

THERMORESISTANCE APPARENTE DES BACTERIES LACTIQUES DANS LE FOIE GRAS PASTEURISÉ

André Stéphane¹, Tejedor Gaël¹, Budziszewski Benoit¹,

Zuber François¹, Planchon Stella¹, Membré Jeanne-Marie^{2,3},

¹ CTCPA, Unité de microbiologie EMaIRIT'S, 449 Avenue Clément Ader, 84911 AVIGNON,

² INRA, UMR1014 Secalim, 44307 NANTES,

³ LUNAM Université, Oniris, 44307 NANTES

sandre@ctcpa.org

RÉSUMÉ

Dans les produits pasteurisés réfrigérés, le développement de bactéries lactiques limite souvent la DLC du produit, par dégradation organoleptique. Une meilleure connaissance de cette flore est primordiale pour limiter cette dégradation et optimiser les traitements de pasteurisation thermique. Des protocoles d'analyses microbiologiques et des milieux de culture spécifiques ont été mis au point, pour être au plus proche des conditions industrielles de pasteurisation du foie gras, et ainsi pouvoir expliquer la variabilité de la thermorésistance de flores lactiques d'intérêt vis-à-vis de certains paramètres de composition des matrices et de conditions de process. Les premiers résultats, obtenus à partir d'un plan d'expérience fractionné pour 7 facteurs à 2 niveaux, ont montré l'influence très forte de la matrice foie gras au cours et après le traitement thermique sur la thermorésistance apparente de deux espèces bactériennes. Puis il a été étudié l'influence des 3 facteurs les plus importants sur la thermorésistance (température de traitement, milieux de traitement et de recouvrement). La thermorésistance augmente quand la concentration en foie gras dans les milieux de traitement et de recouvrement augmente. Cette étude montre que les données de thermorésistance issues de la littérature conduisent à surestimer fortement la destruction des bactéries dans le foie gras pasteurisé. En effet, ces valeurs D ou δ sont pour la plupart obtenues avec des milieux de laboratoire, alors que des thermorésistances jusqu'à 145 fois plus élevées sont observées en expérimentant dans la matrice foie gras.

ABSTRACT

Apparent Heat Resistance of Lactic Bacteria in Foie Gras Products

Growth of lactic bacteria is usually observed as limiting factor of pasteurized then chilled product, along with sensory defect. Better knowledge of this flora is therefore useful to limit the degradation and optimize pasteurization treatments. Specific analysis methodology and growing media were designed to investigate as close as possible to industrial conditions for Foie Gras pasteurization, allowing to explain variability in heat resistance of several lactic bacteria with changes in matrix composition and process conditions. First results were obtained through factorial experimental design with 7 factors on 2 levels, display strong influence of foie Gras matrix on the apparent heat resistance of two species. Additional study was performed with the 3 most influencing factors (heat treatment temperature, destruction and recovery media). Apparent heat resistance increase with the concentration of Foie Gras in destruction and recovery media. This study shows that using published heat resistance data leads to strongly overestimates efficiency of thermal destruction of bacteria in pasteurized foie Gras. Indeed, published D or δ values are usually obtained in laboratory media, whereas heat resistance up to 145 fold higher are observed in Foie Gras matrix

INTRODUCTION

Dans les produits pasteurisés réfrigérés, les bactéries lactiques représentent souvent la flore dont le développement limite la Durée de Vie Microbiologique du produit, par dégradation organoleptique de celui-ci. Cette flore, qui correspond à 12 genres bactériens, combine de nombreuses caractéristiques lui permettant de se développer rapidement à faible température.

Une meilleure connaissance des bactéries lactiques et en particulier de leur thermorésistance, est ainsi primordiale pour l'optimisation des procédés et la maîtrise qualitative notamment des produits à base de foie gras. Parmi les bactéries lactiques, c'est *Weissella viridescens* qui présente la thermorésistance la plus élevée (Borch et al., 1988 ; Santos et al., 2005, données internes). Et cette espèce est retrouvée dans plusieurs échantillons de foies gras pasteurisés, au cours du stockage réfrigéré. Or, au regard des traitements thermiques appliqués par les industriels (au minimum 50 minutes à 70°C), une thermorésistance maximale mesurée de $D = 15$ min à 60°C, ne devrait pas conduire à la survie de cette espèce. L'étude de différents paramètres environnementaux devrait donc permettre de démontrer l'existence de thermorésistance extrême dans certaines conditions environnementales.

