

50376
1994
253

50376
1994
253

THESE

présentée à
L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES
DE LILLE

pour le titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE

spécialité : Sciences de la vie et de la santé
Option : Microbiologie

par
DENIS WATIER



ETUDE DE LA CROISSANCE ET DE LA RESISTANCE
DE *PECTINATUS* ET DE *MEGASPHAERA*, BACTERIES
ANAEROBIES STRICTES, CONTAMINANTS DE LA BIERE

soutenu le 1^{er} décembre 1994 devant la Commission d'Examen

Président : Professeur R. TAILLIEZ
Rapporteurs : Professeur J. M. LEBEAULT
Professeur P. MAFART
Examineur : Professeur D. GUILLOCHON
Professeur J. P. HORNEZ
Docteur J. L. THOLOZAN



030 054718 5

PREFACE

Déjà sur les bancs de l'école, depuis ma plus tendre enfance je rêvais d'être chercheur. Bien des difficultés ont dû être surmontées pour en arriver à soutenir cette thèse. Mes parents m'ont aidé et je les remercie encore pour le soutien qu'ils m'ont apporté tout au long de mes études. Durant cette thèse, je me suis partagé entre l'enseignement et la recherche, ce qui m'a laissé peu de temps libre. Cet état de fait ainsi que les nuits passées au laboratoire à surveiller les différentes cinétiques de croissance ont été des contraintes pour ma femme, Isabelle. Au lieu de subir cette situation, elle m'a soutenu. Je la remercie pour l'aide qu'elle m'a si généreusement apportée et je lui dédie cette thèse.

REMERCIEMENTS

Ce travail a été effectué dans le Laboratoire de Microbiologie fondamentale et appliquée de l'Université des Sciences et Technologies de Lille, sous la direction de Monsieur le Professeur Roger TAILLIEZ. Je tiens à lui exprimer ma profonde reconnaissance pour m'avoir permis d'y réaliser cette thèse. Il me fait l'honneur d'en être le Président.

Je remercie tout particulièrement Monsieur le Professeur Jean-Pierre HORNEZ pour sa gentillesse et l'aide qu'il m'a apportée pour la réalisation de cette thèse. J'ai été très sensible à l'appui dont il m'a fait bénéficier et aux conseils qu'il m'a donnés sur le plan professionnel. Ceux-ci ont été des plus profitables pour mon début de carrière.

J'adresse mes plus vifs remerciements à Monsieur le Professeur Jean-Marie LEBEAULT de l'Université de Technologie de Compiègne pour avoir spontanément accepté d'être Rapporteur de cette thèse.

Je demande à Monsieur le Professeur Pierre MAFART, Directeur de la MST IAA et Innovation de l'Université de Bretagne Occidentale à Quimper qui a accepté de juger le contenu de ce manuscrit, de trouver l'expression de mes sincères remerciements.

Je dois particulièrement manifester ma reconnaissance à Monsieur le Professeur Didier GUILLOCHON de l'I.U. T de l'Université des Sciences et Technologies de Lille, qui me fait l'honneur de participer au jury de cette thèse.

*J'adresse également mes remerciements au Docteur Jean-Luc THOLOZAN de l'I.N.R.A de Villeneuve d'Ascq qui a apporté dans son jugement ses compétences sur le métabolisme de *Pectinatus frisingensis*.*

L'aboutissement de cette thèse a nécessité le concours de nombreuses personnes auxquelles je tiens à exprimer ma reconnaissance :

- Monsieur le Docteur Henri Charles DUBOURGUIER, Directeur de recherche I.N.R.A., pour les remarques constructives dans l'analyse des résultats et pour l'aide précieuse qu'il a apportée à la rédaction des publications.

- Monsieur le Docteur Ivan LEGUERINEL de l'Université de Bretagne Occidentale à Quimper qui m'a soutenu avec gentillesse durant ces quatre années. Je lui suis reconnaissant des conseils qu'il m'a apportés.

- Monsieur Iffat CHOWDHURY qui m'a aidé pour certaines expérimentations contraignantes avec toute sa gentillesse et une totale disponibilité.

- à chacun des stagiaires qui ont travaillé avec moi sur le sujet et qui m'ont apporté une aide technique appréciable.

Je n'oublie pas tous les membres du Laboratoire de Microbiologie Fondamentale et Appliquée de L'Université des Sciences et Technologies de Lille et en particulier Monsieur Max BECHET, qui m'ont apporté aide et sympathie.

Enfin je joins à ces remerciements la direction du collège saint Charles d'Armentières pour m'avoir permis de bénéficier d'un emploi du temps spécialement aménagé, me permettant de concilier la recherche avec mes fonctions d'enseignant.

*Dieu bénit l'homme, non pour avoir trouvé,
mais pour avoir cherché.*

Victor HUGO

Etude de la croissance et de la résistance de *Pectinatus* et de *Megasphaera*, bactéries anaérobies strictes, contaminants de la bière.

Pectinatus et *Megasphaera*, bactéries anaérobies strictes, ont été étudiées du point de vue de leur physiologie de croissance et de leur résistance.

Nous avons réalisé des cinétiques de croissance en étudiant l'influence de la température, du pH et de la concentration en éthanol. Les résultats des taux de croissance maximaux et des populations maximales ont permis de construire différents modèles polynomiaux. Pour *Pectinatus* les conditions optimales de croissance sont de l'ordre de 33-35°C, pH 6,3-6 avec un μ_{max} de 0,31 h⁻¹ et une pop. max. de 3,7 10⁸ bact./ml. Il y a croissance jusqu'au pH 4,1 et 7,3 % d'éthanol v/v. Dans le moût *Pectinatus* se développe dans les conditions physico-chimiques rencontrées lors de la fermentation de la bière. Pour *Megasphaera* les conditions optimales de croissance sont : 33-35°C, pH de 6,2-6,6 avec un taux de croissance de 0,16 h⁻¹. *Megasphaera* est plus sensible que *Pectinatus* et semble moins adapté au milieu bière.

Le métabolisme de *Pectinatus* a été abordé. Nous avons mis en évidence une synthèse d'acétate ainsi que la synthèse de propionate via la voie du succinate.

En ce qui concerne la thermorésistance, pour *Pectinatus*, dans la bière le D_{60} est supérieur à 0,88 minute et le z supérieur à 6°C. La thermorésistance de *Megasphaera* est plus faible puisque le D_{60} est de 0,55 minute. Ces bactéries ne semblent pas poser de problème lors d'une pasteurisation classique avec filtration préalable. Cependant pour *Pectinatus* les risques sont plus importants pour une flash pasteurisation.

L'étude de la résistance à l'oxygène a montré que *Pectinatus* est capable de résister plusieurs heures dans du moût saturé en oxygène malgré son caractère anaérobie stricte.

L'étude de la croissance de *Pectinatus* et de *Megasphaera* lors de la fabrication de la bière a montré que les risques de prolifération de ces micro-organismes sont importants.

Mots clés : *Pectinatus*, *Megasphaera*, bactéries contaminantes, bière, croissance, modélisation prédictive, métabolisme, thermorésistance, pasteurisation.

Study of the growth and resistance of *Pectinatus* and *Megasphaera*, strictly anaerobic beer spoilage bacteria.

Pectinatus and *Megasphaera*, strictly anaerobic bacteria, have been studied, as regards their growth physiology and their resistance.

We have performed growth kinetics by studying the influence of temperature, pH and ethanol concentration. The results of maximal growth rates and maximal populations have enabled us to elaborate different polynomial models. For *Pectinatus* the optimal growth conditions exist when the temperature averages 33-35°C, when the pH is from 6.3 to 6 with a μ_{max} of 0.31 h⁻¹ and a max pop of 3.7 10⁸ b/ml. There is growth until pH 4.1 and 7.3% of ethanol v/v. In wort, *Pectinatus* develops in the physico-chemical conditions encountered during beer fermentation. For *Megasphaera*, the optimal growth conditions are : 33-35 °C, pH from 6.2 to 6.6 with a 0.16 h⁻¹ growth rate. *Megasphaera* is more sensitive than *Pectinatus* and seems less adapted to beer medium.

Pectinatus metabolism has been studied. We have proved that there is a synthesis of acetate and of propionate.

As far as the heat resistance of *Pectinatus* is concerned, in beer, the D₆₀-value is over 0.88 minutes and the z-value over 6°C. *Megasphaera* heat resistance is weaker since the D₆₀-value is of 0.55 minutes. The bacteria do not seem to prevent the course of a classical pasteurisation with preliminary filtration. However, for *Pectinatus*, the risks are more important for a flash pasteurisation.

The study of oxygen resistance has proved that *Pectinatus* is able to resist several hours in a wort saturated in oxygen in spite of its strictly anaerobic type.

The study of *Pectinatus* and *Megasphaera*'s growth during the making of beer has proved that the risks of proliferation are important.

Keywords : *Pectinatus*, *Megasphaera*, spoilage bacteria, beer, growth, predictive modelling, metabolism, heat resistance, pasteurisation.

- LISTE DES PUBLICATIONS SE RAPPORTANT A CE TRAVAIL -

ARTICLES

WATIER D., LEGUERINEL I., HORNEZ J. P., DUBOURGUIER H. C.
Influence de facteurs physico-chimiques sur les cinétiques de croissance de *Pectinatus cerevisiiphilus* et de *Megasphaera cerevisiae*
Sciences des Aliments, 1993 13:297-304

WATIER D., LEGUERINEL I., HORNEZ J. P., CHOWDHURY I., DUBOURGUIER H. C.
Heat resistance of *Pectinatus* sp, a beer spoilage anaerobic bacterium.
Journal of Applied Bacteriology (sous presse) N°. 4826/2/94

WATIER D., DUBOURGUIER H. C., LEGUERINEL I. ET HORNEZ J. P.
Response surface models for predicting the effects of temperature, pH and ethanol concentration on the growth kinetic parameters of *Pectinatus* sp.
Applied and Environmental Microbiology (soumise) N°. AEM 1337-94

WATIER D., CHOWDHURY I., LEGUERINEL I. ET HORNEZ J. P.
The heat resistance of *Megasphaera cerevisiae* and the pasteurisation of beer.
Journal of Food Protection (soumise)

CHOWDHURY I., WATIER D. ET HORNEZ J. P.
Study of survival in oxygen conditions of strictly anaerobic bacteria : *Pectinatus cerevisiiphilus*
Anaerobe (soumise)

COMMUNICATIONS

WATIER D., LEGUERINEL I., HORNEZ J. P., DUBOURGUIER H. C.
Etude de *Pectinatus cerevisiiphilus* et de *Megasphaera cerevisiae*, bactéries anaérobies contaminantes de la bière.
Colloque AFM Quimper 1991.

WATIER D., CHOWDHURY I., LEGUERINEL I., HORNEZ J. P.
Etude de la survie de *Pectinatus cerevisiiphilus* en milieu oxygéné.
Colloque SFM Bactéries anaérobies Villeneuve d'Ascq 17-18 Mars 1994. CR p117

CHOWDHURY I., WATIER D., LEGUERINEL I., HORNEZ J. P.
Thermorésistance de *Megasphaera cerevisiae*.
Colloque SFM Bactéries anaérobies Villeneuve d'Ascq 17-18 Mars 1994. CR p71

LEGUERINEL I., WATIER D., HORNEZ J. P.
Megasphaera cerevisiae growth model.
Colloque SFM Microbiologie Alimentaire et Industrielle Dijon 9-10 Mars 1994. CR p70

ABREVIATIONS

ATCC : American Type Culture Collection

D_{oxy} : temps en minutes nécessaire pour diviser le nombre de micro-organismes survivants par 10 pour une concentration en oxygène dissous donnée

DS : degré de stérilité

DSM : Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH

D_T : temps en minutes nécessaire pour diviser le nombre de micro-organismes survivants par 10 pour une température T

FI : facteur d'inactivation

K : température en degrés Kelvin

MRS : milieu de Man, Rogosa et Sharpe

T : température en degrés Celsius

Test F : test de Fisher

z : élévation de la température en °C nécessaire pour diviser la valeur de D_T par 10

μ_{max} : taux maximal de croissance

- Table des matières -

Partie I : Généralités

1. PLACE DE <i>PECTINATUS</i> ET DE <i>MEGASPHAERA</i> DANS LA CONTAMINATION DES BIERES	1
1.1 GENERALITES SUR LA CONTAMINATION DES BIERES	1
1.2 CONTAMINATION PAR LES BACTERIES	3
1.2.1 BACTERIES LACTIQUES A GRAM NEGATIF, ANAEROBIES FACULTATIVES	3
1.2.1.1 Lactobacillus	3
1.2.1.2 Pediococcus	3
1.2.2 AUTRES BACTERIES A GRAM NEGATIF, ANAEROBIES FACULTATIVES ET STRICTES	4
1.2.2.1 Entérobactéries	4
1.2.2.2 Bactéries acétiques	5
1.2.2.3 Zymomonas	5
1.3 APPARITION DE NOUVEAUX CONTAMINANTS ANAEROBIES : <i>PECTINATUS</i> ET <i>MEGASPHAERA</i>	6
2. CARACTERISTIQUES DE <i>PECTINATUS</i>	7
2.1 ORIGINES ET TAXINOMIE	7
2.2 MORPHOLOGIE	8
2.3 PROPRIETES BIOLOGIQUES ET PHYSIOLOGIQUES	10
2.4 CONDITIONS DE CROISSANCE	13
2.5 PROPRIETES ANTIGENIQUES	13
3. CARACTERISTIQUES DE <i>MEGASPHAERA</i>	14
3.1 ORIGINES ET TAXINOMIE	14
3.2 MORPHOLOGIE	14
3.3 PROPRIETES BIOLOGIQUES ET PHYSIOLOGIQUES	15
3.4 CONDITIONS DE CROISSANCE	16
4. QUELQUES GENERALITES SUR LES TECHNIQUES DE BRASSAGE	17
4.1 LE MALTAGE	17
4.2 LE BRASSAGE	17
4.3 LES FERMENTATIONS	20
4.4 FILTRATION, PASTEURISATION ET CONDITIONNEMENT	21
4.5 POINTS CRITIQUES POUR UNE CONTAMINATION AU COURS DE LA FABRICATION DE LA BIERE	21

5. CROISSANCE BACTERIENNE ET MODELISATION	23
5.1 RAPPELS THEORIQUES SUR LES CINETIQUES MICROBIENNES	23
5.1.1 CINETIQUES DE CROISSANCE	23
5.1.2 CINETIQUE DE CONSOMMATION D'UN SUBSTRAT ET DE PRODUCTION D'UN PRODUIT	24
5.2 PLANS D'EXPERIENCES ET MODELISATION	26
5.2.1 PLANS D'EXPERIENCES	26
5.2.2 LES DIFFERENTS TYPES DE PLAN A VARIABLES STRATIFIEES	27
5.3 MODELES MATHEMATiques (INSPIRE DE "MICROBIOLOGIE PREVISIONNELLE ET MODELISATION", COURS DE MST, MAFART, P.)	28
5.3.1 VALEUR A MESURER	29
5.3.2 CHOIX D'UN MODELE	29
5.3.3 LES DIFFERENTS MODELES	29
6. THERMORESISTANCE	35
6.1 PREMIERE LOI DE DESTRUCTION THERMIQUE DES MICRO-ORGANISMES	35
6.2 DEUXIEME LOI DE LA THERMORESISTANCE	38
6.3 COURBE DE TDT	40
6.4 FACTEURS MODIFIANT LES VALEURS DE D ET DE Z	41
6.4.1 SOUCHE DU MICRO-ORGANISME	41
6.4.2 CONDITIONS DE CULTURE	41
6.4.3 PH	42
6.4.4 ACTIVITE DE L'EAU (A_w)	42
6.4.5 INFLUENCE DES GAZ DISSOUS	42
6.4.6 PRESENCE D'INHIBITEURS	43
6.4.7 MODIFICATIONS APPARENTES DUES AUX CONDITIONS EXPERIMENTALES DE MESURE	43
6.5 CAUSES DE DEVIATIONS DES COURBES DE SURVIE	44
6.5.1 PRESENCE DE PLUSIEURS SITES THERMOSENSIBLES	44
6.5.2 PRESENCE DE MICRO-ORGANISMES EN AMAS	45
6.5.3 DIFFUSION DE LA CHALEUR	45
6.5.4 ACTIVATION DES SPORES PAR LA CHALEUR	45
6.5.5 PRESENCE DE POPULATIONS DIFFERENTES	46
6.5.6 EFFET PROTECTEUR DU MILIEU	46
6.5.7 ARTEFACT DE NUMERATION DES BACTERIES	46
6.5.8 CONDITIONS DE PRECULTURE	46
6.5.9 SOLUTIONS D'ESSAI	46
6.6 APPLICATION AU CAS DE LA BIERE (INSPIRE DE "LA PASTEURISATION DE LA BIERE" BENARD ET AL. 1975)	47
6.7 EFFETS SECONDAIRES DE LA PASTEURISATION SUR LA BIERE	52
6.8 RESISTANCE DES MICRO-ORGANISMES A D'AUTRES AGENTS LETAUX	52

Partie II : Matériels et méthodes

1. SOUCHES	55
1.1 SOUCHES BACTERIENNES	55
1.2 SOUCHE DE LEVURE	55
1.3 CONSERVATION DES SOUCHES	55
2. MILIEUX DE CULTURE	56
2.1 MILIEU DE MAN, ROGOSA ET SHARPE (MRS) (GLUCOSE: 2G/L)	56
2.2 MOUT	56
2.3 BIÈRE	56
2.4 PRÉPARATION DES MILIEUX DE CULTURE	57
2.4.1 MILIEU MRS	57
2.4.2 MOUT ET BIÈRE	57
2.4.3 MILIEU SOLIDE	57
3. SUIVI DES CROISSANCES BACTERIENNES	58
4. DENOMBREMENT	58
4.1 BACTERIES	58
4.2 LEVURES	59
5. RÉALISATION DU PLAN EXPERIMENTAL	59
5.1 STÉRILISATION DU MATÉRIEL	59
5.2 PRÉPARATION DES MILIEUX	60
5.3 REMPLISSAGE DES CUVES	60
5.4 CULTURES MÈRES	60
5.5 SUIVI DES CINÉTIQUES DE CROISSANCE	60
6. MODELISATION DES COURBES DE CROISSANCE	60
7. CONSTRUCTION DES ÉQUATIONS POLYNOMIALES	60

8. FERMENTEUR	62
8.1 DESCRIPTION	62
8.2 MESURES ET REGULATIONS DES PARAMETRES PHYSICO-CHIMIQUES	63
8.3 STERILISATION DES FERMENTEURS	63
8.4 POLARISATION DE LA SONDE A OXYGENE	64
8.5 INOCULATION	64
8.6 PRELEVEMENTS	64
9. CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE	64
9.1 CALIBRATION DE LA COLONNE	65
9.2 PASSAGE DES ECHANTILLONS	65
10. MESURE DE LA THERMORESISTANCE	65
10.1 PREPARATION DES MILIEUX	65
10.2 PREPARATION DE LA SUSPENSION	66
10.3 TEST DE THERMORESISTANCE	66
11. MESURE DE LA RESISTANCE AU PH ACIDES	66
12. MESURE DE LA RESISTANCE A L'OXYGENE DISSOUS	66
13. MICRO-BRASSERIE	67
13.1 PREPARATION DES CULTURES MERES	67
13.2 MONTAGE	67
13.3 STERILISATION	68
13.4 FERMENTATION	69
13.5 FILTRATION	69
13.6 SUIVI DES POPULATIONS	70

Partie III : Résultats et discussion

<u>1. INFLUENCE DE FACTEURS PHYSICO-CHIMIQUES SUR LES CINÉTIQUES DE CROISSANCE DE <i>PECTINATUS CEREVISIIPHILUS</i> ET DE <i>MEGASPHAERA CEREVISIAE</i>.</u>	71
1.1 ETUDE PRELIMINAIRE	71
1.2 ELABORATION D'UN PLAN D'EXPERIENCES	76
1.2.1 MESURE DE LA VARIABLE	77
1.3 CHOIX DU MODELE	80
1.4 DETERMINATION DES TAUX DE CROISSANCE PAR L'UTILISATION DE MODELES MATHEMATIQUES	80
1.4.1 PROBLEME POSE PAR LA SOUCHE <i>PECTINATUS CEREVISIIPHILUS</i> DSM 20466	86
1.5 ANALYSE DES RESULTATS POUR LA SOUCHE <i>PECTINATUS</i> SP. DSM 20465	88
1.6 REALISATION D'UN MODELE QUADRATIQUE POUR LE GENRE <i>PECTINATUS</i>	91
1.7 ANALYSE DES RESULTATS DONNES PAR LE MODELE	101
1.8 RESULTATS DU PLAN D'EXPERIENCES POUR LES SOUCHES <i>PECTINATUS CEREVISIIPHILUS</i> ET <i>P. FRISINGENSIS</i>	104
1.9 VALIDATION DU MODELE POUR LES SOUCHES <i>PECTINATUS CEREVISIIPHILUS</i> ET <i>P. FRISINGENSIS</i>	111
1.10 MODELISATION DE LA CROISSANCE DANS LE MILIEU MOUT	121
1.11 MODELISATION DE LA CROISSANCE DANS LE MILIEU MRS POUR LA SOUCHE <i>MEGASPHAERA CEREVISIAE</i>	131
<u>2. ETUDE DU METABOLISME DE <i>PECTINATUS</i> DANS LE MILIEU MRS</u>	140

3. RESISTANCE	149
3.1 THERMORESISTANCE	149
3.1.1 JUSTIFICATION DES METHODES UTILISEES	149
3.1.2 THERMORESISTANCE DE <i>MEGASPHAERA CEREVISIAE</i> DSM 20461 ET DSM 20462	150
3.1.3 THERMORESISTANCE DE <i>PECTINATUS CEREVISIIPHILUS</i> DSM 20466, <i>PECTINATUS</i> SP. DSM 20465 ET <i>PECTINATUS FRISINGENSIS</i> ATCC 33332	159
3.1.4 DISCUSSION SUR L'EFFICACITE DES BAREMES DE PASTEURISATION UTILISES EN BRASSERIE	175
3.2 ETUDE DE LA SURVIE DE <i>PECTINATUS CEREVISIIPHILUS</i> EN MILIEU OXYGENE	178
3.3 RESISTANCE AUX PH ACIDES	183
<u>4. ETUDE DE L'EVOLUTION DES POPULATIONS DE <i>PECTINATUS</i> ET DE <i>MEGASPHAERA</i> LORS DE LA FABRICATION DE LA BIERE EN MICRO-BRASSERIE</u>	<u>185</u>
4.1.1 EVOLUTION DE LA POPULATION LORS D'UNE CONTAMINATION EXPERIMENTALE	185
4.1.2 ASPECT METABOLIQUE ET ORGANOLEPTIQUE DE LA CONTAMINATION	190
4.1.3 EVOLUTION DE LA POPULATION CONTAMINANTE : ESSAI DE MODELISATION	191
<u>5. CONCLUSION GENERALE</u>	<u>198</u>
<u>6. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</u>	<u>201</u>
<u>7. ANNEXES</u>	<u>217</u>

- Liste des illustrations -

- Liste des illustrations (figures) -

Figure 1 : Parts des différents micro-organismes les plus fréquemment rencontrés dans les contaminations des bières et des moûts..... 2

Figure 2 : Voies de biosynthèse du propionate chez *Propionibacterium* et *Pectinatus* (Chelak et al. 1987)..... 12

Figure 3 : Schéma de la fabrication de la bière (Moll 1991)..... 18

Figure 4 : Exemple de cinétique microbienne..... 23

Figure 5 : Exemple de cinétique d'utilisation d'un substrat et de formation d'un produit par rapport à la croissance..... 25

Figure 6 : Allure de la destruction d'une population microbienne en fonction du temps, pour une température létale et constante 36

Figure 7 : Courbes de survie à la même température montrant l'influence du temps de traitement thermique sur le nombre de cellules microbiennes survivantes..... 37

Figure 8 : courbes de survie à différentes températures 38

Figure 9 : Courbe des relations température-temps donnant une réduction de population microbienne..... 40

Figure 10 : Exemples de déviations de courbes de survie 44

Figure 11 : Montage permettant la stérilisation et le séchage des cuves et des bouchons. Etape 1 : les cuves et les bouchons sont trempés dans l'éthanol pendant 24 heures. Etape 2 : l'erlenmeyer est vidé. Etape 3 : les cuves sont séchées à l'air..... 59

Figure 12 : Montage de la micro-brasserie utilisée pour la fermentation des bières..... 68

Figure 13 : Schéma du montage : filtre à kieselguhr et filtre 0,45 μm pour dénombrement 70

Figure 14 : Cinétiques de croissance de *Pectinatus cerevisiophilus* sur milieu MRS modifié à différents pH, sous agitation à 34°C. L'inoculum a été préparé à pH 7 72

Figure 15 : Temps de latence de *Pectinatus cerevisiophilus* sur milieu MRS modifié à différents pH sous agitation à 34°C. L'inoculum a été préparé à pH 7 72

Figure 16 : Taux de croissance (μ_{max}) de *Pectinatus cerevisiophilus* et de *Megasphaera cerevisiae* en fonction du pH du milieu, sous agitation à 34°C 73

- Figure 17 :** Taux de croissance (μ_{max}) de *Pectinatus cerevisiophilus* DSM 20466 et de *Megasphaera cerevisiae* DSM 20461 en fonction de la température, sous agitation à pH 7,1 74
- Figure 18 :** Taux de croissance (μ_{max}) de *Pectinatus* sp. DSM 20465 et de *Megasphaera cerevisiae* DSM 20462 en fonction des concentrations en éthanol dans le milieu, sous agitation à pH 7,1 et à 34°C..... 75
- Figure 19 :** Relation existant entre l'absorbance mesurée et le nombre de bactéries pour *Pectinatus cerevisiophilus* DSM 20466..... 79
- Figure 20 :** Exemple de courbes de croissance de *Pectinatus* sp. à 32°C, pH 6 et pour une concentration en éthanol de 0% v/v ou 5% v/v modélisées par le modèle de Gompertz et le modèle logistique 81
- Figure 21 :** Exemple de courbes de croissance de *Pectinatus* sp. à 35°C, pH 7 et pour une concentration en éthanol de 5% v/v modélisées par le modèle de Gompertz et le modèle logistique..... 85
- Figure 22 :** Exemple de courbes de croissance de *Megasphaera cerevisiae* à 32°C, pH 6 et pour une concentration en éthanol de 0% v/v modélisées par le modèle de Gompertz et le modèle logistique 85
- Figure 23 :** Exemple de courbes de croissance de *Pectinatus cerevisiophilus* à 35°C, pH 6 et pour une concentration en éthanol de 0% v/v, modélisées par le modèle de Gompertz et le modèle logistique 86
- Figure 24 :** Taux de croissance de *Pectinatus* sp. dans MRS à différents pH et températures pour des concentrations en éthanol (v/v) : 0 %, 2,5 % et 5 %..... 88
- Figure 25 :** Populations maximales (échelle / 10^8) de *Pectinatus* sp. dans MRS à différents pH et températures pour des concentrations en éthanol (v/v) : 0 %, 2,5 % et 5 % 89
- Figure 26 :** Rendements cellulaires de *Pectinatus* sp. dans MRS à différents pH et températures pour des concentrations en éthanol (v/v) : 0 %, 2,5 % et 5 %..... 90
- Figure 27 :** Représentations graphiques des taux de croissance maximaux de *Pectinatus* sp. DSM 20465 en fonction du pH et de l'éthanol à 35, 32, 26, 22 et à 15°C obtenues par modélisation (régression polynomiale : équation N° 1)..... 93
- Figure 28 :** Représentations graphiques des taux de croissance maximaux de *Pectinatus* sp. DSM 20465 en fonction du pH et de l'éthanol à 35, 32, 26, 22 et à 15°C obtenues par modélisation (régression polynomiale : équation N° 2)..... 94
- Figure 29 :** Représentations graphiques des taux de croissance maximaux de *Pectinatus* DSM 20465 en fonction du pH et de l'éthanol à 35, 32, 26, 22 et à 15°C obtenues par modélisation (régression polynomiale : équation N° 3)..... 95

Figure 30 : Représentations graphiques des taux de croissance maximaux de *Pectinatus* sp. DSM 20465 en fonction du pH et de l'éthanol à 35, 32, 26, 22 et à 15°C obtenues par modélisation (régression polynomiale : équation N° 4).....96

Figure 31 : Représentations graphiques des populations maximales de micro-organismes (échelle / 10^8) de *Pectinatus* sp. DSM 20465 en fonction du pH initial et de l'éthanol à 35, 32, 26, 22 et à 15°C obtenues par modélisation (régression polynomiale : équation N° 5)97

Figure 32 : Représentations graphiques des rendements métaboliques (échelle / 10^8) de *Pectinatus* DSM 20465 en fonction du pH initial et de l'éthanol à 35, 32, 26, 22 et à 15°C obtenues par modélisation (régression polynomiale : équation N° 6).....98

Figure 33 : Relation entre $\ln(\mu_{max})$ et $1/K$ permettant de calculer l'énergie d'activation pour la souche *Pectinatus* sp. DSM 20465 dans le milieu MRS99

Figure 34 : Coefficient métabolique de *Pectinatus cerevisiophilus* dans le milieu MRS à différents pH et températures pour des concentrations en éthanol (v/v) : 0 %, 2,5 % et 5 %103

Figure 35 : Taux de croissance de *Pectinatus cerevisiophilus* dans le milieu MRS à différents pH et températures pour des concentrations en éthanol (v/v) : 0 %, 2,5 % et 5 %108

Figure 36 : Taux de croissance de *Pectinatus frisingensis* dans le milieu MRS à différents pH et températures pour des concentrations en éthanol (v/v) : 0 %, 2,5 % et 5 %.....108

Figure 37 : Populations maximales (échelle / 10^8) de *Pectinatus cerevisiophilus* dans le milieu MRS à différents pH et températures pour des concentrations en éthanol (v/v) : 0 %, 2,5 % et 5 %.....109

Figure 38 : Populations maximales (échelle / 10^8) de *Pectinatus frisingensis* dans le milieu MRS à différents pH et températures pour des concentrations en éthanol (v/v) : 0 %, 2,5 % et 5 %.....110

Figure 39 : Relation entre $\ln(\mu)$ et $1/K$ permettant de calculer l'énergie d'activation pour la souche *Pectinatus cerevisiophilus* DSM 20466 dans le milieu MRS.....111

Figure 40 : Relation entre $\ln(\mu)$ et $1/K$ permettant de calculer l'énergie d'activation pour la souche *Pectinatus frisingensis* ATCC 33332 dans le milieu MRS.....111

Figure 41 : Représentations graphiques des taux de croissance de *Pectinatus cerevisiophilus* DSM 20466 en fonction du pH initial et de l'éthanol à 35, 32, 26, 22 et à 15°C obtenues par modélisation (régression polynomiale : équation N° 7).....114

Figure 42 : Représentations graphiques des populations maximales de micro-organismes (échelle / 10^8) de *Pectinatus cerevisiophilus* DSM 20466 en fonction du pH initial et de l'éthanol à 35, 32, 26, 22 et à 15°C obtenues par modélisation (régression polynomiale : équation N° 8)113

Figure 43 : Représentations graphiques des taux de croissance de *Pectinatus frisingensis* ATCC 33332 en fonction du pH et de l'éthanol à 35, 32, 26, 22 et à 15°C obtenues par modélisation (régression polynomiale : équation N° 10)..... 117

Figure 44 : Représentations graphiques des Populations maximales de micro-organismes de croissance de *Pectinatus frisingensis* ATCC 33332 en fonction du pH et de l'éthanol à 35, 32, 26, 22 et à 15°C obtenues par modélisation (régression polynomiale : équation N° 11)..... 118

Figure 45 : Représentations graphiques des rendements métaboliques de micro-organismes de croissance de *Pectinatus frisingensis* ATCC 33332 en fonction du pH et de l'éthanol à 35, 32, 26, 22 et à 15°C obtenues par modélisation (régression polynomiale : équation N° 12)..... 119

Figure 46 : Représentations graphiques des taux de croissance de *Pectinatus* DSM 20466 en fonction du pH et de l'éthanol à 35, 32, 26, 22, 15 et à 8°C obtenues par modélisation (régression polynomiale : équation N° 13)..... 126

Figure 47 : Représentations graphiques de la population maximale de *Pectinatus* DSM 20466 en fonction du pH et de l'éthanol à 35, 32, 26, 22, 15 et à 8°C obtenues par modélisation (régression polynomiale : équation N° 14)..... 127

Figure 48 : Représentations graphiques des taux de croissance de *Pectinatus frisingensis* ATCC 33332 en fonction du pH et de l'éthanol à 35, 32, 26, 22, 15 et à 8°C obtenues par modélisation (régression polynomiale : équation N° 15)..... 128

Figure 49 : Représentations graphiques de la population maximale de *Pectinatus frisingensis* ATCC 33332 en fonction du pH et de l'éthanol à 35, 32, 26, 22, 15 et à 8°C obtenues par modélisation (régression polynomiale : équation N° 16)..... 129

Figure 50 : Taux de croissance maximaux de *Megasphaera cerevisiae* dans le milieu MRS à différents pH températures pour des concentrations en éthanol (v/v) : 0 %, 2,5 % et 5 %..... 133

Figure 51 : Populations maximales de *Megasphaera cerevisiae* dans le milieu MRS à différents pH températures pour des concentrations en éthanol (v/v) : 0 %, 2,5 % et 5 %..... 134

Figure 52 : Relation entre $\ln(\mu)$ et $1/K$ permettant de calculer l'énergie d'activation pour la souche *Megasphaera cerevisiae* DSM 20461 dans le milieu MRS..... 135

Figure 53 : Représentations graphiques des taux de croissance de *Megasphaera cerevisiae* DSM 20461 en fonction du pH et de l'éthanol à 35, 32, 22, 18 et à 15°C obtenues par modélisation (régression polynomiale : équation N° 17)..... 137

Figure 54 : Représentations graphiques des populations maximales de micro-organismes (échelle / 10^8) de *Megasphaera* DSM 20461 en fonction du pH et de l'éthanol à 35, 32, 22, 18 et à 15°C obtenues par modélisation (régression polynomiale : équation N° 18) 138

Figure 55 : Cinétique de croissance et de consommation et de formation de produits par <i>sp.</i> DSM 20465 dans le milieu MRS à pH 6. Glucose, citrate, propionate, succinate et acétate	140
Figure 56 : Concentration en propionate après croissance de <i>Pectinatus sp.</i> dans MRS à différents pH et températures pour des concentrations en éthanol (v/v) : 0 %, 2,5 % et 5 %	141
Figure 57 : Concentration en succinate après croissance de <i>Pectinatus sp.</i> dans MRS à différents pH et températures pour des concentrations en éthanol (v/v) : 0 %, 2,5 % et 5 %	142
Figure 58 : Concentration en succinate et en propionate après croissance de <i>Pectinatus sp.</i> dans MRS à différents pH et températures pour des concentrations en éthanol (v/v) : 0 %, 2,5 % et 5 %	143
Figure 59 : Concentration en acétate après croissance de <i>Pectinatus sp.</i> dans MRS à différents pH et températures pour des concentrations en éthanol (v/v) : 0 %, 2,5 % et 5 %	144
Figure 60 : Différences entre la concentration initiale et finale en éthanol après croissance de <i>Pectinatus sp.</i> dans MRS à différents pH et températures pour des concentrations en éthanol (v/v) : 0 %, 2,5 % et 5 %	145
Figure 61 : Cinétiques de croissance de <i>Pectinatus sp.</i> DSM 20465 dans le milieu MRS en présence d'éthanol en concentrations variables : 0 %, 1%, 2%, 3% et 4%	146
Figure 62 : Voies métaboliques hypothétiques de <i>Pectinatus sp.</i>	147
Figure 63 : Courbes de survie de <i>Megasphaera cerevisiae</i> DSM 20461 dans MRS à 45°C, 50°C, 55°C et 60°C	151
Figure 64 : Courbes de survie de <i>Megasphaera cerevisiae</i> DSM 20462 dans MRS à 50°C, 55°C, 60°C et 70°C	151
Figure 65 : Courbes de relation température-temps de <i>Megasphaera cerevisiae</i> DSM 20461 dans MRS	151
Figure 66 : Courbes de relation température-temps de <i>Megasphaera cerevisiae</i> DSM 20462 dans MRS	151
Figure 67 : Courbes de survie de <i>Megasphaera cerevisiae</i> DSM 20461 dans le moût à 45°C, 50°C, 55°C et 60°C	152
Figure 68 : Courbes de survie de <i>Megasphaera cerevisiae</i> DSM 20462 dans le moût à 45°C, 50°C, 55°C et 60°C	152
Figure 69 : Courbes de relation température-temps de <i>Megasphaera cerevisiae</i> DSM 20461 dans le moût	152

Figure 70 : Courbes de relation température-temps de <i>Megasphaera cerevisiae</i> DSM 20462 dans le moût.....	152
Figure 71 : Courbes de survie de <i>Megasphaera cerevisiae</i> DSM 20461 dans la bière à 48°C, 52°C, 56°C et 60°C.....	153
Figure 72 : Courbes de survie de <i>Megasphaera cerevisiae</i> DSM 20462 dans la bière à 48°C, 52°C, 56°C et 60°C.....	153
Figure 73 : Courbes de relation température-temps de <i>Megasphaera cerevisiae</i> DSM 20461 dans la bière.....	153
Figure 74 : Courbes de relation température-temps de <i>Megasphaera cerevisiae</i> DSM 20462 dans la bière.....	153
Figure 75 : Courbes de survie de <i>Megasphaera cerevisiae</i> DSM 20461 à 50°C dans le moût à pH 4, 5, 2, 6 et 6,3.....	156
Figure 76 : Courbes de survie de <i>Megasphaera cerevisiae</i> DSM 20461 à 50°C dans MRS, avec addition de houblon ou d'éthanol 3,3 % v/v.....	156
Figure 77 : Courbes de relation pH-temps de <i>Megasphaera cerevisiae</i> DSM 20461 dans le moût.....	156
Figure 78 : Courbes de survie de <i>Pectinatus cerevisiophilus</i> DSM 20466 dans MRS à 50°C), 56°C, 60°C et 65°C.....	160
Figure 79 : Courbes de survie de <i>Pectinatus</i> sp DSM 20465 dans MRS à 51°C 57°C et 60°C.....	160
Figure 80 : Courbes de relation température-temps de <i>Pectinatus cerevisiophilus</i> DSM 20466 dans MRS.....	160
Figure 81 : Courbes de relation température-temps de <i>Pectinatus</i> sp DSM 20465 dans MRS.....	160
Figure 82 : Courbes de survie de <i>Pectinatus frisingensis</i> ATCC 33332 dans MRS à 50°C, 55°C, 60°C et 65°C.....	161
Figure 83 : Courbes de survie de <i>Pectinatus cerevisiophilus</i> DSM 20466 dans le moût à 46°C, 50°C, 52°C et 54°C.....	161
Figure 84 : Courbes de relation température-temps de <i>Pectinatus frisingensis</i> ATCC 33332 dans MRS.....	161
Figure 85 : Courbes de relation température-temps de <i>Pectinatus cerevisiophilus</i> DSM 20466 dans le moût.....	161
Figure 86 : Courbes de survie de <i>Pectinatus</i> sp DSM 20465 dans le moût à 48°C, 50°C, 53°C,55°C et 60°C.....	162

Figure 87 : Courbes de survie de *Pectinatus frisingensis* ATCC 33332 dans le moût à 50°C, 56°C, 60°C et 65°C..... 162

Figure 88 : Courbes de relation température-temps de *Pectinatus* sp DSM 20465 dans le moût..... 162

Figure 89 : Courbes de relation température-temps de *Pectinatus frisingensis* ATCC 33332 dans le moût..... 162

Figure 90 : Courbes de survie de *Pectinatus cerevisiophilus* DSM 20466 dans la bière à 48°C, 52°C, 56°C et 60°C..... 163

Figure 91 : Courbes de survie de *Pectinatus* sp. DSM 20465 dans la bière à 48°C, 52°C, 56°C et 60°C..... 163

Figure 92 : Courbes de relation température-temps de *Pectinatus cerevisiophilus* DSM 20466 dans la bière pour des temps de traitement de 30 s, 2 min, 8 min et 15 min 163

Figure 93 : Courbes de relation température-temps de *Pectinatus* sp. DSM 20465 dans la bière pour des temps de traitement de 30 s, 4 min et 8 min..... 163

Figure 94: Courbes de survie de *Pectinatus cerevisiophilus* DSM 20466 dans le moût à 50°C et à pH : 4, 5,2, 6 et 6,3..... 167

Figure 95: Courbes de survie de *Pectinatus* sp DSM 20465 dans le moût à 50°C et à pH : 4, 5,2, 6 et 6,3 167

Figure 96: Relation pH-temps de *Pectinatus cerevisiophilus* DSM 20466 dans le moût à 50°C. 167

Figure 97: Relation pH-temps de *Pectinatus* sp DSM 20465 dans le moût à 50°C 167

Figure 98: Courbes de survie de *Pectinatus frisingensis* ATCC 33332 dans le moût à 50°C et à pH : 4, 5,2, 6 et 6,3 168

Figure 99: Relation pH-temps de *Pectinatus frisingensis* ATCC 33332 dans le moût à 50°C. 168

Figure 100 : Courbe de survie d'un micro-organisme. La valeur de D_T correspond à la valeur négative de l'inverse de la pente de la droite reliant le nombre initial de micro-organismes et le nombre de micro-organismes survivants au temps choisi..... 172

Figure 101 : Valeur de D_T en fonction de la température et de la durée du traitement thermique dans la bière pour la souche *Pectinatus cerevisiophilus* DSM 20466 174

Figure 102 : Courbes de destruction de *Pectinatus cerevisiophilus*, *P. sp.* et *P. frisingensis* par l'oxygène à 32°C et un taux d'oxygène dissous de 4,78 mg/l..... 179

Figure 103 : Courbes de destruction de *Pectinatus cerevisiophilus* DSM 20466 par l'oxygène à 32°C en fonction du temps pour différents taux d'oxygène dissous, 5,74 mg/l, 4,78 mg/l, 3,34 mg/l et 0,96 mg/l..... 180

Figure 104 : Relation entre le taux de croissance de *P. cerevisiophilus* DSM 20466 et la concentration en oxygène dissous..... 181

Figure 105 : Courbes de destruction de *Pectinatus cerevisiophilus* DSM 20466 par l'oxygène (saturation par bullage d'air) en fonction du temps pour différentes températures, 32°C, 15°C et 8°C..... 181

Figure 106 : Courbes de survie de *Pectinatus cerevisiophilus* DSM 20466 dans le moût à pH : 2, 2,5, 3, 3,5 et 4 184

Figure 107 : Relation entre le pH et le temps de réduction décimal, de *Pectinatus cerevisiophilus* DSM 20466 dans le moût (25°C)..... 184

Figure 108 : Cinétique de développement de *Pectinatus cerevisiophilus* DSM 20466, lors de la fermentation d'un moût par *Saccharomyces cerevisiae* en microbrasserie..... 187

Figure 109 : Cinétique de développement de *Megasphaera cerevisiae* DSM 20461 (■), lors de la fermentation d'un moût par *Saccharomyces cerevisiae* en microbrasserie 189

Figure 110 : Relation entre le nombre de bactéries et le temps. Ce graphique montre comment est calculé le nombre de bactéries N_2 à la fin d'un intervalle ($t_2 - t_1$)..... 195

Figure 111 : Evolution de la population de *Pectinatus* lors de la fabrication de la bière 196

- Liste des illustrations (tableaux) -

Tableau 1 : Evolution des paramètres de croissance de *Pectinatus cerevisiophilus* DSM 20466 en fonction de la concentration en Na_2S dans le milieu de culture..... 77

Tableau 2 : Valeurs des taux de croissance de *Pectinatus* sp. DSM 20465 calculés à l'aide du modèle de Gompertz et du modèle logistique avec coefficient de corrélation et test F, population maximale de micro-organismes, coefficient métabolique et rendement cellulaire en fonction des variables température, pH et éthanol 82

Tableau 3 : Equations obtenues par régression polynomiale donnant le taux de croissance, la population maximale de micro-organismes ou le rendement cellulaire de *Pectinatus* sp. DSM 20465 dans le milieu MRS en fonction de la température, du pH initial et de la concentration (% v/v) en éthanol 92

Tableau 4 : Valeurs des taux de croissance de *Pectinatus cerevisiophilus* DSM 20466 calculés à l'aide du modèle de Gompertz et du modèle logistique avec coefficient de corrélation et test F et population maximale de micro-organismes en fonction des variables température, pH et éthanol..... 104

Tableau 5 : Valeurs des taux de croissance de *Pectinatus frisingensis* ATCC 33332 calculés à l'aide du modèle de Gompertz et du modèle logistique avec coefficient de corrélation et test F, population maximale de micro-organismes, coefficient métabolique et rendement cellulaire en fonction des variables température, pH et éthanol 106

Tableau 6 : Equations obtenues par régression polynomiale donnant le taux de croissance ou la population maximale de micro-organismes de *Pectinatus cerevisiophilus* DSM 20466 dans le milieu MRS en fonction de la température, du pH initial et de la concentration (% v/v) en éthanol..... 112

Tableau 7 : Equations obtenues par régression polynomiale donnant le taux de croissance, la population maximale de micro-organismes ou le rendement cellulaire de *Pectinatus frisingensis* ATCC 33332 dans le milieu MRS en fonction de la température, du pH initial et de la concentration (% v/v) en éthanol 116

Tableau 8 : Valeurs des taux de croissance de *Pectinatus cerevisiophilus* DSM 20466 dans le moût calculés à l'aide du modèle logistique avec coefficient de corrélation et test F et population maximale de micro-organismes en fonction des variables température, pH et éthanol..... 121

Tableau 9 : Valeurs des taux de croissance de *Pectinatus frisingensis* ATCC 33332 dans le moût calculés à l'aide du modèle logistique avec coefficient de corrélation et test F et population maximale de micro-organismes en fonction des variables température, pH et éthanol..... 123

Tableau 10 : Equations obtenues par régression polynomiale donnant le taux de croissance ou la population maximale de micro-organismes de *Pectinatus cerevisiophilus* DSM 20466 et *P. frisingensis* ATCC 33332 dans le moût en fonction de la température, du pH initial et de la concentration (% v/v) en éthanol..... 125

Tableau 11 : Valeurs des taux de croissance de *Megasphaera cerevisiae* DSM 20461 calculés à l'aide du modèle de Gompertz et du modèle logistique avec coefficient de corrélation et test F, population maximale de micro-organismes en fonction des variables température, pH et éthanol..... 131

Tableau 12 : Equations obtenues par régression polynomiale donnant le taux de croissance maximal ou la population maximale de micro-organismes de *Megasphaera* DSM 20461 dans le milieu MRS en fonction de la température, du pH initial et de la concentration en éthanol 136

Tableau 13 : Valeurs des D_T et des z avec coefficient de corrélation et écart-type dans MRS, le moût et la bière pour la souche *Megasphaera cerevisiae* DSM 20461..... 154

Tableau 14 : Valeurs des D_T et des z avec coefficient de corrélation et écart-type dans MRS, le moût et la bière pour la souche *Megasphaera cerevisiae* DSM 20462..... 154

Tableau 15 : Valeurs des D_{50} avec coefficient de corrélation et écart-type dans le moût à différents pH et dans MRS en présence de Houblon ou d'éthanol pour la souche <i>Megasphaera cerevisiae</i> DSM 20461.....	157
Tableau 16 : Valeurs des D_T et des z avec coefficient de corrélation et écart-type dans MRS, le moût et la bière pour la souche <i>Pectinatus cerevisiophilus</i> DSM 20466.....	164
Tableau 17 : Valeurs des D_T et des z avec coefficient de corrélation et écart-type dans MRS, le moût et la bière pour la souche <i>Pectinatus cerevisiophilus</i> DSM 20465.....	165
Tableau 18 : Valeurs des D_T et des z avec coefficient de corrélation et écart-type dans MRS, le moût et la bière pour la souche <i>Pectinatus frisingensis</i> ATCC 33332.....	165
Tableau 19 : Valeurs des D_{50} avec coefficient de corrélation et écart-type dans le moût à différents pH et dans MRS en présence de Houblon ou d'éthanol pour la souche <i>Pectinatus cerevisiophilus</i> DSM 20466.....	169
Tableau 20 : Valeurs des D_{50} avec coefficient de corrélation et écart-type dans le moût à différents pH et dans MRS en présence de Houblon ou d'éthanol pour la souche <i>Pectinatus cerevisiophilus</i> DSM 20465.....	169
Tableau 21 : Valeurs des D_{50} avec coefficient de corrélation et écart-type dans le moût à différents pH et dans MRS en présence de Houblon ou d'éthanol pour la souche <i>Pectinatus frisingensis</i> ATCC 33332.....	169
Tableau 22 : Valeur des FI et des degrés de stérilité pour la souche la plus thermorésistante des genres <i>Megasphaera</i> et <i>Pectinatus</i>	176
Tableau 23 : Valeurs des temps de destruction décimale (D_{oxy}) des souches <i>Pectinatus cerevisiophilus</i> DSM 20466, <i>P. sp.</i> DSM 20465 et <i>P. frisingensis</i> ATCC 33332 (4,78 mg/l d'oxygène dissous, 32°C, pH 5,2)	179
Tableau 24 : Valeurs des temps de destruction décimale (D_{oxy}) de <i>Pectinatus cerevisiophilus</i> DSM 20466 pour différents taux d'oxygène dissous (32°C, pH 5,2).....	180
Tableau 25 : Valeurs des destructions décimales (D_{oxy}) de <i>P. cerevisiophilus</i> DSM 20466 dans le moût saturé en oxygène (air) à différentes températures.....	182
Tableau 26 : Valeurs de D de <i>Pectinatus cerevisiophilus</i> DSM 20466 dans le moût pour différents pH (25°C).....	184
Tableau 27 : Nombre de bactéries présentes à chaque étape de la fabrication de la bière en fonction du taux d'inoculation. Calcul à l'aide du modèle. Etape 1 et 2 : fermentation, étape 3 : traversage, étape 4 : fermentation secondaire, étape 5 : pasteurisation, étape 6 : stockage.....	197

- Liste des illustrations (annexes) -

<i>Annexe 1 : Tableau de correspondance entre la température et les Unités de Pasteurisation</i>	216
<i>Annexe 2 : Biophotomètre, HPLC et fermenteurs</i>	217
<i>Annexe 3 : Fermenteur SGI 2,5 l</i>	219
<i>Annexe 4 : Système de prélèvements automatiques</i>	220
<i>Annexe 5 : Agglutination de Pectinatus</i>	221

INTRODUCTION

En arrivant au Laboratoire de Microbiologie Fondamentale et Appliquée j'ai eu la tâche de développer un nouveau thème de recherche sous l'encadrement du Professeur J. P. HORNEZ et du Docteur H. C. DUBOURGUIER. Le nombre toujours croissant des contaminations de bières par des bactéries nouvellement découvertes, *Pectinatus* et *Megasphaera* justifiait qu'on s'y intéresse.

Cette thèse vient concrétiser ces quatre années de travail. Elle traite de la croissance et de la résistance de *Pectinatus* et *Megasphaera*. Ce manuscrit est constitué de trois parties principales, généralités, matériels et méthodes, résultats et discussion. Dans les généralités, les caractéristiques des différents micro-organismes contaminants des bières sont brièvement présentées. Les deux bactéries qui font l'objet de cette étude y sont décrites en détail. Nous avons pris soin d'y référencer toutes les publications connues s'y rapportant. Pour faciliter la compréhension de la partie résultats et discussion, nous avons présenté les techniques utilisées en brasserie pour la fabrication de la bière et nous avons rassemblé les données théoriques sur la croissance bactérienne, sur la modélisation mathématique de celle-ci et sur la thermorésistance des micro-organismes.

La partie résultats et discussion est composée de trois chapitres. Le premier traite de la croissance de *Pectinatus* et de *Megasphaera*, le second de leur thermorésistance et le troisième, plus appliqué, conclut sur les conséquences d'une contamination par ces bactéries.

Mon souhait le plus cher est que ce travail puisse être utile à tous ceux qui s'intéressent à ces deux bactéries.

- Généralités -

1. Place de *Pectinatus* et de *Megasphaera* dans la contamination des bières

1.1 Généralités sur la contamination des bières

Avant les découvertes de Pasteur dans les années 1871-1876 et les travaux de Hansen sur la culture pure, la brasserie était en proie à de fréquents accidents de fabrication dus à l'ignorance du brasseur, au matériel et à une hygiène industrielle plus qu'élémentaire. Pasteur a participé au renforcement de la notion d'asepsie et d'antisepsie dans l'industrie de la brasserie. En 1906 Auguste Riff introduisait la première culture pure de levure dans le nord de la France. Toute brasserie même de nos jours, n'est pas à l'abri d'ennuis microbiologiques si elle n'assure pas une hygiène industrielle stricte, contrôlée par un service qualité efficace.

La conservation de la qualité organoleptique de la bière est liée à la stabilité physico-chimique et biologique. La présence de micro-organismes susceptibles de se développer dans les moûts de fermentation ou dans le produit fini a pour conséquence l'altération du produit. Le développement bactérien, se traduit par l'apparition d'un trouble caractérisé par un dépôt ou un voile en surface, accompagné d'une synthèse de métabolites secondaires affectant la saveur de la bière (Soberka *et al.* 1988). Les saveurs sont dues aux sulfures, aux diacétals et aux acides gras synthétisés pendant la croissance microbienne. Les troubles sont généralement causés par les bactéries lactiques inoculées involontairement lors du remplissage des cuves à fermentation.

Les procédés de fabrication en brasserie et le conditionnement des bières, génèrent des conditions de croissance et un environnement particulier pour la flore microbienne susceptible de s'y développer. En début de fermentation le moût est un milieu propice à la croissance de nombreuses bactéries en raison de sa richesse en oxygène, en acides aminés, en facteurs de croissance et en hydrates de carbone comme l'amidon, le maltose, le glucose et le maltotriose. En revanche, au cours de la fermentation, la baisse du pH, les températures relativement basses, une élévation de la teneur en dioxyde de carbone et en alcool ainsi qu'une disparition de l'oxygène dissous et des sucres fermentescibles, limitent les risques de proliférations bactériennes. L'ensemencement par une grande quantité de levures ainsi que la présence de substances bactéricides (humulones) dans le moût contribuent également à limiter le développement de contaminants. Il en résulte que le nombre de micro-organismes pouvant se développer dans la bière est relativement restreint (Haikara *et al.* 1977).

Qu'il s'agisse de levures ou de bactéries, les contaminants de la bière font partie de la flore non pathogène pour l'homme. Cela s'explique par le fait que les bactéries pathogènes ne se développent plus à des pH inférieurs à 4,5, ce qui correspond au pH de la bière. Quant aux moisissures, leur croissance nécessite une grande quantité d'oxygène qu'elles ne peuvent trouver dans la bière. Les micro-organismes présents à l'origine dans le malt ou l'eau de trempage, s'adaptent graduellement aux conditions prévalant durant les procédures de fermentation lors du brassage des bières. La plus grande partie des micro-organismes reste pourtant incapable de survivre dans les conditions particulières rencontrées lors du brassage.

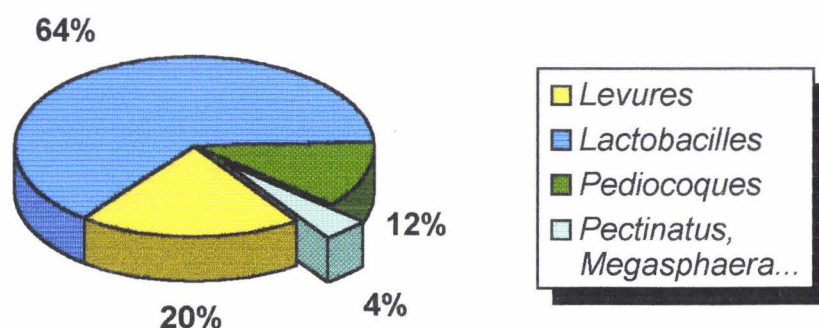


Figure 1 : Parts des différents micro-organismes les plus fréquemment rencontrés dans les contaminations des bières et des moûts.

Les levures représentent 20% des contaminations. Elles appartiennent aux genres *Saccharomyces* et *Brettanomyces*. Les bactéries contaminantes de la bière sont toutes des bactéries à Gram négatif. La flore bactérienne est représentée principalement par les bactéries lactiques du genre *Lactobacillus* (80%) et *Pediococcus*, (15%), soit respectivement 64 % et 12 % du total des contaminations. D'autres bactéries comme *Pectinatus*, les bactéries acétiques du genre *Acetobacter* et *Gluconobacter*, ainsi que des entérobactéries représentent 5% des contaminations bactériennes et 4% du total (Soberka *et al.* 1988). Il est difficile d'établir l'importance des contaminations dues à *Pectinatus* et *Megasphaera*, mais il semble que ces bactéries soient de plus en plus souvent mises en cause dans les accidents de brassage.

Bien que les levures sauvages représentent un nombre non négligeable de cas de contaminations, dans les paragraphes suivants, nous nous limiterons à la description des bactéries contaminantes de la bière.

1.2 Contamination par les bactéries

1.2.1 Bactéries lactiques à Gram négatif, anaérobies facultatives

1.2.1.1 *Lactobacillus*

Les contaminants les plus fréquemment rencontrés dans la bière sont les bactéries lactiques. Elles apparaissent dans l'inoculum de levures et dans les étapes après filtration. Elles font parties de l'environnement des installations de la brasserie car elles sont apportées avec l'orge et le malt. De plus, lors du procédé de maltage, il a été observé que *Lactobacillus* se développait d'un facteur mille (Haikara 1984). Au cours du concassage, du brassage et de l'ébullition les lactobacilles sont dans le meilleur des cas détruits mais ils contaminent de nouveau par le biais de la poussière de malt et l'air¹. Les bactéries lactiques ont une forte tendance à cosédimenter avec les levures. Elles sont donc transférées avec l'inoculum servant pour la fermentation suivante (Kitahara 1974). Le pouvoir contaminant des lactobacilles est attribué à leur température optimale de croissance basse, leur tolérance aux effets bactériostatiques de certaines substances du houblon, leur résistance importante à la teneur en alcool et enfin leur capacité à utiliser les pentoses et les dextrines (Wackerbauer et Emeis 1968; Eschenbecher 1969; Wackerbauer et Emeis 1969; Eschenbecher et Ellenrieder 1975; Weiss *et al.* 1979). Les Lactobacilles acidifient la bière causant des troubles "soyeux" et produisent des mauvais goûts dus au diacétyle et l'acétoïne. les Lactobacilles homofermentaires (tout comme les *Pediococci* homofermentaires) sont des contaminants particulièrement craints dans les brasseries. Les Lactobacilles les plus communs dans la bière sont *L. brevis* (87%) et *L. plantarum* (13%) (Wackerbauer et Emeis 1969; Weiss *et al.* 1979).

