

Les produits fermentés à base de viande de porcs sont, pour la plupart, des produits traditionnels rassemblant une grande diversité de produits dont le saucisson sec, le chorizo, le salami, la rosette, etc.

Le saucisson sec est une charcuterie crue, fermentée, séchée et maturée. Ce type de produit est une production de tradition, et représente en France une activité importante pour les industries de la salaison. Cette activité est assurée par de nombreux artisans allant du charcutier-artisan aux grands groupes industriels. À l'heure actuelle, l'évolution du marché du saucisson sec indique que la demande du consommateur s'oriente de plus en plus vers des produits de bonnes qualités aromatique et hygiénique.

La qualité microbienne des produits de salaisons est extrêmement suivie. La flore majoritaire est une flore utile représentée par la flore lactique et les staphylocoques qui se développent au cours des étapes d'étuvage et de séchage. Les microorganismes présents dans le saucisson après embossage proviennent essentiellement de la matière première (en moyenne 33 % de la matière première est contaminée), mais également lors des diverses manipulations et par le matériel employé. Des bactéries pathogènes peuvent contaminer les produits, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella spp*, *Clostridium spp* et *Listeria monocytogenes* sont les flores principalement rencontrées. *Listeria monocytogenes* peut, dans le cas de désinfections insuffisantes coloniser les plans de travail des ateliers par la formation de biofilms tenaces (Salvat et al., 1995). Une étude réalisée par l'Adiv (Thévenot et al., 2005), a montré que les souches adaptées aux stress induits par le procédé de fabrication sont plus difficilement éliminées que les souches non adaptées. Ce comportement, son caractère ubiquitaire et sa capacité de résister à divers stress thermique et osmotique caractérisent sa complexité. Cette complexité est à l'origine de cette étude dont l'objectif principal a été de mieux connaître et de mieux assurer la qualité microbiologique du saucisson sec et d'acquérir des données permettant de prévoir cette qualité par le biais de modèles mathématiques.

Ce projet a été réalisé dans le cadre d'un financement de l'Office de l'Élevage et de cinq partenaires industriels.

Qualité microbienne du saucisson

Modélisation de *Listeria monocytogenes* dans le saucisson sec

La présence récurrente de *Listeria monocytogenes* au sein de la matière première contaminée, évoque le risque de contamination à la fois des ateliers de fabrications et du produit fini, tel que le saucisson sec. La sécurité ciblée sur l'étude du comportement de ce germe pathogène a permis d'établir un modèle mathématique simple permettant aux salaisoniers d'appréhender ce risque.

COPPET V.¹, CHRISTIEANS S.¹, HUCHET V.²

¹Adiv, 2 rue Chappe, 63039 Clermont-Ferrand Cedex 2,

²Adria Développement, Z.A. de Creac'h Gwen, 29196 Quimper Cedex

Cette étude a permis :

- d'identifier les étapes clés du procédé de fabrication au regard du danger lié à *Listeria monocytogenes* par le biais de modélisation et de challenge-tests,
- d'évaluer et d'optimiser les paramètres du process pour obtenir une inhibition de *Listeria monocytogenes* dans le produit fini via les modèles de microbiologie prévisionnelle.

Pour la réalisation de l'étude, les modèles cardinaux utilisés ainsi que les méthodes de détermination des paramètres cardinaux sont ceux préconisés dans Sym'Previous.

SOUCHES ÉTUDIÉES

Deux souches de *Listeria monocytogenes* ont été étudiées correspondant à la souche de référence CIP78.38, et une souche isolée d'un produit sec K46.3, souche isolée d'un saucisson sec par l'Adiv lors du programme intitulé "Devenir de *Listeria monocytogenes* dans le saucisson sec".

DÉTERMINATION DES PARAMÈTRES NÉCESSAIRES À LA PRÉVISION

Les modèles sont une représentation mathématique d'un phénomène microbiologique, autrement dit, ils visent à prévoir le comportement des microorganismes dans les aliments au cours de leur fabrication et de leur stockage. Ils sont basés sur l'étude des courbes de croissance des microorganismes. La modélisation se fait habituellement en deux étapes :

- la première consiste à ajuster les cinétiques de croissance dans un environnement donné de façon à estimer les valeurs de latence et de taux de croissance qui caractérisent une courbe. On parle alors de modélisation primaire ;
- la seconde étape consiste à relier l'effet de ces paramètres (lag, μ_{max}) aux facteurs environnementaux (température, pH, concentrations d'inhibiteurs), on parle de modélisation secondaire.

