T^*}{z_T}}_{\text{effet température}} - \underbrace{\frac{pH^* - pH}{z_{pH}}}_{\text{effet pH traitement}} - \underbrace{\left(\frac{pH' - pH^*}{z'_{pH}} \right)^2}_{\text{effet pH recouvrement}} - \Delta \quad \text{Equation V.13}$$

Pour appuyer ces remarques, des *Saladières Western* ont été confectionnées avec un sauce sans huile. Nous avons ainsi montré pour la souche de *Bacillus stearothermophilus* A36, que la présence d'huile dans la sauce va augmenter la thermorésistance des spores. Le temps observé pour atteindre la stérilité est inférieur lorsque la sauce utilisée est dépourvue des 18% d'huile composant la recette normale (tableau V.13). La valeur du barème observée se rapproche alors considérablement de la valeur prédite.

Tableau V.13 : Barèmes estimés et observés sur la souche de *Bacillus stearothermophilus* A36, en présence et en absence d'huile.

Souche	Barème en min		
	Estimé	Observé avec huile	Observé sans huile
<i>B. stearothermophilus</i> A36	27,5	43,6	28,5

En dépit des effets de tous ces facteurs non contrôlés ou non pris en compte créant un bruit de fond, le signal que constitue le pH émerge de façon significative. Les rapports de barèmes et de valeurs stérilisatrices présentés dans les tableaux V.14 et V.15 entre les *Saladières* effectuées au pH naturel (acide) et celles effectuées à un pH neutre, mettent en évidence l'effet marquant du pH. Pour les souches les plus thermo-résistantes (*Bacillus stearothermophilus*), le barème est divisé par deux par le seul effet du pH. En terme de valeur stérilisatrice, le rapport atteint la valeur de six.

De plus, le fait que les rapports soient plus importants sur les valeurs observées que sur celles estimées montre que le modèle ne demande pas de réduction

draconienne des valeurs stérilisatrices, mais modérée par rapport à celles suggérées par les résultats expérimentaux. Autrement dit, la réduction de valeur stérilisatrice calculée est largement validée par l'expérience directe.

Tableau V.14 : rapport entre les barèmes pH naturel / pH neutre. *Saladière Western*.

souches	estimés	observés
<i>B. stearothermophilus</i> ATCC 12980	0,46	< 0,43
<i>B. stearothermophilus</i> A36	0,56	0,56
<i>B. coagulans</i>	0,92	0,71
<i>C. sporogenes</i> A27	0,85	0,68
<i>C. sporogenes</i> Pasteur 79.3	0,8	0,72

Tableau V.15 : rapport entre les valeurs stérilisatrices F pH naturel / F pH neutre. *Saladière Western*.

souches	estimés	observés
<i>B. stearothermophilus</i> ATCC 12980	0,15	< 0,14
<i>B. stearothermophilus</i> A36	0,18	0,28
<i>B. coagulans</i>	0,75	0,29
<i>C. sporogenes</i> A27	0,53	0,20
<i>C. sporogenes</i> Pasteur 79.3	0,44	0,28

Optimisation des barèmes des Saladières Western et Mexicana

L'effet considérable du pH se retrouve au niveau des quatre barèmes présentés dans le tableau V.10. L'écart entre d'une part le barème B₁ ne prenant en compte que le facteur température, et d'autre part les barèmes B₂ et B₃ intégrant le facteur pH, confirme le rôle primordial de ce dernier dans l'estimation d'un barème.

Le barème B₁ diffère du barème standard B* par le niveau de sécurité, ce qui explique la différence observée alors que tous les deux ne sont basés que sur le facteur température. En effet, la valeur de D* « choisie » pour la souche pathogène personnalisée est de 0,8 min, nettement supérieure au 0,2 min que l'on rencontre en standard, et un z_T très faible. Ces barèmes personnalisés se placent donc dans des conditions particulièrement défavorables du point de vue des paramètres de thermo-résistance, présentant alors un niveau de sécurité élevé.

En résumé, un nouveau protocole à suivre pour la détermination des barèmes en prenant en compte les facteurs température et pH peut être proposé (p. 140).

PROTOCOLE POUR LA DETERMINATION DU BAREME D'UN NOUVEAU PRODUIT

A. Caractérisation du produit

A.a. Recherche des points critiques en température (point froid) et en pH (point le moins acide). Une même zone de la boîte peut constituer le point critique pour les deux facteurs (cas des *Saladières*).

A.b. Suivi des facteurs température et pH aux points critiques

A.c. Estimation des paramètres cinétiques

⇒ paramètres du modèle de Ball pour le suivi de température (f_h, j_h, f_c, j_c)

⇒ modélisation linéaire ou polynomiale du suivi de pH

B. Souches utilisées en référence pour la simulation

B.a. Choix des souches

Les souches sont choisies selon le contexte du produit à traiter (nature des contaminations des ingrédients). Ces souches peuvent être choisies avec l'aide de la littérature. Il peut également s'agir de souches isolées par l'entreprise, remarquées par une thermorésistance ayant provoqué des accidents de stérilisation.

Généralement en conserverie, la simulation est effectuée à partir de deux souches prises en référence. Ce choix peut varier en fonction du type d'aliment considéré :

⇒ Une souche non pathogène (*B. stearothermophilus*) sur laquelle le nombre de réductions décimales effectué reste faible.

⇒ Une souche pathogène (*C. botulinum*) pour laquelle on recommande conventionnellement 12 réductions décimales.

B.b. Estimation des paramètres de thermorésistance

Les paramètres D^* , z_T , z_{pH} et z'_{pH} sont estimés par l'expérience ou tirés de la littérature.

C. Détermination du barème

C.a. Collecte des paramètres caractéristiques du process (Température de palier du stérilisateur, température initiale du produit, température de l'eau de refroidissement, CUT)

C.b. Calcul du (des) barème(s)

Plusieurs barèmes peuvent être déterminés.

⇒ un barème standard

⇒ un ou plusieurs barèmes personnalisés

Chacun de ces barèmes est déterminé pour chaque point critique et pour chacune des souches de référence. Le plus élevé est bien évidemment retenu.

Simulations et évolutions du process

Les perspectives d'évolution des produits de type *Saladière* passent par une amélioration des qualités organoleptiques du produit, incontestablement altérées par le traitement thermique. Bien que revus à la baisse (tableau V.10), les barèmes de stérilisation peuvent encore être réduits.

Les pistes à travailler pour tendre vers une réduction des temps de chauffage doivent s'orienter vers les cinétiques de température et de pH. Les cinétiques de pH d'un produit tel que la *Saladière Western* restent lentes. Ce produit atteignant un pH proche de 4,5 à l'équilibre voit ce potentiel inexploité, puisque le pH le plus élevé dans la boîte après 72 mn est encore de 5,2.

Ces lents équilibres de pH sont favorisés par une stérilisation en statique. Les stérilisations en autoclaves rotatifs, ou semi rotatifs (pendulaires), s'avèrent intéressantes dans les sens où les équilibres de pH sont incontestablement accélérés par dispersion de la sauce acide dans toutes les zones de la boîte. De plus, on observe une montée en température beaucoup plus rapide.

Pour répondre concrètement à un tel problème, la microbiologie prévisionnelle intervient comme un outil permettant de mesurer rapidement l'impact de ce changement de process, et d'en justifier l'intérêt.

Dans cette optique, des suivis de température et de pH ont été réalisés au cours d'une stérilisation de boîte *Saladière Western* en pendulaire. Les paramètres du suivi de température sont indiqués dans le tableau V.16 :

Tableau V.16 : Valeur des paramètres de Ball estimés sur les suivis de température effectués au cours de cycles de stérilisation en pendulaire (12 répétitions ont été effectuées).

	f_h	j_h corrigé	f_c	j_c
Moyenne	13,18	3,87	34,81	1,25
Ecart type	0,84	0,95	1,88	0,068
Indice Conf 95%	11,54 – 14,83	2,02 – 5,73	31,12 – 38,50	1,12 – 1,38

La diffusion de chaleur vers le point froid de la boîte est largement favorisée. La faible valeur de f_h , bien que compensée en partie par un j_h élevé, traduit le gain d'intérêt sur la cinétique de température.