1.2.1.2 *Pediococcus*

Les Pédiocoques sont des bactéries lactiques homofermentaires, microaérophiles ou anaérobies. Ce sont des cocci le plus souvent sous la forme de tétrades. Leur température optimale de croissance est de 21-25°C mais ces micro-organismes se développent aussi à 9-12°C (Keevil *et al.* 1979). Le contaminant de la bière le plus rencontré dans ce genre est *P. damnosus* (Strandskov *et al.* 1953; Solberg et Clausen 1973; Back 1978). Mais une nouvelle espèce, *P. inopinatus*, est considérée comme responsable de certaines altérations de la bière (Back 1978). Certains Pédiocoques s'entourent d'une capsule mucilagineuse rendant la

¹ pour de plus amples informations sur les techniques de brassage se reporter au paragraphe 4 page 17

bière visqueuse. Les Pédicoques semblent être des contaminants encore plus exigeants du point de vue nutritionnel dans la bière que les Lactobacilles. En pratique, les Pédicoques se multiplient plus facilement dans le sédiment de levure au fond des tanks ou dans les cuves de stockage (Van Vuuren *et al.* 1978). Ceci est probablement dû au fait que les levures excrètent des éléments nutritifs. Les Pédicoques altèrent la flaveur de la bière en produisant du diacétyl et de l'acétoïne (Niefind et Späth 1971; Lawrence et Priest 1981). Ils peuvent également rendre la bière visqueuse par la sécrétion de capsules de polysaccharides créés à partir de sucres fermentescibles. Les Pédicoques sont relativement peu nombreux dans les bières embouteillées. Mais à peine 10000-20000 *Pediococci* par ml fermentant une bière peuvent produire une concentration détectable en diacétyl (Moore et Rainbow 1955; Keevil *et al.* 1979). *Pediococcus pentosaceus* peut tolérer les iso-acides et le pH bas, pouvant ainsi survivre dans la bière pendant de longues périodes (Middlekauff et Sondag 1972; Skerman *et al.* 1980).

1.2.2 Autres bactéries à Gram négatif, anaérobies facultatives et strictes

1.2.2.1 Entérobactéries

Les bactéries à Gram négatif présentes dans le moût proviennent de l'air, de la poussière de malt ou de l'eau. Ce sont pour la plupart des Entérobactéries (75% environ).

En raison de leur haute tolérance au houblon, elles se multiplient rapidement si le moût n'est pas rapidementensemencé. Les plus importantes concentrations se situent aux premier et deuxième jour de la fermentation primaire (Prucha et Scheible 1970). Par la suite les conditions du milieu deviennent désavantageuses du fait du pH inférieur à 4,4 et de la concentration en éthanol supérieure à 2% v/v (Prucha et Scheible 1970; Dachs 1978).

Néanmoins, certaines espèces survivent à la fermentation et s'accumulent dans le sédiment de levures. Elles sont donc transférées avec la fermentation suivante (Prucha et Scheible 1970; Dadds *et al.* 1971; Thomas *et al.* 1972; Van Huuren *et al.* 1980). De plus selon d'autres études les bactéries à Gram négatif seraient capables de croître dans les conduites utilisées dans le transfert des levures et dans les cuves de stockage (Ingledeew 1979).

Les espèces appartenant aux genres *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Obesumbacterium*, *Klebsiella*, *Proteus* et *Serratia* ont été isolées dans le moût (Prucha et Scheible 1970; Eto et Nakagawa 1975; Van Huuren *et al.* 1980). Les espèces les plus rencontrées et les plus nuisibles sont *E. cloacae*, *C. freundii*, *E. agglomerans* (*ex. Erwinia herbicola*) et *O. proteus* (*ex. Flavobacterium proteus*, *Hafnia protea*) (Prucha et Scheible 1970; Eto et Nakagawa 1975; Dachs 1978; Kidney et White 1979; Van Huuren *et al.* 1980).

Les Entérobactéries libèrent de nombreux produits métaboliques qui altèrent le goût de la bière. Des composés soufrés volatils, en particulier le diméthyl-sulfite, donne à la bière un goût de céleri, de choux cuit ou une odeur de légumes (Russel *et al.* 1954; Ault 1965; Anderson *et al.* 1971; Van Engel 1971; Kidney et White 1979). Des mauvais goûts phénolés, fruités ou médicinaux sont causés par l'augmentation des teneurs en acétaldehyde, en n-propanol, en iso-butanol, en iso-pentanol et en iso-amylalcool (Russel *et al.* 1954; Wood et Rainbow 1961; Prucha et Scheible 1970; Rainbow 1971; Niefind et Späth 1975; Dachs 1978). Certaines espèces retardent la fermentation et modifient le pH final de la bière (Prucha et Scheible 1970; Cowbourne *et al.* 1972; Thomas *et al.* 1972; Dachs 1978).

Quoi qu'il en soit, de très hauts niveaux de contamination sont nécessaires pour la formation de ces altérations (1-10% par rapport aux levures) (Ault 1965; Wackerbauer et Emeis 1968; Niefind et Späth 1975; Ploss *et al.* 1979; Lawrence et Priest 1981).

En pratique, les populations de *E. agglomerans* et *O. proteus* dans la bière fermentée peuvent atteindre de hauts niveaux du fait de leur survie et de leur accumulation dans l'inoculum recyclé. L'environnement des brasseries est le milieu naturel de ces espèces car elles se retrouvent abondamment dans l'orge et le malt.

1.2.2.2 Bactéries acétiques

Elles appartiennent aux genres *Acetobacter* et *Gluconobacter* (*ex. Acetomonas*). En raison de leurs exigences simples en éléments nutritifs et leur tolérance à l'acidité et au houblon, le seul facteur limitant leur croissance est le manque en oxygène. Cependant, certaines espèces sont capables de croître avec un taux minimal en O₂ (Ault 1965; Priest *et al.* 1974).

Un certain nombre d'espèces du genre *Acetobacter* oxydent l'alcool en eau et en dioxyde de carbone. *Gluconobacter* a pour produit métabolique final l'acide acétique. En plus de l'acétification du milieu, ces contaminants peuvent rendre la bière visqueuse par la synthèse de capsules de dextran gélatineuses (Reimann et Scheible 1969; Ault et Newton 1971; Seidel *et al.* 1979). La formation de films et de troubles causés par les bactéries acétiques sont des altérations fréquentes des bières en tonneaux.

1.2.2.3 Zymomonas

Z. mobilis est le plus nuisible et le plus craint des contaminants de bières anglaises (Eschenbecher 1968). Anaérobie stricte, il croît à des pH compris entre 3,5 et 7,5, et tolère l'éthanol à plus de 6%.

Zymomonas nécessite le glucose, le fructose ou le saccharose comme source d'hydrate de carbone. Il fermente ces sucres en alcool et en CO₂. *Z. mobilis* croît très rapidement dans la bière, causant des troubles prononcés en peu de jours et des mauvais goûts tels que l'acétaldéhyde et le sulfure d'hydrogène (Dadds et Martin 1973; Anderson et Howard 1974; Rainbow 1981).

1.3 Apparition de nouveaux contaminants anaérobies : *Pectinatus* et *Megasphaera*

Ces vingt dernières années, deux bactéries anaérobies strictes ont fait leur apparition dans l'industrie brassicole. Deux bactéries anaérobies strictes furent isolées des bières et identifiées. *Pectinatus cerevisiiphilus* a été isolée aux Etats-Unis par Lee *et al.* en 1978, et *Megasphaera cerevisiae* a été isolée en Allemagne d'une bière trouble par Weiss *et al.* en 1979. Ces deux bactéries font l'objet de notre étude.

L'observation simultanée dans différents pays de bières contaminées par *Pectinatus cerevisiiphilus* et de *Megasphaera cerevisiae* peut être expliquée par les techniques de brassage favorisant le développement de ses contaminants (Chelack et Ingledew 1987; Seidel *et al.* 1979). Un grand nombre de facteurs ont une influence directe ou indirecte sur la dissolution de l'oxygène dans la bière. Il a été établi que le caractère oxydant de l'oxygène nuit à la stabilité biochimique des bières (Gunst et Verzele 1978, Kattein *et al.* 1988). Ces dernières années de nouvelles techniques ont permis de diminuer le taux d'oxygène dissous dans les bières (entre 0,4 et 0,8 mg/l d'oxygène dissous).

Les brasseurs limitent la dissolution de l'oxygène en modifiant les protocoles de filtration, de soutirage, de remplissage et de vidange des tanks. Mais les résultats les plus marquants ont été obtenus en utilisant le dioxyde de carbone sous pression et en diminuant l'espace libre laissé dans le col des bouteilles lors du conditionnement (Soberka et Warzecha 1986).

Dans les processus de brassage actuels le brasseur fait intervenir différents réducteurs qui peuvent être naturels ou artificiels. Dans les deux cas ils favorisent le développement de bactéries anaérobies comme *Pectinatus* et *Megasphaera*. Les réducteurs naturels se trouvent dans les matières premières et se forment en grande partie lors de la fabrication de la bière. Par contre les réducteurs artificiels sont introduits et proviennent de l'industrie chimique.

Enfin de nouvelles techniques comme la fermentation accélérée et la fabrication de bières à faible taux d'alcool semblent également contribuer au développement de ces nouveaux contaminants. Leur capacité à utiliser des sources de carbone de remplacement telles que le

lactate rend ces contaminants particulièrement dangereux dans le cas d'une infection mixte de la bière. Les bières totalement fermentées, faiblement alcoolisées², à priori moins prédisposées aux infections du fait de leur contenu réduit en sucres fermentescibles, sont en réalité des milieux propices au développement de ces bactéries.

2. Caractéristiques de *Pectinatus*

2.1 Origines et taxinomie

Ce micro-organisme fut isolé aux Etats-Unis en 1978 par Lee *et al.* à partir d'une huile de lubrification mélangée à de la bière et de l'eau.

Des études morphologiques et biochimiques ont permis de caractériser cette nouvelle bactérie (Lee *et al.* 1978; Lee *et al.* 1980). La localisation des flagelles, les produits du métabolisme et le % GC de cette bactérie ont été comparés aux caractéristiques des différents genres appartenant à la famille des Bacteroidaceae. La plupart de ces genres possèdent des caractéristiques différentes à celles de *Pectinatus* (Lee *et al.* 1978; Lee 1984). Dans la famille des Bacteroidaceae, seuls les genres *Bacteroides* et *Selenomonas* synthétisent de l'acide propionique (Holdeman 1974). De part la présence de flagelles, le genre *Selenomonas* ressemble au genre *Pectinatus*. Cependant, chez *Selenomonas* les flagelles sont regroupés au centre de la face concave de la cellule alors que chez *Pectinatus* ils sont répartis le long du grand axe de la cellule. Le nom de *Pectinatus cerevisiiphilus* lui a été attribué (Lee *et al.* 1978; Skerman *et al.* 1980). Cette souche a été déposée à l'American Type Culture Collection sous la référence 29359 (Lee *et al.* 1978) et à la DSM sous la référence 20467

En Allemagne en 1979, Seidel *et al.* isolent deux nouvelles souches qui seront déposées à la DSM sous les références 20465 et 20466. Au cours de ces quinze dernières années les cas de contaminations par *Pectinatus* se sont généralisées à l'ensemble de l'Europe. Après Haukeli (1980) en Suède et Kirchner *et al.* (1980) en Norvège, c'est au tour d'Haikara *et al.* (1981a) en Finlande, d'isoler une autre souche. Elle sera déposée à l'ATCC et référencée sous la référence ATCC 33332. Grâce à une étude des caractères morphologiques, physiologiques, biochimiques et immunologiques Haikara *et al.* (1981b) montrent que la souche DSM 33332 diffère des autres souches DSM 20467, 20466 et 20465, et propose alors pour cette nouvelle souche le nom de *Pectinatus frisingensis*. En 1989 après avoir été trouvé en Pologne dans le circuit

² cas des bières peu caloriques, des bières de régime

véhiculant le CO₂ et dans une eau de trempage, cette bactérie fait son apparition en France (Soberka *et al.* 1989). Dès 1983 les problèmes de contaminations par *Pectinatus* semblent n'épargner aucun pays, un cas de contamination ayant été signalé au Japon (Takahashi 1983). *Pectinatus* a été trouvé de façon sporadique dans l'huile de lubrification mélangée de la bière, dans des canalisations d'eau, dans l'air et sur les planchers des salles d'embouteillage, dans l'eau condensée au plafond, dans les lubrifiants et dans l'eau de trempage (Haukeli 1980; Lee *et al.* 1980; Haikara 1982; Dürr 1983; Soberka et Warzecha 1986; Back *et al.* 1988). En Finlande, à l'exception de quelques cas d'isolement à partir de levures (Haikara 1989), cette bactérie a été généralement trouvée dans des bouteilles non remplies, après lavage ainsi que dans l'eau de rinçage et dans les conduits de CO₂. L'eau semble donc être la source de contamination la plus fréquente. Par ailleurs, la détection de *Pectinatus* dans l'air, malgré son caractère anaérobie, montre qu'il y a risque de contamination lors de la mise en bouteille (Dürr 1983).

2.2 Morphologie

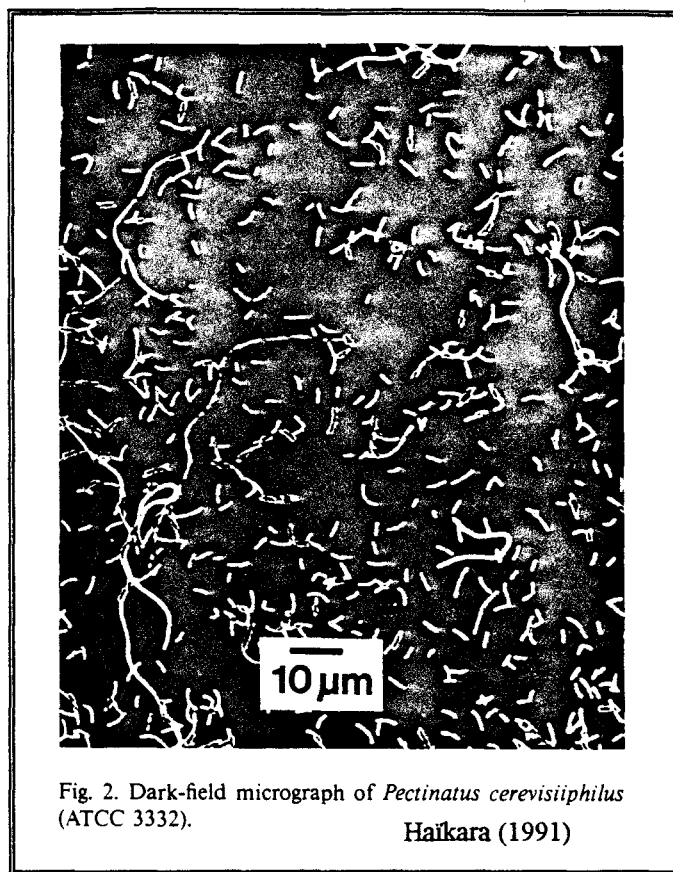
Pectinatus est une bactérie anaérobie stricte à Gram négatif (Lee *et al.* 1978).

L'étude microscopique montre que la morphologie et la structure cellulaire sont identiques pour les différentes souches rencontrées : *Pectinatus cerevisiophilus*, *P. frisingensis*, *P. sp.* (Haikara *et al.* 1981a). Cette bactérie est cylindrique, en forme de S, légèrement incurvée.

On la trouve généralement seule, quelque fois par deux et plus rarement en petite chaîne. Dans la littérature, les tailles mentionnées pour ce micro-organisme diffèrent selon les auteurs (Chelack et Ingledew 1987). Elles varient entre les valeurs suivantes:

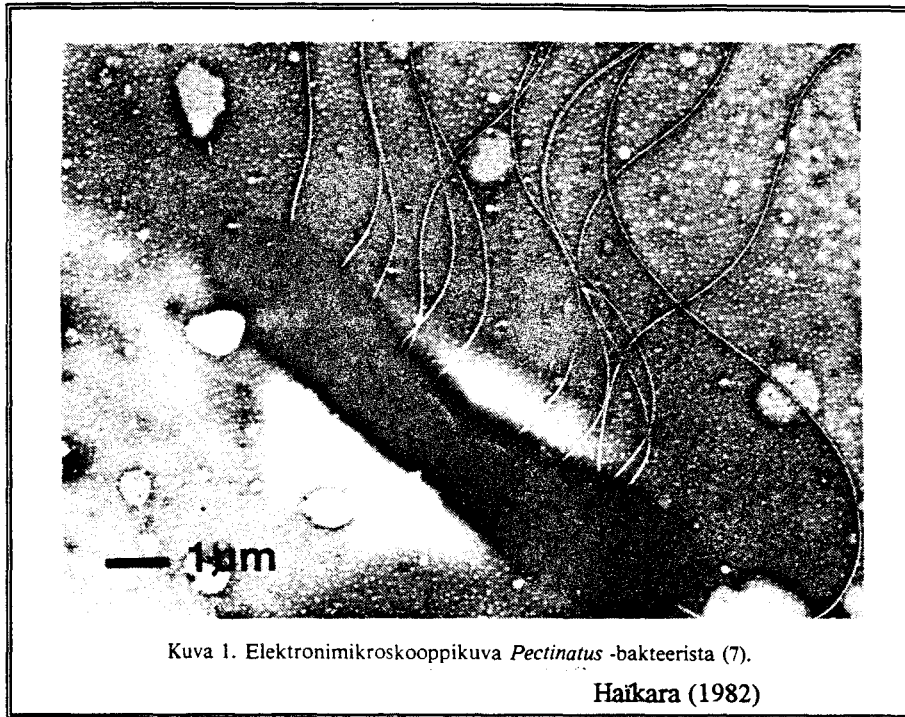
- 0,4 à 0,5 µm de diamètre et 2 à 3 µm de longueur (Haikara *et al.* 1981a; 1981b).
- 0,7 à 0,8 µm de diamètre et 2 à 32 µm de longueur (Lee *et al.* 1978; 1980).

Les différences obtenues peuvent être dues aux différentes préparations cytologiques utilisées, mais aussi à l'âge des bactéries et au milieu de culture. Les cellules sont courtes en début de croissance et s'allongent pendant la phase stationnaire. Il est même possible d'observer des sphéroplesmes en phase de déclin. (Lee *et al.* 1978) Il n'a pas été trouvé de formes sporulées de la bactérie (Haikara *et al.* 1981a).



Pectinatus est une bactérie mobile animée de mouvements serpentaires vibratoires (Lee *et al.* 1980). Ce sont des mouvements hélicoïdaux en forme de x. *Pectinatus* est très mobile en phase de croissance mais cette mobilité décroît dès le début de la phase stationnaire pour devenir imperceptible en phase de déclin lorsque la bactérie s'allonge. Le déplacement du micro-organisme est assuré par des flagelles qui ont été mis en évidence par microscopie électronique. Ils sont présents sur la paroi en nombre variable. Lee *et al.* (1978) en mentionnent 10 ou 23 par cellule tandis que Haikara *et al.* (1981b) n'en signalent que 6.

Pectinatus est péritriche unilatéralement puisque les flagelles sont tous orientés dans le même sens (Lee *et al.* 1978). Contrairement à *Seletonas*, les flagelles ne se trouvent pas uniquement localisés au centre de la partie concave, mais répartis sur l'ensemble du côté concave de la cellule. Différents auteurs ont mis en évidence la présence chez certaines cellules d'un flagelle polaire unique.



En utilisant la microscopie électronique (cryofracture), Haikara *et al.* (1981a) ont mis en évidence une ultrastructure unique. On observe des différences entre les souches (Hakalehto *et al.* 1984). *Pectinatus* possède une membrane externe dont la structure est spécifique aux bactéries à Gram négatif (Seidel 1989,1990). La structure des LPS a été étudiée par Helander *et al.* (1983, 1984 et 1992a) Paradoxalement l'invagination du mérostome et la nature des peptidoglycannes se rapprochent plutôt de la forme à Gram positif. L'espace périplasmique entre la membrane externe et la membrane cytoplasmique est rempli d'un long peptidoglycane de 30 nm. On trouve sur les parties convexes et externes des membranes cytoplasmiques, des particules qui sont composées de protéines ou d'IMPs non connus (Haikara *et al.* 1981a). Il a été conclu qu'il s'agissait d'un stade intermédiaire entre la forme à Gram négatif et la forme à Gram positif.

2.3 Propriétés biologiques et physiologiques

Le métabolisme de *Pectinatus* est mal connu, peu d'études ont été réalisées sur ce sujet. Différents auteurs se sont intéressés aux sources de carbone utilisées par cette bactérie (Haikara *et al.* 1981b; 1981b; Seidel *et al.* 1983; Haikara 1985b). On remarque que *Pectinatus* catabolise un grand nombre de sucres, les utilisant comme source de carbone. De plus Back *et al.* (1979) ainsi que Schisler *et al.* (1979) ont montré que *Pectinatus* était capable d'utiliser l'acide pyruvique et l'acide lactique. Il existe quelques différences entre les souches permettant de les distinguer. Toutefois les sources de carbone utilisées par *P. frisingensis* sont

sensiblement les mêmes que celles utilisées par les souches *P. cerevisiiphilus*.

L'utilisation de l'urée par une bactérie exige la présence de l'uréase. Il a été déterminé que DSM 20467 était uréase positive et que DSM 20465 uréase négative (Haïkara *et al.* 1981a).

Pectinatus est également gélatinase négative et arginine négative (Haïkara *et al.* 1981b).

Cette bactérie est catalase négative (Haïkara *et al.* 1981b) et cytochrome oxydase négative (Soberka *et al.* 1989), ce qui explique qu'elle soit anaérobie stricte.

Il n'y a pas de réduction des nitrates et de production d'indole (Lee *et al.* 1978).

Les principaux composants provenant du métabolisme de *Pectinatus* sont : les acides, acétique, propionique, lactique et succinique, ainsi que le dioxyde de carbone et l'acétoïne. Il est possible d'identifier une contamination par *Pectinatus* en déterminant les acides organiques présents³, par chromatographie (Schisler *et al.* 1979; Haïkara *et al.* 1981b; Haïkara 1985). La synthèse de ces métabolites dépend de la souche et de la source de carbone. Le propionate est le produit majeur de fermentation. Il peut représenter près de 80 % des acides organiques formés. Il existe deux voies possibles de synthèse. La voie du succinate est présente chez *Propionibacterium* spp. mais aussi chez des bactéries anaérobies strictes à Gram négatif comme *Selenomonas ruminantium*, *Anaerovibrio lipolytica*, *Veillonella alcalescens*, *Propionispira arboris* et *Bacteroides fragilis* (Swick et Wood 1960; Allen *et al.* 1964; Galivan et Allen 1968; Hettinger et Reinhold 1972; De Vries *et al.* 1977; Thompson et al 1984). La seconde voie de synthèse est celle de l'acrylate. On la retrouve chez des bactéries anaérobies strictes comme *Megasphaera elsdenii*, *Bacteroides ruminicola* et *Clostridium propionicum* (Leaver *et al.* 1955; Wallnöfer et Baldwin 1967; Brockmann et Wood 1975). Les travaux de Chelack et Ingledew (1987) ont montré que *Pectinatus* utilise la voie du succinate (Figure 2). Le suivi de cinétique de consommation de ¹³C-glucose et ¹³C -pyruvate par RMN ont permis de confirmer ces résultats (Tholozan *et al.* 1994). L'enzyme clef est la succinate réductase qui est inhibée compétitivement par le malate (Chelack et Ingledew 1987). L'acétate représente quant à lui 20 à 25 % des produits finaux.

Pectinatus produit aussi des composés soufrés (du methyl-mercaptan et du sulfure d'hydrogène) qui sont, avec les acides gras, responsables de l'odeur dégagée par les milieux contaminés par cette bactérie.

³ principalement l'acide propionique

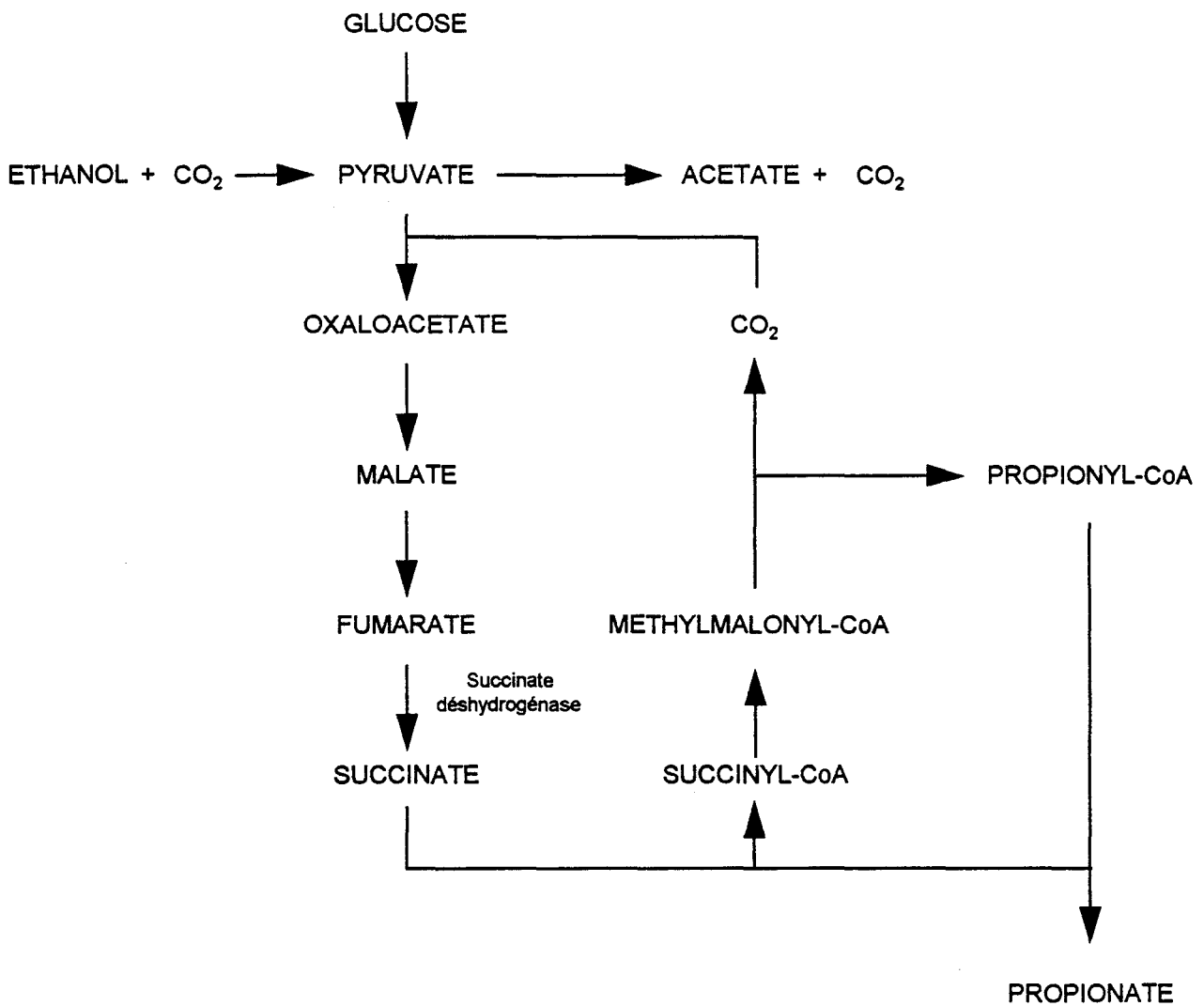


Figure 2 : Voies de biosynthèse du propionate chez *Propionibacterium* et *Pectinatus* (Chelak et al. 1987)



2.4 Conditions de croissance

Pectinatus se développe dans des conditions anaérobies. On retrouve cette bactérie dans les bières qui, lorsqu'elles sont mises en bouteille sont des milieux riches en CO₂ et très pauvres en O₂ grâce à la fermentation alcoolique des levures.

On peut cultiver *Pectinatus* dans un milieu riche (milieu de Man, Rogosa et Sharpe) dépourvu d'oxygène sous atmosphère N₂/CO₂ en présence d'un réducteur. Des milieux sélectifs ont été mis au point (Lee *et al* 1981).

La croissance est possible jusqu'à une concentration en oxygène dissous de 1,9 mg/l dans le milieu MRS et jusque 3 mg/l dans le moût, l'inhibition commençant à partir de 1,5 mg/l (Soberka *et al.* 1989).

L'apparition d'un trouble dans les bières est perceptible après plusieurs mois. Dans des conditions beaucoup plus favorables (température et bière enrichie) le trouble apparaît en une semaine.

Dans un milieu riche comme MRS, le trouble est visible après une dizaine d'heures. Sur milieu solide (MRS) les colonies se développent en 4 jours sous une atmosphère N₂/CO₂. Sous une atmosphère CO₂ pur, des petites colonies apparaissent tardivement (Soberka *et al.* 1989).

Pectinatus se développe entre 15° et 40° dans MRS et dans le moût avec un optimum à 30°C (Haikara *et al.* 1981a; Soberka *et al.* 1989). Les cellules ne peuvent résister plus d'une minute à 58°-60° (Lee *et al.* 1980). La croissance est possible jusqu'au pH 4,5 pour Haikara *et al.* (1981a; 1981b). Elle est inhibée au pH de 3,8 et freinée à partir du pH 4 pour Soberka *et al.* (1989).

La croissance est possible jusqu'à une concentration de 4,5 % (P/V) pour Haikara *et al.* (1981b) et Seidel *et al.* (1983) et jusque 6% pour Soberka *et al.* (1989), l'inhibition commençant à 5%.

Les iodophores et le chlore tuent les cellules (Haukeli 1980; Lee *et al.* 1980).

Ces conditions de croissance expliquent pourquoi *Pectinatus* se développe dans les bières.

2.5 Propriétés antigéniques

La paroi de *Pectinatus* possède des propriétés antigéniques (Haikara 1983; Hakalehto *et al.* 1984; Heleter *et al.* 1984; Gares *et al.* 1993). Plusieurs injections de ces bactéries chez un lapin provoquent sa mort après 3 à 5 mois. Haikara *et al.* (1981a) mentionnent la présence d'antigènes spécifiques à la souche *P. frisingensis* que l'on ne retrouve pas sur les parois des

autres souches. Il est donc possible de différencier *P. frisingensis* des autres souches. Une étude plus récente a confirmé que les souches *P. cerevisiophilus*, *P. frisingensis* et *P. sp.* faisaient partie de trois groupes distincts (Schleifer *et al.* 1990). Les LPS de chacune de ces souches ont des structures différentes (Helander *et al.* 1992).

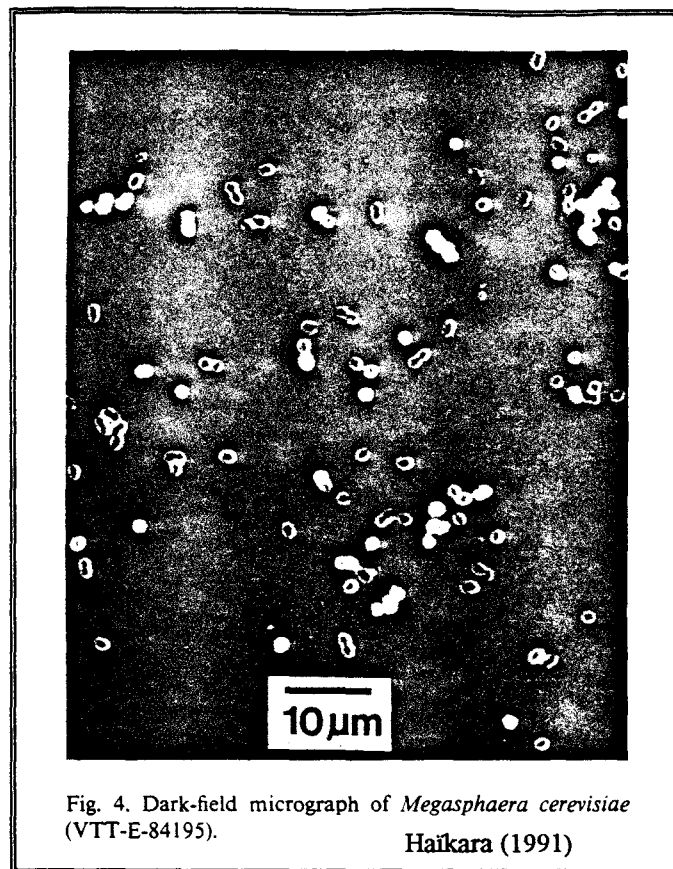
3. Caractéristiques de *Megasphaera*

3.1 Origines et taxinomie

Megasphaera cerevisiae a été isolée en Allemagne d'une bière trouble par Weiss *et al.* en 1979. Elle appartient à la famille des Veillonellaceae (Rogosa 1971), elle diffère de *Megasphaera elsdenii* isolée du rumen de mouton et d'autres animaux ruminants par certains caractères morphologiques et biochimiques. Un nouveau nom d'espèce est proposé par Engelmann et Weiss en 1985 et en 1986. Différentes souches ont été isolées en Finlande et décrites par Haikara en 1984. En France, en 1886 Soberka et Warzecha ont isolée *Megasphaera cerevisiae* d'une bière faiblement alcoolisée.

3.2 Morphologie

Megasphaera cerevisiae est une bactérie à Gram négatif. Les cellules sont sphériques ou légèrement ovales avec un diamètre de 1,3 à 1,6 μm . Elle se présentent seules ou en courtes chaînes (Englemann et Weiss 1985). Après fixation et coloration, le diamètre des cellules varie entre 1,0 et 1,2 μm (Haikara et Lounatmaa 1987). Les ultrastructures de la surface cellulaire des souches *M. cerevisiae* et *M. elsdenii* sont uniformes (Haikara et Lounatmaa 1987).



3.3 Propriétés biologiques et physiologiques

Megasphaera sp et *Cerevisiae* n'utilisent pas le glucose comme source de carbone, toutefois Engelmann et Weiss (1985) et Haikara (1985a) mentionnent que *Megasphaera cerevisiae* semblent pouvoir utiliser le glucose après un traitement thermique du milieu.

Les sources de carbone utilisées par *Megasphaera* sont le lactate, le pyruvate, le fructose et l'arabinose. *Megasphaera*, contrairement à *Pectinatus* ne peut pas utiliser un grand nombre de sucres comme source de carbone. Le glucose, le maltose, le ribose, le xylose, le mannose, le cellobiose, le saccharose, le trehalose, le mannitol ainsi que le glycérol et le succinate ne peuvent pas être fermentés.

Megasphaera est benzidine et catalase négative. Cette bactérie ne réduit pas les nitrates et les nitrites. Elles n'hydrolysent pas l'urée, l'arginine, la gélatine, l'esculine et ne forment pas d'indole (Weiss *et al.* 1979).

Un grand nombre de produits synthétisés par *Megasphaera* ont été identifiés par chromatographie gaz : les acides, acétique, butyrique, isobutyrique, propionique, valmique, isovalmique, caproïque, isocaproïque, caprilique, isocaprilique, ethylacétique, isobylacétique ainsi que l'acétoïne, le propanol, l'isopropanol, le butanol, l'isobutanol et l'isoanlylalcool (Weiss *et al.* 1979; Engelmann et Weiss 1985; Haikara 1985a; Soberka *et al.* 1989;

Haikara et Lounatmaa 1987). Les acides gras synthétisés dépendent de la source de carbone disponible dans le milieu (Weiss *et al.* 1979; Engelmann et Weiss 1985; Haikara 1985a). Les principaux acides produits dans la bière par ce micro-organisme sont : les acides butyrique, iso-valérique, caproïque et acétique. L'acide n-valérique est l'acide gras prédominant quand la source de carbone est le lactate. Dans la bière, le produit de synthèse principal est l'acide n-butyrique (Haikara et Lounatmaa 1987). La production de l'acide caproïque est un caractère typique du genre *Megasphaera*. Toutes les espèces du genre *Megasphaera* produisent de l'hydrogène sulfuré (Weiss *et al.* 1979; Engelmann et Weiss 1985). Les milieux infectés dégagent une odeur fécaloïde, d'œufs pourris et de fromage.

3.4 Conditions de croissance

Megasphaera se développe dans des conditions anaérobies. Cette bactérie semble plus sensible à l'oxygène que *Pectinatus*. Elle se développe sans les bières, le trouble étant visible après 3 à 4 semaines. (Haikara et Lounatmaa 1987)

Megasphaera peut être cultivée dans un milieu riche comme le milieu peptococcus ou PYG (Peptone, Yeast extract et Glucose). La croissance est alors plus rapide et se fait en une trentaine d'heures. *Megasphaera* forme des colonies blanchâtres, lisses, opaques, larges et brillantes de 2 à 5 mm de diamètre (Engelmann et Weiss 1979). Sur milieu riche elles se développent en 3 à 4 jours sous atmosphère N₂/CO₂.

Les études réalisées par plusieurs auteurs montrent certaines disparités. En effet Haikara et Lounatmaa (1987) décèlent une croissance optimale à 37 - 42°C alors que Soberka *et al.* (1989) trouvent des valeurs de 30 - 32°C. Enfin pour Weiss *et al.* (1979) cette bactérie se développe à partir de 15°C et jusque 37°C.

Megasphaera se développe dans les bières jusqu'au pH de 4,1 (Haikara et Lounatmaa 1987; Seidal *et al.* 1979). Cette bactérie est plus sensible à la baisse du pH que *Pectinatus*. De même elle est moins tolérante à l'alcool. *Megasphaera* se développe jusqu'à des concentrations de 3,8% en milieu riche (Haikara et Lounatmaa 1987; Soberka *et al.* 1989) et de 2,25% (P/V) dans les bières (Haikara et Lounatmaa 1987).

Comme *Pectinatus*, *Megasphaera* peut se développer dans les bières. Mais sa plus faible tolérance à l'alcool et à l'oxygène explique peut-être pourquoi cette bactérie est moins fréquente que *Pectinatus* comme contaminant des bières.

4. Quelques généralités sur les techniques de brassage

Comme cela a été mentionné dans un paragraphe précédent, le mode d'introduction de *Pectinatus* et de *Megasphaera* en brasserie n'est pas connu de nos jours. Avant toute étude pratique, et afin de mieux appréhender les risques de contaminations, il peut être utile de rappeler quelques généralités sur les techniques utilisées dans les brasseries. Le paragraphe qui suit en donnera les grandes lignes⁴.

La bière est une boisson alcoolisée, résultant de la fermentation par *Saccharomyces cerevisiae* d'un moût composé d'eau, des substances solubles du malt d'orge et des arômes du houblon. L'orge apporte l'amidon nécessaire⁵ à la fermentation alcoolique. La fabrication de la bière comprend plusieurs phases (Figure 3).

4.1 Le maltage

Le maltage est la première grande étape de la fabrication de la bière, c'est la transformation de l'orge en malt. Il comprend la germination de l'orge et le touraillage. Après une période de trempage, afin de réactiver et de réhydrater l'amande et le germe, l'orge est mise à germer. Cette germination conduit à la synthèse du pool enzymatique. Ces enzymes sont des diastases, (alpha et bêta amylase) qui agiront lors de la saccharification.

4.2 Le brassage

Les opérations réunies sous le nom de "brassage" se décomposent en :

- concassage du malt
- brassage proprement dit
- filtration du moût
- refroidissement du moût

Concassage du malt, empâtage, filtration du moût et lavage des drèches. Le malt est concassé donnant une mouture composée de farine fine, de gruaux et de pailles qui vont faciliter la filtration du moût.

⁴ pour plus d'informations se reporter à l'ouvrage de Moll (1991)

⁵ 63 à 65% du grain d'orge est composé d'amidon dont 78 à 82% d'amylopectine

FABRICATION DE LA BIÈRE

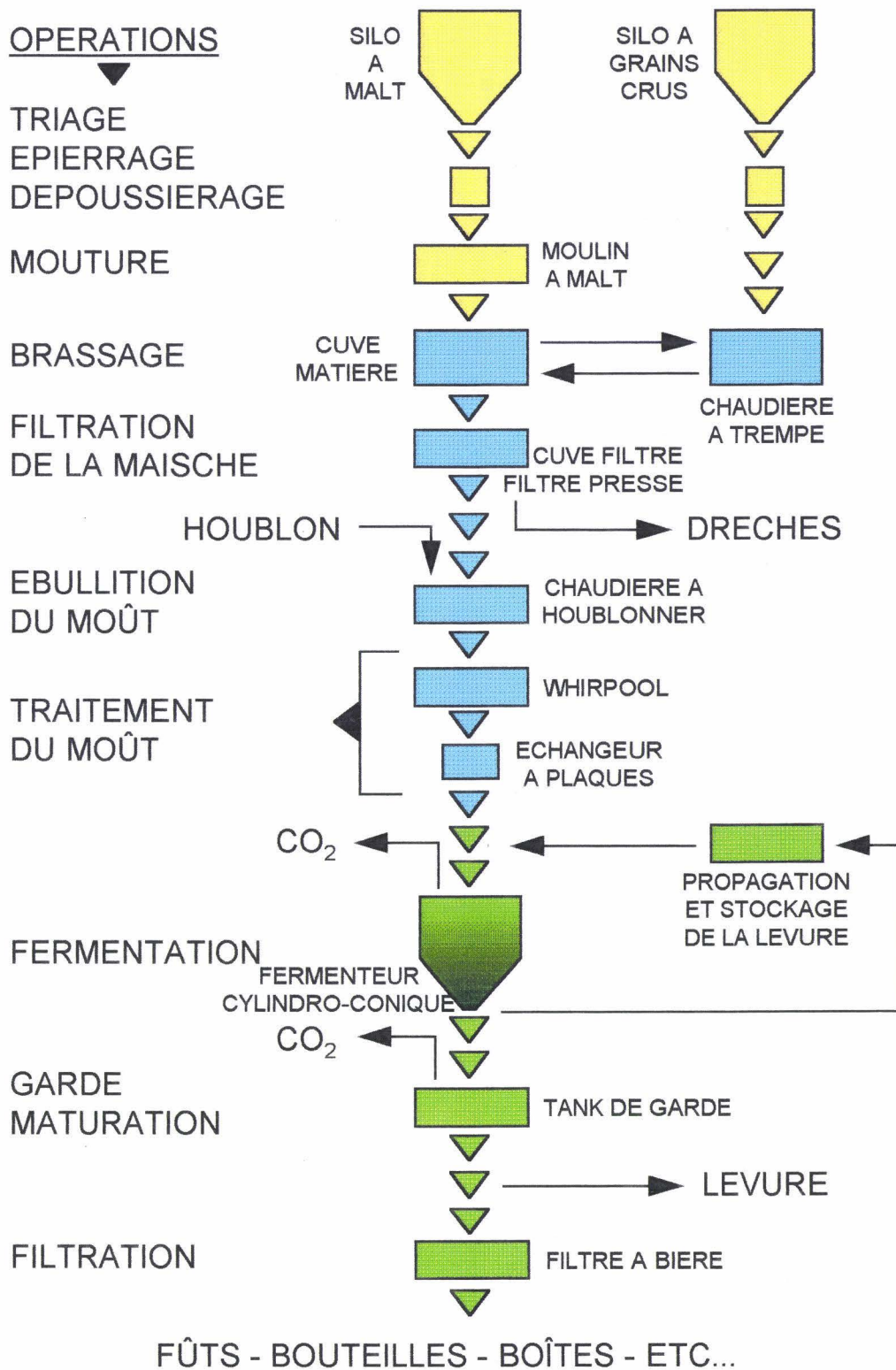


Figure 3 : Schéma de la fabrication de la bière (Moll 1991)

Lors de l'empâtage, on mélange le malt concassé avec l'eau de brassage dans la cuve matière ou la cuve à trempe pour obtenir la maische. Pour la fabrication d'un hectolitre de bière une vingtaine de kilogrammes de malt sont nécessaires. La maische est chauffée à différents paliers de températures pour extraire les matières solubles du malt et hydrolyser les substances azotées ainsi que l'amidon. Cette action diastasique commence dès le maltage puis augmente avec l'hydratation et l'élévation de la température. L'hydrolyse de l'amidon par les amylases se déroule entre 60 et 75°C pendant une heure, ce qui libère du glucose, du maltose et des résidus de dextrans. Seuls le glucose et le maltose sont fermentescibles, on retrouvera donc les résidus de dextrans dans la bière. On peut augmenter ou diminuer la quantité de dextrans dans le moût, en jouant sur la température et obtenir ainsi des moûts plus ou moins fermentescibles. La proportion des matières azotées dissoutes ne dépasse pas 40 %. Les matières azotées hydrolysées au brassage sont des matières azotées plus complexes mais en plus faible proportion que celles hydrolysées au maltage. Cette dissolution s'effectue d'abord sous l'action des protéinases qui commencent l'hydrolyse des protéines insolubles en les transformant en peptones et polypeptides complexes, puis sous l'action de peptidases qui agissent sur les polypeptides. Ces transformations se font vers 45 ou 50°C. Il est à noter que la dissolution excessive des matières azotées est nuisible à la qualité colloïdale de la bière.

L'atténuation limite du moût qui correspond au pourcentage d'extrait fermentescible par la levure est fixée en jouant sur les paliers de température, le pH et la dilution du milieu. La quantité d'alcool dans la bière dépend de l'atténuation, la bière sera plus alcoolisée quand elle est élevée.

La maische est filtrée sur filtre-pressé pour obtenir le moût d'une part et la drêche d'autre part. Cette dernière est épuisée par lavages à l'eau chaude car le moût renferme d'importantes quantités de macromolécules organiques, et en se refroidissant, il devient très rapidement visqueux. Cela explique que le lavage doit se faire à une température aussi élevée que possible sans toutefois dépasser 75°C. Le moût et les différents lavages sont rassemblés dans une grande chaudière à cuire et à houblonner.

Cuisson et houblonnage du moût. Une fois filtré, le moût est envoyé dans une cuve (chaudière à houblonner) où il va être porté à ébullition durant 30 minutes. Cette ébullition a pour objet de stabiliser le moût. A cette température les enzymes sont détruites et les protéines coagulent, formant le trouble à chaud ou "cassure". Le houblon est introduit dans le moût et l'isomérisation des humulones du houblon se poursuit pendant 90 minutes, la drêche de

houblon est ensuite éliminée. Un trouble plus important se forme. La cuisson du moût et du houblon apporte à la bière des substances colorées, des substances réductrices, des mélanoidines et des réductones. Il permet également de stériliser le moût et de fixer le pH à 5,2. Le trouble est éliminé à chaud par décantation ou par centrifugation (Whirlpool).

Refroidissement et traitement du moût. Le moût est refroidi au moyen d'un échangeur à plaques.

4.3 Les fermentations

Fermentation principale. Le moût est oxygéné etensemencé en levain (*Saccharomyces cerevisiae* 500g/hl). La fermentation principale dure entre 5 et 10 jours selon la densité de la bière et la température qui est le plus souvent de 8°C mais qui varie selon les types de fermentation entre 5 et 15°C pour une fermentation haute ou basse. Elle se déroule dans des tanks le plus souvent cylindro-coniques verticaux. Dans les toutes premières heures de la fermentation, l'oxygène du moût est entièrement utilisé par la levure favorisant sa multiplication. Dans un deuxième temps la levure fermente le saccharose et le glucose (10 g/l) puis le maltose (40 g/l) et produit ainsi de l'éthanol. Les acides aminés du moût contribuent à la multiplication cellulaire et à la synthèse des enzymes nécessaires à la fermentation (perméases et maltases). En fin de fermentation principale il ne reste plus que 0,5 g/l de sucres fermentescibles au lieu des 50 g/l du début de fermentation et 50% de l'azote est métabolisé. Techniquement, la fermentation doit tendre à une atténuation, ou en d'autres termes, à une hydrolyse presque complète des sucres fermentescibles en alcool ou en dioxyde de carbone. Un excès d'atténuation empêcherait la fermentation secondaire de se produire. Les substances volatiles, alcools supérieurs, aldéhydes et esters, formés au cours de la fermentation contribuent au parfum de la bière. le pH de la bière se situe aux environs de 4,2. Le refroidissement du moût en fin de fermentation favorise la floculation des levures au fond du tank permettant ainsi leur réutilisation pour ensemenecer une autre fermentation. Le transfert de la bière du tank de fermentation principale au tank de garde se fait à l'abri des contaminations et de l'oxygène (traversage).

Fermentation secondaire ou garde. La fermentation secondaire ou garde assure la saturation en dioxyde de carbone (4,5 à 5g/l), la précipitation du trouble à froid, la réabsorption du diacetyl par la levure et la maturation de la bière. Contrairement à la fermentation principale pour laquelle il a fallu apporter de l'oxygène au moût, la fermentation

secondaire doit se faire intégralement à l'abri de l'air pour éviter qu'une oxydation de la bière n'entraîne une modification désagréable de son goût.

La fermentation secondaire se fait à 1 - 2 °C et dure de deux semaines pour une bière bock à plus d'un mois pour une bière de luxe. L'atténuation finale doit être maximale, ce qui est une condition essentielle pour une bonne stabilité biologique ultérieure de la bière.

4.4 Filtration, pasteurisation et conditionnement

Filtration de la bière. En fin de fermentation secondaire, la bière est filtrée sur des gâteaux de diatomées (Kieselguhr) de nature siliceuse supportée par des toiles métalliques ou des cartons. La filtration a pour but d'obtenir une bière limpide en éliminant les levures et le trouble à froid. La bière filtrée est stockée dans des tanks de présoutirage sous pression et à froid.

Soutirage et pasteurisation. La bière est soutirée en bouteilles, en fûts ou en boîtes métalliques à l'aide d'une soutireuse.

Le soutirage doit limiter autant que possible la dissolution de l'oxygène pour éviter l'oxydation de la bière nuisant à sa stabilité. Pour assurer une bonne stabilité biologique, la bière est le plus souvent pasteurisée. La pasteurisation en bouteilles, contenant-contenu est utilisée dans un grand nombre de brasseries. Pour cela on utilise un pasteurisateur tunnel où les bouteilles sont aspergées d'eau bouillante ou de vapeur. Les échangeurs à plaques permettent de pasteuriser la bière à des températures plus élevées et des temps plus courts. La flash pasteurisation est utilisée pour le soutirage en fûts. Les opérations ultérieures à la flash pasteurisation doivent se dérouler stérilement. Les couples température-temps sont de l'ordre de 15 minutes à 60°C pour une pasteurisation ou de 30 secondes à 70°C pour une flash pasteurisation.

4.5 Points critiques pour une contamination au cours de la fabrication de la bière

Les causes principales d'une contamination résident toujours dans un nettoyage et une désinfection défectueux. Actuellement, le brasseur possède tout l'équipement technique pour produire une bière sans contamination. Pour cela il lui appartient de connaître dans chaque phase de la fabrication, les risques microbiologiques.

Les principales sont au nombre de trois :

- lors du brassage, des bactéries, des levures et des moisissures peuvent provenir des matières premières (malt et eau), de l'opération de brassage et de la filtration de la maische.
- lors de l'ensemencement par les levures
- lors de l'embouteillage⁶.

Il faut noter que les techniques permettant au moût d'être traité en circuit fermé, en anaérobie ont depuis déjà quelques années considérablement limité les risques de contamination. Cependant, si dans ces conditions, les micro-organismes contaminants sont moins nombreux, il se peut que des bactéries anaérobies strictes comme *Pectinatus* et *Megasphaera* puissent y trouver au contraire un terrain propice à leur développement.

⁶ si la bière n'est pas pasteurisée dans les bouteilles

5. Croissance bactérienne et modélisation

5.1 Rappels théoriques sur les cinétiques microbiennes

5.1.1 Cinétiques de croissance

Les cinétiques microbiennes sont les évolutions, lors d'une culture discontinue, de la concentration en biomasse sèche, en substrats divers et en produits en fonction du temps. En culture discontinue, la concentration en biomasse évolue selon la courbe ci-dessous (Figure 4). Les croissances microbiennes étudiées se faisant par division binaire, seule une représentation logarithmique permet de distinguer les différentes phases et de calculer les paramètres d'état ou les variables d'état qui décrivent le "comportement" d'une culture.

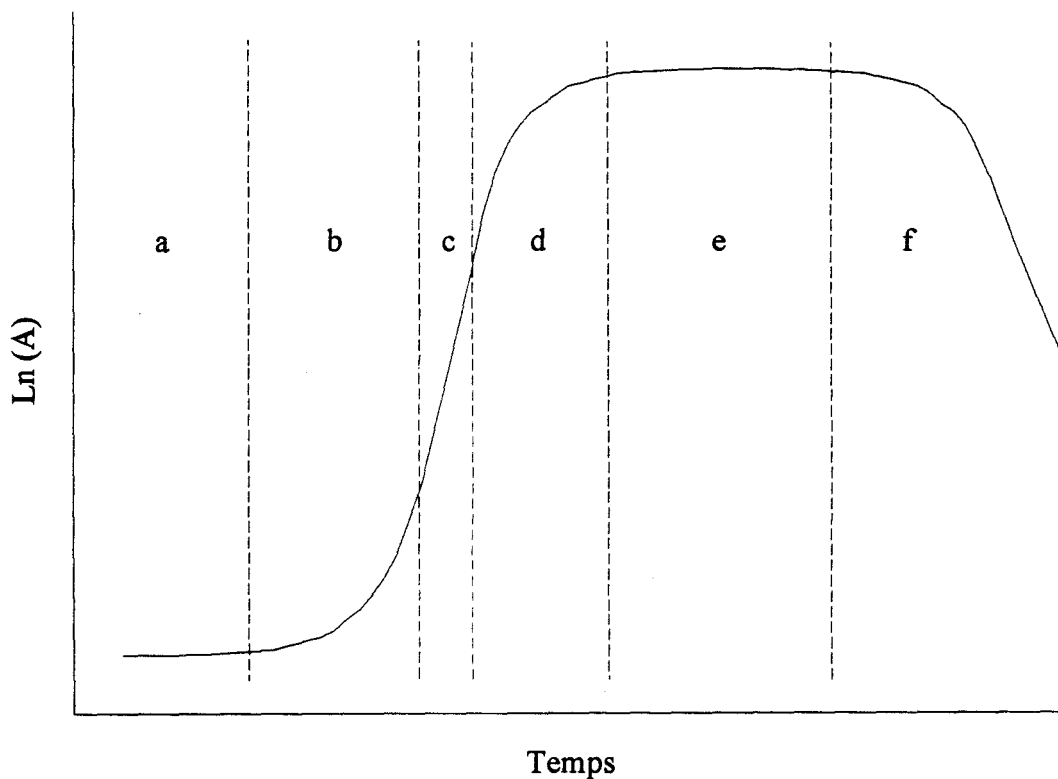


Figure 4 : Exemple de cinétique microbienne. Les phases de croissance sont : a) latence (Q_x (ou μ_x), 0), b) accélération (Q_x augmente), c) phase exponentielle (Q_x expo, $A = A_0 e^{Q_x t}$, Q_x est constant et maximum), d) ralentissement (Q_x diminue car un substrat au moins devient limitant), e) phase stationnaire ($Q_x = 0$), f) décroissance (lyse)

La vitesse spécifique de croissance est égale à la vitesse de croissance en biomasse rapportée à l'unité de biomasse. Puisque nous avons dX/X dans l'expression de la vitesse spécifique de croissance, il est possible de remplacer X par n'importe quelle mesure proportionnelle à la biomasse. La mesure la plus utilisée, rendant compte de la biomasse est la différence entre l'absorbance de la suspension bactérienne à 600 nm et le milieu non ensemencé. La vitesse spécifique de croissance Q_x est aussi appelée taux de croissance μ_x .

$$\mu_x = Q_x = \frac{dX}{dt} \cdot \frac{1}{X}$$

Le μ_x est à déterminer pendant la phase de croissance exponentielle. C'est la période pendant laquelle μ est maximal et constant.

La vitesse de croissance en biomasse (r_x'') est une vitesse volumique : elle représente l'augmentation de biomasse par unité de volume et par unité de temps.

$$r_x'' = \frac{dX}{dt}$$

$$\text{Nous avons donc : } Q_x = \mu_x = \frac{r_x''}{X}$$

Il est à noter que les cinétiques de populations peuvent très bien avoir des vitesses volumiques (r_x'') différentes et le même taux de croissance (μ_x). Le taux de croissance (μ_x) décrit alors réellement l'état physiologique des cellules en division. La connaissance du taux de croissance μ_x permet donc de comparer les cinétiques de populations, de concentrations différentes.

5.1.2 Cinétique de consommation d'un substrat et de production d'un produit

La courbe de consommation et de formation rend compte de l'évolution pendant la culture des concentrations en différents substrats et produits carbonés ou azotés (Figure 5).

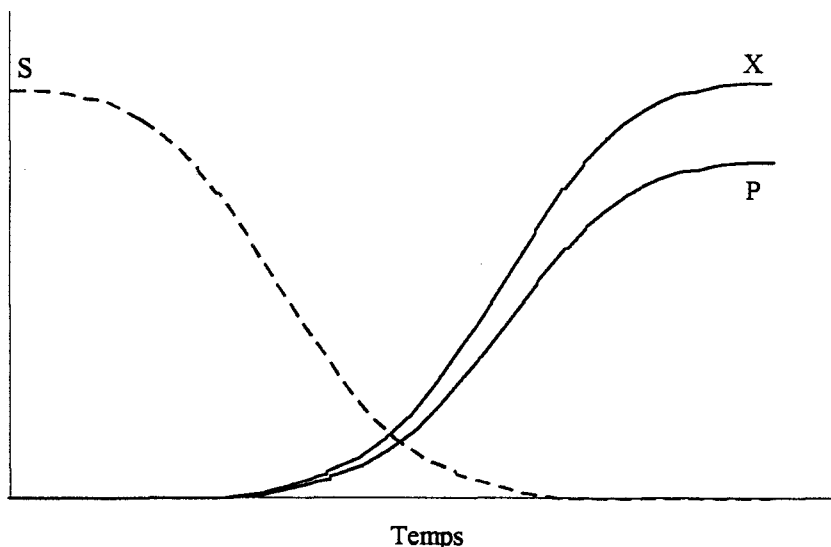


Figure 5 : Exemple de cinétique d'utilisation d'un substrat et de formation d'un produit par rapport à la croissance. avec : S = concentration en substrat $g.l^{-1}$, P = concentration en produit $g.l^{-1}$ t = temps de culture, X = concentration en biomasse sèche $g.l^{-1}$

La vitesse volumique de consommation d'un substrat est donnée par l'équation : $r_s'' = \frac{dS}{dt}$

La vitesse volumique de formation d'un produit est donnée par l'équation : $r_p'' = \frac{dP}{dt}$

L'équation de Pirt définit mathématiquement chacun des termes de l'équation. Elle utilise des constantes et des paramètres cinétiques, les variables sont X et P , les concentrations en biomasse et en produit.

$$\text{Equation de Pirt : } \frac{dS}{dt} = \frac{1}{Y'_{X/S}} \cdot \frac{dX}{dt} + mX + \frac{1}{Y'_{P/S}} \cdot \frac{dP}{dt}$$

Puisque $Q_x = \frac{dX}{dt} \cdot \frac{1}{X}$ l'équation peut s'écrire :

$$\frac{dS}{dt} = \frac{Q_x X}{Y'_{X/S}} + mX + \frac{1}{Y'_{P/S}} \cdot \frac{dP}{dt}$$

Avec :

$Y'_{X/S}$: rendement maximal limite de croissance

$Y'_{P/S}$: rendement maximal limite de conversion du substrat en produit.

Ces rendements s'expriment en gramme de biomasse (ou de produit) formé, par gramme de substrat réellement utilisé pour faire de la biomasse (ou du produit). Y' peut changer pendant la croissance. La biomasse recouvre : la biomasse constitutive et les enzymes de croissance.

m : coefficient de maintenance en h^{-1} , il représente la vitesse spécifique d'utilisation du substrat pour conserver les structures cellulaires en absence de croissance.

Cette équation est applicable facilement si Y' , m et Q_x sont constants pendant la période considérée.