Afin de valider ce type de phénomène dans le foie gras, il paraît nécessaire de déterminer plus précisément la thermorésistance d'isolats sauvages représentatifs des contaminations observées dans ces produits. Ces données devraient permettre d'avancer dans la compréhension des mécanismes d'acquisition de cette thermorésistance, afin de mieux définir les traitements, et/ou de limiter cette thermorésistance avant le traitement.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Matériel biologique

L'espèce *W. viridescens* (souche 1103 037) a été sélectionnée pour sa thermorésistance élevée dans le groupe des bactéries lactiques. *Enterococcus faecium* (3003 002) a été retenu car fréquemment utilisé comme germe de substitution d'espèces pathogènes non sporulantes.

1.2. Milieux à base de foie gras (cru ou cuit)

Afin de pouvoir cultiver des souches bactériennes puis de les récupérer sur une matrice se rapprochant le plus possible d'un foie gras, il a été nécessaire de créer un milieu à base de foie gras utilisable au laboratoire. Le pourcentage maximal de foie gras, additionné à de la gélose blanche a été de 60% de foie gras que celui-ci soit cru ou cuit. Pour la gélose au foie gras cru (FGu),

la base a été une mûlée crue préparée par le CTCPA puis congelée et décontaminée par ionisation.

Pour la gélose au foie gras cuit (FGi), plusieurs blocs de foie gras appertisés sans morceaux et provenant d'un seul et même lot industriel ont été utilisés.

1.3. Production des suspensions bactériennes

Les souches ont été mises en culture sur les différentes géloses et selon différentes conditions (cf. plan d'expérience). Suite à l'incubation des géloses (MRS ou FGu), les tapis bactériens ont été récupérés par raclage et du Tryptone Sel (TS), puis centrifugés (5 min à 9000G à 4°C). Le culot a été repris dans un bouillon TS jusqu'à son utilisation.

1.4. Dénombrement

Les dénombrements ont été effectués soit en profondeur en gélose MRS soit en surface de gélose FGi. Les flores ont été incubées 5 jours à 25°C quelle que soit la gélose utilisée.

1.5. Thermorésistance

Les paramètres de thermorésistance ont été obtenus à l'aide de capillaires en verre plongés dans un bain d'huile pendant différentes durées et différents facteurs: la température, le milieu de traitement (TS ou FGu) ou le milieu de recouvrement (= milieu de dénombrement des flores survivantes, MRS ou FGi). La destruction des bactéries a été modélisée selon le modèle de Weibull permettant de déterminer le paramètre δ . La thermorésistance ainsi mesurée en intégrant l'impact de l'environnement, notamment de recouvrement, est appelée thermorésistance apparente.

1.6. Plan d'expériences

- Plan d'expérience fractionné

Un plan d'expérience a été conçu avec 7 facteurs à 2 niveaux afin d'évaluer le poids de chaque facteur sur la thermorésistance apparente. Les facteurs et niveaux de facteur sont les suivants : l'espèce bactérienne (facteur A : *Enterococcus faecium* / *Weissella viridescens*), le milieu de croissance (facteur B : MRS/FGu), la température de croissance (facteur C : 8°C/25°C), l'âge des cellules bactériennes (facteur D : début de phase exponentielle/14 jours de stockage), le milieu de traitement (facteur E : Tampon Phosphate/FGu), la température de traitement (facteur F : température inférieure/supérieure ; 60 ou 65°C pour *E. faecium* et 65 ou 70°C pour *W. viridescens*), le milieu de recouvrement (facteur G : milieu MRS/Foie Gras cuit (FGi)). L'ordre des essais a été fixé à l'aide d'un tirage aléatoire.

Une analyse de la variance (ANOVA) a été réalisée dans le but de déterminer les facteurs qui avaient un impact prépondérant sur la thermorésistance apparente. Afin de traiter correctement les résultats, le test a été réalisé en prenant en compte tous les facteurs

et toutes les interactions (sauf celles « retirées » intervenant dans les interactions cachées).

