



**HAL**  
open science

# Prédiction et simulation de la qualité et de la sécurité microbiologiques des aliments pendant un procédé. Méthodologies et modélisations

Isabelle Lebert

► **To cite this version:**

Isabelle Lebert. Prédiction et simulation de la qualité et de la sécurité microbiologiques des aliments pendant un procédé. Méthodologies et modélisations. Sciences du Vivant [q-bio]. ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE, 2006. tel-03078424

**HAL Id: tel-03078424**

**<https://hal.inrae.fr/tel-03078424v1>**

Submitted on 16 Dec 2020

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - NoDerivatives 4.0 International License

UNIVERSITE D'Auvergne

UNIVERSITE BLAISE PASCAL

**ECOLE DOCTORALE  
DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE**

Rapport présenté à l'Université Blaise Pascal  
Pour l'obtention de l'Habilitation à Diriger des Recherches

**Prédiction et simulation de la qualité et de la  
sécurité microbiologiques des aliments  
pendant un procédé  
Méthodologies et modélisations**

Soutenue le 29 novembre 2006

Devant le jury composé de :

**Rapporteurs**

Navarro Jean-Marie  
Legrand Jack  
Gros Jean-Bernard

Professeur – Université Montpellier II  
Professeur – Université Nantes  
Professeur – Université Clermont-Ferrand II

**Membres**

Strehaiano Pierre  
Peyron Alain  
Dussap C.-Gilles

Professeur – ENSIACET Toulouse  
ADIV – Clermont-Ferrand  
Professeur – Université Clermont-Ferrand II

Isabelle DESNIER-LEBERT

Unité de Microbiologie

Equipe Qualité et Sécurité des Aliments  
Institut National de la Recherche Agronomique - Clermont-Ferrand - Theix



<b>ABREVIATIONS .....</b>	<b>5</b>
<b>CURRICULUM VITAE.....</b>	<b>6</b>
<b>CHRONOLOGIE .....</b>	<b>12</b>
<b>PROJET - PERSPECTIVES .....</b>	<b>18</b>
<b>ACTIVITES D'ADMINISTRATION ET RESPONSABILITES COLLECTIVES.....</b>	<b>22</b>

## **ACTIVITES DE RECHERCHES**

<b>Introduction.....</b>	<b>27</b>
--------------------------	-----------

### **Activité de recherches 1**

<b>EXPERIMENTATION ET MODELISATION DE LA CROISSANCE BACTERIENNE DANS LES ALIMENTS .....</b>	<b>31</b>
1. Introduction.....	35
2. Souches bactériennes .....	37
3. Caractérisation des souches sélectionnées en milieu liquide et développement de modèles de croissance.....	40
4. Caractérisation des souches sélectionnées en milieu solide et validation des modèles de croissance	46
5. Conclusion .....	53

### **Activité de recherches 2**

<b>EXPERIMENTATION ET MODELISATION DES TRANSFERTS DE MATIERE ET DE CHALEUR DANS LES ALIMENTS.....</b>	<b>55</b>
1. Introduction.....	59
2. Les applications .....	63
3. Evolution de la température dans la viande de porc hachée pendant des procédés d'étuvage et de refroidissement.....	63
4. Effet des variables de contrôle d'un procédé de séchage sur l' $a_w$ de surface d'un aliment.....	65
5. Conclusion .....	71

### **Activité de recherches 3**

<b>EXPERIMENTATION ET MODELISATION DES CARACTERISTIQUES PHYSICOCHIMIQUES DES ALIMENTS.....</b>	<b>72</b>
1. Introduction.....	74
2. Présentation du modèle de Achard.....	74
3. Méthodologie et acquisition de données expérimentales .....	76
4. Conclusion .....	79

**Approche globale**

<b>COMBINAISON DES MODELES.....</b>	<b>80</b>
1. Introduction.....	82
2. Approche globale appliquée à une succession d'opérations unitaires.....	84
3. Approche globale appliquée à une opération de séchage.....	86
4. Conclusion.....	89
<b>Conclusion générale.....</b>	<b>90</b>

<b>DOSSIER DE PUBLICATIONS .....</b>	<b>92</b>
--------------------------------------	-----------

<b>LISTE DES PUBLICATIONS FOURNIES.....</b>	<b>102</b>
---	------------

## ABREVIATIONS

ACTIA	Association des Centres Techniques de l'Industrie Alimentaire
AIP	Action Incitative Prioritaire INRA
CEPIA	Département de recherches Caractérisation et Elaboration des Produits Issus de l'Agriculture
CILAL	Centre Interprofessionnel Lait – Auvergne – Limousin
CTSCCV	Centre Technique de la Salaison, de la Charcuterie et des Conserves de Viandes
C2T	Equipe de recherches Couplage Transfert Transformation
ENVA	Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort
INA PG	Institut National Agronomique de Paris-Grignon
GP	Génie des Procédés
MICA	Département de recherches Microbiologie et Chaîne Alimentaire
QuaPA	Unité de recherches Qualité des Produits Animaux
QuaSA	Equipe de recherches Qualité et Sécurité des Aliments
TPA	Département de recherches Transformation des Produits Animaux
UNIR	Ultra-Propre Nutrition Industrie Recherche
URV	Unité de Recherches sur la Viande

## CURRICULUM VITAE

Isabelle Sylvie DESNIER, épouse LEBERT  
Née le 9 juillet 1965 à Le Raincy (Seine Saint-Denis)  
Mariée, 2 enfants

Adresse personnelle	Adresse professionnelle
12 rue du Nord 63 110 Beaumont  Téléphone : 04 73 28 01 22 Email : andrelebert@wanadoo.fr	INRA Clermont-Ferrand – Theix Unité de Microbiologie Equipe Qualité et Sécurité des Aliments 63122 Saint-Genès Champanelle France  Tel : 33.(0)4.73.62.46.71 Fax : 33.(0)4.73.62.45.81 Email : ilebert@clermont.inra.fr

### DIPLOMES

- 1986-1989 Elève-Ingénieur de l'Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Montpellier
- 1989 **Ingénieur de l'Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Montpellier et Diplôme d'Etudes Approfondies - Sciences des Aliments** (Mention Assez Bien, Université Blaise Pascal, Clermont II).  
Titre : Sélection d'antigènes communs chez différentes espèces de bactéries affectant la qualité des viandes.  
Stage réalisé à l'INRA de Clermont-Ferrand - Theix, à l'Unité de Recherches sur la Viande (URV) dans l'équipe Microbiologie. Responsable : J.C. Labadie
- 2000-2004 **Thèse de Doctorat, discipline Sciences des Aliments**, sous la direction de C.G. Dussap, Professeur à l'Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand II, soutenue le 4 février 2004  
Mention très honorable avec félicitations du jury  
Titre : Prédiction de la croissance de *Listeria innocua* par une approche phénoménologique : modélisations complémentaires des propriétés du milieu, des transferts d'eau et des cinétiques.  
Travaux de recherches réalisés à l'INRA de Clermont-Ferrand - Theix, à l'URV dans les équipes Microbiologie et Génie des Procédés

### CARRIERE PROFESSIONNELLE

- 1989-1990 Ingénieur, responsable du laboratoire d'analyses agricoles au Centre Interprofessionnel Lait Auvergne Limousin (CILAL), Theix (63)
- Depuis janvier 1991  
Ingénieur de Recherches à l'INRA de Clermont-Ferrand - Theix à l'URV, équipe Microbiologie

- 1991 Utilisation de méthodes immunologiques pour la détection rapide de micro-organismes dans les viandes et produits carnés.
- 1992 Caractérisation de la réponse aux chocs thermiques (froids ou chauds) de bactéries d'altération des viandes, *Pseudomonas fragi*. Séquençage d'un gène codant pour la synthèse d'une protéine de choc froid.
- 1992-2004 Projet Microbiologie Prévisionnelle : devenir d'une (re)contamination accidentelle par des micro-organismes pathogènes ou d'altération de surfaces alimentaires solides en conditions environnementales variables, en présence ou non de la flore naturelle et prédire le devenir de cette contamination. Collaboration avec l'équipe Génie des Procédés de l'URV.
- 2004-2006 Projet européen Tradisausage (Assessment and improvement of safety of traditional dry sausages from producers to consumers) débuté en 2003 et coordonné par R. Talon (Responsable de l'équipe Microbiologie)
- 1<sup>er</sup> janvier 2006 : Ingénieur de Recherches à l'INRA de Clermont-Ferrand - Theix dans l'Unité de Microbiologie (responsable Mme E. Forano), équipe Qualité et sécurité des Aliments (responsable Mme R. Talon)  
Participation à trois actions :
- séquençage du génome de *Staphylococcus xylosus*
  - programme ANR : « Compréhension du fonctionnement d'espèces microbiennes cibles dans des matrices alimentaires et origine de leur diversité génétique »
  - programme ANR : « Les staphylocoques à coagulase négative dans les fromages, les salaisons et les ateliers de fabrication. Évaluation de la biodiversité et des risques sanitaires ».

## **ACTIONS D'ENCADREMENT**

### Co-encadrement de personnel

- Un Technicien de la Recherche (permanent INRA)
- Un ingénieur (CDD)
- Un post-doc

### Co-encadrement d'étudiants

- Cinq étudiants en thèse
- Quatre étudiants en DEA
- Dix élèves ingénieurs ou équivalent

### Encadrement d'étudiants

- Un étudiant en DEA
- Une étudiante en BTS
- Un étudiant en Licence Professionnelle

## **EXPERIENCES D'ENSEIGNEMENTS**

- IUT analyse biologique, option Bio-informatique, Aurillac (étudiants 2<sup>ème</sup> année), de 2001 à 2005 :



- \* 4 heures de cours sur les toxi-infections alimentaires et la microbiologie prévisionnelle
- \* 9 heures de Travaux Pratiques en bio-informatique : application de la microbiologie prévisionnelle et les outils disponibles
- CUST Génie Biologique 3<sup>ème</sup> année (Ecole d'ingénieur, Clermont-Ferrand), de 2001 à 2005 : 2 heures de cours en microbiologie prévisionnelle
- Master Nutrition et Sciences des Aliments, 1<sup>ère</sup> et 2<sup>ème</sup> année (Clermont-Ferrand) :
  - \* depuis 2001, 4 heures de cours en 2<sup>ème</sup> année sur les toxi-infections alimentaires, l'HACCP et la microbiologie prévisionnelle
  - \* en 2004 et 2005, en 1<sup>ère</sup> année, 2 heures de cours en microbiologie prévisionnelle

## **PARTICIPATION AUX JURYS**

2002-2004 : Jury d'admission au CUST : 1 j/an  
 2001-2003, 2006 : Jury d'examen du BTS Anabiotec, Le Puy : 1 j/an

## **ACTIONS DE FORMATION**

- \* Thème Microbiologie Prévisionnelle et *Listeria* :
  - Exposé à des industriels dans le cadre d'une journée de formation sur « Viande et froid: nouveaux développements »
  - Exposé sur l'hygiène en industrie alimentaire
  - Exposé à des internes en médecine du travail
- \* Cours techniques : présentation du matériel utilisé au laboratoire
  - à des étudiants de BTS, une fois par an depuis 2000
  - aux étudiants du laboratoire

## **PUBLICATIONS**

- 16 publications parues dans une revue avec comité de lecture
- 2 publications soumises dans une revue avec comité de lecture
- 6 articles comme chapitre d'ouvrage et un en cours de rédaction
- 16 communications orales dans des congrès dont quatre comme conférencier invité
- 23 posters

## **AUTRES ACTIVITES**

1992-1998     Agent Chargé de Prévention à l'URV

1992-1998     Trois mandats de représentante des Ingénieurs lors des réunions des responsables des équipes de recherches à l'URV

1998-2005     Correspondante pour l'URV de la revue mensuelle du Centre de Clermont-Ferrand-Theix « L'Echo des Puy »

2006            Nommée pour 2 ans au conseil de service de l'Unité de Microbiologie  
                   Animatrice Qualité de l'unité de Microbiologie

Reviewer d'articles scientifiques dans la revue Food Microbiology et autres revues

## PARCOURS ADMINISTRATIF A L'INRA

Les restructurations à l'INRA ont entraîné des changements d'affectation dans différents départements de recherches et des changements de noms d'unités et d'équipes.

L'Unité de Recherches sur la Viande appartenait, en 1991, au département TPA (Transformation des produits Animaux). Elle est devenue Unité de Recherches Qualité des Produits Animaux (QuaPA) en avril 2004 après avoir été rattachée au nouveau département Caractérisation et Elaboration des Produits Issus de l'Agriculture (CEPIA).

L'équipe Microbiologie, à laquelle j'appartiens depuis 1991, a fait partie de l'URV/QuAPA jusqu'en décembre 2005.

Le 1<sup>er</sup> janvier 2006, l'équipe Microbiologie a rejoint l'Unité de Microbiologie dans le département MICA (Microbiologie et Sécurité de la Chaîne Alimentaire) et a changé de nom. Elle est désormais l'équipe Qualité et Sécurité des Aliments (QuaSA).

Deux organigrammes sont ainsi présentés. Le premier (Figure 1) situe l'équipe Microbiologie dans l'Unité QuaPA jusqu'au 31 décembre 2005. Le second (Figure 2) situe l'équipe Qualité et Sécurité des Aliments dans l'Unité de Microbiologie depuis le 1<sup>er</sup> janvier 2006.

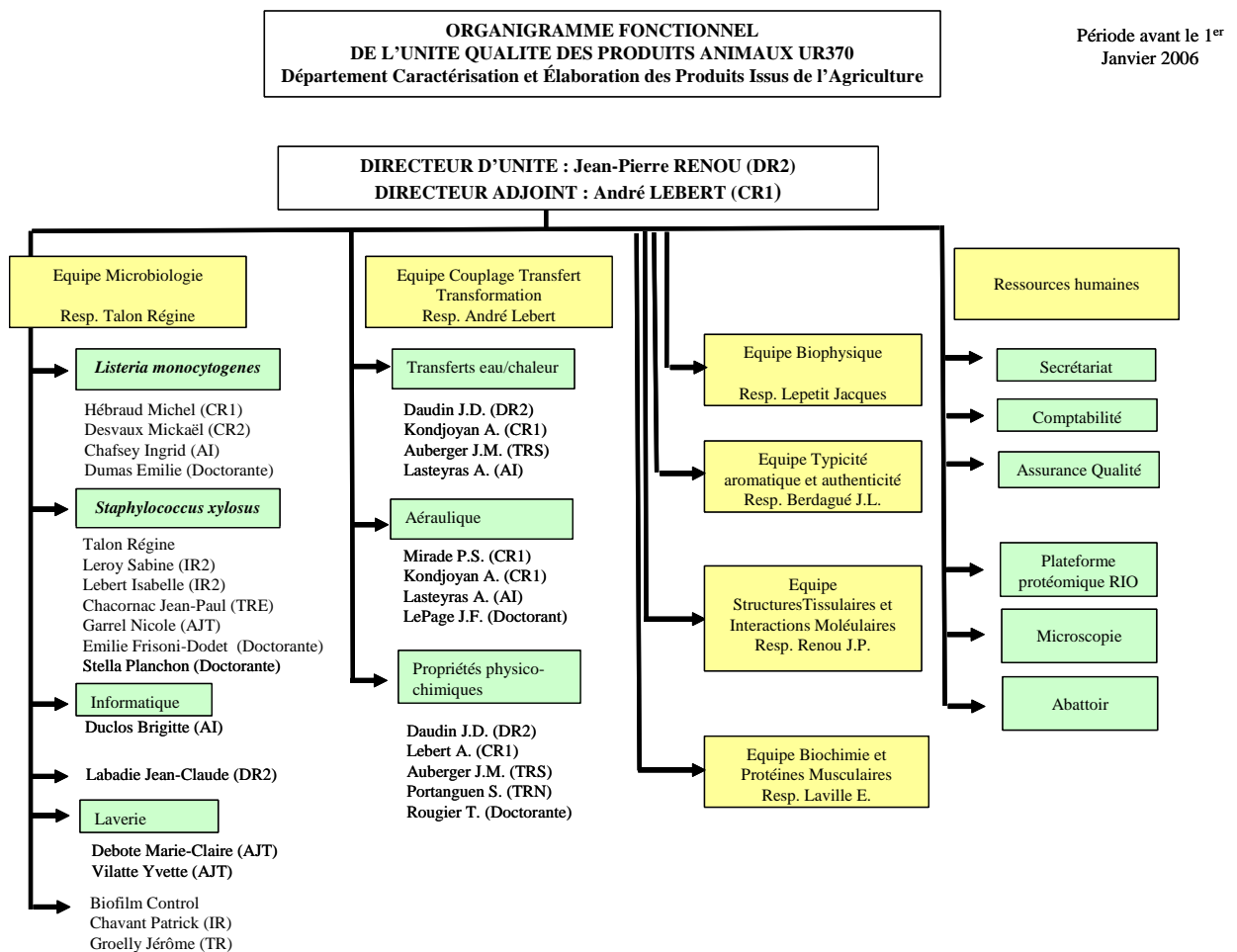


Figure 1 : Organigramme de l'Unité QuaPA

**ORGANIGRAMME FONCTIONNEL  
DE L'UNITE DE MICROBIOLOGIE UR454  
Département Microbiologie et Chaîne Alimentaire**

Période à partir du 1<sup>er</sup>  
Janvier 2006

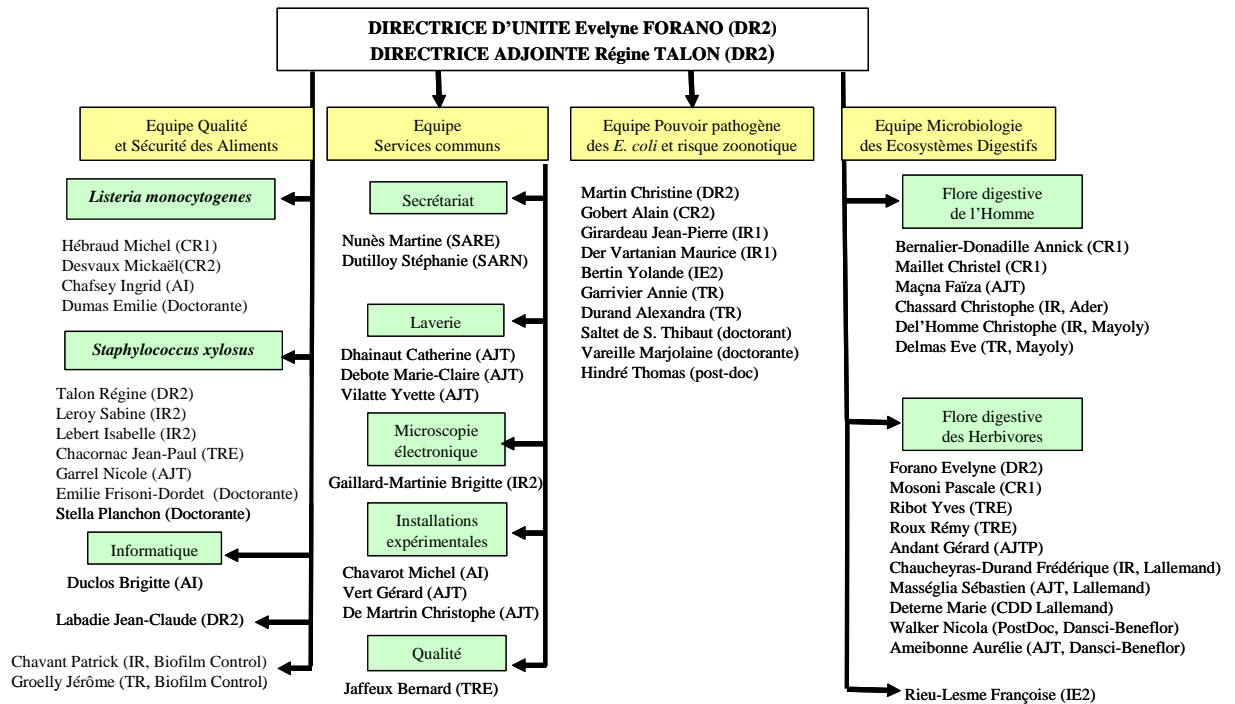


Figure 2 : Organigramme de l'Unité de Microbiologie



## CHRONOLOGIE

Mon premier contact avec la recherche date de 1989 et correspond à mon stage de fin d'étude de 3<sup>ème</sup> année de l'Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Montpellier, stage que j'ai réalisé dans l'équipe de Microbiologie de l'Unité de Recherches sur la Viande (URV) de l'Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) de Clermont-Ferrand - Theix. J'ai choisi d'approfondir mes connaissances dans le domaine des Sciences de l'Aliment et plus particulièrement de la viande en m'inscrivant la même année au DEA des Sciences des Aliments de l'Université Blaise Pascal. Mon sujet, sous la responsabilité de J. C. Labadie, concernait la détection d'antigènes spécifiques chez différentes bactéries affectant la qualité des viandes, dans le but de détecter des flores contaminantes.

Ma première expérience professionnelle a été réalisée dans un laboratoire d'analyses agricoles, le CILAL (Centre Interprofessionnel Lait – Auvergne – Limousin, Theix, Puy-de-Dôme) entre 1989 et 1990. J'étais responsable des analyses de fourrages et de terres. J'encadrais deux techniciennes et assurais le retour des analyses auprès des clients. Dans ce cadre, j'ai apprécié la proximité de l'INRA de Theix, car j'ai pu contacter les chercheurs travaillant sur les fourrages et l'alimentation animale. Ils m'ont aidé à interpréter certains résultats d'analyses de fourrages (valeurs alimentaires d'ensilages, de foins).

En janvier 1991, j'ai été recrutée sur un poste d'Ingénieur de Recherche dans l'équipe Microbiologie de l'URV sous la responsabilité de J.C. Labadie. Pendant cette première année, j'ai travaillé dans le cadre d'une AIP<sup>1</sup> sur l'utilisation de méthodes immunologiques pour la détection rapide de micro-organismes dans les viandes et produits carnés.

En 1992, j'ai débuté un programme de recherche sur la modélisation de la croissance bactérienne, ou Microbiologie Prévisionnelle. Ce projet, sous la responsabilité de A. Lebert (équipe Génie des Procédés (GP) de l'URV et de J.C. Labadie (équipe Microbiologie de l'URV), a été réalisé en partenariat avec l'association d'industriels UNIR<sup>2</sup>. A. Lebert a pris en charge les composantes Génie des Procédés et Modélisation. J'ai développé la composante Microbiologie. L'objectif de nos recherches était d'étudier le devenir d'une (re)contamination accidentelle par des micro-organismes pathogènes ou d'altération de surfaces alimentaires

---

<sup>1</sup> Action Incitative Prioritaire INRA

<sup>2</sup> Ultra-Propre Nutrition Industrie Recherche

solides en conditions environnementales variables, en présence ou non de la flore naturelle et de prédire le devenir de cette contamination. Cette recherche a duré de 1992 à 2004.

De 1992 à 1998, nous avons initié et développé le thème de la Microbiologie Prévisionnelle dans le cadre de contrats avec des centres techniques (CTSCCV<sup>1</sup>) ou le groupement d'industriels UNIR. Deux genres bactériens ont été étudiés, *Listeria* et *Pseudomonas*. L'espèce *Listeria monocytogenes* a été choisie pour son caractère pathogène en santé humaine. Cette espèce a été responsable d'une épidémie de listériose en 1992 (279 cas épidémiques avec 63 morts et 22 avortements). Les espèces *Pseudomonas fragi* et *Pseudomonas fluorescens* sont des bactéries d'altérations des viandes et sont responsables de la dégradation de la qualité hygiénique des viandes conservées à l'air et au froid.

Pendant cette période, les méthodologies nécessaires à l'acquisition de données expérimentales ont été développées.

- Les croissances bactériennes ont été étudiées dans deux milieux en fonction de la température, du pH et de l'activité de l'eau ( $a_w$ ) : un milieu liquide à base de peptones de viande et tamponné dans lequel le pH et l' $a_w$  étaient contrôlés par l'ajout de solutés et un milieu alimentaire solide, la viande de bœuf pour laquelle un protocole de décontamination de la surface a été mis au point pour s'affranchir de la flore naturelle.
- Les populations bactériennes ont été suivies soit par dénombrements sur milieu gélosé soit par mesure de la densité optique.
- Une soufflerie microbiologique a été conçue et construite dans le laboratoire GP pour suivre les croissances bactériennes en surface de viande dont l' $a_w$  était contrôlée par la température, la vitesse et l'humidité relative de l'air.

Ces études ont permis de caractériser la croissance de 66 souches de *Listeria* et 59 souches de *Pseudomonas* en milieu liquide, de montrer leur diversité de comportement en fonction de la température, du pH et de l' $a_w$  : en effet, certaines souches étaient caractérisées par des croissances rapides dans toutes les conditions testées alors que d'autres avaient des croissances lentes dans ces mêmes conditions. Cette variabilité a été prise en compte lors du développement des modèles de prédiction de la croissance en choisissant une souche à croissance rapide et une à croissance lente. Cette stratégie avait pour but d'obtenir un domaine prédit (défini par les modèles de la souche rapide et de la souche lente) dans lequel devait se

---

<sup>1</sup> Centre Technique de la Salaison, de la Charcuterie et des Conserves de Viandes

situer la croissance de n'importe quelle souche. Des modèles polynomiaux, ont été optimisés pour deux souches de *Listeria* et trois souches de *Pseudomonas* à partir d'expériences réalisées en milieu liquide où l' $a_w$  était contrôlée par l'ajout de NaCl. La validation de ces modèles a été réalisée avec des croissances en surface de viande de boeuf dans lesquelles l' $a_w$  était contrôlée par l'humidité relative de l'air (construction d'une soufflerie microbiologique). Les prédictions des modèles étaient correctes pour des  $a_w$  supérieures à 0,96. Ces travaux ont été réalisés lors des thèses de C. Bégot-Laplace (1996) et V. Robles-Olvera (1999).

Pour étudier l'effet de conditions environnementales variables, M. Cheroutre-Vialette (thèse, 1999) a étudié la croissance de *L. monocytogenes* soumise à des variations de pH ou d' $a_w$  en milieu liquide. Elle a modélisé la réponse bactérienne soumise aux variations de pH et d' $a_w$  ainsi que la variabilité de croissance de l'ensemble des souches étudiées.

Pendant cette période, j'ai participé à la publication de huit articles, deux chapitres d'ouvrage, cinq communications orales et dix posters.

De 1998 à 2000, les recherches se sont orientées sur le devenir d'un micro-organisme présent en surface d'un produit alimentaire reposant sur un support solide et en contact avec l'air, situation trouvée lors du séchage de saucissons, de l'affinage de fromages ou de refroidissement de viandes. Les croissances bactériennes réalisées dans la soufflerie microbiologique ont montré les limites de prédiction des modèles polynomiaux en particulier à des  $a_w < 0,96$ . Il était donc indispensable de prendre en compte les variables du procédé de séchage sur la croissance bactérienne et donc de mieux estimer l' $a_w$  de surface du produit alimentaire. J.D. Daudin (équipe GP) et P. Baucour (2000), doctorant, ont développé un modèle de transfert d'eau qui décrit l'effet des caractéristiques de l'air (vitesse, température, humidité relative) sur les propriétés physico-chimiques d'un produit alimentaire solide dont la surface est balayée par un flux d'air. Ce modèle estime l'évolution des profils de teneur en eau au sein du produit et l'évolution des profils de l' $a_w$  de surface en fonction du temps. Il tient compte des transferts d'eau à l'intérieur du produit, des transferts d'eau à l'interface air/produit, et de la courbe de sorption.

L' $a_w$  estimée par le modèle de transfert d'eau et la température en surface du produit ont été utilisées comme entrées dans le modèle polynomial pour calculer l'évolution de la population bactérienne à la surface du produit. Le modèle combiné a été validé à l'aide de croissances dans la soufflerie microbiologique, expériences pour lesquelles j'ai développé le protocole de mesure de la croissance de *Pseudomonas* en surface de viande de porc. Des simulations ont été réalisées pour montrer la sensibilité du modèle combiné à certains facteurs

en quantifiant leurs effets sur l' $a_w$  de surface et sur la croissance bactérienne. Une faible modification de la diffusivité de l'eau, de l'épaisseur, de la vitesse de l'air et de l'humidité relative entraînaient de fortes modifications de l'estimation de l' $a_w$  et en conséquence modifiaient fortement les résultats des croissances prédites.

Ces travaux ont fait l'objet d'un article, d'une communication orale et de trois posters.

De 2000 à 2005, une approche globale de modélisation du comportement bactérien a été développée en prenant en compte les caractéristiques du microorganisme, l'effet du procédé et les caractéristiques de l'aliment. Cette approche a été appliquée dans mon travail de thèse et dans la thèse de V. Zuliani (2005).

Mon objectif de thèse était de prédire la croissance de *L. innocua* inoculée en surface d'un aliment dont la surface était soumise à un flux d'air. La prédiction de l' $a_w$  en surface de l'aliment a été prédite en couplant un modèle de transfert d'eau et un modèle de prédiction des caractéristiques physico-chimiques de milieux aqueux. Mes travaux de recherches ont été menés sur les points suivants :

- L'effet du mode de contrôle de l' $a_w$  a été précisé sur la croissance de *L. innocua* : (1) en milieux de laboratoire, l' $a_w$  était ajustée par l'ajout de sels, sucres ou glycérol ; (2) en milieu solide (surface de gel de gélatine), l' $a_w$  était contrôlée par déshydratation ou en maîtrisant les caractéristiques de l'air (vitesse, humidité relative, vitesse) dans la soufflerie microbiologique.
- Un modèle de croissance bactérienne choisi dans la littérature a été optimisé pour prédire la croissance de *L. innocua* en milieu liquide et en milieu solide en fonction des paramètres température, pH et  $a_w$ .
- Le modèle de transfert d'eau de P. Baucour a été optimisé pour prédire l' $a_w$  en surface d'un gel de gélatine soumis à un flux d'air.
- Une collaboration a débuté en 2000 avec C.G. Dussap, Professeur de l'Université Blaise Pascal de Clermont-Ferrand, Laboratoire de Génie Chimique et Biochimique, afin d'utiliser son approche fondée sur la thermodynamique des solutions et de prédire le pH et l' $a_w$  de milieux de cultures. Le modèle de solution développé par Achard *et al.* (1994)<sup>1</sup> prédit les propriétés de solutions aqueuses en tenant compte des propriétés thermodynamiques (activités, pH, concentrations) des constituants d'un mélange

---

<sup>1</sup> Achard C., Dussap C.G. et Gros J.B. Prediction of pH in complex aqueous mixtures using a group-contribution method. *AIChE Journal*, 1994, 40(7), 1210-1222.



aqueux. Il tient compte de la présence de molécules neutres dans le mélange tels que des sucres, des alcools (modèle UNIFAC (Universal Functional Group Activity Coefficients)), de constituants ioniques tels que des sels, des acides, des bases (modèle basé sur la théorie Pitzer-Debye-Hückel) et des molécules d'eau liées aux cations par des interactions de solvation (modèle de solvation).

Afin de prendre en compte les caractéristiques de l'aliment avec le modèle solide (gel de gélatine) et les caractéristiques d'un procédé de séchage par l'air sur la croissance bactérienne, une stratégie globale de prédiction de la qualité et de la sécurité microbiologique des aliments a été menée en combinant les trois modèles de prédiction : modèle de croissance bactérienne, modèle de transfert d'eau et modèle thermodynamique. Chaque modèle a été adapté, optimisé et validé avant d'être combiné. Cette démarche globale de modélisation a été validée sur des données de croissance de *Listeria* en surface de gel soumis à un séchage.