5.2 Plans d'expériences et modélisation

La croissance microbienne est un phénomène très complexe. Elle fait intervenir un grand nombre de réactions dépendantes de facteurs extérieurs chimiques, physico-chimiques ou physiologiques pouvant d'ailleurs avoir des interactions les uns par rapport aux autres. Il y a encore quelques dizaines d'années, il était impossible de déterminer précisément les conditions optimales de croissance d'un micro-organisme sans devoir réaliser un grand nombre de croissances. On était dans l'obligation de réaliser des croissances microbiennes en étudiant le plus grand nombre de facteurs extérieurs possibles et en n'en faisant varier qu'un seul simultanément. Les interactions entre les facteurs extérieurs étaient donc négligées.

De nos jours le contexte d'innovation dans l'amélioration ou la création de nouveaux produits oblige les laboratoires de recherche et de développement industriels, à prévoir quel sera le développement d'un micro-organisme donné dans un environnement particulier sans pour autant mettre en œuvre des analyses microbiologiques lourdes et coûteuses. La microbiologie prévisionnelle et la modélisation permettent de prévoir pour ces innovations, quelles en seront les conséquences microbiologiques. En effet, l'application des méthodes mathématiques et statistiques à l'étude de la croissance bactérienne conduit rapidement à un résultat sans entraîner un grand nombre d'analyses. Dans les laboratoires de recherche, l'utilisation de ces méthodes a permis de progresser considérablement dans la connaissance de la croissance microbienne. Leur développement a été grandement facilité par la micro-informatique qui a mis à disposition des entreprises les moyens de calcul nécessaires. Les logiciels de plus en plus puissants et simples d'utilisation en font un outil accessible à tout laboratoire et à toute entreprise.

5.2.1 Plans d'expériences

Les plans d'expériences permettent l'étude d'un phénomène soumis à l'action de plusieurs variables. Pour établir un plan d'expérience, il faut connaître l'effet que l'on veut mettre en

évidence et les variables susceptibles d'agir sur le phénomène étudié. Se pose alors le problème de savoir si l'action supposée des variables est effective ou non et dans l'affirmative, de connaître l'influence des variables considérées sur le phénomène. Lorsque la variable est discontinue, les valeurs seront choisies parmi celles possibles, dans le cas contraire (variable continue), qui est le plus courant en microbiologie, elles seront choisies en fonction du domaine à explorer. Dans tous les cas, les différentes valeurs choisies pour l'ensemble des variables dépendent du nombre maximal d'expériences pratiquement réalisables. Le choix des variables peut être délicat. Le plus souvent, toutes les variables agissant sur le phénomène ne peuvent être prises en compte; seules les variables importantes sont alors examinées. Cela est une première source d'erreur dans l'interprétation d'un plan d'expériences, la deuxième étant le manque de précision dans la mesure de la valeur d'une variable. Il est donc nécessaire de prendre toutes ces remarques en considération lorsqu'on est confronté à l'organisation des essais, se pose alors le problème du choix d'un plan d'expériences. Celui-ci doit conduire au résultat avec une certaine chance de succès et sans exiger pour autant un nombre prohibitif d'essais. Les variables peuvent être de deux types et conditionner le choix du plan d'expériences.

Cas des variables non stratifiées. Lorsque le phénomène étudié est soumis à des variables sur lesquelles aucun contrôle n'est possible, on dira que ces variables sont non stratifiées. Dans ce cas il est nécessaire de faire une hypothèse sur le type de loi qui régit le phénomène.

Cas des variables stratifiées. Inversement, lorsque les valeurs des variables peuvent être choisies arbitrairement par l'expérimentateur, elles seront qualifiées de variables stratifiées. L'expérimentation ne se fera que pour certaines valeurs ainsi que pour toutes ou une partie de leurs combinaisons. Il n'est alors pas nécessaire de faire une hypothèse sur la loi régissant le phénomène.

Il est possible que les deux types de variables soient associés dans un plan d'expériences.

Les plans expérimentaux peuvent être classés en trois catégories, les plans à variables non stratifiées, les plans à variables stratifiées et les plans hybrides. On ne s'intéressera qu'aux plans à variables stratifiées.

5.2.2 Les différents types de plan à variables stratifiées

La catégorie des plans à variables stratifiées est très étendue. Les plus utilisés sont les plans orthogonaux, puisque leur analyse est nettement plus facile que celle des plans non orthogonaux. Nous laisserons de côté ces derniers.

Les plans orthogonaux peuvent être à leur tour subdivisés en plans factoriels, latins, multifactoriels, gréco-latins, rectangulaires ou à confusion d'interactions.

Un plan factoriel comprend une fois chacune des combinaisons de facteurs possibles. Le nombre d'essais est très élevé. L'analyse du plan factoriel ne nécessite aucune hypothèse sur la négligibilité des interactions sauf sur celle d'ordre le plus élevé.

Le plan factoriel peut se faire avec répétitions, le nombre d'essais est alors multiplié par le nombre de répétitions.

Ces plans permettent l'étude de toutes les interactions possibles. Il a l'avantage d'être sans risque dans l'étude d'un phénomène. Malheureusement il nécessite un grand nombre d'essais et n'est utilisé que dans les cas où peu de niveaux et de facteurs entrent en jeu.

Pour limiter le nombre d'expériences, il est possible d'utiliser les plans multifactoriels. Ils ont été introduits en 1946 par Plackett et Burman. Le nombre maximal de facteurs qu'il est possible d'introduire du point de vue combinatoire est :

$$f = (n - 1) / (p - 1)$$

n est le nombre d'essais

p est le nombre de niveaux commun à tous les facteurs.

Le plan gréco-latin est un cas particulier du plan multifactoriel où $n = p^d$, dans ce cas le nombre de facteurs qu'il est possible d'introduire devient :

$$f = (p^d - 1) / (p - 1)$$

La construction des plans gréco-latins est connue quand p est premier ou puissance d'un nombre premier. Ils ont l'avantage de permettre l'étude d'un grand nombre de facteurs sans nécessiter de nombreux essais. Par contre les facteurs doivent avoir le même nombre de niveaux et toutes les interactions doivent être négligeables.

5.3 Modèles mathématiques (inspiré de "Microbiologie prévisionnelle et modélisation", cours de MST, Mafart, P.)

Un modèle est fait pour simuler de façon concise et aussi précise que possible le phénomène que l'on veut analyser. A partir de résultats expérimentaux, une équation mathématique est établie.

Cette équation peut faire intervenir les différents paramètres que l'on souhaite étudier et permet de mettre en évidence des interactions entre eux-ci.

L'équation sera du type : $Y = f [t (X_0, T, \text{pH}, a_w)]$

5.3.1 Valeur à mesurer

La valeur à mesurer doit être quantifiable et donc ne pas présenter une réponse tout ou rien. En microbiologie on mesure le plus souvent la production d'un produit de synthèse⁷, le taux de croissance ou la biomasse⁸. Dans tous les cas la modélisation n'est possible qu'à partir d'un seuil correct de sensibilité de la mesure. Il est indispensable que la méthode utilisée se rapproche le plus possible des conditions réelles tout en restant simple dans son application.

5.3.2 Choix d'un modèle

Le choix d'un modèle mathématique est arbitraire car plusieurs modèles conviennent toujours à une situation donnée. Il doit être robuste et simuler le mieux possible la procédure expérimentale étudiée pour que l'écart entre les résultats expérimentaux et les valeurs calculées soit faible. Le critère quantitatif le plus répandu pour tester cette qualité d'ajustement du modèle est la moyenne des carrés des écarts.

$$\text{Moyenne des carrés des écarts} = \frac{\sum_1^n (\hat{X}_i - X_i)^2}{n}$$

\hat{X}_i = valeur de la variable estimée selon le modèle

X_i = valeur de la variable observée expérimentalement

n = nombre d'observations

Pour que le modèle soit robuste, il faut que la valeur mesurée ne soit pas trop sensible, de façon à ce qu'il puisse s'adapter à tout contexte expérimental. Le modèle doit être le plus généraliste possible. Les deux qualités d'un modèle sont donc contradictoires. Dans le choix du modèle, la simplicité et l'esthétique doivent être également prises en compte.

5.3.3 Les différents modèles

Le modèle le plus simple est celui qui ne tient compte que de la croissance, le nombre de micro-organismes double à intervalles de temps réguliers. La cinétique de croissance s'écrit :

$$X = X_0 e^{\mu t} \quad (\mu \text{ étant le taux de croissance})$$

⁷ production d'enzymes, d'antibiotiques mais aussi tests organoleptiques

⁸ contaminations, production de biomasse, détermination des optimums de croissance

Le modèle Monod a été très largement utilisé. Dans cette équation différentielle, l'arrêt de la croissance s'explique par la disparition d'un substrat limitant.

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \frac{S}{S+K}$$

S : concentration en substrat limitant

K : constante de saturation de Monod.

Ces dernières années, on s'oriente vers des fonctions à trois ou quatre paramètres épousant l'allure sigmoïdale de la courbe de croissance. Les paramètres entrant dans le modèle sont déterminés simultanément par régression non linéaire. Dans certains cas, les paramètres peuvent être transformés de manière à leur donner une signification biologique. Les modèles les plus utilisés actuellement sont présentés dans les paragraphes qui suivent.

La fonction logistique

La fonction logistique est représentée par une courbe sigmoïdale symétrique par rapport au point d'inflexion (Ricker 1979). Elle est de la forme :

$$Y = \frac{a}{1 + \exp(b - cx)}$$

Reparamétrée en (Zwietering *et al.* 1990):

$$X = \frac{v}{1 + \exp\left[\frac{4\mu(\lambda - t)}{v} + 2\right]}$$

La fonction de Gompertz

En 1825 Gompertz proposa un modèle rendant compte de la mortalité humaine en fonction de l'âge. La courbe est sigmoïdale, asymétrique par rapport au point d'inflexion. Cette équation est de la forme : $Y = a \cdot \exp[-\exp(b - cx)]$

Zwietering *et al.* (1990) introduit des paramètres avec des significations microbiologiques pour, la phase de latence, le taux de croissance maximal et la population maximale. Le modèle reparamétré devient :

$$\ln(N/N_0) = A \cdot \exp\left[-\exp\left(\frac{\mu e}{v}(\lambda - t) + 1\right)\right]$$

Modèle d'Arrhénius

D'autres modèles intégrant des facteurs (température, a_w , pH...) ont été développés permettant une analyse explicative de l'action des facteurs considérés sur la courbe de croissance.

Arrhénius en 1889 a étudié l'effet de la température sur les cinétiques de réactions chimiques. Le modèle qu'il proposa s'écrit : $K = K_0 e^{-\frac{E_a}{RT}}$

T : température absolue

R : constante des gaz parfaits

E_a : énergie d'activation

K_0 : constante cinétique à la température T_0

K : constante cinétique à la température T

Cette équation s'applique à la cinétique de croissance des micro-organismes⁹ et devient :

$$\mu = \mu_0 e^{-\frac{E_a}{RT}}$$

Cette loi est en fait souvent en défaut et n'apparaît valide que dans une plage étroite de températures. L'énergie d'activation n'est pas constante mais augmente lorsque la température diminue. Il en découle qu'un grand nombre de modifications au modèle d'Arrhénius ont été proposées (Ratkowsky *et al.* 1991).

Eyring (1935) proposa l'équation suivante :

$$\mu = \mu_0 T e^{-\frac{E_a}{RT}}$$

Modèle de Schoolfield

Le modèle de Schoolfield (1981) repose sur les hypothèses suivantes : une seule réaction enzymatique est limitante, la quantité de cette enzyme dans la cellule reste constante, la

⁹ dans ce cas on considère que le taux de croissance est limité par une réaction enzymatique unique

réaction enzymatique limitante obéit à la loi d'Arrhénius et à une cinétique d'ordre zéro, la réaction enzymatique est inactivée à basse et haute températures. L'équation est la suivante :

$$\mu = \mu_{\max} \frac{\frac{T}{T_{\text{opt}}} \left[\exp\left(\frac{E}{R}\left(\frac{1}{T_{\text{opt}}} - \frac{1}{T}\right)\right) \right]}{1 + \exp\left[\frac{E'}{R}\left(\frac{1}{T_{1/2}} - \frac{1}{T}\right)\right] + \exp\left[\frac{E''}{R}\left(\frac{1}{T_{1/2}} - \frac{1}{T}\right)\right]}$$

μ_{\max} : taux de croissance maximum

T_{opt} : température optimale de croissance

$T_{1/2}$: température inférieure à T_{opt} pour laquelle $\mu = 1/2 \mu_{\max}$

$T'_{1/2}$: température supérieure à T_{opt} pour laquelle $\mu = 1/2 \mu_{\max}$

E' : énergie de désactivation pour $T < T_{\text{opt}}$

E'' : énergie de désactivation pour $T > T_{\text{opt}}$

La très bonne valeur prédictive du modèle de Schoolfield s'explique en partie par sa relative complexité. Selon Mac Meekin *et al.* (1989), la complexité de ce modèle ne justifie pas son intérêt explicatif. Des modèles dérivés plus simples ont été proposés par différents auteurs (Broughall *et al.* 1983; Davey 1989)

Modèle de la racine carrée

Le modèle de Ratkowsky *et al.* (1982) ou modèle de la racine carrée est actuellement très utilisé. Il possède une grande efficacité tout en restant simple ce qui a contribué à son succès. Il s'écrit :

$$\sqrt{\mu} = b(T - T_{\min})$$

T_{\min} : température minimale de croissance, caractéristique intrinsèque d'une souche

b : constante

Ce modèle ne peut s'appliquer qu'à des températures comprises entre la température minimale et des températures optimales de croissance. Des modifications de ce modèle ont été proposées par Ratkowsky *et al.* en 1983. L'équation devient alors :

$$\sqrt{\mu} = b(T - T_{\min}) \left[1 - e^{-c(T - T_{\max})} \right]$$

T_{\max} : température maximale de croissance

c : constante

En 1987, Mac Meekin *et al.* intègrent dans le modèle l'influence de l'activité aqueuse du milieu. L'équation se transforme et devient :

$$\sqrt{\mu} = b\sqrt{(a_w - a_w \text{ min})(T - T \text{ min})}$$

D'une façon analogue Adams *et al.* (1991) ont adapté l'équation de Ratkowsky pour l'effet du pH :

$$\sqrt{\mu} = b\sqrt{(\text{pH} - \text{pH min})(T - T \text{ min})}$$

Les modèles de Schoolfield et de Ratkowsky semblent équivalents d'un point de vue statistique. Certains auteurs ont obtenu de meilleurs résultats avec le premier (Adair *et al.* 1989) et d'autres avec le second (Alber et Schaffner 1992). Cependant, le second modèle de Ratkowsky a l'avantage d'intégrer un plus faible nombre de paramètres (Zwietering *et al.* 1991).

Zweitering *et al.* proposent la modification suivante :

$$\mu = [b (T - T_{\text{max}})]^2 [1 - e^{C(T - T_{\text{max}})}]$$

Zweitering *et al.* (1991) préconisent pour le calcul de la concentration microbienne, celle-ci étant pratiquement constante aux basses températures, l'utilisation du modèle de Ratkowsky sous une forme simplifiée :

$$v = b (1 - e^{C(T - T_{\text{max}})})$$

Modèles multifactoriels

Ces modèles sont basés sur des régressions multiples non linéaires de second degré (modèle quadratique) ou du troisième degré (modèle cubique).

Exemple d'un modèle quadratique à trois facteurs :

$$K = a + b\theta_1 + c\theta_2 + d\theta_3 + e\theta_1\theta_2 + f\theta_1\theta_3 + g\theta_2\theta_3 + h\theta_1\theta_2\theta_3 + i\theta_1^2 + j\theta_2^2 + k\theta_3^2$$

θ_x : facteur étudié

Les avantages de ces modèles sont : le nombre de facteurs étudiés en principe illimité, la mise en évidence des interactions éventuelles entre facteurs, une bonne fidélité avec les valeurs expérimentales. En contrepartie ces modèles posent des problèmes de fragilité (Bratchell *et al.* 1989; Palumbo *et al.* 1991; Little *et al.* 1992). De plus ils deviennent rapidement complexes lorsque le nombre de facteurs est important.

Des modifications du paramètre modélisé peuvent améliorer le modèle. De nombreux auteurs ont recourt à la transformation de μ en $\text{Ln } \mu$ (Gibson *et al.* 1988; Bratchell *et al.* 1989; Zaika *et al.* 1992; Buchanan *et al.* 1993; Membré et Burlot 1994).

6. Thermorésistance

La destruction des micro-organismes, nécessaire pour combattre toute infection, peut être obtenue par la mise en œuvre de différents traitements. Les procédés les plus utilisés pour assurer la neutralité bactérienne des bières, sont la filtration stérilisante et la pasteurisation. Depuis les travaux d'Appert en 1810 et de Pasteur (1825-1895), on sait que la conservation des denrées alimentaires peut être réalisée par un traitement par la chaleur.

La pasteurisation est un traitement thermique qui a pour effet de détruire les formes végétatives de micro-organismes potentiellement présents dans le produit (Mafart 1991). Contrairement à la stérilisation qui détruit la totalité des micro-organismes, la pasteurisation ne détruit que les germes non sporulés. En détruisant une grande partie des micro-organismes et des enzymes, la pasteurisation permet de stabiliser les qualités organoleptiques du produit (Boudon 1973).

Dans les pages qui suivent seront décrites les lois régissant la thermorésistance.

6.1 Première loi de destruction thermique des micro-organismes

Comme pour les autres micro-organismes, ceux présents dans la bière ou dans le moût de bière répondent aux lois de la destruction des micro-organismes. Ces lois ont été étudiées par différents auteurs parmi lesquels Bigelow (1921), Ball et Olson (1957) et Cheftel et Thomas (1963). En plongeant une suspension homogène d'un micro-organisme en culture pure dans un bain thermostaté pendant des temps variables dans un milieu lui-même homogène et stable, ces auteurs ont remarqué que la réduction de population obtenue après une durée de chauffage donnée est proportionnelle à la population initiale. La température doit être maintenue constante et être suffisamment élevée pour être létale pour le micro-organisme. La cinétique de destruction est analogue à une cinétique chimique du premier ordre. Elle a pour expression :

$$\frac{-dN}{dt} = kN$$

N exprime la concentration en cellules vivantes au début du chauffage.

dN représente la réduction de population au cours du traitement de durée dt.

k exprime la vitesse relative de destruction thermique, aussi appelée constante de vitesse de réaction à une température donnée (en minutes).

L'équation peut également s'écrire sous la forme :

$$\frac{-dN}{N} = kdt$$

La courbe des variations de la concentration des cellules vivantes en fonction du temps à une température donnée est représentée par la figure 6

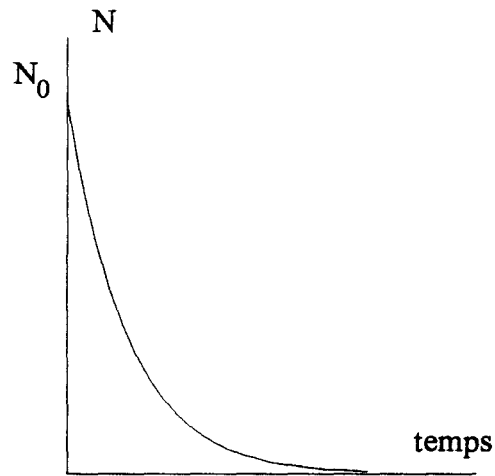


Figure 6 : Allure de la destruction d'une population microbienne en fonction du temps, pour une température létale et constante.

En intégrant l'équation entre les limites du nombre des micro-organismes vivants N_0 au temps $t = 0$ et du nombre des bactéries vivantes N_1 après un temps t de traitement à température constante, on obtient :

$$\int_{N_0}^N \frac{dN}{N} = -k \int_0^t dt$$

$$\text{Soit : } \text{Log}N_0 - \text{Log}N = kt$$

En passant aux logarithmes décimaux, on obtient :

$$t = \frac{2,302}{k} \cdot \log \frac{N_0}{N} \quad \text{ou} \quad \log N = \frac{-k}{2,302} \cdot t + \log N_0$$

Avec N_0 : nombre de bactéries au temps $t = 0$

N : nombre de bactéries survivantes après un temps de réaction t .

Il en résulte une relation linéaire entre le logarithme du nombre de cellules survivantes et la durée du traitement thermique. Sur la figure 7 ont été portées les variations du logarithme de la concentration en cellules vivantes en fonction du temps. Cette droite porte le nom de "courbe de survie".

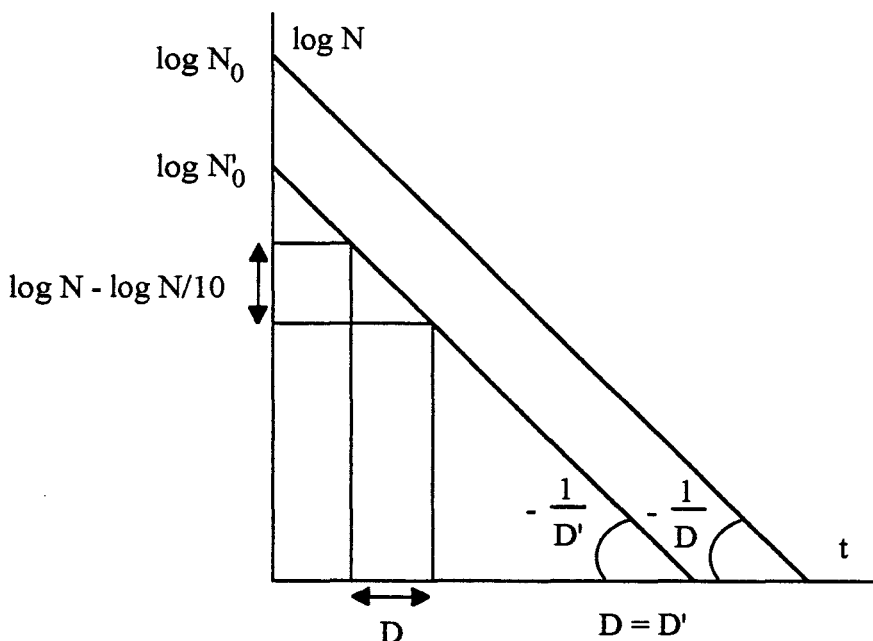


Figure 7 : Courbes de survie à la même température montrant l'influence du temps de traitement thermique sur le nombre de cellules microbiennes survivantes.

Cette équation peut aussi s'écrire sous la forme (Garrick et Mc Neil 1984):

$$t = D \cdot \log \frac{N_0}{N}$$

A partir de cette droite il est possible de calculer la durée de traitement D pour laquelle 90% de la population de cellules vivantes est détruite. On obtient alors $D = 2,302/k$ et l'équation devient

$$\log N = \frac{-t}{D} + \log N_0$$

ou

$$N = N_0 \times 10^{\frac{-t}{D}}$$

Cette équation est la première loi de la thermorésistance.

D est appelée durée de réduction décimale. Elle est définie à une température donnée (T) et sera appelée D_T .

Cette équation montre que le temps de destruction totale des micro-organismes dépend du nombre de bactéries présentes initialement. Par conséquent, dans les procédés de fabrication de la bière, la qualité de la filtration joue un rôle très important pour limiter le nombre de bactéries.

6.2 Deuxième loi de la thermorésistance

Il est possible de tracer pour la même suspension microbienne une infinité de courbes de survie en faisant varier la température.

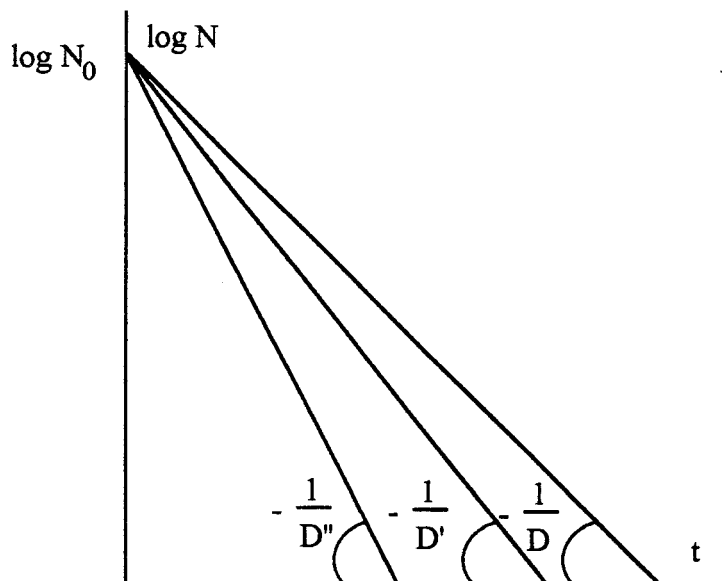


Figure 8 : courbes de survie à différentes températures

On remarque que la vitesse de destruction des micro-organismes augmente avec la température. Par conséquent, D_T diminue donc quand la résistance du micro-organisme diminue, donc quand la température (T) augmente. Pour quantifier les traitements thermiques

on utilise le plus souvent des températures fixées arbitrairement à 121,1°C pour la stérilisation et à 60°C pour une pasteurisation. On obtient alors $D_{121,1}$ et D_{60} .

En reportant le logarithme de D_T en fonction de la température on obtient une droite appelée "courbe des relations température-temps".

$$\log D_T = \frac{-T}{z} + \text{cte} \quad \text{ou} \quad D_T = \text{cte} \cdot 10^{\frac{-T}{z}}$$

Cette équation empirique qui est vérifiée dans la pratique correspond à la deuxième loi de la thermorésistance

Elle peut s'écrire également (Garrick et Mc Neil 1984)

$$\log\left(\frac{D_T}{D_{\text{ref}}}\right) = \frac{T_{\text{ref}} - T}{z}$$

$$\text{donc} \quad \log\left(\frac{D_T}{D_{60}}\right) = \frac{60 - T}{z} \quad \text{et} \quad \log\left(\frac{D_T}{D_{121,1}}\right) = \frac{121,1 - T}{z}$$

Il est possible de calculer la valeur de z qui est l'élévation de la température nécessaire pour diviser la valeur de D_T par 10. La droite devient :

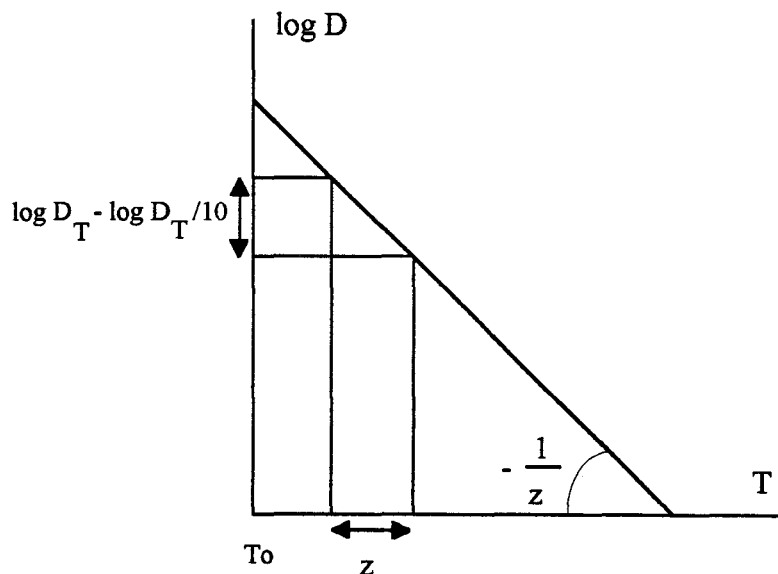


Figure 9 : Courbe des relations température-temps donnant une réduction de population microbienne.

6.3 Courbe de TDT

Bigelow et Esty (1920) proposent le temps de destruction thermique (TDT) pour caractériser la thermorésistance d'une souche pure de micro-organisme. Cela correspond au temps nécessaire pour détruire une population de concentration donnée dans un milieu donné à pH donné. Le TDT est compris entre le temps le plus long où on observe des survivants et le temps le plus court où on obtient une stérilité pratique. Le TDT est donc fonction du nombre initial de micro-organismes. Le TDT diminue quand la température augmente. En pratique, une destruction décimale ne suffit pas à éliminer la totalité des micro-organismes présents dans un milieu donné. Il faut donc prendre un nombre plus important de destructions décimales. On parlera alors de relation température-temps (TRT_n) de n^{ième} réduction décimale. n est choisi en fonction des critères technologiques et doit garantir la stérilité pratique du produit sans apporter de modifications physico-chimiques, nutritionnelles ou organoleptiques. En rapportant sur le graphique le logarithme des temps nécessaires pour obtenir une n^{ième} réduction décimale (soit $n \cdot D_T$) en fonction de la température, quelque soit n, on obtient une droite parallèle à celle de la figure 9. Cette droite partage le plan en deux zones. Au dessus de la droite, les couples température-temps ont un effet destructeur supérieur à TRT_n. A l'inverse, en dessous de la droite, les couples température-temps ne sont pas suffisants pour obtenir une destruction correspondant à la n^{ième} destruction décimale.

6.4 Facteurs modifiant les valeurs de D et de z

Les valeurs D_T et de z varient très largement avec l'environnement du micro-organisme. Un grand nombre de facteurs peuvent plus ou moins fortement modifier la thermorésistance des micro-organismes (Molzahn *et al.* 1983).

6.4.1 Souche du micro-organisme

La thermorésistance varie selon les espèces et peut également varier selon les souches d'une même espèce. Il en résulte que pour établir des barèmes de pasteurisation, il est nécessaire de déterminer la thermorésistance de chaque souche.

La sporulation qui est une forme de résistance, se déclenche lorsque l'environnement devient défavorable aux micro-organismes. Les germes sporulés seront donc beaucoup plus thermorésistants que les formes végétatives. Les bactéries thermophiles sont plus résistantes que les mésophiles et les psychrotrophes. Ces différences pourraient s'expliquer par la présence de constituants plus stables à la chaleur chez les thermophiles que chez les psychrotrophes. Les travaux de Purohit et Stockes (1967), ont montré que les bactéries psychrotrophes possédaient des enzymes plus thermosensibles que les bactéries mésophiles. Robinson et Morita¹⁰ 1966 ont montré que la paroi cellulaire des germes psychrotrophes était sensible à la chaleur humide. De plus les ribosomes d'un bon nombre de germes thermophiles sont plus stables que ceux des mésophiles (Pace et Campbel 1967).

La structure de la paroi des germes à Gram positive les rendrait plus thermorésistants que les germes à Gram négatif. A cela peuvent s'ajouter des différences due à l'état physiologique des cellules. En effet, l'âge pourrait influencer la thermosensibilité de celles-ci. Certains auteurs ont observé une corrélation entre l'âge et la thermorésistance des cellules végétatives. Il en résulte que la thermorésistance est plus élevée pendant les phases de latence et les phases stationnaires et elle est plus faible pendant la phase logarithmique de croissance.

6.4.2 Conditions de culture

Les travaux réalisés par Gaze (1985) sur six souches de *Staphylococcus aureus* ont montré que l'âge de la suspension bactérienne influence la valeur de D_T , dans un sens ou dans l'autre suivant les souches choisies. En règle générale, la thermorésistance augmente avec l'âge (Hansen et Reimann 1963; Hurst *et al.* 1974).

¹⁰ cités par Allwood et Russel (1970)

Les micro-organismes qui ont déjà été soumis à un choc thermique sont plus résistants (Elliker et Frazier 1938; Mackey et Derrick 1986). Knabel et al (1990) ont montré que la résistance de *Listeria monocytogenes* était d'autant plus élevée que le temps du choc thermique préalable (43°C) était prolongé. Ces résultats ont été confirmés pour la même souche par Fedio et Jackson (1989) et Linton *et al.* (1992).

Un choc thermique préalable peut aussi avoir un effet sur la sporulation. Des spores produites à 60°C ont une thermorésistance supérieure à celle déterminée chez les spores de la même souche mais qui ont été cultivées à 55°C (Cook et Gilbert 1968).

6.4.3 pH

Si un pH neutre favorise la thermorésistance (Hansen et Rieman, 1963; Stumbo, 1973) par contre, les pH acides (O'Connor-cox *et al.* 1991) ou alcalins la diminuent.

6.4.4 Activité de l'eau (a_w)

L'activité de l'eau influence également la thermorésistance (Beuchat 1983). Elle augmente quand l'activité de l'eau diminue (Murell et scott 1966; Angelotti *et al.* 1968; Cerf *et al.* 1988). Il en découle que la thermorésistance d'un micro-organisme donné peut être très différente suivant qu'il se trouve dans un milieu liquide ou dans un milieu sec. Elle peut d'ailleurs être multipliée par dix et plus dans des aliments secs.

Dans les milieux liquides, l'effet de l' a_w sur la thermorésistance est lui-même dépendant des types de solutés. La présence de quantités importantes de sucre comme dans les moûts de bières favorise la résistance des micro-organismes (Gibson 1973). Il est à souligner que les matières grasses ont un effet protecteur sur les micro-organismes (Molin et Snygg 1967; Senhaji et Loncin 1977). Il est bien établi que dans une huile complètement exempte d'eau, la thermorésistance est nettement plus élevée qu'en milieu aqueux. Gaze (1985) a montré que la thermorésistance de *Staphylococcus* était considérablement augmentée dans un milieu contenant de l'huile. Cette protection peut résulter de l'encapsulation des bactéries par l'huile.

6.4.5 Influence des gaz dissous

Dallyn et Falloon (1976) ont montré que les gaz dissous dans le milieu pouvaient jouer un rôle dans la thermorésistance. La présence de CO₂ dissous dans la bière accroît l'effet de la pasteurisation (Dallyn et Falloon 1976). Son introduction dans la bière avant pasteurisation est de ce fait intéressante. Il est toutefois nécessaire de travailler sous une pression convenable pour éviter la désorption du gaz entraînant la formation de mousse. Dans ces conditions, les

micro-organismes se trouvant au sein des bulles de gaz seraient protégés par la conductivité des gaz, plus faible que celle des liquides.

6.4.6 Présence d'inhibiteurs

La présence de sels peut affecter la thermorésistance dans un sens comme dans l'autre, selon leur concentration dans le milieu. En effet si 0,3 % à 0,5 % de NaCl favorisent la résistance à la chaleur, au contraire, des concentrations élevées la diminuent (Stumbo 1973). De même, d'autres éléments tels les ions phosphates abaisseraient la résistance des spores à la chaleur au cours de la sporogénèse (El-Bisi et Ordal 1956; Russel 1971). Inversement, une faible concentration dans le milieu en certains cations : Fe⁺⁺, Cu⁺⁺, Mn ⁺⁺ et Ca⁺⁺ diminue la thermorésistance des spores (Sugiyama 1951; Amaha et Ordal 1957; Sadoff 1970). Dans le moût et la bière, les substances antiseptiques apportées par le houblon ont tendance à diminuer la thermorésistance (Adams *et al.* 1989). Mais d'une façon plus marquante l'éthanol contenu dans la bière rend les micro-organismes beaucoup moins résistants (Courtoisier 1984). Splitsoesser *et al.* (1975) ainsi que Molzahn *et al.* (1983) et Kilgour et Smith (1985) et Adams *et al.* (1989) ont confirmé ces résultats pour des souches de *Lactobacillus* et de *Saccharomyces diastaticus*.

6.4.7 Modifications apparentes dues aux conditions expérimentales de mesure

La méthode de détermination utilisée pour calculer le D_T et le z peut modifier les résultats. Contrairement à Reichart (1979) qui a travaillé sur *Saccharomyces cerevisiae*, Kilgour et Smith (1985) ont montré qu'il existe de profondes différences pour les valeurs de D_T et de z entre la méthode traditionnelle et celle de Reichart. Les résultats obtenus par la méthode de Reichart ont donné des degrés de résistance plus faibles pour un même organisme que la méthode traditionnelle. Les valeurs peuvent varier d'un facteur 8 pour le D_{60} et d'un facteur 3 pour le z . Ces résultats restent toutefois inexplicables.

Les conditions de numération ne modifient pas intrinsèquement les valeurs de D_T puisqu'elles sont postérieures à l'action de la chaleur. Cependant, elles peuvent modifier en apparence la thermorésistance d'une façon non négligeable. En effet, le nombre de micro-organismes dénombrés peut être différent selon la température d'incubation du milieu de comptage. Le nombre de micro-organismes dénombrés est maximal si la température de l'incubation est voisine de la température optimale de croissance (Beuchat 1978). De même, les courbes de survie obtenues suite à l'utilisation pour la numération de milieux de culture différents peut révéler des différences de comptage (Linton *et al.* 1992). Knabel *et al.* (1990) et

Linton *et al.* (1992) ont montré que le nombre d'unités formant colonie (ufc) de *Listeria monocytogenes* était différent suivant que la numération se faisait en anaérobie ou en aérobie. Des différences de même ordre ont été obtenues lorsque les températures d'incubation variaient.

6.5 Causes de déviations des courbes de survie

Les lois de la thermorésistance restent théoriques. En pratique on observe souvent des déviations de la courbe de survie qui n'est alors plus linéaire. La formule $\log N = \log N_0 - t / D_T$, n'est plus vérifiée. Les courbes de survie peuvent être bilinéaires, présentant un épaulement dû à une combinaison de mécanismes d'activation et d'inactivation, ou même être curvilignes avec une traînée en fin de courbes. La détermination de D_T peut dans ce cas devenir délicat (Tsang et Ingledew 1982).

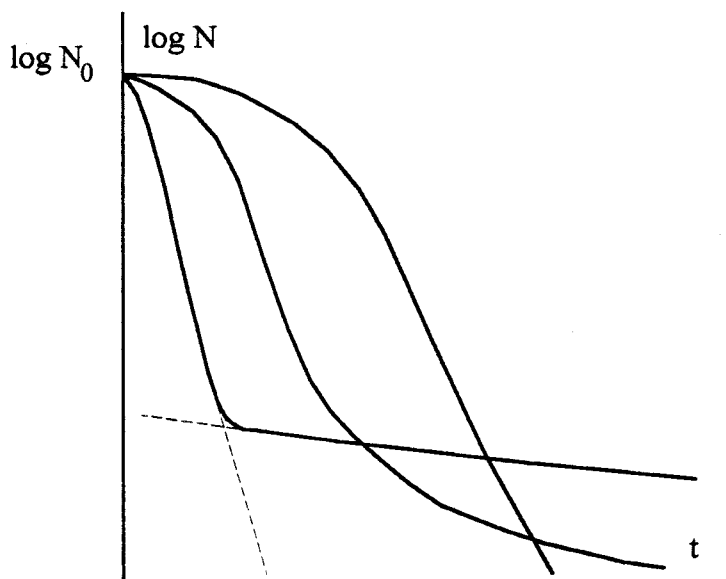


Figure 10 : Exemples de déviations de courbes de survie

6.5.1 Présence de plusieurs sites thermosensibles

La présence dans le micro-organisme de plusieurs sites sensibles (Hansen et Rieman 1963; Allwood et Russel 1970; Magnus *et al.* 1986). peut engendrer un épaulement au début de la courbe de survie. Dans ce cas, la mort ne serait pas due à l'inactivation d'une seule molécule mais de plusieurs.

6.5.2 Présence de micro-organismes en amas

Les travaux de Stumbo (1973), montrent que chaque amas de micro-organismes, produit une colonie tant qu'il contient au moins une cellule. C'est uniquement quand il n'y a plus qu'une cellule viable par amas que la thermorésistance devient logarithmique. Dans certains cas en mélangeant énergiquement la suspension au départ du traitement thermique, les courbes de survie obtenues sont linéaires (Hansen et Rieman 1963). De même, la présence de détergent comme le tween 80 dans le milieu peut limiter la formation d'amas.

Un grand nombre de bactéries peut, dans des conditions normales de croissance se présenter sous forme de chaînettes ou de tétrades. Pour les mêmes raisons que les amas, ces bactéries en chaînettes et en tétrades vont induire des artefacts sur la courbe de survie. Magnus *et al.* (1986), ont pu observer au microscope que les épaulements des courbes de survie de *Streptococcus faecium* et *Streptococcus faecalis*, chauffés dans différents milieux, sont dus à la présence de chaînettes de 4 à 6 bactéries.

6.5.3 Diffusion de la chaleur

Quand la diffusion de la température n'est pas homogène dans la suspension bactérienne, la relation logarithmique entre le nombre de germes survivants et la durée de traitement n'est plus linéaire (Cerf *et al.* 1988). Roberts et Ingram (1965) ont observé que des spores chauffées dans des tubes ouverts immergés partiellement présentaient une courbe de survie concave. Celle-ci devient une droite quand les spores sont chauffées dans des ampoules scellées complètement immergées. Roberts et Ingram expliquent ce phénomène par la présence d'une hétérogénéité thermique. Les spores dans la partie supérieure des tubes, sont probablement soumises à des températures moins importantes que les spores emprisonnées dans la partie inférieure, quand celle-ci n'est pas complètement immergée. Il est donc indispensable que le traitement thermique soit homogène.

6.5.4 Activation des spores par la chaleur

Pour des suspensions de spores, il existe des distorsions aux lois de la thermorésistance au début ou en fin de chauffage (Stumbo 1973; Senhaji 1973; Driard 1974; Cerf 1977; Michiels *et al.* 1978; Etoa 1983). La plupart des spores ont besoin d'une activation pour germer et la chaleur est un excellent activateur, d'où une compétition possible entre la destruction des spores et leur germination.

6.5.5 Présence de populations différentes

Quand 2 espèces génétiquement différentes sont mélangées au sein d'une population, la courbe de survie est biphasique. La première partie de la courbe correspond à la destruction de l'espèce la plus thermosensible et la seconde à la souche la moins thermosensible (Ball et Olson 1957; Bond *et al.* 1970; Stumbo 1973). La présence de sous populations de thermorésistances différentes entraîne des courbes de survie curvilignes.

La présence au sein de la population génétiquement homogène d'individus possédant différents degrés de thermorésistance peut expliquer l'obtention de courbes biphasiques. Cette variabilité serait physiologique et pourrait être notamment liée à l'âge des cellules (Moats 1971)

6.5.6 Effet protecteur du milieu

Quand les suspensions sont chauffées dans des aliments, de nombreuses réactions chimiques se produisent, modifiant ainsi l'environnement des germes. Il peut y avoir apparition d'un effet protecteur du milieu au cours du traitement. Pour exemple, au cours du chauffage, un effet protecteur sur les spores de *Clostridium butyricum* peut apparaître dans le lait augmentant leur thermorésistance.

6.5.7 Artefact de numération des bactéries

Nous avons vu précédemment que la numération pouvait influencer les valeurs de *D*. D'une façon analogue, elle peut induire des artefacts sur la courbe de survie. La numération des micro-organismes survivants pour des faibles populations (moins de 100 germes/ml) est imprécise et source de nombreuses variations. La présence de traînées pourrait être liée à l'imprécision de la méthode quand les dénombrements effectués sont insuffisants (Cerf 1977).

6.5.8 Conditions de préculture

Fedio et Jackson (1989) ont observé des courbes de survie non linéaires pour *Listeria monocytogenes*. Ces courbes deviennent linéaires lorsque la préculture est soumise à un préchauffage d'une heure à 48°C.

6.5.9 Solutions d'essai

Barillère *et al.* (1985) ont montré que les courbes de survie de souches de levure dans des solutions alcooliques et dans des solutions sucrées pouvaient être bilinéaires ou curvilignes. En modifiant les conditions expérimentales, il est possible d'obtenir des courbes de survie rectilignes. Lorsqu'il y a des différences physico-chimiques entre le milieu de culture et le

milieu d'essai, la courbe de survie n'est pas linéaire. La présence d'éthanol ou une différence supérieure à 1 unité pH entre le milieu de culture et le milieu d'essai affecte profondément la forme des courbes de survie dans le cas des levures (Barillère *et al.* 1985). L'éthanol induit des courbes de survie bilinéaires. Plus la solution d'essai est proche des conditions limites de croissance, plus la forme de la courbe s'éloigne de la linéarité. Ces conditions, pH acides et alcool, pourraient modifier des propriétés physico-chimiques des cellules et entraîner un comportement hétérogène des micro-organismes vis-à-vis du traitement thermique. Il faut noter que lorsque le milieu de culture et la solution d'essai ont le même pH et la même teneur en éthanol, les courbes de survie sont rectilignes (Barillère *et al.* 1985).

Enfin les déviations peuvent trouver leurs causes dans les caractéristiques intrinsèques à une espèce. Barillère *et al.* ont montré que dans les mêmes conditions, les déviations pouvaient être variables selon les espèces étudiées. Si pour *Saccharomyces bailii* la courbe de survie est linéaire, elle est curviligne pour *S. bayanus* et bilinéaire pour *S. cerevisiae*

6.6 Application au cas de la bière (inspiré de "La pasteurisation de la bière" Benard *et al.* 1975)

Malgré les conditions particulières régnant dans la bière, le brasseur doit limiter tous risques de contaminations après embouteillage. Pour cela, il est amené à pasteuriser le produit fini. Si en brasserie l'étude scientifique de la thermorésistance s'est développée dans les années 1940, la pasteurisation fut utilisée intuitivement depuis longtemps. Déjà au Moyen-Age on s'était aperçu que l'ébullition du moût ainsi que le nettoyage du matériel à l'eau bouillante favorise la stabilité de la bière. C'est à Appert dès 1796 que l'on doit les premières études sur la conservation des aliments par la chaleur en milieu clos. Un peu plus tard, en 1863 dans son livre "Etudes sur le vin" Pasteur démontre scientifiquement que la destruction thermique des micro-organismes est responsable de la stabilité. Mais ce fut Appert qui en fit les premières applications à la bière par trempage des bouteilles dans un Bain-Marie. C'est en 1866 que Vetén déposa le premier brevet sur la pasteurisation industrielle de la bière en s'inspirant des travaux de Appert et de Pasteur. Enfin ce sont les travaux de Bigelow (1921), Ball (1923), Benjamin (1936) (non publié), Epstein et Dee Snell¹¹ (1940), Laufer et Brenner¹¹ (1940) et Del Vecchio *et al.* (1951) sur les phénomènes de transfert de chaleur, les courbes de survie, sur l'importance de la population initiale et sur la réduction décimale qui ont permis de rationaliser la pasteurisation de la bière. L'ensemble de ces travaux et les différentes remarques apportées dans les paragraphes

¹¹ cités par Benard *et al.* (1975)

précédents montrent qu'il est difficile de généraliser. Pour chaque cas il est nécessaire de déterminer les valeurs de D_T et z relatives aux espèces de micro-organismes étudiées dans les conditions même de pasteurisation.

Pour la bière les valeurs de stérilisation sont choisies en fonction de critères technologiques, en utilisant la stérilité pratique du produit sans entraîner des modifications organoleptiques¹², nutritionnelles¹³ et physico-chimiques¹⁴.

Initialement, la détermination des normes de pasteurisation s'appuyaient sur des observations pratiques. Dans les années 1950 Del Vecchio *et al.* (1951) adoptent l'unité de pasteurisation (UP) qui fut introduite par Benjamin (non publié). L'unité de pasteurisation permet d'évaluer l'intensité des traitements thermiques appliqués à la bière. Elle correspond à l'effet produit par le traitement thermique d'une bière à 60°C pendant une minute, ou tout autre traitement thermique ayant un effet destructeur identique vis-à-vis des micro-organismes¹⁵.

Les valeurs du couple température-temps devant être appliquées à la bière sont celles du microbe le plus thermorésistant susceptible de s'y développer au cours de la conservation. Différents organismes peuvent être pris comme référence. En s'appuyant sur ces considérations, Epstein et Dee Snell¹⁶ (1940) proposent de prendre les levures de culture pour référence celles-ci étant d'après leurs travaux les micro-organismes les plus résistants. Ces mêmes auteurs montrent que la bactérie la plus thermorésistante susceptible de se développer dans la bière serait *Lactobacillus* et proposent une TDT assurant la destruction de ce micro-organisme. Laufer et Brenner¹⁶ (1940) confirmeront ces observations. Les études menées sur la thermorésistance des levures sauvages ont permis à Del Vecchio *et al.* (1951) de proposer un nouveau barème de pasteurisation. Ils préconisent comme référence les levures sauvages qui seraient plus thermorésistantes que les levures de culture et que les bactéries susceptibles de se développer dans la bière. D'après ces travaux un traitement de 5,6 UP à 60°C est suffisant pour détruire les micro-organismes. Sur les bases de cette expérimentation, la courbe de destruction thermique a été constituée avec une valeur de z de 6,94°C. Pour relier le nombre d'UP à la valeur de z , Del Vecchio proposa l'équation suivante :

¹² apparition de goût de cuit, réaction de Maillard, réactions de Strecker (Blockmans *et al.* 1975)

¹³ destruction des vitamines

¹⁴ équilibre colloïdal

¹⁵ un tableau préétabli donne les UP par minute obtenues avec différentes températures (annexe 1)

¹⁶ cités par Benard *et al.* (1975)

$$UP = t \cdot 10^{(60 - T)/z}$$

Pendant longtemps les barèmes de pasteurisation (15 min, 60°C) ont été appliqués comme valeurs standards. Parallèlement, Andrews et Gilliland¹⁷ (1952), préconisent d'utiliser *Saccharomyces diastaticus* comme levure sauvage de référence. Ils ne proposent pas la TDT mais un couple temps-température de 10 minutes à 60°C (10 UP) capable d'assurer la destruction de ces cellules dans l'eau. On peut logiquement penser que la destruction des mêmes micro-organismes dans la bière serait légèrement supérieure en raison de son pH inférieur. Ces résultats ont été confirmés par Takahashi¹⁷ (1966). Claveau¹⁷ *et al.* (1966) ont étudié la thermorésistance de trois levures de culture et de cinq levures sauvages. Ils proposent de prendre la TRT5 de l'espèce sauvage la plus thermorésistante. Cette droite est presque superposable à la droite de Del Vecchio.

Dans la bière, les bactéries contaminantes sont des bactéries non pathogènes, toutefois dans les années 1950 il a été signalé la présence de bactéries coliformes et d'*Escherichia coli* (Buttiaux et Kesteloot 1949; Schowtzer 1962; Buttiaux et Catsaras 1965)¹⁷, en raison de l'altération de la qualité organoleptique mais surtout de la qualité hygiénique de la bière par ces organismes, il est devenu impératif que la pasteurisation élimine le plus complètement possible ces organismes. La TDT pour *E. coli* proposée par Sanders¹⁷ (1957) permet de détruire ce micro-organisme. Ces valeurs s'appliquent au cas du lait où les caractéristiques de la thermorésistance peuvent varier de celles de la bière pour un même organisme. Pour cela Scriban¹⁷ *et al.* (1968) ont étudié la TRT10 dans la bière. Des nouveaux couples température-temps ont été définis. Il semble que 15 à 25 UP donnent des résultats satisfaisants pour une pasteurisation en bouteille ou en flash pasteurisation industrielle. Ce traitement est un bon compromis entre les exigences de la pasteurisation¹⁸ et la stabilité organoleptique et la stabilité colloïdale de la bière. Toutefois cela nécessite une hygiène rigoureuse¹⁹ ainsi qu'une filtration de qualité. Les nouvelles techniques de filtration permettent d'obtenir des bières parfaitement limpides et pratiquement exemptes de micro-organismes. Les traitements thermiques peuvent dans ce cas être réduits. Dans les années 80, le développement de nouveaux produits comme

¹⁷ cités par Benard *et al.* (1975)

¹⁸ destruction des micro-organismes, pénétration de la chaleur pour la pasteurisation en bouteille

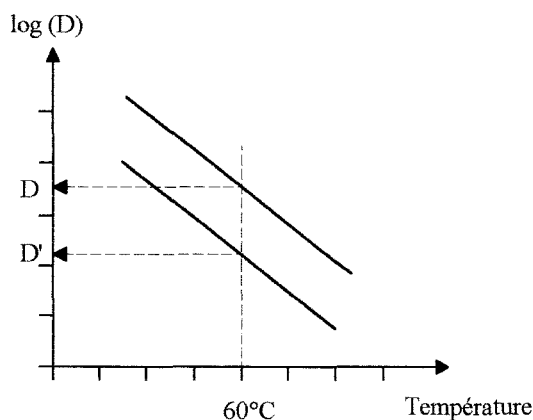
¹⁹ lavage des bouteilles, stérilisation journalière de la soutireuse et des circuits et de la boucheuse

les bières sans alcool (Penn 1986; Wainwright 1987) ont remis en cause les barèmes établis. En effet il est courant qu'une bière sans alcool n'ait pas atteint l'atténuation limite²⁰, il est dans ce cas indispensable de détruire les micro-organismes éventuellement présents afin d'éviter leur développement dans le produit fini. les micro-organismes étant plus résistants dans la bière sans alcool. Pour éviter de devoir augmenter les temps de pasteurisation, certains auteurs comme Adams *et al.* (1989) ont proposé d'augmenter la quantité d'extrait de houblon dans ce type de bière. La présence du houblon diminue la thermorésistance ce qui pourrait compenser l'absence d'éthanol.

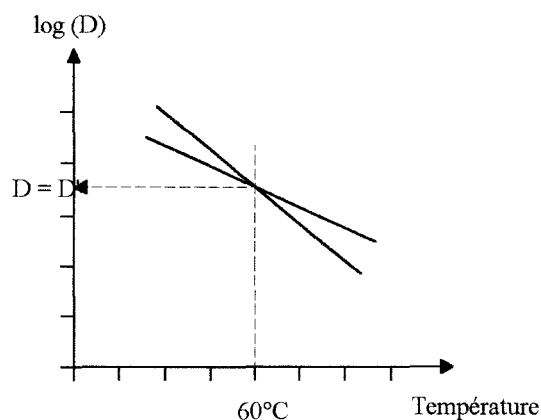
Les bières qui ont subi une flash pasteurisation ou une filtration stérilisante sont par la suite plus sensibles à une nouvelle contamination. Il est donc préférable de pasteuriser les bières dans leur propre emballage pour éviter toute contamination lors du conditionnement.

Dans la pratique, il y a quelques années, les barèmes de pasteurisation étaient établis en s'appuyant sur la valeur de z . Toutefois, il a été montré (Sokal et Rohlf 1969) que l'utilisation de z pouvait entraîner des erreurs importantes dans le calcul de L_t . S'il est en général admis, qu'un organisme thermorésistant possède un z élevé, la réciprocity n'est pas toujours vérifiée. La prise en compte des valeurs de D_T au lieu de celles de z permet donc de mieux estimer le comportement des micro-organismes à la pasteurisation. Un micro-organisme peut être très peu résistant à une températures de 60°C et être caractérisé par une valeur de z élevée et réciproquement. De plus deux organismes caractérisés par des valeurs de z identiques peuvent avoir des D_T très différents. L'encadré ci-dessous en donne une explication graphique à l'aide de quelques exemples.

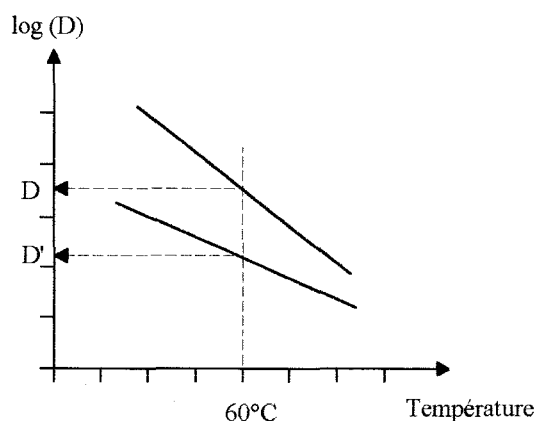
²⁰ présence de sucres fermentescibles



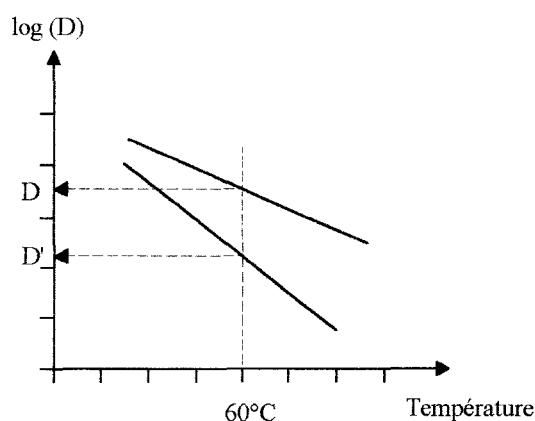
Graphique N°1



Graphique N°2



Graphique N°3



Graphique N°4

Ces différents graphiques théoriques montrent que la valeur de z n'est pas toujours caractéristique de la résistance d'un organisme à un traitement thermique. Sur le premier graphique les valeurs de z et de z' sont identiques alors que D_{60} est supérieur à D'_{60} . On remarque sur le second qu'inversement les valeurs de D_{60} peuvent être identiques alors que celles de z sont différentes. Le troisième graphique montre que la valeur de z peut être supérieure pour un organisme alors que son D_{60} est inférieur. Le quatrième graphique montre quant à lui que la réciproque peut également être vraie. On peut donc dire que la valeur de z nous renseigne davantage sur l'évolution de la thermorésistance d'un micro-organisme que sur sa valeur et que D_{60} permet de mieux estimer le comportement des micro-organismes à la pasteurisation

En conséquence on peut dire que la valeur de z nous renseigne davantage sur l'évolution de la thermorésistance d'un micro-organisme que sur sa valeur. Déjà, Ingram, M. en 1969 et Tsang et Ingledew en 1982 avaient montré que l'utilisation de z n'était pas appropriée pour établir les barèmes des pasteurisations en brasserie. Ces auteurs ont proposé d'utiliser le facteur d'inactivation (FI) caractérisé par le temps de traitement et le D_T , ne faisant plus intervenir le z . Le FI est défini par l'équation suivante : $FI = 10^{(\text{temps de traitement}/D_T)}$. En d'autres termes, le FI correspond au facteur par lequel il faut multiplier le nombre initial de micro-

organismes pour déterminer le nombre de micro-organismes restants après traitement. Pour établir les barèmes de pasteurisation, il est alors nécessaire d'utiliser le D_{60} du micro-organisme le plus thermorésistant. Après avoir déterminé les valeurs des D_T de 11 micro-organismes différents (Levures et bactéries) et en les comparant aux D_T référencés dans la littérature, Tsang et Ingledew (1982) proposent de prendre comme référence le D_{60} de *Pediococcus acidilactici* qui est de 0,867 minutes.

6.7 Effets secondaires de la pasteurisation sur la bière

La pasteurisation n'a pas seulement un effet sur les micro-organismes. Par exemple, un grand nombre d'enzymes présentes dans la bière sont sensibles à la chaleur. L'une d'elles, l'invertase est d'ailleurs un indicateur de pasteurisation et doit être complètement détruite (Benard *et al.* 1975). Il en est de même pour la phosphatase. D'autres enzymes sont au contraire additionnées durant la fermentation, au traversage ou après filtration et avant pasteurisation²⁸ dans des quantités leur permettant d'être encore active après traitement. Leur rôle est capital, elles hydrolysent les protéines évitant la formation d'un trouble colloïdale provenant des protéines. L'établissement des barèmes de pasteurisation ne doit pas tenir compte uniquement de la destruction des micro-organismes mais aussi de celle des enzymes ainsi que de la formation d'autres composés. Ces nouvelles données ont entraîné la redéfinition des barèmes de pasteurisation.

6.8 Résistance des micro-organismes à d'autres agents létaux

L'équilibre des principaux facteurs de qualité de la bière dépend surtout des matières premières, de leurs transformations au brassage, du type de levure, des méthodes de fermentation ainsi que des phénomènes d'oxydoréduction. Ces derniers sont étroitement liés à la présence d'oxygène moléculaire dissous lors des procédés de fabrication. L'oxygène, bien que bénéfique pour la levure en début de croissance, joue un rôle néfaste sur le vieillissement du produit et ses qualités organoleptiques. Les industriels se sont donc efforcés à développer différentes techniques pour réduire la dissolution de l'oxygène lors du procédé de fabrication et du stockage de la bière. On peut supposer que cela a pu largement contribuer à l'augmentation du nombre des contaminations par des bactéries anaérobies strictes comme *Pectinatus* ou *Megasphaera*.