- Carré latin

Les essais ont été réalisés sur une seule espèce bactérienne, *W. viridescens*, flore déterminée précédemment comme la plus thermorésistante, avec 3 facteurs avec 5 niveaux chacun : le milieu de traitement thermique contenant « 0, 25, 50, 75 ou 100% » de foie gras cru, la température de traitement (de 57 à 65°C), le milieu de recouvrement gélosés contenant 0, 25, 50, 75 ou 100% » de foie gras cuit.

Les niveaux moyens en termes de milieu de croissance, de température de croissance et d'âge des cellules bactériennes ont été fixés respectivement à : milieu MRS ; incubation à 25°C ; début de phase exponentielle.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

2.1. Poids des facteurs

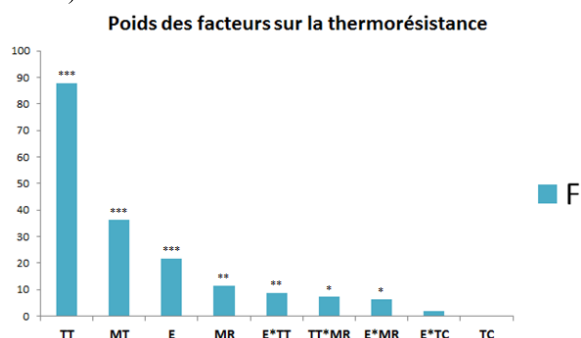
L'exploitation des résultats du plan d'expérience fractionné à 7 facteurs variants a permis de mettre en évidence que l'espèce bactérienne, le milieu de traitement, la température de traitement et le milieu de recouvrement avaient chacun un impact significatif sur la thermorésistance ($Pr > F < 0.05$, Figure 1). Le milieu de croissance, la température de croissance et l'âge des cellules bactériennes n'avaient pas d'effet, tout comme la majorité des interactions.

La température (TT) a été sans surprise le facteur ayant le plus d'effet sur la thermorésistance qui est aussi dépendante de l'espèce bactérienne (E).

Plus intéressant, le milieu de traitement (MT) et le milieu de recouvrement (MR) ont eu chacun un effet significatif. Certaines interactions présentent un effet significatif sur la thermorésistance, comme : « Espèce * Température de traitement » ($E*TT$), « Température de traitement * Milieu de recouvrement » ($TT*MR$), « Espèce * Milieu de recouvrement » ($E*MR$). Ces interactions sont néanmoins difficiles à comprendre et à interpréter.

Il a pu en être conclu que la matrice, dans notre cas du foie gras, joue un rôle important dans la résistance extrême des bactéries d'altération, observée dans les produits industriels.

Figure 1. Poids des différents facteurs sur la thermorésistance. TT : température de traitement ; MT : milieu de traitement ; E : espèce ; MR : milieu de recouvrement ; TC : température de croissance
F : Réponse du test (***) $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$)

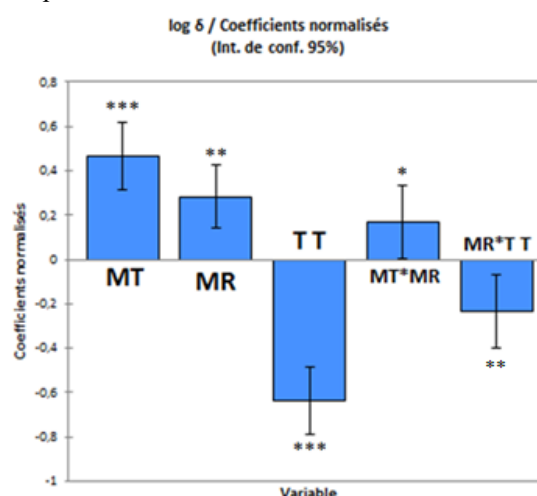


2.2. Modèle prédictif

Suite à cette première conclusion ayant mis en évidence des tendances, une nouvelle série d'expériences a été menée dans le cadre d'un carré latin uniquement sur la souche de *Weissella*. De plus, les facteurs liés à la croissance des bactéries ont été fixés, vu qu'ils n'avaient pas d'influence sur la thermorésistance, au cours de la première série d'essais. Comme déjà observé précédemment, la présence de foie gras dans les milieux, aussi bien de traitement que de recouvrement, impacte fortement sur la thermorésistance apparente. Entre des conditions extrêmes, il est observé un écart d'un facteur 20 sur la thermorésistance mesurée (exemple : 6,5 min < D 57°C < 142 min).