Quant au suivi de pH, l'ensemble des légumes atteint rapidement le pH de la sauce. La zone où le pH reste le plus élevé devient la galette de thon, pour laquelle le pH varie lentement en raison du fort effet tampon des protéines.

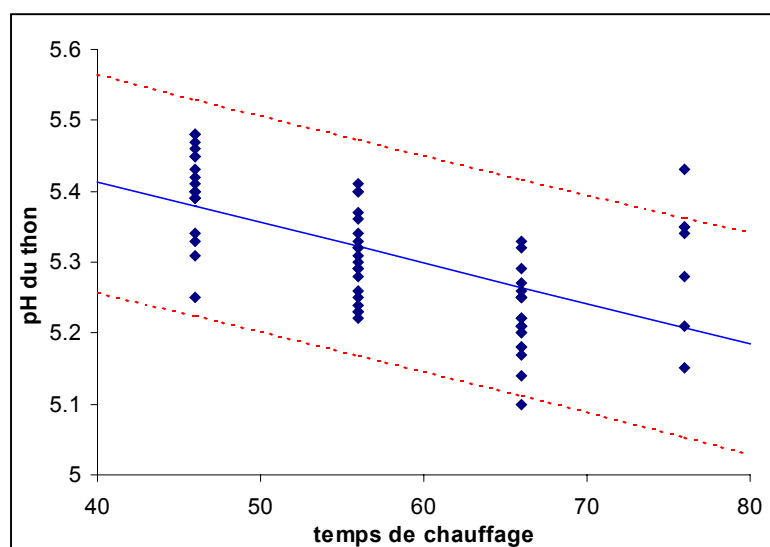


Figure V.14 : Suivi du pH du thon au cours d'une stérilisation en pendulaire. Les régions à 95% de confiance sont indiquées en pointillés.

A partir de l'ensemble de ces données, nous pouvons estimer les quatre barèmes définis précédemment. Les paramètres de thermorésistance sont indiqués (tableau V.9).

La valeur de pH prise en compte au cours du traitement est le pH du thon au début de la stérilisation (pH 6). Les barèmes estimés sont présentés dans le tableau V.17.

Tableau V.17 : temps en minute des trois barèmes définis précédemment pour la *Saladière Western* stérilisée en pendulaire.

	<i>Saladière Western</i>	
	Non pathogène	pathogène
B*	---	22,0
B₁	72,5	82,0
B₂	9,5	9,0
B₃	17,0	16,0

Plusieurs avantages peuvent être tirés de ces modifications de process. Le premier concerne les qualités organoleptiques du produit stérilisé. En stérilisateur statique, les flux de température au sein de la boîte sont lents, créant un gradient de

température important entre le point froid et le bord de la boîte. Ceci engendre une différence de cuisson des ingrédients en fonction de leur localisation dans la boîte, et une surcuisson du pourtour de la boîte, avec une incidence sur le goût, l'aspect, la texture, les couleurs... La stérilisation en autoclave semi rotatif augmente les flux de chaleur, réduisant les différences de température et les inconvénients qu'elles entraînent.

Le second intérêt concerne les équilibres de pH. La sauce va rapidement acidifier l'ensemble du contenu de la boîte. Cette homogénéisation supprime les points locaux au pH élevé où la thermorésistance reste forte.

Le troisième intérêt porte sur le temps de stérilisation. Une réduction du temps d'occupation du stérilisateur diminue le coût de production global.

Enfin, le dernier intérêt concerne la température de palier. Plus cette température est élevée, et plus la vitesse de destruction thermique augmente par rapport à la vitesse de destruction des molécules telles que les colorants, les vitamines (ex : z_T de la vitamine B1 = 25°C, d'après Mafart, 1996). L'inconvénient des températures de palier élevée est le gradient de température plus important au sein de la boîte, accentuant la surcuisson périphérique. Mais compte tenu de la diminution des paramètres f_h et j_h lors d'une stérilisation en semi rotatif, une augmentation de la température de palier de quelques degrés devrait être envisagée.

L'impact sur la thermorésistance de toutes ces modifications de process peuvent, à l'aide des modèles et méthodes de calculs présentés dans ce manuscrit, mesurer et évaluer l'intérêt pour l'entreprise.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

La fin du XX^e siècle aura bouleversé le monde du traitement thermique en général, notamment par les évolutions de la microbiologie prévisionnelle, désormais résolument multifactorielle. Depuis les découvertes de Nicolas Appert, puis les travaux de Ball, en passant par l'époque « Bigelow » où seul le facteur température était considéré lors d'un traitement thermique, les modèles ont évolués vers le multifactoriel dans le domaine de la croissance, mais un retard important a été pris dans le domaine de la destruction.

Dans la première partie de cette étude, les effets du pH du milieu de traitement et du milieu de recouvrement ont été abordés comme deux facteurs indépendants exerçant un effet sur la thermorésistance microbienne. Un nouveau modèle modulaire multifactoriel ajoutant ces deux facteurs à la température a pu être proposé. Caractérisant les effets de trois facteurs environnementaux sur la durée de réduction décimale D, il n'est construit qu'à partir de quatre paramètres, faisant de lui un modèle parcimonieux et robuste.

Dans une seconde partie, ce modèle nous a permis de développer les calculs d'estimations de traitements thermiques à appliquer pour obtenir un taux de destruction microbien prédéfini. Les méthodes de calculs ébauchées par Bigelow, puis par Ball à l'époque où la microbiologie prévisionnelle en était encore à l'ère monofactorielle, ont pu être étendues au multifactoriel par la prise en compte du pH. Ces nouvelles méthodes permettant l'estimation de barèmes ont été validées sur un produit complexe de par sa composition et ses évolutions de pH au cours de la stérilisation.

Les enjeux de la modélisation

Les habitudes alimentaires de ce début de siècle évoluent rapidement, avec un consommateur préférant souvent des produits à durées limites de consommation réduites, au détriment de la conserve. La concurrence des produits frais, mais aussi du surgelé, sur un marché longtemps monopolisé par l'appertisé se fait de plus en plus forte.

Aujourd'hui, l'industrie de la conserve ne peut plus se permettre de « matraquer » ses produits par des traitements thermiques trop sévères, entraînant une dégradation des qualités nutritives et organoleptiques des aliments, et ternissant du même coup son image. Cette industrie doit se tourner vers de nouveaux outils afin de rester compétitive face à la concurrence. Deux pistes peuvent être envisagées :

⇒ La première est représentée par les technologies dites douces, telles que le champs pulsé, les traitements ionisants ou les hautes pressions. Venant en substitution des traitements thermiques, ces procédés éliminent tout ou partie des micro-organismes sans trop altérer le produit alimentaire visé, préservant ainsi son état frais. Malheureusement, les inconvénients de ces procédés sont d'une part un coût de production plus élevé, et d'autre part une réglementation souvent plus contraignante que les traitements thermiques. Par exemple, les traitements ionisants sont limités à des doses inférieures à 10 kGy, trop faible pour éliminer les formes sporulées.

⇒ La seconde piste repose sur la théorie des barrières, visant à combiner plusieurs traitements modérés (ex : traitement thermique associé aux hautes pressions) dont l'action simultanée est plus importante que la somme des effets individuels. Ces théories s'appliquent bien sûr au process, mais également à la formulation du produit (ex : acidification de l'aliment combiné à un traitement thermique). L'avenir de l'appertisation est probablement de jouer sur l'application de cette théorie des barrières, encore faut-il savoir la quantifier.