²⁸ papaine, bronéline, ficine, pepsine, rhozyme P11

Par ailleurs, il existe dans la bière des réducteurs naturels intervenant aux différents stades de fabrication. Ceux-ci peuvent créer un environnement dépourvu de toutes traces d'oxygène permettant aux bactéries anaérobies strictes de survivre ou de se développer. Les malts et plus particulièrement les malts colorés apportent des réducteurs du type polyphénolique lors de l'ébullition du moût, une partie de l'oxygène qui était dissous s'échappe et une autre se combine avec les matières oxydables. Il y a donc réduction grâce aux substances réductrices comme les mélanoidines. (De Clerck et Van Cauwenbergue 1956). Il est à noter que l'ébullition du moût et du houblon augmente le pouvoir réducteur. Au cours de la fermentation on assiste à une baisse du pouvoir réducteur provoquée par l'absorption de tannoïdes sur les levures et une précipitation de certaines substances due au pH (Soberka et Warzecha 1986). La législation permet d'utiliser des glucoses-oxydases ou certains réducteurs artificiels comme l'acide L-ascorbique, des sulfites. Mais ces réducteurs peuvent entraîner la formation de peroxydes pour l'acide L-ascorbique ou de mauvais goûts pour les sulfites.

Les agents réducteurs sont répertoriés dans le tableau suivant : (Chapon²⁹ *et al.* 1973).

Faible pouvoir réducteur	Pouvoir réducteur puissant
- dérivés sulfhydrylés	- composés polyphénoliques
- cystéine, glutathion	- mélanoidines réductrices
- protéines associées à des polyphénols	- réducteurs artificiels
	- substances résultant de la cara-mélisation des hydrates de carbone.

Si dans l'ensemble le moût et la bière peuvent être assimilés à des milieux parfaitement réduits, il n'en est pas de même pour les premières heures de la fermentation principale. Avant ensemencement, le moût est oxygéné ce qui favorise le développement des levures. Cette saturation du moût en oxygène peut être préjudiciable au développement des bactéries anaérobies strictes dans le cas hypothétique d'une contamination. Cette contamination à l'ensemencement pouvant provenir de l'utilisation d'un levain lui même contaminé. Il peut donc être instructif de connaître les degrés de résistance de telles bactéries anaérobies strictes d'autant plus que la bibliographie est pauvre à ce sujet. Les auteurs s'intéressent davantage aux mécanismes de régulation du métabolisme des bactéries anaérobies facultatives en présence ou en absence d'oxygène.

²⁹ cités par Soberka et Warzecha (1986)

En 1897, Kroning²³ *et al.* ont été les premiers à s'intéresser à l'action des désinfectants sur la survie des micro-organismes. Leurs travaux ainsi que ceux de Madsen²³ en 1907 montrent que la destruction d'une population homogène de micro-organismes soumise à l'action de désinfectants suit une loi exponentielle. Il est possible d'élargir cette loi à toute destruction de micro-organismes par traitement létal quel qu'il soit. Dans le cas d'une bactérie anaérobie stricte, l'oxygène a un effet létal. Nous sommes donc amenés à penser qu'il en est de même pour la résistance à l'oxygène. En ce qui concerne l'aspect théorique du phénomène, il est possible de se référer aux paragraphes précédents sur la thermorésistance.

²³ cités par Schmid (1957)

- Matériels et méthodes -

1. Souches

1.1 Souches bactériennes

Les souches bactériennes étudiées ont toutes été isolées de la bière et proviennent des collections internationales : American Type Culture Collection (ATCC) et Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSM).

Souche	Référence
<i>Megasphaera cerevisiae</i>	DSM 20461
<i>Megasphaera cerevisiae</i>	DSM 20462
<i>Pectinatus</i> sp.	DSM 20465
<i>Pectinatus cerevisiophilus</i>	DSM 20466
<i>Pectinatus frisingensis</i>	ATCC 33332

1.2 Souche de levure

La souche de levure utilisée, *Saccharomyces cerevisiae*, a été isolée d'un levain de brasserie. Elle est utilisée pour les fermentations "lager" ou fermentations basses.

1.3 conservation des souches

Après isolement d'une colonie sur milieu MRS en boîte de Pétri et vérification de la pureté de la souche (coloration de Gram et galerie API), un flacon "pénicilline" contenant 20 ml de milieu MRS est ensemencé. Lorsque les bactéries sont en fin de phase de croissance, on prélève 8 ml que l'on introduit dans un flacon contenant 2 ml de glycérol stérile sous atmosphère N₂/CO₂. Après homogénéisation, on stocke les flacons à - 70°. Cette méthode de conservation des souches dans le glycérol permet de conserver un pourcentage de cellules vivantes important après plusieurs années de stockage (Barbour et Priest 1986).

La souche est relancée par trois repiquages consécutifs dans le milieu MRS.

Il est possible de conserver les souches en milieu MRS anaérobie à 4°C pendant 5 mois pour le genre *Pectinatus* et 3 mois pour le genre *Megasphaera*.

2. Milieux de culture

2.1 Milieu de Man, Rogosa et Sharpe (MRS) (Glucose: 2g/l)

Pour toutes les croissances, nous avons utilisé le milieu de Man, Rogosa et Sharpe (MRS) en réduisant la quantité de glucose de 20 g/l à 2 g/l, pour éviter la formation d'un trouble et d'une acidification trop importante engendrée par la croissance de bactéries.

Caséine peptone	10	g/l
Extrait de viande	10	g/l
Extrait de levure	5	g/l
Glucose	2	g/l
Tween 80	1	ml
Acétate de sodium	5	g/l
Sulfate de magnésium	0,1	g/l
Sulfate de manganèse	0,05	g/l
Phosphate dipotassique	2	g/l
Tampon citrate : 9 mM		
Citrate d'ammonium et acide citrique	2	g/l

Un agent réducteur est ajouté à raison de 0,5 g/l pour éliminer toutes traces d'oxygène dissous. La résazurine est utilisée pour vérifier l'absence d'oxygène dissous dans le milieu.

Agent réducteur :		
cystéine-HCl	0,5	g/l
ou Na ₂ S, 9 H ₂ O	0,5	g/l
Indicateur :		
résazurine (solution à 2 g/l)	0,5	ml

2.2 Moût

Le moût de bière à 8,7° Plato provient de la GBM à Roubaix, France. On y ajoute 0,5 g/l de Na₂S, 9 H₂O.

2.3 Bière

La préparation de la bière est faite à partir du moût à 8,7° Plato. Un litre et demi de moût est introduit dans un erlenmeyer disposant d'une entrée d'air à la base et d'une sortie munies de

filtres. La stérilisation de l'ensemble se fait à l'autoclave à 105°C pendant 30 minutes. Après refroidissement à 8°C, le moût est saturé en oxygène (à l'air) etensemencé à partir d'une suspension de levures (*Saccharomyces cerevisiae*) de façon à obtenir une population de $2 \cdot 10^8$ cellules/ml. La fermentation dure 8 jours sans agitation. La bière est refroidie à 2°C pour favoriser la sédimentation des levures. Le surnageant est transvasé stérilement dans des flacons de 500 ml (bouchon à vis étanche aux gaz) qui sont stockés à 2°C pendant 15 jours. La bière est ensuite centrifugée avant d'être conditionnée comme expliqué au paragraphe 2.4.2.

2.4 Préparation des milieux de culture

2.4.1 Milieu MRS

Les différents constituants du milieu sont dilués dans de l'eau distillée qui est portée à ébullition pendant 5 minutes sous agitation. Le milieu est refroidi sous barbotage d'azote (N₂ 100 %). A une température d'environ 40°C, le milieu est maintenu sous barbotage d'un mélange d'azote et de dioxyde de carbone (N₂ : 85%; CO₂ : 15%) jusqu'à complet refroidissement. Après addition de l'agent réducteur (cystéine ou Na₂S), le milieu est introduit en chambre anaérobie. Le pH est ajusté avec H₂SO₄ ou NaOH et le milieu est conditionné en tubes ou en flacons hermétiquement fermés par un septum et stérilisés par autoclave à 105°C pendant 30 minutes.

2.4.2 Moût et bière

Le moût ou la bière sont maintenus sous barbotage d'un mélange d'azote et de dioxyde de carbone (N₂ : 85%; CO₂ : 15%) pendant 20 minutes. Des flacons "pénicilline" sont préalablement sertis sous atmosphère d'azote et de dioxyde de carbone (N₂:85%; CO₂:15%) et stérilisés à l'autoclave à 130°C pendant 15 minutes. Après addition de 0,5 g/l de Na₂S, 9H₂O, les milieux sont introduits dans les flacons par l'intermédiaire d'une seringue et d'une unité de filtration 0,45 µm à travers le septum.

2.4.3 Milieu solide

Le milieu solide a la même composition que le milieu MRS. Pour le dénombrement des bactéries en culture mixte levures-bactéries, 50 mg/l de cycloheximide (fongicide) sont ajoutés au milieu (Hayakawa et Nonomura 1987). Comme pour le milieu liquide, les différents composants du milieu sont introduits dans de l'eau distillée avec 1,4 g de gélose. Après ébullition pendant 5 minutes sous agitation et addition de 0,5 g/l de Na₂S, 9 H₂O, le milieu est réparti en flacons de 100 ml. Après un barbotage rapide sous mélange d'azote et de dioxyde de

carbone (N₂ : 85%; CO₂ : 15%) les flacons sont fermés et stérilisés par autoclave à 105°C pendant 30 minutes. Après fusion de la gélose et homogénéisation, les boîtes de Pétri sont coulées (environ 6 ml par boîte) en chambre anaérobie.

Pour les dénombrements, le milieu solide peut aussi être préparé dans des tubes de Félix fermés par un septum.

3. Suivi des croissances bactériennes

Le biophotomètre est un prototype développé dans notre laboratoire qui permet le suivi automatique des croissances microbiennes (Annexe 2). Le principe fait appel à la spectrophotométrie. Une source envoie une lumière monochromatique (aux environs de 630 nanomètres) à travers un tube contenant un milieu de culture. Derrière chaque tube, un photodétecteur et son amplificateur permettent de capter la lumière et de la convertir en densité optique. Les valeurs sont stockées en mémoire. La croissance bactérienne est suivie par l'évolution de la densité optique dans des tubes standards anaérobies de 16 x 160 contenant 5 ml de milieu. La température est régulée par un "bain-marie" à sec thermostaté de façon individuelle pour chacun des 2 blocs. L'agitation est variable. Elle est assurée par un mouvement orbital créant un vortex dans les tubes.

L'interfaçage avec un ordinateur PC compatible permet le suivi simultané de huit courbes de croissance avec une fréquence définie par l'expérimentateur. L'exploitation des résultats sur tableur conventionnel (Lotus 123 ou Microsoft EXCEL) permet le tracé des courbes, la détermination des temps de latence selon Monod et le calcul des taux spécifiques de croissance. La densité optique est rapportée au nombre de cellules grâce à une droite d'étalonnage et permet de déterminer la population bactérienne maximale.

4. Dénombrement

4.1 Bactéries

Le dénombrement des bactéries survivantes est fait en tubes de Félix contenant 4,5 ml de gélose MRS. Cette méthode est inspirée de celle décrite par Ogg *et al.* (1979). Pour la préparation des tubes, se reporter au paragraphe 2.4.3.

Après fusion de la gélose au bain marie à 100°C, les tubes sont maintenus à 45°C dans un Bain-Marie thermostaté. Un volume de 0,5 ml de suspension bactérienne est prélevé dans le flacon d'essai par l'intermédiaire d'une seringue et introduit dans un tube de gélose. Toujours à

l'aide d'une seringue, après homogénéisation de la gélose et juste avant de plonger les tubes dans un bain d'eau froide, 0,5 ml de gélose est prélevé et introduit dans un autre tube. Huit dilutions sont ainsi réalisées de tube en tube. Après incubation des tubes à 32°C pendant 5 jours les colonies de bactéries sont dénombrées.

4.2 Levures

Les levures sont dénombrées sur au microscope (400 x) sur cellule de Thoma.

5. Réalisation du plan expérimental

Les fermentations sont réalisées directement dans les cuves pour spectrophotomètre en plastique à usage unique (code 05 928.806 Prolabo), fermées hermétiquement par des bouchons de tubes hémolyse pour conserver l'anaérobiose.

5.1 Stérilisation du matériel

Les cuves ainsi que des bouchons sont plongés dans de l'éthanol à 95° pendant 24 heures. Le montage utilisé est représenté sur la figure 11. L'alcool est poussé sous une pression d'air stérile. Une fois l'erlenmeyer vide, le courant d'air ainsi créé permet de sécher les cuves et les bouchons. L'ensemble est stocké à 60°C pendant 24 heures pour parfaire le séchage.

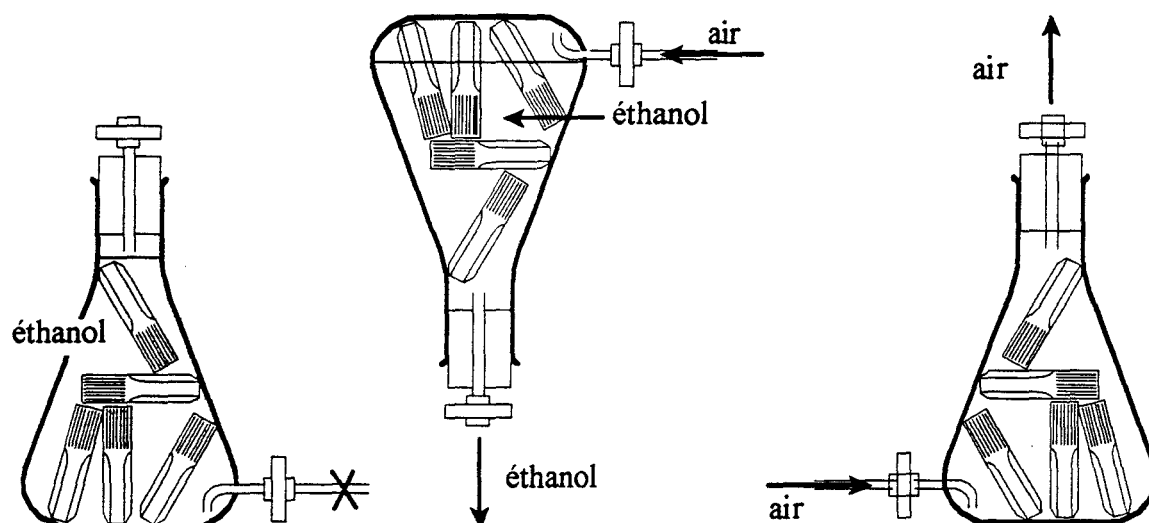


Figure 11 : Montage permettant la stérilisation et le séchage des cuves et des bouchons. Etape 1 : les cuves et les bouchons sont trempés dans l'éthanol pendant 24 heures. Etape 2 : l'erlenmeyer est vidé. Etape 3 : les cuves sont séchées à l'air.

5.2 Préparation des milieux

Une gamme de milieux à différents pH de 4 à 7,3 est préparée comme expliqué dans le paragraphe 2.4.1. Toutefois 2g/l de Na₂S, 9H₂O au lieu de 0,5 g/l sont introduits dans les milieux. Des quantités variables d'éthanol absolu, stérile et dégazé sont introduites si nécessaire pour obtenir une concentration finale de 0, 2,5, 5 et 7,5% d'éthanol pour chaque pH.

5.3 Remplissage des cuves

Cette manipulation est effectuée dans la station anaérobie. Chaque cuve est remplie avec 1 ml de milieu de culture etensemencée avec 20 µl d'une suspension bactérienne en phase exponentielle de croissance, ce qui correspond à environ 3 10⁶ bactéries/ml. Les cuves sont alors bouchées.

5.4 Cultures mères

Elles sont réalisées en flacon "pénicilline" contenant 20 ml de milieu et inoculées par 0,5 ml d'une suspension bactérienne contenant environ 10⁸ bactéries/ml. L'incubation est réalisée sur table d'agitation horizontale à 32°C et 0% d'éthanol v/v, à pH 6 pour le milieu MRS et à pH 5,2 pour le moût.

5.5 Suivi des cinétiques de croissance

Après homogénéisation, toutes les 4 heures pendant les 4 premiers jours puis toutes les 8 heures, la densité optique de chaque cuve est mesurée à 630 nm avec un spectrophotomètre Kontron Uvikon 940. Entre-temps les cuves sont incubées en chambre anaérobie à différentes températures de 2°C à 35°C.

6. Modélisation des courbes de croissance

La modélisation des courbes de croissance est réalisée grâce au logiciel STATITCF (Institut Technique des Céréales et des Fourrages, France). Deux modèles non-linéaires ont été utilisés : le modèle de Gompertz et le modèle logistique.

7. Construction des équations polynomiales

La régression permet de déterminer la relation mathématique existant entre une variable aléatoire Y dépendante et une ou plusieurs variables explicatives X_j. Dans cette étude, le but

de la régression est de prévoir les variations du taux de croissance maximal et de la l'absorbance maximale en fonction de celles de la température, du pH et du pourcentage en éthanol. Ayant 3 variables explicatives, on part d'une équation du type :

$$Y = a T + b P + c E + d T^2 + e P^2 + f E^2 + g T P + h T E + i P E + j T P E + k$$

Avec : T pour la température, P pour le pH et E pour la concentration en éthanol.

La régression polynomiale consiste à effectuer une sélection des variables : température, pH, éthanol ainsi que leur carré et leur combinaison, et d'en déduire ainsi les termes significatifs du polynôme. Les valeurs des coefficients de corrélation partiel et celles des tests F nous ont permis de choisir l'équation la plus significative. Le coefficient de corrélation partiel (r^2) permet d'évaluer la proportion de la variation non expliquée d'une variable aléatoire qui devient expliquée grâce à l'ajout d'une variable explicative. Le test F, quant à lui est le rapport entre la variance spécifique et la variance résiduelle. Si la différence entre les résultats observés et calculés est petite alors la variance résiduelle sera faible. De plus, si l'équation donne une représentation fidèle aux résultats expérimentaux, la variance spécifique sera grande. Une valeur de F importante caractérise la justesse de l'équation. A la valeur F, est associé un degré de signification qui détermine le risque d'obtenir les résultats par le hasard. Malgré un excellent ajustement d'un point de vue statistique, il est possible qu'un modèle simule dans certaines conditions des résultats aberrants (Palumbo *et al.* 1991). Il est donc indispensable de comparer les valeurs calculées à l'aide du modèle avec d'autres valeurs expérimentales n'ayant pas servi à construire le modèle (Little *et al.* 1992). De même il est préférable de simuler un grand nombre de conditions, y compris celles en dehors des limites du plan d'expériences.

La recherche des coefficients de régression est réalisée grâce au logiciel STATITCF. Trois méthodes différentes ont été utilisées :

- la méthode progressive consiste à sélectionner, en première étape, la variable la plus corrélée à Y, puis elle calcule les coefficients de corrélation partielle des variables explicatives restantes et choisit celle qui possède le plus fort coefficient significatif. Les coefficients de corrélation partielle sont alors recalculés en fonction de l'entrée des deux variables et la variable présentant le plus fort coefficient significatif est retenue. Cette sélection progressive par ajout de variable, s'arrête quand aucun des coefficients de corrélation partielle des variables non entrées dans l'équation n'est significatif.

- La méthode pas à pas est semblable à la méthode progressive, mais dès qu'une nouvelle variable est entrée, on réexamine la contribution des variables choisies antérieurement. L'équation présentant les meilleurs paramètres statistiques est retenue.

- La méthode rétrograde (modèle complet) : les contributions de chacune des variables sont calculées en étant considérées tour à tour comme la dernière entrée dans l'équation. La variable ayant le F partiel le plus faible et non significatif sera alors éliminée. Si une variable est retirée, l'équation est alors calculée avec les variables explicatives restantes et la signification de la contribution de chacune d'elles est encore vérifiée en les considérant tour à tour comme la dernière entrée. On procède ainsi jusqu'à ce que la contribution de toutes les variables soit significative. Pour les trois souches étudiées, c'est la méthode rétrograde qui a donné les résultats les plus satisfaisants.

8. Fermenteur

8.1 Description

Nous avons utilisé des fermenteurs Sétric SGI (Annexes 2 et 3). Les caractéristiques de la cuve de ces fermenteurs sont :

- capacité totale : 2 litres
- capacité utile : 1,5 litre
- diamètre de la cuve : 12 cm
- hauteur de la cuve : 20 cm
- pression maximale de travail : 1,5 bar.

La platine supérieure en acier inoxydable supporte :

- une sonde de température
- une entrée d'air avec diffuseur
- une baffle chauffante
- une sortie pour prise d'échantillon automatique
- un bouchon plasma
- un tube d'inoculation
- des capteurs de pH et de pression d'oxygène.

La platine inférieure supportant un système d'agitation (couplage magnétique) est équipée d'un tube de vidange

Le châssis support comporte :

- un filtre stérilisable à l'autoclave
- un débitmètre
- une électrovanne d'eau
- un moteur d'agitation.

Le fermenteur est piloté par un module MRU relié à un ordinateur PC compatible. La mesure et le contrôle des variables se font par l'intermédiaire du logiciel B.I.O.A.C (SGI).

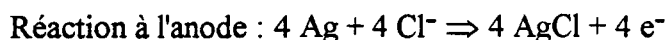
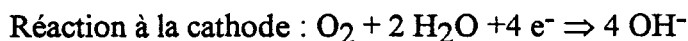
8.2 Mesures et régulations des paramètres physico-chimiques

Le fermenteur est équipé de différentes sondes.

- Régulation de la température : Le régulateur de température est à action proportionnelle. Il régule autour du point de consigne avec une précision de 0,1°C. Il est à double action, chauffage par une baffle chauffante et refroidissement par circulation d'eau froide. Pour les températures inférieures à 20°C le refroidissement se fait par circulation de glycérol refroidi à l'aide d'un cryostat (Beckman Water bath).

- Régulation du pH : Sonde de pH Ingold, stérilisable en place, de sensibilité 0,01 unité pH. Actionneur : pompe ajoutant au milieu de culture de la soude 4 N.

- Régulation de l'oxygène dissous : il s'agit d'une électrode ampérométrique pour laquelle la mesure de l'activité est basée sur la mesure d'un courant. C'est une électrode à membrane utilisant le principe de Clark. Elle permet de déterminer l'oxygène dans les phases gazeuses et liquides. La membrane est en téflon/silicone. Cette électrode se compose d'une cathode (platine) et d'une anode (Ag/AgCl) reliées électriquement par un électrolyte (solution de chlorure). En appliquant une tension de polarisation entre ces deux bornes, on parvient à réduire sélectivement l'oxygène à la cathode.



Cette réaction chimique produit un courant électrique qui est proportionnel à la pression partielle de l'oxygène.

8.3 Stérilisation des fermenteurs

Le fermenteur, équipé des différentes sondes est rempli (1l) d'eau distillée. La sortie d'air est raccordée à deux erlenmeyers montés en série. Le premier est vide et sert de piège à mousse. Le second contient de l'eau, il permet l'évacuation des gaz tout en évitant les entrées d'oxygène et les contaminations. L'ensemble du montage est stérilisé à autoclave à 105°C pendant 30 minutes.

8.4 Polarisation de la sonde à oxygène

L'électrode est étalonnée après installation sur le fermenteur et stérilisation de l'ensemble. En effet la stérilisation est susceptible de modifier la pente de l'électrode.

Après stérilisation, il est nécessaire de laisser l'électrode à oxygène se polariser (6 heures minimum) pour que la tension s'établisse entre la cathode et l'anode. Dès que l'intensité du courant, produit par la réaction chimique, est stable, on peut considérer que l'électrode est polarisée.

8.5 Inoculation

L'inoculation se fait à la seringue stérile à travers le bouchon plasma pour éviter tout contact avec l'oxygène atmosphérique.

8.6 Prélèvements

Les prélèvements pour dénombrement sont manuels. Ils s'effectuent à la flamme, à l'aide d'une seringue stérile après stérilisation à l'alcool du tube de vidange et élimination du volume mort. Ainsi, 0,5 ml de suspension bactérienne est prélevé pour lecture de la densité optique ou dénombrement.

Les prélèvements pour analyse HPLC sont effectués à l'aide d'un échantillonneur automatique type 30/Samplor-F (Annexe 4). Des sondes (30SP/Sonde12/60) fixées sur la platine supérieure du fermenteur, permettent de prélever stérilement 5 ml de milieu à travers une membrane céramique (30SP/Memb60). Un système de vannes (30/Scan4) permet le rinçage et la vidange des tuyaux ainsi que la collecte de l'échantillon par l'intermédiaire d'un collecteur de fraction (30/Coll40). Le collecteur est placé à 8°C. La conservation des échantillons se fait par congélation à - 30°C.

9. Chromatographie Liquide Haute Performance

La Chromatographie Liquide Haute Performance permet la séparation d'un ou plusieurs composés d'un mélange pour permettre leur identification et leur quantification. Le système utilisé est une chaîne HPLC Kontron 360 (Annexe 2) avec une colonne échangeuse d'ions H⁺ OACK Merck permettant ainsi la séparation des molécules chargées. Le passage des échantillons est assuré par un passeur d'échantillons (Autosampler Kontron 360). La détection se fait par un spectrophotomètre UV Kontron 430 à 210 nm et par un réfractomètre LKB 2142

475. L'ensemble de la chaîne HPLC, interfacé à un ordinateur PC est pilotée par le logiciel Kontron Data system 450 version 3.30.

L'élution est réalisée dans les conditions suivantes :

- éluant : H₂SO₄ à 0.02 N
- température : 70°C
- débit : 0.4 ml/min
- volume injecté : 20µl

9.1 Calibration de la colonne

Avant de passer les échantillons à analyser, une calibration de la colonne est effectuée par passage d'étalons dont la composition et la concentration sont connues.

9.2 Passage des échantillons

Les échantillons à analyser sont centrifugés à 5000 t/min (Jouan C 400 SA-L) afin d'éliminer les bactéries et les macromolécules.

10. Mesure de la thermorésistance

Le suivi de l'évolution du paramètre de résistance à la chaleur pour chaque bactérie est effectué dans des flacons "pénicilline". Cette méthode se rapproche de celle utilisée par Barillère *et al.* (1985) et Doutsias (1974).

10.1 Préparation des milieux

Les milieux MRS, le moût et la bière sont préparés comme indiqué aux paragraphes 2.4.1 et 2.4.2. Dans le cas du test de la thermorésistance en présence de houblon, 330 mg de cônes de houblon séché sont infusés dans 1 litre d'eau distillée portée à ébullition pendant une heure. Après filtration et rajustement à un litre par adjonction d'eau distillée, cette solution est utilisée pour la préparation du milieu MRS.

Pour tester la thermorésistance en présence d'éthanol nous avons utilisé les flacons contenant le milieu MRS et nous y avons ajouté de l'éthanol absolu dégazé et stérile de façon à obtenir une concentration finale de 3,3 % d'éthanol v/v.

10.2 Préparation de la suspension

Les souches sontensemencées dans un milieu identique à celui utilisé pour le test de la thermorésistance. La même suspension en début de phase stationnaire est utilisée pour les différentes températures testées.

10.3 Test de thermorésistance

Les flacons "pénicilline" contenant 19 ml de milieu sont plongés dans un bain marie thermostaté à des températures comprises entre 48°C et 65°C. L'équilibre des températures est effectif après 10 minutes.

Au temps zéro, 1 ml d'une suspension bactérienne contenant approximativement 10^9 cellules/ml est introduit dans le flacon. Le milieu est alors homogénéisé par un mouvement de vortex. A intervalle de temps définis les bactéries survivantes sont dénombrées en gélose profonde (tubes de Félix).

11. Mesure de la résistance au pH acides

La méthode est similaire à celle utilisée pour la thermorésistance. Le pH du moût est ajusté avec H₂SO₄. Les cultures mères sont réalisées à pH 4,5. Le test de la résistance se fait à température ambiante.

12. Mesure de la résistance à l'oxygène dissous

L'étude de la résistance de *Pectinatus* et de *Megasphaera* à l'oxygène dissous est réalisée en fermenteur Sétric. Après stérilisation à l'autoclave (paragraphe 8.3) et vidange de l'eau contenue dans le fermenteur, 1,5 litre de moût est introduit par filtration tangentielle sur filtre de 0,45 µm (module Sartorius R.). L'oxygène dissous est éliminé par barbotage d'un mélange de gaz (N₂ 85%, CO₂ 15%). Après étalonnage des sondes, la concentration désirée en oxygène dissous dans le milieu est ajustée par bullage d'air. L'arrivée de gaz est fermée et le fermenteur est isolé de toute pollution de gaz extérieur. La pression dans le fermenteur est en équilibre avec la pression atmosphérique. La concentration en oxygène dissous doit rester stable durant 24 heures avant toute manipulation.

Les micro-organismes sontensemencés à des populations de 10^7 cellules/ml dans le fermenteur à partir de cultures mères en phase de croissance après centrifugation à 3000 t/min (Beckman J2 21M) et rinçage avec du moût stérile dépourvu de réducteur.

La concentration en oxygène dissous est maintenue constante et suivie toutes les 30 mn. A intervalle de temps défini les bactéries survivantes sont dénombrées en gélose profonde (milieu MRS contenant 4 g/l de Na₂S, 9H₂O) en tube de Félix.

13. Micro-brasserie

Pour différentes raisons, l'expérimentateur peut avoir besoin de reproduire à l'échelle du laboratoire le procédé de fabrication de la bière. Pour cela il dispose d'outil comme les micro-brasseries, les mini-brasseries ou les brasseries pilotes. Chacune de ces appellations correspond à une installation de capacité et de finalité différentes.

La micro-brasserie est une installation de 5 à 50 litres. Elle est décrite par de nombreux auteurs parmi lesquels De Clerck et De Clerck (1966) et Harrison *et al.* (1987). Les essais à cette échelle servent avant tout à l'évaluation grossière de nouvelles matières premières ou d'une nouvelle souche de levure. Il est évident que la fabrication de la bière à cette échelle est difficilement transposable à l'échelle industrielle, phénomène connu en génie des procédés sous le terme de scaling-up. Les faiblesses rencontrées par ce type d'installation par rapport à la brasserie industrielle sont : les effets de bord, l'agitation, l'oxydation, les rapports de surfaces, la hauteur hydrostatique et bien d'autres. Les résultats obtenus sont à interpréter avec beaucoup de prudence avant extrapolation à plus grande échelle, le produit fini fabriqué dans ces conditions ne ressemblant pas toujours à de la bière.

13.1 Préparation des cultures mères

Une souche pure de *Saccharomyces cerevisiae* est mise en culture à 32°C dans du moût stérile et oxygéné. Cette suspension de levures est utilisée pour ensemercer 7 autres litres de moût. Au cours de la fermentation le milieu est refroidi progressivement jusqu'à 8°C.

Les cultures mères de *Pectinatus cerevisiiphilus* et de *Megasphaera cerevisiae* sont réalisées dans du moût anaérobie à 8°C.

13.2 Montage

Le montage utilisé est présenté sur la figure 12. La fermentation principale est réalisée dans un fermenteur de 20 litres de marque Biolafitte (Saint Germain en Laye, France). Les caractéristiques de ce fermenteur sont :

- capacité totale : 20 litres
- capacité utile : 18 litres

- diamètre de la cuve : 22 cm
- hauteur de la cuve : 57 cm

La platine supérieure en acier inoxydable supporte différentes sorties et entrées :

- une entrée reliée directement au flacon d'ensemencement
- une entrée pour l'ensemencement de *Pectinatus cerevisiiphilus*
- une entrée d'air stérile
- une sortie pour l'évacuation du dioxyde de carbone évitant la montée en pression dans le fermenteur
- une sortie permettant de vider le fermenteur au 3/4

Cette sortie est directement reliée par un tuyau à un fût de bière de 30 litres de contenance.

13.3 Stérilisation

Le fermenteur est rempli avec 12 litres de moût frais. Le fût de bière est mis sous atmosphère de CO₂. L'ensemble du montage (fermenteur, moût, fût, tuyaux et filtres) est stérilisé par autoclave à 105°C pendant 40 minutes.

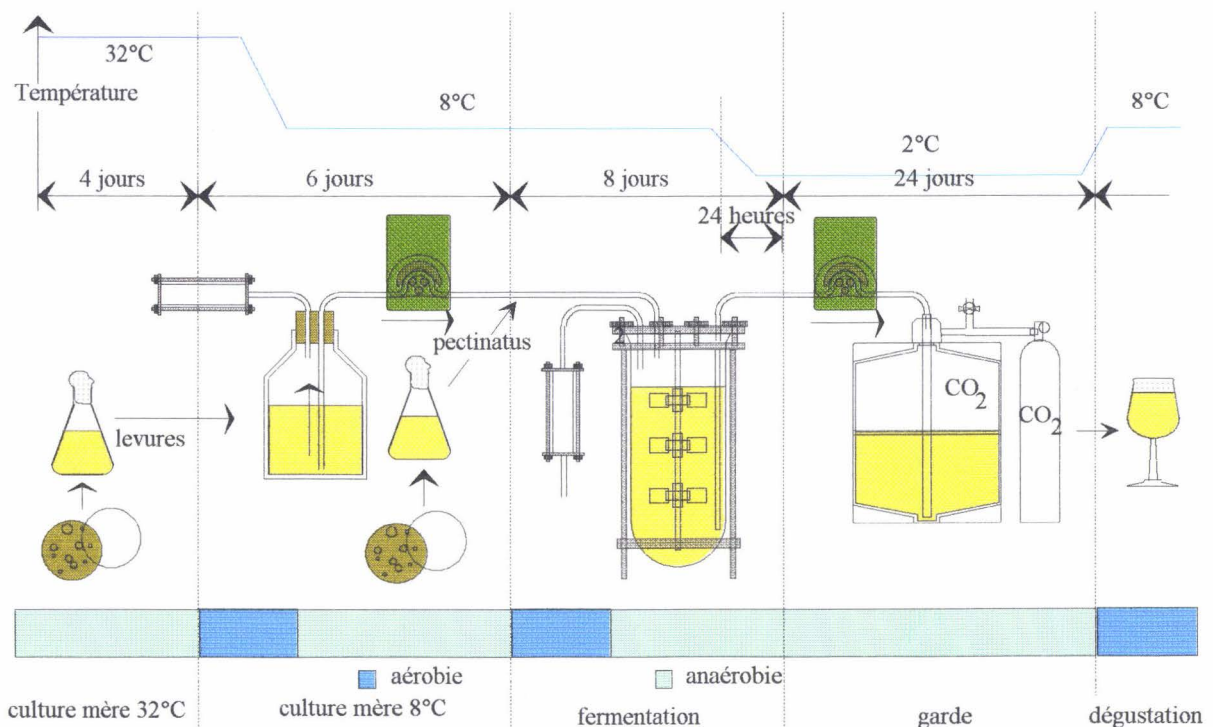


Figure 12 : Montage de la micro-brasserie utilisée pour la fermentation des bières

13.4 Fermentation

L'ensemble de l'installation est placé en chambre froide à 8°C à l'abri de la lumière. Le moût est saturé en oxygène à l'air. L'ensemencement se fait à l'aide d'une pompe (Heidolph Rumo 100) au 1/7^{ème} du volume (soit $2 \cdot 10^8$ levures/ml). La fermentation principale dure 8 jours sans agitation. En fin de fermentation la bière est refroidie à 2°C pour favoriser la sédimentation des levures. Le traversage est réalisé vers le fût sous atmosphère de CO₂. La garde dure 24 jours à 2°C. La dégustation est faite juste après le soutirage.

Plusieurs fermentations sont réalisées simultanément :

- une bière témoin sans contamination
- une bière contaminée en début de fermentation par *Pectinatus cerevisiiphilus* (300 cellules/ml).
- une bière contaminée en début de fermentation par *Megasphaera cerevisiae* (300 cellules/ml).

13.5 Filtration

L'installation est constituée d'un filtre (figure 13) (stérilisé par autoclave à 130°C, 15 minutes) dont l'extrémité est raccordée à la sortie d'un fermenteur contenant de la bière fermentée par une population mixte de 10^7 levures/ml (*Saccharomyces cerevisiae*) et de 10^6 bactéries/ml (*Pectinatus cerevisiiphilus* ou *Megasphaera cerevisiae*). Du dioxyde de carbone stérile (1,5 bar) est introduit dans le fermenteur. Un by-pass permet de purger l'ensemble du montage. La fermeture de celui-ci permet de pousser la bière vers le filtre. Le corps filtrant est composé d'un carton filtre clarifiant (3 mm) et d'une couche de 2 cm de Kieselguhr (800 g/m²). La surface filtrante est de 12,5 cm². Cent millilitres de rétentat sont filtrés (filtre d'acétate de cellulose de 45µm, Sartorius) sous atmosphère de dioxyde de carbone. Le filtre est ensuite placé sur gélose MRS (cycloheximide) incubée à 32°C en anaérobie pour dénombrement des bactéries.

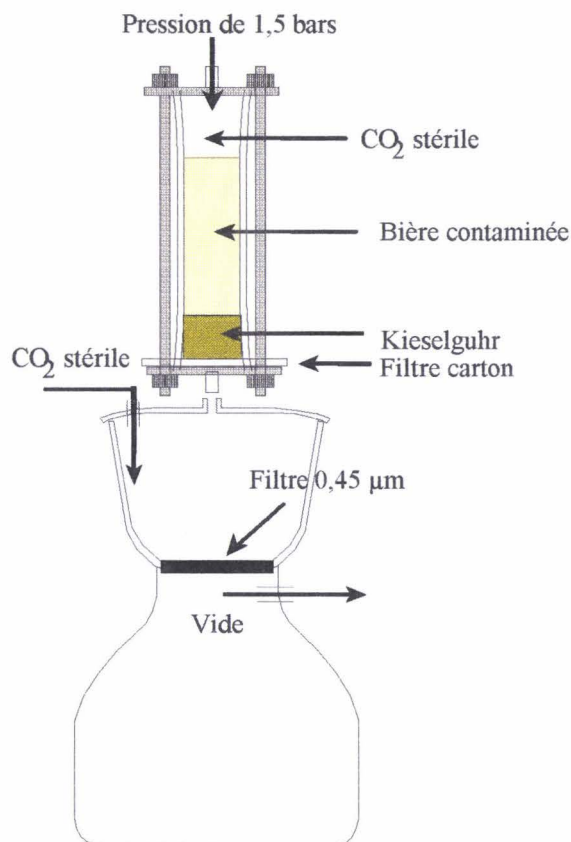


Figure 13 : Schéma du montage : filtre à kieselguhr et filtre 0,45 µm pour dénombrement

13.6 Suivi des populations

Un montage similaire a été réalisé en fermenteur Sétric SGI de 2 litres avec prélèvements réguliers pour permettre le dénombrement des levures sur cellule de Thoma et des bactéries en tubes de gélose (tubes de Félix). Les prélèvements sont réalisés après une agitation de 30 secondes à 400 tours/min permettant une remise en suspension des levures et des bactéries.

Les contaminations sont de (300 cellules/ml) pour *Pectinatus cerevisiophilus* et de ($5 \cdot 10^5$) pour *Megasphaera cerevisiae*.

- Résultats et discussion -

1. Influence de facteurs physico-chimiques sur les cinétiques de croissance de *Pectinatus cerevisiiphilus* et de *Megasphaera cerevisiae*.

1.1 Etude préliminaire

Peu d'informations sur les cinétiques et les conditions de développement de ces micro-organismes dans la bière, en particulier en présence de levures, sont actuellement disponibles. Ce travail préliminaire décrit le comportement de *P. cerevisiiphilus* et de *M. cerevisiae* en cultures pures, sur des souches de collections internationales isolées de la bière. Ce travail a pour objet de déterminer les limites et les optima de croissance de *P. cerevisiiphilus* et de *M. cerevisiae*. Il constitue une première approche pour permettre l'élaboration d'un plan d'expériences. En conséquence de quoi, nous limiterons les résultats présentés à l'essentiel. Les résultats obtenus étant sensiblement les mêmes pour chaque genre.

Les différentes études de l'influence des facteurs physico-chimiques sur la croissance de *Pectinatus* et de *Megasphaera* ont été réalisées en suivant l'évolution de la population toutes les deux heures. Sur les cinq souches *P. sp.* DSM 20465, *P. cerevisiiphilus* DSM 20466, *P. frisingensis* ATCC 33332, *M. cerevisiae* DSM 20461 et 20462, les cinétiques obtenues ont permis de déterminer précisément pour chacune d'entre elles les taux spécifiques de croissance et les temps de latence. La figure 14 en donne un exemple.

En ce qui concerne le pH on observe des phases de latence d'autant plus longues que la différence du pH du milieu de culture par rapport au pH du milieu de préculture est élevée (Figure 15). Les temps de latence sont nuls lorsque les pH sont identiques.

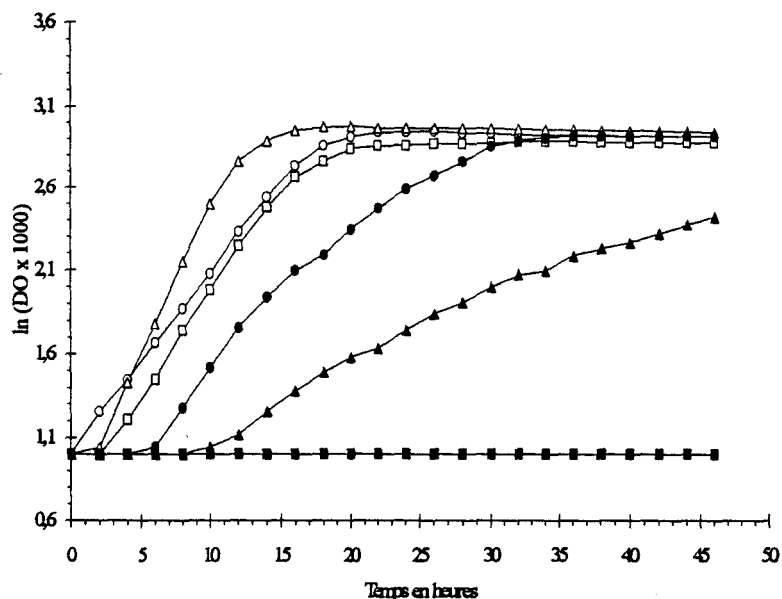


Figure 14 : Cinétiques de croissance de *Pectinatus cerevisiophilus* sur milieu MRS modifié à différents pH 3,5 et 8,0 (■), 4,0 (▲), 4,5 (●), 5,0 (□), 6,0 (△), 7,0 (○), sous agitation à 34°C. L'inoculum a été préparé à pH 7.

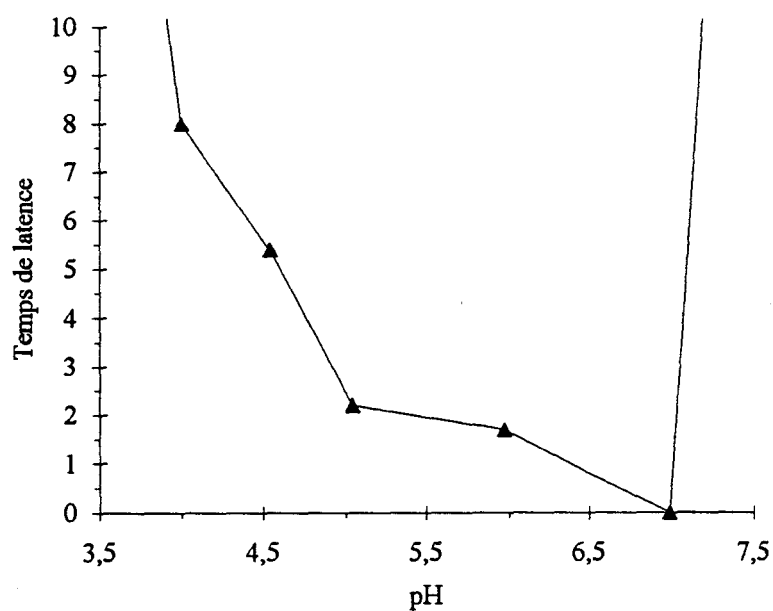


Figure 15 : Temps de latence de *Pectinatus cerevisiophilus* sur milieu MRS modifié à différents pH sous agitation à 34°C. L'inoculum a été préparé à pH 7.

Les souches de *P. cerevisiiphilus* étudiées présentent une plage de croissance entre le pH 3,5 et pH 8, plus large que celle observée pour *M. cerevisiae*, le pH étant compris entre 4 et 7,5 (Figure 16).

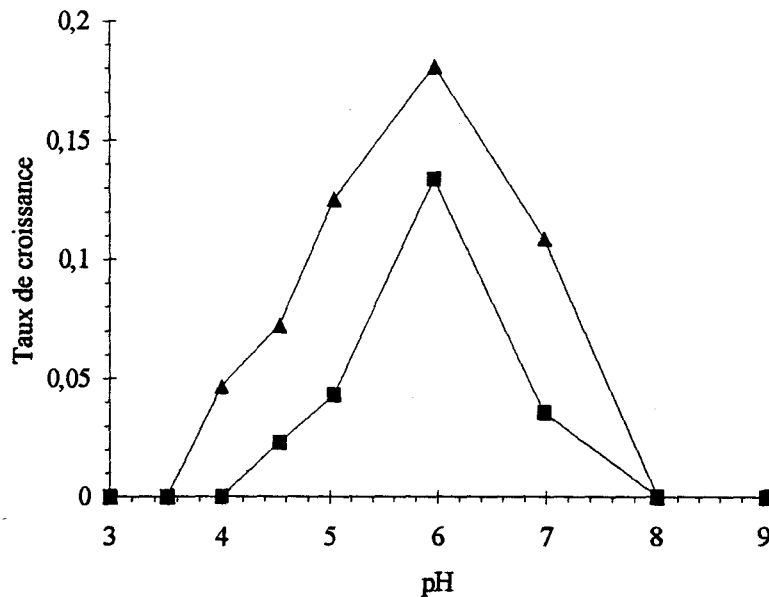


Figure 16 : Taux de croissance (μ_{max}) de *Pectinatus cerevisiiphilus* (▲) et de *Megasphaera cerevisiae* (■) en fonction du pH du milieu, sous agitation à 34°C.

Toutes les souches de *Pectinatus* et de *Megasphaera* ont un pH optimal égal à 6, mais l'ensemble de nos expériences a montré que, pour un même pH, les taux de croissance de *Pectinatus* sont toujours supérieurs à ceux de *Megasphaera*. Dans la bière, le pH est inférieur au pH optimal mais il faut noter qu'à pH 4,5 le taux de croissance spécifique de *Pectinatus* n'est réduit que de 60 %. Le faible nombre de points expérimentaux ne nous permet pas d'être plus précis.

Contrairement aux résultats de Haikara et Lounatmaa (1987) et de Soberka *et al* (1989), l'étude fine de l'influence de la température ne permet pas de définir une température optimale de croissance mais un plateau qui se situe, quelles que soient les souches, entre 30°C et 37°C (Figure 17). La diminution du taux spécifique de croissance est faible jusqu'à 40°C. Par contre, aucune croissance n'est observée au-dessus de 43°C.

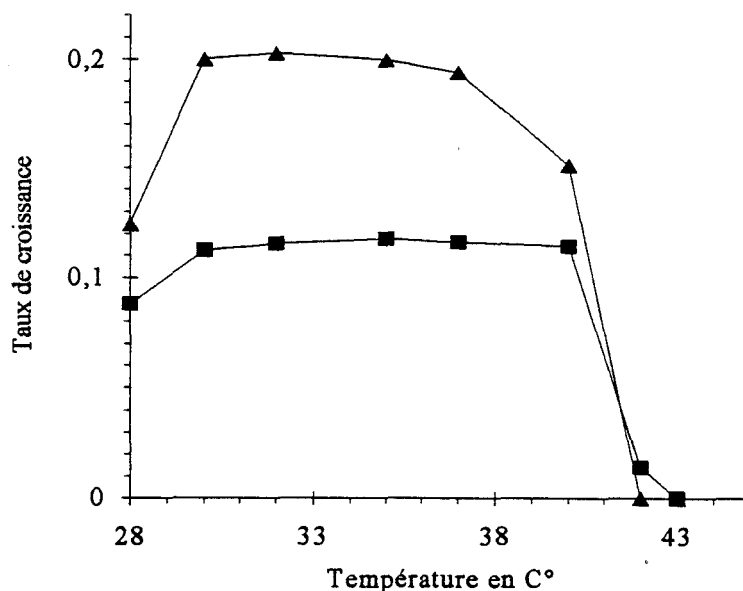


Figure 17 : Taux de croissance (μ_{max}) de *Pectinatus cerevisiophilus* DSM 20466 (▲) et de *Megasphaera cerevisiae* DSM 20461 (■) en fonction de la température, sous agitation à pH 7,1.

Ces résultats ainsi que ceux concernant la thermosensibilité de ces micro-organismes (destruction de ces bactéries par un traitement d'une minute à 60°C, Lee *et al.* (1980)), suggèrent que ces souches, lorsqu'elles sont observées dans la bière, ne trouvent pas leur origine dans une contamination du moût mais plus probablement, dans une contamination par les levains lors de leur recyclage.

Dans ce travail préliminaire, l'étude à des températures inférieures à 28°C n'a pas été réalisée. Outre son intérêt fondamental pour la détermination des énergies d'activation qui, très généralement, se situent entre 54 kJ et 67 kJ (Pirt 1974), elle est essentielle pour l'étude du comportement des souches en brasserie lors de la fermentation et de la garde.

Sans l'adaptation préalable à de hautes concentrations en éthanol, la croissance de *Pectinatus* et de *Megasphaera* est affectée par cet alcool (Figure 18). Ces travaux préliminaires ont montré qu'à pH 7,1 l'inhibition de *Pectinatus* commence à 2 % d'éthanol et semble complète à 3 %. Ces résultats semblent en contradiction par rapport aux travaux de Soberka *et al.* (1989) qui notent une croissance jusqu'à une concentration de 6% dans les moûts de brasserie. *Megasphaera* n'est que légèrement inhibée à partir de 2%, l'arrêt de la croissance se produisant pour des teneurs en éthanol supérieures à 4%. Cette tolérance est plus marquée que celle observée par Haikara et Lounatmaa (1987). Ces différences peuvent être

liées en particulier au mode d'action supposé de l'alcool qui modifierait la perméabilité cellulaire et donc des échanges transmembranaires, étroitement dépendants des constituants du milieu. D'autres résultats préliminaires tendraient à confirmer cette hypothèse, la résistance à l'éthanol augmentant à des pH inférieurs à 7,1.

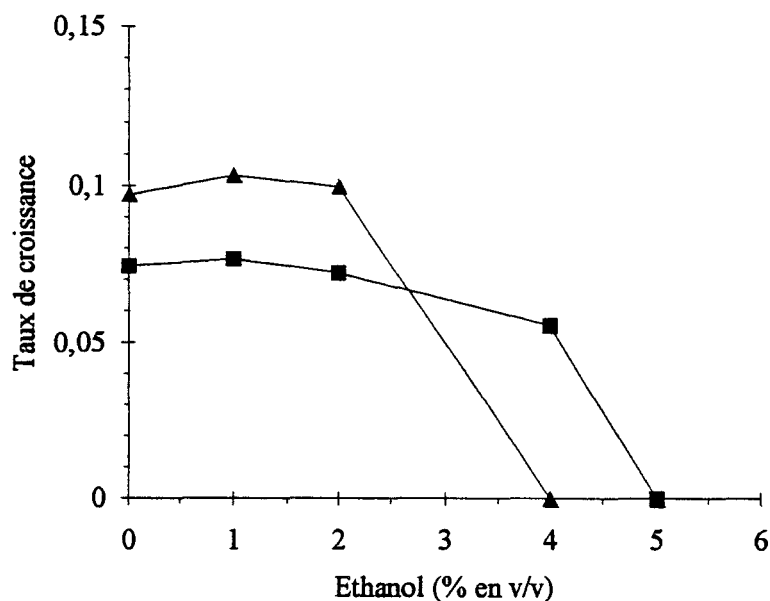


Figure 18 : Taux de croissance (μ_{max}) de *Pectinatus* sp. DSM 20465 (▲) et de *Megasphaera cerevisiae* DSM 20462 (■) en fonction des concentrations en éthanol dans le milieu, sous agitation à pH 7,1 et à 34°C.

Ces résultats sont cependant à moduler en fonction du milieu bière, qui contient non seulement des composés complexes d'origine végétale mais aussi des produits du métabolisme secondaire des levures présentes lors de la fabrication. Les différences entre nos résultats et ceux de la littérature peuvent provenir des conditions physico-chimiques (température, pH...) utilisées. En effet il peut très bien y avoir des effets synergiques entre les facteurs. Dans ces conditions, l'élaboration d'un plan d'expériences se justifie pleinement.

1.2 Elaboration d'un plan d'expériences

Le but de cette étude était de connaître l'influence relative des paramètres physico-chimiques sur la croissance de *Pectinatus* et de *Megasphaera*.

Nous avons utilisé les plans factoriels afin d'obtenir le maximum d'informations. Celui-ci a l'avantage d'être sans risque dans l'étude des phénomènes et ne nécessite pas d'hypothèse sur la négligibilité des interactions entre variables.

Nous avons choisi d'étudier les facteurs : température, pH et éthanol. Ces facteurs sont dans le milieu bière, susceptibles d'influencer la croissance de ces micro-organismes contaminants.

Les résultats de l'étude préliminaire (¹ paragraphe 1.1 page 71) nous ont permis de définir le domaine à explorer et de délimiter les bornes du plan factoriel.

**Souches : *Pectinatus* sp DSM 20465, *P. cerevisiophilus* DSM 20466,
P. frisingensis ATCC 33332**

Milieu : MRS

Températures : 35; 32; 26, 22, 15, 8°C

pH : 4; 5,3; 6; 7,2

Ethanol : 0; 2,5; 5 % v/v

Les expériences ont été doublées à 35, 32 et 26 °C.

Souches : *Megasphaera cerevisiae* DSM 20461 et 20462

Milieu : MRS

Températures : 35; 32, 22, 18, 15, 8°C

pH : 4; 5; 6; 7

Ethanol : 0; 2,5; 5 % v/v

Les expériences ont été doublées à 35, 32 et 22 °C.

Enfin pour connaître l'influence de ces facteurs sur le développement des bactéries dans des conditions proches de celles rencontrées en brasserie, nous avons construit d'autres plans factoriels en utilisant les facteurs suivants :

¹  renvoie à un paragraphe ou à une page

Souches : *Pectinatus cerevisiiphilus*, *P. frisingensis*

Milieu : moût

Températures : 32; 22; 15; 8; 2°C

pH : 4; 5,1; 5,9

Ethanol : 0; 2,5; 5; 7,5 % v/v

1.2.1 Mesure de la variable

Pour limiter les sources d'erreur dans l'analyse d'un plan d'expériences, il est primordial que la variable à mesurer ait un seuil de sensibilité convenable, qu'il n'y ait pas d'erreur dans sa mesure, et que les facteurs étudiés soient les seuls paramètres variables pouvant influencer les résultats.

Présence de réducteur en forte concentration.

Nous avons vérifié que l'addition d'un réducteur pour assurer l'anaérobiose n'influence pas la croissance. Les micro-cuves utilisées n'étant probablement pas parfaitement étanches aux gaz, nous avons utilisé une concentration élevée de réducteur. Nous avons préféré Na₂S à la cystéine-HCl pour éviter la formation de peroxydes à l'autoclavage (Morgan *et al.* 1986).

Des cinétiques de croissance de *Pectinatus cerevisiiphilus* DSM 20466 ont été suivies sur biophotomètre en présence de différentes concentrations en Na₂S. Pour chacune d'elle, le taux de croissance et l'absorbance maximale ont été calculés. Le tableau 1 montre qu'une concentration de 25,6 mmol/l permet de garantir l'anaérobiose dans les micro-cuves sans ralentir la vitesse de croissance et diminuer la biomasse de façon significative. D'autres essais réalisés sur *Megasphaera* ont donné des résultats similaires.

Na ₂ S en mmol/l	6,4	12,8	25,6	51,3	102,6	128,2
Taux de croissance (h ⁻¹)	0,361	0,345	0,385	0,333	0,300	0,429
Absorbance maximale	0,992	1,097	0,898	0,735	0,545	0,221

Tableau 1 : Evolution des paramètres de croissance de *Pectinatus cerevisiiphilus* DSM 20466 en fonction de la concentration en Na₂S dans le milieu de culture

Une étude réalisée par Tholozan *et al.* (1993) a montré que les ions sodium influencent peu le taux de croissance et la formation de la biomasse de *Pectinatus frisingensis*, jusqu'à la concentration de 83 mmol/l. L'addition des 25,6 mmol/l de sodium introduit par Na₂S et des 60 mmol/l déjà présentes dans le milieu MRS donne une concentration équivalente. Nos résultats sont donc en accord avec ceux de Tholozan *et al.* (1993).

Mesure de la croissance

La croissance bactérienne a été suivie par mesure de l'absorbance. Cette technique nous a permis de suivre plus de 200 cinétiques de croissance simultanément. Toutefois, la mesure de l'absorbance peut poser quelques problèmes. La croissance de *Pectinatus* dans un milieu riche s'accompagne d'un trouble très important (Haikara 1985) en phase stationnaire correspondant à une absorbance mesurée supérieure à 2,5. Chez *Megasphaera*, l'absorbance maximale ne dépasse guère 1,1. Si pour cette dernière cela ne pose pas de problèmes techniques, il en va tout différemment de *Pectinatus*. En effet une absorbance aussi élevée sort très largement des limites de linéarité d'un spectrophotomètre. Les croissances étant réalisées en micro-cuves, en milieu anaérobie, il n'a pas été possible de diluer la suspension bactérienne avant chaque mesure. Quand cela était possible (milieu MRS), nous avons limité la source de carbone (glucose : 2 g/l) pour réduire la quantité de biomasse en phase stationnaire. De plus pour corriger l'erreur due à la non linéarité de l'appareil de mesure, nous avons déterminé la relation existante entre l'absorbance mesurée par l'appareil et l'absorbance réelle. L'absorbance réelle est donnée par la mesure sur le milieu dilué et doit se situer dans la zone de linéarité du spectrophotomètre. L'absorbance a été mesurée sur une suspension de cellules de *Pectinatus cerevisiiphilus* dans du milieu MRS. La suspension bactérienne utilisée a été prise en fin de phase exponentielle puisque la morphologie de *Pectinatus* évolue en fonction de l'âge (Lee *et al.* 1978; 1980; Haikara 1985) et que nous nous intéressons à la biomasse formée pendant et en fin de phase de croissance. Les dilutions sont faites avec le même milieu. Parallèlement la correspondance entre l'absorbance et le nombre de bactéries a été déterminée par régression non linéaire (Figure 19). Le nombre de bactéries est déterminé par comptage sur cellule de Thoma de façon à tenir compte de l'ensemble de la biomasse présente, comprenant à la fois les cellules mortes et les cellules vivantes.