L'exploitation des résultats de thermorésistance, par régression linéaire, a permis de confirmer que le milieu de traitement, la température de traitement et le milieu de recouvrement avaient un impact significatif sur la thermorésistance ($Pr > |t| < 0.05$, figure 2).

Figure 2. Effet des facteurs et interactions sur la thermorésistance (valeur δ). (MT : milieu de traitement ; MR : milieu de recouvrement ; TT : température de traitement) *** : $p < 0.001$; ** : $p < 0.01$; * : $p < 0.05$



De même, les interactions « Milieu de traitement * Milieu de recouvrement » et « Milieu de recouvrement * Température de traitement » ont un effet significatif sur la thermorésistance apparente.

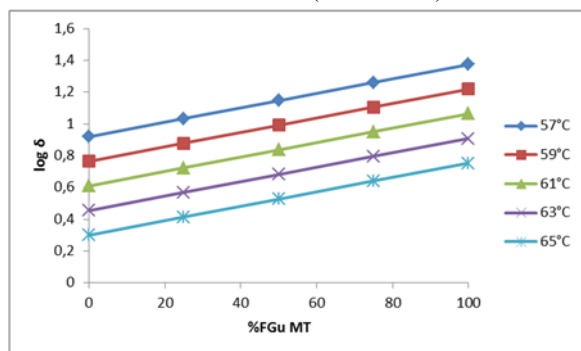
Les facteurs qui ont le plus d'impact sur la thermorésistance sont le milieu de traitement et la température de traitement. En effet, leur impact est hautement significatif ($p < 0.001$) comparé au reste des facteurs et interactions. Le milieu de traitement, le milieu de recouvrement et l'interaction MT * MR ont un effet « positif » sur la thermorésistance (coefficient normalisé > 0), c'est-à-dire qu'une augmentation du niveau de ces facteurs et de leur interactions augmente la thermorésistance apparente.

À l'inverse, la température de croissance et l'interaction MR*TT ont un effet « négatif » sur la thermorésistance. L'interaction MT*TT n'est pas représentée sur la représentation graphique car elle n'avait pas d'impact significatif sur la thermorésistance.

Les représentations graphiques ont été réalisées à l'aide de l'équation du modèle de la régression linéaire, ce sont donc des prédictions selon le modèle suivant :

$\log \delta = 1,12 + 9,38 \text{ E-}03 * A + 5,67 \text{ E-}03 * B - 0,161 * C + 9,69 \text{ E-}05 * AB - 1,65 \text{ E-}03 * BC$; avec : A = Pourcentage de foie gras cru dans le milieu de traitement ; B = Pourcentage de foie gras cuit dans le milieu de recouvrement ; C = Température de traitement. Ce modèle peut ensuite être utilisé pour représenter graphiquement l'impact prédictif de chacun des facteurs.

Figure 3. Évolution de la thermorésistance prédite ($\log \delta$) en fonction du pourcentage de foie gras cru dans le milieu de traitement (%FGu MT)



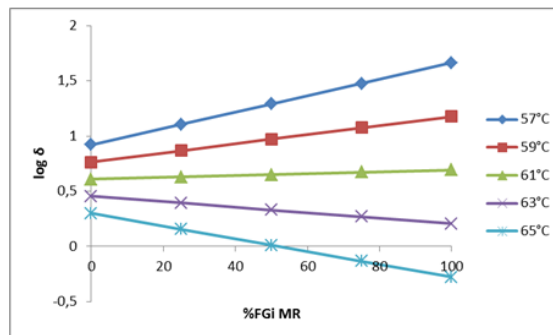
La Figure 3 représente l'évolution de la thermorésistance à différentes températures en fonction du pourcentage de foie gras dans le milieu de traitement, sans tenir compte de l'influence de la concentration en foie gras du milieu de recouvrement MR : 0% FGi (= milieu MRS). Il peut être observé que plus le pourcentage de foie gras dans le milieu de traitement augmente, plus la thermorésistance apparente augmente.

Ainsi, la souche de *W. viridescens* testée présente une thermorésistance 3 fois plus élevée (écart de 0.45 log) dans un milieu de traitement composé de foie gras (100%, condition «industrielle»), qu'en condition de laboratoire (TP), et cela sans tenir compte du milieu de recouvrement.