Ces modèles sont caractérisés par l'équation : $\mu_{max} = \mu_{opt} \rho(T) \gamma(pH) \tau([Acide]) \sigma(aw) \xi(T, pH, [Acide], aw)$, avec :

$$\gamma(pH) = \begin{cases} pH < pH_{min}, & 0 \\ pH_{min} < pH < pH_{max}, & \frac{(pH - pH_{min})(pH - pH_{max})}{(pH - pH_{min})(pH - pH_{max}) - (pH - pH_{opt})^2} \\ pH > pH_{max}, & 0 \end{cases}$$

$$\rho(T) = \begin{cases} T < T_{min}, & 0 \\ T_{min} < T < T_{max}, & \frac{(T - T_{min})^2 (T - T_{max})}{(T_{opt} - T_{min})[(T_{opt} - T_{min})(T - T_{opt}) - (T_{opt} - T_{max})(T_{opt} + T_{min} - 2T)]} \\ T > T_{max}, & 0 \end{cases}$$

L'approche modulaire, permet de modéliser individuellement l'effet de chaque facteur. Ces modèles simples permettent l'élaboration d'un modèle plus général prenant en compte l'effet combiné de l'ensemble des facteurs environnementaux et l'effet de la matrice avec la détermination du μ_{opt} . Cette approche présente des avantages comme l'utilisation de modèles simples généralement définis par un petit nombre de paramètres. Ces paramètres ont une signification biologique simple (pH_{min} , pH_{opt} , pH_{max} , T_{min} , T_{opt} ...) et le modèle prend en compte l'aliment contrairement à beaucoup de modèles développés à ce jour. Afin d'évaluer le comportement de *Listeria monocytogenes*, les valeurs cardinales de la souche étudiée doivent être connues. Ces valeurs cardinales permettent de quantifier l'effet d'un facteur, en l'occurrence la température, le pH, l'humidité relative... sur le comportement

de la souche étudiée. L'effet matrice alimentaire est décrit au travers de ce terme μ_{opt}

Comportement de *Listeria monocytogenes* en fonction du pH

Les taux de croissance ont été mesurés à différents pH et les points expérimentaux ont été ajustés avec le modèle précédent. Les résultats des différents ajustements sont présentés figures 1 et 2 et les paramètres estimés tableau 1.

Comportement de *Listeria monocytogenes* en fonction de la température

Les taux de croissance ont été mesurés à différentes températures et les points expérimentaux ont été ajustés avec le modèle précédent.