L'équation est la suivante :

$$\text{Nombre de bactéries} = 10^8 \times (-7,14 \times \text{absorbance mesurée}) / (-8,51 + \text{absorbance mesurée})$$

$$r^2 = 0,99$$

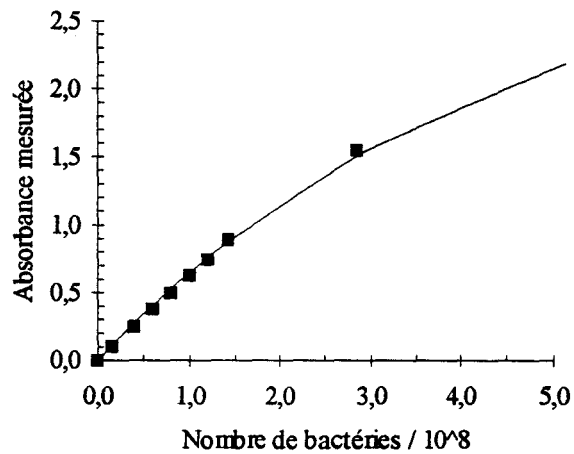


Figure 19 : Relation existant entre l'absorbance mesurée et le nombre de bactéries pour *Pectinatus cerevisiophilus* DSM 20466. Valeurs expérimentales (■), valeurs calculées à l'aide de l'équation (—).

Pour *Megasphaera*, l'absorbance ne dépassant pas 1,1, nous ne tiendrons pas compte de la non-linéarité du spectrophotomètre.

Le rapport est le suivant :

$$\text{nombre de bactéries} = 1,7 \cdot 10^8 \times \text{absorbance mesurée}$$

$$r^2 = 0,96$$

1.3 Choix du modèle

Différents modèles peuvent être utilisés pour modéliser les effets de paramètres comme, la température, l' a_w , ou le pH, sur les courbes de croissance. Les modèles de Ratkowsky *et al.* (1982) (modèle de la racine carrée) et le modèle de Schoolfied (1981) donnent de très bons résultats. (Adair *et al.* 1989; Zwietering *et al.* 1991; Alber et Shnaffner 1992). Cependant s'ils intègrent dans leur équation la température (modèle de Schoolfied et Ratkowsky) et même après transformations pour le modèle de Ratkowsky, l' a_w (Mac Meeking *et al.* 1987) ou le pH (Adams *et al.* 1991), ils ne permettent pas d'intégrer simultanément les trois paramètres étudiés.

Notre choix s'est donc porté sur le modèle multifactoriel (modèle quadratique) qui, bien que moins robuste, permet d'intégrer les trois paramètres, température, pH et concentration en éthanol. De plus ce modèle offre la possibilité d'étudier les interactions entre ces trois paramètres.

La régression polynomiale modélise les valeurs de μ_{max} ou celles de la population maximale mais pas les courbes de croissance elles-mêmes. Il est donc nécessaire de déterminer préalablement le taux de croissance et la population maximale.

1.4 Détermination des taux de croissance par l'utilisation de modèles mathématiques

Habituellement la détermination du taux de croissance est faite par calcul de la pente par régression linéaire de la droite correspondant à la phase exponentielle.

Dans ce cas le choix des points expérimentaux à prendre en compte reste arbitraire. De plus les courbes de croissance ne présentent que rarement une phase exponentielle bien définie. Celle-ci correspond le plus souvent dans la pratique à un point d'inflexion, la courbe étant alors sigmoïde, d'où les difficultés pour la détermination de μ_{max} (Jason, A.C. 1983; Broughall et Brown 1984; Gibson *et al.* 1987). Dans ce cas la détermination de la pente de la tangente au point d'inflexion devient très subjective. Nous avons préféré déterminer les taux de croissance maximaux à l'aide d'un modèle.

Pour calculer le taux de croissance maximal et la population maximale, les modèles de Gompertz et logistiques sont les plus utilisés (Jason 1983; Gibson *et al.* 1987, 1988; Bratchell *et al.* 1989...). Contrairement au modèle logistique, le modèle de Gompertz donne des courbes sigmoïdes asymétriques par rapport au point d'inflexion.

Les formules mathématiques de ces deux modèles calculées par le logiciel STATICF sont légèrement différentes de celles couramment trouvée dans la littérature (Gompertz 1825; Ricker 1979). Elles sont de la forme :

$$\text{Modèle de Gompertz : } \ln(N/N_0) = a.e^{-(b/c)}.e^{(-c.t)}$$

$$\text{Modèle logistique : } \ln(N/N_0) = a / (1 + b.e^{(-c.t)})$$

Une transformation des équations similaires à celle décrite par Zwietering *et al.* (1990) nous a permis d'établir une correspondance entre les paramètres de ces équations et le taux de croissance.

Le taux de croissance est donné par l'expression :

$$ac / \exp$$

pour le modèle de Gompertz

$$\text{et } ac / 4$$

pour le modèle logistique.

Toutes les courbes de croissance dans MRS ont été modélisées à l'aide des deux modèles. La figure 20 en donne un exemple.

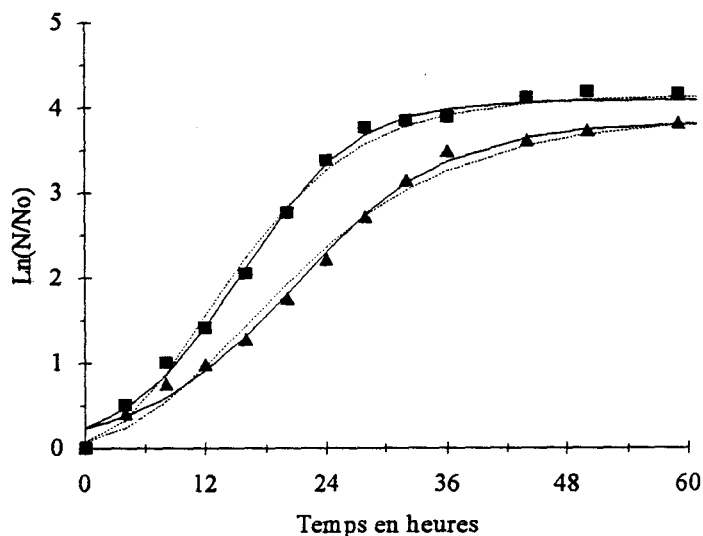


Figure 20 : Exemple de courbes de croissance de *Pectinatus* sp. à 32°C, pH 6 et pour une concentration en éthanol de 0% v/v (■) ou 5% v/v (▲) modélisées par le modèle de Gompertz (—) et le modèle logistique (---).

Ces modèles ont été comparés par leur valeur de r^2 et par le test de Fischer (test F). Pour la souche *P. sp.*, les valeurs des r^2 et des tests F sont rassemblées dans le tableau 2.

Tableau 2 : Valeurs des taux de croissance de *Pectinatus sp. DSM 20465* calculés à l'aide du modèle de Gompertz et du modèle logistique avec coefficient de corrélation et test F, population maximale de micro-organismes, coefficient métabolique et rendement cellulaire en fonction des variables température, pH et éthanol. (q est calculé à l'aide des valeurs des taux de croissance établis à l'aide du modèle logistique).

Temp. : température en °C; Eth. : éthanol en % v/v; r^2 : coefficient de corrélation; μ_{max} : taux de croissance maximal; ddl : degrés de liberté; Test F : test de Fisher; q : coefficient métabolique en g^{-1} de biomasse . g de carbone (substrat) . h^{-1} ; Y : rendement cellulaire en g de biomasse . g^{-1} de carbone (substrat).

Variables			Gompertz		logistique		ddl	Test F	Pop. max. /10 ⁸	q	Y
Temp.	pH	Eth.	r^2	μ_{max}	r^2	μ_{max}					
35	5,3	0	0,98	0,2027	0,98	0,2044	17	1,02	3,21	0,0935	2,1860
35	5,3	0	0,99	0,2242	0,99	0,2153	17	0,98	3,17	0,0997	2,1596
35	5,3	2,5	0,98	0,1958	0,98	0,1897	17	1,05	3,37	0,0827	2,2950
35	5,3	2,5	0,99	0,2145	0,99	0,2081	17	1,11	3,23	0,0947	2,1976
35	5,3	5	0,98	0,1234	0,98	0,1206	17	1,15	2,38	0,0748	1,6129
35	5,3	5	0,99	0,1421	0,99	0,1396	17	1,00	2,09	0,0987	1,4144
35	6	0	0,99	0,2941	0,99	0,2952	17	1,32	3,51	0,1223	2,4128
35	6	0	0,99	0,3038	0,99	0,2984	17	0,87	3,40	0,1278	2,3343
35	6	2,5	0,98	0,2575	0,99	0,2578	17	1,33	3,51	0,1075	2,3979
35	6	2,5	0,99	0,3038	0,99	0,2984	17	0,87	3,58	0,1220	2,4460
35	6	5	0,98	0,1581	0,98	0,1566	17	1,16	2,59	0,0882	1,7763
35	6	5	0,98	0,1939	0,98	0,1890	17	0,85	2,66	0,1038	1,8219
35	7,2	0	0,99	0,3085	0,99	0,2965	17	0,83	2,48	0,1752	1,6927
35	7,2	0	0,99	0,2870	0,99	0,2772	17	0,89	2,67	0,1525	1,8184
35	7,2	2,5	0,97	0,2233	0,97	0,2145	17	1,10	2,44	0,1290	1,6622
35	7,2	2,5	0,97	0,2361	0,97	0,2265	17	1,02	2,56	0,1296	1,7472
35	7,2	5	0,96	0,0967	0,98	0,0991	17	1,74	1,02	0,1388	0,7144
35	7,2	5	0,95	0,1063	0,97	0,1071	17	1,53	1,31	0,1173	0,9135
32	5,3	0	0,99	0,2049	0,99	0,2009	17	1,21	3,08	0,0956	2,1012
32	5,3	0	0,98	0,1752	0,98	0,1673	17	1,00	3,16	0,0776	2,1560
32	5,3	2,5	0,99	0,1909	0,99	0,1882	17	0,90	3,38	0,0814	2,3110
32	5,3	2,5	0,98	0,1680	0,98	0,1636	17	1,10	3,05	0,0786	2,0814
32	5,3	5	0,99	0,1261	0,99	0,1271	17	1,51	2,48	0,0751	1,6928
32	5,3	5	0,98	0,1168	0,98	0,1125	17	0,91	2,12	0,0778	1,4461
32	6	0	0,99	0,2709	0,99	0,2691	17	0,83	3,69	0,1060	2,5381
32	6	0	0,99	0,2586	0,99	0,2537	17	0,84	3,61	0,1021	2,4853
32	6	2,5	0,99	0,2815	0,99	0,2818	17	0,89	3,64	0,1134	2,4856
32	6	2,5	0,99	0,2321	0,99	0,2269	17	0,83	3,54	0,0938	2,4193
32	6	5	0,98	0,1712	0,98	0,1719	17	0,98	2,75	0,0915	1,8781
32	6	5	0,98	0,1625	0,98	0,1570	17	0,86	2,80	0,0819	1,9170
32	7,2	0	0,98	0,2330	0,98	0,2239	17	0,98	2,55	0,1284	1,7435
32	7,2	0	0,98	0,2221	0,98	0,2181	17	1,16	2,65	0,1206	1,8083
32	7,2	2,5	0,97	0,1952	0,97	0,1851	17	0,99	2,45	0,1106	1,6736
32	7,2	2,5	0,98	0,1924	0,98	0,1865	17	1,11	2,51	0,1090	1,7119
32	7,2	5	0,99	0,1023	0,99	0,1060	17	2,37	0,92	0,1663	0,6373
32	7,2	5	0,98	0,0922	0,99	0,0935	17	1,52	1,00	0,1355	0,6899

Suite du tableau 2

Variables			Gompertz		logistique		ddl	Test F	Pop. max. /10 ⁸	q	y
Temp.	pH	Eth.	r ²	μmax	r ²	μmax					
26	5,3	0	0,99	0,1399	0,99	0,1444	17	3,14	2,98	0,0708	2,0394
26	5,3	0	0,99	0,1210	0,99	0,1195	17	0,62	2,96	0,0589	2,0307
26	5,3	2,5	0,99	0,1317	0,99	0,1354	17	3,78	2,77	0,0716	1,8918
26	5,3	2,5	0,99	0,1058	0,99	0,1071	17	1,30	2,66	0,0589	1,8172
26	5,3	5	0,99	0,0849	0,99	0,0870	17	1,45	2,13	0,0599	1,4524
26	5,3	5	0,99	0,0863	0,99	0,0860	17	0,41	2,09	0,0602	1,4289
26	6	0	0,98	0,1525	0,98	0,1486	17	0,95	3,70	0,0589	2,5221
26	6	0	0,99	0,1872	0,99	0,1906	17	2,17	3,68	0,0760	2,5093
26	6	2,5	0,99	0,1462	0,99	0,1424	17	0,92	3,39	0,0616	2,3107
26	6	2,5	0,99	0,1737	0,99	0,1777	17	1,99	3,48	0,0748	2,3763
26	6	5	0,99	0,1134	0,99	0,1167	17	1,45	2,49	0,0688	1,6953
26	6	5	0,99	0,1339	0,99	0,1383	17	2,12	2,95	0,0687	2,0139
26	7,2	0	0,99	0,1465	0,99	0,1426	17	0,91	2,37	0,0885	1,6114
26	7,2	0	0,98	0,1591	0,99	0,1599	17	1,61	2,68	0,0876	1,8251
26	7,2	2,5	0,99	0,1312	0,99	0,1315	17	1,35	2,17	0,0864	1,5222
26	7,2	2,5	0,98	0,1393	0,99	0,1413	17	1,76	2,52	0,0798	1,7705
26	7,2	5	0,90	0,0367	0,92	0,0404	17	1,29	0,67	0,0875	0,4619
26	7,2	5	0,96	0,0457	0,98	0,0517	17	1,67	0,99	0,0762	0,6792
22	5,3	0	0,99	0,0453	0,98	0,0485	17	0,39	0,43	0,1632	0,2974
22	5,3	2,5	0,99	0,0397	0,99	0,0431	17	0,30	0,49	0,1286	0,3353
22	5,3	5	0,00	0,0000	0,00	0,000*			0,00		0,0000
22	6	0	0,99	0,0287	0,99	0,0344	17	0,63	1,03	0,0485	0,7077
22	6	2,5	0,99	0,0354	0,98	0,0391	17	0,76	0,40	0,1432	0,2735
22	6	5	0,00	0,0000	0,00	0,000*			0,00		0,0000
22	7,2	0	0,00	0,0000	0,00	0,000*			0,00		0,0000
22	7,2	2,5	0,00	0,0000	0,00	0,000*			0,00		0,0000
22	7,2	5	0,00	0,0000	0,00	0,000*			0,00		0,0000
15	5,3	0	0,97	0,0025	0,96	0,0026	17	0,74	0,08	0,0480	0,0538
15	5,3	2,5	0,97	0,0026	0,96	0,0024	17	0,59	0,06	0,0562	0,0428
15	5,3	5	0,00	0,0000	0,00	0,000*			0,00		0,0000
15	6	0	0,00	0,0000	0,00	0,000*			0,00		0,0000
15	6	2,5	0,00	0,0000	0,00	0,000*			0,00		0,0000
15	6	5	0,00	0,0000	0,00	0,000*			0,00		0,0000
15	7,2	0	0,00	0,0000	0,00	0,0000			0,00		0,0000
15	7,2	2,5	0,00	0,0000	0,00	0,0000			0,00		0,0000
15	7,2	5	0,00	0,0000	0,00	0,0000			0,00		0,0000

0,000* : valeurs des taux de croissance nuls utilisées pour établir les équations polynomiales.

Le test F correspond au rapport des variances de chaque modèle : variance du modèle de Gompertz / variance du modèle logistique. Plus la variance d'un modèle est petite, meilleur est le modèle. Le test F est donc supérieur à 1 quand le modèle logistique est plus satisfaisant que le modèle de Gompertz et inversement quand le test F est plus petit que 1. Cette différence n'est toutefois pas toujours significative. A l'aide d'une table de distribution de T (loi de Student) et en fonction du degré de liberté, il est possible de déterminer les valeurs du test F pour lesquelles la différence est significative à 95%. A titre d'exemple, pour

valeur de T égale à 2,110, si la valeur du test F est supérieure, cela veut dire que le modèle logistique est significativement meilleur et inversement s'il est inférieur à 1/2,110. Pour la souche *Pectinatus* sp. DSM 20465 la détermination des tests F montre que les modèles sont statistiquement très proches, seuls 8 cas sont significativement différents, 5 à l'avantage du modèle logistique et 3 à celui du modèle Gompertz. Le coefficient de corrélation permet aussi de comparer les deux modèles. Dans 8 cas, le r^2 pour le modèle logistique est supérieur à celui du modèle de Gompertz, l'inverse ne se vérifie que dans quatre cas. Dans l'ensemble l'avantage pour le modèle logistique est plus marqué pour les températures 26°C, 32°C et 35°C. Il semble donc que l'utilisation des deux modèles puisse se justifier. Des conclusions identiques peuvent être faites pour la souche *Pectinatus frisingensis* ATCC 33332. Cependant dans le cas de *Pectinatus cerevisiiphilus* DSM 20466, le modèle de Gompertz semble plus satisfaisant. Les avis sur l'efficacité de ces deux modèles divergent selon les auteurs et les souches bactériennes utilisées. Toutefois, le modèle de Gompertz reste le plus largement utilisé (Zwietering *et al.* 1991).

La comparaison des courbes modélisées laisse apparaître que graphiquement si l'on se restreint à la phase de croissance, le modèle logistique semble être plus fidèle aux points expérimentaux. Par conséquent, nous avons choisi pour déterminer les taux de croissance pour les trois souches de *Pectinatus* le modèle logistique.

En ce qui concerne la détermination de la population maximale, nous avons préféré utiliser les valeurs expérimentales pour déterminer les populations maximales. En effet comme le montre les exemples des figures 21 et 22, les courbes modélisées ne suivent pas toujours les valeurs expérimentales. Cela vient du fait que le modèle logistique ne modélise que la phase de latence, la phase de croissance et la phase stationnaire. Dans le cas d'une phase stationnaire courte suivi d'une phase de déclin, le manque de points en phase stationnaire comme la prise en compte de points correspondant à la phase de déclin peuvent introduire une erreur.

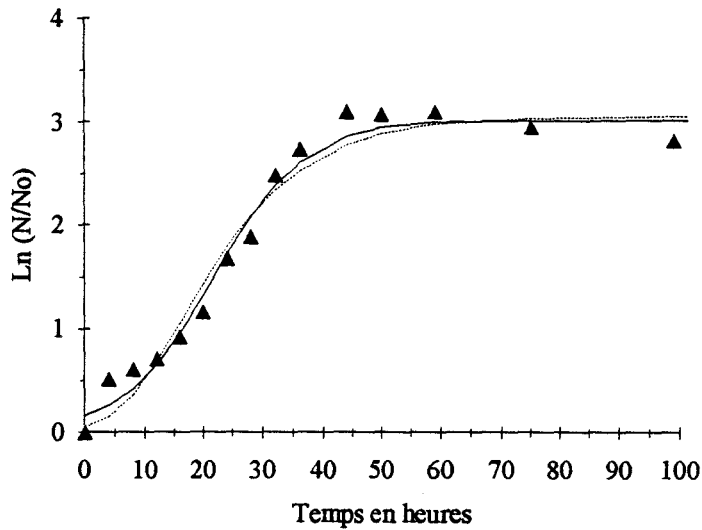


Figure 21 : Exemple de courbes de croissance de *Pectinatus* sp. à 35°C, pH 7 et pour une concentration en éthanol de 5% v/v modélisées par le modèle de Gompertz (—) et le modèle logistique (---).

Les mêmes modèles ont été utilisés et comparés pour modéliser les cinétiques de croissance de *Megasphaera cerevisiae* DSM 20461. La figure 22 en donne un exemple.

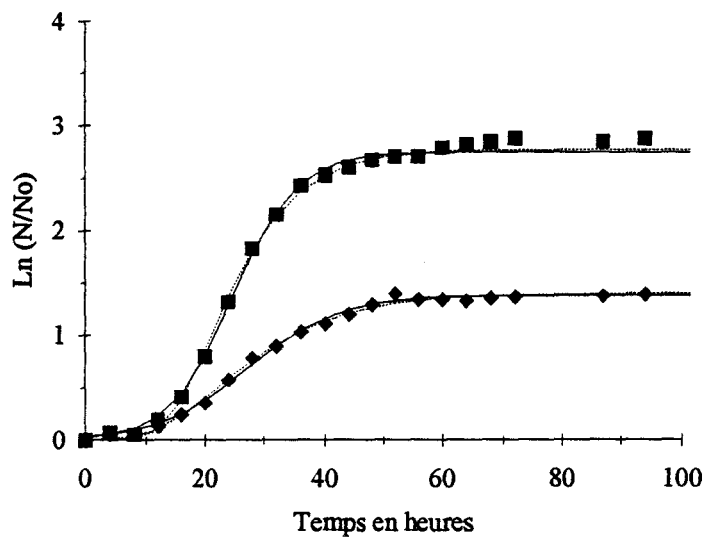


Figure 22 : Exemple de courbes de croissance de *Megasphaera cerevisiae* à 32°C, pH 6 et pour une concentration en éthanol de 0% v/v modélisées par le modèle de Gompertz (—) et le modèle logistique (---).

A la fois les valeurs de r^2 et du test F ne permettent pas donner une préférence à l'un ou à l'autre. Nous avons donc préféré utiliser le modèle de Gompertz puisqu'il est le plus utilisé des deux.

1.4.1 Problème posé par la souche *Pectinatus cerevisiiphilus* DSM 20466

Les cinétiques de croissance de la figure 22 montrent un phénomène de diauxie. Les courbes de croissance se composent de deux phases de croissance distinctes. Pour le plan d'expériences, dans le milieu MRS, toutes les courbes de croissance de *Pectinatus cerevisiiphilus* DSM 20466 présentent une allure similaire.

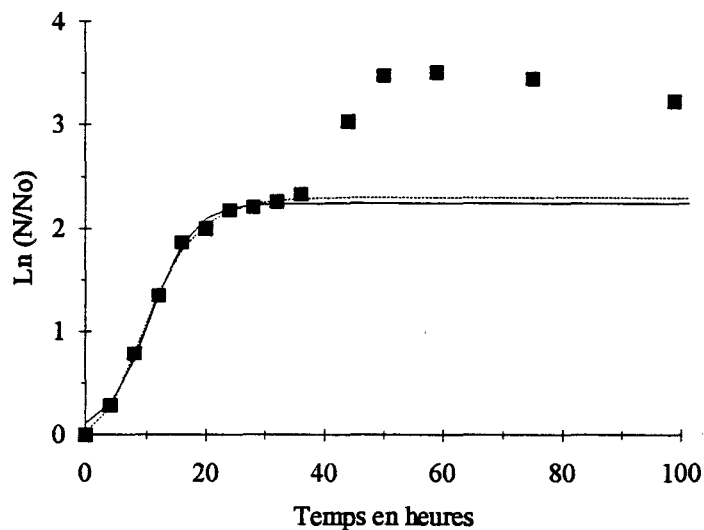


Figure 23 : Exemple de courbes de croissance de *Pectinatus cerevisiiphilus* à 35°C, pH 6 et pour une concentration en éthanol de 0% v/v, modélisées par le modèle de Gompertz (—) et le modèle logistique (—).

Plusieurs explications peuvent être proposées.

Dans un milieu de culture synthétique contenant une source de carbone utilisable immédiatement et une autre nécessitant une adaptation enzymatique de la cellule, un phénomène de diauxie peut être observé. La comparaison entre la composition du milieu MRS en début et en fin de croissance a révélé l'utilisation du glucose et du citrate comme source de carbone par *Pectinatus*. Des cinétiques de consommation de substrat réalisées en dehors de ce plan expérimental (Figure 55) montrent que le citrate est utilisé comme source de carbone une fois le glucose catabolisé.

L'agglutination des bactéries peut aussi expliquer la présence de deux phases de croissance. Ce phénomène est bien connu en microbiologie (Lewin 1984; Marshall 1984). Nous avons remarqué à plusieurs reprises sans que la cause en soit connue qu'il pouvait y avoir agglutination des bactéries du genre *Pectinatus* au cours de la phase exponentielle (Annexe 5). Dans un grand nombre de cas cette agglutination disparaît en fin de phase exponentielle. Ce phénomène conduit à une diauxie apparente puisque les bactéries se développent alors que la formation d'amas n'entraîne pas d'augmentation de la densité optique. Les rendements de croissance des deux phases exponentielle sont pour la grande majorité des courbes très proches ce qui est un argument en faveur de cette deuxième hypothèse. Pour la modélisation des courbes de croissance de *Pectinatus cerevisiiphilus* DSM 20466 nous n'avons pris en considération que les points expérimentaux correspondant à la première partie des courbes. La modélisation par les modèles de Gompertz ou logistique nécessite un nombre minimum de 15 points expérimentaux pour garantir des résultats fiables. Etant donné le faible nombre de points expérimentaux utilisés pour modéliser les courbes de *P. cerevisiiphilus*, nous avons pris la précaution de vérifier graphiquement le bon fondé de chaque résultat.

1.5 Analyse des résultats pour la souche *Pectinatus* sp. DSM 20465

Les valeurs des taux de croissances maximaux et des populations maximales de la souche *Pectinatus* sp. DSM 20465 sont rassemblés dans le tableau 2 (page 82). Les figures 24 et 25 en donnent un aperçu graphique.

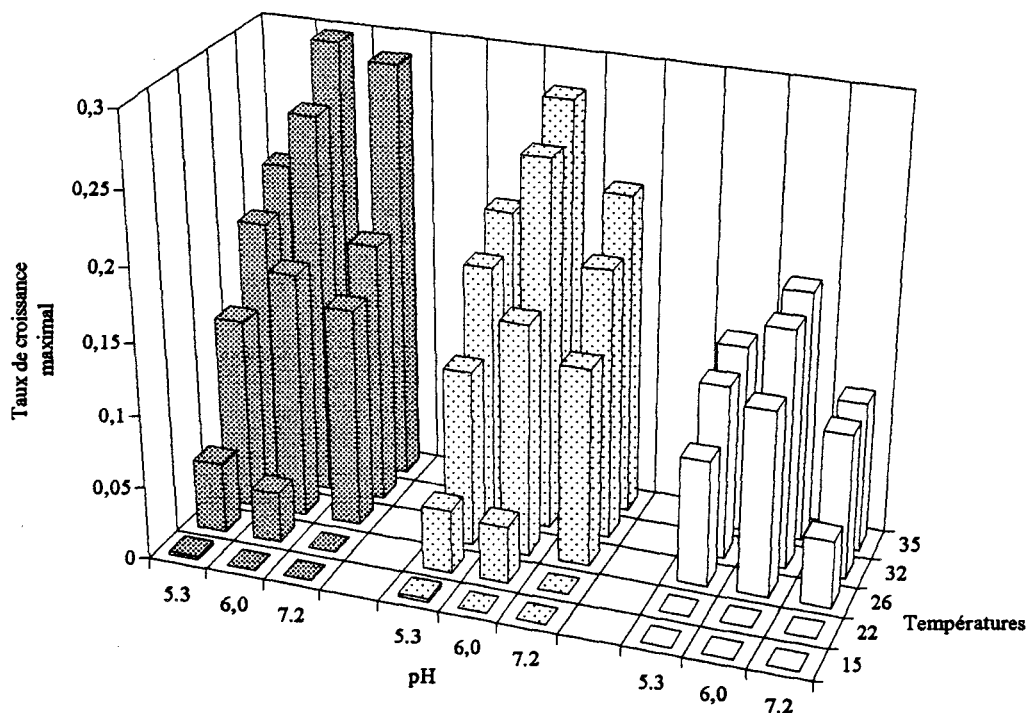


Figure 24 : Taux de croissance de *Pectinatus* sp. dans MRS à différents pH et températures pour des concentrations en éthanol (v/v) : 0 % (gris), 2,5 % (ombré), 5 % (blanc).

On peut remarquer une influence marquée de la température, du pH et de l'éthanol sur le taux de croissance maximal. Ceux-ci sont les plus élevés pour le pH 6 et sont d'autant plus bas que la concentration en éthanol augmente. Ils restent toutefois relativement conséquents même pour une concentration de 5 %. D'autres expériences ont montré que *Pectinatus* été capable de se développer jusqu'à des concentrations de 8,5 %. Le taux de croissance diminue progressivement avec la température. A 15°C il n'y a croissance que pour un pH de 5,3 et pour des concentrations en éthanol de 0 et 2,5 %. Une température basse favorise la croissance à des pH plus acides. Températures et pH bas sont des caractéristiques du milieu bière. *P. sp.* montre une certaine "adaptation" de la souche à cet environnement.

La température a un effet de tout ou rien sur la population atteinte en fin de phase de croissance (Figure 25).

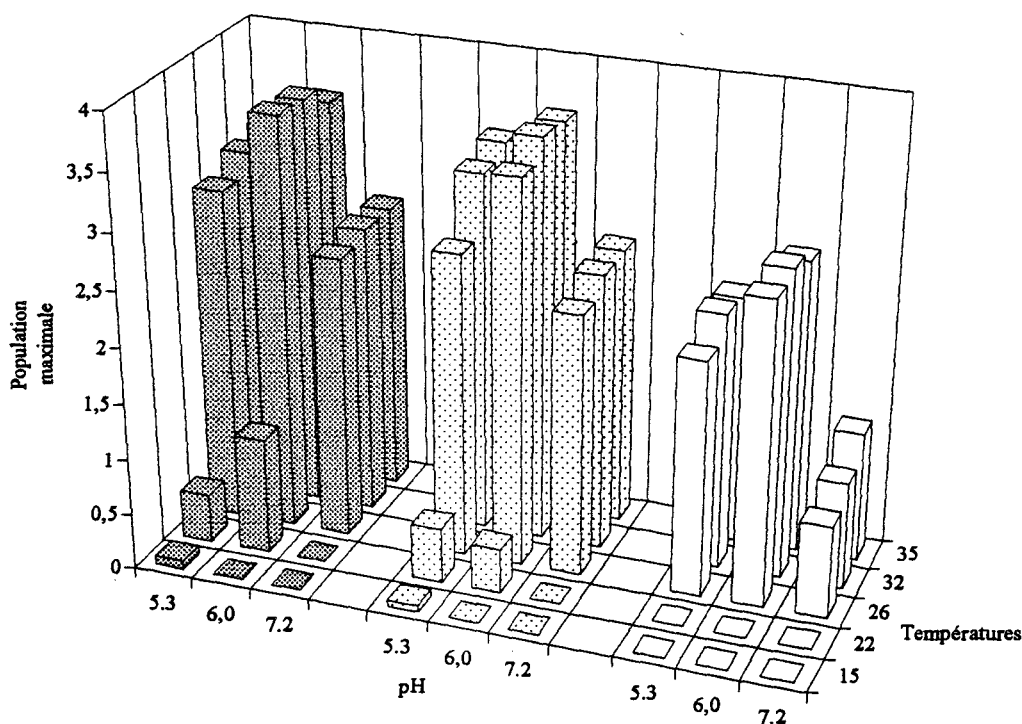


Figure 25 : Populations maximales (échelle / 10⁸) de *Pectinatus* sp. dans MRS à différents pH et températures pour des concentrations en éthanol (v/v) : 0 % (gris), 2,5 % (ombré), 5 % (blanc).

Pour des températures supérieures à 26°C, la population maximale est peu affectée par la température et cela quel que soit la concentration en éthanol. Inversement dès que la température descend en dessous des 26°C, le développement est considérablement réduit. Des études d'autres auteurs ont montré qu'il n'y avait plus de développement pour des températures inférieures à 15°C (Haïkara *et al.* 1981b; Soberka *et al.* 1989). Il est probable que des enzymes indispensables au développement de *Pectinatus* soient inactivées à basses températures.

Comme pour le taux de croissance, la croissance est la plus élevée pour le pH 6. Ces résultats sont donc identiques à ceux trouvés dans l'étude préliminaire (paragraphe 1.1 page 71) (Watier *et al.* 1993).

Une analyse en chromatographie liquide haute pression des échantillons en fin de croissance nous a permis de déterminer la quantité de substrat utilisé en fin de croissance. Le rapport entre la biomasse (g/l) et la quantité de substrat consommé (g/l) correspond au rendement cellulaire (Figure 26).

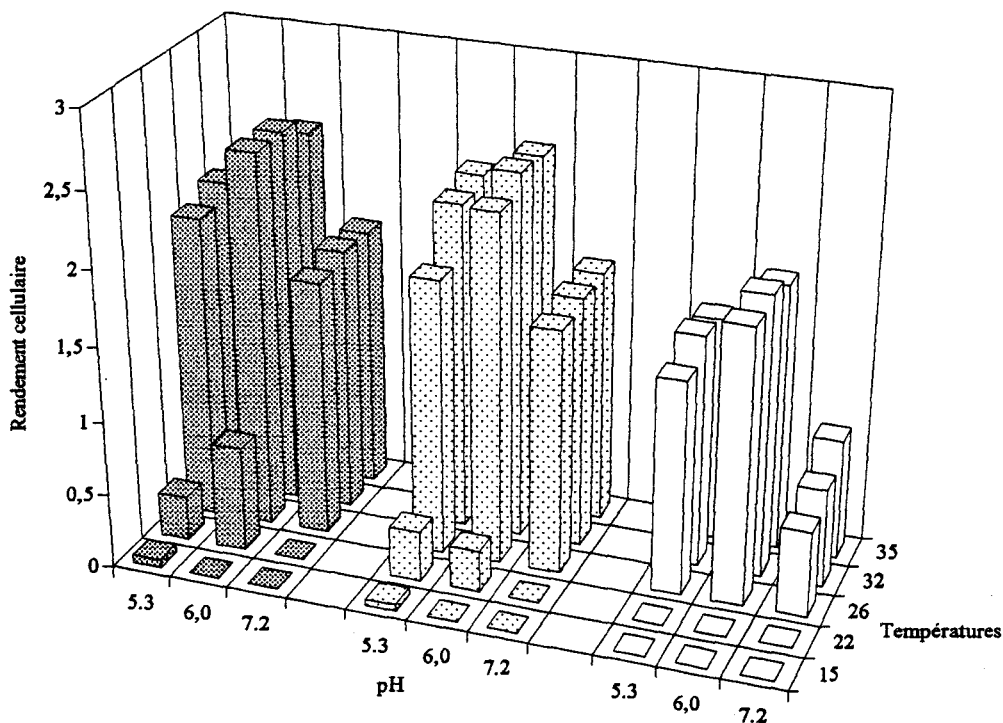


Figure 26 : Rendements cellulaires de *Pectinatus* sp. dans MRS à différents pH et températures pour des concentrations en éthanol (v/v) : 0 % (gris), 2,5 % (ombré), 5 % (blanc).

Pour des températures comprises entre 26°C et 35°C celui-ci est peu affecté par la température. L'effet de l'éthanol se fait ressentir à partir d'une concentration de 2,5 %. Le pH quant à lui, a une influence beaucoup plus marquée.

La souche *Pectinatus* sp. DSM 20465 a donné les résultats les plus homogènes. Nous avons donc utilisé ces résultats pour tenter d'établir un modèle de croissance de référence pouvant s'appliquer à l'ensemble du genre *Pectinatus*.

1.6 Réalisation d'un modèle quadratique pour le genre *Pectinatus*

Il est possible d'apporter des modifications à l'équation classique. Différents types de modèles polynomiaux ont été construits (Tableau 3). Les graphiques correspondants sont représentés par les figures 27 à 32.

Dans le plan d'expériences nous n'avons pas systématiquement observé une croissance. Certaines valeurs des taux de croissance maximaux et de la population maximale sont nulles. Il est difficile de savoir si celles-ci sont représentatives, et par conséquent, si elles doivent être introduites dans le modèle. Nous avons construit 2 équations, l'une sans les valeurs nulles (équation 1 : Tableau 3) et l'autre en incluant celles se trouvant juste à la limite de la croissance (équation 2). D'un point de vue statistique l'équation 2 est meilleure, le r^2 et le test F étant supérieurs. Il faut cependant noter qu'il est normal que la valeur du test F augmente, puisque le test F est fonction du nombre de degrés de liberté. D'un point de vue graphique, l'équation 2 semble respecter davantage les valeurs expérimentales notamment à basses températures. Les autres modèles seront donc construits en incluant les valeurs nulles.

La tendance actuelle est à l'utilisation de variables transformées (Gibson *et al.* 1988; Bratchell *et al.* 1989; Zaika *et al.* 1992; Buchanan *et al.* 1993; Membré *et al.* 1994). Les valeurs modélisées sont converties en logarithme népérien et la température en 1/K. Nous avons également utilisé des transformations, mais en leur donnant une signification biologique. Pour l'effet de la température nous avons utilisé l'équation d'Arrhenius (Arrhenius 1889). Elle est de la forme : $\mu = \mu_0 e^{(-Ea/RK)}$.

avec Ea = l'énergie d'activation.

R = constante des gaz parfaits

K = température en degrés Kelvin

Dans cette équation, la croissance bactérienne est assimilée à un ensemble de réactions enzymatiques, Ea étant l'élévation d'énergie nécessaire pour activer l'ensemble des réactions enzymatiques.

Tableau 3 : Equations obtenues par régression polynomiale donnant le taux de croissance, la population maximale de micro-organismes ou le rendement cellulaire de *Pectinatus* sp. DSM 20465 dans le milieu MRS en fonction de la température (T est la température exprimée en degrés Celsius, K la température en degrés Kelvin), du pH initial (P) et de la concentration (% v/v) en éthanol (E). Dans l'expression : $e^a \cdot e^{(Ea/RK)}$, $Ea = 45,8$. KJ, $a = 78,5 \text{ h}^{-1}$ si T est supérieure ou égale à 26 et 282,8 KJ, $a = 16,28 \text{ h}^{-1}$ si T est inférieure. L'équation 1, a été établie sans les valeurs nulles des taux croissance. Dans les équations 2 à 6, les valeurs nulles (marquées par un * dans le tableau 2) des taux de croissance, de la population maximale de micro-organismes ou du rendement cellulaire, ont été prises en compte.

équation N°1

$$\text{Taux de croissance} = 0,003855 T + 0,659182 P + 0,045489 E - 0,05518 P^2 - 0,003591 E^2 + 0,001767 T.P - 0,000242 T.P.E - 2,179584$$

$$\text{Degrés de liberté} = 59 \quad r^2 = 0,913 \quad \text{test F} = 77,85$$

équation N°2

$$\text{Taux de croissance} = - 0,00201 T + 0,60561 P + 0,03902 E - 0,05399 P^2 - 0,00377 E^2 + 0,00287 T.P - 0,00021 T.P.E - 1,92675$$

$$\text{Degrés de liberté} = 63 \quad r^2 = 0,92 \quad \text{test F} = 99,89$$

équation N°3

$$\begin{aligned} \text{Taux de croissance} = & - 0,03535 e^a e^{(Ea/RK)} + 0,63669 P + 0,01929 E \\ & - 1,53616 e^a e^{2(Ea/RK)} - 0,05304 P^2 - 0,00377 E^2 + 0,30083 e^a e^{(Ea/RK)}.P \\ & + 0,16096 e^a e^{(Ea/RK)}.E - 0,04578 e^a e^{(Ea/RK)}.P.E - 1,91758 \end{aligned}$$

$$\text{Degrés de liberté} = 68 \quad r^2 = 0,96 \quad \text{test F} = 164,66$$

équation N°4

$$\begin{aligned} \text{Ln (Taux de croissance + 1)} = & 0,00765 e^a e^{(Ea/RK)} + 0,53842 P + 0,00163 E \\ & - 1,86004 e^a e^{2(Ea/RK)} - 0,04503 P^2 - 0,00333 E^2 + 0,26538 e^a e^{(Ea/RK)}.P \\ & + 0,14333 e^a e^{(Ea/RK)}.E - 0,03923 e^a e^{(Ea/RK)}.P.E - 1,61597 \end{aligned}$$

$$\text{Degrés de liberté} = 68 \quad r^2 = 0,96 \quad \text{test F} = 184,090$$

équation N°5

$$\begin{aligned} \text{Population maximale de micro-organismes} = & 41,76663 e^a e^{(Ea/RK)} + 9,55536 P \\ & + 0,12168 E - 120,50600 e^a e^{2(Ea/RK)} - 0,79800 P^2 - 0,06206 E^2 - 28,54130 \end{aligned}$$

$$\text{Degrés de liberté} = 68 \quad r^2 = 0,93 \quad \text{test F} = 137,65$$

équation N°6

$$\begin{aligned} \text{Rendement cellulaire} = & 9,2227 e^a e^{(Ea/RK)} + 2,1135 P + 0,0273 E \\ & - 26,6482 e^a e^{2(Ea/RK)} - 0,1763 P^2 - 0,0275 E^2 - 6,317 \end{aligned}$$

$$\text{Degrés de liberté} = 68 \quad r^2 = 0,93 \quad \text{test F} = 138,24$$

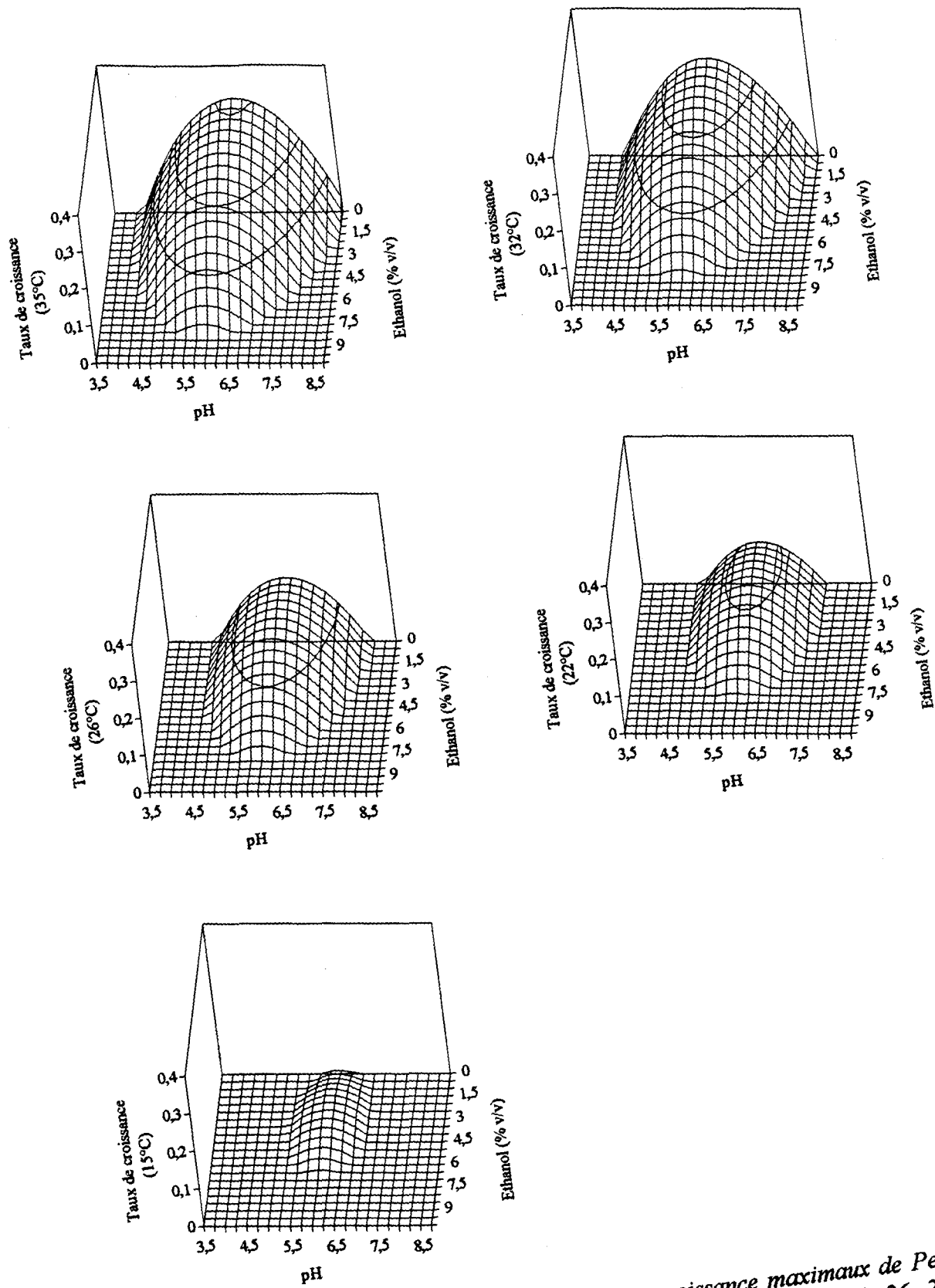


Figure 27 : Représentations graphiques des taux de croissance maximaux de *Pectinatus* sp. DSM 20465 en fonction du pH et de la concentration en éthanol à 35, 32, 26, 22 et à 15°C obtenues par modélisation (régression polynomiale : équation N° 1).

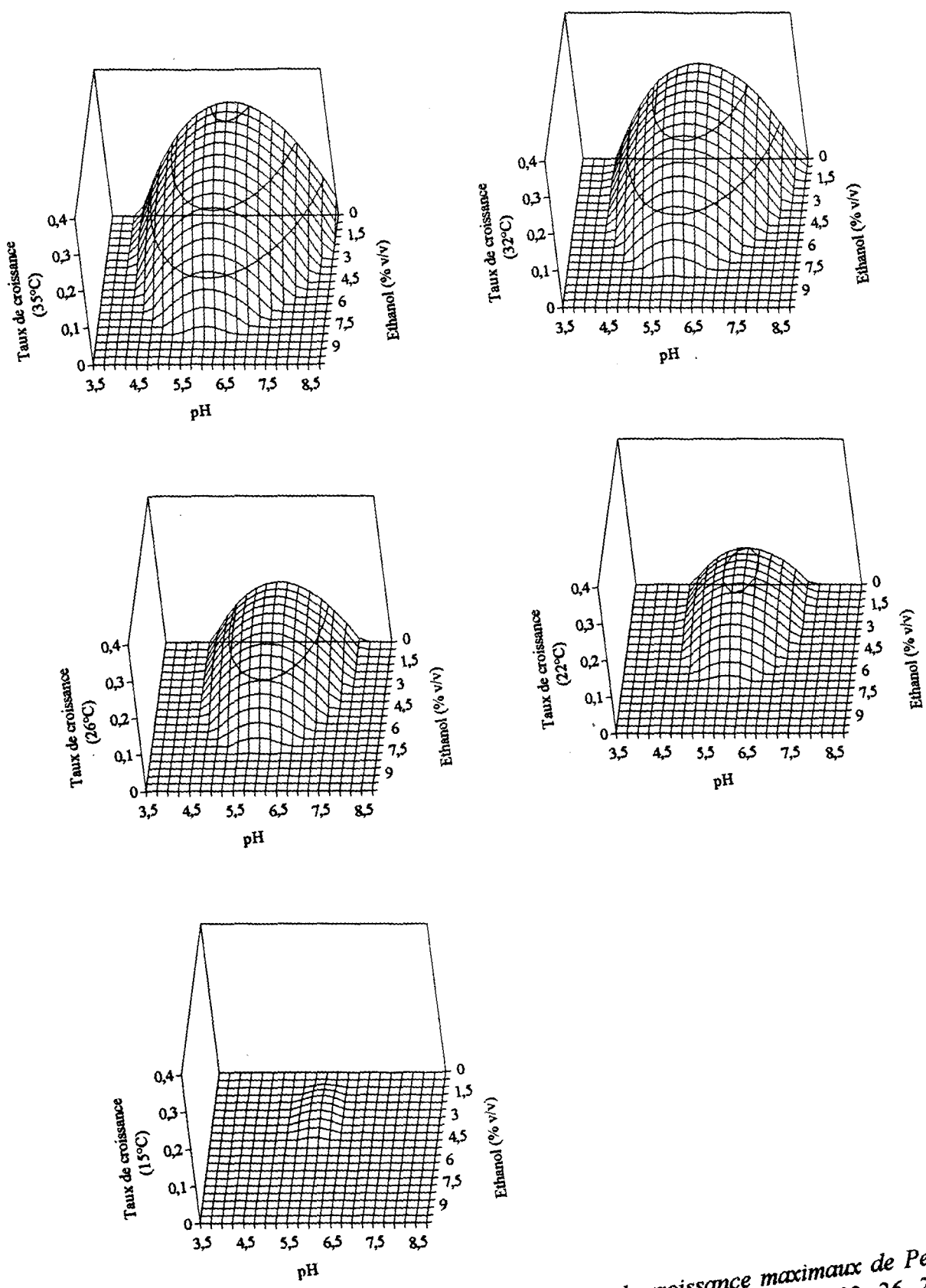


Figure 28 : Représentations graphiques des taux de croissance maximaux de *Pectinatus* sp. DSM 20465 en fonction du pH et de la concentration en éthanol à 35, 32, 26, 22 et à 15°C obtenues par modélisation (régression polynomiale : équation N° 2).

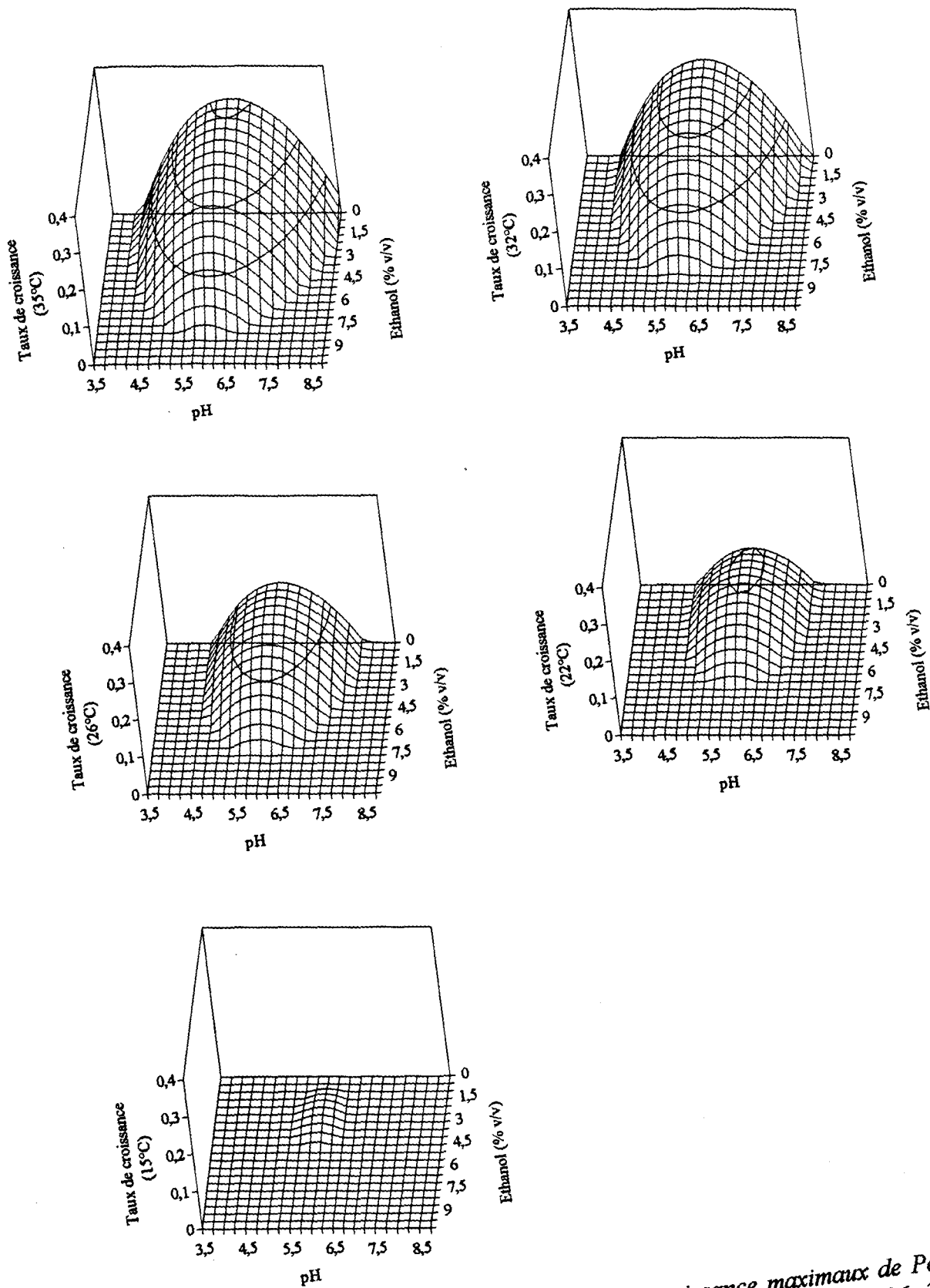


Figure 28 : Représentations graphiques des taux de croissance maximaux de *Pectinatus* sp. DSM 20465 en fonction du pH et de la concentration en éthanol à 35, 32, 26, 22 et à 15°C obtenues par modélisation (régression polynomiale : équation N° 2).

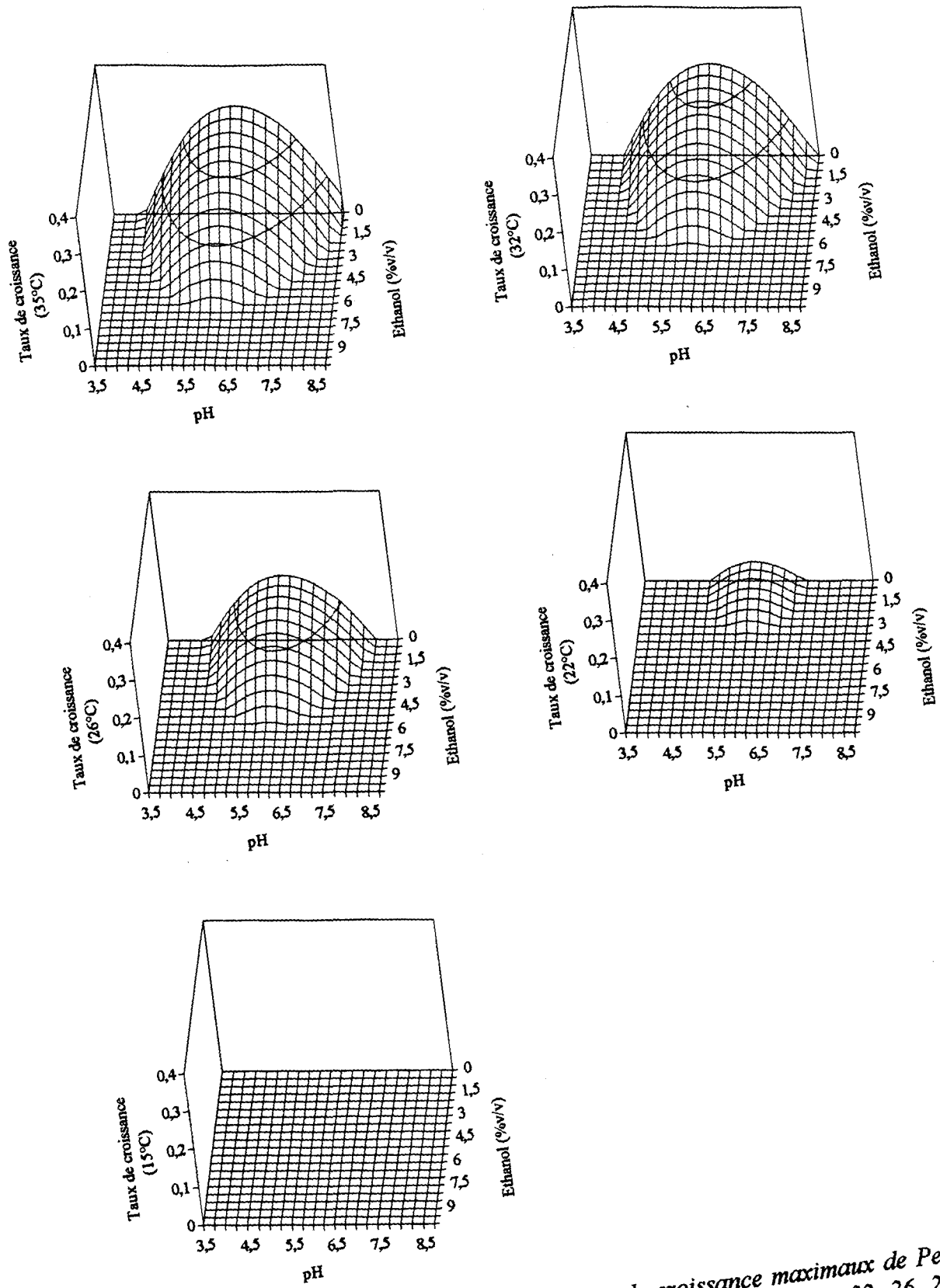


Figure 30 : Représentations graphiques des taux de croissance maximaux de *Pectinatus* sp. DSM 20465 en fonction du pH et de la concentration en éthanol à 35, 32, 26, 22 et à 15°C obtenues par modélisation (régression polynomiale : équation N° 4).

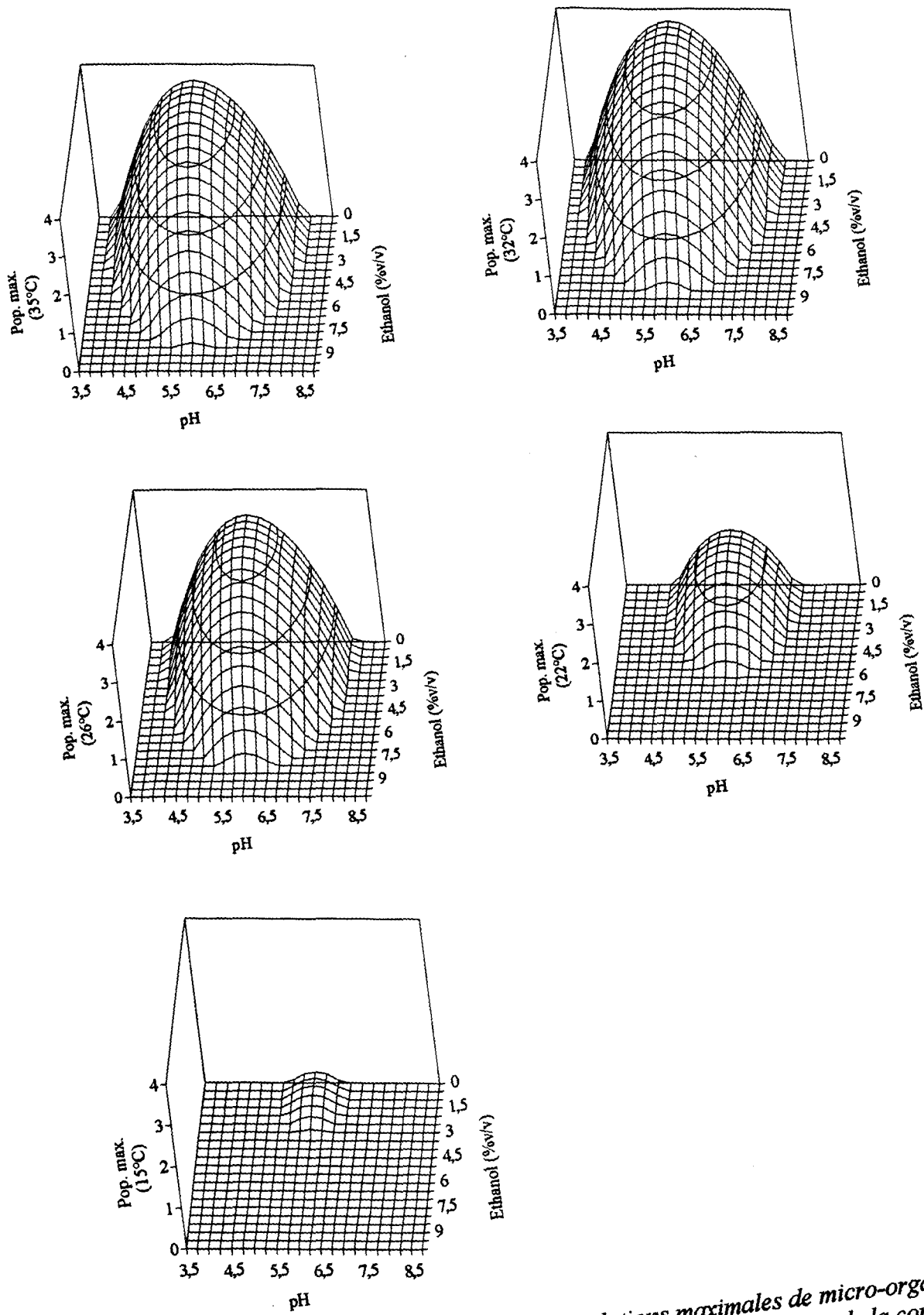


Figure 31 : Représentations graphiques des populations maximales de micro-organismes (échelle / 10^8) de *Pectinatus* sp. DSM 20465 en fonction du pH initial et de la concentration en éthanol à 35, 32, 26, 22 et à 15°C obtenues par modélisation (régression polynomiale : équation N° 5).