De plus, cet effet du milieu de traitement n'est pas dépendant de la température de traitement, l'évolution étant la même quelle que soit la température. Enfin, le modèle prédit une évolution de la thermorésistance quasi linéaire avec ce facteur : la thermorésistance modélisée est directement proportionnelle à la concentration de foie gras dans le milieu de traitement. La Figure 4 représente l'évolution prédite par le modèle, de la thermorésistance en fonction du pourcentage de foie gras cuit dans le milieu de recouvrement (milieu où sont revivifiées les bactéries

ayant survécu au traitement thermique). Dans ce cas, sans tenir compte de l'effet du pourcentage de foie gras dans le milieu de traitement (MT : 0% FGu (= destruction en milieu Tampon Phosphate).

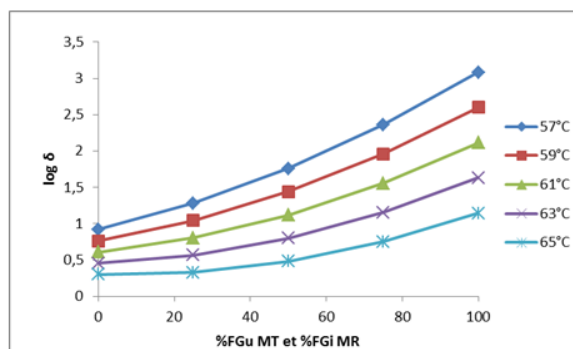
Figure 4. Évolution de la thermorésistance prédite ($\log \delta$) en fonction du pourcentage de foie gras cuit dans le milieu de recouvrement (%FGi MR)



Le pourcentage de foie gras dans le milieu de recouvrement a un effet sur la thermorésistance prédite ($\log \delta$), mais cet effet est dépendant de la température. En effet, aux températures les plus faibles (57°C, 59°C), l'addition de foie gras dans le milieu de recouvrement augmente la thermorésistance. La thermorésistance est jusqu'à 5 fois plus élevée à 57°C dans un milieu de recouvrement composé de foie gras.

À l'inverse, à des températures plus élevées, une augmentation de la concentration en foie gras dans le milieu de recouvrement diminue la thermorésistance apparente. La souche est donc 4 fois moins résistante dans un milieu de recouvrement composé de foie gras qu'en milieu de laboratoire à 65°C. Il faut noter qu'il est connu que lorsque la température augmente, tous les autres facteurs perdent de leur influence sur la thermorésistance. De même, il faut tenir compte de l'interaction «Milieu de recouvrement * Température de traitement» qui a un fort impact négatif sur la thermorésistance. Les résultats montrent également que l'évolution de la thermorésistance était quasi linéaire. La thermorésistance apparente était donc directement proportionnelle à la concentration en foie gras dans le milieu de recouvrement.

Figure 5. Évolution de la thermorésistance prédite ($\log \delta$) en fonction du pourcentage de foie gras à la fois dans le milieu de traitement (%FGu MT) et dans le milieu de recouvrement (%FGi MR)



La Figure 5 présente l'évolution de la thermorésistance en fonction du milieu de traitement et du milieu de recouvrement. Les valeurs de pourcentage de foie gras cru ou cuit sont les mêmes, c'est-à-dire qu'au point d'abscisse 25, le $\log \delta$ correspond à la valeur obtenue avec 25% de foie gras cru dans le milieu de traitement et 25% de foie gras cuit dans le milieu de recouvrement. Elle permet de visualiser l'effet combiné du milieu de traitement et du milieu de recouvrement lorsque la composition du milieu est identique dans les deux milieux (ce qui reflète les conditions réelles).

La thermorésistance apparente prédite augmente quand le pourcentage de foie gras dans le milieu de traitement et le milieu de recouvrement augmente. En effet, la thermorésistance à 65°C a été augmentée de 0.30 $\log \delta$ (0% FG) à 1.14 $\log \delta$ (100% FG), soit une thermorésistance multipliée par 7. L'augmentation est nettement plus importante aux plus basses températures, par exemple à 57°C avec une thermorésistance multipliée par un facteur 145.