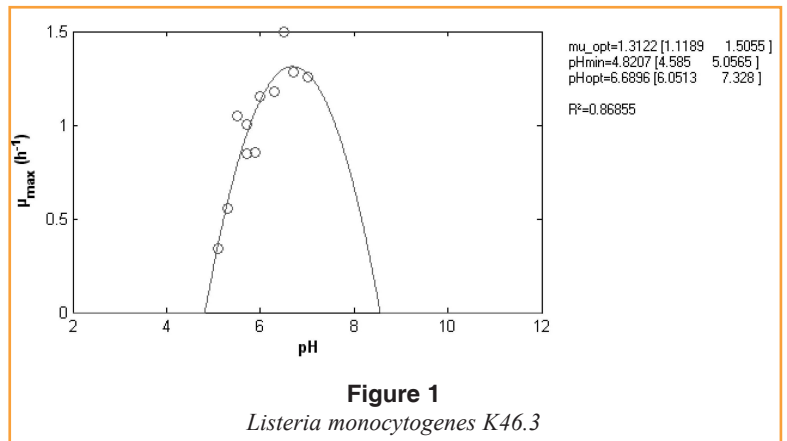


Figure 1
Listeria monocytogenes K46.3

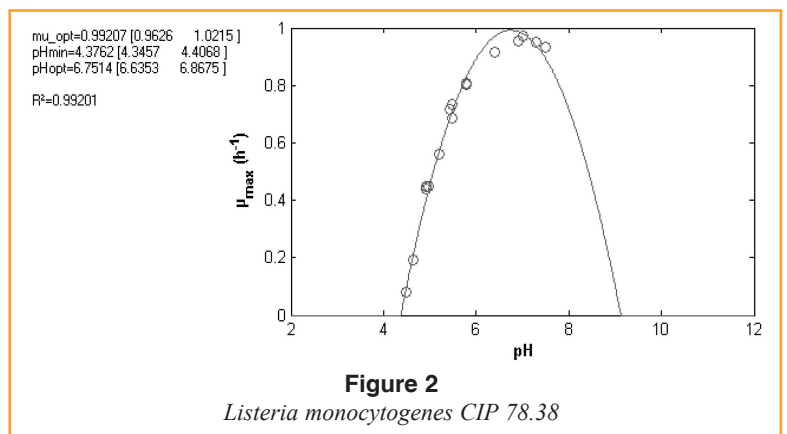


Figure 2
Listeria monocytogenes CIP 78.38

Tableau 1
ESTIMATIONS DES pH CARDINAUX OBTENUS POUR LES DEUX SOUCHES DE *LISTERIA MONOCYTOGENES* ÉTUDIÉES*

	<i>L. monocytogenes</i> K46.3	<i>L. monocytogenes</i> CIP 78.38
R^2_{adj}	0.87	0.99
pH_{min}	4.82 [4.58 — 5.05]	4.37 [4.34 — 4.41]
pH_{opt}	6.69 [6.05 — 7.03]	6.75 [6.63 — 6.87]

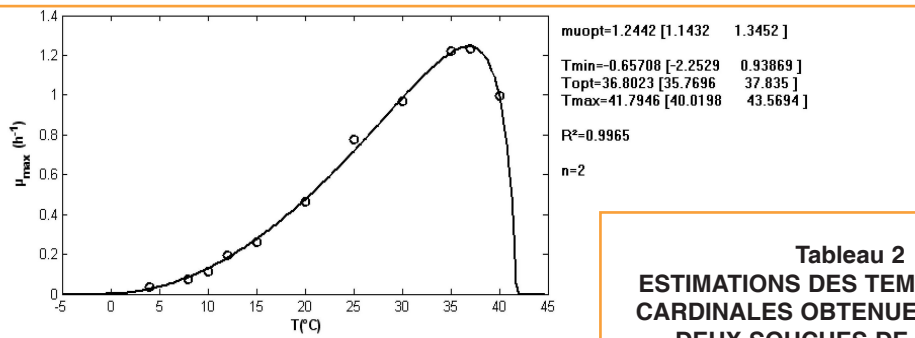


Figure 3

Evolution du taux de croissance en fonction de la température - *Listeria monocytogenes* K46.3

Tableau 2
ESTIMATIONS DES TEMPÉRATURES CARDINALES OBTENUES POUR LES DEUX SOUCHES DE *LISTERIA MONOCYTOGENES* ÉTUDIÉES*

	<i>L. monocytogenes</i> K46.3	<i>L. monocytogenes</i> CIP 78.38
R^2_{adj}	0.99	0.99
T_{min} (°C)	-0.66 [-2.2 - 0.9]	-0.6 [-1.8 - 0.6]
T_{opt} (°C)	36.8 [35.8 — 37.8]	38.8 [38.2 -39.4]
T_{max} (°C)	41.8 [40 — 43.6]	42.8 [42.4 — 43.2]

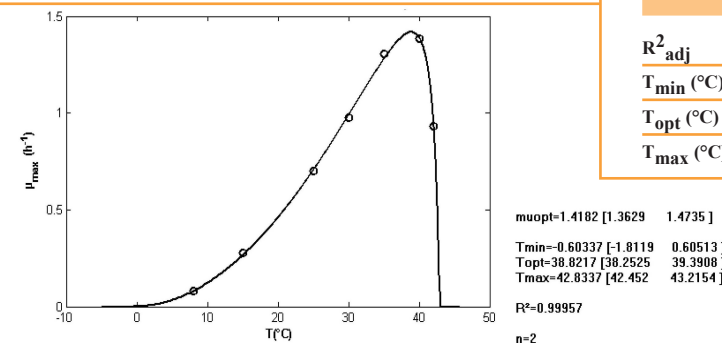


Figure 4

Evolution du taux de croissance en fonction de la température *Listeria monocytogenes* CIP 78.38