La thèse de V. Zuliani avait pour objectif de modéliser le comportement d'une bactérie présente dans un aliment en prenant en compte les étapes du procédé depuis la fabrication jusqu'à la fin du stockage. Elle a été réalisée en collaboration avec le CTSCCV. V. Zuliani a modélisé, selon une approche globale, la croissance, la survie ou l'inhibition de *L. monocytogenes* pendant le procédé de fabrication des lardons de type industriels. Elle a représenté le procédé en tenant compte des opérations unitaires suivantes : ajout de NaCl, ajout de sels d'acides, étuvage et stockage au froid. Deux modèles de microbiologie prévisionnelle (croissance et destruction) ont été adaptés et validés en prenant en compte l'effet de la température, du pH, de l' $a_w$  et des sels d'acides. Un modèle de transfert de chaleur a été développé pour prendre en compte les conditions d'étuvage et de refroidissement et ainsi prédire les évolutions spatiales et temporelles de la température dans le produit. Le couplage des modèles de prédiction du comportement bactérien et du modèle de transfert de chaleur a permis de prédire correctement les conditions où une croissance, la survie ou la destruction, étaient observées. Ce travail de thèse a confirmé l'intérêt de l'approche globale.

Les travaux de 2000 à 2005 ont été publiés sous la forme de cinq articles, un article soumis, trois chapitres d'ouvrage, huit communications et dix posters.

En mars 2004, mes activités ont évolué en raison du rattachement de mon équipe au nouveau Département INRA « Microbiologie et Chaîne Alimentaire » (MICA), entraînant une réorientation des thématiques de l'équipe Microbiologie et de l'équipe Génie des procédés.

De mars 2004 à juillet 2006, j'ai participé au projet européen Tradisausage « Assessment and improvement of safety of traditional dry sausages from producers to consumers » (2003-2006) coordonné par R. Talon. Son objectif était d'évaluer et d'améliorer la qualité des saucissons secs traditionnels depuis le producteur jusqu'au consommateur tout en préservant la typicité des produits. Six pays (Espagne, France, Grèce, Italie, Portugal, Slovaquie) ont participé à ce projet. Je suis intervenue dans quatre workpackages (WP) : (WP2) évaluation des risques sanitaires associés à la fabrication des saucissons secs traditionnels ; (WP3) identification puis sélection de souches d'intérêt technologique, isolées des ateliers et des saucissons ; (WP 4) amélioration de la sécurité des produits et de l'hygiène dans les ateliers ; (WP 5) validation d'un procédé permettant de maîtriser les qualités hygiéniques des produits tout en gardant leur typicité. J'ai présenté les résultats du WP2 et WP4 lors de la 4<sup>ème</sup> réunion des partenaires du projet, à Kosice (Slovaquie) en octobre 2004, et ceux du WP3 et WP4 lors de la 5<sup>ème</sup> réunion à Lisbonne (Portugal) en mars 2005. J'ai participé à la réunion de clôture du projet européen en décembre 2005 à Paris.

Pendant cette période, j'ai publié un article et un chapitre d'ouvrage et présenté deux communications orales. Une publication est soumise et deux autres publications sont en cours de rédaction. J'ai rédigé un chapitre dans l'ouvrage Handbook of Fermented Meat and Poultry qui présente une synthèse bibliographique des écosystèmes microbiens dans les produits fermentés traditionnels. Je coordonne également un numéro spécial de la revue Viande & Produits Carnés qui comportera sept articles à vocation de transfert vers les professionnels de la filière viande. Ces articles présentent les résultats des équipes françaises obtenues pendant le projet Tradisausage. Je m'occupe plus particulièrement de la rédaction de trois d'entre eux.

J'ai sélectionné dix articles que j'ai jugés représentatifs du travail réalisé sur la période 1992-2005. Ces dix articles correspondent à mes travaux de recherches sur la prédiction et la simulation de la qualité et de la sécurité microbiologiques des aliments soumis à un procédé. Ces publications sont indiquées par la notation A1 à A10 dans le mémoire.

## PROJET - PERSPECTIVES

Du fait des recherches développées dans l'équipe QuaSA, mes activités de recherches porteront sur l'étude des staphylocoques à coagulase négative (SCN) et sur leur innocuité dans les produits alimentaires fermentés. En effet, plusieurs études décrivent des souches de SCN isolées des aliments exprimant des facteurs de risque : toxines, antibiorésistance, amines biogènes. D'autres études montrent la présence des SCN dans le milieu médical où ces souches seraient associées à des infections nosocomiales. Leur présence et leur persistance dans ces différents environnements peuvent être liées à leur capacité à former des biofilms sur des surfaces biotiques ou abiotiques. Dans un premier temps, l'innocuité des SCN sera abordée par l'étude de leur biodiversité et de la présence des facteurs de risque. Dans un deuxième temps, elle sera abordée par l'étude de leur capacité à produire des biofilms.

La première partie de mes activités sera réalisée dans le cadre du projet ANR intitulé : « Les staphylocoques à coagulase négative dans les fromages, les salaisons et les ateliers de fabrication. Évaluation de la biodiversité et des risques sanitaires ». Ce projet débuté en janvier 2006 porte sur l'analyse de la biodiversité des espèces de staphylocoques par des méthodes d'identification moléculaire et sur la compréhension des écosystèmes microbiens des saucissons secs.

La production de saucissons secs est réalisée en trois phases : la formulation qui aboutit à la mûlée, la fermentation et la maturation ou séchage. La mûlée est constituée de viande maigre, de gras, de sucres, de nitrites/nitrates et d'épices. Des ferments sont ajoutés dans le cas des productions industrielles, alors que dans les productions fermières, ce sont les ferments naturellement présents dans la matière première qui se développent pour assurer la fermentation du produit. Les ferments sont constitués de bactéries lactiques et de SCN. Les bactéries lactiques améliorent la sécurité et la stabilité du produit en l'acidifiant alors que les SCN participent au développement de la couleur et de l'arôme pendant la phase de maturation. Ces derniers sont considérés comme des flores positives participant aux caractéristiques organoleptiques du produit fini. Cependant certaines souches de SCN isolées des aliments expriment des facteurs de risque (toxines, antibiorésistance, amines biogènes) ce qui remet en cause l'innocuité sanitaire des SCN.

La diversité des SCN sera étudiée en identifiant les espèces et en caractérisant les souches de SCN isolées de produits et de l'environnement. Les facteurs de risques seront identifiés sur

ces souches à l'aide d'une puce ADN ou puce diagnostic développée par le Laboratoire de Microbiologie (INRA Rennes). Le risque potentiel des souches ainsi que le risque de transmission des déterminants de l'antibiorésistance (fréquence et conditions de transfert) seront évalués à la fois *in vitro* et dans une matrice viande.

La deuxième partie de mes activités portera sur l'étude de la physiologie de la croissance en biofilm de l'espèce *S. xylosus* et plus particulièrement la souche *S. xylosus* C2a qui est la bactérie d'étude dans l'équipe QuaSA. Cette espèce est fréquemment isolée des produits carnés, elle est souvent utilisée comme ferment et contribue aux propriétés sensorielles du produit. Elle est également isolée de l'environnement d'ateliers de salaison (Corbière Morot-Bizot et al., 2006)<sup>1</sup>.

Un biofilm est défini comme un ensemble de cellules isolées ou associées en colonies, incluses dans une matrice constituée d'exopolymères bactériens, de matière organique et de macromolécules du milieu environnant. La mise en place d'un biofilm s'effectue en deux étapes (Folio, 2003<sup>2</sup>, Planchon, 2006<sup>3</sup>) :

- L'adhésion : la première phase d'adhésion est rapide et réversible, un simple rinçage élimine la bactérie. Les forces qui interviennent entre la surface inerte et la cellule vivante sont les forces de Van der Waals, les forces électrostatiques et les interactions hydrophobes. Ensuite, l'adhésion devient irréversible ; un raclage et un brossage sont nécessaires pour éliminer les bactéries. Elle est influencée entre autre par l'hydrophobicité des souches, leur état physiologique, les conditions de cultures et les quantités d'exopolymères. Ces derniers, produits par les bactéries, sont composés de muco-polysaccharides. Cette étape, plus lente, se stabilise en quelques heures (4 à 6 heures).

- La colonisation : elle dure de quelques heures à quelques mois. Les bactéries se multiplient et sécrètent des exopolysaccharides qui s'accumulent à la surface du matériau et dans lesquels les bactéries survivent. La maturation de cet ensemble aboutit à un biofilm de structure complexe et hétérogène.

---

<sup>1</sup> Corbière Morot-Bizot, S., Leroy, S., Talon, R., 2006. Staphylococcal community of a small unit manufacturing traditional dry fermented sausages. *International Journal of Food Microbiology*, 108, 210-217.

<sup>2</sup> Folio, P., 2003. Etablissement d'une base de données protéomique de *Listeria monocytogenes* EGDE. Approches protéomique et transcriptomique de l'adhésion et de la formation d'un biofilm par *Listeria monocytogenes*. Thèse de Docteur es science, Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand

<sup>3</sup> Planchon Stella, 2006. Thèse de l'Université Clermont-Ferrand II. Aptitude de *Staphylococcus carnosus* et *Staphylococcus xylosus* à former des biofilms. Etude d'une souche « biofilm-positif » par une approche protéomique.

Dans le biofilm, l'activité des micro-organismes est variable : vers la surface, les bactéries sont en phase de multiplication. En profondeur, comme la diffusion de l'oxygène et des nutriments est plus faible et que des variations de pH et en métabolites ont lieu, le métabolisme bactérien ralentit pour s'adapter à ces conditions moins favorables. La croissance en biofilm confère néanmoins des avantages aux bactéries : les résistantes aux antimicrobiens, aux désinfectants et aux agressions environnementales (dessiccation, carence...) sont souvent accrues (Mah et O'Toole, 2001)<sup>1</sup>.

Dans l'environnement, les biofilms sont parfois soumis à des cycles d'humidification/séchage. Or les effets de la dessiccation ou de la déshydratation sur les bactéries en biofilm sont peu renseignés. Les compétences acquises pendant mes premières années de recherches me permettront de prendre en compte les caractéristiques physico-chimiques de l'environnement et des milieux sur le développement d'un biofilm. Je caractériserai la physiologie de *S. xylosus* C2a lors d'un stress hydrique (dessiccation) ou osmotique (NaCl) sur un support alimentaire (milieu gélatine) et sur un support abiotique (verre ou acier). J'ai montré en effet que pour une  $a_w$  donnée, la croissance de *L. innocua* était plus rapide en milieu liquide et en milieu gélifié en présence de NaCl, qu'en milieu gélifié lorsque l' $a_w$  était contrôlée par la teneur en eau. Ces deux types de stress liés à l'eau sont décrits dans la littérature (Potts, 1994)<sup>2</sup> :

- le stress osmotique intervient lorsque les cellules bactériennes sont placées dans une solution aqueuse contenant des solutés qui ne peuvent pas pénétrer dans la cellule. En conséquence, un flux d'eau de l'intérieur de la cellule vers l'extérieur se met en place pour atteindre un équilibre entre les deux compartiments ;
- le stress hydrique intervient lorsqu'il y a séchage. La perte d'une fraction de l'eau de la cellule lors du stress hydrique est appelée dessiccation.

Lors d'un stress hydrique, l'environnement immédiat est l'atmosphère alors que pour un stress osmotique, les cellules sont exposées à un milieu aqueux. Ces deux stress ont des répercussions sur le volume, la structure et l'activité cellulaire. La cellule met en jeu des mécanismes physiques passifs (flux d'eau) et des mécanismes biochimiques actifs (synthèses métaboliques). Dans ce dernier cas, l'équilibre entre le milieu intracellulaire et extracellulaire peut être atteint si la cellule accumule des solutés osmocompatibles : les ions  $K^+$  et les acides

---

<sup>1</sup> Mah, T. F., O'Toole, G. A., 2001. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. Trends in Microbiology 9, 34-39.

<sup>2</sup> Potts, M., 1994. Desiccation tolerance of prokaryotes. Microbiological Reviews 58, 755-805.

aminés (glutamate, proline, glycine bêtaïne) sont accumulés par transport lorsqu'ils sont présents dans l'environnement et/ou par synthèse. Le stress osmotique est bien documenté dans la littérature : les systèmes de transport sont décrits et les gènes correspondants identifiés. L'effet du stress hydrique est par contre moins étudié. En général, on suppose que la faible quantité d'eau libre du cytoplasme est suffisante pour assurer la croissance bactérienne, mais lorsqu'une cellule est sujette au séchage, elle n'a pas la capacité de mettre en place un mécanisme pour sa protection car il n'y a plus d'eau disponible. Ceci pourrait donc expliquer en partie pourquoi le stress osmotique est moins inhibiteur que le stress hydrique à une même  $a_w$ . Il serait intéressant de comprendre l'effet de ces deux stress sur des cellules en biofilm.

Par ailleurs, dans l'équipe, M. Hébraud et M. Desvaux travaillent sur les mécanismes de formation de biofilm sur un autre modèle bactérien, *L. monocytogenes*. Si *S. xylosum* C2a produit une grande quantité d'exopolysaccharides, *L. monocytogenes* forme des biofilms via un autre mécanisme. L'étude et la comparaison de ces deux bactéries nous permettront de mieux comprendre les mécanismes mis en jeu lors de leur croissance et survie dans des environnements agroalimentaires.

J'envisage d'utiliser des méthodes de détections par fluorochromes ou de marquages de *S. xylosum* C2a par la Green Fluorescent Protein. Les outils de microscopie comme la microscopie à épifluorescence (un appareil est disponible dans l'Unité Microbiologie de l'INRA de Theix) ou la microscopie confocale (un appareil est présent sur le site de l'Université de Clermont-Ferrand) seront utilisés pour l'étude des biofilms. Cette étude peut aussi être abordée par la génomique fonctionnelle. En effet pour étudier l'ensemble des protéines exprimées et mettre en évidence des réseaux de régulation, S. Planchon a développé une approche de protéomique pour comparer les bactéries en biofilm et en milieu liquide en se focalisant sur les protéines de parois et de membranes. L'analyse transcriptomique est en cours de développement dans l'équipe. Cette analyse sera facilitée car le génome de *S. xylosum* C2a est en cours de séquençage par S. Leroy. Ces différentes informations permettront d'expliquer les mécanismes moléculaires impliqués dans la formation des biofilms dans des conditions de stress osmotiques et hydriques.

## **ACTIVITES D'ADMINISTRATION ET RESPONSABILITES COLLECTIVES**

Au sein de l'Equipe Microbiologie, j'ai animé l'activité Microbiologie du thème Microbiologie Prévisionnelle en collaboration avec A. Lebert (équipe GP) qui en était le responsable. Dans cette animation, je distingue trois grandes parties, deux concernaient l'activité Microbiologie Prévisionnelle avec d'une part la réalisation des expériences et le fonctionnement au laboratoire et d'autre part l'encadrement des personnes. La troisième concernait la gestion de projets en rapport avec ce thème.

En ce qui concerne l'aspect expérimental, j'ai demandé dès le début la construction d'un laboratoire de classe 2 car l'étude portait sur une bactérie pathogène *L. monocytogenes*. Pour la mise en place du thème de recherches, des appareils ont été acquis. Leurs capacités à répondre à nos travaux ont été évaluées afin de réaliser notre choix final : un photomètre lecteur de microplaques (Bioscreen C, Labsystem), un fermenteur (cuves 2 et 4 litres, Sétric Génie Industriel et les capteurs de température, pH, O<sub>2</sub>, débit-mètres massiques nécessaires à son utilisation), un ensementeur spiral (Interscience). Pour concevoir et construire la soufflerie microbiologique, de nombreuses réunions ont été nécessaires pour définir les contraintes microbiologiques, aérauliques qui devaient être respectées. Ces réunions ont rassemblé des microbiologistes et des personnes de l'équipe GP (A. Lebert et trois techniciens). Le coût de cette soufflerie est évaluée à environ 120 000 euros.

J'ai régulièrement organisé des réunions de travail avec les différents chercheurs concernés par le thème de recherche entre 1991 et 2005 (A. Lebert, J.D. Daudin et C.G. Dussap).

En ce qui concerne la gestion des projets, le thème de la Microbiologie Prévisionnelle a été initié dans le cadre du projet de recherches UNIR. J'ai également participé à d'autres projets de recherches (Organotechnie, Arilait). Ces contrats se sont élevés en moyenne à environ 15 000 euros par an durant dix ans, somme que j'ai gérée directement. Cette somme a été doublée par des prestations de services connexes réalisées par A. Lebert.

Dans le cadre de Sym'Prévius (Centre National de Compétence en Microbiologie Prévisionnelle), j'ai réalisée des prestations de services et participé aux réunions de deux sous-groupes. Le sous-groupe « Bibliographie » concernait le fonctionnement de la base de données Sym'Prévius et le choix des publications à saisir dans la base ainsi que les méthodes de saisies des données de la bibliographie. Le sous-groupe « Stress et latence » visait à mieux

cerner l'effet de stress (thermiques, osmotiques, acides ou autres) sur les temps de latence et en particulier la distribution des temps de latence individuels après un choc.

J'ai aussi participé au montage de projets (Projets AQS (Aliment Qualité Sécurité), projet ACTIA, réseau RARE) ce qui m'a mis en contact avec les centres techniques ACTIA (ADIV, CTSCCV, ADRIA Quimper) ou avec d'autres équipes de l'URV. Seule une minorité de projets a pu aboutir.

Dans l'équipe Microbiologie, j'ai la responsabilité du laboratoire de classe 2 en ce qui concerne sa gestion (planning des expériences et utilisation des appareils), son occupation et l'encadrement des personnes. En effet des personnes (permanents ou stagiaires de l'équipe de Microbiologie ou de l'équipe GP) autres que celles travaillant en microbiologie prévisionnelle, y interviennent. Je leur indique à leur arrivée les consignes propre à ce lieu de travail et les règles d'hygiène et sécurité. Pour les étudiants venant de l'équipe GP, j'encadre leur travail d'un point de vue microbiologique et apporte des conseils sur les thèmes développés dans leur équipe et intégrant de la microbiologie (aérobiocontamination, décontamination de surface par la vapeur).

En matière de responsabilités collectives au sein du Centre de Theix :

- je participe au bon fonctionnement de l'ensemble du laboratoire. La rénovation des laboratoires a nécessité plusieurs déménagements et j'ai été amenée à proposer des aménagements des locaux, suivre l'avancement des travaux et discuter avec le responsable du service travaux du Centre.
- ayant été Agent Chargé de Prévention de 1992-1998, je reste toujours vigilante quant à la sécurité dans les laboratoires en participant à l'encadrement et à la surveillance du personnel et des étudiants.
- au sein de l'Unité de Recherches sur la Viande, j'ai été correspondante de 1998 à 2005 de la revue Echos des Puy diffusée au sein du centre de Clermont-Ferrand Theix.

Depuis juin 2006, j'ai été nommée par E. Forano, animatrice qualité de l'Unité de Microbiologie. L'animateur qualité est l'interlocuteur de l'Unité auprès du département de recherche INRA, du Centre de recherche et de la Mission Qualité auprès de la Direction Générale de l'INRA. Il planifie avec le Directeur d'Unité les actions Qualité à engager, les organise et il gère les documents Qualité. Je succède à Christel Maillet, avec qui j'ai eu des réunions régulières depuis mars 2006, sur les actions Qualités déjà menées dans l'Unité depuis



2001. Je serai aidée dans mon travail par un responsable de la métrologie (Y. Ribot) et un adjoint Qualité (B. Jaffeux).

J'ai participé à plusieurs reprises à la relecture d'articles scientifiques à la demande des éditeurs de revues internationales dans lesquelles je publie (International Journal of Food Microbiology, Food Microbiology).

Depuis 1992, j'ai co-encadré 10 élèves ingénieurs ou équivalent, 4 étudiants en DEA, 5 étudiants en thèse, 1 post-doc. Pendant ma thèse, j'ai encadré et organisé le travail de quatre personnes : S. Portanguen, technicien de la recherche de l'équipe GP, S. Chandez, élève en BTS (2 mois), O. Chantreau (DEA, 7 mois) et un ingénieur (C. Nicolas, CDD 15 mois). J'ai, pendant ma thèse, co-encadré la thèse de V. Zuliani. J'ai encadré de février à juin 2006, J. Po, étudiant en Licence Professionnelle, sur un sujet concernant la gestion des échantillons dans le cadre du référentiel qualité à l'INRA.

L'encadrement et la formation d'étudiants revêt une grande importance et représente un fort investissement en temps. Cet investissement porte majoritairement sur le travail en laboratoire en début de stage, puis sur l'interprétation de résultats et la rédaction en fin de stage. J'essaie d'aider les étudiants à s'intégrer dans le monde du travail et à travailler dans une équipe. Ils doivent apprendre à acquérir de nouvelles connaissances tant techniques que théoriques, et savoir les retransmettre par des présentations orales ou des documents écrits. J'ai pu m'adapter à chaque niveau d'étudiants que j'ai reçu (de niveau BTS à niveau Post-doc) en proposant des sujets ou des projets en accord avec leur formation. Mon objectif étant qu'ils réalisent un travail rigoureux dans lequel je peux avoir confiance, et qu'ils acquièrent l'autonomie nécessaire à la poursuite de leur projet

J'ai participé à des jurys d'admission de futurs élèves ingénieurs au CUST qui consistent à sélectionner les candidats lors d'un entretien oral en présence de deux ou trois juges. Chaque candidat est jugé, entre autre, sur la manière dont il présente son cursus scolaire et ses activités extrascolaires, sur ses motivations et à travers ces discussions, son aptitude à communiquer. Je participe également à des jurys d'examen du BTS Anabiotec du Puy en Velay. Dans ce cadre, j'interviens lors des examens de pratiques expérimentales qui servent à valider leur diplôme.

Depuis 2001, j'ai été sollicitée pour participer à l'enseignement de la Microbiologie Prévisionnelle à trois niveaux différents :

- A l'IUT d'Aurillac, j'interviens en 2<sup>ème</sup> année auprès d'élèves en analyse biologique option bio-informatique pour 4 heures de cours et 9 heures (3 x 3h) de travaux pratiques en bio-informatique. Ces élèves doivent acquérir une double compétence en biologie et en informatique. De ce fait, 2h de cours sont consacrées à la microbiologie des aliments, et j'insiste sur les bactéries responsables de toxi-infections alimentaires car elles sont prépondérantes en microbiologie prévisionnelle. Les 2h suivantes présentent la Microbiologie Prévisionnelle : courbe de croissance et paramètres associés, modèles utilisés, application en milieu industriel. 3h de travaux pratiques en salle informatique complètent le cours théorique et chaque étudiant développe un modèle de prédiction de la croissance bactérienne à partir de données expérimentales que je leur fournis. Ils manipulent également un logiciel disponible sur le WEB, le Pathogen Modelling Program.
- A l'école d'ingénieurs du CUST de Clermont-Ferrand, de 2001 à 2004, j'ai réalisé 2h de cours en microbiologie prévisionnelle à des élèves de 3<sup>ème</sup> année Département Génie Biologique. Après de brefs rappels sur les courbes de croissance, la définition de la microbiologie prévisionnelle et le contexte dans lequel se situe cette discipline, j'abordais de manière plus approfondie les modèles avec leurs avantages, leurs inconvénients et leurs limites. Les applications industrielles de ces modèles étaient également présentées.
- Au mastère de Nutrition et Sciences des Aliments de Clermont-Ferrand en 1<sup>ère</sup> et 2<sup>ème</sup> année. Depuis 2001 je suis intervenue dans le DEA (Mastère deuxième année, M2) où j'aborde en 4 heures les trois points suivants : (1) les bactéries responsables de toxi-infections alimentaires, (2) le concept HACCP (Hazard Analysis and Critical Control Point) et (3) la Microbiologie Prévisionnelle. En 2004, du fait de la mise en place du système Licence-Mastère-Doctorat, le cours de microbiologie prévisionnelle a été scindé avec 2 heures en 1<sup>ère</sup> année et 2h en 2<sup>ème</sup> année.

## **ACTIVITES DE RECHERCHES**

## INTRODUCTION

Les produits alimentaires subissent des opérations technologiques qui entraînent des modifications physico-chimiques et aboutissent à la sélection de certains genres et espèces microbiens. Ces micro-organismes peuvent être indésirables (bactéries pathogènes ou d'altération) ou au contraire recherchés (microflore technologique). Leur identification et la connaissance de leur croissance dans des conditions environnementales connues permettent d'évaluer les effets de la fabrication, de la distribution et de la conservation sur les problèmes de contrôle-qualité et de sécurité alimentaire. La qualité et la sécurité des aliments passent donc par la maîtrise de la sécurité microbiologique tout au long du processus de production, depuis l'animal ou le végétal jusqu'au produit à consommer. Trois groupes sont concernés par la sécurité alimentaire :

- les consommateurs, ils sont en droit d'attendre des produits alimentaires de bonnes qualités hygiéniques et organoleptiques ;
- les industriels de l'agroalimentaire, leur responsabilité est engagée car ils se doivent de produire des aliments à la fois nourrissants, savoureux, économiques mais surtout sains ;
- les pouvoirs publics, ils doivent pouvoir imposer des règles de production et de vente des produits alimentaires.

C'est dans ce cadre qu'un centre de compétence en Microbiologie Prévisionnelle, Sym'Prévious, a été mis en place en 1998. Sym'Prévious réunit des laboratoires de Recherches publics (ENVA<sup>1</sup>, INRA, INA-PG<sup>2</sup>), des centres techniques ACTIA<sup>3</sup>, des entreprises membres de l'association UNIR et les pouvoirs publics (Direction Générale de l'Alimentation).

La microbiologie prévisionnelle a pour but de prédire le devenir d'un microorganisme contaminant un produit lors d'un accident de fabrication (mauvais dosage d'un inhibiteur,...), de conservation (rupture de la chaîne du froid,...) ou lors de la modification du produit (formulation, composition,...) et de prédire la durée de vie des produits. Les modèles mathématiques développés en microbiologie prévisionnelle décrivent les effets de facteurs environnementaux (température, pH, activité de l'eau,...) sur le taux de croissance d'un micro-organisme, sur le temps nécessaire pour atteindre un niveau donné de population microbienne ou sur la production de métabolites.

---

<sup>1</sup> Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort

<sup>2</sup> Institut National Agronomique de Paris-Grignon

<sup>3</sup> Association des Centres Techniques de l'Industrie Alimentaire

Jusqu'à présent, une quantité importante d'informations a été accumulée sur le comportement des microorganismes dans des milieux liquides et solides de composition et de texture proches de l'aliment en fonction de leurs propriétés physico-chimiques. Ces données ont permis de construire des modèles de microbiologie prévisionnelle, c'est-à-dire des modèles prédisant la croissance des populations bactériennes en fonction des propriétés physico-chimiques du milieu et de l'environnement. Théoriquement, ces modèles permettent d'étudier l'effet des variables caractérisant les procédés (conditions de fabrication, conservation,...) et les produits (composition des aliments) sur le développement des microorganismes. Dans la pratique, les variables caractérisant les procédés et les produits ne sont mesurées qu'à un instant donné et que dans un endroit précis. Leurs variations spatiale et temporelle sont rarement prises en compte et manquent pour prédire correctement le comportement des micro-organismes. Aussi est-il nécessaire d'avoir des données caractérisant en continu le produit ou le procédé pour modéliser puis prédire les propriétés physico-chimiques des produits et les caractéristiques des procédés.

Seule une approche globale et complète de la prédiction de la qualité et de la sécurité microbiologique des aliments peut répondre à cette problématique mais cela fait appel à plusieurs disciplines : microbiologie, génie des procédés et thermodynamique appliquée. La Figure 3 définit un organigramme général qui sous-tend la totalité de mon travail. Un aliment, milieu liquide ou solide, est caractérisé par des propriétés physico-chimiques – le plus souvent non uniformes dans le produit - qui influencent le développement des microorganismes. Ce dernier est décrit par les modèles de croissance ou de destruction (microbiologie prévisionnelle) et de production de métabolites : les paramètres de croissance (temps de latence et temps de génération) ou de destruction sont estimés en fonction des variables qui décrivent l'environnement microbien. L'accroissement ou la décroissance de la population bactérienne est ainsi estimé. Un accroissement de population conduit à la consommation et/ou à la production de métabolites ce qui peut être représenté par des modèles stœchiométriques prenant en compte la conversion de la source de carbone en produits du métabolisme de la bactérie. La composition du milieu et l'environnement microbien sont donc modifiés par l'activité des bactéries mais aussi par les transferts d'eau et de solutés. La prise en compte de l'effet des variables de commande des procédés sur les transferts de matière et de chaleur apporte des informations indispensables et supplémentaires sur l'évolution de la composition des aliments. Ceci permet de calculer les propriétés physico-chimiques qui influencent à leur tour le développement microbien.

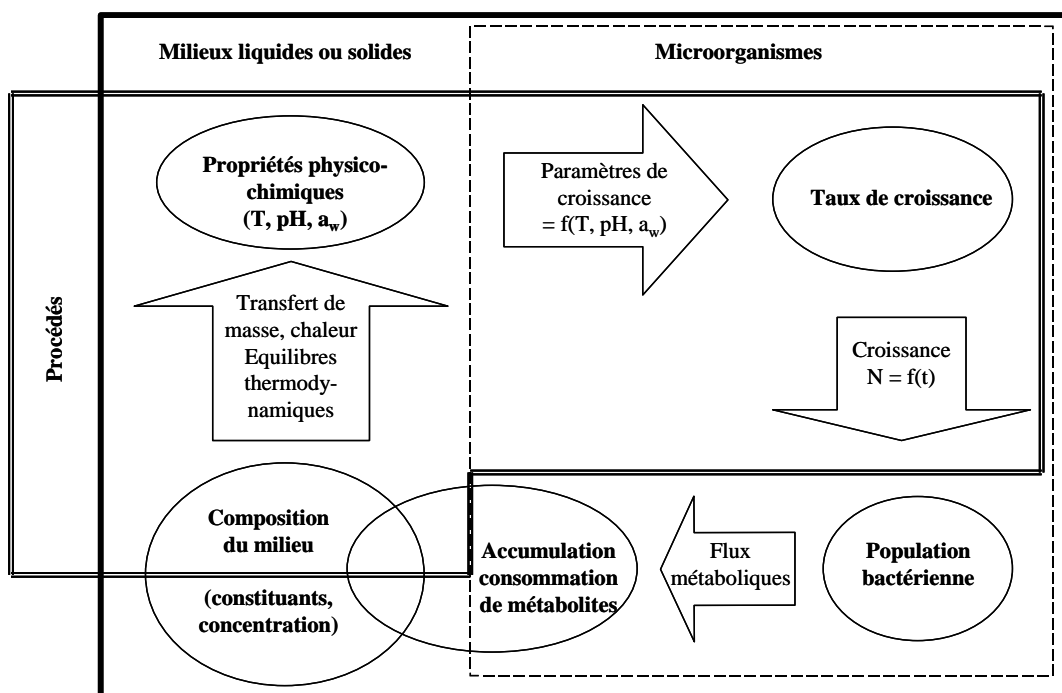


Figure 3 : Stratégie de modélisation intégrée des propriétés physico-chimiques des aliments et du développement des populations bactériennes subissant un procédé de fabrication.  $\Rightarrow$ , Modèles ;  $\circ$ , Variables quantifiées et estimées ; N, population bactérienne ; T, température ;  $a_w$ , activité de l'eau.

Ce schéma fait ressortir des interactions complexes. Même si des modèles existent à chaque étape, ils ont généralement été construits isolément, avec des objectifs propres à leur mise en place et selon des hypothèses précises et ne sont ainsi applicables que dans des conditions restreintes. L'objectif de nos recherches est d'intégrer plusieurs disciplines différentes dans le but de prédire la qualité et la sécurité des aliments en tenant compte des procédés appliqués à l'aliment.

De façon globale, il y a trois champs disciplinaires à prendre en compte :

- la microbiologie, avec la caractérisation et la modélisation de la croissance et de la décroissance cellulaire et la production de métabolites ;
- le génie des procédés avec la caractérisation et la modélisation des transferts de matière et de chaleur ;
- la thermodynamique appliquée avec la mesure et la prédiction des propriétés physico-chimiques d'un aliment en fonction de sa composition.

Parmi les nombreux modèles disponibles, nous avons choisi ceux qui permettaient une approche phénoménologique c'est-à-dire décrivant et prédisant les phénomènes sous-jacents

dans chaque discipline. En microbiologie et en génie des procédés, nous avons adapté des modèles existants aux besoins de nos travaux. En thermodynamique appliquée, la prédiction des propriétés physico-chimiques des aliments est un aspect peu abordé mais indispensable pour tenir compte de la composition d'un aliment. Les modèles de prédiction des propriétés physico-chimiques sont basés sur des modèles de solutions et sur la caractérisation des équilibres thermodynamiques : ils ont été développés au départ pour une utilisation dans le domaine de la chimie et de la pétrochimie. Ce travail a montré qu'une méthodologie identique pouvait être appliquée dans le cas des milieux proches des aliments.