Le travail de Zwietering réalisé dans le domaine de la croissance, et l'introduction de son concept γ , crée le lien entre la microbiologie prévisionnelle et cette théorie des barrières. La « hauteur » d'une barrière peut être caractérisée par l'inverse de γ au niveau de la croissance, ou par λ au niveau de la destruction. Une analogie évidente existe donc entre ce concept γ et le concept λ présenté dans ce manuscrit.

$$\frac{\mu_{\max}}{\mu} = \frac{1}{\gamma(T)} \times \frac{1}{\gamma(pH)} \times \frac{1}{\gamma(a_w)}$$

$$\frac{D^*}{D} = \lambda_T \times \lambda_{pH} \times \lambda_{a_w}$$

Un regain d'intérêt de l'industrie de la conserve vers la microbiologie prévisionnelle permettrait d'affiner quelque peu les barèmes de stérilisation, de mesurer par simple simulation l'impact d'un changement de process ou d'une acidification du produit sur la thermorésistance bactérienne.

Mais la contradiction apparente entre la simplicité de la théorie (basée sur la prise en compte de quelques facteurs) et la complexité du comportement des spores bactériennes au cours de la destruction appelle cependant à la plus grande vigilance. La multitude de facteurs intervenant sur la vitesse de destruction thermique, et interagissant entre eux, ne peut bien évidemment pas être totalement maîtrisée. Mais une sélection judicieuse des facteurs principaux et leur intégration dans nos modèles conduit peu à peu à des estimations de moins en moins fausses.

Face à cette multitude de facteurs, tout modèle, aussi complexe soit il, sera toujours trop simple. A l'inverse, un modèle trop complexe resterait inutilisable puisque certains facteurs tels que la température ou le pH de sporulation resteront incontrôlables lorsqu'il s'agit de la contamination naturelle d'ingrédients alimentaires. La microbiologie prévisionnelle doit donc sans cesse rechercher l'équilibre entre la simplicité des modèles et la justesse de la prévision.

Perspectives

Comme nous avons pu nous en rendre compte dans ce manuscrit, le modèle ne prédit pas exactement le barème expérimental, et dans chaque cas étudié, une différence est observée entre le barème estimé et le barème réel observé. Cette différence regroupe l'ensemble des effets des facteurs non pris en compte (nature de l'acide, texture, lipides...). Les travaux de modélisation sur l'effet de l'activité de l'eau du milieu de traitement (Gaillard *et al.*, 1998) et sur l'effet de l' a_w de recouvrement (Coroller *et al.*, 2000) permettent d'extrapoler notre modèle global à ces deux facteurs. D'après leurs résultats, nous pouvons étendre notre concept aux valeurs de destruction biologique partielle tel que :

$$\frac{D^*}{D} = \lambda_T \cdot \lambda_{pH} \cdot \lambda_{pH'} \cdot \lambda_{a_w} \cdot \lambda_{a_w'}$$

où

$$\lambda_{a_w} = 10^{\frac{a_w - 1}{z_{a_w}}}$$

pour le facteur a_w de traitement

et

$$\lambda_{a_w'} = 10^{\left(\frac{a_w' - a_{w'opt}}{z_{a_w'}} \right)^2}$$

pour le facteur a_w de recouvrement

Ce nouveau modèle demande cependant des validations sur des produits industriels afin d'étendre les calculs de barème de stérilisation à ces facteurs a_w .

C'est ensuite sur de nouveaux facteurs que la microbiologie prévisionnelle doit orienter ces efforts afin d'affiner progressivement ses prévisions.

Enfin, les méthodes de Bigelow et de Ball ne seront définitivement et totalement étendues au multifactoriel que lorsque les valeurs des paramètres z relatifs aux nouveaux facteurs seront enfin standardisées comme l'a été la valeur de z_T à 10°C. Pour cela, de nombreuses études restent à faire, notamment dans le domaine du recouvrement.

NOMENCLATURE

Lettres majuscules

B : Barème de stérilisation, ou temps de palier de l'autoclave

CUT : Coming Up Time. Il s'agit du temps mis par un autoclave pour atteindre la température de palier.

D : Durée de réduction décimale. Temps de traitement thermique nécessaire pour réduire une population microbienne à $1/10^{\circ}$ de sa taille initiale. La température de traitement peut être précisée en indice (D_T).

D* : Durée de réduction décimale déterminée dans des conditions standards (121,1°C ; pH neutre).

F : Valeur stérilisatrice standard

F' : Valeur stérilisatrice personnalisée

SCE : Somme de Carré des Ecart

T* : température de référence de 121,1°C

T_p : température de palier du stérilisateur

T₀ : température initiale du produit à stériliser

T_c : Température de l'eau de refroidissement d'un stérilisateur

VDB : Valeur de destruction biologique définie par D^*/D

VS : Valeur stérilisatrice (F)

Lettres minuscules

- a_w : activité de l'eau du produit
- f_c : paramètres du modèle de Ball relatif au refroidissement du produit
- f_h : paramètres du modèle de Ball relatif à l'échauffement du produit
- j_c : paramètres du modèle de Ball relatif au refroidissement du produit
- j_h : paramètres du modèle de Ball relatif à l'échauffement du produit
- $j_h \text{ corr}$: paramètre j_h corrigée par prise en compte du CUT
- n : nombre de durées de réduction décimale, ou taux de réduction décimale
- pH^* : pH du milieu de traitement de référence égale à 7.
- pH'^* : pH du milieu de recouvrement de référence égal à 7.
- pH_{opt} : pH du milieu de traitement auquel la durée de réduction décimale est maximale
- pH'_{opt} : pH du milieu de recouvrement auquel la durée de réduction décimale est maximale
- z_T : écart de température par rapport à la température de référence entraînant une variation de la durée de réduction décimale d'un facteur 10.
- z_{pH} : écart de pH par rapport au pH de traitement de référence entraînant une variation de la durée de réduction décimale d'un facteur 10.
- z'_{pH} : écart de pH par rapport au pH' de recouvrement de référence entraînant une diminution de la durée de réduction décimale d'un facteur 10.

Lettres grecques

- δ : Paramètre du modèle de Mafart *et al.* (2001) exprimant la durée de la première réduction décimale.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Ababouch, L. & Busta, F. F. (1987). Effect of thermal treatment in oils on bacterial spore survival. *J. Appl. Bacteriol.* **62**, 491-502.

Ababouch, L. H., Gritit, L., Eddafry, R. & Busta, F. F. (1995). Thermal inactivation kinetics of *Bacillus subtilis* spores suspended in buffer and in oils. *J. Appl. Bacteriol.* **78**, 669-676.

Anderson, E. E., jr, W. B. E. & Fellers, C. R. (1949). Effect of acids, salt, sugar and other food ingredient on thermal resistance of *Bacillus thermoacidurans*. *Food res. Int.* **14**, 499-510.

Anderson, R. A. & Friesen, W. T. (1974). The thermal resistance of *Bacillus stearothermophilus* spores. The effect of temperature and pH of the heating medium. *Pharm. Acta Helv.* **49**, 295-298.

Anderson, W. A., McClure, P. J., Baird-Parker, A. C. & Cole, M. B. (1996). The application of log-logistic model to describe the thermal inactivation of *Clostridium botulinum* 213B at temperature below 121.1°C. *J. Appl. Bacteriol.* **80**, 283-290.

Arrhenius, S. (1889). Über die Reaktionsgeschwindigkeit bei der Inversion von Rohrzucker durch Säuren. *Z. Phys. Chem.* **4**, 226-248.

Ball, C. (1923). Thermal process time for canned food. *Natl. Res. Council, Washington, DC*.

Ball, C. O. & Olson, F. C. W. (1957). Sterlization in food technology - Theory, Practice and Calculations. *First edition, McGraw-Hill Book Compagny, Inc.*

Bates, D. M. & Watts, D. G. (1988). Non linear regression analysis and its applications. *p. 103. New York : John Wiley & Sons.*

Beale, E. M. (1960). Confidence regions in non-linear estimation. *J. Royal Stat. Soc. B22*, 41-88.

Bigelow, W. D. (1921). The logarithmic nature of thermal death time curves. *J. Infect. Diseases* **29**, 528-536.

Bigelow, W. D. & Esty, J. R. (1920). The thermal death point in relation to time of typical thermophilic organisms. *J. Infect. Diseases* **27**, 602-617.