* Les paramètres estimés sont disponibles au sein de Sym'Prévious

Les résultats des différents ajustements sont présentés figures 3 et 4 et les paramètres estimés tableau 2.

$\mu_{opt}=1.2085$ [1.0598 1.3571]
 $aw_{min}=0.92062$ [0.91024 0.931]
 $aw_{opt}=0.98647$ [0.9828 0.99014]
 $R^2=0.96754$
 $n=2$

Figure 5

Listeria monocytogenes
K46.3

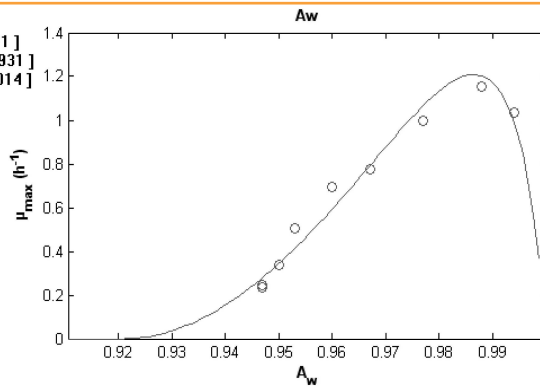


Tableau 3
ESTIMATIONS DES A_w CARDINALES OBTENUES POUR LES DEUX SOUCHES DE *LISTERIA MONOCYTOGENES* ÉTUDIÉES*

	<i>L. monocytogenes</i> K46.3	<i>L. monocytogenes</i> CIP 78.38
R^2_{adj}	0.967	0.971
$A_{w_{min}}$	0.920 [0.910 - 0.931]	0.886 [0.876 - 0.896]
$A_{w_{opt}}$	0.986 [0.982 - 0.990]	0.993 [0.992 - 0.995]

Comportement de *Listeria monocytogenes* en fonction de l'activité de l'eau

$\mu_{opt}=1.0434$ [0.96636 1.1204]
 $aw_{min}=0.88634$ [0.87603 0.89664]
 $aw_{opt}=0.99383$ [0.99202 0.99564]
 $R^2=0.97199$
 $n=2$

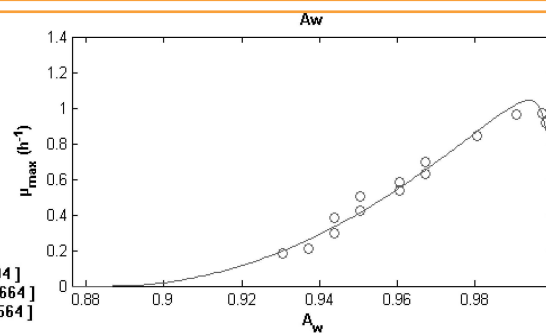


Figure 6

Listeria monocytogenes CIP 78.38

Les taux de croissance ont été mesurés à différentes A_w et les points expérimentaux ont été ajustés avec le modèle :

$$(aw) = \begin{cases} aw < aw_{min}, & 0 \\ aw_{min} < aw, & \frac{(aw - aw_{min})^2 (aw - 1)}{(aw_{opt} - aw_{min}) [(aw_{opt} - aw_{min})(aw - aw_{opt}) - (aw_{opt} - 1)(aw_{opt} + aw_{min} - 2aw)]} \end{cases}$$

Les résultats des différents ajustements sont présentés figures 5 et 6 et les paramètres estimés tableau 3.