Pour quantifier le comportement d'une bactérie présente dans un aliment soumis à un procédé, nous avons développé une activité de recherche dans chacune des disciplines. Ainsi ce document comprend-il quatre chapitres :

- le premier chapitre « Expérimentation et modélisation de la croissance bactérienne dans les aliments » présente les activités de recherches en Microbiologie. Les résultats expérimentaux nécessaires aux développements des modèles et les modèles obtenus sont présentés.
- le deuxième chapitre « Expérimentation et modélisation des transferts de matière et de chaleur dans les aliments » présente les activités de recherches en Génie des Procédés. Les appareils et techniques expérimentales sont détaillés. Les modèles de transfert sont présentés ainsi que les méthodes pour optimiser les paramètres nécessaires à leur application.
- le troisième chapitre « Expérimentation et modélisation des caractéristiques physico-chimiques des aliments » présente les activités de recherches en Thermodynamique appliquée. Les choix de matériel de mesure et les données expérimentales sont présentés car ils permettent ensuite de valider les prédictions du modèle thermodynamique dans des milieux aqueux de plus en plus complexes.
- le dernier chapitre présente l'aboutissement et la combinaison des modèles issus des trois activités de recherches. En effet, l'intégration de chacun des modèles permet de prédire le comportement de bactéries présentes dans un aliment de caractéristiques connues et soumis à un procédé de fabrication ou de conservation.

**ACTIVITE DE RECHERCHES 1**

**EXPERIMENTATION ET MODELISATION  
DE LA CROISSANCE BACTERIENNE DANS LES ALIMENTS**



Acquis techniques	Acquis scientifiques
<ul style="list-style-type: none"> <li>- méthodologies de suivie du comportement bactérien               <ul style="list-style-type: none"> <li>- en milieu de culture liquide</li> <li>- en surface de viande (décontaminée ou non)</li> <li>- en viande hachée (porc, bœuf)</li> <li>- en surface de gélatine</li> <li>- en condition constantes ou variables (T, pH, a<sub>w</sub>)</li> </ul> </li> <li>- mise au point d'un milieu solide à base de gélatine</li> <li>- contrôles des propriétés physico-chimiques des milieux : teneur en eau, pH, a<sub>w</sub>, température, concentration en solutés</li> <li>- statistiques et traitements des données               <ul style="list-style-type: none"> <li>- plan d'expériences</li> <li>- méthodes d'analyses des données multifactorielles (ACP, classification)</li> <li>- régression linéaire multiple</li> <li>- régression non linéaire</li> <li>- [réseaux de neurones] <sup>1</sup></li> </ul> </li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- diversité du comportement de souches bactériennes               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 58 <i>Listeria monocytogenes</i> et 8 <i>Listeria innocua</i></li> <li>→ une souche de <i>L. monocytogenes</i> retenue par Sym'Previus</li> <li>- 40 <i>Pseudomonas fragi</i> et 19 <i>Pseudomonas fluorescens</i></li> </ul> </li> <li>- comparaison des croissances entre milieux - liquide et solide               <ul style="list-style-type: none"> <li>- liquide/surface de viande/viande hachée</li> <li>- liquide/gel de gélatine</li> </ul> </li> <li>- croissances en fonction               <ul style="list-style-type: none"> <li>- a<sub>w</sub> et type de solutés</li> <li>- pH et type d'acide ou base</li> </ul> </li> <li>- croissances en conditions               <ul style="list-style-type: none"> <li>- constantes</li> <li>- variables dans le temps (pH, a<sub>w</sub>)</li> </ul> </li> <li>- modèles de croissance secondaires               <ul style="list-style-type: none"> <li>- polynomiaux (<i>Listeria</i> et <i>Pseudomonas</i>)</li> <li>- Augustin (1999) <sup>2</sup></li> </ul> </li> </ul>
	<p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">Validation des modèles de prédiction de la croissance de <i>Listeria</i> et de <i>Pseudomonas</i> dans différents milieux et aliments en fonction de la température, du pH et de l'a<sub>w</sub></p>

Entre crochets : réalisations indispensables à mes activités de recherche, mais non réalisées par moi-même.

<sup>1</sup> réalisé par Cheroutre-Vialette M. et Lebert A. (Cheroutre-Vialette, M., Lebert, A., 2002. Application of recurrent neural network to predict bacterial growth in dynamic conditions. International Journal of Food Microbiology 73, 107-18)

<sup>2</sup> Augustin, J.-C., 1999. Modélisation de la dynamique de croissance des populations de *Listeria monocytogenes* dans les aliments. 153 p., These de Docteur es science, Université Claude Bernard - Lyon 1.

Co-encadrement :

- quatre thèses de l'Université Clermont-Ferrand II:

Laplace-Bégot (1996) Mesure et modélisation de la croissance de *Listeria* en milieu liquide et en surface de viande

Robles-Olvera (1999) Comparaison de la croissance de *Pseudomonas* species et *Listeria* species en milieu liquide et en viande de bœuf

Cheroutre-Vialette (1999) Croissance de *Listeria monocytogenes* soumise à des chocs acides, basiques et osmotiques. Mesure et modélisation

Zuliani (2005) Prédiction de la contamination bactérienne lors de la fabrication et de la conservation d'un aliment – Application à de la viande de porc contaminée par *Listeria monocytogenes*

- trois DEA : Laplace (1992), Lauro (1995), Baucour (1996)

- cinq élèves-ingénieurs : Guidicelli (1993), Bordes (1994), Kehoane (1994), Lauro (1994), MacNally (1996)

- un groupe de 4 élèves-ingénieurs : Boulanger, Kerguillec, Lambert, Lauro (1993)

Encadrement :

- un DEA : Chantreau (2003) et un BTS : Chandez, (2002)

Production scientifique sur cette activité:

- onze publications :

Bégot C., Desnier I, Lebert A., Daudin J.D., Labadie J.C. (1996). Recommendations for calculating growth parameters by optical density measurements. *Journal of Microbiological Methods*, 25, 225-232.

**A1** Bégot C., Lebert I., Lebert A. (1997). Variability of the response of 66 *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* strains to different growth conditions. *Food Microbiology*, 14, 403-412.

Lebert I., Lebert A. (1997). Microbiologie prédictive : Théorie et applications industrielles. *Microbiologie Aliments Nutrition*, 15, 157-172.

Lebert I., Bégot C., Lebert A. (1998a). Growth of *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas fragi* in a meat medium as affected by pH (5.8-7.0), water activity (0.97-1.00) and temperature (7-25°C). *International Journal of Food Microbiology*, 39, 53-60.

**A2** Lebert I., Bégot C., Lebert A. (1998b). Development of two *Listeria monocytogenes* growth models in a meat broth and their application to beef meat. *Food Microbiology*, 15, 499-509.

**A3** Lebert I., Robles-Olvera V., Lebert A. (2000). Application of polynomial models to predict growth of mixed cultures of *Pseudomonas* spp. and *Listeria* in meat. *International Journal of Food Microbiology*, 61, 27-39

**A4** Cheroutre-Vialette M., Lebert I., Hébraud M., Labadie J.-C., Lebert A. (1998). Effects of pH or  $A_w$  stress on growth of *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*, 42, 71-77.

**A5** Lebert I., Dussap C.G., Lebert A. (2004). Effect of  $a_w$ , controlled by the addition of solutes or by water content, on the growth of *Listeria innocua* in broth and in a gelatine model. *International Journal of Food Microbiology*, 94, 67-78

**A6** Lebert I., Dussap C.G., Lebert A. (2005b). Combined physico-chemical and water transfer modelling to predict bacterial growth during food processes, *International Journal of Food Microbiology*, 102, 305-322.

Zuliani V., Lebert I., Garry P., Vendevre J.-L., Augustin J.-C., Lebert A. (2006, sous presse). Effects of heat processing regime, pH, water activity and their interactions on the behaviour of *Listeria monocytogenes* in ground pork. Modelling the boundary of the growth/no-growth areas as a function of pH, water activity and temperature. *International Journal of Food Science and Technology*.

**A10** Lebert I. et Lebert A. (2006, acceptée) Quantitative prediction of microbial behaviour during food processing using an integrated modelling approach: a review. *International Journal of Refrigeration*

- deux chapitres d'ouvrage : Laplace *et al.* (1993), Lebert I. et Lebert A. (1996)

- six communications orales : Bégot *et al.* (1996), Lebert A. et Lebert I. (1997), Lebert A. *et al.* (2001), Lebert A. et Lebert I. (2002), Lebert I. *et al.* (2003b)

dont une comme invitée : Desnier I. et Lebert A. (1994)

- six posters avec texte : Lebert A. *et al.* (2000), Lebert I. *et al.* (2000a), Lebert I. *et al.* (2000b), Zuliani *et al.* (2003), Lebert I. *et al.* (2004a), Zuliani *et al.* (2004),

- sept posters avec résumé : Laplace *et al.* (1993), Laplace *et al.* (1994), Lebert A. et Desnier I. (1996), Desnier I. *et al.* (1996), Bégot *et al.* (1996), Lebert I. *et al.* (2004), Zuliani *et al.* (2004).

Publications de A1 à A10 données dans le dossier de publications



## 1. Introduction

Si le terme « microbiologie prévisionnelle » est relativement nouveau (il a été défini par Roberts et Jarvis en 1983<sup>1</sup>), le concept n'est pas nouveau. En 1937, Scott <sup>2</sup> précisait que la connaissance du taux de croissance de micro-organismes à différentes températures rendait possible la prédiction de la croissance de la flore contaminante d'altération lors de procédés dépendant de la température. Dans les années 60 et 70, de nombreuses études ont été menées sur la modélisation de la croissance de germes d'altération. Dans les années 80 et 90, l'intérêt s'est porté sur les bactéries pathogènes responsables de toxi-infections alimentaires.

De nombreux modèles ont été développés et des logiciels sont disponibles pour prédire la croissance de nombreux pathogènes [Lebert I. et Lebert A., 2006 – A10]. Dans ces modèles, deux niveaux de calculs sont généralement développés pour caractériser les croissances bactériennes en fonction des propriétés physico-chimiques. Dans un premier temps, une équation décrit la croissance de la population bactérienne en fonction du temps et permet de caractériser la courbe de croissance par des paramètres, tels que le taux de croissance maximum ( $\mu_{\max}$ ) et le temps de latence (L). Dans un second temps, un modèle décrit l'effet des propriétés physico-chimiques sur les paramètres  $\mu_{\max}$  et L.

En 1992, la majorité des modèles (Gibson, et al. 1988<sup>3</sup>, Hudson 1994<sup>4</sup>) était développée à partir d'études de la croissance bactérienne réalisée en milieu liquide de laboratoire. D'abord, seule la température a été étudiée (Ratkowsky et al. 1983<sup>5</sup>), puis le pH, l' $a_w$  ou l'addition de nitrite ont été pris en compte. L'effet des interactions entre les facteurs a été mis en évidence. En 1992, nous avons initié à l'URV la thématique Microbiologie Prévisionnelle dans le cadre d'un contrat de Recherche entre l'INRA et UNIR. Une analyse bibliographique a montré que

---

<sup>1</sup> Roberts T. A. et Jarvis B. 1983 - Predictive modelling of food safety with particular reference to *Clostridium botulinum* in model cured meat systems, in T. A. Roberts et F. A. Skinner (ed.), Food microbiology. Advances and prospects., (London and New York), 85-95.

<sup>2</sup> Scott W. J. 1937 - The growth of micro-organisms on ox muscle. II. The influence of temperature. J. Coun. Sci. Ind. Res. (Aust.), 10, 338-350, cité par McMeekin T. A. et Ross T. - Use of predictive microbiology in relation to meat and meat products. 39th ICoMST, Calgary, 1993, session 6.

<sup>3</sup> Gibson, A. M., Bratchell, N., Roberts, T. A., 1988. Predicting microbial growth: growth responses of *Salmonellae* in a laboratory medium as affected by pH, sodium chloride and storage temperature. International Journal of Food Microbiology 6, 155-178.

<sup>4</sup> Hudson J.A. 1994 Comparison of response surface models for *Listeria monocytogenes* strains under aerobic conditions. Food Res. int., 27, 53-59.

<sup>5</sup> Ratkowsky, D. A., Lowry, R. K., McMeekin, T. A., Stokes, A. N., Chandler, R. E., 1983. Model for bacterial culture growth rate throughout the entire biokinetic temperature range. Journal of Bacteriology 154, 1222-1226.

des différences existaient entre les travaux réalisés en laboratoire et leur possible application en milieu industriel dans les aliments (Tableau 1).

Tableau 1 : Comparaison entre les conditions expérimentales rencontrées en microbiologie prédictive et les conditions régnant dans les aliments

	Conditions expérimentales rencontrées en microbiologie prévisionnelle	Conditions régnant dans les aliments
1	Souches de laboratoires	Souches sauvages
2	Souche(s) d'une seule espèce	Mélange de genres et d'espèces
3	Forte concentration de cellules	Faible à forte concentration de cellules
4	Cellules croissant dans des conditions optimales	Cellules stressées ou endommagées
5	Milieu de culture liquide	Aliment liquide, particulière ou solide
6	En général, 3 facteurs environnementaux	Plus de 3 facteurs environnementaux
7	Conditions expérimentales en régime stationnaire	Conditions en régime transitoire
8	Prédiction unique	Large dispersion des mesures

Cette analyse a montré que la majorité des études étaient réalisées avec des souches de collection qui peuvent avoir des comportements différents des souches isolées de milieu industriel (Hudson, 1992<sup>1</sup>). Dans un aliment, de nombreux genres et espèces coexistent dans l'aliment. De plus les études ont été réalisées en milieu liquide alors que les microorganismes sont sur des aliments solides de natures et de compositions complexes. En conséquence, les modèles de croissance bactérienne, développés à partir des résultats obtenus en milieu liquide, ne peuvent pas s'appliquer immédiatement au cas d'une bactérie placée dans un milieu solide (Walls et al. 1996<sup>2</sup> ; Walls et Scott, 1997<sup>3</sup>). Les modèles sont généralement développés à partir d'expériences réalisées en régime stationnaire, et n'intègrent ainsi pas les régimes transitoires qui existent systématiquement dans les procédés de fabrication et de stockage des aliments.

Dans ce cadre, l'objectif de nos recherches était d'étudier le devenir d'une (re)contamination accidentelle par des micro-organismes pathogènes ou d'altération de surfaces alimentaires solides en conditions environnementales variables, en présence ou non

---

<sup>1</sup> Hudson, J. A., 1992. Variation in growth kinetics and phenotype of *Aeromonas* spp. from clinical, meat processing and fleshfood sources. *International Journal of Food Microbiology* 16, 131-139

<sup>2</sup> Walls, I., Scott, V. N., Bernard, D. T., 1996. Validation of predictive mathematical models describing growth of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Food Protection* 59, 11-15.

<sup>3</sup> Walls, I., Scott, V. N., 1997. Validation of predictive mathematical models describing the growth of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection* 60, 1142-1145.

de la flore naturelle et de prédire le devenir de cette contamination. Nos travaux de recherches en Microbiologie Prévisionnelle ont abordé les points 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8 du Tableau 1.

Par rapport à la Figure 3, dans cette activité de recherches en microbiologie, la modélisation n'a porté que sur la bactérie ( $N=f(t)$  et paramètres de croissance =  $f(a_w, pH, T)$ ). Les paramètres physico-chimiques (température,  $a_w$ , pH, quantité de solutés) étaient mesurés ou leur quantité était connue dans le milieu utilisé.

## **2. Souches bactériennes**

### **2.1. Choix du genre et des espèces**

L'étude étant menée dans le cadre d'un contrat avec l'association UNIR, le choix s'est porté sur deux genres bactériens présents dans les produits carnés : *Listeria* et *Pseudomonas*.

En 1992, *Listeria monocytogenes* a été responsable d'une épidémie de listériose due à la présence de la bactérie dans de la langue de porc en gelée. 63 décès et 22 avortements ont été enregistrés sur les 279 cas recensés pendant cette épidémie (Rocourt et al. 1992<sup>1</sup>). Dans notre étude, nous avons travaillé sur 66 souches de *Listeria* principalement isolées de viande, produits carnés ou matériel d'usine. Sur les 58 *L. monocytogenes*, cinq étaient responsables d'épidémies aux USA ou en France, 15 étaient isolées de sites industriels et les 38 autres étaient des souches de collection. Huit souches appartenait à l'espèce non pathogène *L. innocua* [Bégot et al. 1997 – A1].

Le genre *Pseudomonas*, et en particulier les espèces *Pseudomonas fragi* et *Pseudomonas fluorescens*, a été choisi pour son rôle dans l'altération des viandes et produits carnés. Ces deux espèces sont responsables de dégradations de la qualité hygiénique des viandes conservées à l'air et au froid. A partir d'une concentration de  $10^6$  bactéries /g, des défauts de couleur (verdissement de la viande), d'odeur et d'aspect (poissage en surface) apparaissent et rendent la viande impropre à la consommation. Leur développement entraîne une diminution de la durée de vie des produits alimentaires. 59 souches de *Pseudomonas* ont été étudiées. Les 40 *P. fragi* et 19 *P. fluorescens* ont été isolés de viandes et produits carnés [Bégot et al. 1998a].

---

<sup>1</sup> Rocourt, J., Goulet, V., Lepoutre-Toulemon, A., Jacquet, Ch., Catimel, B., Rebiere, I., Miegerville, A. F., Courtieu, A. L., Pierre, O., Dehaumont, P., Veit, P., 1993. Epidémie de listériose en France en 1992. Méd. Mal. Infect. 23, 481-484

## 2.2. Caractérisation des souches en milieu liquide en fonction de l' $a_w$ , du pH et de la température - sélection des souches représentatives

Cette étude avait pour but de sélectionner deux ou trois souches représentatives de l'ensemble des souches étudiées. Le choix a été réalisé en fonction de leur capacité à croître dans des conditions caractéristiques des produits carnés et des trois facteurs influençant principalement la croissance bactérienne : la température, le pH et l' $a_w$ .

Les outils expérimentaux et de modélisation ont été choisis et mis en place pour la réalisation de ces expériences.

- C. Bégot (thèse, 1996) a suivi les croissances bactériennes dans un milieu Bouillon Tryptone Viande (BTV) [protéose peptone 10 g/kg eau, tryptone 5 g/kg eau, extrait de viande 10 g/kg eau, glucose 5 g/kg eau) tamponné avec  $K_2HPO_4$ - $KH_2PO_4$  0,1M pour contrôler le pH. L' $a_w$  était ajustée par l'ajout de NaCl. Les cinétiques de croissance étaient mesurées par densité optique avec un photomètre (Bioscreen C, Labsystems)) [Bégot et al., 1996].
- Pour permettre de mieux différencier le comportement des souches, des plans d'expériences ont été réalisés. Du fait du nombre de souches à étudier, il n'était pas envisageable de réaliser des plans d'expérience complets. En effet, deux niveaux par facteur (température, pH et  $a_w$ ) représentent 8 expériences. Trois niveaux par facteurs représentent 27 expériences.
  - Pour *Listeria* [Bégot et al., 1997 - A1], deux niveaux par facteurs ont été choisis (T : 10 - 37°C ;  $a_w$  : 0,96 - 1,00 ; pH : 5,6 - 7,0). En utilisant les matrices de Hadamard, le nombre d'expériences a été réduit de 8 à 4.
  - Pour *Pseudomonas* [Lebert I. et al., 1998a], un plan factoriel fractionnaire a été utilisé pour lequel neuf conditions étaient étudiées au lieu de 27 pour un plan factoriel complet. Chaque facteur était testé 3 fois à chaque niveau avec pour la température, 7 - 16 - 25°C ; pour le pH, 5,8 - 6,4 - 7,0 et pour l' $a_w$  0,970 - 0,985 - 1,000.
- Pour chaque cinétique de croissance obtenue dans chacune des conditions des plans d'expérience, les trois paramètres de croissance (temps de latence L, vitesse maximale

de croissance  $\mu_{\max}$  et population maximale atteinte A) étaient optimisés par régression non linéaire en utilisant l'équation modifiée de Gompertz (Zwietering et al., 1991<sup>1</sup>). L'équation de Gompertz était dans les années 90, l'équation la plus utilisée du fait de sa simplicité [Lebert I. et Lebert A. 2006 – A10].

- Chaque lot de données (*Listeria* et *Pseudomonas*) a été analysé par une analyse en composantes principales, pour vérifier l'homogénéité du comportement des souches étudiées. Ensuite une classification hiérarchique ascendante a été réalisée pour grouper les souches ayant des caractéristiques de croissance similaires. Une grande diversité de comportement a été observée entre les 66 souches de *Listeria* sans pour autant séparer les *L. monocytogenes* des *L. innocua* [Bégot et al., 1997 – A1]. Les résultats ont montré que les souches isolés de sites industriels avaient des temps de latence et des temps de génération plus courts que ceux des souches de collection. Deux souches ont été sélectionnées :

- *L. monocytogenes* CLIP 19532, appartenait au groupe des souches (15 individus) ayant une croissance plus lente que la moyenne de la population dans toutes les conditions étudiées.
- *L. monocytogenes* 14, isolée de sols et de matériels d'usine agroalimentaire, appartenait au groupe des souches (10 individus) ayant une croissance plus rapide que la moyenne de la population dans toutes les conditions étudiées. *L. monocytogenes* 14 a été ensuite retenue comme souche type dans les études de Sym'Previus. *L. innocua* CLIP 20595 a été également sélectionnée pour son caractère non pathogène et pour ses caractéristiques de croissance proche de celles de *L. monocytogenes* 14. Elle a permis de réaliser les expériences en laboratoire ou dans un hall technologique (soufflerie microbiologique) où la manipulation de *L. monocytogenes* n'était pas possible.

Une grande diversité de comportement a été également observée pour les *Pseudomonas* mais dans ce cas, chaque espèce représentait un groupe, celui des *P. fragi* étant caractérisé par des temps de latence plus courts [Lebert I. et al., 1998a]. Trois souches ont été sélectionnées : deux *P. fragi*, l'un (*P. fragi* 162) caractérisé par une croissance rapide dans toutes les

---

<sup>1</sup> Zwietering, M. H., De Koos, J. T., Hasenack, B. E., De Wit, J. C., Van't Riet, K., 1991. Modeling of bacterial growth as a function of temperature. Applied and Environmental Microbiology 57, 1094-1101.



conditions de l'étude et l'autre (*P. fragi* K1) avec une croissance plus lente. Une souche de *P. fluorescens* 58 a été sélectionnée pour ses temps de latence longs.

La variabilité de comportement des souches d'un même genre (*Listeria*) ou d'espèces différentes (*Pseudomonas*) a été prise en compte dans le développement des modèles de prédiction de la croissance en choisissant dans chaque cas une souche à croissance rapide et une à croissance plus lente. La stratégie était de définir un domaine (défini par la souche la plus rapide et la plus lente) à l'intérieur duquel devait se situer la courbe de croissance de n'importe quelle souche.

### **3. Caractérisation des souches sélectionnées en milieu liquide et développement de modèles de croissance**

L'objectif était de caractériser les croissances bactériennes en fonction de différentes propriétés physico-chimiques dont la température, le pH et l' $a_w$  sont les principales. Néanmoins il a été montré que le type de soluté utilisé pour réguler l' $a_w$  ou le pH influençait différemment les croissances bactériennes. Si le NaCl et l'acide chlorhydrique ont été les premiers solutés utilisés, ils ont été très vite comparés à d'autres. A partir des résultats expérimentaux, des modèles mathématiques différents ont été choisis pour répondre au mieux à la complexité des conditions étudiées.

#### **3.1. Effet de la température, du pH (HCl) et de l' $a_w$ (NaCl) sur la croissance bactérienne et modélisation**

Les souches sélectionnées dans la partie précédente ont été étudiées dans un domaine plus large de températures, pH et  $a_w$  (Tableau 2) [Lebert I. et al. 1998b – A2 ; Lebert I. et al. 2000 - A3]. Les cinétiques de croissance étaient réalisées en milieu liquide en erlenmeyer et mesurées par densité optique. L'influence des trois facteurs (température, pH,  $a_w$ ) et leurs interactions sur la croissance des souches choisies ont été étudiées selon les essais d'un plan d'expériences. Pour chaque facteur, nous avons choisi d'étudier 5 niveaux. 125 expériences auraient été nécessaires dans un plan factoriel complet. Le nombre d'expériences a été réduit à 16 en utilisant un plan composite centré.

Tableau 2 : Souches sélectionnées et intervalle d'étude de chaque facteur

Genre	Souches	Température	pH	a <sub>w</sub>
<i>Listeria</i>	<i>L. monocytogenes</i> CLIP 19532	4°C - 30°C	5,4 - 7,0	0,96 - 1,0
	<i>L. monocytogenes</i> 14			
<i>Pseudomonas</i>	<i>P. fragi</i> 162	2°C - 14°C	5,4 - 7,0	0,96 - 1,0
	<i>P. fragi</i> K1			
	<i>P. fluorescens</i> 58			

Les résultats expérimentaux ont permis de réaliser les modèles de prédiction de la croissance bactérienne. Les paramètres L, temps de latence, Tg, temps de génération et A, accroissement de population, caractérisant chaque croissance ont été calculés en utilisant le modèle modifié de Gompertz.

Lorsque la température est l'unique facteur contrôlant la croissance bactérienne, l'approche modèle racine carrée de Ratkowsky *et al.* (1982<sup>1</sup>) est suffisante. La prise en compte de plusieurs facteurs est plus facilement réalisée par l'approche surface de réponse qui décrit les effets et les interactions entre les facteurs (Gibson *et al.* 1988<sup>2</sup> ; Hudson 1994<sup>3</sup>) [Lebert I. et Lebert A. 2006 – A10]. Le taux de croissance maximum et le temps de latence sont modélisés indépendamment. L'avantage de ce modèle est de prendre en compte les interactions entre les facteurs. Son inconvénient vient d'une part qu'il ne peut être appliqué que dans le domaine défini par le plan d'expériences pour les facteurs étudiés et que toute extrapolation peut entraîner des prévisions erronées des paramètres de croissance. D'autre part, l'augmentation du nombre de facteurs de contrôle entraîne une augmentation du nombre de paramètres à estimer, ceci conduisant à multiplier la collecte de données expérimentales. Ceci limite son utilisation pour plus de quatre facteurs.

Les paramètres des modèles polynomiaux ont été publiés dans [Lebert I. *et al.* 1998b – A2] pour *Listeria* et [Lebert I. *et al.* 2000 - A3] pour *Pseudomonas*.

<sup>1</sup> Ratkowsky, D. A., Olley, J., McMeekin, T. A., Ball, A., 1982. Relationship between temperature and growth rate of bacterial cultures. *Journal of Bacteriology* 149, 1-5.

<sup>2</sup> Gibson, A. M., Bratchell, N., Roberts, T. A., 1988. Predicting microbial growth: growth responses of *Salmonellae* in a laboratory medium as affected by pH, sodium chloride and storage temperature. *International Journal of Food Microbiology* 6, 155-178.

<sup>3</sup> Hudson, J. A., 1994. Comparison of response surface models for *Listeria monocytogenes* strains under aerobic conditions. *Food Research International* 27, 53-59.

### 3.2. Croissance de *L. monocytogenes* soumise à des variations de pH (acide acétique, NaOH, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) ou d'a<sub>w</sub> (KCl, NaCl)

La microbiologie prévisionnelle a surtout considéré les cas où les conditions de culture étaient maintenues constantes. Or, dans les procédés utilisés par les industries agro-alimentaires, les aliments sont soumis à des variations graduelles ou brusques de facteurs tels que le pH, l'a<sub>w</sub>, la température. Pour appliquer les modèles développés jusqu'à présent et en l'absence de résultats expérimentaux, de nombreux chercheurs ont développé des modèles de croissance bactérienne en conditions environnementales variables de température basés sur les deux hypothèses suivantes : (1) absence de temps de latence après l'application du choc et (2) reprise de la croissance avec un temps de génération similaire à celui observé dans la condition limitante.

M. Cheroutre-Vialette [thèse (1999) ; Cheroutre-Vialette et al., 1998 – A4] a étudié le comportement de *L. monocytogenes* soumise à des chocs acides, basiques ou osmotiques en milieu liquide :

- effet de chocs - NaCl 8%, KCl 8%, acide acétique pH=5,6, NaOH pH=9, ions ammonium pH=9 - sur le comportement de trois souches de *L. monocytogenes* sélectionnées dans les groupes à croissance rapide, intermédiaire et lente ;
- l'effet de variations d'intensités de ces chocs sur la croissance d'une souche de *L. monocytogenes* ;
- l'effet des combinaisons de chocs pH (acide ou basique) et osmotique sur la croissance de *L. monocytogenes* par la juxtaposition de deux plans centraux composites et d'un plan factoriel. Ainsi, des effets synergiques ou antagonistes des différents chocs ont été mis en évidence.

Trois conditions étaient étudiées dans toutes les expériences : conditions standard, limitante et choc. La condition standard était représentée par la croissance de *L. monocytogenes* dans le milieu standard (pH=7, a<sub>w</sub>≅1), cette condition étant considérée comme le témoin de croissance. La condition limitante était caractérisée par la croissance de la bactérie directement dans le milieu ajusté au pH ou à l'a<sub>w</sub> désiré. La condition choc était définie de la façon suivante : la bactérie croissait initialement dans le milieu standard ; lorsque la croissance atteignait le début de la phase exponentielle, des solutions "chocs" étaient additionnées au milieu standard. Ces solutions étaient préparées de façon à obtenir une valeur de pH ou d'a<sub>w</sub> identique à celle étudiée en condition limitante.

Lors de ces chocs, les trois souches de *L. monocytogenes* avaient un comportement similaire : après application du choc, un temps de latence est apparu et le temps de génération

après la reprise de croissance était supérieur à celui de la condition limitante. L'étude de l'effet des intensités de chocs ou des combinaisons de chocs a montré que la durée de la latence induite dépendait de façon non linéaire de l'intensité du choc. Ainsi les observations n'ont pas confirmé les deux hypothèses formulées pour l'élaboration des modèles dynamiques. Cette étude a permis de déterminer les conditions nécessaires (amplitude et vitesse de variation du pH ou de l' $a_w$ ) pour qu'il y ait induction d'une latence, ce qui correspond à la limite d'utilisation des modèles polynomiaux qui ont été développés dans des conditions statiques de croissance.

Pour modéliser de telles conditions, A. Lebert a développé un modèle dynamique de croissance à partir de techniques de réseaux de neurones. Les réseaux de neurones artificiels permettent de prendre en compte à la fois des facteurs qualitatifs et quantitatifs comme la diversité de comportement des souches d'une même espèce et la variation des conditions environnementales. L'application de ce modèle à la prédiction du temps nécessaire pour atteindre une population bactérienne donnée, donnerait alors, non pas une valeur unique du temps, mais un intervalle de temps et la probabilité associée.

Plusieurs types de réseaux de neurones existent, et le choix dépend du type de problème à traiter. Le travail de S. Lauro (DEA, 1995) a montré l'aptitude des réseaux récurrents de neurones à représenter la croissance bactérienne. P. Baucour (DEA, 1996), en utilisant les résultats de C. Laplace-Bégot, a mis au point des réseaux récurrents à couches en tenant compte de la diversité du comportement en croissance des souches de *Listeria*. La combinaison de réseaux de neurones a permis de simuler correctement la diversité de croissance des 66 souches de *Listeria* étudiées précédemment.