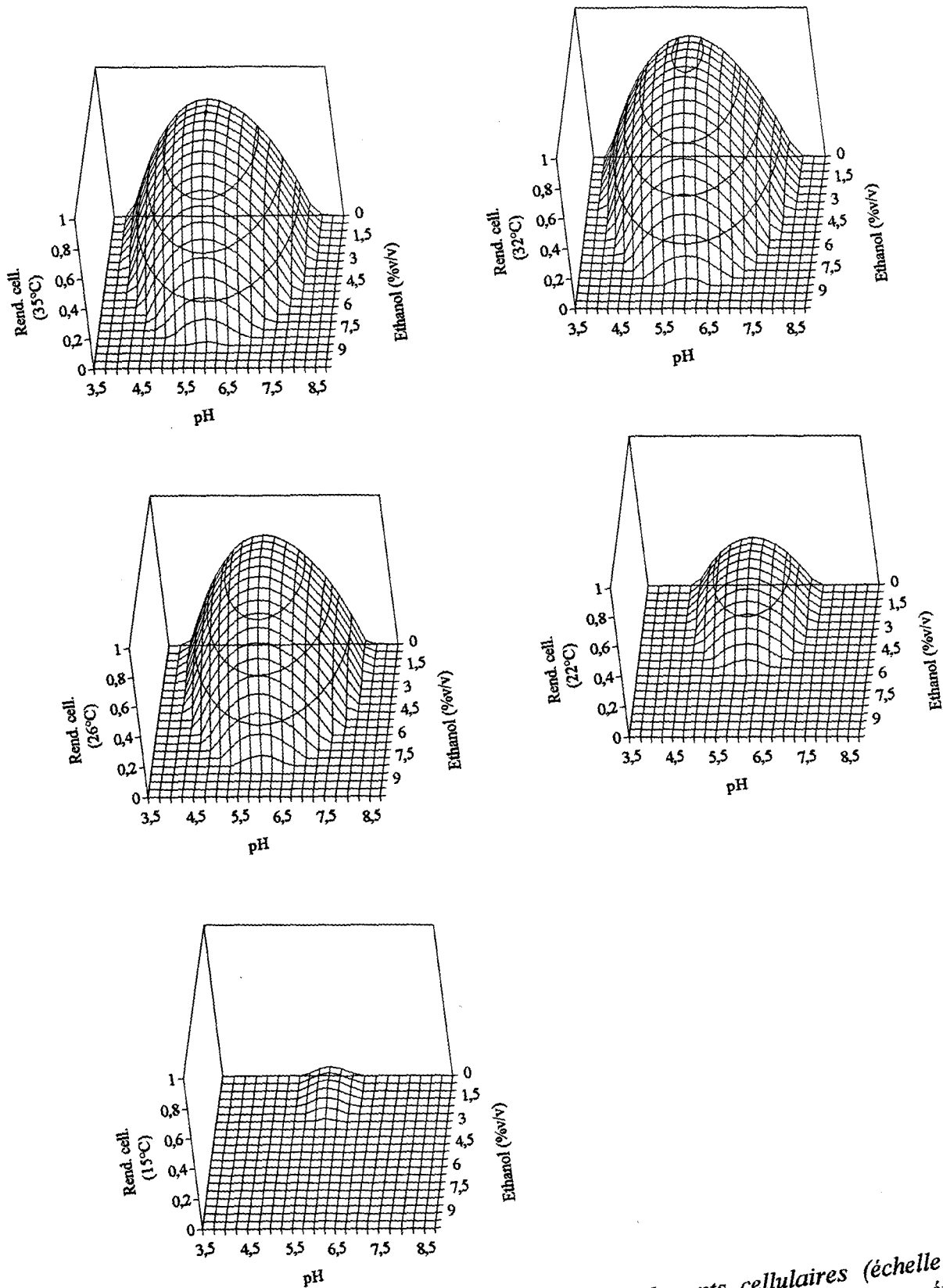


Figure 32 : Représentations graphiques des rendements cellulaires (échelle / 10^8) de *Pectinatus* sp. DSM 20465 en fonction du pH initial et de la concentration en éthanol à 35, 32, 26, 22 et à 15°C obtenues par modélisation (régression polynomiale : équation N° 6).

Cette équation n'est en fait valable que pour une plage étroite de températures, l'énergie d'activation n'étant pas constante. Elle augmente quand la température diminue. Pour intégrer cette variation d'énergie d'activation, Eyring (1935) proposa l'équation suivante : $\mu = \mu_0 K e^{(-Ea/RK)}$. Toutefois cette équation ne peut pas être utilisée dans une régression polynomiale puisque nous avons la température sous la forme K facteur de e^K). La figure 33 met en évidence une variation de l'énergie d'activation chez *Pectinatus* sp. DSM 20465 à 26°C.

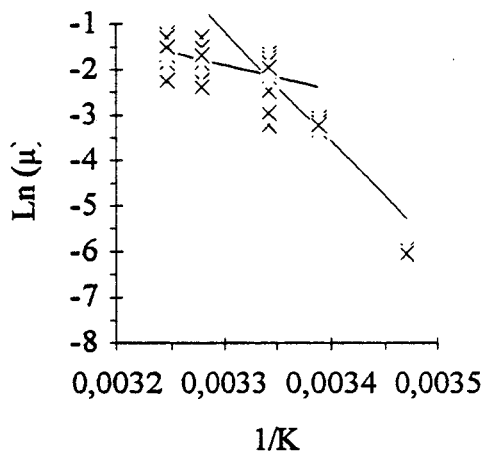
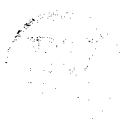


Figure 33 : Relation entre $\text{Ln}(\mu_{\text{max}})$ et $1/K$ permettant de calculer l'énergie d'activation pour la souche *Pectinatus* sp. DSM 20465 dans le milieu MRS

Pour des températures supérieures à 26°C, l'énergie d'activation est de 45,8 kJ. Ces énergies d'activation sont inférieures à celles des autres organismes (entre 54 et 67 kJ)(Pirt 1974). *Pectinatus* est donc un micro-organisme peu exigeant en énergie pour démarrer sa croissance. Pour des températures inférieures l'énergie d'activation est de 282,8 kJ soit 6 fois plus élevée; Cela est sans doute dû à une modification métabolique, des enzymes différentes étant mises en jeu ayant pour conséquence un besoin en énergie plus élevé pour permettre le développement de *Pectinatus*.

Dans les équations 3, 4, 5 et 6, nous avons tenu compte de ce changement d'énergie d'activation. L'équation d'Arrhenius prend la forme : $\mu = e^{78,5} e^{(-24141/K)}$ pour les températures supérieures ou égales à 26°C et la forme $\mu = e^{16,3} e^{(-5508/K)}$ pour les températures inférieures.

L'influence du pH peut se résumer à une équation du type $\mu = a.pH^2 + b.pH + c$ (Pirt 1974). Cette expression fait partie intégrante de l'équation polynomiale.



Ces transformations ont permis de considérablement améliorer le modèle puisque le r^2 est supérieur et le test F passe de 99,89 à 164,66. Toutes les autres équations seront transformées de la même façon.

Dans l'équation 4, nous avons transformé les valeurs de μ_{\max} en $\ln \mu_{\max}$. Cette équation peut être comparée avec celle sans transformation (équation 3). Comme cela se vérifie le plus souvent dans la littérature, la valeur du r^2 et du test F sont sensiblement supérieures pour l'équation avec transformations. Cependant la comparaison des représentations graphiques de ces équations avec des résultats non introduits dans le modèle et ne provenant pas du plan expérimental montrent une meilleure prédiction de l'équation 3. En effet l'équation 4 donne une croissance nulle à 15°C alors que des résultats expérimentaux ont montré que *Pectinatus* peut encore se développer à cette température (suivant le pH et la concentration en éthanol). De plus, nous avons mis en évidence que la vitesse de croissance de *Pectinatus* est sensiblement supérieure en présence d'une faible concentration en éthanol, ce qui n'est pas reproduit par l'équation 4. Cette vérification est d'autant plus importante que les modèles polynomiaux sont relativement fragiles (Bratchell *et al.* 1989; Palumbo *et al.* 1991). Il semble donc que si la transformation népérienne donne un modèle plus ajusté, elle peut en contre partie nuire à sa robustesse.

En conséquence, nous avons préféré utiliser comme modèle de base pour le genre *Pectinatus*, l'équation du type :

$$Y = a \mu_0 e^{(-Ea/RK)} + b P + c E + d \mu_0 e^{2(-Ea/RK)} + e P^2 + f E^2 + g \mu_0 e^{(-Ea/RK)} P + h \mu_0 e^{(-Ea/RK)} E + i P E + j \mu_0 e^{(-Ea/RK)} P E + k$$

avec :

Ea : énergie d'activation, R : constante des gaz parfaits, K : température en degrés Kelvin

P : pH, E : éthanol en % v/v

L'originalité de notre démarche vient de l'intégration dans l'équation polynomiale de facteurs ayant un fondement biologique. L'utilisation de la loi d'Arrhenius en y incluant l'énergie d'activation a permis d'améliorer considérablement les paramètres statistiques du modèle.

1.7 Analyse des résultats donnés par le modèle

L'étude des équations 3 et 5 (☞ page 92) nous permet de déterminer les conditions optimales de croissance. En ce qui concerne le taux de croissance, l'équation 3, au-dessus de 35°C (en dehors des limites du plan d'expériences), n'a plus de sens biologiquement parlant. C'est à cette température ou à une température supérieure que le taux de croissance maximal est le plus élevé. Il est de 0,31 h⁻¹ à pH 6,6 et à 0 % d'éthanol. Ce taux de croissance est bien supérieur à celui trouvé lors des études préliminaires (0,2 h⁻¹) (☞ page 73). Cette différence provient de la difficulté de cerner les conditions optimales par l'utilisation d'une méthode traditionnelle. Cela montre tout l'intérêt d'utiliser un plan d'expériences et une modélisation qui permettent de déterminer avec précision les conditions pour lesquelles le taux de croissance maximal est le plus élevé en tenant compte des interactions.

A 35°C, la croissance est effective jusqu'au pH 4,1. En dessous d'une concentration de 4,5 %, la présence d'éthanol n'influence pas la vitesse de croissance. Pour un pH 6, *P. sp.* peut même se développer jusqu'à des concentrations de 7,3 %. Le pH étant généralement proche de 4,2 dans la bière, ces résultats montrent que *Pectinatus* est capable de s'y développer si le degré alcoolique ne dépasse pas 5 % v/v.

Lorsque la température diminue, le taux de croissance diminue également. A 15°C le pH optimal change pour passer à 6 avec une croissance entre les pH 5,2 et 6,7 pour une concentration en éthanol de 2,5 %. Le taux de croissance serait donc favorisé à basse température par la présence d'éthanol. L'équation 3 montre que les interactions température-pH et température-éthanol sont significatives. La croissance dans le moût de bière (pH 5,2) à cette température (fermentation haute) est donc possible.

A 8°C, dans les conditions optimales correspondantes au pH 6 et à une concentration en éthanol de 2,5 %, le taux de croissance ne serait plus que de 0,019 h⁻¹. La plage de croissance se réduit aux pH compris entre 5,4 et 6,5 pour des concentrations en éthanol comprises entre 0,5 et 4,7 %. La température peut jouer un rôle au niveau des réactions enzymatiques. A température optimale, les enzymes sont plus actives, ce qui favorise la croissance de *Pectinatus*.

La température modifie également la fluidité membranaire. On conçoit facilement que le mouvement des nombreuses molécules qui doivent traverser la membrane sera plus ou moins aisé suivant que l'état de la membrane est plus ou moins fluide.

Le pH influe sur le fonctionnement des pompes à protons. Lorsque le pH extérieur varie, la cellule tend à rétablir un certain équilibre par l'intermédiaire des pompes à protons qui consomment de l'ATP. De l'ATP est donc utilisé au détriment de la croissance cellulaire.

L'éthanol est un solvant organique qui agit sur la fluidité membranaire. Il entraîne une désorganisation de la membrane, un changement de configuration des protéines qui vont perturber les échanges.

La population maximale atteinte en fin de phase exponentielle en fonction des conditions de croissance nous est donnée par l'équation 5 (☞ page 92). Les paramètres statistiques de cette équation ($r^2 = 0,93$, test $F = 137,65$) sont une preuve du bon ajustement des valeurs calculées aux valeurs expérimentales. Les conditions optimales de croissance sont : 32,3°C, pH 6,0 et 1,0 % d'éthanol. Les conditions optimales diffèrent donc de celles du taux de croissance maximal. Dans ces conditions, la population peut atteindre $3,7 \cdot 10^8$ bactéries/ml. On retrouve les mêmes limites de croissance que pour l'équation 3 (sauf pour les pH supérieurs à 7) ce qui montre la bonne reproductibilité de ces modèles. L'éthanol à faible concentration favorise la formation de biomasse quel que soit la température. On peut donc supposer que l'éthanol est utilisé comme source de carbone. Ces résultats ont aussi été confirmés par croissance à 32°C de *Pectinatus frisingensis* sur milieu minimum avec l'éthanol comme seule source carbonée.

Dans des conditions de stockage de la bière (bière de table à 4 % v/v) qui peuvent dans certains cas avoisiner les 30°C, ce modèle montre que la population de *Pectinatus* peut atteindre $9,4 \cdot 10^7$ bactéries/ml (dans le cas toutefois qu'il y ait encore une source de carbone fermentescible).

A basse température, le pH optimal ne varie pas. L'équation 5 montre qu'il n'existe aucune interaction significative entre les différents facteurs. A 8°C la population maximale est encore d'environ $1,4 \cdot 10^7$ bactéries/ml.

Le rendement cellulaire est donné par l'équation 6 (☞ page 92). Celle-ci a la même allure que celle de la population maximale. Les paramètres statistiques sont équivalents. Comme pour la population maximale aucune interaction n'est significative. Nous obtenons les mêmes conditions optimales pour le rendement cellulaire et pour la population maximale. Dans ces conditions plus de 82 % du substrat (en g de biomasse g^{-1} de substrat) est transformé en biomasse, le reste comme le montre l'équation de Pirt (☞ page 25) serait utilisé pour la synthèse métabolique et pour l'énergie de maintenance. Un tel rendement cellulaire montre que même pour des concentrations faibles en source de carbone, la population bactérienne peut

être élevée. Cela peut expliquer les troubles importants dans les bières contaminées par *Pectinatus*. Le fort rendement cellulaire de *Pectinatus* et la faible valeur d'énergie d'activation montrent que les bactéries anaérobies sont capables de se multiplier avec une faible consommation d'énergie. En revanche la croissance est plus lente, caractérisée par un coefficient métabolique (q) 5 à 8 fois plus faible que celui d'une bactérie aérobie (Tableau 2 (☞ page 92), Figure 34).

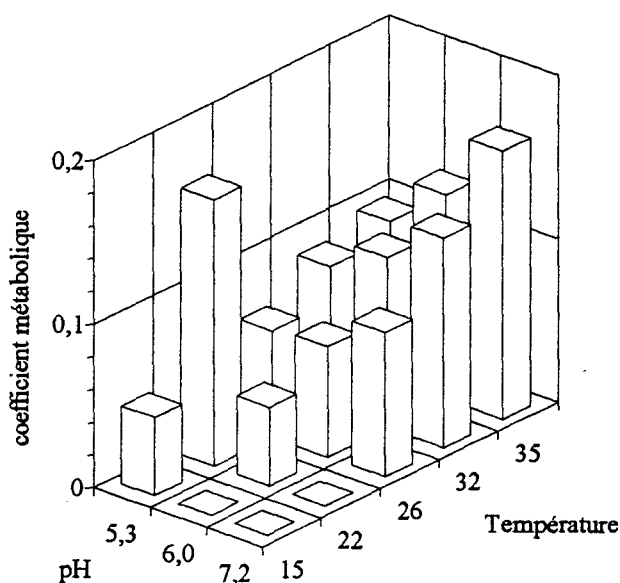


Figure 34 : Coefficient métabolique de *Pectinatus cerevisiophilus* dans le milieu MRS à différents pH et températures pour une concentration en éthanol de 0% (v/v).

La valeur élevée du coefficient métabolique à 26°C, pH 5,3 peut provenir d'un changement métabolique.

Il n'a pas été possible de modéliser les valeurs de q , l'équation polynomiale aboutissant à des résultats aberrants.

Quand les conditions de températures, de pH et de concentration en éthanol sont défavorables, la production de biomasse diminue en faveur du métabolisme et de l'énergie de maintenance, nous avons d'ailleurs noté une élévation de l'énergie d'activation² (☞ page 99).

² pour des températures inférieures à 26°C

1.8 Résultats du plan d'expériences pour les souches *Pectinatus cerevisiiphilus* et *P. frisingensis*

Les valeurs des taux de croissance maximaux et des populations maximales sont rassemblées dans les tableaux 4 et 5.

Tableau 4 : Valeurs des taux de croissance de *Pectinatus cerevisiiphilus* DSM 20466 calculés à l'aide du modèle de Gompertz et du modèle logistique avec coefficient de corrélation et test F et population maximale de micro-organismes en fonction des variables température, pH et éthanol.

Temp. : température en °C; *Eth.* : éthanol en % v/v; r^2 : coefficient de corrélation; μ_{max} : taux de croissance maximal; *ddl* : degrés de liberté; *Test F* : test de Fisher.

Variables			Gompertz		logistique		ddl	Test F	Pop. max. /10 ⁸
Temp.	pH	Eth.	r^2	μ_{max}	r^2	μ_{max}			
35	5,3	0	0,99	0,1635	0,99	0,0867	7	1,53	1,90
35	5,3	0	0,99	0,0941	0,99	0,0960	7	0,13	1,94
35	5,3	2,5	0,99	0,0826	0,99	0,0821	7	0,49	2,16
35	5,3	2,5	0,99	0,0872	0,99	0,0956	7	0,69	2,02
35	5,3	5	0,99	0,0947	0,99	0,0967	7	0,68	1,01
35	5,3	5	0,99	0,0808	0,99	0,0833	7	0,31	0,99
35	6	0	0,99	0,1551	0,99	0,1532	7	0,55	1,67
35	6	0	0,99	0,1593	0,99	0,1545	7	0,41	1,42
35	6	2,5	0,99	0,0789	0,99	0,0800	7	0,39	1,94
35	6	2,5	0,99	0,1533	0,99	0,1583	7	0,35	1,86
35	6	5	0,99	0,1615	0,99	0,1661	7	0,34	1,20
35	6	5	0,99	0,1219	0,99	0,1210	7	0,30	1,09
35	7,2	0	0,99	0,1808	0,99	0,1875	7	2,22	2,68
35	7,2	0	0,99	0,1839	0,99	0,1836	7	0,34	2,78
35	7,2	2,5	0,99	0,1303	0,99	0,1268	7	0,37	2,04
35	7,2	2,5	0,99	0,1519	0,99	0,1435	7	0,65	2,78
35	7,2	5	0,99	0,1759	0,99	0,1703	7	0,62	0,18
35	7,2	5	0,99	0,0826	0,99	0,0798	7	0,52	0,39
32	5,3	0	0,99	0,0708	0,99	0,0777	7	0,63	1,54
32	5,3	0	0,99	0,0882	0,99	0,0968	7	1,29	1,48
32	5,3	2,5	0,99	0,0936	0,99	0,0952	7	0,51	1,97
32	5,3	2,5	0,99	0,0659	0,99	0,0675	7	0,91	1,75
32	5,3	5	0,99	0,0835	0,99	0,0870	7	0,80	0,45
32	5,3	5	0,99	0,0708	0,99	0,0723	7	0,30	0,62
32	6	0	0,99	0,1639	0,99	0,1651	7	0,41	1,56
32	6	0	0,99	0,1550	0,99	0,1511	7	0,40	1,36
32	6	2,5	0,99	0,0645	0,99	0,0685	7	0,76	1,90
32	6	2,5	0,99	0,1445	0,99	0,1511	7	2,14	1,91
32	6	5	0,99	0,1558	0,99	0,1624	7	1,29	1,07
32	6	5	0,99	0,1287	0,99	0,1257	7	0,46	1,13
32	7,2	0	0,99	0,1724	0,99	0,1803	7	1,99	2,99
32	7,2	0	0,99	0,1532	0,99	0,1554	7	0,21	2,80
32	7,2	2,5	0,99	0,1329	0,99	0,1304	7	0,30	1,97
32	7,2	2,5	0,99	0,1763	0,99	0,1769	7	0,38	2,28
32	7,2	5		0,0000	0,99	0,1657	7	0,00	0,20
32	7,2	5	0,99	0,0858	0,99	0,0856	7	0,46	0,42

Suite du tableau 4

Temp.	Variables		Gompertz		logistique		ddl	Test F	Pop. max. /10 ⁸
	pH	Eth.	r ²	μmax	r ²	μmax			
26	5,3	0	0,99	0,0477	0,99	0,0508	15	0,70	1,33
26	5,3	0	0,99	0,0646	0,99	0,0695	15	1,91	1,31
26	5,3	2,5	0,99	0,0655	0,99	0,0675	6	1,11	1,74
26	5,3	2,5	0,99	0,1052	0,98	0,0930	4	0,71	1,57
26	5,3	5	0,99	0,0609	0,99	0,0615	6	1,15	0,38
26	5,3	5		0,0000		0,000*		0,00	0,73
26	6	0	0,99	0,0840	0,99	0,0932	7	1,44	1,51
26	6	0	0,99	0,0810	0,99	0,0793	8	0,67	1,83
26	6	2,5	0,99	0,0865	0,99	0,0920	8	0,73	1,74
26	6	2,5	0,99	0,0931	0,99	0,0930	7	0,69	1,90
26	6	5	0,99	0,0959	0,98	0,1041	8	0,83	0,93
26	6	5	0,99	0,1001	0,99	0,0935	7	0,62	0,48
26	7,2	0	0,99	0,1463	0,99	0,1506	10	0,43	2,45
26	7,2	0	0,99	0,1204	0,99	0,1193	7	0,59	2,43
26	7,2	2,5	0,99	0,1249	0,99	0,1266	8	0,03	2,02
26	7,2	2,5	0,99	0,1104	0,99	0,1080	7	0,63	2,04
26	7,2	5	0,99	0,0776	0,99	0,0761	15	0,56	0,25
26	7,2	5	0,99	0,1447	0,99	0,1425	7	0,69	0,60
22	5,3	0	0,99	0,0558	0,99	0,0599	17	0,38	0,42
22	5,3	2,5	0,97	0,0309	0,95	0,0325	17	0,73	0,13
22	5,3	5	0,89	0,0020	0,87	0,0018	15	0,86	0,10
22	6	0	/	/	0,98	0,0440	17	79,57	1,03
22	6	2,5	0,98	0,0502	0,97	0,0541	17	0,56	0,40
22	6	5	0,98	0,6785	0,98	0,0280	15	1,06	0,29
22	7,2	0	0,89	0,5880	0,89	0,0479	15	1,03	0,27
22	7,2	2,5	0,78	0,3309	0,80	0,0523	15	1,11	0,31
22	7,2	5	0,67	0,0018	0,66	0,0016	15	0,95	0,10
15	5,3	0	0,91	0,0011	0,89	0,0012	15	0,86	0,10
15	5,3	2,5	0,90	0,0017	0,89	0,0016	15	0,92	0,10
15	5,3	5		0,0000		0,000*			0,00
15	6	0	0,85	0,1235	0,88	0,0002	15	1,22	0,30
15	6	2,5	0,98	0,5226	0,98	0,0519	15	1,04	0,29
15	6	5		0,0000		0,000*			0,00
15	7,2	0		0,0000		0,000*			0,00
15	7,2	2,5		0,0000		0,000*			0,00
15	7,2	5		0,0000		0,000*			0,00

0,000* : valeurs des taux de croissance nuls utilisées pour établir les équations polynomiales.

Tableau 5 : Valeurs des taux de croissance de *Pectinatus frisingensis* ATCC 33332 calculés à l'aide du modèle de Gompertz et du modèle logistique avec coefficient de corrélation et test F, population maximale de micro-organismes, coefficient métabolique et rendement cellulaire en fonction des variables température, pH et éthanol. (q est calculé à l'aide des valeurs des taux de croissance établis à l'aide du modèle logistique).

Temp. : température en °C; Eth. : éthanol en % v/v; r^2 : coefficient de corrélation; μ_{max} : taux de croissance maximal; ddl : degrés de liberté; Test F : test de Fisher; q : coefficient métabolique en g^{-1} de biomasse . g de carbone (substrat) . h^{-1} ; Y : rendement cellulaire en g de biomasse . g^{-1} de carbone (substrat).

Variables			Gompertz		logistique		ddl	V1/V2	Pop. max. /10 ⁸	q	Y
Temp.	pH	Eth.	r^2	μ_{max}	r^2	μ_{max}					
35	5,3	0	0,99	0,1493	0,99	0,1505	13	1,80	4,08	0,1262	1,1928
35	5,3	0	0,99	0,1478	0,99	0,1499	13	2,26	3,67	0,1396	1,0738
35	5,3	2,5	0,99	0,1375	0,99	0,1406	13	2,14	3,76	0,1274	1,1035
35	5,3	2,5	0,99	0,1367	0,99	0,1402	13	2,35	3,48	0,1374	1,0203
35	5,3	5	0,97	0,0888	0,98	0,0920	13	1,47	2,77	0,1132	0,8123
35	5,3	5	0,98	0,0819	0,99	0,0862	13	1,79	2,23	0,1316	0,6547
35	6	0	0,99	0,1995	0,99	0,1985	13	1,27	4,40	0,1519	1,3065
35	6	0	0,99	0,1929	0,99	0,1934	13	1,43	4,36	0,1496	1,2928
35	6	2,5	0,99	0,1810	0,99	0,1824	13	1,47	4,23	0,1475	1,2367
35	6	2,5	0,98	0,1765	0,99	0,1782	13	1,46	4,23	0,1441	1,2366
35	6	5	0,99	0,1190	0,99	0,1216	13	1,76	2,91	0,1429	0,8508
35	6	5	0,99	0,1225	0,99	0,1252	13	1,91	3,20	0,1340	0,9337
35	7,2	0	0,98	0,1922	0,99	0,1894	13	1,55	3,05	0,2119	0,8939
35	7,2	0	0,99	0,1731	0,99	0,1759	13	1,69	4,16	0,1444	1,2175
35	7,2	2,5	0,97	0,1500	0,98	0,1514	13	1,67	2,77	0,1880	0,8054
35	7,2	2,5	0,97	0,1552	0,98	0,1565	13	1,66	3,01	0,1787	0,8760
35	7,2	5	0,55	0,0048	0,57	0,0064	13	1,13	0,01	2,5418	0,0025
35	7,2	5	0,95	0,0488	0,96	0,0620	13	1,51	0,05	2,6602	0,0233
32	5,3	0	0,99	0,1306	0,99	0,1334	13	1,98	4,10	0,1096	1,2171
32	5,3	0	0,99	0,1285	0,99	0,1312	13	2,32	3,78	0,1172	1,1193
32	5,3	2,5	0,99	0,1221	0,99	0,1264	13	2,30	3,88	0,1094	1,1550
32	5,3	2,5	0,99	0,1192	0,99	0,1232	13	2,42	3,55	0,1165	1,0570
32	5,3	5	0,98	0,0836	0,98	0,0858	13	1,30	3,13	0,0928	0,9254
32	5,3	5	0,98	0,0761	0,99	0,0809	13	1,72	2,52	0,1084	0,7468
32	6	0	0,99	0,1799	0,99	0,1811	13	1,56	4,32	0,1411	1,2842
32	6	0	0,99	0,1759	0,99	0,1775	13	1,50	4,32	0,1383	1,2842
32	6	2,5	0,99	0,1697	0,99	0,1711	13	1,49	4,22	0,1371	1,2475
32	6	2,5	0,99	0,1656	0,99	0,1684	13	1,53	4,22	0,1350	1,2475
32	6	5	0,99	0,1231	0,99	0,1262	13	1,85	3,15	0,1357	0,9304
32	6	5	0,99	0,1235	0,99	0,1269	13	1,96	3,42	0,1254	1,0116
32	7,2	0	0,97	0,1646	0,98	0,1647	13	1,55	3,10	0,1809	0,9107
32	7,2	0	0,98	0,1652	0,99	0,1668	13	1,84	3,35	0,1697	0,9829
32	7,2	2,5	0,98	0,1472	0,99	0,1498	13	1,99	2,90	0,1745	0,8585
32	7,2	2,5	0,98	0,1480	0,99	0,1504	13	1,99	3,17	0,1602	0,9384
32	7,2	5	0,99	0,0809	0,99	0,0842	13	1,53	1,52	0,1857	0,4536
32	7,2	5	0,99	0,0809	0,99	0,0894	13	1,67	1,65	0,1811	0,4937

Suite du tableau 5

Variables			Gompertz		logistique		ddl	Test F	Pop. max. /10 ⁸	q	y
Temp.	pH	Eth.	r ²	μmax	r ²	μmax					
26	5,3	0	0,99	0,0865	0,99	0,0995	15	0,93	3,44	0,0974	1,0224
26	5,3	0	0,99	0,0816	0,99	0,0916	15	0,79	3,69	0,0835	1,0973
26	5,3	2,5	0,99	0,0869	0,99	0,0959	15	0,69	3,20	0,1013	0,9473
26	5,3	2,5	0,99	0,0816	0,99	0,0848	15	0,84	3,59	0,0799	1,0621
26	5,3	5	0,97	0,0545	0,99	0,0571	15	0,62	2,20	0,0880	0,6487
26	5,3	5	0,98	0,0541	0,99	0,0596	15	0,90	2,26	0,0894	0,6666
26	6	0	0,99	0,1129	0,99	0,1204	15	1,10	4,18	0,0974	1,2371
26	6	0	0,99	0,1124	0,99	0,1201	15	0,99	4,10	0,0989	1,2145
26	6	2,5	0,99	0,1096	0,99	0,1159	15	1,49	3,89	0,1005	1,1530
26	6	2,5	0,99	0,1068	0,99	0,1153	15	1,19	3,69	0,1053	1,0947
26	6	5	0,99	0,0844	0,99	0,0949	15	1,42	3,15	0,1018	0,9323
26	6	5	0,99	0,0867	0,99	0,0993	15	1,27	3,00	0,1118	0,8886
26	7,2	0	0,99	0,0986	0,99	0,1109	15	1,32	3,06	0,1234	0,8987
26	7,2	0	0,99	0,1045	0,99	0,1176	15	0,82	3,38	0,1185	0,9921
26	7,2	2,5	0,99	0,0917	0,99	0,1044	15	1,56	2,83	0,1246	0,8376
26	7,2	2,5	0,99	0,0955	0,99	0,1067	15	1,10	2,84	0,1268	0,8415
26	7,2	5	0,71	32,1499	0,99	0,0857	15	0,86	1,60	0,1814	0,4726
26	7,2	5	0,99	14,7707	0,99	0,0743	15	0,00	1,58	0,1591	0,4673
22	5,3	0	0,98	0,1312	0,99	0,1317	17	2,75	2,07	0,2131	0,6181
22	5,3	2,5	0,98	0,1028	0,99	0,1051	17	2,11	1,84	0,1906	0,5514
22	5,3	5	0,96	0,0909	0,97	0,0869	17		1,26		0,3796
22	6	0	0,98	0,1274	0,99	0,1264	17	1,42	2,24	0,1881	0,6722
22	6	2,5	0,99	0,1459	0,99	0,1488	17	2,49	2,01	0,2455	0,6062
22	6	5		0,0000	0,99	0,0894	17		1,50		0,4470
22	7,2	0		0,0000		0,000*			0,00		0,0000
22	7,2	2,5		0,0000		0,000*			0,00		0,0000
22	7,2	5		0,0000		0,000*			0,00		0,0000
15	5,3	0	0,99	0,0360	0,99	0,0354	15	1,83	3,36	0,0345	1,0261
15	5,3	2,5	0,99	0,0295	0,99	0,0281	15	0,56	2,34	0,0378	0,7430
15	5,3	5	0,96	0,0093	0,98	0,0096	15		1,09		0,3656
15	6	0		0,0000		0,000*			0,00		0,0000
15	6	2,5		0,0000		0,000*			0,00		0,0000
15	6	5		0,0000		0,000*			0,00		0,0000
15	7,2	0		0,0000		0,0000			0,00		0,0000
15	7,2	2,5		0,0000		0,0000			0,00		0,0000
15	7,2	5		0,0000		0,0000			0,00		0,0000

0,000* : valeurs des taux de croissance nuls utilisées pour établir les équations polynomiales..

Les figures 35 et 36 donnent un aperçu des taux de croissance maximaux calculés à l'aide du modèle logistique.

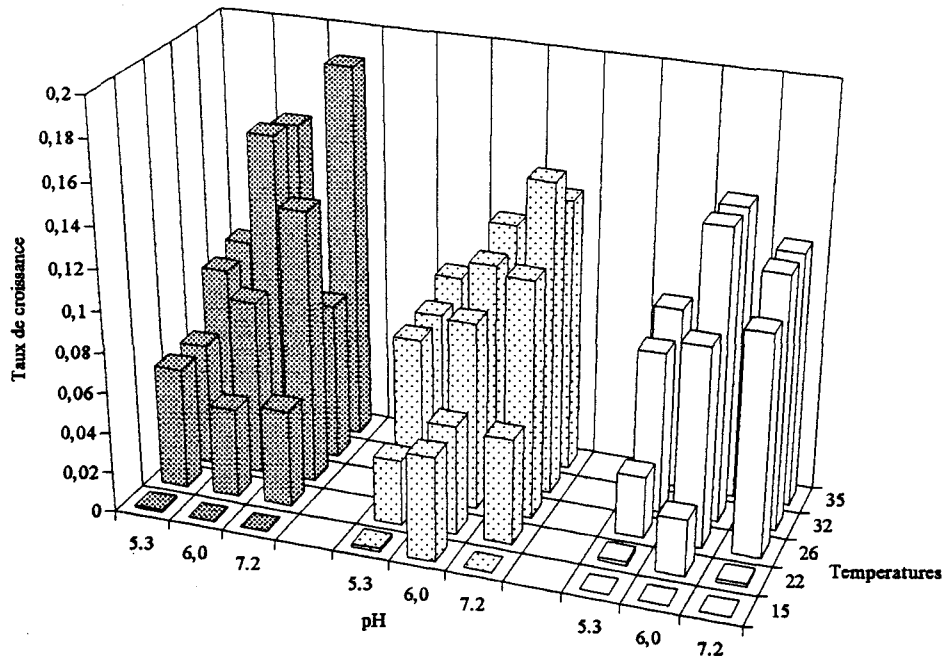


Figure 35 : Taux de croissance de *Pectinatus cerevisiophilus* dans le milieu MRS à différents pH et températures pour des concentrations en éthanol (v/v) : 0 % (gris), 2,5 % (ombré), 5 % (blanc).

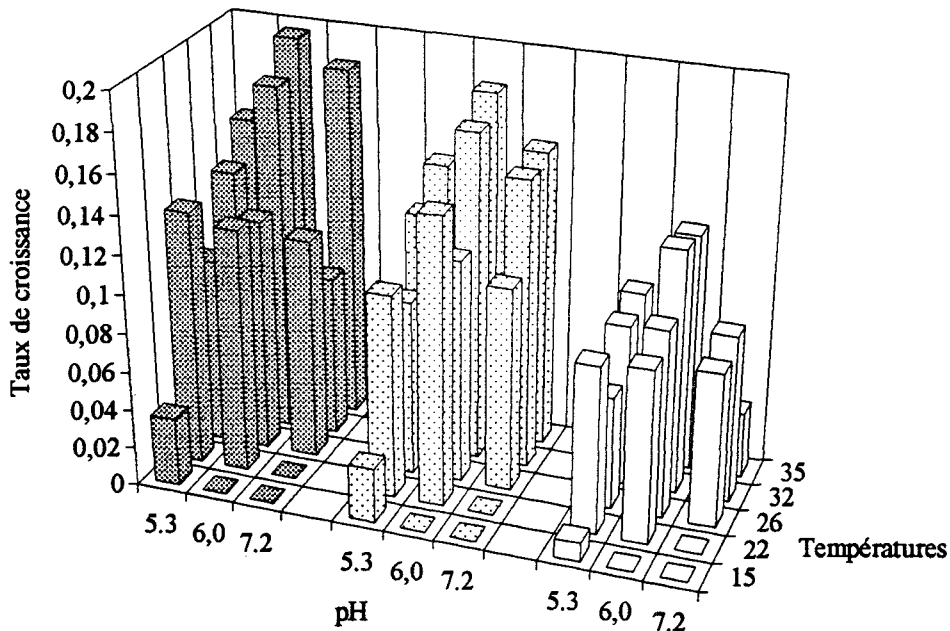


Figure 36 : Taux de croissance de *Pectinatus frisingensis* dans le milieu MRS à différents pH et températures pour des concentrations en éthanol (v/v) : 0 % (gris), 2,5 % (ombré), 5 % (blanc).



Pour les températures les plus élevées, les taux de croissance de ces deux souches sont inférieurs à ceux de *Pectinatus* sp.. Cependant il en va tout autrement pour les températures de 22°C et de 15°C. A ces températures, à pH 6 et pour 2,5 % d'éthanol, *P. cerevisiophilus* a un taux de croissance encore élevé, de l'ordre de 0,6 h⁻¹.

En ce qui concerne la souche *P. frisingensis*, pour des températures de 22°C et plus, la croissance est plus rapide pour le pH 6 quel que soit la concentration en éthanol. Curieusement, sans que la cause en soit connue, la croissance est plus rapide à 22°C qu'à 26°C. A 15°C, cette souche est capable de se développer à pH 5,3 avec des taux de croissance de 0,04 h⁻¹.

Les figures 37 et 38 donnent un aperçu des valeurs des populations maximales de *P. cerevisiophilus* et de *P. frisingensis*.

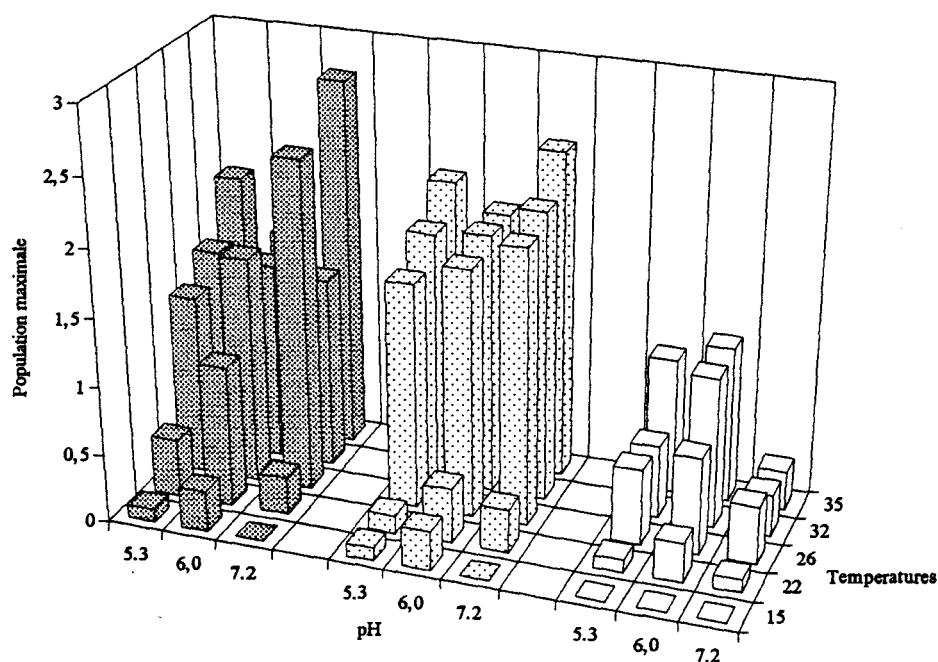


Figure 37 : Populations maximales (échelle / 10⁸) de *Pectinatus cerevisiophilus* dans le milieu MRS à différents pH et températures pour des concentrations en éthanol (v/v) : 0 % (gris), 2,5 % (ombré), 5 % (blanc).

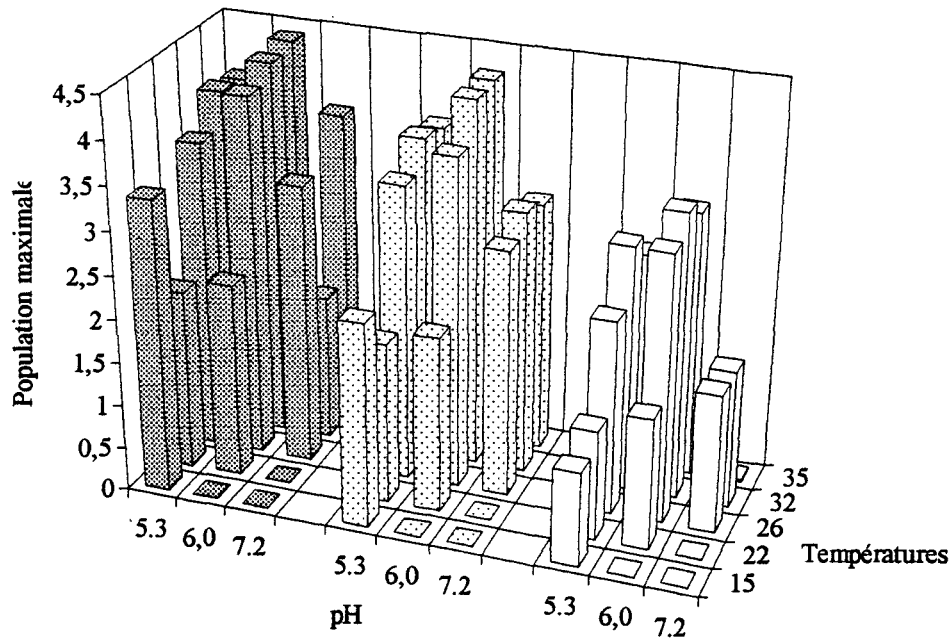


Figure 38 : Populations maximales (échelle / 10⁸) de *Pectinatus frisingensis* dans le milieu MRS à différents pH et températures pour des concentrations en éthanol (v/v) : 0 % (gris), 2,5 % (ombré), 5 % (blanc).

P. cerevisiophilus est la souche dont la population maximale atteinte en fin de phase de croissance est la moins élevée. En revanche la population maximale de *P. frisingensis* peut être bien supérieure notamment à pH 6 et à 35°C mais surtout à 22°C et à 15°C.

Les populations atteintes par *P. frisingensis* et le taux de croissance non négligeable pour les températures de 15°C à pH 5,3 font de ce micro-organisme l'espèce du genre *Pectinatus* provoquant les troubles les plus importants lors d'une contamination.

1.9 Validation du modèle pour les souches *Pectinatus cerevisiophilus* et *P. frisingensis*

De la même façon que pour la souche *P. sp.* nous avons déterminé les énergies d'activation (Figures 39 et 40).

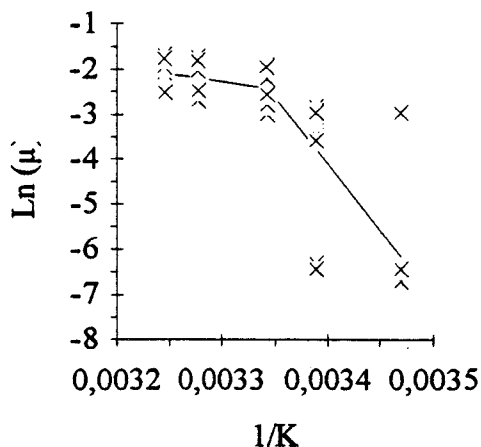


Figure 39 : Relation entre $\text{Ln}(\mu)$ et $1/T$ permettant de calculer l'énergie d'activation pour la souche *Pectinatus cerevisiophilus* DSM 20466 dans le milieu MRS.

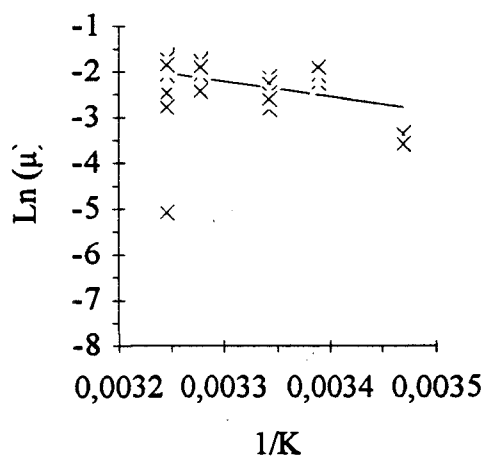


Figure 40 : Relation entre $\text{Ln}(\mu)$ et $1/T$ permettant de calculer l'énergie d'activation pour la souche *Pectinatus frisingensis* ATCC 33332 dans le milieu MRS.

Pour *P. cerevisiiphilus*, cette énergie est de 24,1 kJ pour les températures supérieures ou égales à 26°C. Elle passe à 244,6 kJ pour des températures inférieures. Pour *P. frisingensis*, l'énergie d'activation est constante et de l'ordre de 27,9 kJ. Ces deux souches possèdent donc des énergies d'activation plus basse que *P. sp.* et plus particulièrement pour *P. frisingensis* à basse température. Le bon développement de cette souche à 15°C est donc la conséquence d'un minimum d'énergie requis pour activer les réactions enzymatiques permettant la croissance.

Les différences entre les énergies d'activation de ces deux souches par rapport à *P. sp.* nous ont amenés à construire d'autres équations incorporant ces nouvelles valeurs.

Les équations polynomiales concernant la souche *P. cerevisiiphilus* sont rassemblées dans le tableau 6. Les figures 40 et 41 en donnent les représentations graphiques.

Tableau 6 : Equations obtenues par régression polynomiale donnant le taux de croissance ou la population maximale de micro-organismes de *Pectinatus cerevisiiphilus* DSM 20466 dans le milieu MRS en fonction de la température (T est la température exprimée en degrés Celsius, K la température en degrés Kelvin), du pH initial (P) et de la concentration (% v/v) en éthanol (E). Dans l'expression : $e^{a \cdot e^{(Ea/RK)}}$, $Ea = 24,1$. kJ et $a = 7,3$ h⁻¹ si T est supérieure ou égale à 26 et 244,6 kJ et $a = 95,9$ h⁻¹ si T est inférieure. Dans les équations les valeurs nulles (marquées par un * dans le tableau 4) des taux de croissance ou de la population maximale de micro-organismes, ont été prises en compte.

équation N°7

$$\begin{aligned} \text{Taux de croissance} = & - 0,86074 e^a e^{(Ea/RK)} + 0,30679 P - 0,00399 E - 0,02458 P^2 \\ & + 0,29844 e^a e^{(Ea/RK)} \cdot P - 0,92525 \end{aligned}$$

$$\text{Degrés de liberté} = 72 \quad r^2 = 0,80 \quad \text{test F} = 54,913$$

équation N°8

$$\begin{aligned} \text{Population maximale de micro-organismes} = & - 17,35528 e^a e^{(Ea/RK)} - 0,0309177 P \\ & + 0,36129 E - 0,07979 E^2 + 5,77082 e^a e^{(Ea/RK)} \cdot P + 7,48195 e^a e^{2(Ea/RK)} \cdot E \\ & - 1,53066 e^a e^{(Ea/RK)} \cdot P \cdot E + 0,18477 \end{aligned}$$

$$\text{Degrés de liberté} = 72 \quad r^2 = 0,89 \quad \text{test F} = 79,104$$

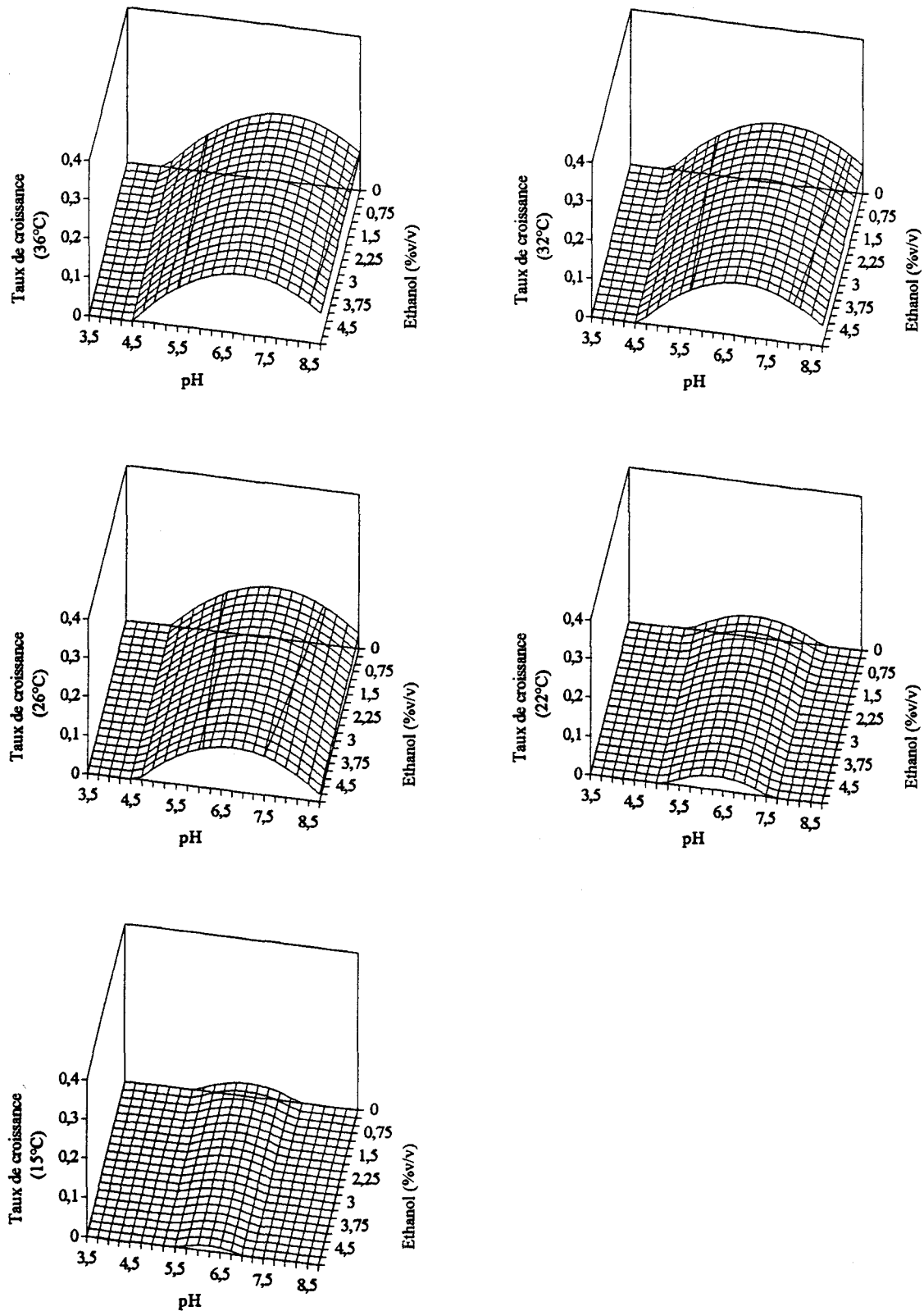


Figure 41 : Représentations graphiques des taux de croissance de *Pectinatus cerevisiophilus* DSM 20466 en fonction du pH initial et de la concentration en éthanol à 35, 32, 26, 22 et à 15°C obtenues par modélisation (régression polynomiale : équation N° 7).

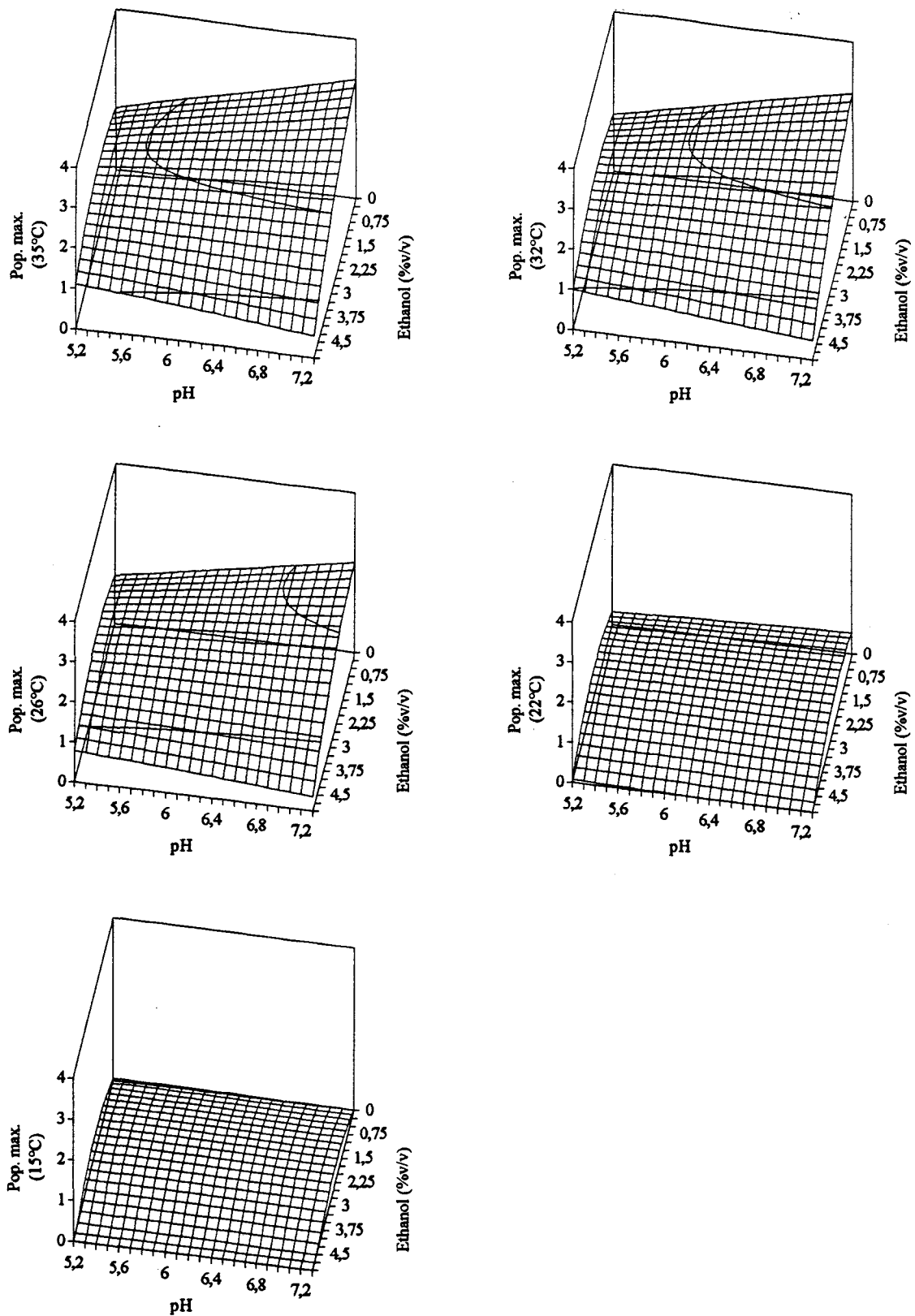


Figure 42 : Représentations graphiques des populations maximales de micro-organismes (échelle / 10^8) de *Pectinatus cerevisiiphilus* DSM 20466 en fonction du pH initial et de la concentration en éthanol à 35, 32, 26, 22 et à 15°C obtenues par modélisation (régression polynomiale : équation N° 8).

L'équation 7 possède un r^2 faible. Cela est dû à des résultats expérimentaux peu homogènes. Le modèle ne semble fidèle aux résultats expérimentaux que dans les bornes même du plan d'expérience et principalement pour les conditions optimales. Les conditions optimales sont : 35°C ou plus, pH 7, 0 % d'éthanol. Ce dernier n'a pas d'influence marquée sur le taux de croissance dans les limites considérées. Les conditions limites de croissance ne seront pas discutées.

l'équation 8 est caractérisée par un r^2 plus élevé ce qui a pour conséquence une meilleure prédiction des taux de croissance en fonction de la concentration en éthanol. En contre partie, la prédiction de la croissance pour les pH bas n'est pas satisfaisante. L'introduction de valeurs de taux de croissance nuls obtenus à pH 4 n'améliore pas l'équation. La régression du rendement cellulaire (équation 9) n'a pas été présentée, le r^2 et le test F étant beaucoup trop faibles.

Les équations 7 et 8 n'étant pas satisfaisantes et ne permettant pas une analyse fiable, nous préférons nous en remettre aux valeurs expérimentales. Les causes de l'hétérogénéité des résultats expérimentaux ne sont pas connues. Il est possible que cela ait pour origine la non prise en compte dans le plan d'expériences d'un paramètre non contrôlé, autre que la température, le pH ou l'éthanol pouvant influencer la croissance.

Les équations correspondantes à la souche *P. frisingensis* sont beaucoup plus satisfaisantes (Tableau 7). L'équation 10 est caractérisée par un r^2 et un test F encore faibles mais la comparaison des valeurs des taux de croissance calculés à l'aide de l'équation avec des résultats expérimentaux ne provenant pas du plan d'expériences montre un bon ajustement du modèle même en dehors des limites de ce plan d'expériences. Toutefois Cette équation minimise la croissance de *P. frisingensis* à basses températures. Les conditions optimales de croissance sont : 35°C ou plus, pH 6,5 et 0 % d'éthanol. Le taux de croissance maximal est alors de 0,20 h⁻¹. Le modèle met en évidence des interactions significatives de type température-pH et température-pH-éthanol. L'équation 11 donne les valeurs des populations maximales pour la souche *P. frisingensis*. Les faibles valeurs du r^2 et du test F s'expliquent par des résultats peu homogènes pour les températures 22°C et 15°C ce qui nous interdit toute utilisation de cette équation pour déterminer les limites de croissance. En revanche, la régression polynomiale sur un plan d'expériences réduit ne comprenant que les valeurs des populations maximales pour les températures 26°C, 32°C et 35°C donne une valeur de r^2

proche 0,95 nous permettant de déterminer les conditions optimales de croissance. Celles-ci sont de 33°C pH 6,2 et 0 % d'éthanol avec une population de $4,5 \cdot 10^8$ bactéries/ml.