Ainsi, l'évolution de la thermorésistance globale prédite est dépendante de la température. En effet, plus la température est basse, plus l'écart de thermorésistance entre des milieux de traitement et de recouvrement à 0% à 100% de foie gras est important. L'écart à 65°C entre les milieux à 0% et 100% était de 0.84 $\log \delta$ alors que l'écart à 57°C était de 2.16 $\log \delta$. Il y avait donc une différence d'un facteur 20 (1.32 $\log \delta$) entre l'évolution de la thermorésistance entre les deux températures extrêmes du plan d'expérience.

L'évolution de la thermorésistance globale n'étant pas linéaire, elle n'est donc pas directement proportionnelle au pourcentage de foie gras dans le milieu de traitement et de recouvrement.

CONCLUSION

Nos expérimentations ont permis de déterminer quels facteurs avaient un effet significatif sur la thermorésistance de bactéries dans le foie gras et quel était le poids de ces facteurs par rapport aux autres.

En contradiction avec la bibliographie, les facteurs en relation avec la croissance n'ont eu aucun impact sur la thermorésistance. Par exemple, le milieu gras de croissance n'a pas induit une augmentation de la thermorésistance comme rapporté pour *Listeria monocytogenes* dans le beurre et la crème (De Matos et al., 1998). De même des cellules plus âgées n'ont pas présentées une thermorésistance plus élevée

qu'une culture fraîche, plus jeune (Christiansen et al., 2006, Martinez et al 2003).

En revanche, l'impact des milieux de traitement et de recouvrement, qui ont présenté un effet significatif sur l'augmentation de la thermorésistance des bactéries lactiques dans le foie gras, est en accord avec les travaux d'Osaili et al. (2009) pour qui plus un milieu de traitement était gras, plus la thermorésistance était élevée, tout comme le milieu de recouvrement pour Peck et al. (1992).

La nouveauté de nos résultats concerne la mise en évidence d'interactions («Espèce * Température de traitement», «Espèce * Milieu de recouvrement», et «Température de traitement * Milieu de recouvrement»), interactions qui montrent un effet significatif sur la thermorésistance.

Le deuxième plan d'expérience a confirmé que le milieu de traitement et de recouvrement avait un effet significatif sur la thermorésistance : les 2 milieux ont un effet protecteur des bactéries. À 57°C et 59°C, le milieu riche en foie gras semble avoir un effet protecteur alors qu'à 63°C et 65°C, l'addition de foie gras dans le milieu de recouvrement semble avoir un effet négatif sur la thermorésistance apparente. Cet effet n'était pas attendu, mais peut aisément s'expliquer par l'existence de l'interaction «Milieu de recouvrement * Température de traitement» qui a un fort impact négatif sur la thermorésistance.

Le foie gras va donc avoir globalement un effet plutôt protecteur sur les bactéries lactiques contre la destruction thermique, effet qui pourrait être dû aux acides gras disponibles dans cette matrice pour le métabolisme et la physiologie des bactéries lactiques.

Une étude a montré que les acides gras intervenaient dans la fluidité de la membrane cellulaire, et notamment lors de l'adaptation au froid (Chintalapati et al., 2004). On pourrait se demander si un mécanisme similaire n'est pas à l'origine de l'augmentation de la thermorésistance observée lors de notre étude. Enfin notre étude a montré que les données de thermorésistance issues de la littérature obtenues en conditions de laboratoire conduisent à surestimer fortement la destruction des bactéries lactiques dans le foie gras au cours de la pasteurisation. Nous avons observé pour une même souche une thermorésistance apparente à 57°C jusqu'à 145 fois plus élevée lorsqu'elle mesurée dans la matrice foie gras, comparé à celle observée dans du milieu Tryptone Sel, avec dénombrement sur MRS.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Borch E., 1988. Int. J. Food. Microbiol. (7), 317-330
- Chintalapati S., 2004. Cell. Mol. Biol. (50) 631-642
- Christiansen P., 2006. Int. Dairy J. (16) 1196-1204
- De Matos R. E., 1998. J. Appl. Microbiol. (84) 234-239
- Martinez S., 2003. L. Appl. Microbiol. (37) 475-481
- Osaili T., 2009. J. Appl. Microbiol. (107) 928-935
- Peck M., 1992. L. Appl. Microbiol. (15) 146-151
- Santos E. M., 2005. Int. J. Food. Microbiol. (97) 285-296