Par la suite, A. Lebert a développé des réseaux récurrents à couches permettant une bonne représentation de la croissance bactérienne en conditions environnementales variables. La base de données est issue de la thèse de M. Cheroutre-Vialette [Cheroutre-Vialette et al. 1998 – A4]. La Figure 4 montre un exemple de validation du modèle obtenu dans le cas où le pH passe brusquement de 7 à 9,5 et la concentration en sel de 0 à 8 %. Le réseau optimisé simule bien, après application du choc, la latence induite et une vitesse de croissance plus faible que celle observée en condition limitante. Le réseau répond bien à l'objectif initial à savoir un modèle simulant la croissance en conditions environnementales variables (Cheroutre-Vialette

M. et Lebert A. (2000<sup>1</sup>, 2002<sup>2</sup>)). Ainsi les cartes de Kohonen ont permis de faire de la classification et les réseaux récurrents à couches ont été utilisés pour représenter les phénomènes dynamiques. Cette technique prometteuse est malheureusement limitée par le besoin d'un grand nombre de données expérimentales.

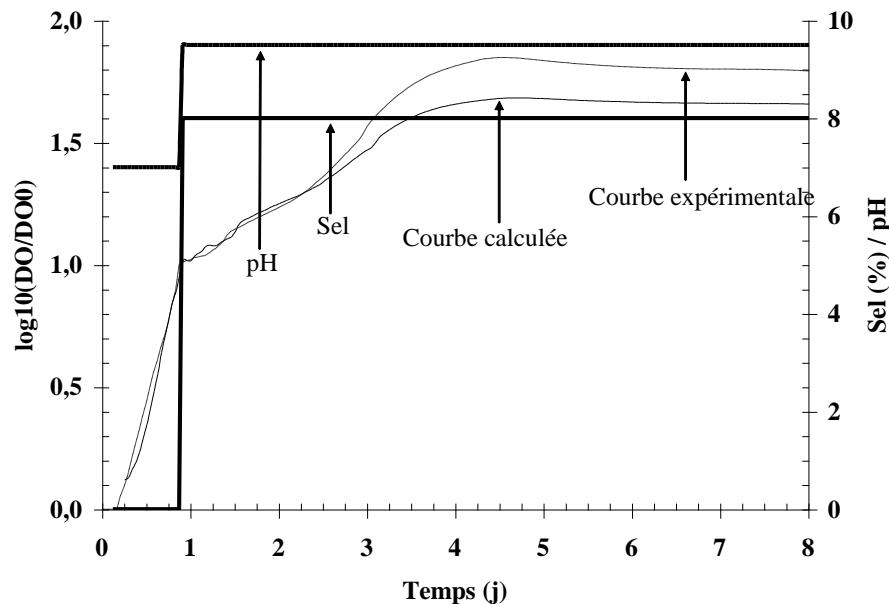


Figure 4 : Comparaison de la courbe de croissance de *L. monocytogenes* 14 et de la courbe calculée à l'aide d'un réseau de neurones - Cas d'un changement brusque du pH et de la concentration en sel.

### 3.3. Effet de la température, de l' $a_w$ et du type de solutés sur la croissance bactérienne et modélisation

Les croissances de *L. innocua* CLIP 20595 ont été suivies dans le milieu BTV dans lequel l' $a_w$  était contrôlée entre 0,91 à 0,995 par l'ajout de solutés, NaCl, KCl, glucose, saccharose ou glycérol [Lebert I. et al., 2004 – A5]. Les temps de latence et les temps de génération calculés étaient similaires quelque soit le soluté lorsque l' $a_w$  était supérieure à 0,96. Pour une  $a_w$  inférieure, l' $a_w$  minimum de croissance différait selon le soluté (Tableau 3). Par exemple, pour le glycérol, une croissance a toujours été observée à  $a_w$  0,904.

<sup>1</sup> Cheroutre-Vialette M. et Lebert A., 2000. Modelling the growth of *Listeria monocytogenes* in dynamic conditions. International Journal of Food Microbiology 55, 201-207.

<sup>2</sup> Cheroutre-Vialette M. et Lebert A., 2002. Application of recurrent neural network to predict bacterial growth in dynamic conditions. International Journal of Food Microbiology 73, 107-118.

Tableau 3 :  $a_w$  minimum de croissance ( $a_{w,min}$ ) de *L. innocua* CLIP 20595 en fonction du soluté dans le milieu liquide à pH 5,5 , 20°C.

BTV	Contrôle $a_w$	Domaine d' $a_{w,min}$
Liquide	NaCl	0,911 – 0,920
	KCl	0,915 - 0,917
	Glucose	0,910 – 0,918
	Saccharose	0,918 –0,925
	Glycérol	< 0,904
Gélinifié	Quantité d'eau	0,935-0,946

Pour décrire la croissance de la population bactérienne en fonction du temps, j'ai choisi l'équation logistique avec délai et rupture de Rosso et al. (1996<sup>1</sup>). Le modèle modifié de Gompertz a l'inconvénient de ne pas représenter correctement les courbes de croissance à l'origine, il a été abandonné au profit du modèle de Rosso qui pallie à ce problème et allie simplicité et flexibilité. L'équation différentielle et sa forme intégrée sont présentées dans [Lebert I. et al., 2005 – A6].

Pour décrire l'évolution des paramètres de croissance en fonction des propriétés physico-chimiques, le modèle d'Augustin (1999)<sup>2</sup> a été utilisé [Lebert I. et al., 2005 – A6]. Il décrit le taux de croissance maximum  $\mu_{max}$  comme le produit du taux optimum de croissance ( $\mu_{opt}$ , taux maximum de croissance obtenu dans les conditions optimales de croissance de la bactérie) par des fonctions dépendantes des propriétés physico-chimiques (T, pH,  $a_w$ ). Ce modèle prend en compte les valeurs cardinales de la bactérie c'est-à-dire les valeurs minimales, optimales et maximales de croissance de la bactérie pour le facteur étudié. Dans ce modèle, le produit du taux maximum de croissance par le temps de latence, [ $\mu_{max} \times L$ ], est supposé constant. L'intérêt du modèle réside dans la signification biologique de tous ses paramètres. Le modèle peut être directement utilisé si des valeurs cardinales des facteurs sont connues dans la littérature. La valeur de  $\mu_{opt}$  ou les valeurs cardinales sont obtenues dans la littérature ou sont calculées à partir de données expérimentales. Rosso (1995) a montré que les températures cardinales étaient spécifiques de la souche et que  $\mu_{opt}$  était spécifique du milieu d'incubation.

<sup>1</sup> Rosso, L., Bajard, S., Flandrois, J. P., Lahellec, C., Fournaud, J. and Veit, P. (1996) Differential growth of *Listeria monocytogenes* at 4 and 8°C : consequences for the shelf life of chilled products. Journal of Food Protection 59, 944-949.

<sup>2</sup> Augustin, J.-C. (1999) Modélisation de la dynamique de croissance des populations de *Listeria monocytogenes* dans les aliments. 153 p., Thèse de Doctorat, Université Claude Bernard - Lyon 1.

Les résultats de croissance en fonction de l' $a_w$  et du type de soluté ont montré que les valeurs cardinales obtenues dans la littérature n'étaient pas satisfaisantes pour décrire nos données. De ce fait j'ai estimé les valeurs cardinales et le taux de croissance optimum ( $\mu_{opt}$ ) pour le modèle du taux de croissance maximum (modèle  $\mu_{max}$ ), et modélisé le temps de latence (L) indépendamment du taux de croissance maximum car l'hypothèse du produit [ $\mu_{max} \times L$ ] = constante n'était pas confirmée dans le cas de nos expériences.

Les équations complètes des modèles et les paramètres utilisés pour ces modèles ont été publiés dans [Lebert I. et al., 2005 – A6].

#### **4. Caractérisation des souches sélectionnées en milieu solide et validation des modèles de croissance**

L'objectif de la Microbiologie Prévisionnelle est d'appliquer les modèles de prédiction du comportement bactérien (croissance ou décroissance) dans ou sur un aliment (Point 5 du Tableau 1). Ainsi les cinétiques que nous avons réalisées en milieu liquide, ont toujours été comparées à des cinétiques en milieux solides proches d'un aliment ou dans/sur un aliment. Cette comparaison a été faite directement en comparant les données expérimentales dans les deux milieux ou indirectement en comparant les prédictions des modèles développés à partir de données en milieu liquide sur les données expérimentales obtenues en milieu solide. Cette étape de validation est indispensable pour vérifier que les modèles développés en milieu liquide peuvent prédire la croissance en milieu solide.

##### **4.1. Croissance bactérienne en viande de bœuf décontaminé - validation des modèles polynomiaux**

La croissance des souches de *Listeria* et de *Pseudomonas* sélectionnées a été étudiée dans ou sur la viande de bœuf [Lebert I. et al. 1998b - A2 ; Lebert I. et al. 2000 – A3]. C. Laplace-Bégot (thèse, 1996) a mis au point un protocole de décontamination de la surface de la viande afin de s'affranchir de la présence de la flore naturelle. La viande de bœuf, et en particulier le muscle *Biceps femoris*, a été choisie pour sa taille et son pH homogène. Pour obtenir une viande stérile en surface, le muscle était décontaminé à l'acide peracétique à 0,35%, puis paré. La viande étaitensemencée en surface et incubée à la température désirée et au pH de la viande (Tableau 4). Pour éviter le dessèchement de la viande en surface pendant l'incubation, la viande a été placée dans un récipient dont l'air était saturé et avait une humidité relative proche de 100%. Ainsi l' $a_w$  en surface de l'échantillon était considéré comme proche de 1. Les temps de génération et de latence ont pu être comparés avec les modèles polynomiaux

(Tableau 4). Les résultats obtenus sur *Listeria* montrent que les modèles de croissance développés en milieu liquide ne sont pas utilisables en l'état pour la prédiction des croissances en milieu solide : si les temps de génération sont similaires, les temps de latence sont nettement plus importants en surface de viande qu'en milieu liquide. Ceci peut s'expliquer dans la mesure où le milieu de croissance et la disponibilité des nutriments étaient différents.

Tableau 4 : Temps de latence L (h) et temps de génération Tg (h) observés et prédits par les modèles polynomiaux de *L. monocytogenes* 14 et *L. monocytogenes* CLIP 19532

Souches	T (°C)	a <sub>w</sub>	pH	L exp.		L prédit		Tg exp.		Tg prédit	
						Lm14	Lm19532			Lm14	Lm19532
Lm 14	14	≈1,0	5,8	21,9		8,1	5,2	4,8		4,1	3,9
Lm CLIP 19532	14	≈1,0	5,8	42,5		8,1	5,2	7,2		4,1	3,9
Lm 14	4	≈1,0	5,8	350		107,1	138,9	31,0		33,7	41,0
Lm CLIP 19532	4	≈1,0	5,8	342		107,1	138,9	23,4		33,7	41,0

Lm : *L. monocytogenes* ; exp. : valeurs expérimentales

V. Robles-Olvera (thèse, 1999) a validé la démarche suivie concernant la sélection de souches représentatives des *Pseudomonas* et l'utilisation des modèles correspondants. En effet, les modèles polynomiaux pour *Pseudomonas* ont prédit correctement les croissances de souches de *Pseudomonas* du laboratoire inoculées en surface de viande préalablement décontaminée, ainsi que la croissance de la flore naturelle (*Pseudomonas* spp.) en surface de viande de boeuf ou en boeuf hachée, réfrigérée et conservée à l'air. La Figure 5 montre que la croissance mesurée expérimentalement est comprise dans la fourchette donnée par les trois modèles développés en milieu liquide.

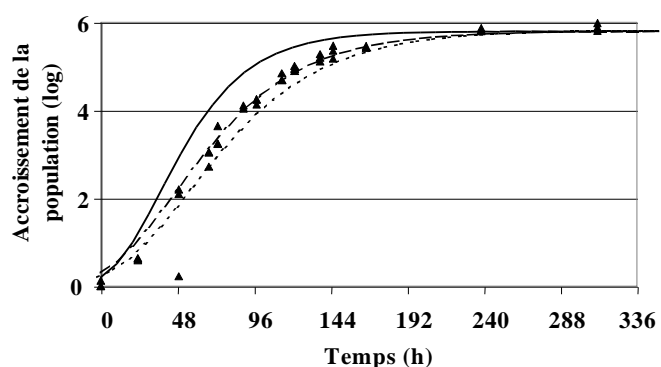


Figure 5: Croissance de *Pseudomonas* spp. contaminant naturellement la viande de boeuf et prédiction par les trois modèles de croissance polynomiaux, à 6°C, humidité relative de l'air ≈ 100 %, pH 5.8. Données expérimentales (▲) ; Modèle *P. fragi* 162 (—) ; Modèle *P. fragi* K1 (- - -) ; Modèle *P. fluorescens* (·····).



Des essais de croissances simultanées de *Listeria* et de *Pseudomonas* ont été réalisés en surface de viande décontaminée. Les temps de latence et de génération étaient identiques à ceux mesurés lorsque les croissances de *Listeria* et *Pseudomonas* étaient mesurées indépendamment l'une de l'autre : il ne semblait pas y avoir d'influence réciproque des deux genres bactériens. Au vu de ces résultats, des essais ont été menés sur des steaks hachés du commerce dont la flore dominante était constituée de *Pseudomonas* et qui ont été réensemencés avec *Listeria*. Si les croissances de *Pseudomonas* étaient comprises dans la fourchette donnée par les modèles, aucune croissance de *Listeria* n'a été observée malgré des ensemencements supérieurs au seuil de tolérance. Deux hypothèses ont été émises pour interpréter les résultats : soit il y avait un effet de la structure (surface de viande ou viande hachée) soit il y avait inhibition de la croissance de *Listeria* par un ou plusieurs germes présents dans la flore naturelle [Lebert I. et al. 2000 – A3].

De tels résultats montrent la nécessité de porter l'attention sur la réalisation de modèle tenant mieux compte des conditions de croissance dans l'aliment ainsi que sur la validation des modèles élaborés.

#### **4.2. Effet de la température, de l' $a_w$ et des sels d'acides sur le comportement bactérien et optimisation du modèle d'Augustin avec interaction**

Le travail de V. Zuliani (thèse, 2005) visait à connaître le comportement de *L. monocytogenes* dans des lardons ou plus généralement dans la viande de porc traitée en salaison. Son objectif était de déterminer l'influence de facteurs chimiques sur la limitation, l'inhibition voire la diminution de la population initiale de *L. monocytogenes* présente dans la viande. Les résultats ont permis le développement de modèles décrivant la croissance bactérienne mais également décrivant l'interface croissance/non-croissance. Les facteurs liés au procédé ont été pris en compte à travers le contrôle des paramètres physico-chimiques (température, pH,  $a_w$ , nature et concentration en phénols et en sels d'acides organiques).

Afin de faciliter le contrôle des paramètres physico-chimiques et l'ensemencement de la viande par *L. monocytogenes* 14, l'ensemble des expériences a été réalisé avec de la viande de porc hachée. La viande, après avoir été ionisée pour obtenir un milieu paucimicrobien, était ajustée au niveau pH et  $a_w$  (NaCl), puis inoculée avec *L. monocytogenes* 14 à une concentration initiale de  $10^5$  ufc/g. Les échantillons étaient stockés à 20°C pendant 7 jours [Zuliani V. et al. 2006]. Dans une première étape, les cinétiques bactériennes ont été obtenues dans le cadre d'un plan factoriel complet à deux facteurs et 5 niveaux (pH : 5,0 – 5,3 -5,6 –

5,9 - 6,2 ;  $a_w$  : 0,93 - 0,94 - 0,95 - 0,96 - 0,97). Dans une deuxième étape, l'influence de quatre inhibiteurs (chacun testé à trois concentrations, Tableau 5) a été étudiée selon un plan factoriel prenant en compte également trois niveaux de pH et d' $a_w$  (Tableau 5, 108 expériences).

Tableau 5 : Plans factoriels à trois facteurs ( $a_w$ , pH, pourcentage ou concentration en inhibiteur) réalisé pour chacun des inhibiteurs

Inhibiteur	pH	$a_w$	Pourcentage (% p/p)	Concentration (mM)
Lactate de sodium	5,6-5,9-6,2	0,95-0,96-0,97	1,5-3,0-4,5	134-268-402
Acétate de sodium	5,6-5,9-6,2	0,95-0,96-0,97	0,3-0,6-0,9	22-44-66
Sorbate de potassium	5,6-5,9-6,2	0,95-0,96-0,97	0,3-0,6-0,9	20-40-60
Fumée liquide	5,6-5,9-6,2	0,95-0,96-0,97	0,3-0,6-0,9*	-

\* pourcentage exprimé en % (v/p)

Les cinétiques de croissance ont été lissées par le modèle de Rosso et al. (1996). Les paramètres de croissance ont été prédits avec la version du modèle d'Augustin (1999)<sup>1</sup> prenant en compte la présence d'inhibiteur et l'interaction entre les facteurs [Lebert I. et Lebert A., 2006 – A10]. Dans l'étude de V. Zuliani, le produit [ $\mu_{\max}$  x L] était supposé indépendant des facteurs environnementaux, l'influence des substances inhibitrices sur  $\mu_{\max}$  était modélisée par un modèle de type racine carrée, et était caractérisée par la  $CMI_i$  (concentration minimale inhibitrice de la substance i). Dans leur modèle, Augustin et Carlier (2000)<sup>2</sup> ont introduit des valeurs minimales cardinales absolues : aux conditions limites de croissance de la bactérie, les valeurs de  $T_{\min}$ ,  $pH_{\min}$  et  $a_{w,\min}$  ne sont plus, comme supposées, constantes et indépendantes des conditions expérimentales et lorsque deux ou trois paramètres diminuent simultanément, les observations expérimentales montrent que ces valeurs minimales augmentent. V. Zuliani a choisi ce modèle d'Augustin avec interaction pour pouvoir estimer les limites entre croissance et non-croissance en fonction des propriétés physico-chimiques.

Les expériences de la première étape ont montré qu'il était possible d'utiliser les valeurs cardinales d'Augustin et de maintenir l'hypothèse que le produit [ $\mu_{\max}$  x L] était égal à une constante K. Pour tenir compte du milieu viande, le taux optimal de croissance,  $\mu_{\text{opt}}$ , et K ont été optimisés ( $\mu_{\text{opt}} = 1,90 \text{ h}^{-1}$  et  $K = 1,94$ ). Pour 22 conditions sur les 25 du plan d'expériences, le modèle simulait correctement les cinétiques de *L. monocytogenes*. Pour les trois prédictions

<sup>1</sup> Augustin, J.-C., 1999. Modélisation de la dynamique de croissance des populations de *Listeria monocytogenes* dans les aliments. 153 p., Thèse de Doctorat, Université Claude Bernard - Lyon 1.

<sup>2</sup> Augustin, J.-C., Carlier, V., 2000. Modelling the growth rate of *Listeria monocytogenes* with a multiplicative type model including interactions between environmental factors. International Journal of Food Microbiology 56, 53-70.

non satisfaisantes, un seul point de dénombrement était en dehors de l'enveloppe de prédiction à 90%. Le modèle d'Augustin, couplé au modèle logistique, permet également de prédire correctement la ligne correspondant aux conditions environnementales permettant l'accroissement de 1,0 ULog de la population bactérienne. Cette ligne prédite passe correctement au milieu des données expérimentales (Figure 6).

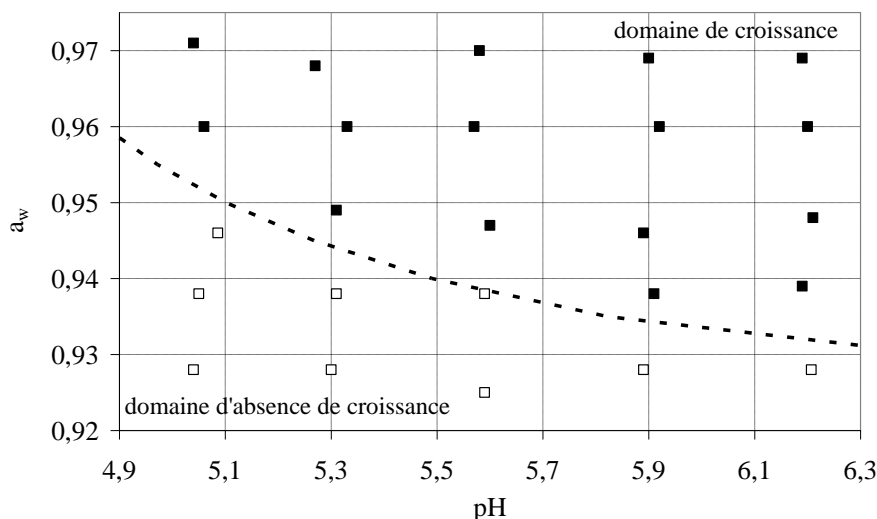


Figure 6 : Prédiction de la ligne correspondant aux conditions environnementales permettant l'accroissement de 1,0 ULog de la population bactérienne après sept jours de stockage à 20°C. (■) population observée > 1,0 ULog ; (□) population observée < 1,0 ULog ; (----) ligne prédite = 1,0 ULog.

Une fraction des expériences avec les inhibiteurs a servi à estimer les  $CMI^\circ$  et  $pH_{min}^\circ$  de chaque sel d'acide (Tableau 6). Les cinétiques bactériennes étaient correctement prédites dans 83% des cas, pour le sorbate de potassium et la fumée liquide, et dans 75% des cas, pour l'acétate de sodium.

Tableau 6 : Valeurs de  $pH_{min}^\circ$  et  $CMI^\circ$  utilisées dans le modèle d'Augustin en fonction de l'inhibiteur

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

Dans la formulation de la saumure des lardons, il est fréquent que les sels d'acides organiques soient ajoutés en combinaison. Les expériences réalisées en présence de deux sels d'acides organiques, avaient pour objectif de mettre en évidence des interactions entre les deux inhibiteurs et d'étudier si les modèles pouvaient prédire les cinétiques de *Listeria*.

Les résultats ont montré que l'effet inhibiteur de deux sels d'acides organiques était fortement lié aux valeurs de pH et d' $a_w$ . A  $a_w$  0,97 et pH 6,2, aucune interaction entre les deux inhibiteurs n'a été observée, l'effet inhibiteur étant seulement dû au sel d'acide à la plus forte concentration. Par contre à des  $a_w$  et pH plus bas, l'effet inhibiteur des deux sels d'acides était supérieur à celui du sel étudié seul.

V. Zuliani a montré que le modèle d'Augustin prédisait correctement les cinétiques bactériennes en présence de deux inhibiteurs à pH 6,2 et  $a_w$  0,97. Lorsque l' $a_w$  et/ou le pH diminuaient, les modèles sous-estimaient la population bactérienne. Ceci montre la difficulté à prédire les interactions de deux inhibiteurs. Par contre, le modèle prédisait correctement certaines cinétiques si seul le sel d'acide majoritaire était pris en compte dans le modèle. Les interactions entre facteurs de type inhibiteur ou aux limites de croissance des bactéries est un problème complexe à modéliser.

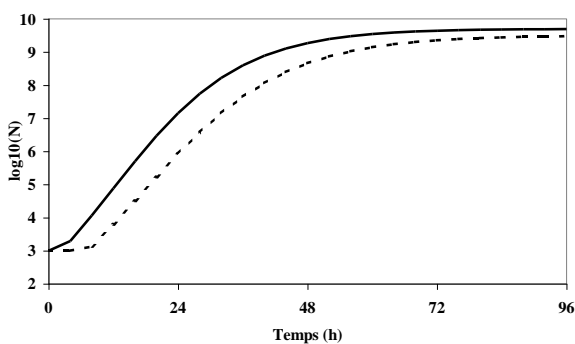
#### **4.3. Effet de la teneur en eau et de l' $a_w$ d'un aliment modèle sur la croissance bactérienne et optimisation du modèle d'Augustin sans interaction**

Dans la littérature, l'ajustement de l' $a_w$  est réalisé par l'ajout de solutés et peu d'études existent sur l'effet d'un milieu lorsque l' $a_w$  est contrôlée par la diminution de la quantité d'eau. C'est pourquoi j'ai mis au point un milieu à base de gélatine (BTVg) [Lebert I. et al. 2004 – A5]. Son  $a_w$  contrôlée par sa teneur en eau (kg d'eau / kg de matière sèche), peut varier de 0,995 (X=4 kg eau / kg M.S.) à 0,911 (X= 0,5 kg eau / kg M.S.). Les croissances de *L. innocua* CLIP 20595 ont été réalisées en surface de gel de gélatine en boîtes de Pétri c'est-à-dire en conditions statiques d' $a_w$  proche de 1.

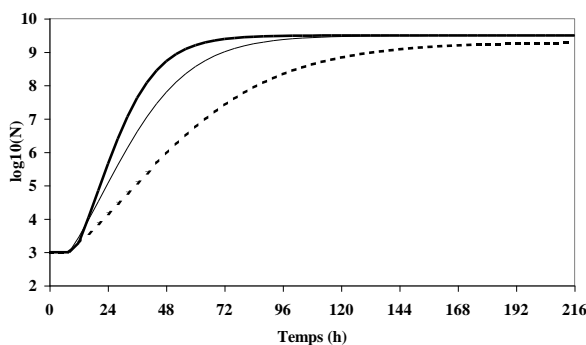
O. Chantreau (DEA, 2003) n'a observé aucune croissance à une teneur en eau de 0,5 kg eau/kg MS ( $a_w = 0,912$ ) et seulement un léger accroissement de population ( $0,5 \text{ Ulog}_{10}(\text{CFU}/\text{cm}^2)$ ) à une teneur en eau de 0,64 kg eau/kg MS ( $a_w = 0,935$ ). L' $a_w$  minimum de croissance est plus élevée que celle observée en milieu liquide (Tableau 3). Il a comparé les croissances en milieu liquide en présence de NaCl, à des croissances en surface de gélatine pour laquelle l' $a_w$  était soit contrôlée par l'ajout de NaCl soit par la diminution de la teneur en eau (Figure 7). A  $a_w$  0,993, seul un léger retard de croissance était observé entre le milieu gélifié et le milieu liquide. A  $a_w$  0,97, les croissances étaient les plus rapides en milieu liquide, puis plus lentes en milieu gélifié en présence de NaCl, et plus lentes encore en milieu gélifié où l' $a_w$  était contrôlée par la teneur en eau. L'écart observé entre les croissances dans les deux milieux gélifiés s'est amplifié lorsque l' $a_w$  est passée de 0,97 à 0,95. Les différences de

croissance observées ont été attribuées d'une part à un effet de la structure du milieu (liquide par rapport à gélifié) lorsque le NaCl était utilisé pour contrôler l' $a_w$  et d'autre part au mode de contrôle de l' $a_w$  (ajout de NaCl par rapport à la déshydratation) dans le milieu gélifié.

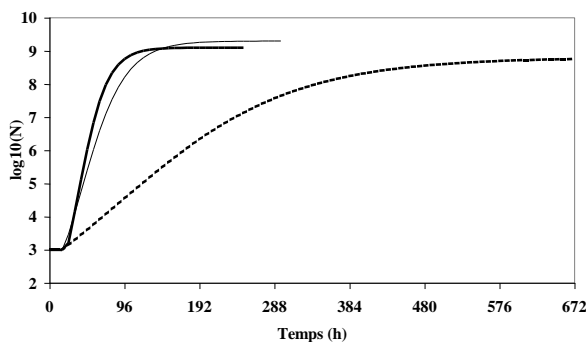
Les résultats expérimentaux ont montré de grandes disparités de croissance entre le milieu liquide et le milieu gélifié. Ainsi deux modèles ont été optimisés : un, présenté précédemment, pour la prédiction des paramètres de croissance en milieu liquide et un en milieu gélifié. Le produit [ $\mu_{max} \times L$ ] n'était pas constant dans les essais en milieu gélifié, en conséquence, un modèle pour le temps de latence et un pour le taux maximum de croissance ont été développés [Lebert I. et al. 2005b – A6].



Cas a	$a_w =$	<b>0,993</b>
	BTV	BTVg
X	25	3,5
NaCl	0	0



Cas b	$a_w =$	<b>0,970</b>	
	BTV-Na	BTVg-Na	BTVg
X	25	3,5	1,4
NaCl	37	37	0



Cas c	$a_w =$	<b>0,950</b>	
	BTV-Na	BTVg-Na	BTVg
X	25	3,5	1,0
NaCl	73	74	0

Figure 7 : Croissances de *L. innocua* CLIP 20595 en milieu liquide avec ou sans NaCl [BTV et BTV-Na (■)], en milieu gélifié [BTVg (- -)], en milieu gélifié où l' $a_w$  est modifié par l'ajout de NaCl [BTVg-Na (■)]. Trois conditions testées : cas a,  $a_w = 0,993$  ; cas b,  $a_w \cong 0,970$  ; cas c,  $a_w \cong 0,95$ . NaCl, concentration en NaCl exprimée en g/kg d'eau. X, teneur en eau (kg eau/kg MS).

## **5. Conclusion**

L'ensemble de ces travaux montre la difficulté de développer un modèle prenant en compte un grand nombre de paramètres influençant le développement bactérien. Depuis les débuts de la microbiologie prévisionnelle, le nombre de paramètre n'a cessé d'augmenter : de un paramètre, uniquement la température, à de nombreux paramètres qui sont eux-mêmes dépendants des caractéristiques liées à leur contrôle (pH / type d'acide,  $a_w$  / type de soluté). Chaque nouvelle avancée et complexification d'un modèle fait apparaître de nouvelles limites dans l'utilisation de ces modèles. Ceci est d'autant plus vrai lorsque la microbiologie prévisionnelle s'applique aux aliments, où la texture, la structure et la composition jouent un rôle non négligeable sur les micro-organismes. Un des points importants de ce travail a été de montrer l'effet du mode de régulation de l' $a_w$  sur la croissance de *L. innocua*, entre un contrôle par l'ajout de NaCl ou par la déshydratation du milieu, cette dernière ayant un effet inhibiteur plus important.



## **ACTIVITE DE RECHERCHES 2**

### **EXPERIMENTATION ET MODELISATION DES TRANSFERTS DE MATIERE ET DE CHALEUR DANS LES ALIMENTS**



Acquis techniques	Acquis scientifiques
<ul style="list-style-type: none"> <li>- soufflerie microbiologique               <ul style="list-style-type: none"> <li>- conception, [construction]<sup>1</sup>, [instrumentation]<sup>1</sup>, mise en route</li> <li>- acquisition des données physiques (<math>T_{air}</math>, <math>T_{rosée}</math>, <math>\Delta P</math>, vitesse d'air)</li> </ul> </li> <li>- mesure des teneurs en eau de la gélatine en condition de séchage</li> <li>- [traitement du signal, filtrage des données]<sup>2</sup></li> <li>- [techniques de résolution de systèmes d'équations différentielles ou d'équation dérivées partielles]<sup>3</sup></li> <li>- [mesure des isothermes de sorption]<sup>4</sup></li> <li>- [mesure des diffusivités]<sup>5</sup></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- mesure de l'<math>a_w</math> de surface               <ul style="list-style-type: none"> <li>- à haute vitesse d'air, <math>a_w \approx HR/100</math></li> <li>- à vitesse d'air faible, <math>a_w = f(t)</math></li> </ul> </li> <li>- [modèle de transfert de matière]<sup>6</sup> <ul style="list-style-type: none"> <li>- prédiction de l'<math>a_w</math> en surface des aliments</li> </ul> </li> <li>- [modèle de transfert de chaleur]<sup>2</sup> <ul style="list-style-type: none"> <li>- prédiction de la température en fonction du temps et de l'espace</li> </ul> </li> </ul>
	↓ Simulation de l'effet de variables procédé ou produit sur l' $a_w$ de surface des aliments

Entre crochets : réalisations indispensables à mes activités de recherche, mais non réalisées par moi-même

<sup>1</sup> Equipe C2T, Unité QuAPA, INRA Theix

<sup>2</sup> A. Lebert

<sup>3</sup> P. Baucour, A. Lebert

<sup>4</sup> P. Baucour (Baucour P. et Daudin J. D., 2000. Development of a new method for fast measurement of water sorption isotherms in the high humidity range: validation on gelatine gel. Journal of Food Engineering 44, 97-107)

<sup>5</sup> M. Ruiz-Cabrera (Ruiz-Cabrera M., 1999. Détermination de la relation entre la diffusivité de l'eau et la teneur en eau dans les matériaux déformables à partir d'images RMN - Elaboration de la méthode avec des gels de gélatine et transposition à la viande. Thèse de Docteur ès science, Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand II)

<sup>6</sup> P. Baucour

Co-encadrement :

- quatre thèses de l'Université Clermont-Ferrand II:

Laplace-Bégot (1996) Mesure et modélisation de la croissance de *Listeria* en milieu liquide et en surface de viande

Robles-Olvera (1999) Comparaison de la croissance de *Pseudomonas* species et *Listeria* species en milieu liquide et en viande de bœuf

Baucour (2000) Mesure des isothermes de sorption dans les hautes humidités. Modélisation du couplage transfert d'eau et croissance bactérienne en surface des viandes

Zuliani (2005) Prédiction de la contamination bactérienne lors de la fabrication et de la conservation d'un aliment – Application à de la viande de porc contaminée par *Listeria monocytogenes*

Encadrement :

- un MOO : Nicolas (2003)

Production scientifique :

- quatre publications :

**A7** Robles Olvera V., Bégot C., Lebert I., Lebert A. (1999). An original device to measure bacterial growth on the surface of meat at relative air humidity close to 100%. *Journal of Food Engineering*, 38, 425-437.