Brown, K. L. & Martinez, A. (1992). The heat resistance of spores of *Clostridium botulinum* 213B heated at 121-130°C in acidified mushroom extract. *Int. J. Food Prot.* **55**, 913-915.

Cameron, M. S., Leonard, S. J. & Barrett, E. L. (1980). Effect of moderately acid pH on heat resistance of *Clostridium sporogenes* spore in phosphate buffer and in pea puree. *Appl. Env. Microbiol.* **39**, 943-949.

Casolari, A. (1994). About basic parameters of food sterilization technology. *Int. J. Food Microbiol.* **11**, 75-84.

Cerf, O. (1977). Tailing of survival curves of bacterial spores. *Int. J. Appl. Bacteriol.* **42**, 1-19.

Cerf, O., Davey, K. R. & Sadoudi, A. K. (1996). Thermal inactivation of bacteria - a new predictive model for the combined effect of three environmental factors: temperature, pH and water activity. *Food Res. Int.* **29**, 219-226.

Chick, H. (1910). The process of disinfection by chemical agencies and hot water. *Journal of Hygiene, Cambridge* **10**, 237-286.

Cook, A. M. & Brown, M. R. W. (1965). Relationship between heat activation and percentage colony formation for *Bacillus stearothermophilus* spores: effects of storage and pH on the recovery medium. *Int. J. Appl. Bacteriol.* **28**, 361-364.

Cook, A. M. & Gilbert, R. J. (1968). Factors affecting the heat resistance of *Bacillus stearothermophilus* spores I. The effect of recovery condition on colony count of unheated and heated spores. *Int. J. Food Technol.* **3**, 285-293.

Coroller, L., Leguérinel, I. & Mafart, P. (2000). Effect of water activities of heating and recovery media on apparent heat resistance of *Bacillus cereus* spores. *Appl. and Env. Microbiol.* **67**, 317-322.

Couvert, O., Leguérinel, I. & Mafart, P. (1999). Modelling the overall effect of pH on the apparent heat resistance of *Bacillus cereus* spores. *Int. J. Food Microbiol.* **49**, 57-62.

Davey, K., Lin, S. & Wood, D. (1978). The effect of pH on continuous high-temperature / short time sterilization of liquid foods. *Am. Inst. Chem. Eng. J.* **24**, 537-540.

Dickson, E. C., Georgina, G. S. & Burke, E. S. (1919). Botulims: a study of resistance of spores of *Bacillus botulinus* to various sterilizing agencies which are commonly employed in canned of fruits and vegetables. *Arch. Int. Med.* **24**, 581-599.

Esty, J. R. & Meyer, K. F. (1922). The heat resistance of spores of *B. botulinus* and allied anaerobes. *J. Infect. Diseases* **31**, 650-663.

Esty, J. R. & Williams, C. C. (1924). Heat resistance studies. A new method for determination of heat resistance of bacterial spores. *J. Infect. Diseases* **34**, 516-528.

Falissard, B. (1998). Comprendre et utiliser les statistiques dans les sciences de la vie. *Masson, Paris*.

Feeherry, F. E., Munsey, D. T. & Rowley, D. B. (1987). Thermal inactivation and injury of *Bacillus stearothermophilus* spores. *J. Appl. Environ. Microbiol.* **53**, 365-370.

Fernandez, A., Salmeron, C., Fernandez, P. S. & Martinez, A. (1999). Application of a frequency distribution model to describe the thermal inactivation of two strain of *Bacillus cereus*. *J. Food Sc. and Tech.* **10**, 158-162.

Fernandez, P. S., Ocio, M. J., Sanchez, T. & Martinez, A. (1994a). thermal resistance of *Bacillus stearothermophilus* spores heated in acidified mushroom extract. *Int. J. Food Prot.* **57**, 37-41.

Fernandez, P. S., Ocio, M. J., Rodrigo, F., Rodrigo, M. & Martinez, A. (1996). Mathematical model for the combined effect of temperature and pH on thermal resistance of *Bacillus stearothermophilus* and *Clostridium sporogenes* spores. *Int. J. Food Microbiol.* **32**, 225-233.

Fernandez, P. S., Gomez, F. J., Ocio, M. J., Sanchez, T., Rodrigo, M. & Martinez, A. (1994b). Influence of acidification and type of acidulant of recovery medium on *Bacillus stearothermophilus* spores counts. *Letters in Applied Microbiology* **19**, 146-148.

Gaillard, S., Leguérinel, I. & Mafart, P. (1998a). Model for combined effects of temperature, pH and water activity on thermal inactivation of *Bacillus cereus* spores. *Int. J. Food Sci.* **63**, 887-889.

Gaillard, S., Leguérinel, I. & Mafart, P. (1998b). Modelling combined effect of the temperature and pH on the heat resistance of spores of *Bacillus cereus*. *Int. J. Food microbiol.* **15**, 625-630.

Geeraerd, A. H., Herremans, C. H. & Impe, J. F. V. (2000). Structural model requirements to describe microbial inactivation during a mild heat treatment. *Int. J. Food Microbiol.* **59**, 185-209.

Goldoni, J. S., Kojima, S., Leonard, S. & Heil, J. R. (1980). Growing spores of P.A. 3679 in formulations of beef heart infusion broth. *Int. J. Food Sc.* **45**, 467-475.

Gombas, D. E. (1983). Bacterial spore resistance to heat. *Int. J. Food Technol.* **Nov**, 105-110.

Gonzalez, I., Lopez, M., Mazas, M., Gonzalez, J. & Bernardo, A. (1995). The effect of recovery condition on the apparent heat resistance of *Bacillus cereus* spores. *Int. J. Appl. Bacteriol.* **78**, 548-554.

Grischy, R. O., Speck, R. & Adams, D. M. (1983). New media for enumeration and detection of *Clostridium sporogenes* PA 3679 spores. *Int. J. Food Sci.* **48**, 1466-1469.

Headlee, M. R. (1931). Thermal death point. III. Spores of *Clostridium welchii*. *J. Infect. diseases* **48**, 468.

Henriques, A. O. & Moran, C. P. (2000). Structure and Assembly of the bacterial endospore coat. *Methods* **20**, 95-110.

Jordan, R. C. & Jacobs, S. E. (1948). Studies on the dynamics of disinfection. The variation of the concentration exponent for hydrogen and hydroxyl ions with the mortality level using standard cultures of *Bact. coli* at 51°C. *J. Hyg. Cambridge* **46**, 289-295.

Katzin, L. I., Sandholzer, L. A. & Strong, M. E. (1943). Application of the decimal reduction time principle to a study of the resistance of coliform bacteria to pasteurization. *J. Bacteriol.* **45**, 256-272.

Leclerc, H., Gaillard, J.-L. & Simonet, M. (1995). Microbiologie générale. La bactérie et le monde bactérien. *Doin Editeurs*.

Leguérinel, I. & Mafart, P. (2001). Modelling the influence of pH and organic acid types on thermal inactivation of *Bacillus cereus* spores. *Int. J. Food Microbiol.* **63**, 29-34.

Leguérinel, I., Couvert, O. & Mafart, P. (2000). Relationship between the apparent heat resistance of *Bacillus cereus* spores and the pH and NaCl concentration of the recovery media. *Int. J. Food Microbiol.* **55**, 223-227.

L'Haridon, R. & Cerf, O. (1978). La désinfection et l'antisepsie : proposition d'un mode de raisonnement tenant compte des cinétiques d'inactivation des micro-organismes. *Revue de l'institut Pasteur de Lyon* **11**, 445-456.

Lobry, J. R., Rosso, L. & Flandrois, J. P. (1991). A FORTRAN subroutine for the determination of parameter confidence limits in non-linear models. *Binary* **3**, 86-93.

Lopez, M., Gonzalez, I., Condon, S. & Bernardo, A. (1996). Effect of pH heating medium on the thermal resistance of *Bacillus stearothermophilus* spores. *Int. J. food Microbiol.* **28**, 405-410.