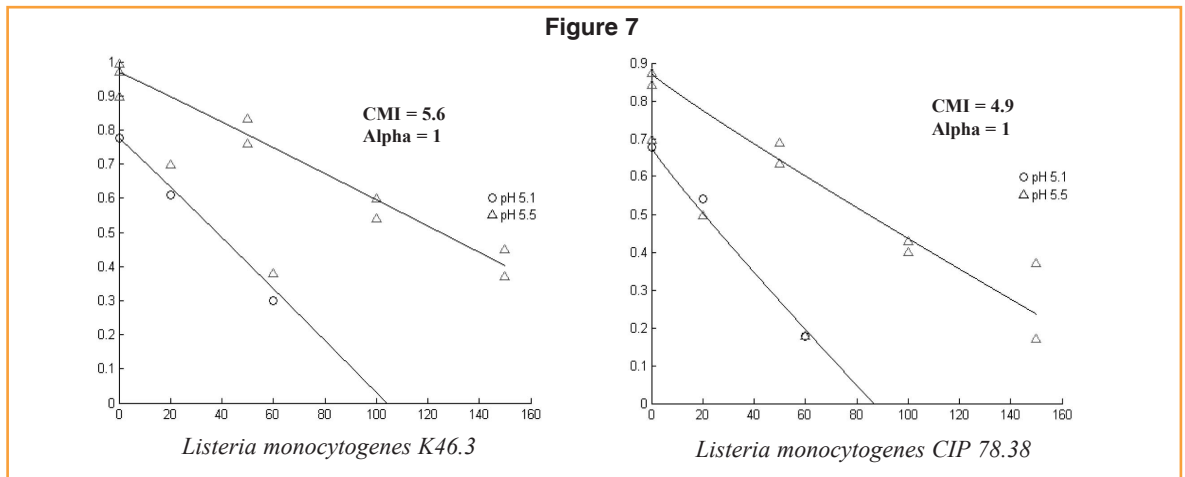


Tableau 4
SYNTHÈSE DES DIFFÉRENTES CONDITIONS
DE FABRICATIONS DE SAUCISSONS SECS

Fabrication	Conditions de fabrication	Souches étudiées	Répétitions
1	Standards Étuvage (5 jours à 24°C, humidité relative de 95 % à 80 %) Séchage (30 jours à 14°C, Hr: 80 %) Conservation (30 jours à 14°C)	CIP 78.38	3
		K46.3	
		Fabrication témoin sans ensemencement	1
2	Reproduire un accident de fabrication Produits emballés sous atmosphère modifiée dès J4 Conservation à une Aw = 0,92, Aw favorable à la croissance de <i>Listeria monocytogenes</i>	CIP 78.38	3
		K46.3	
		Fabrication témoin sans ensemencement	1
3	Reproduire un accident de fabrication Fabrication sans ferments hygrométrie élevée maintien de la température constante à 20°C	K46.3	3
		Fabrication témoin sans ensemencement	1
4	Reproduire un accident de fabrication Lot de viande différent, naturellement contaminé en <i>L. monocytogenes</i> formulation sans ferments hygrométrie élevée	K46.3	3
		Fabrication témoin sans ensemencement	1

Comportement de *Listeria monocytogenes* en fonction de l'acide lactique

Les résultats des différents ajustements et les paramètres estimés sont présentés figure 7.

Les valeurs cardinales relatives aux quatre facteurs et aux deux souches ayant été déterminées, il s'agit de définir le μ_{opt} (à partir de courbes expérimentales sur matrice) pour pouvoir réaliser des simulations du comportement de *Listeria monocytogenes* au sein du saucisson sec en fonction des facteurs environnementaux Aw, pH, température, concentration en acide lactique.

CHALLENGE-TESTS SUR SAUCISSONS SECS

Revivification des souches

Les souches de *Listeria monocytogenes* sont conservées congelées sous la forme de cryobilles. Au préalable de toute

fabrication, il est indispensable de les revivifier.

De façon individuelle, chaque souche est revivifiée dans 10 mL de BHI, pendant 24 h à 30 °C puis, 100 μ L ont été transférés dans 10 mL de BHI et incubés à 30 °C pendant 24 h. Chaque pré-culture est de nouveau transférée, à raison de 100 μ L, dans 10 mL de BHI et incubée à 12 °C pendant 30 h afin d'obtenir des souches adaptées et revivifiées. Enfin, 250 μ L des pré-cultures sont transférés dans 50 mL de BHI, incubés à 12 °C jusqu'à la fin de leur phase exponentielle de croissance :

- la souche K46.3 a été inoculée après 55 h de culture à raison de 10^4 germes par gramme de mûlée,
- la souche CIP 78.38 après 60 h de culture à raison de 10^5 germes/g.