**A8** Lebert I., Baucour P., Lebert A., Daudin J.D. (2005a). Assessment of bacterial growth on the surface of meat under standard processing conditions by combining biological and physical models, *Journal of Food Engineering*, 68, 89-98.

**A6** Lebert I., Dussap C.G., Lebert A. (2005b). Combined physico-chemical and water transfer modelling to predict bacterial growth during food processes, *International Journal of Food Microbiology*, 102, 305-322.

**A9** Lebert I., Nicolas C., Portanguen S., Lebert A. (2006, sous presse) Combined water transfer and bacterial models to predict *Listeria innocua* growth on the surface of gelatine gel during the drying process, *Journal of Food Engineering*.

- un chapitre d'ouvrage : Zuliani *et al.* (2004)

- quatre communications orales : Lebert I. *et al.* (2003a), Nicolas *et al.* (2003), Zuliani *et al.* (2005), Kondjoyan *et al.* (2005)

- trois posters avec texte : Lebert A. *et al.* (1997a), Lebert A. *et al.* (1997b), Baucour *et al.* (2002)

- un poster avec résumé : Baucour *et al.* (2002).

Publications de A1 à A10 données dans le dossier de publications



## **1. Introduction**

Dans de nombreux procédés de l'industrie agro-alimentaire, le but premier est l'échange de chaleur par les opérations de réfrigération, congélation ou cuisson ou l'échange de matière lors de séchage, salage, fumage. Les deux transferts chaleur et matière peuvent également intervenir de manière simultanée. La maîtrise correcte de ces échanges est indispensable pour obtenir la qualité voulue pour un produit alimentaire tant au niveau organoleptique, nutritionnel qu'au niveau hygiénique car tout défaut va déterminer le comportement du consommateur vis-à-vis du produit.

L'étude des transferts de chaleur et de matière s'impose car ils modifient les propriétés physico-chimiques, telles que la température et la teneur en eau à l'intérieur du produit. Les réactions chimiques et enzymatiques et/ou l'activité bactérienne dépendent en effet de ces propriétés. Lors des traitements par l'air, les transferts interviennent en périphérie du produit : lors d'un refroidissement, la température de surface décroît rapidement et met en jeu des transferts de chaleur, l' $a_w$  de surface diminue également puisqu'il peut exister un flux d'eau entre le produit et l'atmosphère. Les flux de chaleur ou les transferts de masse interviennent dans deux cas : (1) lorsqu'une différence de température ou de concentration existe entre deux milieux ou entre deux points dans un même milieu, ou (2) lorsqu'il y a une modification de phase comme lors d'une vaporisation ou ébullition ou lors d'une condensation.

Nous nous sommes intéressés au cas d'un produit alimentaire reposant sur un support solide, situation trouvée lors du séchage de produits de charcuterie, de l'affinage de fromage ou de refroidissement de la viande, et dont seule la face supérieure était en contact avec l'air. Pour simplifier le problème, nous avons considéré que le produit était parallélépipédique, homogène, isotrope, que son épaisseur était très petite par rapport aux deux autres dimensions (Figure 8). La face supérieure était balayée par un flux d'air et sa face opposée reposait sur un support avec lequel il n'y avait ni échange de chaleur ni échange de matière. De même, les faces latérales n'échangeaient pas de chaleur et de matière. Sur la base de ces hypothèses, l'aliment échangeait de la chaleur et de la matière avec l'air et le support sur lequel il était placé. Nous avons limité les transferts de matière à des échanges d'eau et considéré que le support ne pouvait pas échanger d'eau avec le produit car il est inerte.

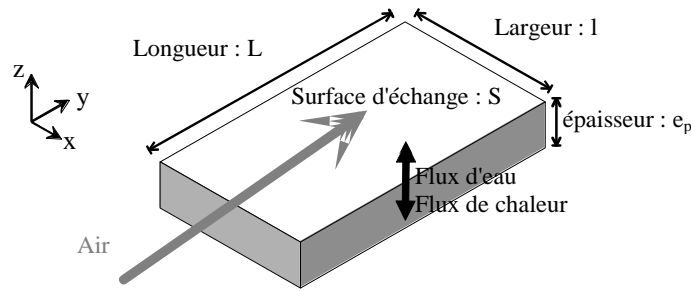


Figure 8: Aliment placé dans un flux d'air

### 1.1. Flux d'eau

Le modèle de transfert d'eau est constitué de deux équations (Figure 9) :

- l'équation du flux d'eau qui traduit les transferts d'eau à l'interface air/produit : ce flux dépend du coefficient de transfert d'eau,  $k$ , qui varie avec la vitesse de l'air et les concentrations en eau dans l'air et dans le produit

$$J_E = k \cdot (C_{\text{surface}} - C_{\text{air}}) \quad \text{E 1}$$

où  $k$  coefficient transfert d'eau (m/s) ;  $C_{\text{air}}$  concentration de l'eau dans l'air (kg water/m<sup>3</sup>) ;  $C_{\text{surface}}$  concentration volumique en eau au contact du produit (kg water/m<sup>3</sup>).

Le flux d'eau,  $J_E$ , peut aussi être exprimé en fonction de l' $a_w$  de surface du produit :

$$J_E = k \cdot (P(T_{\text{Surface}}) - a_{w,s} \cdot P(T_{\text{rosée}})) \quad \text{E 2}$$

où  $a_{w,s}$   $a_w$  de surface du produit ;  $P$  pression partielle de l'air à la température (Pa) ;  $T_{\text{Surface}}$  température à la surface du produit (°C ou K) ;  $T_{\text{rosée}}$  température de point de rosée (°C ou K).

- l'équation de Fick qui caractérise les transferts d'eau à l'intérieur du produit : elle donne l'évolution de la teneur en eau en fonction du temps,

$$J_D = \mathbf{D}(C,T) \cdot \frac{\partial C}{\partial z} \quad \text{E 3}$$

où  $C$  concentration volumique en eau dans le produit (kg d'eau/m<sup>3</sup>) ;  $T$  température du produit (°C ou K) ;  $\mathbf{D}$  diffusivité de l'eau dans le produit (m<sup>2</sup>/s).

Dans notre étude nous supposons que la diffusivité de l'eau ne dépend que de la température et de la concentration en eau.

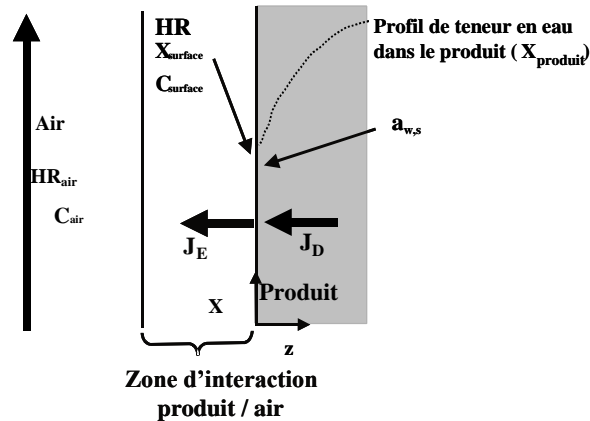


Figure 9 : Flux d'eau et paramètres à considérer lorsque qu'un aliment est placé dans un flux d'air. D, diffusivité (m<sup>2</sup>/s), X, teneur en eau (kg d'eau/kg MS), C, concentration volumique en eau (kg d'eau/m<sup>3</sup>), HR, humidité relative (%), z, épaisseur du produit (m), J<sub>D</sub> et J<sub>E</sub>, flux d'eau dans le produit et à l'interface air/produit (kg d'eau/m<sup>2</sup>/s).

## 1.2. Flux de chaleur

Trois modes d'échange de chaleur sont possibles :

- par contact ou conduction thermique (J<sub>3</sub>, J<sub>5</sub>)
- par mouvement de fluide ou convection thermique (J<sub>2</sub>)
- à distance ou radiation thermique (J<sub>4</sub>).

De plus, il faut tenir compte du transfert de chaleur dû à l'évaporation de l'eau entraînée par le flux J<sub>E</sub>. Le transfert de chaleur est composé de cinq équations (Figure 10) :

- le flux de chaleur J<sub>1</sub> correspond à l'évaporation de l'air à l'interface air/produit

$$J_1 = J_E \cdot L_V \quad \text{E 4}$$

où J<sub>E</sub> densité de flux d'eau (kg eau . m<sup>-2</sup> . s<sup>-1</sup>), L<sub>V</sub> chaleur latente de vaporisation de l'eau (2.448 J.kg<sup>-1</sup> à 20°C).

- le flux de chaleur J<sub>2</sub> décrit les échanges de chaleur à l'interface air/produit :

$$J_2 = h \cdot (T_{\text{air}} - T_{\text{surface}}) \quad \text{E 5}$$

où h coefficient de transfert de chaleur convectif (W . m<sup>-2</sup> . K<sup>-1</sup>), T<sub>air</sub> température de l'air (°C ou K) ; T<sub>surface</sub> température en surface du produit (°C or K).

- le flux de chaleur J<sub>3</sub> correspond au transfert de chaleur par conduction entre le produit et le support :

$$J_3 = h' \cdot (T_{\text{support}} - T_{\text{contact}}) \quad \text{E 6}$$

où  $h'$  = coefficient de transfert de chaleur conductif ( $\text{W} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{K}^{-1}$ ),  $T_{\text{support}}$  température du support ( $^{\circ}\text{C}$  or  $\text{K}$ ) ;  $T_{\text{contact}}$  température de la surface du produit au contact du support ( $^{\circ}\text{C}$  or  $\text{K}$ ).

- le flux de chaleur  $J_4$  décrit le transfert apporté par radiation :

$$J_4 = \varepsilon \cdot \sigma \cdot (T_{\text{air}}^4 - T_{\text{surface}}^4) \quad \text{E 7}$$

où  $\varepsilon$  émissivité du produit (sans dimension) ;  $\sigma$  constante de Boltzmann ( $5.67 \text{ W} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{K}^{-4}$ ).

- le flux de chaleur  $J_5$  dans le produit:

$$J_5 = \lambda(C,T) \cdot \frac{\partial T}{\partial z} \quad \text{E 8}$$

où  $C$  concentration volumique en eau dans le produit ( $\text{kg d'eau/m}^3$ ) ;  $T$  température du produit ( $^{\circ}\text{C}$  or  $\text{K}$ ) ;  $\lambda$  diffusivité de la chaleur dans le produit ( $\text{m}^2 \cdot \text{s}$ )

Dans notre étude nous supposons que la diffusivité de la chaleur ne dépend que de la température et de la concentration en eau.

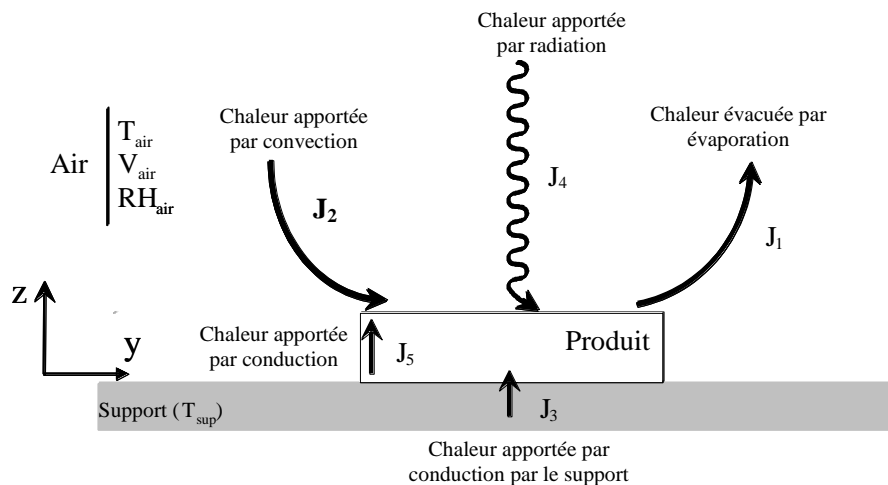


Figure 10 : Différents flux de chaleur échangés qui participent à l'établissement de la température du produit ( $T$ ).

## **2. Les applications**

La prise en compte des flux de chaleur et de matière est indispensable pour estimer l'évolution de la température ou de la quantité d'eau dans les produits alimentaires. V. Zuliani (thèse, 2005) a utilisé les modèles de transferts de chaleur pour estimer l'évolution spatiale et temporelle de la température lors de l'étuvage et du refroidissement de la viande de porc hachée. C. Bégot-Laplace (thèse, 1996), V. Robles-Olvera (thèse, 1999), P. Baucour (thèse, 2000) et moi-même pendant ma thèse avons utilisé les équations de transfert d'eau pour estimer en fonction du temps, l' $a_w$  de surface de produits alimentaires soumis à un procédé de séchage par l'air.

## **3. Evolution de la température dans la viande de porc hachée pendant des procédés d'étuvage et de refroidissement**

Dans le procédé de fabrication des lardons, une étape d'étuvage a lieu après l'étape de saumurage. Il est donc nécessaire de pouvoir prédire l'évolution de la température lors de cette étape : montée, palier et descente. Trois étuvages ont été appliqués [4h à 42°C, 1h à 48°C et 1h à 53°C] suivis chacun par un stockage à 20°C pendant 7 jours (Zuliani et al. 2004) ou à 4°C pendant 25 semaines.

Expérimentalement, la viande hachée était conditionnée sous sac plastique imperméable (plaque de 20 x 15 x 1,3 cm<sup>3</sup>). La température des parallélépipèdes a été mesurée à cœur de l'aliment.

Pour estimer l'évolution de la température en chaque point du parallélépipède, V. Zuliani (thèse, 2005) a considéré les points suivants dans son modèle de transfert thermique :

- Seuls les transferts de chaleur à l'intérieur du produit  $J_5$  et à l'interface air/produit  $J_2$  ont été pris en compte. Les longueurs et largeurs de la plaque étant très longues par rapport à l'épaisseur, le transfert de chaleur interne  $J_5$  a été considéré comme unidirectionnel.
- Les autres transferts de chaleur (conduction entre le produit et son support,  $J_3$ , et radiation  $J_4$ ) ont été négligés.
- Le produit étant emballé hermétiquement, le flux de matière  $J_E$  était nul et donc le flux de chaleur par évaporation  $J_1$  était nul.
- Il a été supposé que la résistance au transfert de chaleur se situait essentiellement dans le produit et non dans l'emballage et à l'interface air/produit (nombre de Biot très grand).



L'évolution spatiale et temporelle de la température a été prédite en différents points de la plaque en la divisant en plusieurs sections d'épaisseurs égales. Dans chaque section la température était supposée identique et égale à celle prédite en son centre. L'équation de Fourier (Bimbenet et al. 2002)<sup>1</sup> a été résolue de façon analytique.

Les températures au cœur de la plaque pendant les trois étuvages et le stockage à 20°C ont été utilisées pour optimiser la valeur de la diffusivité thermique de la viande hachée ( $\lambda = 9.10^{-9} \text{ m}^2.\text{s}^{-1}$ ). Le modèle de transfert thermique a été validé sur les expériences d'étuvage suivies par un stockage à 4°C (Figure 11).

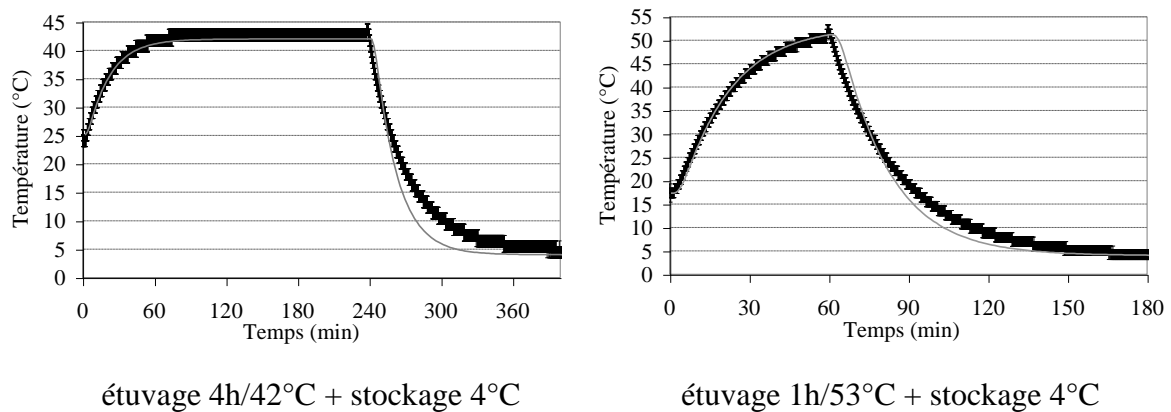


Figure 11 : cinétiques de température à cœur de l'aliment modèle expérimentales et prédites par le modèle de transfert thermique, lors du procédé d'étuvage et du stockage à 4°C

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

<sup>1</sup> Bimbenet, J.J., Duquenoy, A. et Trystram, G., 2002. Génie des procédés alimentaires, Dunod, Paris. 303 p.

#### **4. Effet des variables de contrôle d'un procédé de séchage sur l' $a_w$ de surface d'un aliment**

Les études réalisées en microbiologie prévisionnelle en milieu liquide et en milieu solide ont montré que le mode de régulation de l' $a_w$  (type de soluté en milieu liquide, type de soluté et teneur en eau en milieu solide) pouvait entraîner de fortes différences entre les croissances bactériennes même lorsque l' $a_w$  des milieux était semblable. Cela a en conséquence posé des problèmes pour modéliser les croissances bactériennes et plusieurs modèles de Microbiologie Prévisionnelle ont dû être développés en fonction des modes de régulation de l' $a_w$ .

Dans la filière viande, les problèmes d'hygiène et de sécurité alimentaire se posent du fait de la présence des bactéries en surface des produits carnés et de leur possible développement en fonction des conditions du procédé. Si la température est un paramètre très étudié, l'effet de l' $a_w$  est moins renseigné et d'autant moins que l' $a_w$  est une donnée difficilement contrôlable et mesurable en surface des produits alimentaires. L' $a_w$  de surface est reliée aux caractéristiques de l'air entourant l'aliment, telles que l'humidité relative, la température, la vitesse de l'air. Une question sous-jacente aux résultats en microbiologie prévisionnelle était de savoir si le modèle de croissance développé dans des conditions où l' $a_w$  était contrôlée par un soluté pouvait être appliqué à la croissance d'une bactérie contaminant la surface d'un aliment soumis à un séchage.

- Le premier objectif de ce travail était de répondre à un besoin expérimental à savoir le contrôle de l' $a_w$  de surface : pour cela un outil expérimental, la soufflerie microbiologique, a été conçu, construit et testé à l'Unité de Recherches sur la Viande. La soufflerie devait de part sa conception, permettre l'étude de la croissance de bactéries dans des conditions proches des conditions industrielles couramment rencontrées (humidité relative de l'air comprise entre 80 % et 100 % et température de l'air comprise entre + 4 °C et + 40 °C).
- Le second objectif de ce travail était de développer un modèle de prédiction de l' $a_w$  en surface de produit alimentaire en fonction des variables de contrôle du procédé et des caractéristiques de l'aliment.

Deux types d'échantillons ont été étudiés dans la soufflerie : des échantillons non contaminés par des bactéries pour tester les performances de la soufflerie microbiologique et des échantillons réensemencés avec les bactéries sélectionnées. Dans tous les cas, les

échantillons étaient placés dans le plateau de la soufflerie (dimension 30 cm x 10 cm x 2 cm) et introduits par la boîte à gants. Seule leur face supérieure était balayée par le flux d'air (Figure 12). Les échantillons testés étaient les suivants :

- viande de bœuf : thèses de Bégot-Laplace (1996) et Robles-Olvera (1999),
- plâtre ou viande de porc : thèse de Baucour (2000),
- gel de gélatine pendant ma thèse (2004).

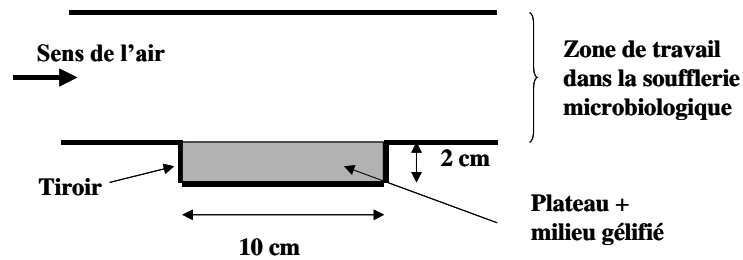


Figure 12 : Schéma de l'emplacement du plateau contenant le gel de gélatine dans le tiroir de la soufflerie microbologique présentée dans la Figure 13.

#### 4.1. Conception et construction de la soufflerie microbologique

La soufflerie microbologique [Robles Olvera V. et al. 1999 – A7] a été conçue et construite dans le laboratoire Génie des Procédés (Figure 13). C. Bégot-Laplace (thèse, 1996) a participé à sa conception et à sa construction. V. Robles-Olvera (thèse, 1999) a amélioré la régulation de l' $a_w$  de surface à basses températures.

Si dans le principe la régulation de la température de l'air ne pose pas de problème, l' $a_w$  est plus difficile à maîtriser. Cette grandeur d'équilibre dépend de l'humidité relative de l'air qui elle-même dépend de la quantité d'eau présente dans l'air et de la température de l'air. La régulation de l' $a_w$  est réalisée en agissant d'une part sur la quantité d'eau injectée dans la soufflerie et d'autre part sur sa température. Ainsi modifier l'humidité relative de l'air revient aussi à modifier la température de l'air : les deux régulations ne sont pas indépendantes.

C. Bégot-Laplace et V. Robles-Olvera ont travaillé sur la viande de bœuf qui est constituée de 70 à 75 % d'eau, l' $a_w$  initiale est ainsi proche de 1. La surface de la viande est caractérisée par une température,  $T_s$ , et une pression partielle en eau,  $P_s$  ; l'air, par une température  $T_a$  et une pression partielle en eau  $P_a$ . Quand la viande est au contact de l'air, aux points de contact, il y a évolution des températures et des pressions de vapeur d'eau vers un équilibre. Si la viande a une température  $T_s < T_a$ , il y a réchauffement du produit de  $T_s$  vers  $T_a$ . Comme  $P_s < P_a$ , il y a sortie d'eau en permanence selon le coefficient de diffusivité de l'eau dans la

viande. Quand l'équilibre thermique et hydrique est atteint, aux points de contact, surface du produit - air, le flux  $J_E$  (Equation 2) est nul et on obtient la relation :

$$a_{w,s} = HR/100 = \frac{P_s}{P'_s} \quad E 9$$

où  $a_{w,s}$   $a_w$  de surface du produit ; HR humidité relative de l'air (%),  $P_s$  la pression partielle de l'eau dans l'air et  $P'_s$  la pression saturante de l'eau pure à la température considérée.

Pour un flux d'eau équivalent, travailler à une forte vitesse d'air se traduit par un coefficient de transfert d'eau,  $k$ , élevé (Equation 2), puisque  $k$  dépend de la racine carrée de la vitesse, et par une faible différence de pression partielle d'eau entre l'air et la surface. Pour obtenir une forte  $a_w$  de surface de la viande (0,95 - 1,00), il faut donc appliquer une vitesse d'air élevée à la surface de la viande.

Pour concevoir la soufflerie, nous avons tenu compte de contraintes de natures microbiologiques et aérauliques. Ainsi, la boucle de traitement de l'air devait répondre à plusieurs caractéristiques : régulation fine des caractéristiques de l'air (humidité relative et donc  $a_w$  et température) ; traitement homogène de l'échantillon ; flux d'air stérile ; échantillonnage stérile.

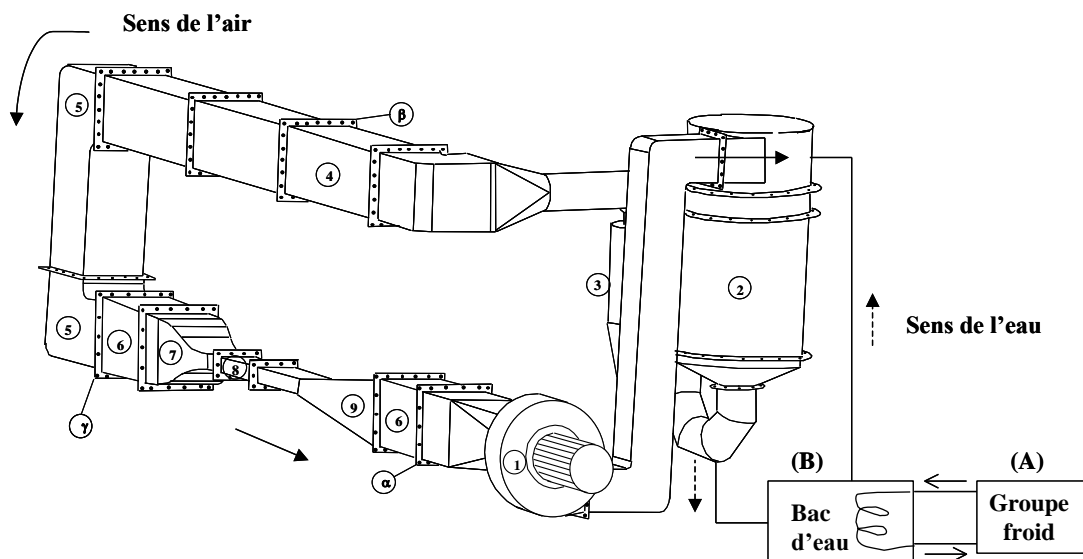


Figure 13 : Schéma de la soufflerie microbiologique. Elle comprend trois parties : de ( $\alpha$ ) à ( $\beta$ ) partie conditionnement de l'air ; de ( $\beta$ ) à ( $\alpha$ ) partie aéraulique de l'air ; ( $\gamma$ ) à ( $\alpha$ ) partie, zone de travail stérile. (1) ventilateur, (2) tour d'humidification, (3) cyclone, (4) résistances électriques, (5) coude avec ailettes, (6) pré-filtre + filtre, (7) convergent, (8) cellule de mesure, (9) divergent, (A) groupe froid, (B) bac à réserve d'eau.

La soufflerie [Robles-Olvera et al. 1999 – A7] permet de placer un aliment dans des conditions aérauliques et microbiologiques maîtrisées (température : 4°C à 40°C, vitesse : 0,5 m/s à 10 m/s et humidité relative de l'air : jusqu'à 99 %). Elle est étanche et stérilisable à 160 °C ; une zone de travail est délimitée par deux filtres à haute efficacité et la liaison avec l'extérieur se fait à travers une boîte à gants. Température et vitesse d'air sont contrôlées par des capteurs. L'humidité relative est calculée à partir de la température de l'air et de la température de point de rosée également mesurée. Des tests ont permis de vérifier la bonne homogénéité de la température et de la vitesse d'air dans différentes sections de la cellule de mesure. Les différences moyennes observées étaient inférieures à 0,2 °C pour la température et à 0,2 m/s pour la vitesse.

#### **4.2. Expérimentation et validation du modèle de prédiction de l' $a_w$ en surface d'aliments**

P. Baucour (thèse, 2000) [Lebert I. et al. 2005a – A8] a développé un modèle de transfert d'eau qui intègre l'effet des caractéristiques de l'air (vitesse, température, humidité relative) sur les propriétés physico-chimiques d'un produit alimentaire solide dont la surface est balayée par un flux d'air. Son modèle estime l'évolution des profils de teneur en eau au sein du produit et l'évolution des profils de l' $a_w$  de surface en fonction du temps. Le modèle tient compte des transferts d'eau à l'intérieur du produit (équation de Fick, équation E3), des transferts d'eau à l'interface air/produit (équation E2), et de la relation entre l' $a_w$  et la teneur en eau (courbe de sorption).

L'une des difficultés de la modélisation du transfert d'eau dans les produits alimentaires, lors du séchage, est la déformation qui résulte de la rétraction du produit. Afin de prendre en compte cette rétraction, P. Baucour a retenu l'hypothèse la plus simple qui est de considérer l'additivité des volumes partiels d'eau et de matière sèche :

$$V_{\text{Total}} = V_{\text{eau}} + V_{\text{MS}} \quad \text{E 10}$$

Comme que l'épaisseur de l'échantillon est très petite par rapport aux deux autres dimensions, la rétraction ne s'opère que dans la direction  $z$  du transfert d'eau et l'équation précédente se ramène alors à une additivité des '*longueurs d'eau* ( $z_{\text{eau}}$ ) *et de matière sèche* ( $z_{\text{MS}}$ )' :

$$z_{\text{Total}} = z_{\text{eau}} + z_{\text{MS}} \quad \text{E 11}$$

Le concept de longueur de matière sèche permet de constituer un référentiel spatial dont l'abscisse est dite abscisse solide ( $\xi$ ). Ce référentiel, invariant lors du séchage, a été utilisé par Rovedo *et al.* (1998<sup>1</sup>). L'équation de Fick a alors la forme suivante:

$$\frac{\partial X}{\partial t} = \frac{\partial}{\partial \xi} \left( D^*(X) \cdot \frac{\partial X}{\partial \xi} \right) \quad \text{E 12}$$

où  $X$  la teneur en eau (kg eau / kg MS), et  $D^*$  ( $\text{m}^2_{\text{MS}} \cdot \text{s}^{-1}$ ) la diffusivité effective dans le nouveau référentiel qui s'exprime en fonction de la diffusivité  $D$  ( $\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ ) selon :

$$D^*(X) = \frac{D(X)}{\left( 1 + \frac{\rho_{\text{MS}}}{\rho_{\text{eau}}} X \right)^2} \quad \text{E 13}$$

où  $\rho_i$  les masses volumiques de l'eau ( $\text{kg eau} \cdot \text{m}^{-3}$ ) et de la matière sèche ( $\text{kg MS} \cdot \text{m}^{-3}$ ).

L'évolution de la diffusivité de l'eau en fonction de la teneur en eau est représentée par l'équation:

$$D = a \cdot e^{(c+b \cdot X_r \cdot e^{(d \cdot (X_r+f))})} \cdot (a \cdot X_r + b) \quad \text{E 14}$$

avec  $X_r = \frac{X}{X_0}$ , où  $X_0$  teneur en eau initiale du gel,  $X$  teneur en eau,  $X_r$  teneur en eau réduite.

Les coefficients  $a$ ,  $b$ ,  $c$ ,  $e$  et  $f$  ont été estimés pour un gel de gélatine pure à partir des mesures de Ruiz-Cabrera (1999)<sup>2</sup> et avaient les valeurs :

$$a = 1,11 ; b = 8,37 \cdot 10^{-5} ; c = -25,39 ; d = 0,31 ; f = 25,85.$$

P. Baucour a estimé le coefficient de transfert de matière à l'interface air produit,  $k$ , en plaçant une plaque de plâtre humide dans le plateau de la soufflerie microbiologique. A une vitesse d'air de 2,3 m/s, la valeur était égale à 0,0218 m/s.

La Figure 14 présente le fonctionnement global du modèle de Baucour. Ce modèle a été validé sur des expériences de séchage avec des gels de gélatine pure ayant une teneur en eau

<sup>1</sup> Rovedo, C. O., Suarez, C., Viollaz, P., 1998. Analysis of moisture profiles, mass Biot number and driving forces during drying of potato slabs. *Journal of Food Engineering* 36, 211-231.