Lopez, M., Mazas, M., Gonzalez, I., Bernardo, A. & Gonzalez, J. (1994). Effect of pH and sodium chloride on the thermal resistance of *Bacillus stearothermophilus* spores. *Microbiologie-Aliments-Nutrition* **12**, 317-322.

Lopez, M., Gonzalez, I., Mazas, M., Gonzalez, J., Martin, R. & Bernardo, A. (1997). Influence of recovery condition on apparent heat resistance of *Bacillus stearothermophilus* spores. *Int. J. Food Sci. and Tech.* **32**, 305-311.

Löwik, J. A. M. & Anema, P. J. (1972). Effect of pH on the heat resistance of *Clostridium sporogenes* spores in minced meat. *Int. J. appl. bacteriol.* **35**, 119-121.

Lynch, D. J. & Potter, N. N. (1988). Effects of organic acids on thermal inactivation of *Bacillus stearothermophilus* and *Bacillus coagulans* spores in frankfurter emulsion slurry. *Int. J. Food Protec.* **51**, 475-480.

Madsen, T. & Nyman, M. (1907). Zur theorie der desinfektion. *Zeitschrift für Hygiene und Infektionskrankheiten* **57**, 388-404.

Mafart, P. (1996). Genie industriel alimentaire - Les procédés physiques de conservation. Tome 1. 2e édition. *Lavoisier*.

Mafart, P. (1999). Les modèles de destruction thermique des microorganismes. *Sciences des Aliments* **19**, 131-146.

Mafart, P. & Leguérinel, I. (1997). Modelling the heat stress and the recovery of bacterial spore. *Int. J. Food Microbiol* **37**, 131-135.

Mafart, P. & Leguérinel, I. (1998). Modelling combined effect of temperature and pH on the heat resistance of spores by a non-linear Bigelow equation. *Int. J. Food Sci.* **63**, 6-8.

Mafart, P., Couvert, O. & Leguerinel, I. (2001). Effect of pH on the resistance of spores - Comparison of two models. *Int. J. Food Microbiol.* **63**, 51-56.

Mafart, P., Couvert, O., Gaillard, S. & Leguerinel, I. (2002). On calculating sterility in thermal preservation methods : application of the Weibull distribution model. *Int. J. Food Microbiol.* **72**, 107-113.

Mallidis, C. G. & Scholefield, J. (1986). Evaluation of recovery media for heated spores of *Bacillus stearothermophilus*. *Int. J. Appl. Bact.* **61**, 517-523.

Mazas, M., Lopez, M., Gonzalez, I., Gonzalez, J., Bernardo, A. & Martin, R. (1998). Effects of the heating medium pH on heat resistance of *Bacillus cereus* spores. *J. of Food Safety* **18**, 25-36.

McMeekin, T. A., Olley, J. N., Ross, T. & Ratkowsky, D. A. (1993). Predictive microbiology. *Wiley, Chichester, UK*.

Meyer, A., Deiana, J. & Leclerc, H. (1991). Cours de microbiologie générale. *Doin Editeurs 2e ed.*

Murray, T. J. (1931). Thermal death point. II. Spores of *Bacillus anthracis*. *J. Infect. diseases* **48**, 457.

Murray, T. J. & Headlee, M. R. (1931). Thermal death point. I. Spores of *Clostridium tetani*. *J. Infect. diseases* **48**, 436.

Ocio, M. J., Sanchez, T., Fernandez, P. S., Rodrigo, M. & Martinez, A. (1994). Thermal resistance characteristics of PA 3679 in the temperature range of 110-121°C as affected by pH type of acidulant and substrate. *Int. J. food microbiol.* **22**, 239-247.

Olsen, A. M. & Scott, W. J. (1946). Influence of starch in media used for the detection of heated bacterial spores. *Nature* **157**, 337.

Olsen, A. M. & Scott, W. J. (1950). Enumeration of heated bacterial spores, Experiments with *Clostridium botulinum* and other species of *Clostridium*. *Aust. J. Sci. Research* **Series** **3**, 219-233.

Palop, A. (1999). Effects of environmental factors on the viability of micro-organisms. *Int. Symp. on Microbial stress and recovery in Food*, Quimper, 14-16 june.

Peleg, M. & Cole, M. B. (1998). Reinterpretation of microbial survival curves. *Crit. Rev. in Food Sc.* **38**, 353-380.

Peleg, M. & Cole, M. B. (2000). Estimating the survival of *Clostridium botulinum* spores during heat treatment. *Int. J. Food Protec.* **63**, 190-195.

Pirone, G., Mannino, S. & Campanini, M. (1987). Termoresistenza di Clostridi butirrici in funzione del pH. *Industria conserve* **62**, 135-137.

Pontius, A. J., Rushing, J. E. & Foegeding, P. M. (1998). Heat resistance of *Alicyclobacillus acidoterristris* spores as affected by various pH values and organic acids. *Int. J. Food Prot.* **61**, 41-46.

Prescott, Harley & Klein (1995). Microbiologie. *De Boeck-Wesmael S.A., Bruxelles pour la traduction française.*

Rajkowski, K. T. & Mikolajcik, E. M. (1987). Characteristics of selected strains of *Bacillus cereus*. *Int. J. Food protec.* **50**, 199-205.

Ratkowsky, D., Olley, J., McMeekin, T. & Ball, A. (1982). Relationship between temperature and growth rate of bacterial cultures. *J. Bacteriol.* **149**, 1-5.

Reichart, O. & Mohacsi-Farkas, C. (1994). Mathematical modelling of combined effect of water activity, pH and redox potential on the heat destruction. *Int. J. Food Microbiol.* **24**, 103-112.

Rodrigo, F., Martinez, A., Sanchez, T., Peris, M. J. & Safon, J. (1993). Kinetics of *Clostridium sporogenes* PA 3679 spores destruction using computer-controlled thermoresistometer. *J. Food Sci.* **58**, 649-652.

Rodriguez, A. C., Smerage, G. H., Teixeira, A. A. & Busta, F. F. (1988). Kinetic effects of lethal temperature on population dynamics of bacterial spores. *Am. soc. Agri. Eng.* **31**, 1594-1602.

Rodriguez, A. C., Smerage, G. H., Teixeira, A. A., Lindsay, J. A. & Busta, F. F. (1992). Population model of bacterial spores for validation of dynamic thermal processes. *J. Food process eng.* **15**, 1-30.

Rosso, L. (1995). Modelisation et microbiologie prévisionnelle : Elaboration d'un nouvel outil pour l'agro-alimentaire. *Thèse. Université Claude Bernard, Lyon I.*

Sanchez, T., Rodrigo, M., Ocio, M. J., Fernandez, P. & Martinez, A. (1995). Growth and heat resistance of *Clostridium sporogenes* PA 3679 spores heated and recovered in acidified media. *J. Food protec.* **58**, 656-660.

Santos, M. H. S. & Zarzo, J. T. (1995). Glucono-delta-lactone and citric acis as acidulant for lowering the heat resistance of *Clostridium sporogenes* PA 3679 in HTST working conditions. *Int. J. Food Microbiol.* **25**, 191-197.

Santos, M. H. S. & Zarzo, J. T. (1996). Evaluation of citric and GDL in the recovery at different level of *Clostridium sporogenes* P A 3679 spores subjected to HTST treatment conditions. *Int. J. Food Microbiol.* **29**, 241-254.

Santos, M. H. S., Kalasic, H. N., Goti, A. C. & Enguidanos, M. R. (1992). The effect of pH on the thermal resistance of *Clostridium sporogenes* (PA 3679) in asparagus puree acidified with citric acid and glucono-delta-lactone. *Int. J. food microbiol.* **16**, 275-281.

Santos, M. H. S., Zarzo, J. T., Santamarta, A. A. & Toran, M. J. P. (1993). Citric acid lower heat resistance of *Clostridium sporogenes* PA679 in HTST white asparagus puree. *Int. J. Food Sci. and technol.* **28**, 603-610.