Tableau 7 : Equations obtenues par régression polynomiale donnant le taux de croissance, la population maximale de micro-organismes ou le rendement cellulaire de *Pectinatus frisingensis* ATCC 33332 dans le milieu MRS en fonction de la température (T est la température exprimée en degrés Celsius, K la température en degrés Kelvin), du pH initial (P) et de la concentration (% v/v) en éthanol (E). Dans l'expression : $e^a \cdot e^{(Ea/RK)}$, $Ea = 27,9$ kJ et $a = 8,86 \text{ h}^{-1}$.

Dans les équations les valeurs nulles (marquées par un * dans le tableau 5) des taux de croissance, de la population maximale de micro-organismes ou le rendement cellulaire, ont été prises en compte.

équation N°10

$$\begin{aligned} \text{Taux de croissance} = & 4,44783 e^a e^{(Ea/RK)} + 0,40722 P + 0,02635 E - 34,12218 e^a \\ & e^{(Ea/RK)} \\ & - 0,03894 P^2 - 0,00270 E^2 + 0,78011 e^a e^{(Ea/RK)} \cdot P - 0,03605 e^a e^{(Ea/RK)} \cdot P \cdot E - 1,46103 \end{aligned}$$

$$\text{Degrés de liberté} = 68 \quad r^2 = 0,84 \quad \text{test F} = 41,27$$

équation N°11

$$\begin{aligned} \text{Population maximale de micro-organismes} = & 75,48752 \cdot e^a e^{(Ea/RK)} + 5,68044 P \\ & - 3,65082 E - 1027,09387 e^a e^{2(Ea/RK)} - 0,74311 P^2 - 0,06569 E^2 + 28,92569 e^a \\ & e^{(Ea/RK)} \cdot P + 37,83082 e^a e^{(Ea/RK)} \cdot E + 0,67708 P \cdot E - 6,84379 e^a e^{(Ea/RK)} \cdot P \cdot E - 17,96997 \end{aligned}$$

$$\text{Degrés de liberté} = 68 \quad r^2 = 0,79 \quad \text{test F} = 22,44$$

équation N°12

$$\begin{aligned} \text{Rendement cellulaire} = & 16,1824 e^a e^{(Ea/RK)} + 1,2606 P - 0,8253 E \\ & - 234,3562 e^a e^{2(Ea/RK)} - 0,1664 P^2 - 0,01505 E^2 + 6,7454 e^a e^{(Ea/RK)} \cdot P \\ & + 8,5177 e^a e^{(Ea/RK)} \cdot E + 0,1533 P \cdot E - 1,54325 e^a e^{(Ea/RK)} \cdot P \cdot E - 3,90775 \end{aligned}$$

$$\text{Degrés de liberté} = 68 \quad r^2 = 0,78 \quad \text{test F} = 21,339$$

Etude de la croissance et de la résistance de Pectinatus et de Megasphaera - Généralités

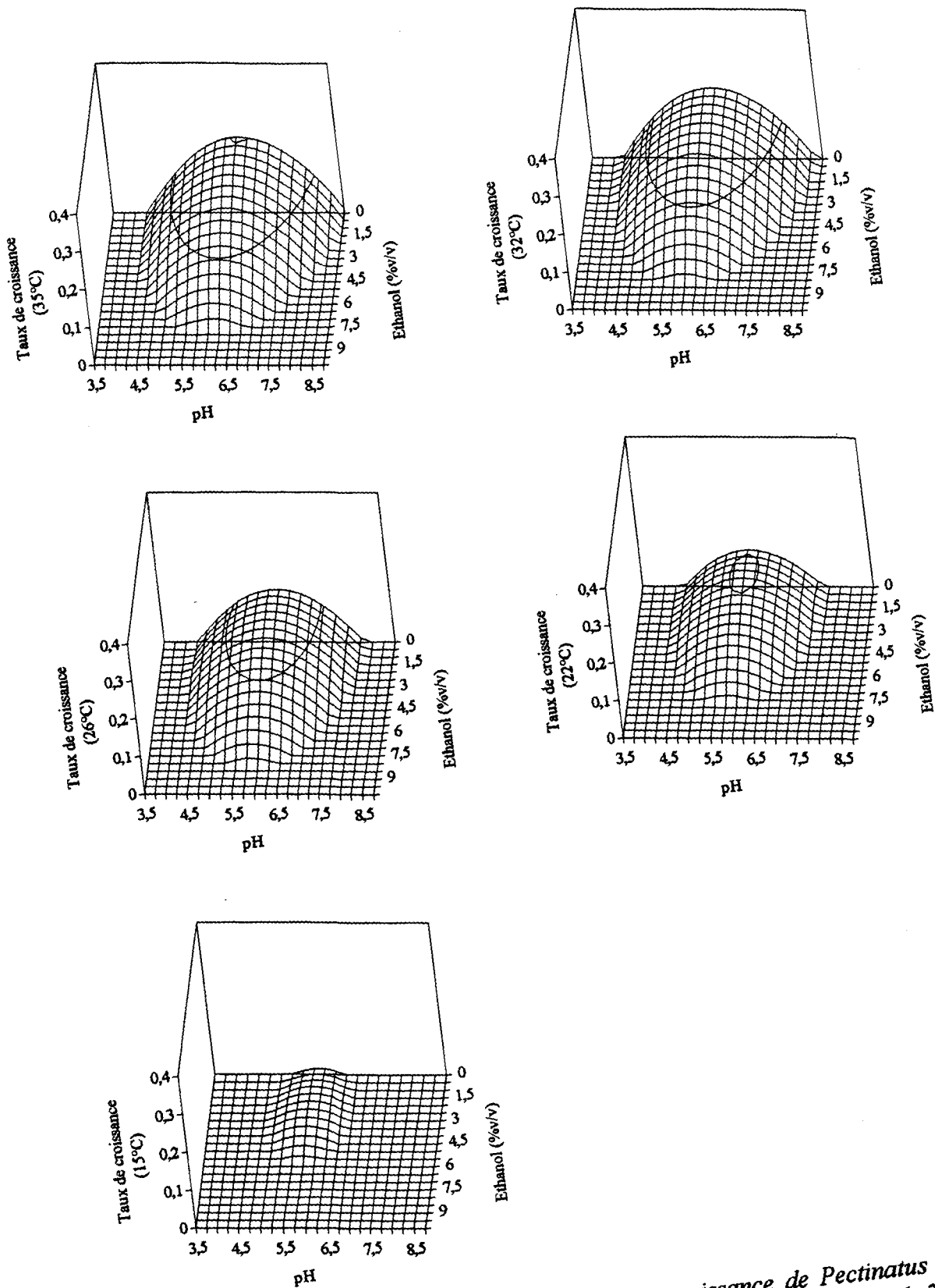


Figure 43 : Représentations graphiques des taux de croissance de *Pectinatus frisingensis* ATCC 33332 en fonction du pH et de la concentration en éthanol à 35, 32, 26, 22 et à 15°C obtenues par modélisation (régression polynomiale : équation N° 10).

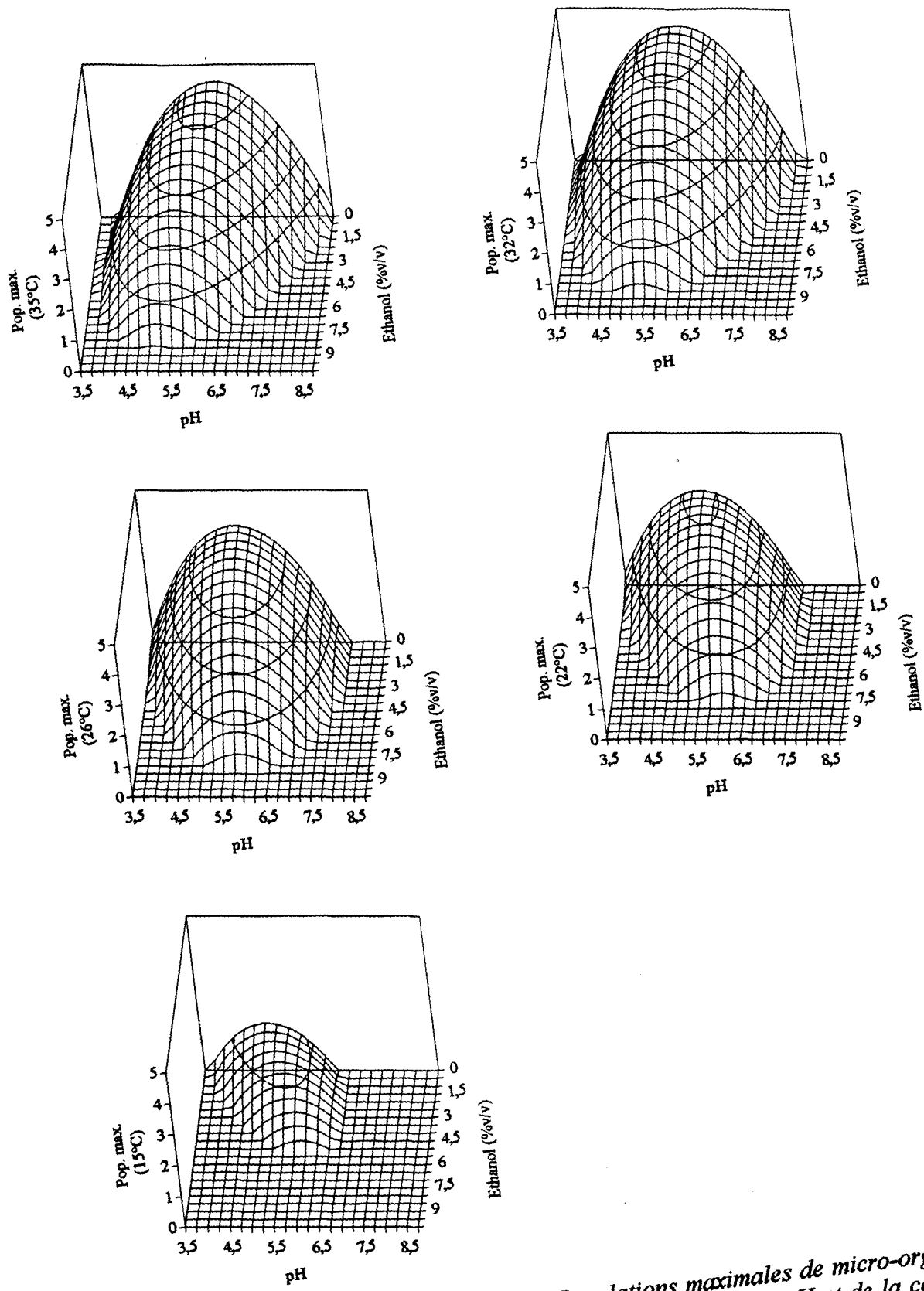


Figure 44 : Représentations graphiques des Populations maximales de micro-organismes de croissance de *Pectinatus frisingensis* ATCC 33332 en fonction du pH et de la concentration en éthanol à 35, 32, 26, 22 et à 15°C obtenues par modélisation (régression polynomiale : équation N° 11).

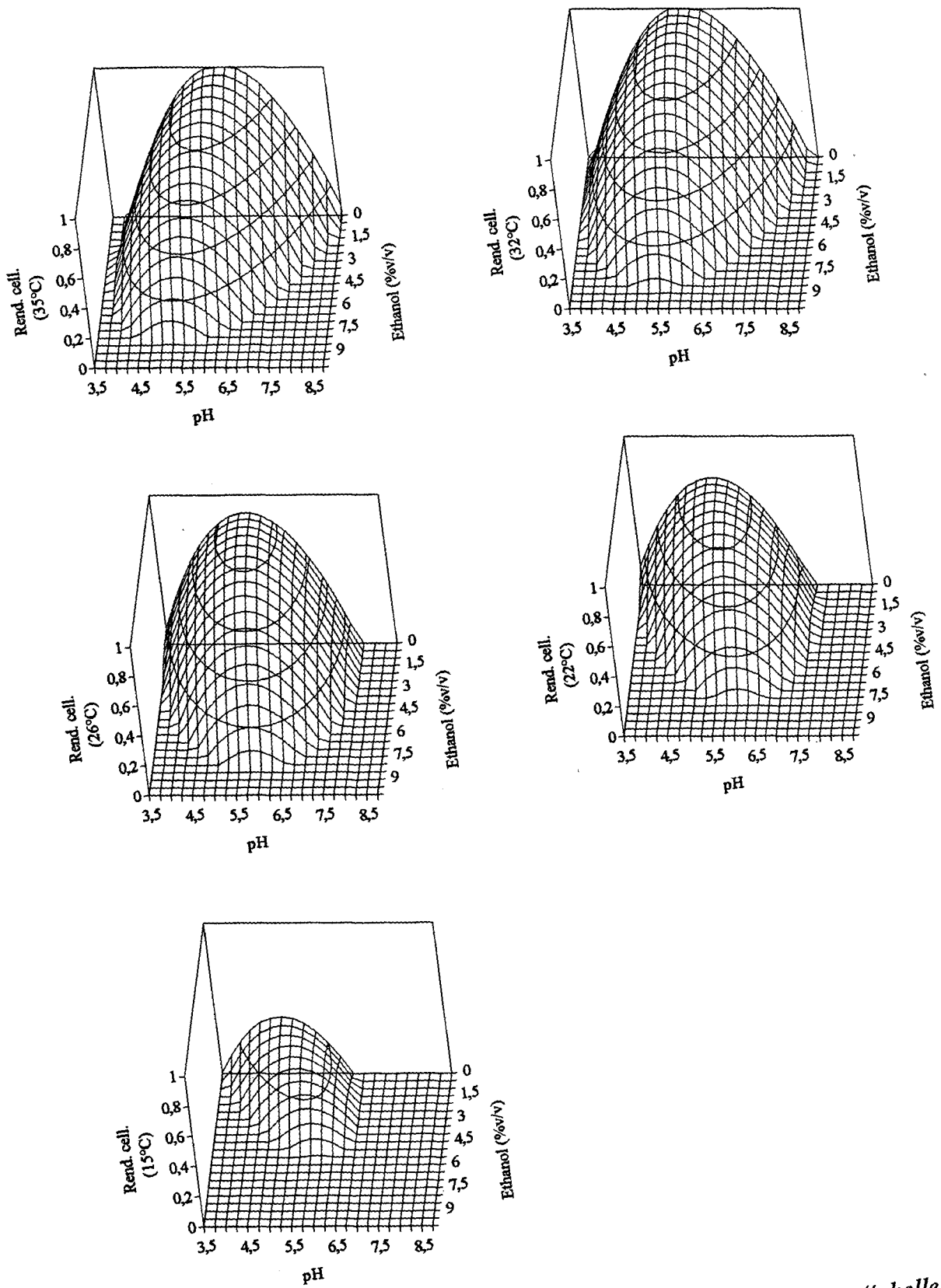


Figure 45 : Représentations graphiques des rendements cellulaires (échelle / 10^8) de *Pectinatus frisingensis* ATCC 33332 en fonction du pH et de la concentration en éthanol à 35, 32, 26, 22 et à 15°C obtenues par modélisation (régression polynomiale : équation N° 12).

La comparaison des différents modèles établis pour les différentes souches, nous ont permis de déterminer les conditions optimales. Celles-ci ne varient que très légèrement entre les trois souches. Il en résulte que le modèle proposé pour le genre *Pectinatus* (équations 3, 5 et 6) semble pouvoir s'appliquer aux différentes souches dans les limites du plan d'expériences. Ces modèles sont moins satisfaisants pour les conditions limites comme celles rencontrées pendant la fermentation.

1.10 Modélisation de la croissance dans le moût

Des essais de fermentation dans le moût ont montré qu'il pouvait y avoir une croissance plus importante que dans le milieu MRS à des températures basses.

Les équations 3, 5, 7, 8, 10 et 11 (☞ page 92) montrent que la souche *P. frisingensis* est la bactérie risquant de se développer dans les proportions les plus importantes dans la bière quel que soit la température. De même *P. cerevisiophilus* se développe mieux à 15°C que *P. sp.*. Nous avons donc utilisé ces deux souches pour construire un nouveau plan d'expériences. Ce plan expériences n'a plus pour vocation de déterminer les conditions optimales de croissance mais de simuler la croissance lors de la fermentation. Il est indispensable de construire des plans d'expériences dans les conditions les plus proches de celles rencontrées lors de la fermentation (Tableau 8 et 9).

Tableau 8 : Valeurs des taux de croissance de *Pectinatus cerevisiophilus* DSM 20466 dans le moût calculés à l'aide du modèle logistique avec coefficient de corrélation et test F et population maximale de micro-organismes en fonction des variables température, pH et éthanol.

Temp. : température en °C; *Eth.* : éthanol en % v/v; r^2 : coefficient de corrélation; μ_{max} : taux de croissance maximal; *ddl* : degrés de liberté; *Test F* : test de Fisher.

Variables			logistique			
Temp.	pH	Eth.	r^2	μ_{max}	ddl	Pop. max. /10 ⁸
32	4	0	0,99	0,1402	27	3,56
32	4	2,5	0,99	0,1090	27	2,38
32	4	5	0,99	0,0609	27	1,18
32	4	7,5	0,99	0,0352	27	0,93
32	5,1	0	0,99	0,1969	27	4,01
32	5,1	2,5	0,99	0,1643	27	3,21
32	5,1	5	0,99	0,0900	27	1,79
32	5,1	7,5	0,99	0,1382	27	2,32
32	5,9	0	0,99	0,2671	27	4,42
32	5,9	2,5	0,99	0,2047	27	3,08
32	5,9	5	0,99	0,1060	27	3,16
32	5,9	7,5	0,99	0,1632	27	3,74
22	4	0	0,99	0,0704	27	2,51
22	4	2,5	0,99	0,0446	27	1,47
22	4	5	0,99	0,0132	27	0,23
22	4	7,5	0,99	0,0169	27	2,40
22	5,1	0	0,98	0,1031	27	3,11
22	5,1	2,5	0,99	0,0755	27	2,16
22	5,1	5	0,99	0,0298	27	0,76
22	5,1	7,5	0,99	0,0525	27	2,71
22	5,9	0	0,99	0,1162	27	3,25
22	5,9	2,5	0,99	0,0914	27	2,34
22	5,9	5	0,99	0,0605	27	1,01
22	5,9	7,5	0,99	0,0663	27	4,11

Suite du tableau 8

Variables			logistique			
Temp.	pH	Eth.	r ²	μmax	ddl	Pop. max. /10 ⁸
15	4	0	0,99	0,0027	25	0,03
15	4	2,5	0,99	0,0049	25	0,05
15	4	5	0,98	0,0020	25	0,08
15	4	7,5	0,98	0,0034	25	0,03
15	5,1	0	0,98	0,0252	18	0,54
15	5,1	2,5	0,99	0,0286	25	1,26
15	5,1	5		0,0000		0,00
15	5,1	7,5	0,98	0,0055	25	0,87
15	5,9	0	0,99	0,0058	25	0,08
15	5,9	2,5	0,99	0,0059	25	0,11
15	5,9	5	0,99	0,0062	25	0,24
15	5,9	7,5	0,99	0,0033	25	0,04
8	4	0	0,99	0,0074	19	0,05
8	4	2,5	0,99	0,0056	19	0,05
8	4	5	0,99	0,0048	19	0,05
8	5,1	0	0,99	0,0084	19	0,22
8	5,1	2,5	0,99	0,0042	19	0,09
8	5,1	5	0,99	0,0044	19	0,04
8	5,9	0	0,99	0,0072	19	0,12
8	5,9	2,5	0,99	0,0064	19	0,11
8	5,9	5	0,99	0,0044	19	0,04
2	4	0	0,99	0,0067	19	0,04
2	4	2,5	0,99	0,0061	19	0,04
2	4	5	0,99	0,0062	19	0,03
2	5,1	0	0,99	0,0085	19	0,08
2	5,1	2,5	0,99	0,0050	19	0,04
2	5,1	5	0,98	0,0068	19	0,05
2	5,9	0	0,99	0,0063	19	0,04
2	5,9	2,5	0,98	0,0026	19	0,03
2	5,9	5	0,99	0,0025	19	0,02

Tableau 9 : Valeurs des taux de croissance de *Pectinatus frisingensis* ATCC 33332 dans le moût calculés à l'aide du modèle logistique avec coefficient de corrélation et test F et population maximale de micro-organismes en fonction des variables température, pH et éthanol.

Temp. : température en °C; Eth. : éthanol en % v/v; r^2 : coefficient de corrélation; μ_{max} : taux de croissance maximal; ddl : degrés de liberté; Test F : test de Fisher.

Temp.	Variables		logistique			
	pH	Eth.	r^2	μ_{max}	ddl	Pop. max. /10 ⁸
32	4	0	0,99	0,1540	27	2,63
32	4	2,5	0,99	0,1167	27	1,98
32	4	5	0,99	0,0795	27	1,14
32	4	7,5	0,98	0,0124	27	4,44
32	5,1	0	0,99	0,2046	27	3,08
32	5,1	2,5	0,99	0,1820	27	2,78
32	5,1	5	0,99	0,1230	27	2,03
32	5,1	7,5	0,99	0,0422	27	4,73
32	5,9	0	0,99	0,2379	27	3,47
32	5,9	2,5	0,99	0,1884	27	2,59
32	5,9	5	0,99	0,1534	27	1,65
32	5,9	7,5	0,99	0,0891	27	3,78
22	4	0	0,99	0,0806	27	2,44
22	4	2,5	0,99	0,0677	27	1,85
22	4	5	0,99	0,0502	27	1,11
22	4	7,5	0,99	0,0487	27	2,36
22	5,1	0	0,99	0,1134	27	3,13
22	5,1	2,5	0,99	0,0980	27	2,65
22	5,1	5	0,99	0,0761	27	1,79
22	5,1	7,5	0,99	0,0904	27	3,03
22	5,9	0	0,99	0,1122	27	3,44
22	5,9	2,5	0,99	0,0953	27	2,63
22	5,9	5	0,99	0,0704	27	1,77
22	5,9	7,5	0,97	0,0132	27	0,13

Suite du tableau 9

Variables			logistique			
Temp.	pH	Eth.	r ²	μmax	ddl	Pop. max. /10 ⁸
15	4	0	0,97	0,0039	25	0,05
15	4	2,5	0,99	0,0079	25	0,22
15	4	5	0,99	0,0076	25	0,04
15	4	7,5	0,98	0,0028	25	0,02
15	5,1	0	0,92	0,0024	25	0,03
15	5,1	2,5	0,98	0,0242	25	0,59
15	5,1	5	0,99	0,0079	25	0,34
15	5,1	7,5	0,99	0,0614	25	0,05
15	5,9	0	0,81	0,0050	25	0,04
15	5,9	2,5	0,84	0,0027	25	0,05
15	5,9	5	0,99	0,0289	25	1,33
15	5,9	7,5	0,99	0,0376	25	2,24
8	4	0	0,98	0,0033	19	0,08
8	4	2,5	0,98	0,0082	19	0,07
8	4	5	0,99	0,0040	19	0,04
8	5,1	0	0,99	0,0087	19	0,10
8	5,1	2,5	0,99	0,0096	19	0,08
8	5,1	5	0,99	0,0069	19	0,05
8	5,9	0	0,99	0,0054	19	0,12
8	5,9	2,5	0,98	0,0055	19	0,04
8	5,9	5	0,99	0,0045	19	0,06
2	4	0	0,98	0,0182	19	0,09
2	4	2,5	0,98	0,0080	19	0,05
2	4	5	0,99	0,0209	19	0,08
2	5,1	0	0,99	0,0075	19	0,03
2	5,1	2,5	0,98	0,0046	19	0,03
2	5,1	5	0,98	0,0042	19	0,03
2	5,9	0	0,98	0,0037	19	0,06
2	5,9	2,5	0,99	0,0043	19	0,14
2	5,9	5	0,99	0,0054	19	0,02

Le milieu utilisé est le moût. Les températures de fermentation étant généralement comprises entre 2°C et 15°C pour des pH de 5,2 à 4 et une concentration en éthanol de 0 à 10 % nous avons limité le plan d'expériences aux températures 2, 8, 15, 26 et 32°C (☞ page 77). Contrairement aux résultats de Haïkara *et al.* (1981b) et de Soberka *et al.* (1989) (pour qui il n'y a plus de croissance en dessous de 15°C) les tableaux 8 et 9 montrent qu'il y a croissance dans le moût à des températures inférieures à 15°C. Ces résultats indiquent donc que ces bactéries sont bien adaptées au milieu bière et peuvent se développer lors de la fermentation.

Nous avons construit des équations modélisant le taux de croissance et la population maximale de *P. cerevisiophilus* et de *P. frisingensis* dans le moût (Tableau 10).

Tableau 10 : Equations obtenues par régression polynomiale donnant le taux de croissance ou la population maximale de micro-organismes de *Pectinatus cerevisiophilus* DSM 20466 et *P. frisingensis* ATCC 33332 dans le moût en fonction de la température (T est la température exprimée en degrés Celsius, K la température en degrés Kelvin), du pH initial (P) et de la concentration (% v/v) en éthanol (E). Dans l'expression : $e^a \cdot e^{(Ea/RK)}$, $Ea = 76,25$. kJ et $a = 27,82$.

Pectinatus cerevisiophilus DSM 20466

équation N°13

$$\text{Taux de croissance} = - 3,01766 e^a e^{(Ea/RK)} + 0,08392 P - 0,00082 E - 0,00902 P^2 + 0,97488 e^a e^{(Ea/RK)} \cdot P + 0,30371 e^a e^{(Ea/RK)} \cdot E - 0,09870 e^a e^{(Ea/RK)} \cdot P \cdot E - 0,18595$$

$$\text{Degrés de liberté} = 77 \quad r^2 = 0,93 \quad \text{test F} = 139,60$$

équation N°14

$$\text{Population maximale de micro-organismes} = - 21,04043 e^a e^{(Ea/RK)} + 2,56613 P - 0,02127 E - 222,09414 e^a e^{2(Ea/RK)} - 0,26997 P^2 + 16,49015 e^a e^{(Ea/RK)} \cdot P + 4,17185 e^a e^{(Ea/RK)} \cdot E - 1,58736 e^a e^{(Ea/RK)} \cdot P \cdot E - 6,02883$$

$$\text{Degrés de liberté} = 77 \quad r^2 = 0,83 \quad \text{test F} = 43,46$$

Pectinatus frisingensis ATCC 33332

équation N°15

$$\text{Taux de croissance} = - 1,91937 e^a e^{(Ea/RK)} + 0,13437 P + 0,00158 E - 6,22121 e^a e^{2(Ea/RK)} - 0,01446 P^2 + 0,89186 e^a e^{(Ea/RK)} \cdot P + 0,21246 e^a e^{(Ea/RK)} \cdot E - 0,07819 e^a e^{(Ea/RK)} \cdot P \cdot E - 0,30961$$

$$\text{Degrés de liberté} = 91 \quad r^2 = 0,89 \quad \text{test F} = 82,49$$

équation N°16

$$\text{Population maximale de micro-organismes} = + 4,46999 e^a e^{(Ea/RK)} + 2,40182 P - 0,02184 E - 350,52887 e^a e^{2(Ea/RK)} - 0,24889 P^2 + 12,93704 e^a e^{(Ea/RK)} \cdot P + 3,54345 e^a e^{(Ea/RK)} \cdot E - 1,32187 e^a e^{(Ea/RK)} \cdot P \cdot E - 5,95067$$

$$\text{Degrés de liberté} = 77 \quad r^2 = 0,78 \quad \text{test F} = 30,83$$

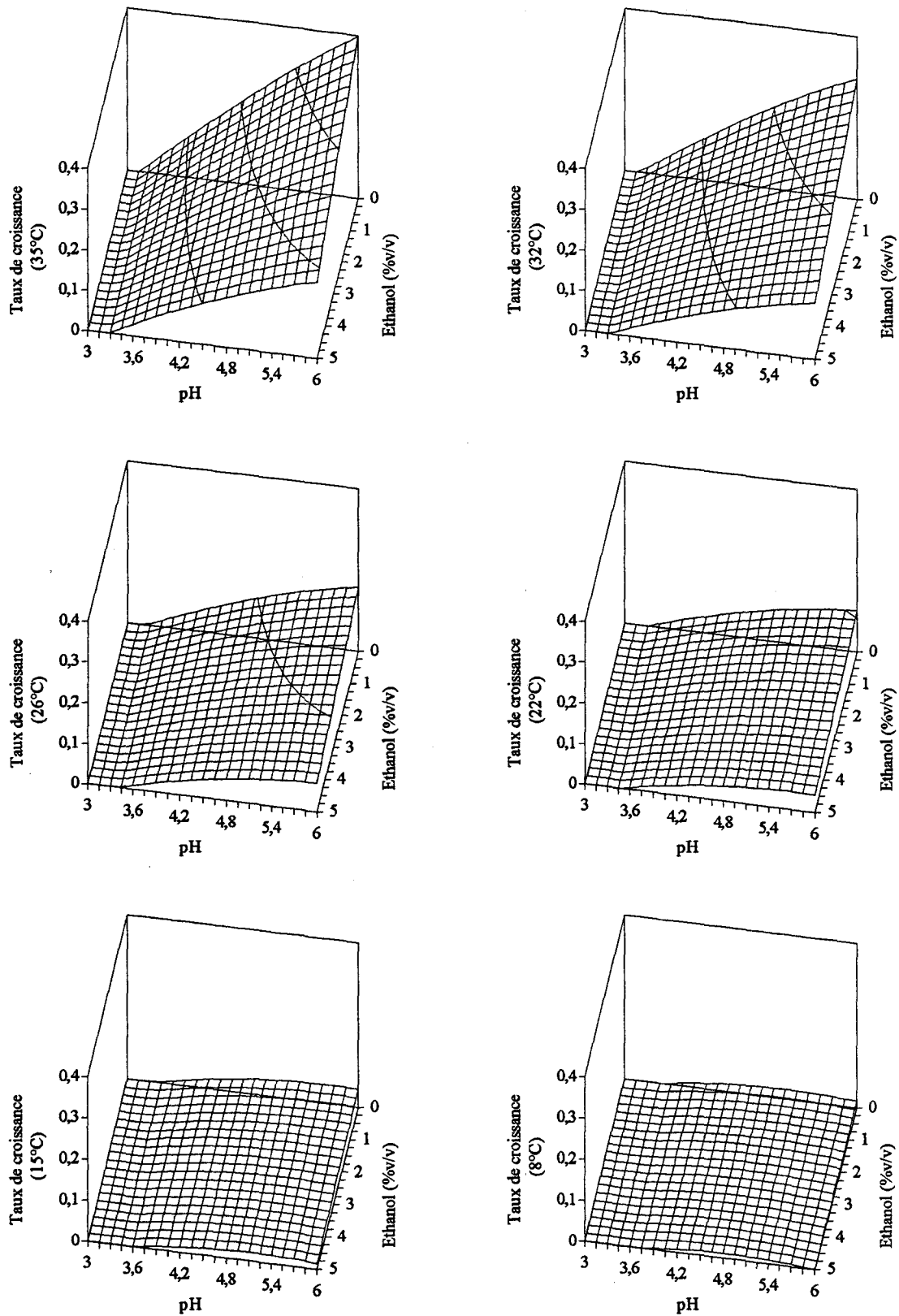


Figure 46 : Représentations graphiques des taux de croissance de *Pectinatus cerevisiiphilus* DSM 20466 en fonction du pH et de la concentration en éthanol à 35, 32, 26, 22, 15 et à 8°C obtenues par modélisation (régression polynomiale : équation N° 13).

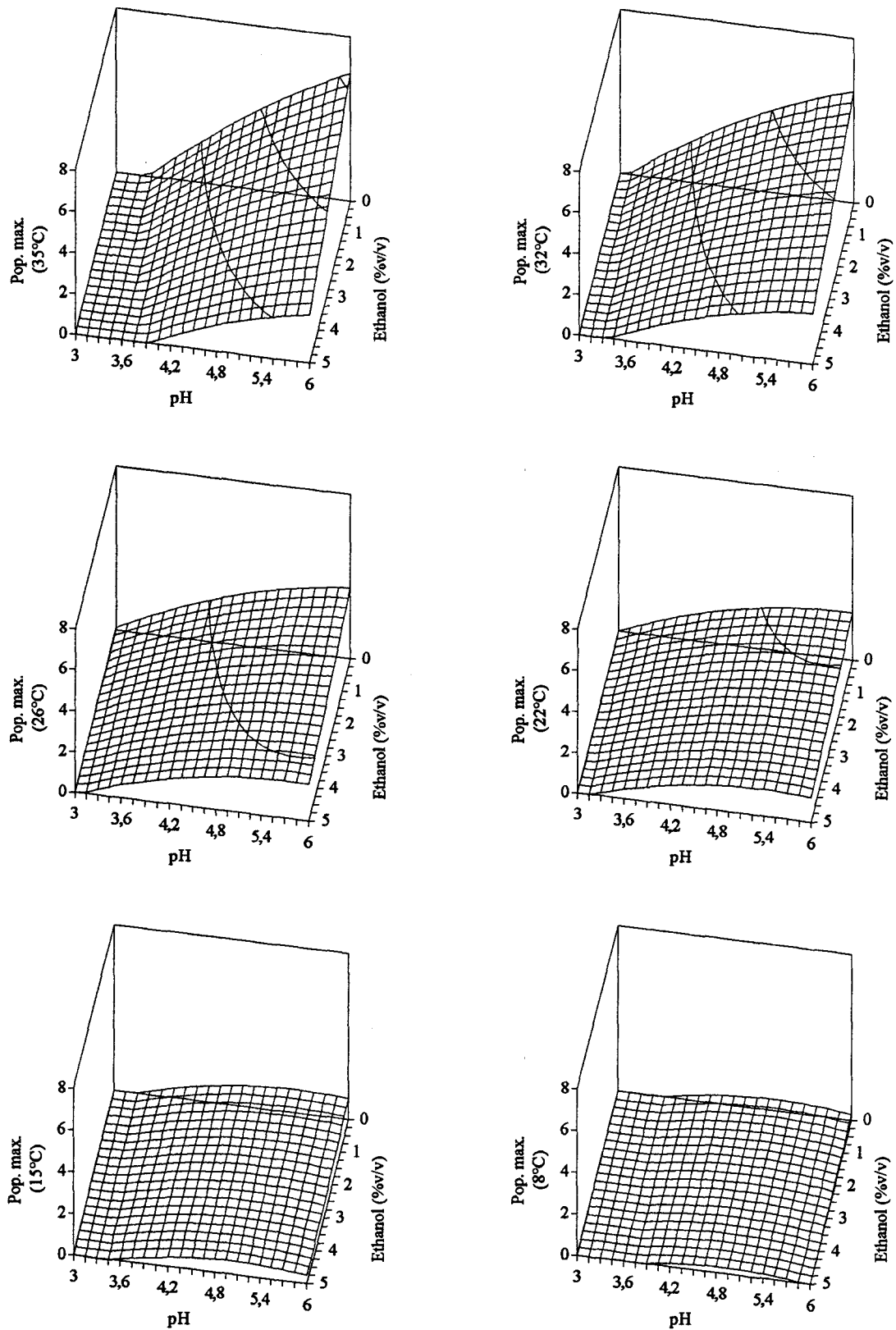


Figure 47 : Représentations graphiques de la population maximale de *Pectinatus* DSM 20466 en fonction du pH et de la concentration en éthanol à 35, 32, 26, 22, 15 et à 8°C obtenues par modélisation (régression polynomiale : équation N° 14).



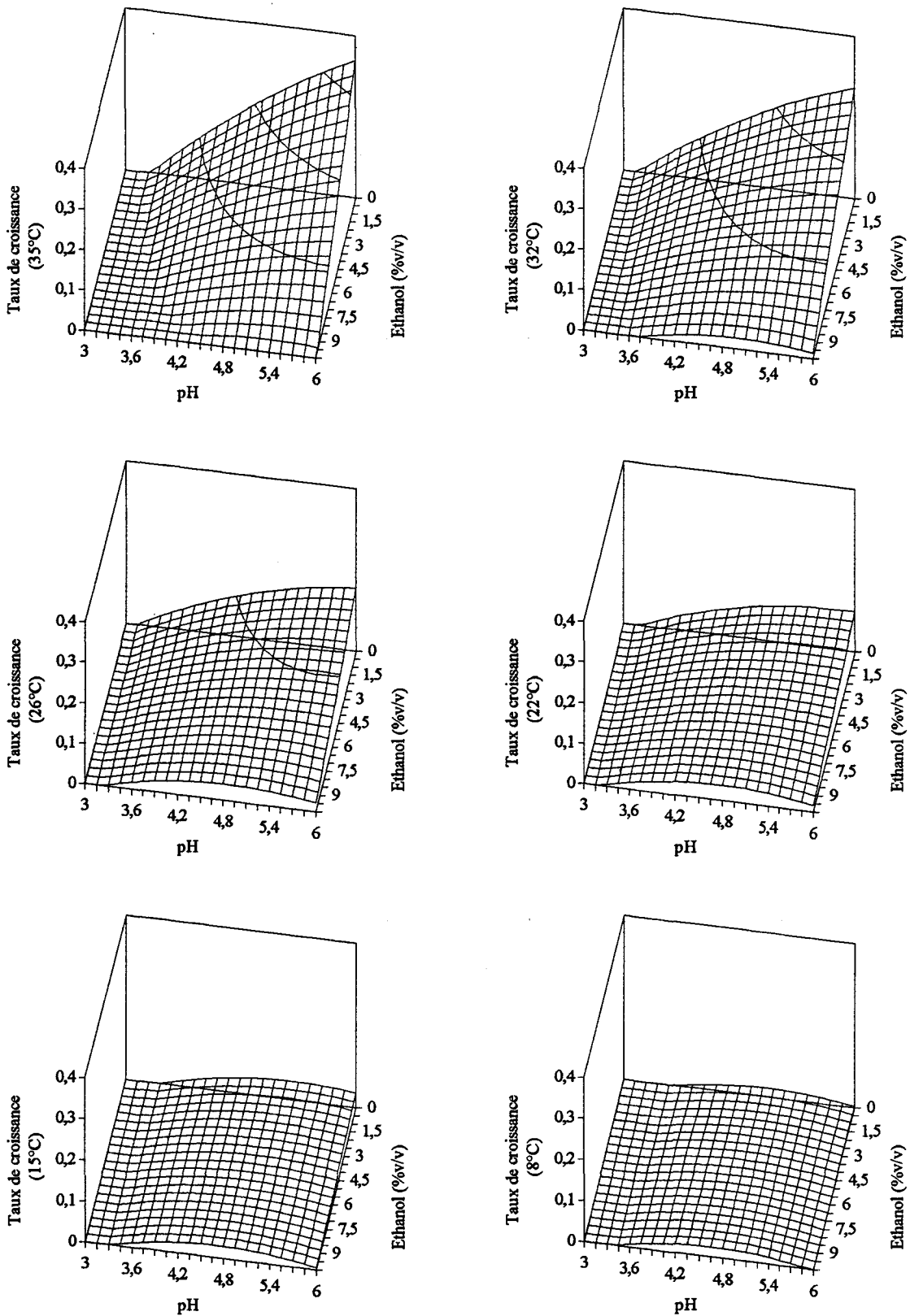


Figure 48 : Représentations graphiques des taux de croissance de *Pectinatus frisingensis* ATCC 33332 en fonction du pH et de la concentration en éthanol à 35, 32, 26, 22, 15 et à 8°C obtenues par modélisation (régression polynomiale : équation N° 15).

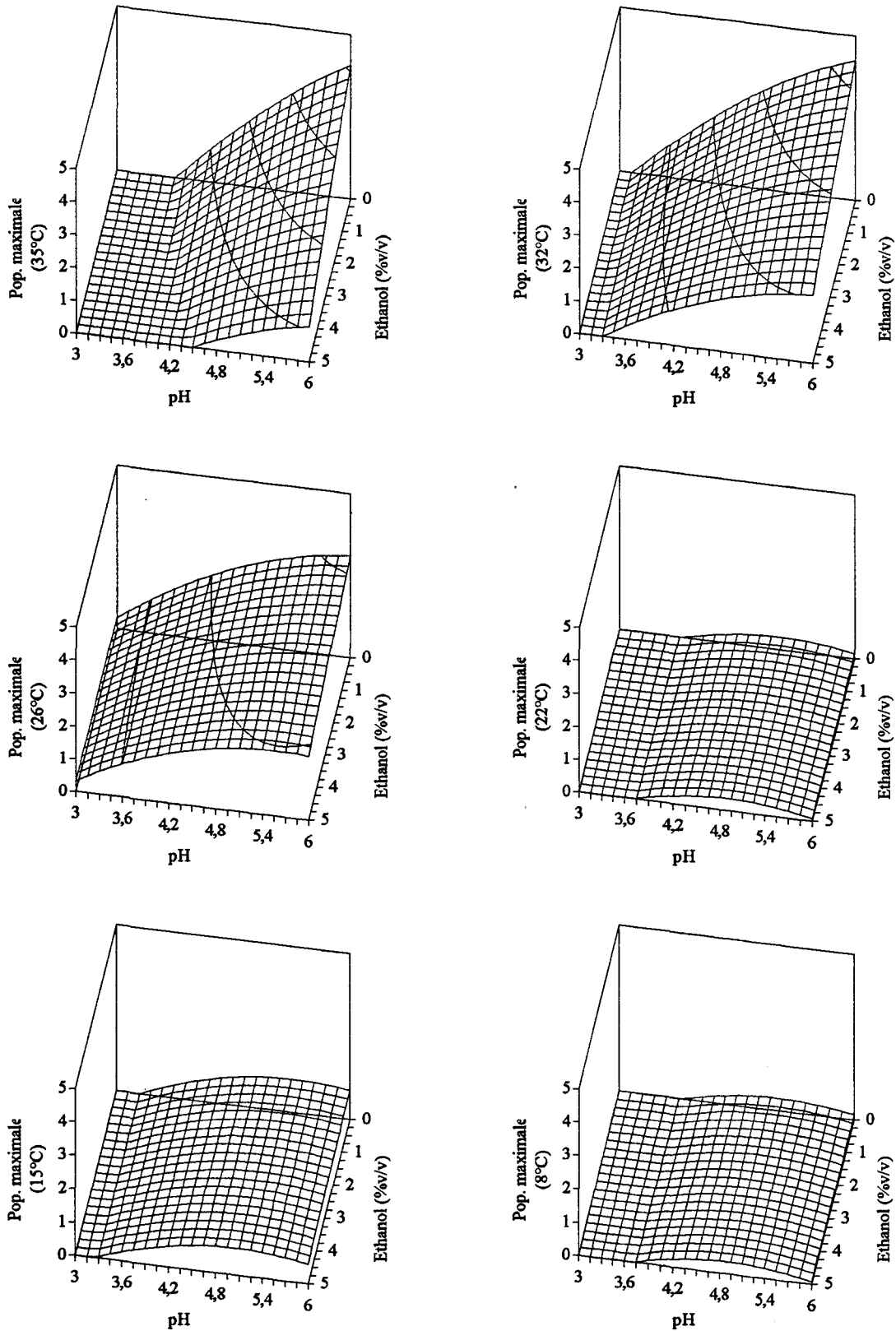


Figure 49 : Représentations graphiques de la population maximale de *Pectinatus frisingensis* ATCC 33332 en fonction du pH et de la concentration en éthanol à 35, 32, 26, 22, 15 et à 8°C obtenues par modélisation (régression polynomiale : équation N° 16).

Les différences de croissance dans le moût et le milieu MRS pour des pH et des concentrations en éthanol identiques, pour une même température, peuvent s'expliquer par la composition différente des deux milieux. Si les humulones que le moût contient ont tendance à limiter le développement des micro-organismes (Simpson 1993), il est possible que sa richesse en glucides fermentescibles, en acides aminés, en vitamines (Moll 1991) et en minéraux (Moll et Moll 1993), permette à *Pectinatus* de s'y développer plus rapidement.

La bonne homogénéité des valeurs expérimentales nous a permis de construire différentes équations polynomiales caractérisées par des r^2 et des test F acceptables. La croissance est effective jusqu'à des températures inférieures à 2°C et des pH inférieurs à 3,5. Dans les limites du plan d'expériences, la concentration en éthanol semble avoir moins d'influence que dans le milieu MRS.

Les équations 13 et 15 (Tableau 10) permettent de calculer le taux de croissance maximal des souches *P. cerevisiophilus* et *P. frisingensis* pour les différentes conditions pouvant être rencontrées lors de la fermentation du moût jusqu'au produit fini. Une comparaison des taux de croissance maximaux montre que la croissance, pour des conditions de température, de pH et de concentration en éthanol identiques, est plus rapide dans le moût que dans le milieu MRS. De même, les équations 14 et 16 (Tableau 10) montrent que la population atteinte est plus importante dans le moût. Contrairement au milieu MRS le taux de croissance et la population maximale de *P. cerevisiophilus* sont plus élevés que ceux de *P. frisingensis* pour des pH proches de celui du moût. Il en résulte que *P. cerevisiophilus* peut poser d'avantages de problèmes dans le cas d'une contamination à l'ensemencement, le taux de croissance pouvant atteindre 0,023 h⁻¹ et une population de 5,2 10⁷ bactéries/ml dans des conditions standards de fermentation du moût (8°C, pH 5,2). Dans le cas des fermentations hautes (15° ou 22°C, pH 5,2), ces valeurs sont beaucoup plus élevées (0,044 h⁻¹ et 1,1 10⁸ bactéries/ml à 15°C et 0,09 h⁻¹ et 2,2 10⁸ bactéries/ml à 22°C). Si la contamination a lieu dans la bière, *P. frisingensis* se développe d'avantage que *P. cerevisiophilus*, le taux de croissance est alors de 0,049 h⁻¹ et la population peut atteindre 1,5 10⁸ bactéries/ml. La plage des températures et des pH permettant la croissance de *Pectinatus* est plus large dans le moût que dans le milieu MRS. Il semble que cette bactérie soit bien adaptée au milieu moût et bière, ce qui est sûrement une des raisons pour lesquelles elle n'a été isolée jusqu'à nos jours que dans cet environnement (Chelack et Ingledew 1987; Haikara 1991).

1.11 Modélisation de la croissance dans le milieu MRS pour la souche *Megasphaera cerevisiae*

Les valeurs des taux de croissance maximaux et des populations maximales sont rassemblées dans le tableau 11

Tableau 11 : Valeurs des taux de croissance de *Megasphaera cerevisiae* DSM 20461 calculés à l'aide du modèle de Gompertz et du modèle logistique avec coefficient de corrélation et test F, population maximale de micro-organismes en fonction des variables température, pH et éthanol.

Temp. : température en °C; Eth. : éthanol en % v/v; r^2 : coefficient de corrélation; μ_{max} : taux de croissance maximal; ddl : degrés de liberté; Test F : test de Fisher

Temp.	Variables		Gompertz		logistique		ddl	Test-F	Pop. max. /10 ⁸
	pH	Eth.	r^2	μ_{max}	r^2	μ_{max}			
35	5	0	0,99	0,0949	0,99	0,0927	17	1,83	1,17
35	5	0	0,99	0,1022	0,99	0,1011	17	3,41	1,20
35	5	2,5				0,0000			0,00
35	5	2,5	0,94	0,0480	0,96	0,0342	17	1,33	1,14
35	5	5		0,000*		0,0000			0,00
35	5	5		0,000*		0,0000			0,00
35	6	0	0,99	0,1750	0,99	0,1723	17	0,82	1,38
35	6	0	0,98	0,1026	0,98	0,0992	17	1,16	0,99
35	6	2,5	0,99	0,0818	0,98	0,0829	17	0,55	0,96
35	6	2,5	0,99	0,0724	0,98	0,0736	17	0,50	0,91
35	6	5		0,000*		0,0000			0,00
35	6	5		0,000*		0,0000			0,00
35	7	0	0,99	0,1223	0,98	0,1227	17	0,74	1,16
35	7	0	0,99	0,1315	0,98	0,1321	17	0,67	1,13
35	7	2,5	0,99	0,0694	0,99	0,0690	17	1,40	0,52
35	7	2,5	0,99	0,0679	0,99	0,0701	17	0,75	0,47
35	7	5	0,97	0,0200	0,95	0,0190	17	0,61	0,11
35	7	5	0,95	0,0270	0,95	0,0294	17	0,84	0,06
32	5	0	0,99	0,0885	0,99	0,0886	17	3,11	1,20
32	5	0	0,99	0,0919	0,99	0,0807	17	2,67	1,23
32	5	2,5		0,000*		0,0000			0,00
32	5	2,5		0,000*		0,0000			0,00
32	5	5		0,000*		0,0000			0,00
32	5	5		0,000*		0,0000			0,00
32	6	0	0,99	0,1587	0,99	0,1549	17	0,99	1,58
32	6	0	0,99	0,1496	0,99	0,1469	17	0,96	1,53
32	6	2,5	0,99	0,1029	0,99	0,1033	17	0,32	1,20
32	6	2,5	0,99	0,1236	0,99	0,1249	17	0,32	1,14
32	6	5		0,000*		0,0000			0,00
32	6	5		0,000*		0,0000			0,00
32	7	0	0,99	0,1290	0,99	0,1280	17	0,99	1,17
32	7	0	0,99	0,1333	0,99	0,1332	17	0,79	1,19
32	7	2,5	0,99	0,0455	0,99	0,0453	17	0,89	0,29
32	7	2,5	0,99	0,0439	0,99	0,0428	17	1,29	0,25
32	7	5		0,000*		0,0000			0,00
32	7	5		0,000*		0,0000			0,00

Suite du tableau 11

Temp.	Variables		Gompertz		logistique		ddl	Test-F	Pop. max. /10 ⁸
	pH	Eth.	r ²	μmax	r ²	μmax			
22	5	0		0,000*		0,0000			0,00
22	5	0		0,000*		0,0000			0,00
22	5	2,5		0,000*		0,0000			0,00
22	5	2,5		0,000*		0,0000			0,00
22	5	5		0,000*		0,0000			0,03
22	5	5		0,000*		0,0000			0,00
22	6	0	0,98	0,1102	0,98	0,1052	17	1,18	1,37
22	6	0	0,96	0,0781	0,98	0,0770	17	1,86	1,39
22	6	2,5	0,98	0,0712	0,98	0,0743	17	0,95	1,33
22	6	2,5	0,99	0,0824	0,99	0,0864	17	0,83	1,39
22	6	5	0,00	0,000*	0,00	0,0000			0,00
22	6	5	0,00	0,000*	0,00	0,0000			0,00
22	7	0	0,99	0,1019	0,99	0,0991	17	1,27	1,23
22	7	0	0,99	0,0979	0,99	0,0991	17	1,38	1,25
22	7	2,5	0,99	0,0418	0,99	0,0419	17	1,32	0,36
22	7	2,5	0,99	0,0392	0,99	0,0404	17	1,71	0,41
22	7	5		0,000*		0,0000			0,00
22	7	5		0,000*		0,0000			0,00
18	5	0	0,99	0,0094	0,99	0,0098	17	0,28	0,66
18	5	1,75	0,99	0,0032	0,99	0,0056	17	1,33	0,11
18	5	2,5	0,93	0,0073	0,93	0,0163	17	1,12	0,23
18	5	5	0,00	0,0000	0,00	0,0000			0,00
18	6	0	0,98	0,0141	0,96	0,0187	17	0,55	1,81
18	6	1,75	0,99	0,0128	0,99	0,0134	17	0,23	1,19
18	6	2,5	0,99	0,0081	0,99	0,0077	17	2,52	0,56
18	6	5	0,00	0,0000	0,00	0,0000			0,00
18	7	0	0,99	0,0373	0,99	0,0375	17	0,93	1,04
18	7	1,75	0,91	0,0048	0,92	0,0056	17	1,24	0,96
18	7	2,5	0,99	0,0125	0,99	0,0163	17	4,25	0,52
18	7	5	0,83	0,0013	0,84	0,0011	17	1,09	0,08
15	5	0		0,0000		0,0000			0,00
15	5	2,5		0,0000		0,0000			0,00
15	5	5		0,0000		0,0000			0,00
15	6	0		0,000*		0,0000			0,00
15	6	2,5		0,000*		0,0000			0,00
15	6	5		0,000*		0,0000			0,00
15	7	0	0,97	0,0093	0,98	0,0115	17	1,56	2,01
15	7	2,5		0,000*		0,0000			0,00
15	7	5		0,0000		0,0000			0,00

0,000* : valeurs des taux de croissance nuls utilisées pour établir les équations polynomiales

La figure 50 donne un aperçu des taux de croissance maximaux calculés à l'aide du modèle de Gompertz.

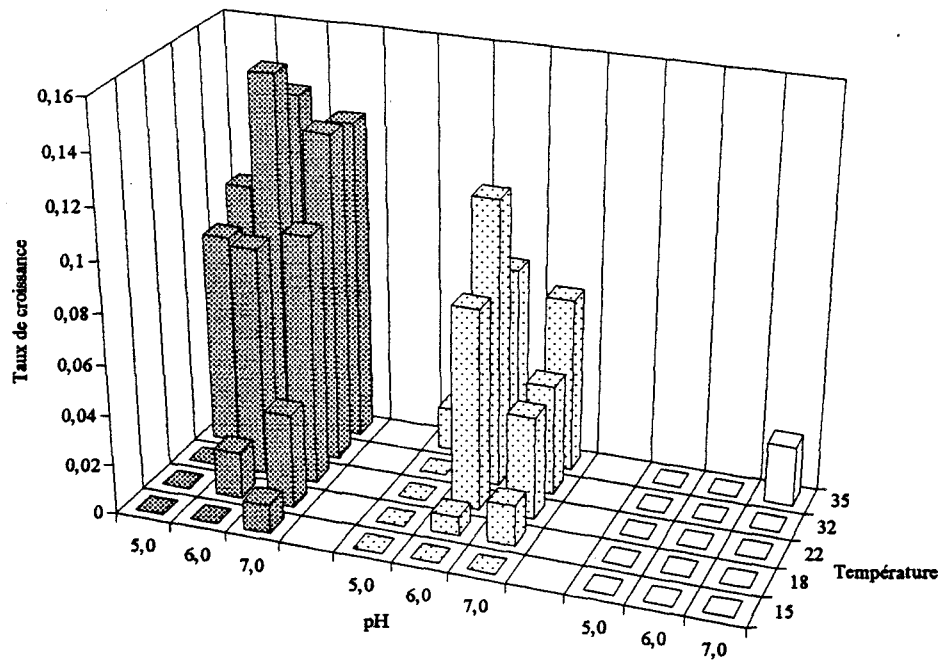


Figure 50 : Taux de croissance maximaux de *Megasphaera cerevisiae* dans le milieu MRS à différents pH températures pour des concentrations en éthanol (v/v) : 0 % (gris), 2,5 % (ombré), 5 % (blanc).

La température, le pH et l'éthanol influencent fortement le taux de croissance maximal. Il est le plus élevé pour le pH 6. Il est d'autant plus bas que la concentration en éthanol augmente. Pour une concentration de 5 % il n'y a plus de croissance sauf à 35°C, pH 7. La croissance est plus rapide à 32°C, elle diminue progressivement avec la température. A 15°C il n'y a croissance que pour un pH de 7 à 0 % d'éthanol.

En absence d'éthanol dans le milieu, Pour des températures supérieures à 15°C, la population maximale semble peu affectée par la température (Figure 51).

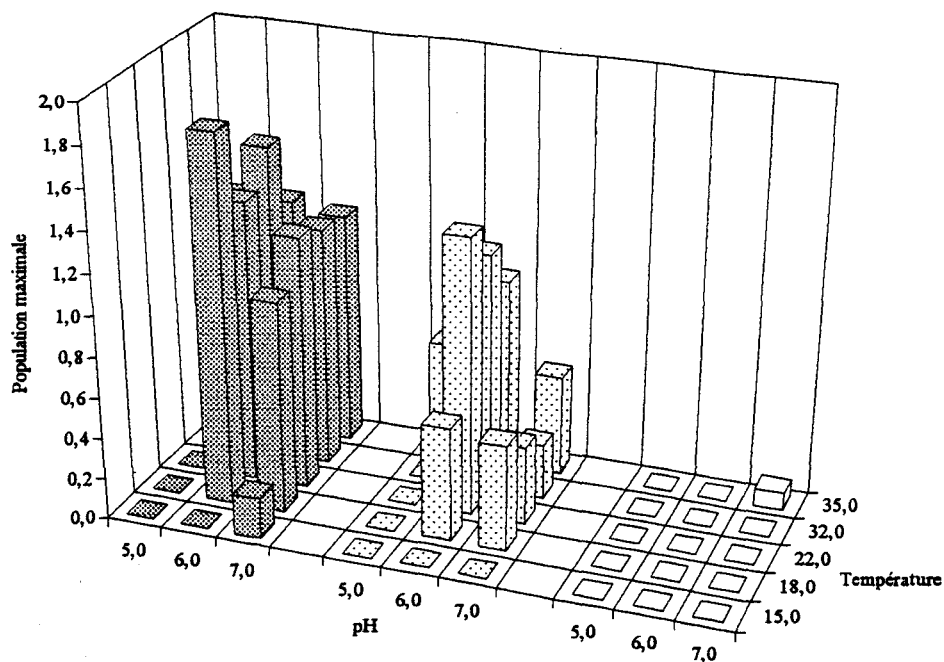


Figure 51 : Populations maximales de *Megasphaera cerevisiae* dans le milieu MRS à différents pH températures pour des concentrations en éthanol (v/v) : 0 % (gris), 2,5 % (ombré), 5 % (blanc).

La présence d'éthanol dans le milieu influence fortement la population maximale. La population maximale est la plus élevée à pH 6 pour une température de 32-26°C. Les optimums de la population maximale et du taux de croissance se superposent. Ces résultats sont similaires à ceux trouvés dans l'étude préliminaire (Watier et al. 1993)

La figure 52 donne les valeurs de l'énergie d'activation. On peut y remarquer un changement pour des températures inférieures à 22°C. Elle est de 7,7 kJ entre 35 et 22°C ce qui est très faible comparativement aux autres micro-organismes (Pirt 1974). Il semble donc que cette bactérie nécessite très peu d'énergie pour amorcer sa croissance. Elle est beaucoup plus élevée (316,4 kJ) pour les températures plus basses. La température a donc un rôle prédominant dans le développement de *Megasphaera*. Un tel changement dans la valeur de l'énergie d'activation fait présumer à un shift métabolique important, des enzymes différentes intervenant dans le métabolisme de base pour des températures inférieures et supérieures à 22°C.