<sup>2</sup> Ruiz-Cabrera, M., 1999. Détermination de la relation entre la diffusivité de l'eau et la teneur en eau dans les matériaux déformables à partir d'images RMN - Elaboration de la méthode avec des gels de gélatine et transposition à la viande. Thèse de Docteur ès science, Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand II.

initiale de 3 kg eau/kg MS et un pH de 6,0. Les gels étaient placés dans un flux d'air ayant une vitesse de 0,56 m/s et une humidité relative de 40% (Baucour *et al.*, 1999)<sup>1</sup>.

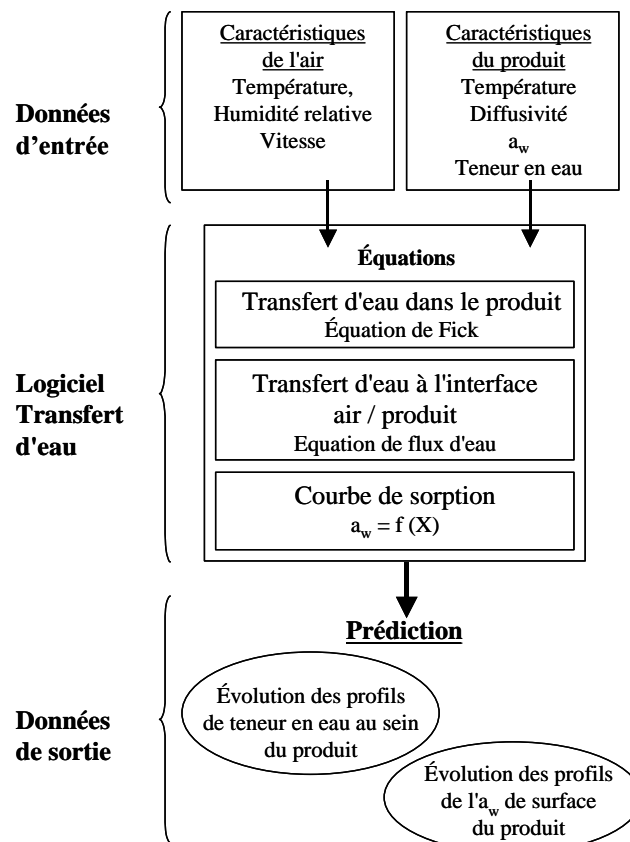


Figure 14 : Schéma de fonctionnement du modèle de transfert d'eau.

Des simulations ont été réalisées pour étudier la sensibilité du transfert d'eau en quantifiant l'effet de facteurs du procédé et de l'aliment sur l' $a_w$  de surface. Elles ont montré qu'une faible modification de la diffusivité de l'eau, l'épaisseur, la vitesse de l'air et l'humidité relative entraînaient de fortes modifications de l'estimation de l' $a_w$  [Lebert I. et al. 2005b – A8]. La simulation réalisée par P. Baucour concernant l'effet de la vitesse de l'air sur l' $a_w$  a confirmé les hypothèses posées par Bégot-Laplace et Robles-Olvera c'est-à-dire qu'une vitesse d'air de 7 m/s entraînait très rapidement un équilibre entre la surface de la viande et l'humidité relative de l'air.

<sup>1</sup> Baucour P., Ruiz-Cabrera M. et Daudin J.D. 1999. Food surface water activity prediction in water transfer processes: incidence of sorption isotherm in the high humidity range. *In* : II European Congress of Chemical Engineering (Montpellier, France).

Dans le travail de P. Baucour, un séchage hétérogène en surface de la viande de porc en surface a été observé selon l'axe des fibres musculaires. C'est pourquoi, j'ai développé pendant ma thèse un milieu modèle gel de gélatine [Lebert I. et al. 2004 – A5]. Ce milieu avait :

- une composition identique à chaque expérimentation, alors que pour la viande, elle était dépendante de la variabilité liée aux animaux. La teneur en eau initiale était correctement maîtrisée.
- une structure homogène de l'échantillon. Ainsi pendant le séchage, la gélatine permettait d'appliquer les hypothèses de Baucour pour la rétraction.

J'ai ainsi optimisé le modèle de Baucour pour prédire l' $a_w$  en surface du gel de gélatine. Les coefficients de l'équation de diffusivité en fonction de la teneur en eau ont été estimés pour un gel de gélatine pure à partir des mesures de Ruiz-Cabrera (1999), le coefficient de transfert d'eau à l'interface air produit, a été vérifié pour le milieu gélifié et la courbe de sorption mesurée.

Le modèle de transfert d'eau a été validé avec succès en comparant des valeurs expérimentales et prédites de teneur en eau du milieu gélifié sous différentes conditions de séchage dans la soufflerie microbiologique. Ces résultats sont présentés dans l'article [Lebert I. et al. 2006 – A9].

## **5. Conclusion**

L'avancée essentielle de cette recherche est le développement d'un modèle de prédiction de l' $a_w$  en surface d'un aliment soumis à un flux d'air. Les techniques classiques de mesure de l' $a_w$  (moyenne d'un produit) supposent qu'il y ait équilibre entre le produit dans son ensemble et l'atmosphère gazeuse autour de ce produit. Ces techniques ne sont pas applicables à la mesure de l' $a_w$  en surface d'un aliment, d'autant plus que cet aliment n'est pas en équilibre avec l'atmosphère gazeuse. J'ai validé ce modèle pendant mon travail de thèse en l'appliquant à un milieu gel de gélatine.



## **ACTIVITE DE RECHERCHES 3**

### **EXPERIMENTATION ET MODELISATION DES CARACTERISTIQUES PHYSICOCHEMIQUES DES ALIMENTS**

Acquis techniques	Acquis scientifiques
<ul style="list-style-type: none"> <li>- mesure de l'<math>a_w</math> avec trois techniques <ul style="list-style-type: none"> <li>- <math>a_w</math>-mètre Novasina, gamme <math>a_w</math> 0-1</li> <li>- <math>a_w</math>-mètre Roebing, gamme <math>a_w</math> 0,96-1,00 <ul style="list-style-type: none"> <li>→ détermination du point de congélation des peptones et de la gélatine</li> </ul> </li> </ul> </li> <li>- [appareil de mesure des courbes de sorption dans les hautes humidités] <sup>1</sup></li> <li>- mesure du pH <ul style="list-style-type: none"> <li>- sonde pH ISFET</li> <li>- sonde pH Inlab 413, pour les solutions liquides <ul style="list-style-type: none"> <li>→ mesure de courbes de titration</li> </ul> </li> <li>- sonde de pénétration, viande hachée</li> <li>- sonde pH plate, surface de gélatine</li> </ul> </li> <li>- mesure de teneur en eau</li> <li>- [modèle thermodynamique de prédiction des propriétés physico-chimiques] <sup>2</sup></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- optimisation des paramètres d'interaction du modèle thermodynamique dans des milieux en présence de NaCl et KCl</li> <li>- caractérisations des peptones et de la gélatine <ul style="list-style-type: none"> <li>- estimation d'une masse moléculaire apparente</li> <li>- estimation de pK</li> <li>- décomposition en groupes fonctionnels</li> </ul> </li> <li>- prédiction <math>a_w</math> et pH de milieu liquide de culture bactérien contenant des concentrations faibles de NaCl, KCl, glycérol, glucose, saccharose</li> <li>- prédiction du pH des courbes de titration d'acides aminés et de mélange d'acides aminés</li> <li>- prédiction de l'<math>a_w</math> du milieu de culture à base de gélatine et de peptones <ul style="list-style-type: none"> <li>→ prédiction de la courbe de sorption</li> </ul> </li> </ul>

Entre crochets : réalisations indispensables à mes activités de recherche, mais non réalisées par moi-même.

<sup>1</sup> P. Baucour (Baucour P. et Daudin J.D. Development of a new method for fast measurement of water sorption isotherms in the high humidity range: validation on gelatine gel. *Journal of Food Engineering*, 2000, 44, 97-107.

<sup>2</sup> Achard C., Dussap C.G. et Gros J.B. 1994. Prediction of pH in complex aqueous mixtures using a group-contribution method. *AIChE Journal*, 40(7), 1210-1222.

Cette activité a été réalisée pendant mon travail de thèse.

Production scientifique :

- une publication :

**A6** Lebert I., Dussap C.G., Lebert A. (2005b). Combined physico-chemical and water transfer modelling to predict bacterial growth during food processes, *International Journal of Food Microbiology*, 102, 305-322.

- une communication orale : Lebert I. *et al.* (2004a)

- quatre posters avec texte : Lebert I. *et al.* (2002), Lebert I. *et al.* (2003a), Lebert I. *et al.* (2003b), Lebert I. *et al.* (2005)

Publications de A1 à A10 données dans le dossier de publications

## **1. Introduction**

L' $a_w$  et le pH sont deux facteurs intervenant sur la qualité globale (organoleptique, hygiénique) d'un aliment. D'un point de vue hygiène et sécurité alimentaire, leur contrôle permet de maîtriser le développement microbien, en réduisant ou en inhibant la croissance des microorganismes présents. Ces deux facteurs peuvent être contrôlés séparément, ensemble ou en combinaison avec d'autres facteurs tels que la température. Le pH d'un aliment est directement modifié lorsqu'un acide est ajouté (acide acétique, acide chlorhydrique) comme agent de conservation ou indirectement par l'activité métabolique de la flore bactérienne présente qui produit de l'acide lactique ou acétique. L' $a_w$  est ajustée par l'ajout de molécules tels que des sels (NaCl, KCl) ou des polyosides (glucose, saccharose, glycérol,...). La connaissance des valeurs de ces deux facteurs dans un aliment est nécessaire pour savoir si le procédé de fabrication a été correctement appliqué et pour prédire la croissance d'un microorganisme à l'aide des modèles de microbiologie prévisionnelle. Si le pH et l' $a_w$  d'un aliment sont facilement mesurés dans un produit fini, ils sont plus difficiles à évaluer pendant le procédé de fabrication. La prévision du pH et de l' $a_w$  apparaît alors comme une aide précieuse pour connaître la qualité du produit alimentaire.

En 2000, j'ai débuté une collaboration avec C.G. Dussap du Laboratoire de Génie Chimique et Biochimique (Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand). J'ai utilisé une approche fondée sur la thermodynamique des solutions afin de prédire le pH et l' $a_w$  de milieux de cultures. Le modèle de Achard *et al.* (1994)<sup>1</sup>, développé dans cette équipe, prédit les propriétés de solutions aqueuses en tenant compte des propriétés thermodynamiques (activités, pH, concentrations) des constituants d'un mélange aqueux.

## **2. Présentation du modèle de Achard**

Le modèle de solution développé par Achard *et al.* (1994) comprend trois contributions :

- le modèle UNIFAC (Universal Functional Group Activity Coefficients) modifié par Larsen *et al.* (1987)<sup>2</sup> pour la prévision des activités de molécules non ioniques dans le mélange tels que des sucres, des alcools, ... Ce modèle est basé sur le concept de

---

<sup>1</sup> Achard C., Dussap C.G. et Gros J.B., 1994. Prediction of pH in complex aqueous mixtures using a group-contribution method. *AIChE Journal*, 40(7), 1210-1222.

<sup>2</sup> Larsen B. L., Rasmussen P., Fredenslund A., 1987. A modified UNIFAC group-contribution model for prediction of phase equilibria and heats of mixing. *Industrial & Engineering Chemistry Research* 26, 2274-2286.

contribution de groupes : chaque molécule est décomposée en groupes fonctionnels. Le coefficient d'activité est la somme de deux termes : le premier tient compte de la surface et du volume des molécules à l'aide de paramètres structuraux et le deuxième des interactions énergétiques entre groupes.

- un modèle décrivant les interactions de longue portée entre espèces ioniques et se basant sur la théorie de Pitzer-Debye-Hückel (Pitzer, 1973)<sup>1</sup>. Il permet de rendre compte de la présence de constituants ioniques tels que des sels, des acides, des bases.
- un modèle de solvation tenant compte de la présence des molécules d'eau liées aux cations par des interactions de solvation. L'équation de solvation est basée sur la définition du nombre d'hydratation pour chaque ion, correspondant au nombre de molécules d'eau supposées liées chimiquement aux espèces chargées (Achard *et al.*, 1994).

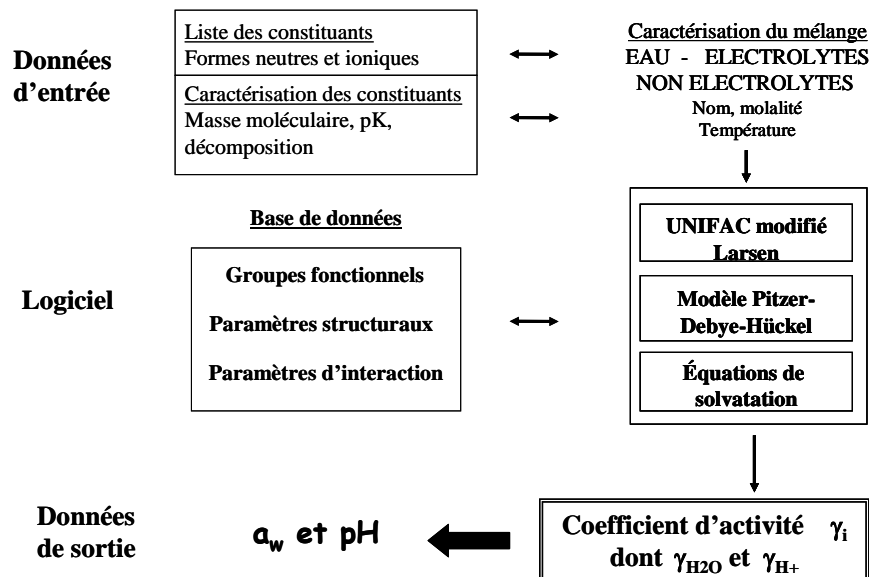


Figure 15 : Modèle thermodynamique de prédiction du pH et  $a_w$  de solutions aqueuses

Le modèle de solution (Figure 15) fournit la composition détaillée de la solution (concentrations des différentes espèces chargées) et les activités des différents solutés. Les activités peuvent être comparées directement aux valeurs expérimentales de l' $a_w$  et du pH car le pH est égal à  $-\log(a_{H^+})$  avec  $a_{H^+}$  l'activité des ions  $H^+$ .

<sup>1</sup> Pitzer, K. S., 1973. Thermodynamics of electrolytes. 1. Theoretical basis and general equations. The Journal of Physical Chemistry 77, 268-277.

### 3. Méthodologie et acquisition de données expérimentales

#### 3.1. Métrologie

##### *Mesure de l'a<sub>w</sub>*

Deux appareils ont permis de mesurer l'a<sub>w</sub> dans les milieux liquides et solides et de travailler sur l'ensemble de la plage d'a<sub>w</sub> de mon étude :

- Le Micro-Osmomètre Automatique, Type 13/13DR – Autocal (Roebing, Allemagne) mesure l'abaissement du point de congélation d'une solution par rapport à celui de l'eau pure ce qui permet une mesure directe de l'osmolalité de la solution. Seules les mesures en milieu liquide sont faisables sur une plage d'a<sub>w</sub> de 0,97 à 1,00.
- L'appareil a<sub>w</sub>-Sprint TH500 (Novasina, Roucaire, France) mesure l'a<sub>w</sub> d'un produit solide ou liquide en équilibre en humidité et en température. La plage de mesure est comprise entre 0,05 et 1,00 a<sub>w</sub>.

##### *Mesure du pH*

Lors de l'ajout de sels dans les milieux de cultures, j'ai observé une diminution du pH proportionnelle à la concentration en sel. Pour savoir si cette chute était due à l'effet des sels ou à un défaut de mesure, j'ai testé plusieurs pH-mètres et sondes (Tableau 7). L'électrode ISFET<sup>1</sup> devait mieux prendre en compte les interactions électrostatiques dues à la présence des sels/ions. En fait tous les pH-mètres ont donné des résultats similaires. Ce contrôle des appareils a permis de considérer que la mesure était non biaisée et valide.

Tableau 7 : Caractéristiques des pH-mètres.

pH-mètre	MP 230 Mettler Toledo	MI 229 * Mettler Toledo	Consort C533 Fischer Bioblock
Résolution	+/- 0,001 upH	+/- 0,01 upH	+/- 0,01 upH
Plage de mesure	-1,999-19,999	0,00-14,00	0,01-14,00
Précision relative	+/- 0,001 upH	+/- 0,01 upH	0,2 %
Point de calibrage	7,00 - 4,01 - 9,21	7,00 - 4,01 - 9,21	7,00 - 4,01
Sonde de pH associée	Inlab 413 (verre) Inlab 426 (verre)	Inlab 490 (capteur ISFET)	n° 84915 (verre)

\* matériel prêté par la société Mettler Toledo.

<sup>1</sup> L'électrode ISFET (transistor sélectif à effet de champ ou Ion Selective Field Effect Transistor) combine deux technologies, une sur les électrodes sélectives aux ions et une sur les transistors à effets de champ (FET). Une membrane sélective aux ions d'intérêts (H<sup>+</sup>), placée sur la grille d'un FET, est sensible aux changements de composition chimique de la solution qui conduisent à une modification des interactions électrostatiques au niveau de cette membrane.

### **3.2. Mesures expérimentales et validation du modèle thermodynamique sur des solutions binaires à quaternaires**

J'ai réalisé les premières mesures sur des solutions simples, binaires ou ternaires, c'est-à-dire composé d'eau et d'un ou deux solutés [Desnier-Lebert, 2004 – thèse]. Pour des molalités inférieures à 3 moles  $\text{kg}^{-1}$ , les écarts entre valeurs expérimentales et prédites par le modèle de Achard étaient de l'ordre de 0,001 unité  $a_w$  pour le NaCl et de 0,005 unité  $a_w$  pour le glucose. Pour d'autres solutés, à une molalité inférieure à 3 moles  $\text{kg}^{-1}$ , les écarts étaient du même ordre de grandeur : 0,005 unité  $a_w$  pour le KCl, 0,007 unité  $a_w$  pour le glycérol, 0,01 unité  $a_w$  pour le saccharose, le fructose et le maltose. Pour des mélanges ternaires (eau+fructose+glucose ou eau+KCl+NaCl), les écarts étaient inférieurs à 0,005 unité  $a_w$  pour les sels et inférieurs à 0,01 unité  $a_w$  pour les sucres pour des molalités inférieures à 2 moles  $\text{kg}^{-1}$ .

Afin de s'approcher de la composition des milieux de microbiologie, j'ai mesuré le pH et l' $a_w$  de mélanges quaternaires (eau + tampon phosphate (pH 7 ou pH 5,8) + solutés). L'ajout de concentrations croissantes de NaCl,  $\text{NaNO}_3$ ,  $\text{NaNO}_2$ , KCl,  $\text{KNO}_3$  ou  $\text{KNO}_2$  dans le tampon phosphate s'est traduit par une baisse proportionnelle du pH. La chute de pH a été correctement prédite par le modèle de Achard après avoir ajusté des paramètres d'interactions du couple  $\text{Na}^+/\text{HPO}_4^{2-}$ .

### **3.3. Mesures expérimentales et adaptation du modèle thermodynamique pour les milieux microbiologiques liquides**

La présence des trois peptones composant le milieu de culture bactérien BTM (protéose peptone, peptone de viande et tryptone) a été plus complexe à prendre en compte car ces constituants n'existaient pas dans la base de données du modèle thermodynamique [Lebert I. et al. 2005b – A6]. Les peptones sont un mélange complexe de peptides et d'acides aminés et ne peuvent être caractérisées de manière simple. Pour les caractériser, j'ai supposé que chaque peptone était similaire à un acide aminé à deux pK. Les 2 pK ont été estimés par la mesure de courbes de titration. Une masse molaire apparente a été estimée en mesurant le point d'abaissement cryoscopique de chaque solution de peptone avec le Micro-Osmomètre Automatique (Tableau 8). A partir de la masse molaire, une décomposition en groupes fonctionnels a été proposée (Tableau 9). Chaque peptone a ainsi pu être caractérisée et introduite dans la base de donnée du logiciel.

Tableau 8 : Masses molaires apparentes ( $M_a$ , g/mole) et  $pK$  pour les peptones et la gélatine

Peptones	$M_a$ (g/mole)	$pK_a$	$pK_b$
Proteose peptone	213.7	4.00	9.48
Tryptone	223.5	4.50	9.72
Extrait de viande	172.5	4.20	9.94
Gelatine	865.1	3.25	7.11

Tableau 9 : Décomposition en groupes fonctionnels des peptones.

Peptones	Nombre de groupes fonctionnels				
	$CH_3$	$CH_2$	CH	$NH_3^+$	$COO^-$
Proteose peptone	3	4	4	1	1
Tryptone	3	4	5	1	1
Extrait de viande	2	3	3	1	1

Les  $pH$  et les  $a_w$  des milieux de cultures BTV ont été mesurés en présence de concentrations croissantes de NaCl, KCl, glycérol, glucose ou saccharose. Les prédictions du  $pH$  et de l' $a_w$  en présence de concentrations croissantes en NaCl et glycérol sont présentées dans [Lebert I. et al. 2005b – A6]. Le  $pH$  et l' $a_w$  ont été correctement prédits quel que soit le sel ou le  $pH$  du tampon. A partir de 2,6 moles de NaCl/kg d'eau, à  $pH$  5,8, un écart de 0,2 unité  $pH$  était observé. En présence de sucres, des écarts de  $pH$  et d' $a_w$  étaient observés dès les faibles molalités pour le  $pH$  et pour les molalités élevées pour l' $a_w$ . Ces mêmes écarts avaient été observés lors de la prédiction des  $pH$  et des  $a_w$  dans les solutions eau + tampon phosphate + sucres. L'ajout des peptones n'a donc pas entraîné de modification des écarts entre les valeurs expérimentales et calculées. Ceci valide la simplification pour la caractérisation des peptones. En présence de glycérol, les prédictions de l' $a_w$  étaient inférieures à 0,006 unité  $a_w$  pour des molalités inférieures à 3 moles de glycérol/kg d'eau. Cet écart était de 0,005 unité  $a_w$  dans la solution eau + tampon phosphate. Ces résultats ont montré la capacité du modèle thermodynamique à prendre en compte correctement et simultanément le mélange des constituants aussi complexes qu'un milieu de culture bactérien.

### 3.4. Mesures expérimentales et adaptation du modèle thermodynamique pour les milieux microbiologiques gélifiés

La démarche mise en place pour les peptones a été appliquée à la gélatine [Lebert I. et al. 2005b – A6]. Le modèle a été utilisé pour prédire le  $pH$  et l' $a_w$  du gel de gélatine composé des trois peptones, de glucose, de la gélatine et de quantité d'eau décroissante pour contrôler l' $a_w$ .

La masse molaire apparente et les deux pK de la gélatine sont donnés dans le Tableau 8. La gélatine étant une protéine, la décomposition a été réalisée en faisant apparaître des liaisons peptidiques. La liaison peptidique  $-CO-NH-$  n'est pas décrite dans le modèle UNIFAC-Larsen, elle a été remplacée par les sous-groupes  $CH_2CO$  et  $CH_2NH$ . Cependant le nombre de liaisons peptidiques n'est pas connu, ainsi plusieurs décompositions ont été testées. La décomposition retenue dans le modèle (6  $CH_3$ , 7  $CH_2$ , 6  $CH$ , 7  $NH_2$ , 6  $COOH$ , 3  $CH_2CO$ , 3  $CH_2NH$ ) a permis une bonne prédiction de l' $a_w$  (écart relatif moyen : 0,14 %) dans le domaine d'intérêt de 0,9 à 1,0 d' $a_w$  (Figure 16), par contre le pH était toujours surestimé de 0,4 à 0,6 upH. Le modèle thermodynamique permet de prédire l' $a_w$  du milieu gel de gélatine qui est un milieu complexe, et permet plus particulièrement de prédire l'évolution de la teneur en eau en fonction de l' $a_w$ , c'est-à-dire la courbe de sorption.

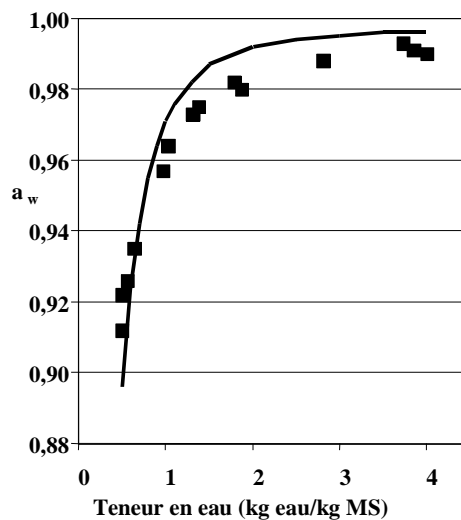


Figure 16 :  $a_w$  mesurées et prédites par le modèle thermodynamique du milieu BTVg à base de gélatine en fonction de la teneur en eau. Valeurs expérimentales, (■); prédites (—).

#### 4. Conclusion

Ce travail a montré que le modèle de prédiction des propriétés physico-chimiques pouvait être appliqué à la prédiction des propriétés physico-chimiques d'un milieu solide complexe proche d'un aliment. Au démarrage de ce travail, aucune piste ne laissait envisager un tel résultat.



**APPROCHE GLOBALE**

**COMBINAISON DES MODELES**

Acquis techniques	Acquis scientifiques
<ul style="list-style-type: none"> <li>- combinaison des techniques expérimentales présentée précédemment <ul style="list-style-type: none"> <li>- préparation d'un milieu gélifié parfaitement homogène de composition maîtrisée</li> <li>- maîtrise des conditions de température, humidité relative et de vitesse d'air dans la soufflerie</li> <li>- techniques microbiologiques (ensemencement, prélèvement, dénombrement)</li> </ul> </li> <li>- [combinaison de modèles <ul style="list-style-type: none"> <li>- résolution des problèmes de stabilité numérique] <sup>1</sup></li> </ul> </li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- prédiction de la courbe de sorption d'un milieu gélifié</li> <li>- prédiction de l'a<sub>w</sub> de surface d'un aliment soumis à un flux d'air</li> <li>- prédiction de la température dans un aliment soumis à un chauffage / refroidissement</li> <li>- prédiction de la croissance de bactéries présentes dans un aliment soumis à un ou plusieurs procédés</li> </ul> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Simulation de l'effet de variables procédé ou des caractéristiques de l'aliment sur la croissance bactérienne</p>

Entre crochets : réalisations indispensables à mes activités de recherche, mais non réalisées par moi-même.

<sup>1</sup> A. Lebert

Co-encadrement :

- deux thèses de l'Université Clermont-Ferrand II:

Baucour (2000) Mesure des isothermes de sorption dans les hautes humidités. Modélisation du couplage transfert d'eau et croissance bactérienne en surface des viandes

Zuliani (2005) Prédiction de la contamination bactérienne lors de la fabrication et de la conservation d'un aliment – Application à de la viande de porc contaminée par *Listeria monocytogenes*

Encadrement :

- un MOO : Nicolas (2003)

Production scientifique de cette activité :

- quatre publications :

**A6** Lebert I., Dussap C.G., Lebert A. (2005b) Combined physico-chemical and water transfer modelling to predict bacterial growth during food processes, *International Journal of Food Microbiology*, 102, 305-322.

**A8** Lebert I., Baucour P., Lebert A., Daudin J.D. (2005a). Assessment of bacterial growth on the surface of meat under standard processing conditions by combining biological and physical models, *Journal of Food Engineering*, 68, 89-98.

**A9** Lebert I., Nicolas C., Portanguen S., Lebert A. (2006, sous presse) Combined water transfer and bacterial models to predict *Listeria innocua* growth on the surface of gelatine gel during the drying process, *Journal of Food Engineering*.

**A10** Lebert I. et Lebert A. (2006, acceptée) Quantitative prediction of microbial behaviour during food processing using an integrated modelling approach: a review. *International Journal of Refrigeration*

- deux chapitres d'ouvrage : Zuliani *et al.* (2004), Lebert I. *et al.* (2005a)

- six communications orales : Lebert I. *et al.* (2003b), Nicolas *et al.* (2003), Lebert I. *et al.* (2004a), Zuliani *et al.* (2005), Kondjoyan *et al.* (2005), Lebert I. *et al.* (2005b)

- huit posters avec texte : Lebert I. *et al.* (2002), Lebert I. *et al.* (2003a), Lebert I. *et al.* (2003b), Zuliani *et al.* (2003), Lebert I. *et al.* (2004a), Lebert I. *et al.* (2004b), Zuliani *et al.* (2004), Lebert I. *et al.* (2005)

- deux posters avec résumé : Lebert I. *et al.* (2004), Zuliani *et al.* (2004).

Publications de A1 à A10 données dans le dossier de publications

## **1. Introduction**

Les trois activités de recherches présentées précédemment peuvent paraître très éloignées et sans lien les unes avec les autres. Certes cela est vrai quant à la nature des disciplines abordées, chaque thème est un axe de recherche en soi et de nombreux travaux existent dans la littérature pour décrire les phénomènes qui les sous-tendent. Mais cela est faux car chacune de ces activités est indispensable pour atteindre l'objectif final que nous nous étions fixé à savoir : développer un modèle de prédiction de la qualité et de la sécurité microbiologique des aliments en tenant compte des procédés appliqués et des caractéristiques de l'aliment.

Cet objectif ne peut être atteint que si des approches méthodiques sont mises en place dans chaque activité de recherches. Ainsi nous avons réalisé les phases suivantes :

- une phase expérimentale : les méthodologies nécessaires à l'acquisition de données expérimentales ont été développées. Elles concernaient la mise au point de nouveaux protocoles expérimentaux, le choix d'appareils de mesure fiables ou la construction d'appareils spécifiques. Cette phase a permis de créer une base de données de qualité, disponible et réutilisable à tout moment pour la suite des recherches.
- une phase de modélisation : la description des phénomènes étudiés (biologiques, physiques ou chimiques) passe par le choix de modèles. Ce choix suppose de faire des hypothèses sur les équations utilisées, et d'optimiser les paramètres des équations. C'est dans ce cadre que les bases de données obtenues précédemment ou celles obtenues dans la littérature ont pris tout leur intérêt. En effet une fraction des données doit permettre d'optimiser les paramètres des modèles et une autre fraction indépendante de la première doit permettre de valider les modèles en comparant les prédictions aux données expérimentales.
- une phase de combinaison des différents modèles développés et validés indépendamment les uns des autres
- une phase de simulation avec les modèles combinés.

Wilson et al. (2002)<sup>1</sup> sont les premiers à avoir proposé une approche intégrant les différentes disciplines pour prédire le comportement bactérien dans un aliment. Des études

---

1 Wilson, P. D., Brocklehurst, T. F., Arino, S., Thuault, D., Jakobsen, M., Lange, M., Farkas, J., Wimpenny, J. W., Van Impe, J. F., 2002. Modelling microbial growth in structured foods: towards a unified approach. *International Journal of Food Microbiology* 73, 275-89.

récentes ont été publiées dans cette voie, elles sont synthétisées dans la publication [Lebert I. et Lebert A., 2006 – A10].

Tableau 10 : Modèles utilisés dans l'approche globale

Etude	V. Zuliani	P. Baucour	I. Desnier-Lebert
Bactérie	<i>L. monocytogenes</i>	<i>Pseudomonas spp.</i>	<i>L. innocua</i>
Produit	Viande de porc hachée salée	Viande de porc	Gel de gélatine
Procédé	Etuvage et stockage	Séchage	Séchage
Modèle			
Transfert	Chaleur <sup>1</sup>	Matière <sup>2</sup>	Matière <sup>2</sup>
Physico-chimique			Thermodynamique <sup>3</sup>
Croissance bactérienne	I: Equation logistique <sup>4</sup> II: Modèle cardinal <sup>7</sup>	I: Equation Gompertz <sup>5</sup> II: Modèle polynomial <sup>6</sup>	I: Equation logistique <sup>4</sup> II: Modèle cardinal <sup>7</sup>
Décroissance bactérienne	I. Cinétique d'ordre un <sup>8</sup> II. Modèle Bigelow <sup>9</sup>		

I: modèle primaire; II: modèle secondaire

1 Zuliani V., Thèse de l'Université Clermont-Ferrand II, 2005. Prédiction de la contamination bactérienne lors de la fabrication et de la conservation d'un aliment – Application à de la viande de porc contaminée par *Listeria monocytogenes*. Mars 2002 – Mai 2005.