Sapru, V., Smerage, G. H., Teixeira, A. A. & Lindsay, J. A. (1993). Comparaison of predictive model for bacterial spore population resources to sterilisation temperature. *Int. J. Food Sci.* **58**, 223-228.

Schmidt, C. F. (1957). Thermal resistance of micro-organisms. *Antiseptics, Disinfectants, Fungicides, and Chemical and Physical Sterilization*. G. F. Reddish (ed.). Lea and Febiger, Philadelphia.

Shull, J. J., Cargo, G. T. & Ernst, R. R. (1963). Kinetiks of heat activation and of thermal death of bacterial spores. *J. Appl. Microbiol.*, 485-487.

Splittstoesser, D. F., Lee, C. Y. & Churey, J. J. (1998). Control of acyclobacillus in the juice industry. *Dairy, Food and Environmental Sanitation* **18**, 585-587.

Stringer, S. C. & Peck, M. W. (1996). Vegetable juice aids the recovery of heated spores of non-proteolytic *Clostridium botulinum*. *Letters in appl. Microbiol.* **23**, 407-411.

Sugiyama, H. (1951). Studies on factor affecting the heat resistance of spores of *Clostridium botulinum*. *J. Bacteriol.* **62**, 81-96.

Tejedor, W., Rodrigo, M. & Martinez, A. (2001). Modeling the combined effect of pH and temperature on the heat resistance of *Bacillus stearothermophilus* spores heated in a multicomponent food extract. *Int. J. Food Prot.* **64**, 1631-1635.

Vas, K. & Proszt, G. (1955). Heat destruction of bacterial spores in the presence of chemical agents. *Acta Microbiol.* **2**, 235.

Walls, I. & Chuyate, R. (1998). *Alicyclobacillus* - historical perspective and preliminary characterisation study. *Dairy Food and Environmental Sanitation* **18**, 499-503.

Weiss, H. (1921). The heat resistance of spores with special reference to the spores of *B. botulinus*. *J. infect. diseases* **28**, 70-92.

Wijtzes, T., Wit, J. C. D., Veld, J. H. J. H. I. t., Riet, K. V. t. & Zwietering, M. H. (1995). Modelling bacterial growth of *Lactobacillus curvatus* as a function of acidity and temperature. *Appl. and Env. Microbiol.* **61**, 2533-2539.

Williams, O. B. (1929). The heat resistance of bacterial spores. *J. Infect. diseases* **44**, 421-465.

Wisotzkey, J. D., Jr, P. J., Fox, G. E., Deinhard, G. & Poralla, K. (1992). Comparative sequence analyses on the 16S rRNA (rDNA) of *Bacillus acidocaldarius*,

Bacillus acidoterrestris, and *Bacillus cycloheptanicus* and proposal for creation of a new genus, *Alicyclobacillus* gen. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **42**, 263-269.

Xezones, H. & Hutching, I. J. (1965). Thermal resistance of *Clostridium botulinum* (62A) spores as affected by fundamental food constituents. *Int. J. Food Technol.* **19**, 113-115.

Zwietering, M. H., Wit, J. C. d. & Notermans, S. (1996). Application of predictive microbiology to estimate the number of *Bacillus cereus* in pasteurised milk at the point of consumption. *Int. J. Food Microbiol.* **30**, 55-70.

Zwietering, M. H., Wijtzes, T., Wit, J. C. D. & Riet, K. V. t. (1992). A decision support system for prediction of microbial spoilage in foods. *Int. J. Food Prot.* **55**, 973-979.

ARTICLES ET COMMUNICATIONS

Publications

- Couvert, O., Leguérinel, I., Mafart, P., 1999. Modelling the overall effect of pH on the apparent heat resistance of *Bacillus cereus* spores. Int. J. Food Microbiol. 49, 57-62.
- Leguérinel, I., Couvert, O., Mafart, P., 2000. Relationship between the apparent heat resistance of *Bacillus cereus* spores and the pH and NaCl concentration of the recovery media. Int. J. Food Microbiol. 55, 223-227.
- Mafart, P., Couvert, O., Leguerinel, I., 2001. Effect of pH on the resistance of spores - Comparison of two models. Int. J. Food Microbiol. 63, 51-56.
- Mafart, P., Couvert, O., Gaillard, S., Leguerinel, I., 2002. On calculating sterility in thermal preservation methods : application of ther Weibull distribution model. Int. J. Food Microbiol. 72, 107-113.

Poster

- Couvert, O., Leguérinel, I., Mafart, P., 2000. Modelling the influence of the incubation temperature upon the estimated heat resistance value of heated spores. 3rd int. Conf. On predictive Modelling in Foods, 12-15 septembre, Louvain, Belgium.

Communication

- Mafart, P., Couvert, O., Gaillard, S., Leguérinel, I., 2001. On calculing sterility in thermal preservation methods : Application of the Weibull distribution model. Symposium Model-IT, 9-14 decembre, Palmerson North, New Zeland.

Annexes 1

La méthode de Bigelow (1921)

D'après Mafart (1996) « Génie industriel alimentaire »

Cette méthode est basée sur l'équation (24) :

$$F = \int_0^t L(T) dt$$

avec résolution numérique de l'intégrale. La fonction $L(T) = f(t)$ n'est pas modélisée mathématiquement mais on a recours à un enregistrement de température à cœur du produit. A partir de cet enregistrement, on résoud graphiquement la somme :

$$F = \sum L_i \cdot \Delta t_i$$

en prenant comme incrément $\Delta t_i = 1$ minute.

Seules sont considérées comme létales les températures supérieures ou égales à 100 °C (*fig. 5*).

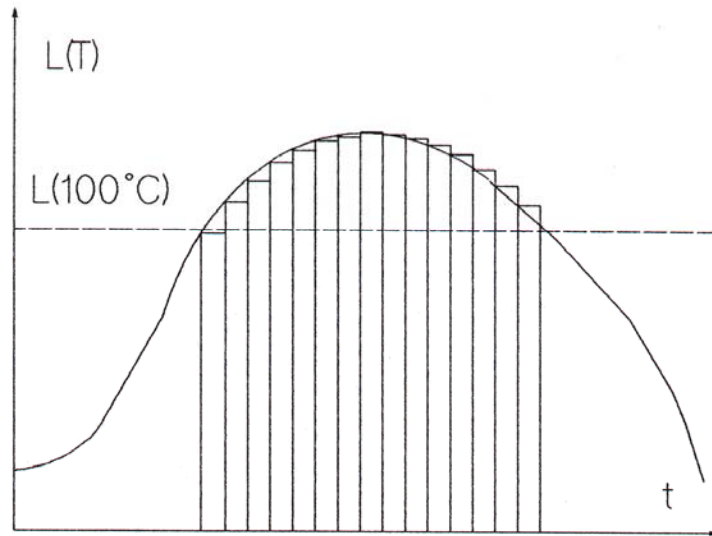


Figure 5

Aire d'intégration permettant de calculer une valeur stérilisatrice selon la méthode de Bigelow

Calcul de F connaissant le diagramme temps-température

A partir de la courbe temps-température, tracer le courbe $L(T) = f(t)$.

A partir de $L_i = L(100^\circ\text{C})$, calculer l'aire du rectangle de hauteur 1 minute et de base L_i , soit numériquement L_i .

Déterminer la valeur suivante L_{i+1} de la VDB au temps de départ plus 1 minute.

Etc.

Numériquement, $F = \sum L_i$.

Une variante qui épouse mieux la forme de la courbe consiste à calculer les aires des trapèzes de hauteur 1 minute et de bases L_i et L_{i+1} , de sorte que numériquement,

$$F = \sum \frac{L_i + L_{i+1}}{2}$$

Détermination de la durée du palier à cœur du produit pour une valeur fixée de F (fig. 6)

Tracer la courbe $L(T) = f(t)$ à partir de l'enregistrement de température.