Les inocula (1000 cfu/g) utilisés pour l'ensemencement étaient issus de cultures en phase stationnaire de croissance. Afin d'éviter un biais dans les résultats, toutes les fabrications et les répétitions ont été réalisées avec la même viande de départ, répartie en lots et

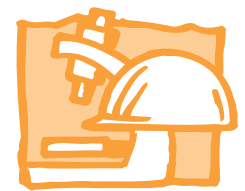
congelée. Celle-ci a été préalablement analysée afin de lever toute ambiguïté dans les résultats.

Formulation des saucissons

Au cours des différents challenges tests, une formulation standard a été suivie, constituée par une mûlée représentée par 82 % d'épaule et 18 % de bardière, et des additifs classiques (poivre, sel, dextrose, salpêtre). Au total, quatre fabrications ont été réalisées (standard et reproduction de défauts) constituées de trois répétitions par souche, rassemblant un total de 90 produits par production (cf. tableau 4). En parallèle, pour chaque fabrication, un essai témoin a été réalisé en utilisant la même mûlée de départ mais sans ensemencement.

Analyses

Les différents produits fabriqués ont été suivis dans le temps par dénombrement de la concentration en *Listeria monocytogenes* (ISO



11290-2) et en flore lactique (NF V04-503). Un suivi du pH, de l'Aw, un dosage des nitrites et de l'acide lactique ont complété les résultats microbiologiques. Un total de 14 points d'analyse, correspondant aux étapes clés du process : embos-

sage, étuvage, séchage et conservation, a été défini en multipliant les points d'analyse durant l'étape de conservation pour un suivi plus rigoureux du taux de croissance bactérien et une meilleure intégration dans le modèle.

RÉSULTATS

Quelles que soient les conditions de fabrication, les dénombrements en *Listeria monocytogenes* décroissent en fonction du temps de conservation (figures 8 à 11).

FABRICATION STANDARD (1)

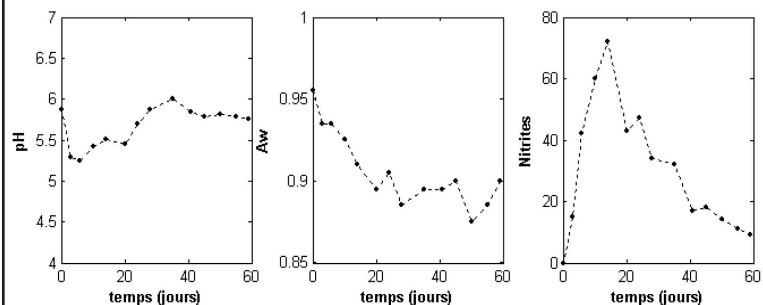


Figure 8

Évolution des caractéristiques physico-chimiques du saucisson sec au cours de son process de fabrication et de sa conservation

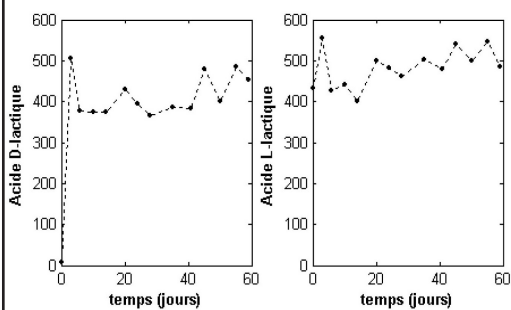
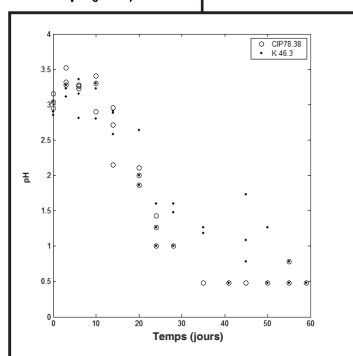