2 [Lebert I. et al., 2005 – A8]

3 Achard C., Dussap C.G. et Gros J.B., 1994. Prediction of pH in complex aqueous mixtures using a group-contribution method. *AIChE Journal*, 40(7), 1210-1222.

4 Rosso, L., Bajard, S., Flandrois, J. P., Lahellec, C., Fournaud, J., Veit, P., 1996. Differential growth of *Listeria monocytogenes* at 4 and 8°C: consequences for the shelf life of chilled products. *Journal of Food Protection* 59, 944-949.

5 Zwietering, M. H., De Koos, J. T., Hasenack, B. E., De Wit, J. C., Van't Riet, K., 1991. Modeling of bacterial growth as a function of temperature. *Applied and Environmental Microbiology* 57, 1094-1101.

6 Lebert, V. Robles-Olvera, A. Lebert, 2000. Application of polynomial models to predict growth of mixed cultures of *Pseudomonas spp.* and *Listeria* in meat. *International Journal of Food Microbiology*, 61, 27-39.

7 Augustin, J.-C., 1999. Modélisation de la dynamique de croissance des populations de *Listeria monocytogenes* dans les aliments. 153 p., These de Docteur es science, Université Claude Bernard - Lyon 1.

8 Chick, H., 1908. An investigation of the laws of disinfection. *Journal of Hygiene of Cambridge* 8, 92-158.

9 Bigelow, W., 1921. The logarithmic nature of thermal death time curves. *Journal of Infectious Diseases* 29, 528-536.

Dans nos recherches, nous avons développé deux aspects (Tableau 10) :

- l'un sur la prédiction du comportement de bactéries présentes dans un aliment soumis à une succession d'opérations unitaires. L'exemple choisi concernait le développement de *L. monocytogenes* contaminant de la viande de porc hachée soumise à procédé de fabrication de lardons de type industriel (V. Zuliani, thèse 2005). Afin de simplifier le problème, l' $a_w$  et le pH étaient ajustés en début de procédé et supposés constants pendant le reste du procédé. La viande subissait ensuite des opérations de chauffage par étuvage et de refroidissement pour le stockage. Les modèles nécessaires dans cette

approche concernaient les modèles de microbiologie prévisionnelle avec des modèles de croissance et de décroissance bactérienne et un modèle de transfert de chaleur.

- l'autre sur la prédiction du comportement de bactéries présentes en surface d'un aliment soumis à une seule opération unitaire. Deux exemples illustrent cet aspect :
  - P. Baucour (thèse, 2000) a étudié le comportement de bactéries d'altération, *Pseudomonas* spp. en surface de viande de porc soumise à un séchage. Il a utilisé un modèle de croissance bactérienne et un modèle de transfert d'eau.
  - Pendant ma thèse, j'ai étudié le comportement de *L. innocua* en surface de gel de gélatine soumis à un séchage. J'ai utilisé un modèle de la littérature en Microbiologie Prévisionnelle, le modèle de transfert d'eau de P. Baucour et un modèle de thermodynamique de prédiction des caractéristiques physico-chimiques du gel de gélatine.

## **2. Approche globale appliquée à une succession d'opérations unitaires**

V. Zuliani (thèse, 2005) a appliqué l'approche globale à la prédiction de la croissance, de la survie ou de l'inhibition de *L. monocytogenes* pendant un procédé de fabrication de lardons de type industriel. Elle a pris en compte, dans une matrice viande de porc hachée, les opérations unitaires impliquées dans le procédé (ajout de NaCl, ajout d'acides, chauffage / refroidissement). Deux modèles de microbiologie prévisionnelle (croissance et destruction) ont été adaptés et validés en prenant en compte l'effet de la température, du pH, de l' $a_w$ . Un modèle de transfert de chaleur a été optimisé pour prendre en compte les différentes conditions d'étuvage testées et prédire les évolutions spatiales et temporelles de la température dans le produit.

Après ajustement du pH et de l' $a_w$ , la viande de porc hachée était inoculée avec *L. monocytogenes*, emballée et soumise à trois conditions d'étuvages suivies par une réfrigération à 20 ou 4 °C (Zuliani et al. 2006). Au cours de l'étuvage, une destruction bactérienne a été le plus souvent observée lors des trois procédés testés. Lors du stockage, selon le pH et l' $a_w$ , la population bactérienne est restée constante ou a augmenté.

Pour modéliser la destruction bactérienne par la température (Tableau 10), V. Zuliani a choisi le modèle de Chick (1908) et le modèle secondaire de Bigelow (1921) [Lebert I. et Lebert A., 2006 – A10]. Ce dernier prédit l'évolution du temps de réduction décimale ( $D_\theta$ ) en fonction de la température. A partir des données expérimentales,  $D_{60}$  (temps de réduction

décimale à 60°C) a été optimisé à 2 minutes et z (élévation de température permettant de diminuer  $D_{60}$  d'un facteur dix) à 7,4°C.

Le comportement de *L. monocytogenes* dépend de la température calculée en chacun des points de la viande et en fonction du temps. Dans l'approche globale, si la température en un point était supérieure à la température maximum de croissance (45,5°C), le modèle de destruction de Bigelow estimait le temps de réduction décimale à la température calculée et le modèle de Chick évaluait la décroissance de la population en fonction du temps. De manière identique, si la température en un point était inférieure à la température maximum de croissance, le modèle de croissance estimait les temps de latence et de génération à la température calculée, valeurs qui étaient intégrées au modèle donnant l'évolution de la population en fonction du temps. La population totale correspondait à la somme des populations de chaque section à un temps donné. Le modèle combiné a été optimisé sur les expériences suivies d'un stockage à 20°C et validé sur celles suivies par un stockage à 4°C (Figure 17).

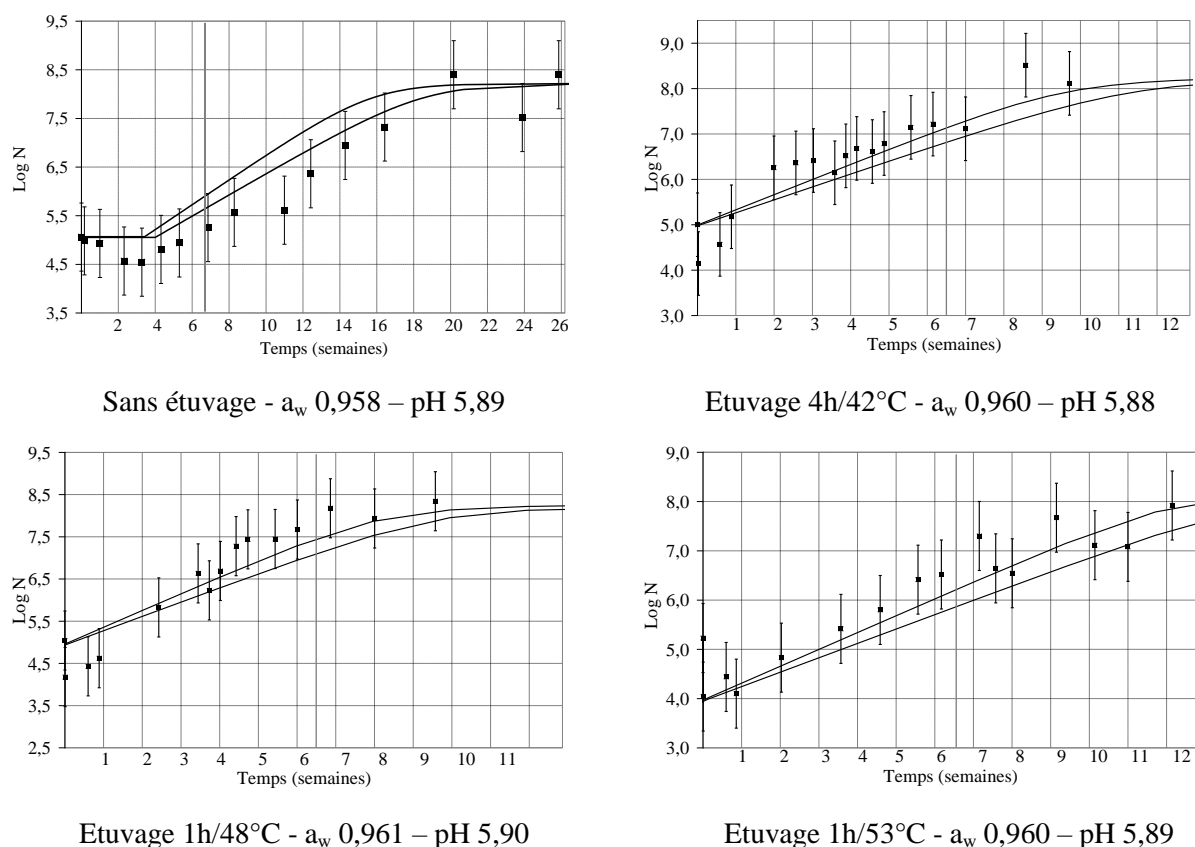


Figure 17 : Cinétiques expérimentales et prédites par le modèle combiné, avec ou sans étuvage et stockage à 4°C.

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

Cette étude a permis de montrer la validité du concept d'une approche globale combinant des modèles de Microbiologie Prévisionnelle et des modèles de génie des procédés à une succession d'opérations unitaires.

### 3. Approche globale appliquée à une opération de séchage

#### 3.1. Effet du séchage sur les *Pseudomonas* spp. présents en surface de viande de porc

Les travaux de P. Baucour sont présentés et discutés dans la publication [Lebert I., 2005b – A8]. Des simulations de l'évolution de l' $a_w$  en surface de la viande ont été obtenues avec le modèle de transfert d'eau. Ces simulations ont servi de données d'entrée dans le modèle de croissance bactérienne ce qui a permis de quantifier l'effet des variables de contrôle du procédé (vitesse de l'air et l'humidité relative) et les caractéristiques de la viande (diffusivité, épaisseur) sur la croissance bactérienne. P. Baucour a montré que considérer une diffusivité constante ( $2 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ ) revenait à prévoir que la population bactérienne atteignait son maximum en 96 h, alors que ce maximum n'était atteint qu'en 336 h (Figure 18). Des simulations sur l'effet combiné de deux facteurs (vitesse et humidité relative de l'air) sur la croissance de *Pseudomonas* (Figure 19) montrent dans le domaine exploré, plusieurs combinaisons où les limites de la croissance de *Pseudomonas*, sont atteintes. Ceci permet de prévoir et de préserver la qualité de la viande de porc.

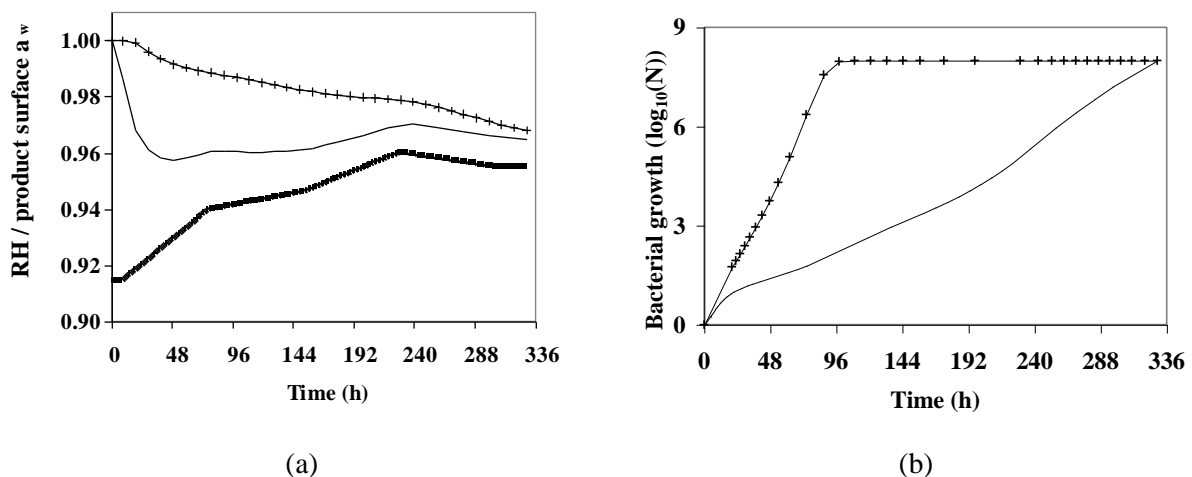


Figure 18 : Simulations de l'influence de la diffusivité de l'eau sur l'évolution (a) de l' $a_w$  et (b) sur la croissance de *Pseudomonas* spp. en surface de viande de porc en utilisant les modèle combiné. Diffusivité constante  $D=2 \cdot 10^{-10}$  (---+) ou diffusivité variable avec la teneur en eau  $D=f(X)$  (—) à  $12^\circ\text{C}$ . Variation de l'humidité relative (—) obtenue lors de l'expérience de validation et utilisé pour les calculs.

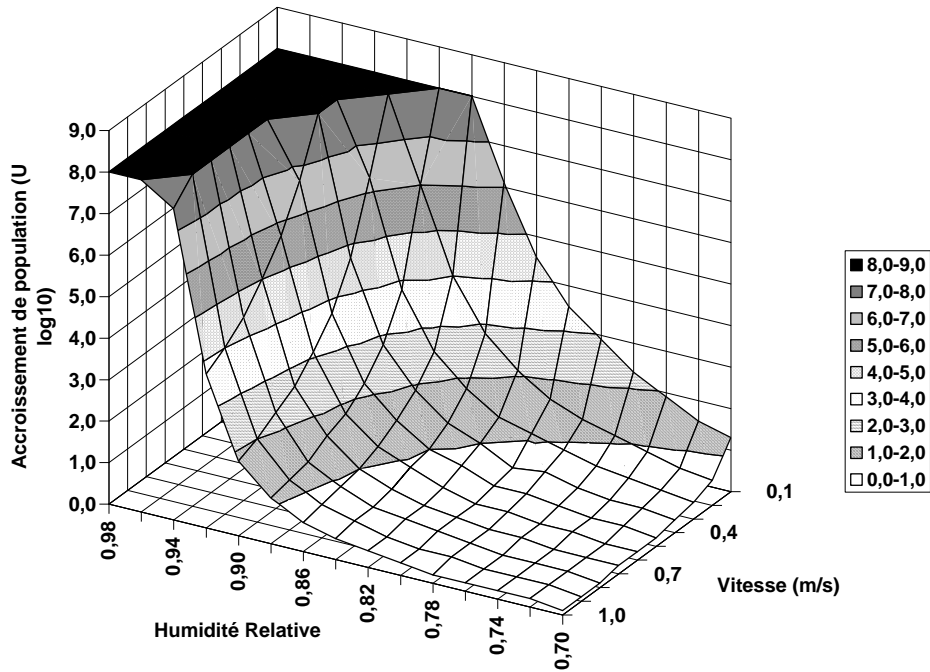


Figure 19 : Influence de la vitesse de l'air et de l'humidité relative de l'air sur la croissance de *Pseudomonas* spp. en surface de viande de porc à 12°C

### 3.2. Effet du séchage sur l' $a_w$ de surface d'un gel de gélatine et conséquences sur le développement de *L. innocua*

La combinaison des trois types de modèle s'est faite selon la stratégie suivante (Figure 20) :

- le modèle de transfert d'eau permet de prédire l'évolution de la teneur en eau dans et en surface du produit en fonction du temps lorsque sont connues les caractéristiques de l'air (humidité relative, vitesse, température), les caractéristiques du produit (diffusivité, épaisseur) et la valeur du coefficient de transfert à l'interface air/produit.
- le modèle thermodynamique permet de prédire l'évolution de l' $a_w$  en fonction de la teneur en eau lorsque sont connues les caractéristiques du milieu (composition, concentration). En combinant ces deux modèles, l' $a_w$  de surface peut être estimée.
- cette valeur d' $a_w$  permet de calculer les temps de génération et de latence à l'aide du modèle secondaire de croissance. Le modèle primaire donne l'évolution de la population bactérienne en fonction du temps.



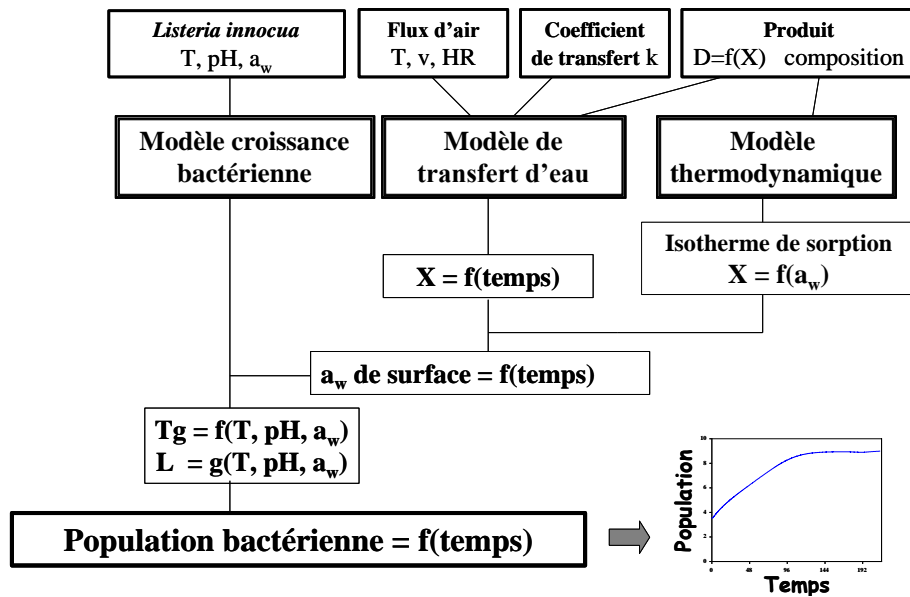


Figure 20 : Stratégie globale de modélisation de l'effet du séchage sur l' $a_w$  de surface de l'aliment et sur la croissance bactérienne

Cette démarche a été testée sur des croissances de *L. innocua* CLIP 20595 réalisées dans la soufflerie microbiologique à 18°C dans trois conditions d'humidité relative et de vitesse d'air. Elles sont présentées dans la publication [Lebert I. et al 2005b – A6]. L'étude a montré que la diminution de l'humidité relative et l'augmentation de la vitesse d'air entraînaient une diminution de la population maximale atteinte. Le passage d'une humidité relative de 95,5 % à 92 % à une même vitesse ( $v = 2,3$  m/s) ralentit la croissance bactérienne. L'augmentation de la vitesse de l'air de 2,3 à 4,6 m/s à 92 % HR, inhibe fortement le développement de *L. innocua* dès 24 heures (Figure 21).

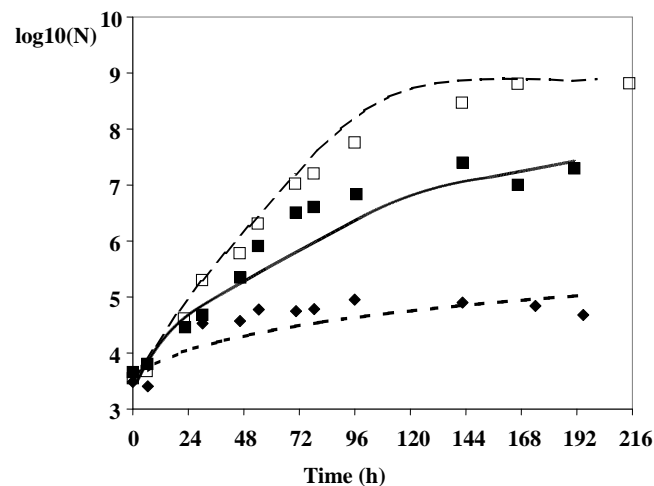


Figure 21 : Croissances et prédictions de la croissance de *L. innocua* CLIP 20595 à 18°C en surface du milieu gélifié en fonction de l'humidité relative (HR) et de la vitesse d'air ( $v$ ) dans les trois expériences [HR = 95.5%,  $v = 2.3$  m/s] croissance expérimentale ( $\square$ ) et prédite (— —) [HR = 92.0%,  $v = 2.3$  m/s] croissance expérimentale ( $\blacksquare$ ) et prédite (—) [HR = 92.5%,  $v = 4.6$  m/s] croissance expérimentale ( $\blacklozenge$ ) et prédite (- - -).

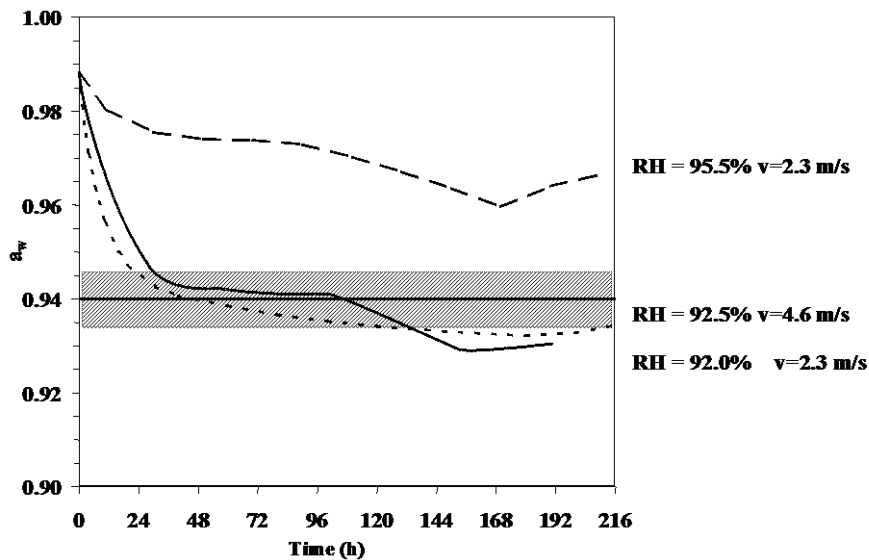


Figure 22 :  $a_w$  en surface de gel de gélatine, estimées à l'aide de la combinaison du modèle de transfert d'eau et du modèle thermodynamiques dans les trois conditions d'humidité relative et de vitesse d'air de la figure 11. [RH = 95.5%,  $v = 2.3$  m/s], (— —); [RH = 92%,  $v = 2.3$  m/s], (—); [RH = 92.5%,  $v = 4.6$  m/s], (- -). Domaine d' $a_w$  minimum de *L. innocua* mesuré en surface de gel de gélatine (Tableau 3).

L'intérêt de l'approche globale est que l'effet des variables de contrôle du procédé (ici humidité relative et vitesse d'air) sur la croissance de *L. innocua* a pu être expliquée par l'estimation de l'évolution de l' $a_w$  de surface en combinant le modèle de transfert d'eau et le modèle thermodynamique. En effet, la quantification de l'évolution de l' $a_w$  de surface n'est pas possible expérimentalement. Les données expérimentales de croissance ont prouvé que la stratégie était correcte. Ainsi la démarche globale a été validée. En effet, les premières études réalisées en conditions constantes d' $a_w$  avaient montré que l' $a_w$  minimum de croissance de *L. innocua* en milieu gélifié était comprise entre 0,935 et 0,946 (Tableau 3). Dans la soufflerie, dès que l' $a_w$  prédite était inférieure à 0,94, la croissance bactérienne était stoppée (Figure 22).

#### 4. Conclusion

L'intérêt de cette démarche réside dans la combinaison des modèles utilisés en génie des procédés ou en thermodynamique. Ils permettent de prédire l'évolution de propriétés physico-chimiques en surface ou dans l'aliment alors qu'aucune méthode expérimentale simple n'existe pour mesurer ces propriétés en continu en fonction du temps mais également spatialement dans le produit. Ils permettent également de traduire des variables procédé telles que l'humidité relative et la vitesse d'air, ou les caractéristiques du produit telles que la diffusivité, la composition et la concentration en solutés, en propriétés agissant directement sur le développement bactérien telles que l' $a_w$ .

## CONCLUSION GENERALE

Dans le domaine de la microbiologie prévisionnelle, plusieurs voies sont explorées :

- le développement de modèles pour prédire les paramètres de croissance et les cinétiques bactériennes est toujours un domaine en développement. Les modèles probabilistes ont depuis peu été ré-introduits afin de prédire les domaines de croissance et de non-croissance des microorganismes en fonction de la température, du pH et de l' $a_w$  ;
- la phase de latence est un autre sujet d'étude. Du fait de la grande variabilité de réponse des microorganismes à un changement des conditions environnementales, le temps de latence est toujours difficile à estimer. Des recherches sont ainsi effectuées sur le temps de latence individuel d'une cellule ou sur la prise en compte de l'historique vécu par la cellule pour estimer cette latence ;
- la microbiologie prévisionnelle et la structure de l'aliment et/ou l'effet d'un procédé est une voie peu abordée par les équipes de recherches car elle nécessite de faire appel à des personnes ayant des compétences diverses et complémentaires dans chacun des domaines étudiés (microbiologie, bio-informatique, génie des procédés, thermodynamique appliquée). Des outils expérimentaux particuliers sont nécessaires et n'existent généralement pas dans le commerce. Par exemple, l'équipe de recherche de Norwich (UK) (Institute of Food research, Wright et al. (2000)<sup>1</sup>) a développé un appareil pour suivre en continu la croissance des bactéries immobilisées dans un milieu solide (gel de gélatine) en fonction de paramètres physico-chimiques. Les équipes Microbiologie et Génie des Procédés de l'URV ont conçu et construit une soufflerie microbiologique pour suivre la croissance bactérienne en fonction d'un procédé de séchage.

C'est cette voie de recherche qui a été choisie en collaboration avec le Laboratoire de Génie Chimique et Biochimique de l'Université Blaise Pascal. Nous avons orienté nos recherches sur l'effet de l' $a_w$  sur le devenir de *L. innocua* et *P. fragi* sur un aliment en appliquant un procédé de séchage, et sur l'effet de l'étuvage et du salage sur *L. monocytogenes* en viande hachée. D'autres auteurs ont travaillé sur l'effet du refroidissement

---

<sup>1</sup> Wright, K. M., Coleman, H. P., Mackie, A. R., Parker, M. L., Brocklehurst, T. F. G., Wilson, D. R., Hills, B. P., 2000. Determination of mean growth parameters of bacterial colonies immobilized in gelatin gel using a laser gel-cassette scanner. International Journal of Food Microbiology 57, 75-89.

des jambons sur *Clostridium perfringens* (Amézquita et al., 2005)<sup>1</sup>, ou sur l'effet d'un traitement thermique et de la déshydratation qui en découle, sur l'inactivation de *L. monocytogenes* (Valdramidis et al., 2006)<sup>2</sup>. Les exemples sont rares, ils sont présentés dans l'article de synthèse [Lebert I. et Lebert A., 2006 – A10]. Dans chaque cas, les modèles de génie des procédés permettent une estimation des propriétés physico-chimiques qui évoluent dans le temps et dans l'espace, ces estimations sont alors utilisées comme entrée dans les modèles de microbiologie prévisionnelle pour estimer les populations bactériennes. Le modèle thermodynamique [Lebert et al. – A6] et le modèle stoechiométrique (Wilson et al., 2002)<sup>3</sup> apportent respectivement des informations indispensables sur les caractéristiques des aliments et sur le métabolisme des bactéries présentes.

Ces travaux récents appliqués à différents microorganismes, différents produits et pour différents procédés valident cette approche globale qui permet d'estimer les paramètres plutôt que de les mesurer. L'approche globale peut être, si elle se développe, une aide précieuse pour la prédiction de la sécurité dans les aliments, notamment en HACCP et en analyse des risques où la composition des aliments est soumise à des variations pendant le procédé, la distribution et la conservation.

---

<sup>1</sup> Amézquita, A., Weller, C. L., Wang, L., Thippareddi, H., Burson, D. E., 2005. Development of an integrated model for heat transfer and dynamic growth of *Clostridium perfringens* during the cooling of cooked boneless ham. *International Journal of Food Microbiology* 101, 123-44.

<sup>2</sup> Valdramidis, V. P., Geeraerd, A. H., Gaze, J. E., Kondjoyan, A., Boyd, A. R., Shaw, H. L., Van Impe, J. F., 2006. Quantitative description of *Listeria monocytogenes* inactivation kinetics with temperature and water activity as the influencing factors; model prediction and methodological validation on dynamic data. *Journal of Food Engineering* 76, 79-88.

<sup>3</sup> Wilson, P. D., Brocklehurst, T. F. G., Arino, S., Thuault, D., Jakobsen, M., Lange, M., Farkas, J., Wimpenny, J. W., Van Impe, J. F., 2002. Modelling microbial growth in structured foods: towards a unified approach. *International Journal of Food Microbiology* 73, 275-89.

## **DOSSIER DE PUBLICATIONS**



## Liste des publications

### Travaux personnels

1. **I. Desnier**, 1989. Sélection d'antigènes communs chez différentes espèces de bactéries affectant la qualité des viandes. DEA Sciences des Aliments, Université Blaise Pascal, Clermont II, juillet 1989.
2. **I. Desnier**, 1989. Sélection d'antigènes communs chez différentes espèces de bactéries affectant la qualité des viandes. Diplôme d'Agronomie Approfondie, Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Montpellier, octobre 1989.
3. **I. Desnier-Lebert**, 2004. Prédiction de la croissance de *Listeria innocua* par une approche phénoménologique: modélisations complémentaires des propriétés du milieu, des transferts d'eau et des cinétiques. Mémoire de Thèse de Docteur ès science, Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand II, février 2004.

### Articles parus dans des revues avec comité de lecture

4. J. Labadie et **I. Desnier**, 1992. Selection of cell wall antigens for the rapid detection of bacteria by immunological methods. *Journal of Applied Bacteriology*, 72, 220-226.
5. C. Bégot, **I. Desnier**, A. Lebert, J.D. Daudin, J.C. Labadie, 1996. Recommendations for calculating growth parameters by optical density measurements. *Journal of Microbiological Methods*, 25, 225-232.
6. C. Bégot, **I. Lebert**, A. Lebert, 1997. Variability of the response of 66 *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* strains to different growth conditions. *Food Microbiology*, 14, 403-412.
7. **I. Lebert**, A. Lebert, 1997. Microbiologie prédictive : Théorie et applications industrielles. *Microbiologie Aliments Nutrition*, 15, 157-172.
8. **I. Lebert**, C. Bégot, A. Lebert, 1998a. Growth of *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas fragi* in a meat medium as affected by pH (5.8-7.0), water activity (0.97-1.00) and temperature (7-25°C). *International Journal of Food Microbiology*, 39, 53-60.
9. **I. Lebert**, C. Bégot, A. Lebert, 1998b. Development of two *Listeria monocytogenes* growth models in a meat broth and their application to beef meat. *Food Microbiology*, 15, 499-509.
10. M. Cheroute-Vialette, **I. Lebert**, M. Hébraud, J.-C. Labadie, A. Lebert, 1998. Effects of pH or Aw stress on growth of *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*, 42, 71-77.
11. V. Robles Olvera, C. Bégot, **I. Lebert**, A. Lebert, 1999. An original device to measure bacterial growth on the surface of meat at relative air humidity close to 100%. *Journal of Food Engineering*, 38, 425-437.
12. **I. Lebert**, V. Robles-Olvera, A. Lebert, 2000. Application of polynomial models to predict growth of mixed cultures of *Pseudomonas* spp. and *Listeria* in meat. *International Journal of Food Microbiology*, 61, 27-39.
13. **I. Lebert**, C.G. Dussap, A. Lebert, 2004. Effect of  $a_w$ , controlled by the addition of solutes or by water content, on the growth of *Listeria innocua* in broth and in a gelatine model. *International Journal of Food Microbiology*, 94, 67-78.
14. **I. Lebert**, P. Baucour, A. Lebert, J.D. Daudin, 2005a. Assessment of bacterial growth on the surface of meat under standard processing conditions by combining biological and physical models, *Journal of Food Engineering*, 68, 89-98.
15. **I. Lebert**, C.G. Dussap, A. Lebert, 2005b. Combined physico-chemical and water transfer modelling to predict bacterial growth during food processes, *International Journal of Food Microbiology*, 102, 305-322.
16. **I. Lebert**, C. Nicolas, S. Portanguen, A. Lebert. (2006, sous presse). Combined water transfer and bacterial models to predict *Listeria innocua* growth on the surface of gelatine gel during the drying process, *Journal of Food Engineering*.
17. V. Zuliani, **I. Lebert**, P. Garry, J.-L. Vendevre, J.-C. Augustin, A. Lebert, (2006, sous presse). Effects of heat processing regime, pH, water activity and their interactions on the behaviour of *Listeria monocytogenes* in ground pork. Modelling the boundary of the growth/no-growth areas as a function of pH, water activity and temperature. *International Journal of Food Science and technology*.
18. **I. Lebert** et A. Lebert (2006, acceptée) Quantitative prediction of microbial behaviour during food processing using an integrated modelling approach: a review. *International Journal of Refrigeration*
19. **I. Lebert**, S. Leroy and R. Talon. (2006, acceptée) Effect of industrial and natural biocides on spoilage, pathogenic and technological strains grown in biofilm. *Food Microbiology*.
20. **I. Lebert**, S. Leroy, P. Giammarinaro, A. Lebert, J.P. Chacornac, S. Bover-Cid, C. Vidal-Carou, R. Talon (2006, soumise) Diversity of microorganisms in the environment and dry fermented sausages of small traditional French processing units. *Meat Science*.
21. V. Zuliani, **I. Lebert**, J. C. Augustin, P. Garry, J. L. Vendevre, A. Lebert (2006, soumise). Modelling the behaviour of *Listeria monocytogenes* in ground pork as a function of pH, water activity, nature and concentration of organic acid salts. *Journal of Applied Microbiology*.