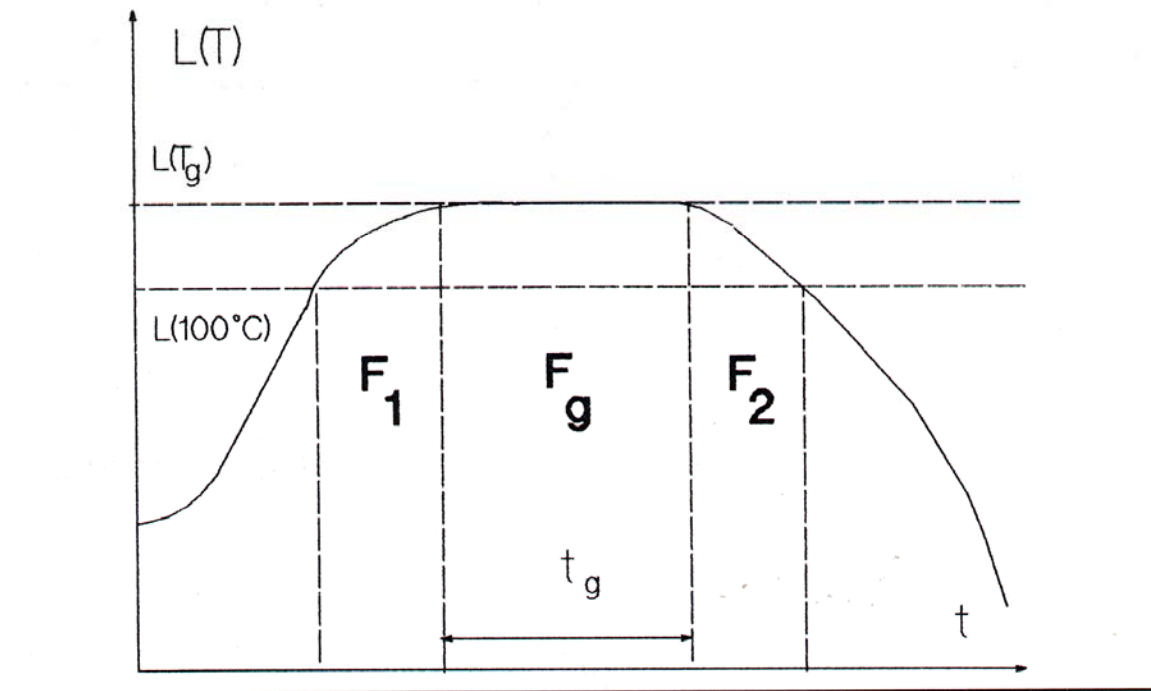


Figure 6

Soit T_g la température du palier à cœur du produit. Découper la courbe en trois zones :

- zone de chauffage pour $L(100\text{ °C}) < L < L(T_g)$,
- palier pour $L = L(T_g)$,
- zone de refroidissement pour $L(100\text{ °C}) < L < L(T_g)$.

Calculer les valeurs stérilisatrices F_1 et F_2 correspondant respectivement aux zones de chauffage et de refroidissement.

La valeur stérilisatrice correspondant au palier doit alors être :

$$F_g = F - (F_1 + F_2).$$

La durée du palier à cœur du produit doit donc être :

$$t = \frac{F_g}{L_g}$$

Grâce à l'enregistrement simultané de la température du milieu chauffant, on pourra en déduire quelle doit être la durée du palier de l'autoclave.

Critique de la méthode

La méthode de Bigelow doit être considérée comme la méthode de référence car elle s'appuie sur une courbe expérimentale, donc incontestable. Il n'est fait appel à aucun modèle mathématique ni à la moindre hypothèse de départ.

La détermination graphique de F qui pouvait paraître fastidieuse peut être supprimée grâce à l'utilisation d'un enregistreur-intégrateur qui calcule automatiquement l'aire d'intégration pour n'importe quelle valeur de z . La pureté de cette méthode, exempte de tout truquage mathématique, a pour contrepartie son absence totale de pouvoir d'extrapolation. La méthode de Bigelow ne permet d'orienter les essais (ce qui est déjà un progrès par rapport à la méthode « biologique ») que dans des conditions fixes de température initiale, de température du milieu chauffant, de nature de produit, de géométrie, de format etc. Dès que l'un de ces facteurs varie l'étude est à recommencer à partir de zéro.

Cet inconvénient majeur explique le succès persistant de méthodes plus alambiquées mais plus puissantes telles que celle de Ball.

Annexes 2

La méthode de Ball (1923)

D'après Mafart (1996) « Génie industriel alimentaire »

Il s'agit d'une méthode semi-analytique qui consiste à calculer F à l'aide d'un changement de variable s'appuyant sur l'équation :

$$\log \frac{T_{\infty} - T_o}{T_{\infty} - T} = \frac{1}{f_h} t - \log j \quad (31) \text{ (Cf. chap 1)}$$

Le cycle chauffage-refroidissement représenté par la fonction :

$$\log \frac{T_{\infty} - T_o}{T_{\infty} - T} = f(t)$$

présente quatre phases (*fig. 7*) :

- une phase de latence curviligne de chauffage,
- une phase linéaire de chauffage conforme à l'équation (31),
- une phase de latence curviligne de refroidissement,
- une phase linéaire de refroidissement.

La première phase peut être négligée car elle correspond à une zone de températures non létales. Il reste donc trois phases et

$$F = \int_{t_o}^{t_g} L(T) dt + \int_{t_g}^{t'_g} L(T) dt + \int_{t'_g}^{t_f} L(T) dt$$

avec $L(t) = 10^{\frac{T - T^*}{z}}$

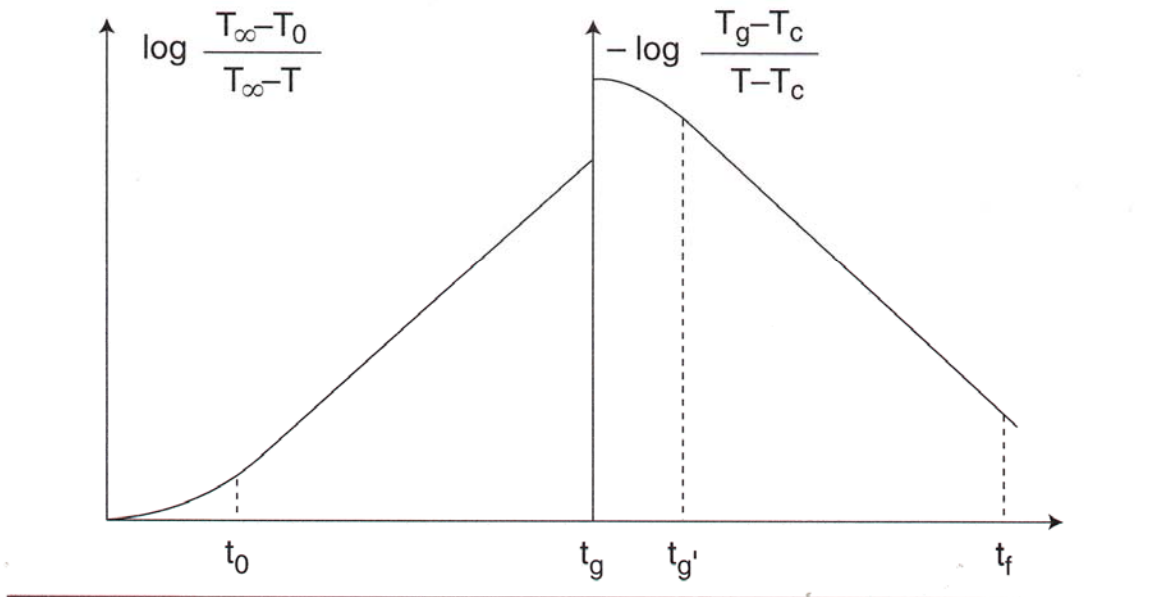


Figure 7

Zones curvilignes et linéaires des cinétiques de chauffage et de refroidissement prises en compte par la méthode de Ball

A partir de l'équation (31), on effectue le changement de variable suivant :

$$dt = - \frac{f_h}{2,303} \cdot \frac{d(T_\infty - T)}{T_\infty - T}.$$

Reste le problème de la phase de latence curviligne de refroidissement reliant les deux phases linéaires qui n'obéit pas à l'équation (31). Ball ajuste cette phase à l'aide d'une hyperbole.