Figure 9

Comportement de deux souches de *Listeria monocytogenes* au cours du process de fabrication du saucisson sec et de sa conservation



ACCIDENT DE FABRICATION : ACTIVITÉ DE L'EAU MAINTENUE ÉLEVÉE (2) (souhait d'une Aw supérieure à 0,94 pendant l'ensemble du process)

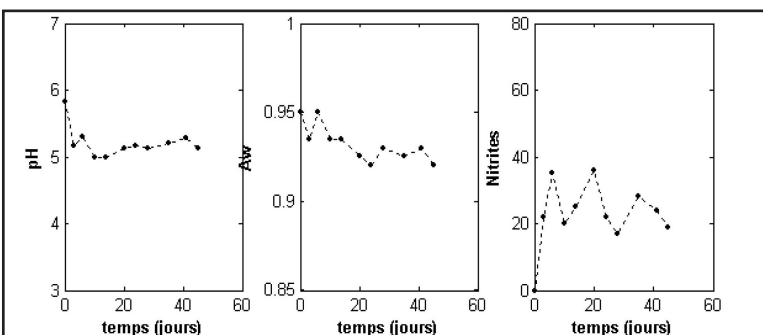


Figure 10

Évolution des caractéristiques physico-chimiques du saucisson sec au cours de son process de fabrication et de conservation

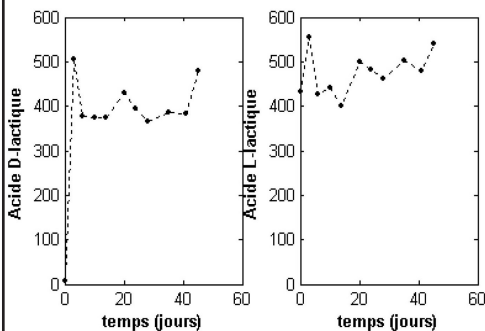
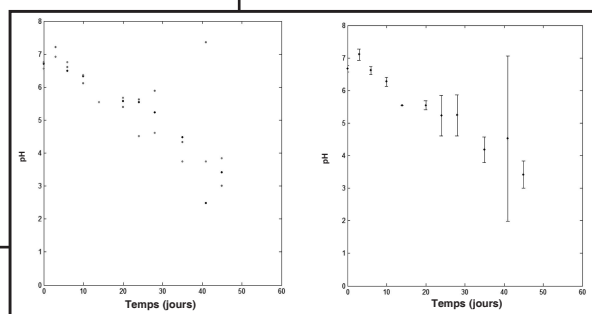


Figure 11

Évolution du comportement de *Listeria monocytogenes* K46.3 (moyenne de trois répétitions et écart type) au cours du process de fabrication saucisson sec et de sa conservation



Le développement de la flore lactique s'effectue durant les trois premiers jours, (+2 Log) entraînant une production d'acide lactique D (+500 mg/g) ainsi qu'une réduction de pH (de 5,8 à environ 5,1/5,2). Si la concentration d'acide lactique reste ensuite stable tout au long du processus de fabrication, le pH quant à lui remonte graduellement jusqu'à 5,9 sous l'action des levures.

En condition standard, l'activité de l'eau décroît régulièrement pendant l'étape de séchage pour se stabiliser vers 0,89 à J28 (fin de séchage) jusqu'à la DLUO sauf pour la fabrication 2 où l'Aw est stabilisée vers 0,92.