### Chapitre d'un livre

22. C. Laplace, **I. Desnier**, J.-D. Daudin, A. Lebert, J.-C. Labadie, 1993. Mesure de la croissance bactérienne par densité optique en vue de sa modélisation. Analyse critique sur un exemple : *Listeria monocytogenes*. In : Colloque Société Française de Microbiologie (ed.), *Flashs sur les microorganismes pathogènes dans les aliments*, 275-283, Paris.
23. **I. Lebert**, A. Lebert, 1996. Prediction of bacterial growth in practice. In : Daudin, J.-D. (ed.), *New developments in meat refrigeration*, 15-22, I.I.R. and EC\CE/AMST, Utrecht.
24. **I. Lebert**, S. Rousset, A. Lebert, R. Talon, 2003. Meat eating quality. In : Encyclopedia of Food sciences and Nutrition, deuxième édition, Benjamin Caballero, Luiz Trugo, Pail Finglas, Elsevier Academic Press, p. 3777-3785.
25. V. Zuliani, **I. Lebert**, A. Lebert, 2004. Integrated modelling of food processing and bacterial behaviour, In: Recent Research Developments in Microbiology, Research Signpost, 8, 295-323.
26. **I. Lebert**, S. Portanguen, A. Lebert, C.-G. Dussap, 2006a. Chapter 23: A global approach to predict *Listeria innocua* growth at the surface of foods as a function of the media and process characteristics. In: Current Topics in Bioprocesses in Food Industries, Larroche, C., Pandey, A., Dussap C.G. (editors) Asiatech., New Delhi, 296-317.
27. **I. Lebert**, P. Giammarinaro, S. Morot-Bizot, S. Leroy, R. Talon, 2005b. Microbial ecosystems of processing units and traditional products in France. In: CIHEAM-IAMZ, Journal Options Méditerranéennes : Série A (sous presse).
28. **I. Lebert**, S. Leroy, R. Talon (2006, en rédaction). Chapter 11: Microorganisms in traditional fermented meats. In: Handbook of Fermented Meat and Poultry. Blackwell Publishing, Iowa

### Communications orales dans des congrès (**I. Lebert** = orateur)

29. C. Bégot, **I. Desnier**, A. Lebert, 1996. Microbial growth on fresh beef surfaces as influenced by water activity, temperature and air velocity. 2nd International Conference on Predictive Microbiology, Hobart (Australie), février 1996.
30. A. Lebert, **I. Lebert**, 1997. Mesure de la croissance bactérienne sur des surfaces alimentaires solides – Modélisation par réseaux de neurones. International Institute of Refrigeration. Predictive microbiology applied to cold food preservation. Quimper, juin 1997.
31. A. Lebert, **I. Lebert**, M. Vialette, 2001. Modélisation de la croissance de bactéries soumises à une variation brusque du pH ou l' $a_w$  de leur environnement. XXXIII<sup>ème</sup> journées de statistique, Nantes, 18 mai 2001.
32. A. Lebert, **I. Lebert**, 2002. Microbiologie prévisionnelle et Génie des procédés alimentaires. 2<sup>ème</sup> Rencontres A3P de microbiologie, Pau (France) 12-13 juin 2002.
33. **I. Lebert**, P. Baucour, J.D. Daudin, A. Lebert. 2003a. Prediction of bacterial growth in dynamic water activity conditions, 4<sup>ème</sup> colloque international de modélisation prévisionnelle dans les aliments, 15 au 19 juin 2003, Quimper, 24-249, ISBN 90-5682-400-7, Predictive Modelling in Foods - Conference proceedings. Editors : J.F.M. Van Impe, A.H. Geeraerd, I. Leguérinel, P. Mafart, Belgique, p 247-249
34. **I. Lebert**, S. Portanguen, C.G. Dussap, A. Lebert, 2003b. Effects of  $a_w$  controlled by NaCl or glycerol or by the water content in food on the growth of *Listeria innocua*. 4<sup>ème</sup> colloque international de modélisation prévisionnelle dans les aliments, 15 au 19 juin 2003, Quimper. Predictive Modelling in Foods - Conference proceedings. Editors : J.F.M. Van Impe, A.H. Geeraerd, I. Leguérinel, P. Mafart, Belgique, p 129-131
35. C. Nicolas, P. Baucour, S. Portanguen, J.D. Daudin, **I. Lebert** and A. Lebert, 2003. Modèle de transfert de matière couplé à un modèle de croissance de *Listeria monocytogenes*. 9<sup>ème</sup> congrès de la Société Française de Génie des Procédés (SFGP), Saint-Nazaire 9-10-11 septembre 2003.
36. **I. Lebert**, C.G. Dussap, A. Lebert. 2004a. Prediction of pH and water activity of complex bacterial growth media containing electrolytes using UNIFAC model. Présentation n°654. Proceedings sous forme de CD-ROM. 9<sup>ème</sup> Congrès International de Génie des procédés alimentaires, iCEF9, Montpellier (France), 7 - 11 mars 2004.
37. V. Zuliani, P. Garry, J.-L. Vendevre, J.-C. Augustin, **I. Lebert**, A. Lebert. 2005. Integrated modelling of food processing and bacterial behaviour, BioMicroWorld Congress, Badajoz (Espagne), 15-18 mars 2005.
38. A. Kondjoyan, **I. Lebert**, V. P. Valdramidis, M. Havet, A. H. Geeraerd, A. Lebert and J. F. Van Impe. 2005. Application of a complete heat-water model to predict microbial growth and inactivation during airflow treatments at the surface of meat products. In: Proceedings of the Third International Symposium on Application of Modelling as an Innovative Technology in the Agri-Food Chain (Model-It), 29 may-2 june 2005, Leuven, Belgium. Editors: Hertog, M.L.A.T.M., Nicolai B.M., Brugge, 2005. Acta Horticulturae, number 674, 285-292.
39. **Lebert I.**, Leroy S., Talon R. 2005a. Effect of industrial and natural disinfectants on spoilage, pathogenic and technological strains grown alone or in mixed culture in biofilm. COST Action 920/WG4 Meeting, Phenotypic and genotypic profiles of virulence and survival of bacteria along the foodchain, Graz, Austria, 11 – 13 September 2005.



40. **Lebert I.**, Dussap Gilles, Lebert A. 2005b. Comportement d'une population bactérienne en surface d'un gel de gélatine soumis à un séchage. 10ème congrès de la Société Française de Génie des Procédés (SFGP), 20-22 septembre 2005, Toulouse.

**Communications orales invitée dans des congrès (I. Lebert = orateur)**

41. **I. Desnier**, A. Lebert, 1994. Prediction of bacterial growth in practice. Meat and refrigeration : new developments, I.I.R et EC/CE/AMST, Antony-Paris, 27-29 juin 1994.
42. **I. Lebert**, A. Lebert, 2004. Prédiction de la croissance de *Listeria innocua* en surface d'un gel de gélatine lors d'un séchage. 4ème Rencontres A3P de microbiologie, Tours (France), 8-9 juin 2004
43. **I. Lebert**, S. Portanguen, A. Lebert, CG Dussap, 2004b. Growth prediction of *Listeria innocua* at the surface of foods. International Congress on Bioprocess in food industries, Clermont-Ferrand 11-13 juillet 2004.
44. **I. Lebert**, Giammarinaro P., Morot-Bizot S., Leroy S., Talon R., 2004c. Microbial ecosystems of processing units and traditional products in south of Europe. 5<sup>th</sup> International Symposium on the Mediterranean Pig, Tarbes (France), 16-19 november 2004.

**Communications par poster dans des congrès ou symposiums (support écrit = texte intégral)**

45. A. Lebert, **I. Lebert**, C. Bégot, V. Robles, 1997a. Mise au point d'une soufflerie microbiologique pour la mesure de la croissance de micro-organismes sur des surfaces alimentaires solides. Application à la croissance de *Listeria* spp. Congrès Agoral; Dijon, avril 1997.
46. A. Lebert, **I. Lebert**, C. Bégot, V. Robles, 1997b. Mesure de la croissance de micro-organismes en surface de produits alimentaires en fonction de la température, de l'humidité relative et de la vitesse de l'air. 6ème Congrès Français de Génie Chimique. Paris, septembre 1997.
47. A. Lebert, M. Chéroutre-Vialette, **I. Lebert**, 2000. A recurrent neural network for modelling the growth of *Listeria monocytogenes* in dynamic conditions. 46th International Congress of Meat Science and Technology. Buenos Aires (Argentine), 698-699. 28 août-1er septembre 2000.
48. **I. Lebert**, V. Robles-Olvera, A. Lebert, 2000a. Growth of mixed cultures of *Listeria* and *Pseudomonas* spp. in beef meat and their prediction using polynomial models. 46th International Congress of Meat Science and Technology. Buenos Aires (Argentine), 700-701. 28 août-1er septembre 2000
49. **I. Lebert**, V. Robles-Olvera, A. Lebert, 2000b. Prediction of the growth of mixed cultures of *Listeria* and *Pseudomonas* spp. in meat using polynomial models. 216-218. 3rd International Conference on Predictive Modelling in Foods. Louvain (Belgique), 12-15 septembre 2000.
50. P. Baucour, **I. Lebert**, A. Lebert, J.D. Daudin, 2002. Modélisation de la croissance de *Pseudomonas* spp. en surface d'un muscle de porc placé dans un flux d'air. Congrès Agoral 2002, Prévision, analyse et gestion du risque, Nancy (France), 26-27 mars 2002
51. **I. Lebert**, S. Portanguen, A. Lebert, C.G. Dussap, 2002. Prévision de l'activité de l'eau et du pH de solutions aqueuses complexes à l'aide de modèles Thermodynamiques. Congrès Agoral 2002, Prévision, analyse et gestion du risque, Nancy (France), 26-27 mars 2002
52. **I. Lebert**, A. Lebert, C.G. Dussap, 2003a. Evaluation of physico-chemical properties of complex aqueous solutions containing electrolytes: an aid to predictive microbiology ? 4<sup>ème</sup> colloque international de modélisation prévisionnelle dans les aliments, 15 au 19 juin 2003, Quimper. Predictive Modelling in Foods - Conference proceedings. Editors : J.F.M. Van Impe, A.H. Geeraerd, I. Leguérinel, P. Mafart, Belgique, p. 141-143
53. **I. Lebert**, S. Portanguen, A. Lebert, C.G. Dussap, 2003b. Prévision des caractéristiques physico-chimiques (pH, aw, activités) de solutions aqueuses contenant des acides aminés. 9ème congrès de la Société Française de Génie des Procédés (SFGP), Saint-Nazaire, 9-10-11 septembre 2003.
54. V. Zuliani, P. Garry, J.L. Vendevre, J.C. Augustin, **I. Lebert** and A. Lebert, 2003. Growth of *Listeria monocytogenes* in ground pork as a function of pH and water activity". 4<sup>ème</sup> colloque international de modélisation prévisionnelle dans les aliments, 15 au 19 juin 2003, Quimper. Predictive Modelling in Foods - Conference proceedings. Editors : J.F.M. Van Impe, A.H. Geeraerd, I. Leguérinel, P. Mafart, Belgique, p 43-45
55. **I. Lebert**, S. Portanguen., C.G. Dussap, A. Lebert., 2004a. Prediction of the growth of *Listeria* as a fonction of water activity controlled by the addition of solutes or the depression of the water content. Poster n°653. Proceedings sous forme de CD-ROM. 9ème Congrès International de Génie des procédés alimentaires, iCEF9, Montpellier (France), 7 - 11 mars 2004.
56. **I. Lebert**, C. Nicolas, S. Portanguen, A. Lebert, 2004b. Growth prediction of *Listeria* at the surface of foods. Poster n°651. Proceedings sous forme de CD-ROM. 9ème Congrès International de Génie des procédés alimentaires, iCEF9, Montpellier (France), 7 - 11 mars 2004.
57. V. Zuliani, P. Garry, J.L. Vendevre, J.C. Augustin, **I. Lebert**, A. Lebert, 2004. Validation of the Augustin  $\gamma$ -concept model for *Listeria monocytogenes* in ground pork as a function of pH, water activity and processing

- regime. Poster n°652. Proceedings sous forme de CD-ROM. 9ème Congrès International de Génie des procédés alimentaires, iCEF9, Montpellier (France), 7 - 11 mars 2004.
58. Lebert I., Dussap Gilles, Lebert A. 2005. Prédiction des propriétés physico-chimiques des milieux de culture bactériens. 10ème congrès de la Société Française de Génie des Procédés (SFGP), 20-22 septembre 2005, Toulouse.

#### **Communications par poster dans des congrès ou symposiums (support écrit = résumé)**

59. C. Laplace, **I. Desnier**, J.D. Daudin, A. Lebert, J.C. Labadie, 1993. Mesure de la croissance bactérienne par densité optique en vue de sa modélisation. Analyse critique sur un exemple : *Listeria monocytogenes*. Flash sur les micro-organismes pathogènes dans les aliments, Paris, avril 1993.
60. C. Laplace, **I. Desnier**, A. Lebert, 1994. An automated turbidimetric method for assessing simultaneous growths. 3ème conférence internationale ASEPT « Sécurité alimentaire 94 », Laval, juin 1994.
61. A. Lebert, **I. Desnier**, 1996. Application of neural computation for modelling the growth of *Listeria monocytogenes* strains. 2nd International Conference on Predictive Microbiology, Hobart (Australie), février 1996.
62. **I. Desnier**, C. Bégot, A. Lebert, 1996. Setting up of and comparison of polynomial models for two *Listeria monocytogenes* strains. 2nd International Conference on Predictive Microbiology, Hobart (Australie), février 1996.
63. C. Bégot, **I. Desnier**, A. Lebert, 1996. Variability of the response of 66 *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* strains to different growth conditions. 2nd International Conference on Predictive Microbiology, Hobart (Australie), février 1996.
64. A. Kondjoyan, S. Mirade, A. Lebert, **I. Lebert**, J.D. Daudin, 1999. Hygiène des procédés de traitement par l'air. Rencontres Européennes "Qualité des viandes et des produits carnés". Theix (France).
65. P. Baucour, C. Nicolas, **I. Lebert**, A. Lebert, J.D. Daudin, 2002. Utilisation d'un modèle de transfert de chaleur et matière couplé avec un modèle de croissance de microbiologie prévisionnelle pour l'optimisation d'un procédé utilisant l'air. 9èmes Journées des Sciences du Muscle et Technologies de la Viande. Clermont-Ferrand (France), 15-16 octobre 2002, 259-260.
66. **I. Lebert**, R. Talon, A. Lebert, 2004. Influence de la deshydratation sur la croissance bactérienne : mise au point d'un milieu de culture. VIème congrès de la Société Française de Microbiologie, Bordeaux, 10-12 mai 2004
67. V. Zuliani, **I. Lebert**, P. Garry, J.C. Augustin, J.L. Vendeuvre, A. Lebert, 2004. Effets comparés de deux sels de sodium (chlorure et lactate) et du pH sur l'interface croissance/non croissance de *Listeria monocytogenes* dans la viande de porc. VIème congrès de la Société Française de Microbiologie, Bordeaux, 10-12 mai 2004

#### **Articles parus dans une revue sans comité de lecture**

68. C. Laplace, **I. Desnier**, J.D. Daudin, A. Lebert, J. Labadie, 1993. Mesure de la croissance bactérienne par densité optique en vue de sa modélisation. Analyse critique sur un exemple : *Listeria monocytogenes*. Colloque Société Française de Microbiologie : "Flashs sur les microorganismes pathogènes dans les aliments". Institut Pasteur, Paris, 28-29 avril 1993, 275-283.
69. **I. Lebert**. Prédiction de la croissance de *Listeria* et *Pseudomonas* dans les produits carnés. Fiche CRIAA-Industrie-Recherche<sup>1</sup>, 2001.
70. **I. Lebert**, A. Lebert, C.G. Dussap. Faut-il prendre en compte les caractéristiques de l'aliment et de l'effet des procédés pour prédire la croissance bactérienne dans les aliments ? L'Echo des Puys, Centre INRA de Clermont-Ferand Theix – Lyon. 68, avril 2004.
71. **I. Lebert**. Prédire la croissance bactérienne dans les aliments, Fiche CRIAA-Industrie-Recherche, mai 2004.

---

<sup>1</sup> Centre de ressources et d'Informations en Agro-Alimentaire, INRA

## Rapports et Comptes-Rendus de Contrats

### Contrat UNIR (Usine Nutrition Industrie Recherche ) - INRA : février 1993 - décembre 1996

72. **Desnier I.**, Laplace C., Lebert A. Méthodologie de la microbiologie prédictive. Application à la croissance en surface des viandes. Rapport d'étape, juillet 1993.
73. **Desnier I.**, Laplace C., Lebert A. Méthodologie de la microbiologie prédictive. Application à la croissance en surface des viandes. Rapport d'étape, janvier 1994
74. **Desnier I.**, Laplace C., Lebert A. Méthodologie de la microbiologie prédictive. Application à la croissance en surface des viandes. Rapport d'étape, juin 1994.
75. **Desnier I.**, Laplace C., Lebert A. Méthodologie de la microbiologie prédictive. Application à la croissance bactérienne en surface des viandes. Rapport d'étape, 9 novembre 1994.
76. **Desnier I.**, Laplace C., Lebert A. Méthodologie de la microbiologie prédictive. Application à la croissance bactérienne en surface des viandes : "Régulation de la température dans le Bioscreen C". Rapport d'étape, 1994.
77. Bégot, C., **Desnier, I.**, Lebert, A. et Lauro, S., Méthodologie de la microbiologie prédictive. Application à la croissance bactérienne en surface des viandes. Rapport d'étape, 25 avril 1995.
78. Bégot, C., **Desnier, I.** et Lebert, A. Méthodologie de la microbiologie prédictive. Application à la croissance bactérienne en surface des viandes. Rapport d'étape, 10 janvier 1996.
79. Lebert, A. et **Desnier, I.** Rapport sur la Deuxième Conférence Internationale sur la Microbiologie Prédictive 18-22 février 1996. Hobart, Australie. INRA- UNIR.
80. Lebert, A. et **Lebert, I.**, Méthodologie de la microbiologie prédictive. Application à la croissance bactérienne en surface des viandes. Rapport d'étape 29 octobre 1996.
81. **I. Lebert** et A. Lebert, Programme Microbiologie prédictive, Rapport final, décembre 1996. Contrat INRA-UNIR, Février 1993-Décembre 1996.

### Contrat Société Organotechnie, 1994-1996

82. **Desnier I.**, Lebert A., Montel M.C. Effet de peptones sur la croissance de deux souches de *Staphylococcus*. Rapport, juillet 1994
83. **Desnier I.**, Lebert A., Montel M.C. Effet de peptones sur la croissance de quatre souches de *Staphylococcus*. Rapport, janvier 1995.
84. Lebert A., **Lebert I.**, Montel M.C. Effet de peptones sur la croissance de quatre souches de *Staphylococcus* : Recherche d'un mélange optimal de quatre peptones. Rapport, mai 1996.

### Contrat UNIR - INRA : 1997

85. Lebert, A., **Lebert, I.** et Robles Olvera, V., 1997. Croissance de deux souches de *Pseudomonas fragi* en milieu liquide. Rapport final Microbiologie prédictive. Contrat INRA-UNIR, Décembre 1997.

### Prestation de service ARILAIT : 1997

86. **Lebert, I.**, Maire, M., Brouillaud, A. et Lebert, A., 1997. Comparaison des données sur le comportement de différentes bactéries en fonction de paramètres physico-chimiques avec les données des modèles de prédiction. Compte-rendu final INRA - CNEVA, Contrat Arilait, Octobre 1997.

### Prestation de service Sym' PREVIUS : février – mai 2001

87. Lebert, A., **Lebert, I.** Saisies de données de publication sur «Croissance de *Listeria* dans les produits carnés», février – mai 2001

### Projet européen TRADISAUSAGE n° QLK1-CT-2002-02240. Assessment and improvement of safety of traditional dry sausages from producers to consumers (TRADISAUSAGE) : 2003-2005

Coordinateur : Régine TALON, INRA, Centre de Clermont-Ferrand Theix, 63 122 Saint-Genès Champanelle

88. 4th meeting report, Kosice, Slovaquie, octobre 2004
  - Report Workpackage 2 – Task 2.3 and Task 2.4 : Microbiology and amines overview in south Europe. Partner 1: Data analysis of all partners
  - Report Workpackage 4 – Task 4.1 and Task 4.2 : Targeting disinfectant.: Strategy of the French partner (Partner 1)

89. 5th meeting report, Lisboa, Portugal, avril 2005

- Report Workpackage 3 – Task 3.3: Selection of barrier or technological bacteria. Results of French partner
- Report Workpackage 4 – Task 4.1 and Task 4.2: Targeting disinfectant. Results of the French partner

90. Final meeting report, Paris, France, décembre 2005

- Final Report Workpackage 4 and Workpackage 5

Projet ANR-05-PNRA-005 (SCN/BEER) : Les staphylocoques à coagulase négative dans les fromages, les salaisons et les ateliers de fabrication : Evaluation de la biodiversité et des risques sanitaires.

Coordonnateur GAUTIER Michel, Agrocampus-Rennes Laboratoire de Microbiologie, 65, rue de Saint Brieuc CS84215 35042 Rennes cedex.

91. Rapport d'avancement scientifique du 1er semestre (1er janvier 2006 - 30 juin 2006)

- Workpackage 1 : Biodiversité des SCN et des souches dans les fromages, salaisons et ateliers
- Workpackage 2 : Identification des risques liés aux SCN
- Workpackage 5 : Gestion, valorisation, communication

## Activité d'encadrement

### Co-encadrement de Stagiaires élèves-ingénieurs avec A. Lebert

92. Guidicelli Delphine, Stage de 2<sup>ème</sup> année ENSIA<sup>1</sup>, Massy Octobre-Décembre 1993. Sélection de souches de *Pseudomonas* et étude de leur croissance par photométrie en vue de leur modélisation
93. Boulanger Céline, Kerguillec Estelle, Lambert Lise, Lauro Stéphanie, Stage IPEP, 4<sup>ème</sup> année ESITPA<sup>2</sup>, Val de Reuil, Décembre 1993. Microbiologie prédictive sur les viandes de boeuf et de porc, de l'abattage à la commercialisation
94. Bordes Maryline, Stage de 1<sup>ère</sup> année CUST, Clermont-Ferrand II, Juillet - Août 1994. Utilisation du Bioscreen C pour l'étude de croissances bactériennes
95. Kehoane Sharon, Stage de 3<sup>ème</sup> année Université de Cork, Irlande, Juillet - Septembre 1994. Techniques used in creating a predictive model
96. Lauro Stéphanie, Stage fin d'étude ESITPA, Val de Reuil, Mai - Décembre 1994. Etude de la croissance de *Listeria monocytogenes* en surface de viande et en milieu liquide.
97. MacNally Marian, Stage de 3<sup>ème</sup> année Université de Cork, Department of Food Science, Irlande, Juillet - Août - Septembre 1996. The effects of various chemical stress on the growth of *Lactobacillus*.

### Co-encadrement de Stagiaires élèves-ingénieurs avec A. Lebert et A. Kondjoyan

98. Portanguen Stéphane, 2006, Mémoire d'Ingénieur CNAM de Clermont-Ferrand, Février 2005-Janvier 2006. Optimisation d'une méthode de suivi de populations de *Listeria* soumise à des chocs thermiques et osmotiques.

### Encadrement de stagiaires BTS

99. Chandez Sandrine, Stage de 2<sup>ème</sup> année BTS agroalimentaire, Lycée agricole Marmilhat, Janvier - Février 2002. Croissance de *Listeria innocua* en surface de gel de gélatine

### Encadrement de stagiaires Licence professionnelle

100. PO Julien, 2006, Stage Licence professionnelle Génie de Bioproductions et de l'Agroalimentaire, IUT du LIMOUSIN, Limoges. Février – juin 2006, Conduite d'un projet de gestion des échantillons dans le cadre du référentiel qualité de l'INRA

### Co-encadrement de Diplômes d'Etudes Approfondies.

#### Avec A. Lebert et J.-D. Daudin

101. Laplace Claire, DEA Sciences des aliments, Clermont-Ferrand II, 1992. Mesure de la croissance bactérienne par densité optique en vue de sa modélisation. Analyse critique sur un exemple : *Listeria monocytogenes*. Janvier - Septembre 1992.

#### Avec A. Lebert

102. Lauro Stéphanie, DEA Sciences des aliments, Clermont-Ferrand II, 1995. Modélisation de la croissance bactérienne par des réseaux de neurones. Janvier - Septembre 1995.
103. Baucour Philippe, D.E.A. Génie Chimique des Universités Paris XIII, Paris VII, Marne-le Vallée, de l'Ecole Nationale Supérieure des Mines de Paris, de l'Ecole Nationale Supérieure des Techniques Avancées, de l'Institut National Agronomique Paris-Grignon et de l'Ecole Nationale Supérieure des Industries Agroalimentaires, 1996. Utilisation de réseaux de neurones récurrents en vue de la modélisation de la croissance bactérienne.

---

<sup>1</sup> Ecole Nationale Supérieure des Industries Alimentaires

<sup>2</sup> Ecole Supérieure d'Ingénieurs et de Techniciens Pour l'Agriculture

Avec A. Kondjoyan

104. Malbrancq Yohann, DEA Sciences des aliments, Université Bordeaux 1 - Université Bordeaux 1, Sciences technologies, Institut des sciences et techniques des aliments de Bordeaux, 2003. Décontamination de la surface de viande de poulet par jet de vapeur sous pression atmosphérique. Janvier - Août 2003 (Confidentiel).

**Encadrement de Diplômes d'Etudes Approfondies**

105. Chantreau Olivier, DEA de Nutrition et Sciences des aliments, Clermont-Ferrand II, 2003. Modélisation de la croissance de *Listeria innocua* sur un gel de gélatine en fonction de l'activité de l'eau régulée par la teneur en eau et la concentration en chlorure de sodium. Janvier-Juillet 2003.

**Co-encadrement de Thèses**

Avec A. Lebert

106. Laplace-Bégot Claire, Thèse de l'Université Clermont-Ferrand II, 1996. Mesure et modélisation de la croissance de *Listeria* en milieu liquide et en surface de viande. Février 1993 - Janvier 1996.
107. Robles-Olvera Victor, Thèse de l'Université Clermont-Ferrand II, 1999. Comparaison de la croissance de *Pseudomonas* species et *Listeria* species en milieu liquide et en viande de bœuf. Septembre 1995 - Mars 1999.
108. Chéroutre-Vialette Michèle, Thèse de l'Université Clermont-Ferrand II, 1995. Croissance de *Listeria monocytogenes* soumise à des chocs acides, basiques et osmotiques. Mesure et modélisation. Décembre 1995 - Avril 1999.

Avec J.D. Daudin et A. Lebert

109. Baucour Philippe, Thèse de l'Université Clermont-Ferrand II, 2000. Mesure des isothermes de sorption dans les hautes humidités. Modélisation du couplage transfert d'eau et croissance bactérienne en surface des viandes. Décembre 1996 – Décembre 1999.

Avec A. Lebert, J.C. Augustin, P. Gary, JL Vendevre

110. Zuliani Véronique, Thèse de l'Université Clermont-Ferrand II, 2005. Prédiction de la contamination bactérienne lors de la fabrication et de la conservation d'un aliment – Application à de la viande de porc contaminée par *Listeria monocytogenes*. Mars 2002 – Mai 2005.

**Co-encadrement de Main-d'Oeuvre Occasionnelle avec A. Lebert**

111. Nicolas Carine, Contrat en CDD 15 mois à INTERBEV<sup>1</sup>, détachée à l'INRA. Mars 2002 – Mai 2003
- Expertise machine à classer les gros bovins
  - Sujet de recherche : croissance de *Listeria innocua* CLIP 20595 sur gel de gélatine en condition dynamique d'a<sub>w</sub> (soufflerie microbiologique)

**Co-encadrement de Post-doc avec A. Kondjoyan**

112. Péroval Claudine, Post-doc INRA, Contrat Sept 2003 – Mai 2005. Analyse de l'effet de procédés thermiques intenses sur la viabilité des bactéries en surface des viandes

---

<sup>1</sup> Association Nationale Interprofessionnelle du Bétail et des Viandes

## LISTE DES PUBLICATIONS FOURNIES

- A1** Bégot C., Lebert I., Lebert A. (1997). Variability of the response of 66 *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* strains to different growth conditions. *Food Microbiology*, 14, 403-412.
- A2** Lebert I., Bégot C., Lebert A. (1998b). Development of two *Listeria monocytogenes* growth models in a meat broth and their application to beef meat. *Food Microbiology*, 15, 499-509.
- A3** Lebert, V. Robles-Olvera, A. Lebert, 2000. Application of polynomial models to predict growth of mixed cultures of *Pseudomonas* spp. and *Listeria* in meat. *International Journal of Food Microbiology*, 61, 27-39.
- A4** Cheroutre-Vialette M., Lebert I., Hébraud M., Labadie J.-C., Lebert A. (1998). Effects of pH or  $A_w$  stress on growth of *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*, 42, 71-77.
- A5** Lebert I., Dussap C.G., Lebert A. (2004). Effect of  $a_w$ , controlled by the addition of solutes or by water content, on the growth of *Listeria innocua* in broth and in a gelatine model. *International Journal of Food Microbiology*, 94, 67-78
- A6** Lebert I., Dussap C.G., Lebert A. (2005b). Combined physico-chemical and water transfer modelling to predict bacterial growth during food processes, *International Journal of Food Microbiology*, 102, 305-322.
- A7** Robles Olvera V., Bégot C., Lebert I., Lebert A. (1999). An original device to measure bacterial growth on the surface of meat at relative air humidity close to 100%. *Journal of Food Engineering*, 38, 425-437.
- A8** Lebert I., Baucour P., Lebert A., Daudin J.D. (2005a). Assessment of bacterial growth on the surface of meat under standard processing conditions by combining biological and physical models, *Journal of Food Engineering*, 68, 89-98.
- A9** Lebert I., Nicolas C., Portanguen S., Lebert A. (2006, sous presse). Combined water transfer and bacterial models to predict *Listeria innocua* growth on the surface of gelatine gel during the drying process, *Journal of Food Engineering*.
- A10** Lebert I. et Lebert A. (2006, acceptée) Quantitative prediction of microbial behaviour during food processing using an integrated modelling approach: a review, *International Journal of Refrigeration*