Le principe de la méthode étant donné, ainsi que le point de départ, on fera grâce au lecteur des détails de calcul qui suivent en se contentant de montrer l'utilisation pratique. Il faut toutefois connaître les trois hypothèses de départ :

- 1) Le facteur de latence de refroidissement $j = 1,41$.
- 2) f_h est constant et égal à f_c [inverse de la pente de $\theta = f(t)$ au refroidissement].
- 3) Le palier de l'autoclave est atteint immédiatement : au temps $t = 0$, la température de l'autoclave est T_∞ .

Détermination de F pour une durée de chauffage B connue (fig. 8) :

- Si besoin, déterminer expérimentalement les valeurs de f_h et j ;
- calculer la valeur de $g = T_\infty - T_g$;

(T_g est la température à cœur du produit au moment où on arrête le chauffage, laquelle ne coïncide pas nécessairement avec la température maximale).

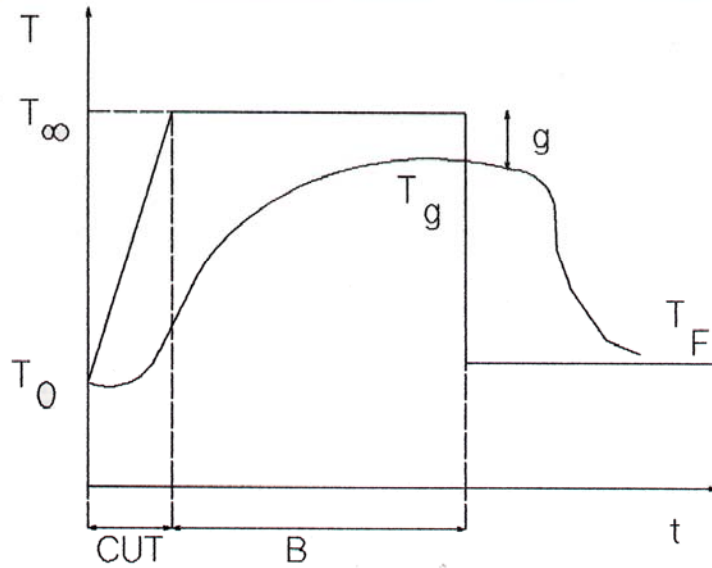


Figure 8

L'équation (31) permet de déduire :

$$\log g = \log j(T_\infty - T_0) - \frac{B}{f_h} \quad (32)$$

– consulter la table de Ball calculée pour une certaine valeur de $T_\infty - T_F$ (généralement 100 °C) on obtient la valeur du rapport f_h/U avec :

$$U = F \cdot 10^{\frac{T^* - T_\infty}{z}}$$

En déduire la valeur de F.

Détermination de la durée B de chauffage, F étant fixé

– si besoin, déterminer expérimentalement les valeurs de f_h et j ;

– calculer la fonction $U = F \cdot 10^{\left(\frac{T^* - T_\infty}{z}\right)}$, puis f_h/U ;

– trouver dans la table la valeur de g.

– calculer B à partir de l'équation (31) :

$$B = f_h \log j(T_\infty - T_0) - f_h \log g,$$

Changement de format

Dans la pratique, on ne peut se dispenser d'une nouvelle détermination de f_h et j que dans le cas d'un produit solide pour lequel on peut considérer que le régime de chauffage est diffusif. Dans ce cas, la valeur de j reste

inchangée et la nouvelle valeur de f_h est donnée pour un cylindre, par l'équation :

$$f'_h = f_h \frac{\frac{5,783}{R^2} + \frac{\pi^2}{H^2}}{\frac{5,783}{R'^2} + \frac{\pi^2}{H'^2}}$$

Correction apportée lorsque le délai de mise en régime de l'autoclave n'est pas négligeable.

Les calculs précédents supposent que la température du palier de l'autoclave est atteinte dès le début de la phase de chauffage. Lorsque le délai de mise en régime, ou comme disent les anglosaxons, le « coming up time » (CUT) n'est pas négligeable, il convient d'apporter une correction aux calculs. S'appuyant sur un certain nombre d'expériences, Ball constate que la phase transitoire de mise en régime équivaut à un palier de température constant (et égale à celle du palier stationnaire) dont la durée serait égale à 42 % du CUT. Le palier équivalent devient alors :

$$B' = B + 0,42 \text{ CUT} \quad (33)$$

et tout se passe comme si le chauffage efficace commençait à zéro + 0,58 CUT. En d'autres termes, on effectue une translation d'axe et la droite représentative de l'équation (22) coupe l'axe $t = 0,58 \text{ CUT}$ en $-\log j'$, si bien que j doit être corrigé en :

$$\log j' = \log j - \frac{0,58 \text{ CUT}}{f_h} \quad (34)$$

Bien entendu, lorsqu'à l'inverse, se fixant une valeur stérilisatrice, on veut calculer le barème de stérilisation, le calcul donne le barème équivalent B' et le barème réel de l'autoclave est :

$$B = B' - 0,42 \text{ CUT} \quad (35)$$

RESUME

Les traitements thermiques sont utilisés dans l'industrie de la conserve pour assainir les aliments et assurer leur stabilité microbiologique et biochimique. Cependant, les nombreux effets secondaires comme l'altération des qualités nutritives et organoleptiques, incitent les entreprises à réduire les barèmes à leurs minima, tout en maintenant la sécurité microbiologique. La recherche de ce barème optimum passe par l'étude de la résistance thermique des formes bactériennes sporulées.

La première partie de ce manuscrit consiste en l'élaboration d'un modèle établi sur les spores de sept souches bactériennes (*B. stearothermophilus*, *C. sporogenes*, espèces acidophiles...). Ce modèle décrit la thermorésistance en fonction de la température, mais surtout du pH de l'aliment que nous dédoublons en deux facteurs distincts : le pH du milieu de traitement thermique dont l'effet direct sur la thermorésistance est bien connu, et le pH du milieu d'incubation post-traitement qui affecte à la fois le taux de germes survivants susceptibles de se développer et la durée de réduction décimale apparente.

La seconde partie est consacrée à l'application du modèle dans les calculs de barèmes de stérilisation. Les méthodes de Bigelow et de Ball sont étendues au multifactoriel par intégration du pH, conduisant ainsi à un nouveau protocole de détermination de barème de stérilisation. Pour appuyer cette démonstration, un produit industriel est choisi en exemple : ses barèmes sont redéterminés par cette nouvelle méthode.

Mots-clés : Microbiologie prévisionnelle, spores bactériennes, traitements thermiques, pH du milieu de traitement, pH du milieu de stockage, barème de stérilisation.

ABSTRACT

In canned food industry, heat treatments are used in order to produce healthier food and to maintain its microbiological and biochemical stability. However, the numerous side effects, such as deterioration of nutritious and organoleptical qualities, urge companies to reduce their scales down to a minimum that maintain, nevertheless, the microbiological stability. This Optimization research proceeds from the study of heat resistance of bacterial spores.

In the first part of this work, we established a model on spores of seven bacterial strains (*B. stearothermophilus*, *C. sporogenes*, acidophilic species...). In this model, the heat resistance of these spores is related to the temperature, and mainly to the food pH, which is divided into two distinct factors : The heat treatment medium pH whose direct effects on heat resistance are well known, and the post-treatment medium pH which affects both the rate of surviving spores likely to germinate and grow and the apparent decimal reduction time.

The second part is assigned to the application of the model in sterilization time calculation methods. The Bigelow's and Ball's methods are enlarged by integration of pH, leading to a new protocol for sterilization time calculations. To check this demonstration, an industrial product is taken as an example and its scales are determined according to this new method.

Key words : Predictive microbiology, bacterial spores, heat treatments, Heat treatment medium pH, storage medium pH, sterilisation scale.