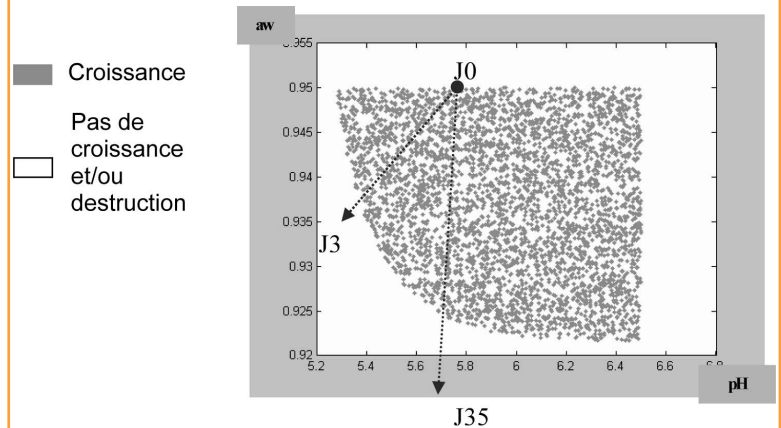
À partir des nitrates ajoutés, ceux-ci sont réduits par les *Pseudomonas* pendant les 15 premiers jours pour produire des nitrites. Néanmoins, ceux-ci sont relativement instables au sein de la matrice saucisson et disparaissent rapidement (soit sous forme de gaz, soit ils sont fixés sur la myoglobine et/ou autre composant).

Listeria monocytogenes est stable (voire se développe) durant les trois premiers jours, ensuite sa population décroît graduellement au cours du temps avec une réduction de 3-4 Log en 45 jours.

Exploitation des challenge-tests

Dans cette étude, différents challenge tests ont été réalisés en conditions standards ou en simulant des défauts de fabrication: sans addition de ferments, maintien d'une Aw élevée. Quel que soit le challenge test réalisé, il a été démontré que le taux de *Listeria monocytogenes* décroît tout au long du processus.

Figure 12
INTERFACE CROISSANCE/NON CROISSANCE DE *LISTERIA MONOCYTOGENES* EN FONCTION DES FACTEURS pH/Aw
(les facteurs température et acide lactique étant fixés respectivement à 24 °C et 1000 mg/g (1 %))



Une caractérisation physico-chimique du saucisson sec a été réalisée de l'embossage à la DLUO.

Les résultats expérimentaux mettent en évidence une destruction de *Listeria monocytogenes*, entre 3 et 45 jours de stockage, occasionnée par l'évolution des caractéristiques physico-chimiques du produit. En effet, en cohérence avec les interfaces croissance/non croissance établies par Sym'Previus* à partir des valeurs cardinales calculées, les caractéristiques physico-chimiques obtenues à J3 (pH 5,3; Aw: 0,935; concentration en acide lactique totale: 1 %) ne permettent pas le développement de *Listeria monocytogenes* (figure 12).

Dans le cas de l'accident de fabrication avec une activité de l'eau élevée ($0,92 < Aw < 0,935$), la combinaison pH/Aw ne permet pas le développement de *Listeria monocytogenes* ($5 < pH < 5,3$).

Au vu de ces résultats, le risque d'accident de fabrication industrielle résulte d'une mauvaise combinaison activité de l'eau/pH c'est-à-dire d'une mauvaise fermentation associée à un mauvais séchage.

Vis-à-vis de la croissance, la maîtrise de *Listeria monocytogenes* est due à une bonne acidification associée à un bon séchage.

L'acidification résulte de la capacité des bactéries lactiques à s'implanter. Pour pouvoir garantir une acidification correcte en fonction de la formulation, il reste à prévoir le comportement des bactéries lactiques et la production d'acide lactique en fonction de la formulation et des conditions de stockage.

B I B L I O G R A P H I E

- (1) SALVAT G., TOQUIN M., MICHEL Y., COLIN P., 1995. Control of *Listeria monocytogenes* in the delicatessen industries: the lessons of a listeriosis outbreak in France. Int. J. food Microbiol., 25,75-81.
(2) THEVENOT D., DELIGNETTE-MULLER ML., CHRISTIEANS S., VERNOZY-ROZAND C., 2005. Fate of *Listeria monocytogenes* in experimentally contaminated French sausages. Int. J. food Microbiol., 101,189-200.

* Sym'Previus : <http://www.symprevius.org>

- (3) VEREECKEN K.M., VAN IMPE J.F., 2000. Experimental validation of a model for combined growth and metabolite production of lactic acid bacteria. Proceedings of the 3rd International Conference on Predictive Modelling in Foods.
(4) LEROY F., DEGEEST B., DE VUYST L., 2000. A novel area of predictive modelling: describing the functionality of beneficial microorganisms in foods. Proceedings of the 3rd International Conference on Predictive Modelling in Foods