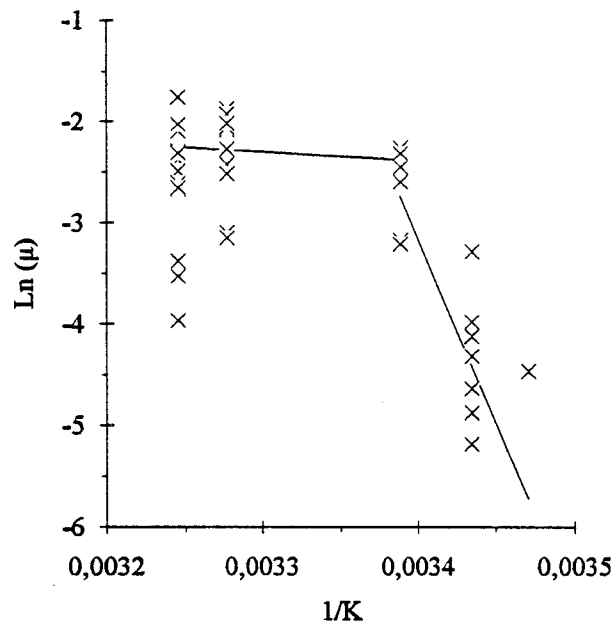


Figure 52 : Relation entre $\text{Ln}(\mu)$ et $1/K$ permettant de calculer l'énergie d'activation pour la souche *Megasphaera cerevisiae* DSM 20461 dans le milieu MRS

Partant des mêmes conclusions que pour *Pectinatus* sp. sur la variation de l'énergie d'activation, nous avons construit des équations polynomiales de la forme :

$$Y = a \mu_0 e^{(-Ea/RK)} + b P + c E + d \mu_0 e^{2(-Ea/RK)} + e P^2 + f E^2 + g \mu_0 e^{(-Ea/RK)} P + h \mu_0 e^{(-Ea/RK)} E + i P E + j \mu_0 e^{(-Ea/RK)} P E + k$$

Toutefois il s'avère que cette transformation n'apporte pas d'amélioration. La même remarque peut être faite sur l'utilisation de $\text{Ln}(\mu_{\text{max}})$ ou $\text{Ln}(\text{pop. max.})$. Dans ces conditions nous avons préféré utiliser une équation polynomiale plus simple, de la forme :

$$Y = a T + b P + c E + d T^2 + e P^2 + f E^2 + g \mu_0 T P + h T E + i P E + j T P E + k$$

Les équations sont rassemblées dans le tableau 12.

Tableau 12 : Equations obtenues par régression polynomiale donnant le taux de croissance maximal ou la population maximale de micro-organismes de *Megasphaera* DSM 20461 dans le milieu MRS en fonction de la température, du pH initial et de la concentration en éthanol. T est la température en degrés Celsius, P correspond au pH et E à la concentration en éthanol (% v/v).

Dans toutes les équations les valeurs nulles (marquées par un * dans le tableau 11) des taux de croissance ou de la population maximale de micro-organismes, ont été prises en compte.

équation N°17

$$\text{Taux de croissance} = 0,00231 T + 0,26651 P + 0,01064 E - 0,00012 T^2 - 0,02340 P^2 + 0,00153 T.P - 0,00016 T.P.E - 0,87477$$

$$\text{Degrés de liberté} = 82 \quad r^2 = 0,82 \quad \text{test F} = 49,25$$

équation N°18

$$\text{Population maximale de micro-organismes} = 0,14212 T + 4,87227 P + 0,22960 E - 0,00217 T^2 - 0,38598 P^2 - 0,00588 T.E - 0,04456 P.E - 16,21861$$

$$\text{Degrés de liberté} = 82 \quad r^2 = 0,71 \quad \text{test F} = 25,77$$

Ces équations montrent que les facteurs température, pH et éthanol ont un effet marqué sur les taux de croissance maximaux de *Megasphaera cerevisiae*. Il apparaît sur les figures 53 et 54 que les conditions optimales ($\mu_{\max} = 0,16 \text{ h}^{-1}$) se situent à une température proche de 35°C, un pH de 6,6 et une concentration nulle en éthanol. On constate qu'il n'y a plus de croissance au-dessus de 6% d'éthanol. Aucune croissance n'est observée en dessous du pH 4,25. Quand la température baisse, le pH optimal de croissance diminue pour se situer aux environs du pH 6,4. A 15°C la croissance ne s'observe plus qu'à des pH de 5 à 7.

L'équation 18 montre que les conditions optimales ne sont pas les mêmes pour le taux de croissance maximal et pour la population maximale. On observe la plus forte croissance ($1,5 \cdot 10^8$ cellules/ml) pour une température de 33°C, un pH de 6,2 et une concentration nulle en éthanol.

Pour les deux équations, les valeurs calculées diffèrent des valeurs expérimentales lorsque la température baisse et que la concentration en éthanol augmente. Ces écarts entre valeurs expérimentales et valeurs calculées peuvent expliquer le faible r^2 (0,82 et 0,71).

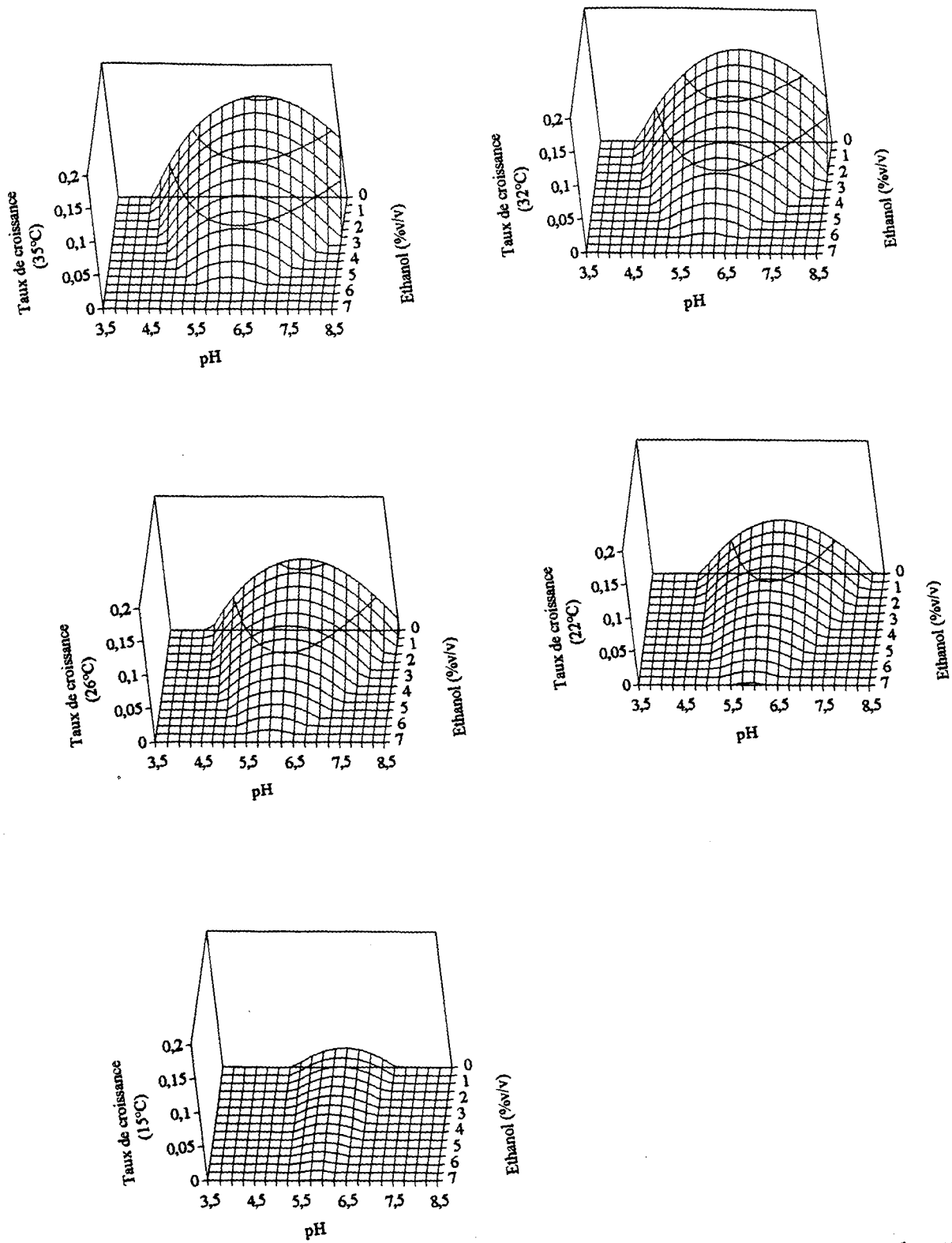


Figure 53 : Représentations graphiques des taux de croissance de *Megasphaera cerevisiae* DSM 20461 en fonction du pH et de la concentration en éthanol à 35, 32, 22, 18 et à 15°C obtenues par modélisation (régression polynomiale : équation N° 17).

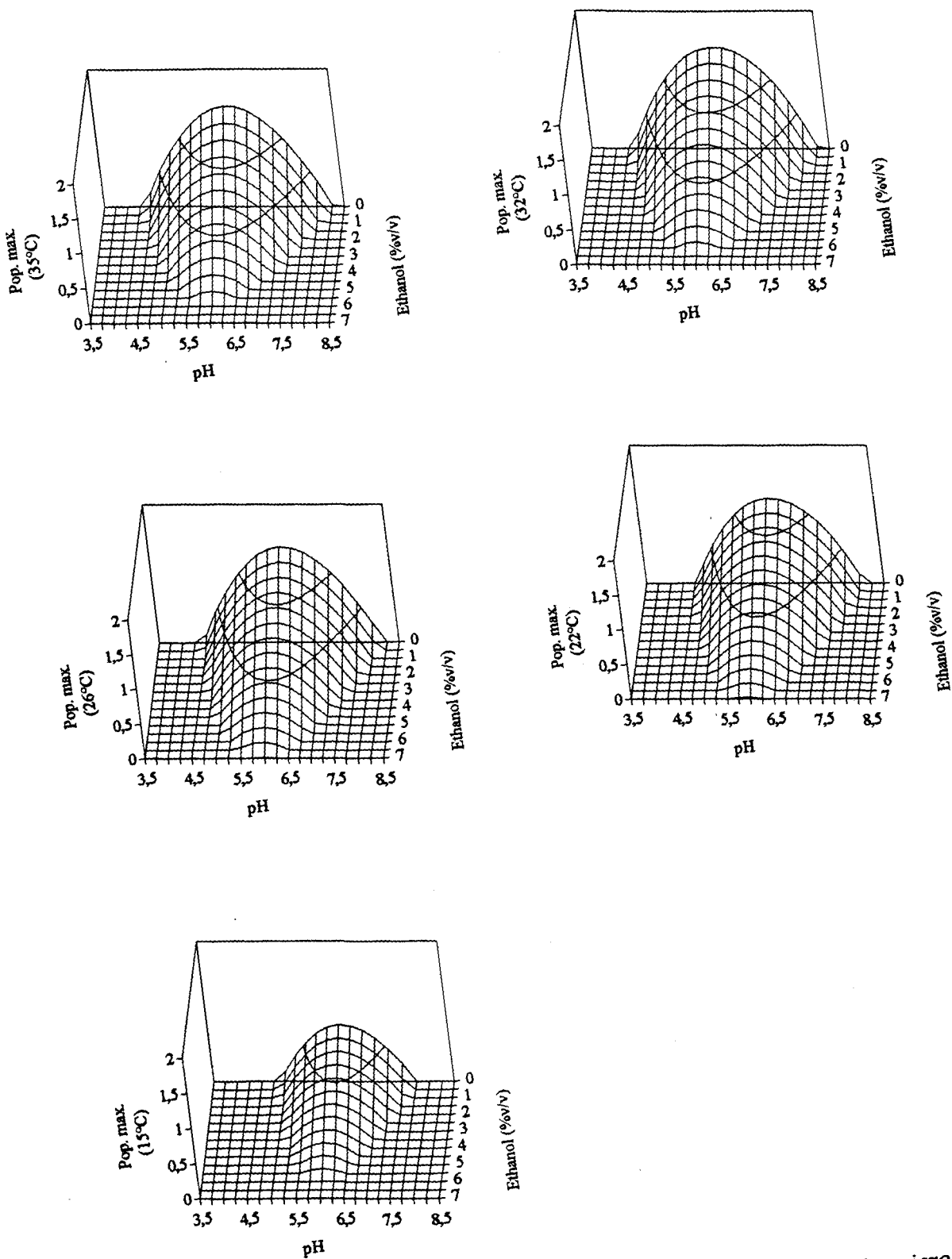


Figure 54 : Représentations graphiques des populations maximales de micro-organismes (échelle / 10^8) de *Megasphaera* DSM 20461 en fonction du pH et de la concentration en éthanol à 35, 32, 22, 18 et à 15°C obtenues par modélisation (régression polynomiale : équation N° 18).

Le modèle polynomiale intégrant l'équation d'Arrhénius ne convient pas à *Megasphaera*. D'après les résultats expérimentaux, il semble que les conditions d'environnement durant la fermentation de la bière (2 à 8°C, pH 4,5 à 5,2 et concentration en éthanol de 0 à 5 %), ne permettent pas le développement de *Megasphaera cerevisiae*. Cependant les conditions rencontrées dans une bière faiblement alcoolisée stockée à une température ambiante supérieure à 25°C peuvent permettre le développement de cette bactérie.

2. Etude du métabolisme de *Pectinatus* dans le milieu MRS

L'analyse par chromatographie liquide haute pression a permis de suivre la consommation et la synthèse de produits par *Pectinatus* sp. DSM 20465 lors de la croissance dans le milieu MRS (Figure 55).

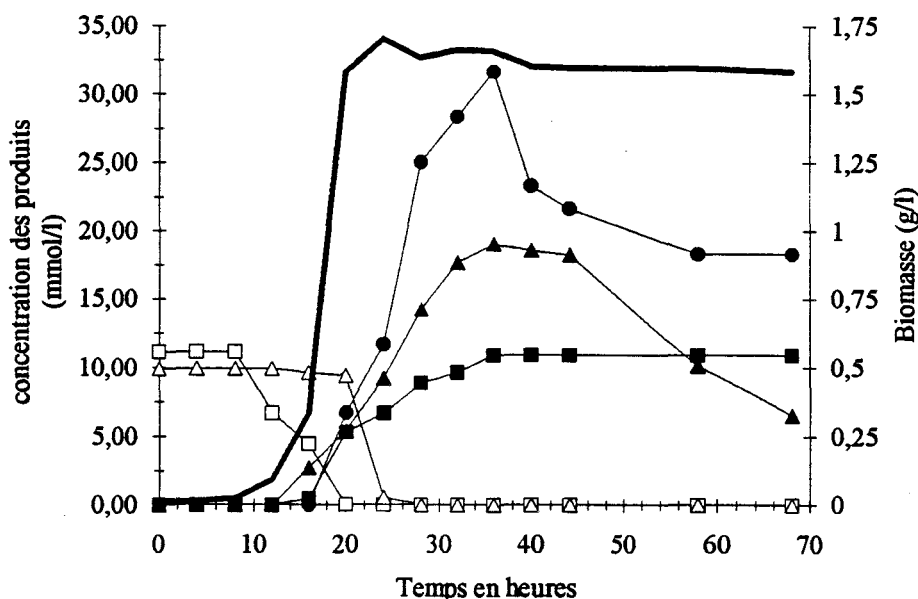


Figure 55 : Cinétique de consommation et de formation de produits par *Pectinatus* sp. DSM 20465 dans le milieu MRS à pH 6. Glucose (\square), citrate (\triangle), propionate (\blacksquare), succinate (\blacktriangle) et (\bullet) acétate.

Pectinatus est capable d'utiliser le glucose et le citrate comme sources de carbone. Le catabolisme des deux substrats n'est pas simultané. Le citrate est catabolisé lorsqu'il n'y a plus de glucose dans le milieu. Le trop faible nombre de points expérimentaux entre 10 et 25 heures ne permet pas de savoir si cela se traduit par une courbe de croissance diauxique. La croissance bactérienne s'arrête quand la totalité du citrate est consommé. La synthèse de succinate, d'acétate et de propionate commence au début de la phase de croissance et se poursuit en début de phase stationnaire. Après 36 heures une partie de l'acétate et du succinate est réutilisée comme source de carbone. On peut supposer que *Pectinatus* utilise en partie ces substrats pour son énergie de maintenance.

Globalement la figure 55 semble montrer que la quantité des produits synthétisés est plus importante que celle des produits consommés. En réalité, il est possible que certains glucides ou acides aminés apportés par l'introduction d'extrait de levure et de viande dans le milieu MRS soient également utilisés comme source de carbone.

Dans le plan d'expériences, *P. sp.*, l'analyse de la composition initiale avant croissance par rapport à la composition finale des milieux a montré que pour chaque croissance, la totalité du glucose (2 g/l) et du citrate (2 g/l) est consommée.

La figure 56 montre que *Pectinatus* est capable de synthétiser du propionate. La synthèse de propionate est indépendante de la concentration en éthanol ou de la biomasse mais est fonction de la température et du pH. La température 26°C favorise la synthèse de propionate. Les pH plus acides comme le pH 5,3 entraînent une synthèse beaucoup plus forte. Dans les meilleures conditions elle peut atteindre 50 mmol/l soit 3,6 g/l.

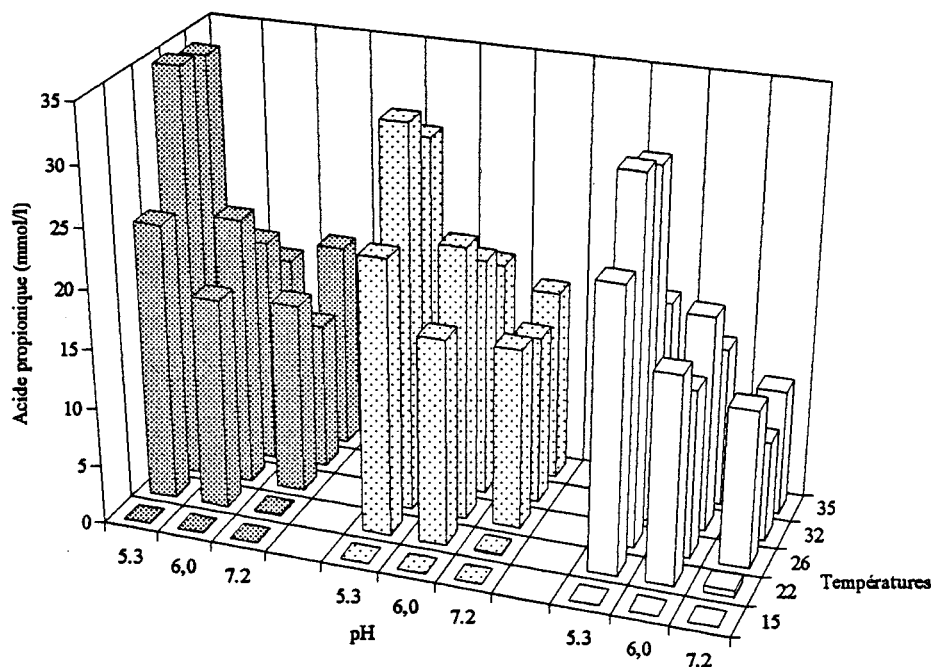


Figure 56 : Concentration en propionate après croissance de *Pectinatus sp.* dans MRS à différents pH et températures pour des concentrations en éthanol (v/v) : 0 % (gris), 2,5 % (ombré), 5 % (blanc).

Lors de la croissance de *Pectinatus* sp., on observe une synthèse de succinate (Figure 57). Celle-ci est beaucoup plus importante à pH 6 et surtout à pH 7,2 qu'à pH 5,3. Lorsqu'il y a croissance, la température a peu d'influence, excepté à 22° pour le pH 7,2.

Le pH optimal pour la synthèse du succinate est donc différent de celui pour la synthèse du propionate. Comme pour *Propionibacterium acidipropionici* (Hsu et Yand 1991), les enzymes permettant la transformation du succinate en propionate chez *Pectinatus* sont donc caractérisées par un pH optimal acide.

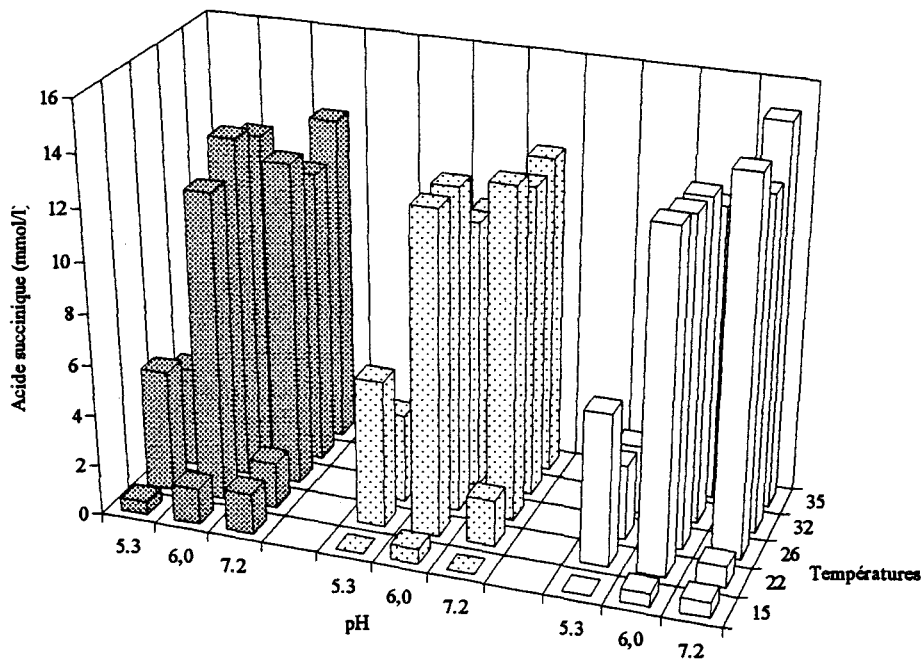


Figure 57 : Concentration en succinate après croissance de *Pectinatus* sp. dans MRS à différents pH et températures pour des concentrations en éthanol (v/v) : 0 % (gris), 2,5 % (ombré), 5 % (blanc).

Comme Tholozan *et al.* (1993a, 1994) l'ont constaté pour la souche *Pectinatus frisingensis*, Il existe une balance entre la concentration en succinate et la concentration en propionate. Lorsque la concentration en propionate augmente, celle en succinate diminue, il en résulte que la concentration globale³ varie peu (Figure 58). Cela confirme que *Pectinatus* utilise la voie du succinate pour la synthèse du propionate.

³ succinate + propionate

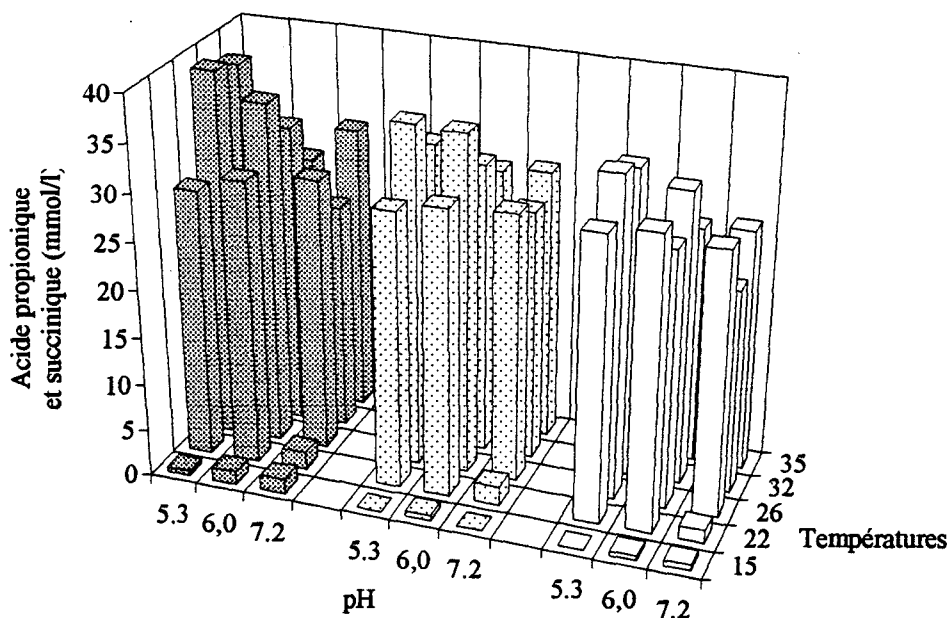


Figure 58 : Concentration en succinate et en propionate après croissance de *Pectinatus* sp. dans MRS à différents pH et températures pour des concentrations en éthanol (v/v) : 0 % (gris), 2,5 % (ombré), 5 % (blanc).

La transformation du méthylmalonyl-CoA en propionyl-CoA nécessite un carbone provenant de la décarboxylation du pyruvate en l'oxaloacétate. Ce dernier est transformé en malate qui est un inhibiteur compétitif de la succinate réductase (Chelak *et al.* 1987). Une concentration élevée en propionate entraîne donc l'élévation de la concentration en malate inhibant la formation de succinate. La concentration en succinate est donc fonction de la synthèse du propionate.

La figure 59 met en évidence une synthèse élevée d'acétate.

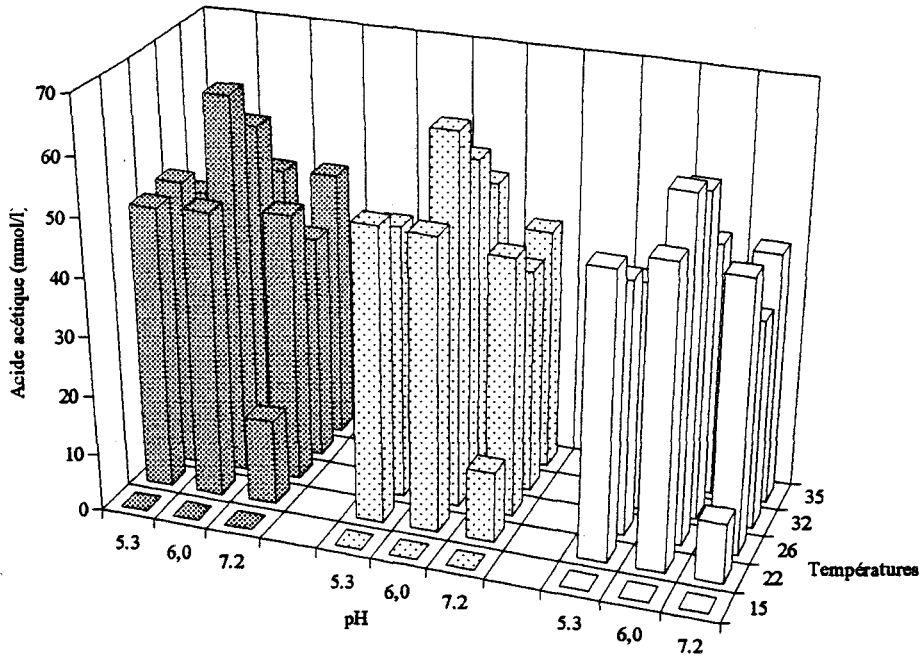


Figure 59 : Concentration en acétate après croissance de *Pectinatus* sp. dans MRS à différents pH et températures pour des concentrations en éthanol (v/v) : 0 % (gris), 2,5 % (ombré), 5 % (blanc).

Les quantités non négligeables d'acétate qui s'accumulent, semblent avoir un rôle important d'un point de vue énergétique cellulaire. La synthèse de l'acétate est maximale pour le pH 6 à 26°C. Elle est indépendante de la concentration en éthanol dans le milieu de départ.

La figure 61 montre l'utilisation de l'éthanol comme source de carbone par *Pectinatus* sp.. Cette voie de dégradation de l'éthanol a d'ailleurs été mise en évidence chez d'autres bactéries (Schink *et al.* 1987). Le bilan est le suivant : $3 \text{ éthanol} + 2 \text{ HCO}_3^- = 2 \text{ propionate} + 1 \text{ acétate}^- + \text{H}^+ + 3\text{H}_2\text{O}$.

L'utilisation de l'éthanol comme source de carbone semble être liée à la synthèse d'acétate puisque lorsque la synthèse d'acétate est la plus élevée, l'utilisation de l'éthanol est réduite. On peut supposer qu'une concentration élevée en acétate implique une concentration également élevée d'Acétyl-CoA, déplaçant l'équilibre éthanol-Acétyl-CoA vers l'éthanol.

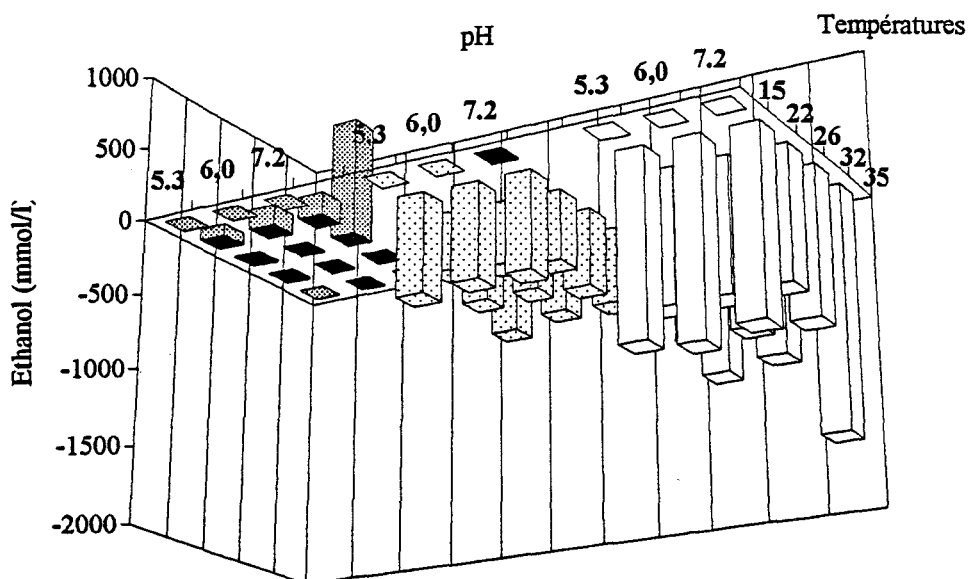


Figure 60 : Différences entre la concentration initiale et finale en éthanol après croissance de *Pectinatus* sp. dans MRS à différents pH et températures pour des concentrations en éthanol (v/v) : 0 % (gris), 2,5 % (ombré), 5 % (blanc).

Le catabolisme de l'éthanol par *Pectinatus* est proportionnel à sa concentration initiale dans le milieu. Cette voie de catabolisme semble être moins utilisée par la bactérie pour les températures 32 et 26°C.

Lorsque l'éthanol est absent du milieu avant croissance, il peut y avoir synthèse de celui-ci, tout au moins pour les températures de 22°C et 26°C principalement à pH 7,2. Cette synthèse d'éthanol a d'ailleurs été mise en évidence chez *Pectinatus frisingensis* (Tholozan, communication personnelle). Il semble donc que la voie de dégradation de l'éthanol en acétyl-CoA via l'acétaldéhyde soit réversible, l'équilibre étant déplacé vers la synthèse d'éthanol pour les températures 26°C et 32°C. L'acétyl-CoA peut être un intermédiaire dans la voie de synthèse de l'acétate. L'acétyl-CoA est un composé riche en énergie, le passage de l'acétyl-P en acétate libère un ATP.

La figure 61 est le résultat d'une étude fine de l'influence de l'éthanol sur la croissance de *P. sp.*

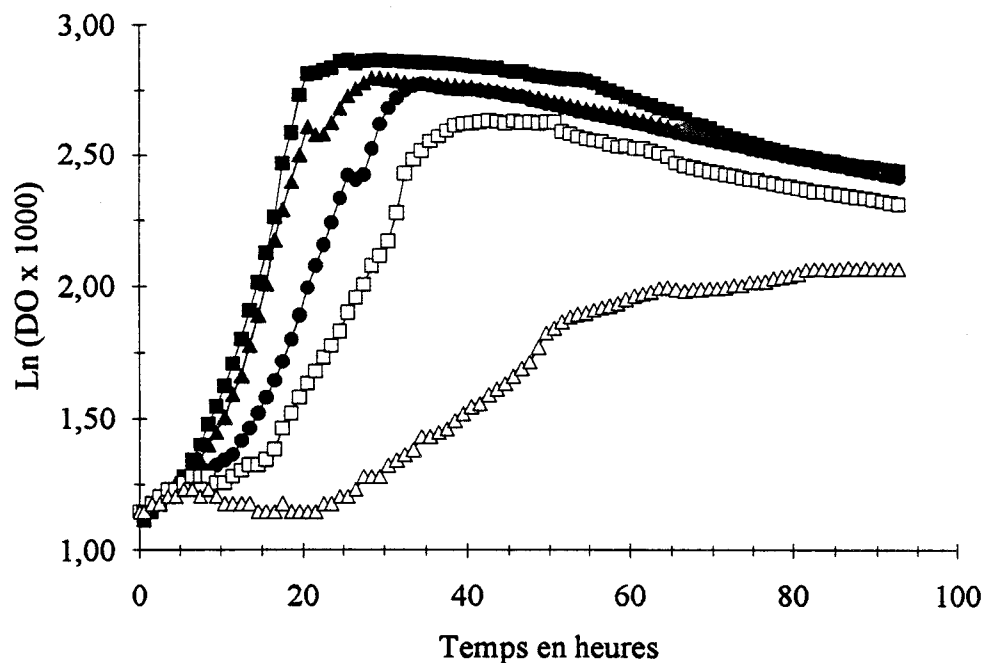


Figure 61 : Cinétiques de croissance de *Pectinatus* sp. DSM 20465 dans le milieu MRS en présence d'éthanol en concentrations variables : 0 % (■), 1% (▲), 2% (●), 3% (□) 4% (△).

Les cinétiques de croissance ont été réalisées sur biophotomètre. Elles montrent en fin de phase de croissance, pour les concentrations de 1 et 2 % (v/v), un phénomène de diauxie qui pourrait avoir pour origine l'utilisation de l'éthanol comme substrat carboné après un temps d'adaptation lorsque le glucose du milieu est totalement utilisé. Pour des concentrations plus importantes la diauxie n'est plus visible. Dans ces conditions, la croissance étant beaucoup plus lente, il est possible que l'adaptation des bactéries à ce second substrat soit effective avant que le glucose ne soit complètement utilisé.

L'ensemble des résultats sur le métabolisme de *Pectinatus* sp. et les informations données par la littérature pour d'autres micro-organismes anaérobies (Doelle 1969) permettent d'établir une carte des voies métaboliques hypothétiques de cette bactérie (Figure 62).

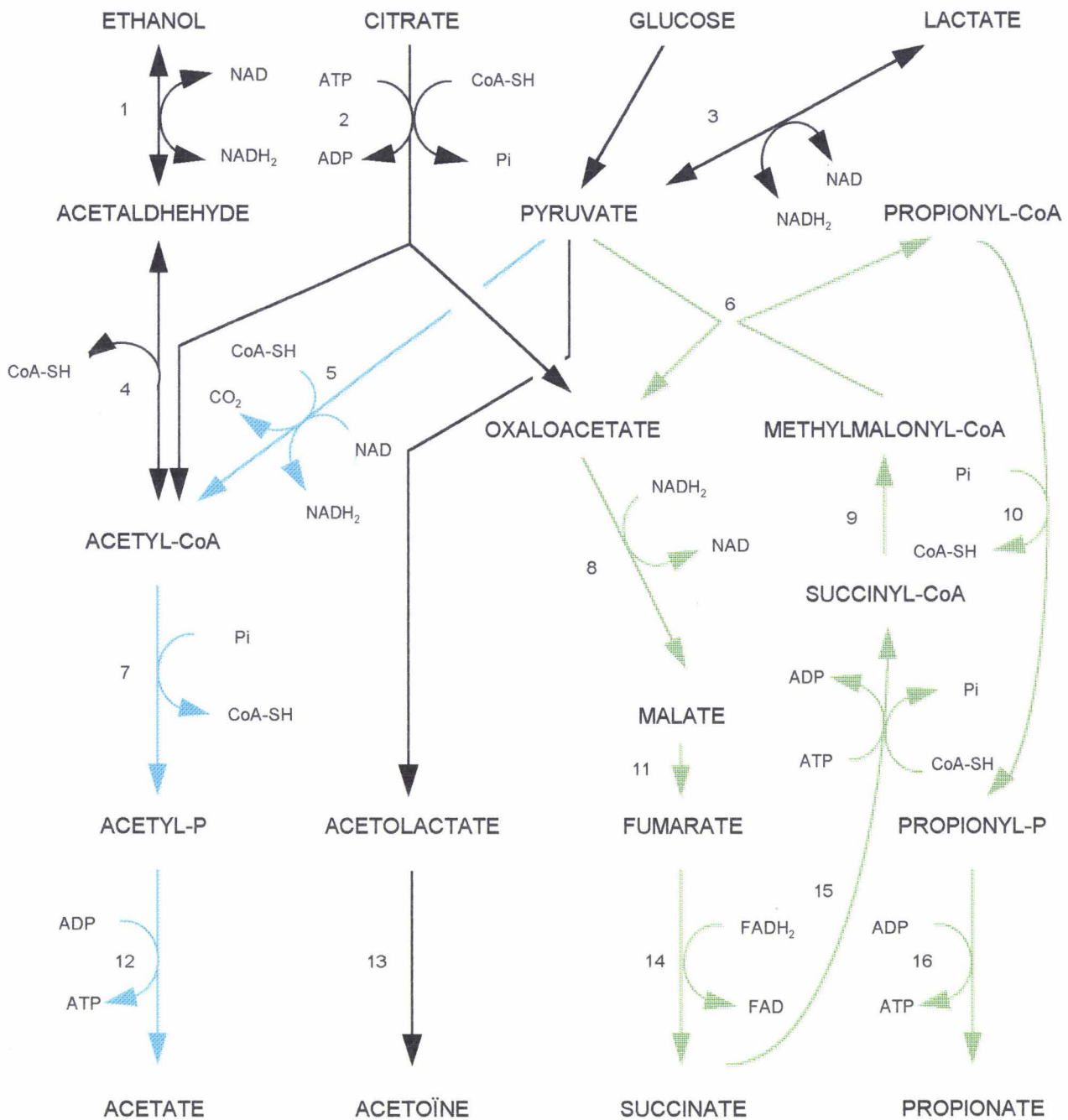


Figure 62 : Voies métaboliques hypothétiques de *Pectinatus* sp.
Bleu : voie de l'acétate, **vert :** voie du propionate

- 1) Alcool déshydrogénase. 2) Citrate lyase. 3) Lactate déshydrogénase. 4) Aldehyde déshydrogénase.
- 5) Pyruvate décarboxylase. 6) Méthylmalonl-CoA-pyruvate transcarboxylase. 7) Phospho-transacétylase.
- 8) Malate déshydrogénase. 9) Méthylmalonyl-CoA isomérase. 10) Phospho-transpropionylase.
- 11) Fumarase. 12) Acétate kinase. 13) Acétolate décarboxylase. 14) Succinate déshydrogénase.
- 15) Coenzyme-A transférase. 16) Propionate kinase.



Le métabolisme de *Pectinatus* sp. est plus actif pour des températures comprises entre 26°C et 32°C. Dans ces conditions de température à pH 5,3, la production de propionate est importante. En contrepartie la concentration en succinate diminue. Quand le pH est proche du pH optimal de croissance, la synthèse d'acétate augmente. En milieu plus basique, la synthèse de propionate diminue, ce qui a pour conséquence que le succinate s'accumule. Le pH du milieu de culture semble être l'un des facteurs principaux de modification des bilans de fermentation de ces micro-organismes, et met en évidence l'existence d'une balance métabolique entre les excréments de propionate et de succinate. Le métabolisme de *Pectinatus* n'est pas proportionnel à la croissance en biomasse. Des populations plus faibles (comme à 22°C) peuvent malgré tout entraîner une synthèse importante de propionate notamment à pH acides. Dans le moût lors d'une fermentation haute ou lors du stockage de la bière, une contamination par *Pectinatus* peut avoir de graves conséquences, entraînant la formation d'un trouble mais surtout la formation d'une quantité non négligeable de propionate qui altère les qualités organoleptiques de la bière.

3. Résistance

3.1 Thermorésistance

3.1.1 Justification des méthodes utilisées

La technique la plus utilisée pour déterminer la thermorésistance d'un micro-organisme a été décrite par Cheftel *et al.* (1963). Elle consiste à introduire dans des tubes capillaires scellés des suspensions de spores ou de cellules et de les plonger dans un bain thermostaté pendant des temps variables avant de les refroidir dans un bain de glace. Les micro-organismes survivants sont ensuite dénombrés sur milieu gélosé.

Megasphaera et *Pectinatus* étant des micro-organismes anaérobies strictes, nous avons préféré utiliser la méthode décrite à la page 65, qui permet de travailler sous atmosphère d'azote, l'oxygène dissous pouvant influencer grandement la thermorésistance des micro-organismes (Linton *et al.* 1992). Pour assurer l'anaérobiose nous avons introduit un réducteur dans le milieu. L'utilisation de Na_2S , contrairement à d'autres réducteurs (la cystéine par exemple), permet d'éviter lors du chauffage la formation de peroxydes qui abaissent la thermorésistance (Morgan *et al.* 1986). La méthode mise en place a l'avantage d'être moins lourde. Elle se rapproche de celle utilisée par Doutsias (1974) et Barillère *et al.* (1985).

Il est indispensable de s'assurer de la validité de toutes méthodes nouvelles mises en pratique. Pour cela, nous avons pris la précaution de vérifier que la température à l'intérieur du flacon⁴ était identique à celle du Bain-Marie thermostaté. L'équilibre s'établit après 10 minutes. Lors de l'addition de l'inoculum⁵ dans le flacon, la chute momentanée de la température peut être considérée comme négligeable pour les températures inférieures à 55°C, la baisse de température étant faible et les temps de traitement très supérieurs au temps d'équilibre. L'équilibre est établi après seulement 3 minutes. L'erreur qui en découle a été considérée comme négligeable dans toute cette étude. Pour les températures supérieures, les temps de traitement ne dépassant pas 1 minute et la stabilisation se faisant en plus de 3 minutes, nous avons pris en compte la baisse de la température dans le flacon pour la détermination de la température de traitement.

⁴ flacon contenant le milieu sans les bactéries

⁵ inoculum à 40 °C et moins de 2,5 % du volume final

Les températures utilisées dans l'étude de la thermorésistance sont différentes selon les souches testées et les milieux utilisés. Elles ont été choisies après essais préliminaires. Elles ont un effet létal sur les bactéries et permettent une détermination des valeurs de D_T pour des temps acceptables.

Nous avons vu que la destruction décimale (D_T) correspond à la valeur négative de l'inverse de la pente de la "courbe de survie". La thermorésistance ne dépend pas du nombre de micro-organismes initiaux, nous avons utilisé le pourcentage du nombre de micro-organismes survivants pour établir les "courbes de survie" : $\log(\text{nombre d'ufc}^6 \times 100 / \text{nombre d'ufc au temps zéro})$. Ainsi, les graphiques ont l'avantage d'être plus lisibles. Généralement les "courbes de survie" sont linéaires, la résistance thermique étant définie par des valeurs de D_T et z déterminées par régression linéaire. Le D_{70} n'a pu être mesuré expérimentalement que dans de rares cas, la destruction des cellules se faisant trop rapidement et l'imprécision de la méthode devenant trop importante. Il est toutefois indispensable de s'approcher au plus près des températures utilisées en pasteurisation. Elles sont de l'ordre de 60°C pour une pasteurisation en bouteille et 70°C pour une flash pasteurisation. Quand cela n'était pas possible expérimentalement, le D_{70} a été déterminé par le calcul à partir des équations de relation température-temps.

Pour éviter les dérives des "courbes de survie" nous avons pris quelques précautions. Nous avons utilisé des milieux de préculture et d'essai rigoureusement identiques ainsi qu'un inoculum homogène prélevé au début de la phase stationnaire afin d'avoir des cellules toutes dans le même état physiologique.

3.1.2 Thermorésistance de *Megasphaera cerevisiae* DSM 20461 et DSM 20462

Les "courbes de survie" de *Megasphaera cerevisiae* à différentes températures, dans différents milieux sont présentées respectivement pour les deux souches, DSM 20461 et DSM 20462 sur les figures 63 et 64 pour le milieu MRS, figures 67 et 68 pour le moût et figures 71 et 72 pour la bière.

⁶ unité formant colonie

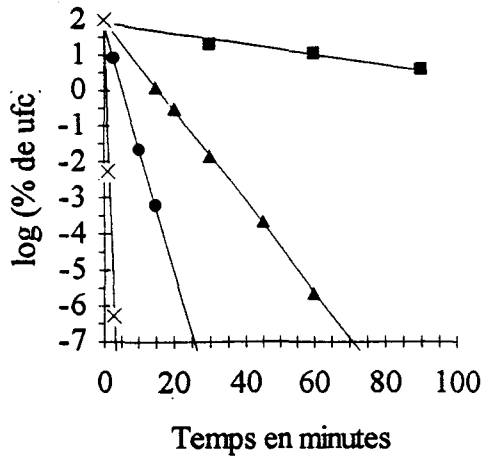


Figure 63 : Courbes de survie de *Megasphaera cerevisiae* DSM 20461 dans MRS à 45°C (■), 50°C (▲), 55°C (●) et 60°C (x).

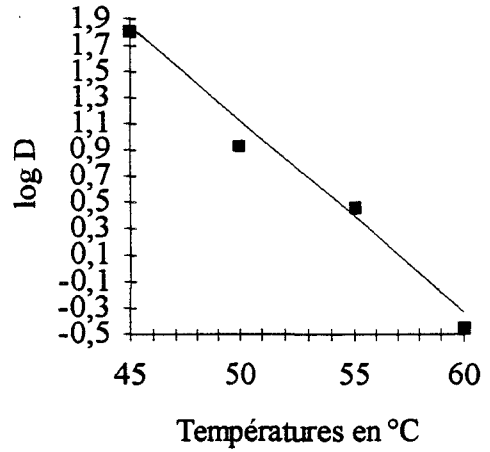


Figure 65 : Courbes de relation température-temps de *Megasphaera cerevisiae* DSM 20461 dans MRS

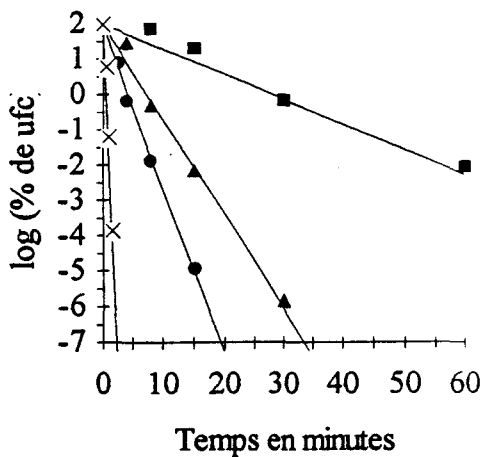


Figure 64 : Courbes de survie de *Megasphaera cerevisiae* DSM 20462 dans MRS à 50°C (■), 55°C (▲), 60°C (●) et 70°C (x).

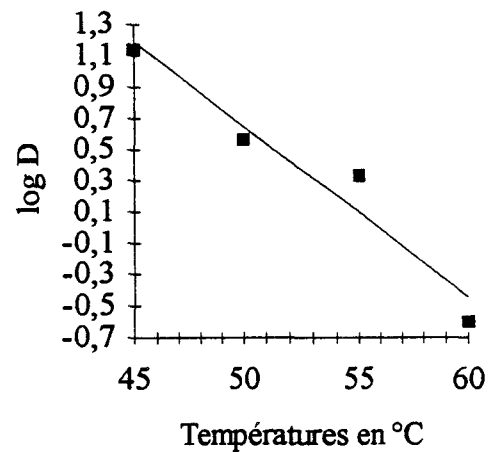


Figure 66 : Courbes de relation température-temps de *Megasphaera cerevisiae* DSM 20462 dans MRS



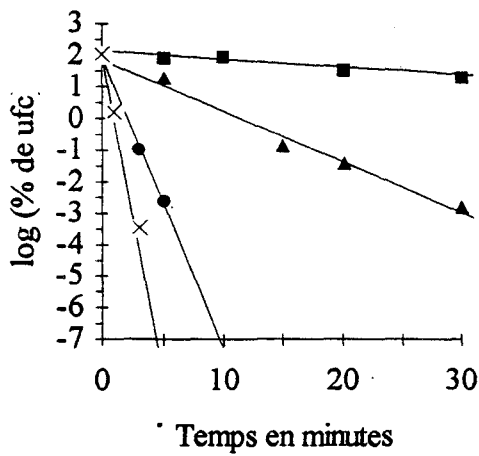


Figure 67 : Courbes de survie de *Megasphaera cerevisiae* DSM 20461 dans le moût à 45°C (■), 50°C (▲), 55°C (●) et 60°C (×).

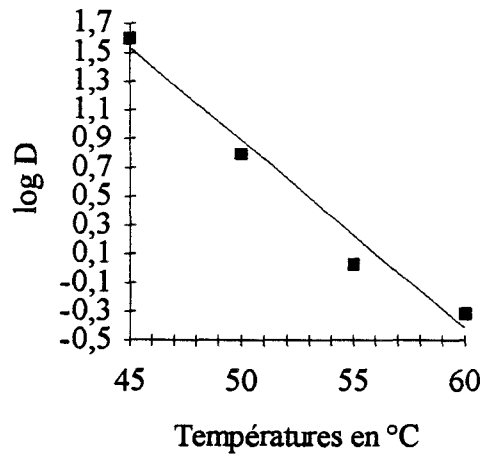


Figure 69 : Courbes de relation température-temps de *Megasphaera cerevisiae* DSM 20461 dans le moût.

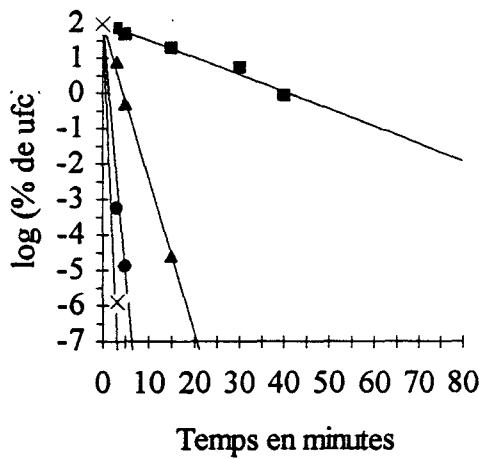


Figure 68 : Courbes de survie de *Megasphaera cerevisiae* DSM 20462 dans le moût à 45°C (■), 50°C (▲), 55°C (●) et 60°C (×).

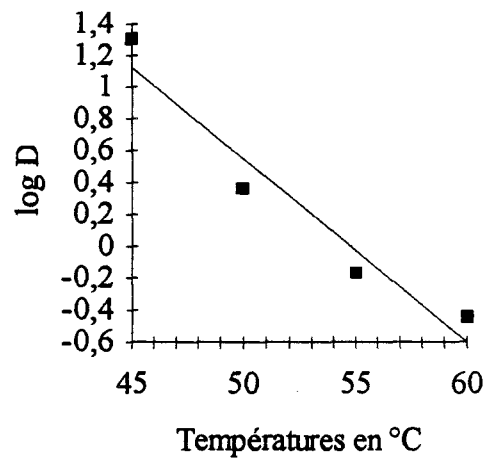


Figure 70 : Courbes de relation température-temps de *Megasphaera cerevisiae* DSM 20462 dans le moût.

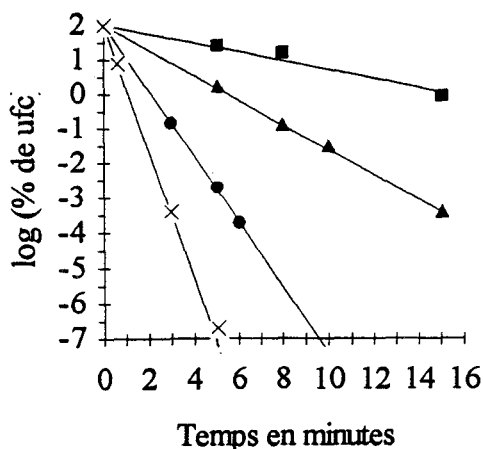


Figure 71 : Courbes de survie de *Megasphaera cerevisiae* DSM 20461 dans la bière à 48°C (■), 52°C (▲), 56°C (●) et 60°C (x).

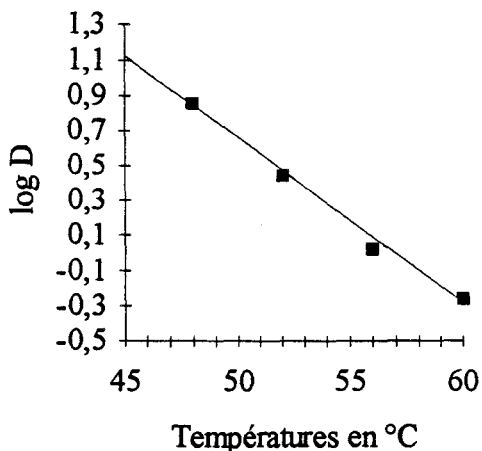


Figure 73 : Courbes de relation température-temps de *Megasphaera cerevisiae* DSM 20461 dans la bière.

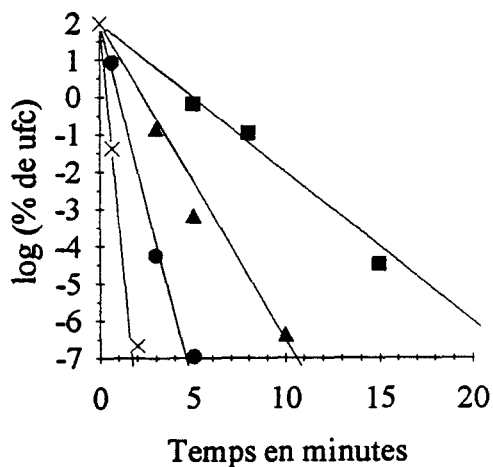


Figure 72 : Courbes de survie de *Megasphaera cerevisiae* DSM 20462 dans la bière à 48°C (■), 52°C (▲), 56°C (●) et 60°C (x).

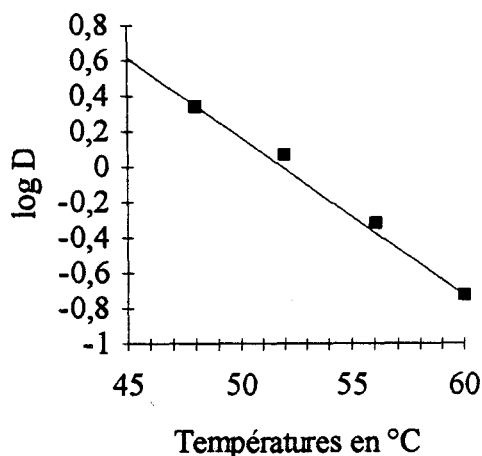


Figure 74 : Courbes de relation température-temps de *Megasphaera cerevisiae* DSM 20462 dans la bière.

Les "courbes de survie" de *Megasphaera cerevisiae* DSM 20461 et DSM 20462 sont linéaires, ce qui est en accord avec la première loi de la thermorésistance. Elle permettent donc de déterminer aisément les valeurs de réduction décimale par régression linéaire correspondantes à la valeur négative de l'inverse de la pente. Les valeurs de D_T et les données statistiques correspondantes sont rassemblées dans les tableaux 13 et 14.

<i>Megasphaera cerevisiae</i> DSM 20461							
Milieu	Temp. (°C)	D_T (min)	r^2	Ecart-type	z (°C)	r^2	Ecart-type
MRS	45	64,18	0,98	6,94	6,82	0,99	0,55
	50	8,57	0,98	0,54			
	55	2,87	0,99	0,13			
	60	0,36	0,92	0,05			
Moût	45	39,22	0,99	2,61	7,62	0,96	1,05
	50	6,13	0,99	0,47			
	55	1,07	0,99	0,05			
	60	0,55	0,98	0,04			
Bière	48	7,11	0,97	0,78	10,65	0,97	1,23
	52	2,78	0,99	0,038			
	56	1,06	0,99	0,020			
	60	0,55	0,99	0,065			
	70	*0,060	/	/			

Tableau 13 : Valeurs des D_T et des z avec coefficient de corrélation et écart-type dans MRS, le moût et la bière pour la souche *Megasphaera cerevisiae* DSM 20461.

* valeur théorique calculée à l'aide de la formule $\log(D_T) = -T/z + cte$

<i>Megasphaera cerevisiae</i> DSM 20462							
Milieu	Temp. (°C)	D_T (min)	r^2	Ecart-type	z (°C)	r^2	Ecart-type
MRS	45	13,76	0,98	0,97	9,16	0,97	1,35
	50	3,68	0,99	0,19			
	55	2,15	0,97	0,28			
	60	0,25	0,97	0,029			
Moût	45	19,96	0,98	1,58	8,69	0,99	0,51
	50	2,28	0,99	0,038			
	55	0,69	0,97	0,12			
	60	0,36	0,97	0,08			
Bière	48	2,2	0,99	0,15	11,17	0,97	1,52
	52	1,17	0,98	0,11			
	56	0,48	0,99	0,039			
	60	0,19	0,97	0,021			
	70	*0,023	/	/			

Tableau 14 : Valeurs des D_T et des z avec coefficient de corrélation et écart-type dans MRS, le moût et la bière pour la souche *Megasphaera cerevisiae* DSM 20462.

* valeur théorique calculée à l'aide de la formule $\log(D_T) = -T/z + cte$

Les valeurs des coefficients de corrélation sont toutes supérieures ou égales à 0,97 sauf une (0,92). Les valeurs des D_T décroissent de façon exponentielle (linéaire en échelle logarithmique) quand la température augmente conformément à la deuxième loi de la

thermorésistance (☞ page 38). L'ensemble des valeurs de D_{60} montre une certaine homogénéité.

Pour *Megasphaera* DSM 20461, la thermorésistance dans le milieu MRS est plus élevée que dans le moût est surtout que dans la bière. Les valeurs de z sont sensiblement identiques dans le milieu MRS et le moût, mais celles-ci sont plus élevées dans la bière (1,4 fois plus que dans le moût).

Pour *Megasphaera* DSM 20462 les différences entre les valeurs de D_{60} sont plus marquées que pour *Megasphaera* DSM 20461. La thermorésistance à 60°C de *Megasphaera* DSM 20462 est la plus élevée dans le moût avec une valeur de 0,36 minute, ce qui est 1,4 fois plus que dans le milieu MRS et 1,9 fois plus que dans la bière où la thermorésistance est donc la plus faible avec une valeur de 0,19 minute. Pour l'ensemble des températures, la thermorésistance est identique dans le milieu MRS et le moût mais plus forte dans la bière malgré un z plus élevé. Comme pour *Megasphaera* DSM 20461, la valeur de z est la plus élevée dans la bière, celle-ci étant alors 1,3 fois plus élevée que dans le moût et seulement 1,2 fois que dans le moût. Les z dans le milieu MRS et dans le moût ne sont pas significativement différents. Pour les deux souches, le z est plus élevé dans la bière. Il faudra donc être plus vigilant dans le cas d'une flash pasteurisation qui se fait à 70°C pour des temps beaucoup plus courts.

Il est curieux que la thermorésistance soit aussi homogène dans les trois milieux, malgré des différences physico-chimiques importantes. De nombreux auteurs ont étudié l'influence de ces facteurs sur la thermorésistance des micro-organismes. Il en ressort que généralement, les pH acides (Stumbo, 1973; Hansen et Rieman, 1963; O'Connor-cox *et al.* 1991), la présence de houblon (Adams *et al.* 1989) et d'éthanol (Splittsoesser 1975; Molzahn 1983; Kilgour et Smith 1985; Adams *et al.* 1989) abaissent la résistance. Dans les milieux étudiés, le pH étant de 6 dans MRS et de 4,2 dans la bière, la présence d'extrait de houblon dans le moût et la bière ainsi que l'éthanol dans la bière devraient entraîner une forte baisse de la thermorésistance. La souche DSM 20461 ne semble donc pas être sensible à ces facteurs physico-chimiques tout au moins à 60°C.

Pour s'en assurer nous avons étudié la thermorésistance de cette souche à différents pH dans le moût, à 50°C. Cette température a été choisie pour éviter une destruction trop rapide des micro-organismes rendant délicate l'expérimentation. Les "courbes de survie" sont représentées sur la figure 75 et les valeurs des D_{50} sont rassemblées sur la figure 77 et dans le tableau 15.

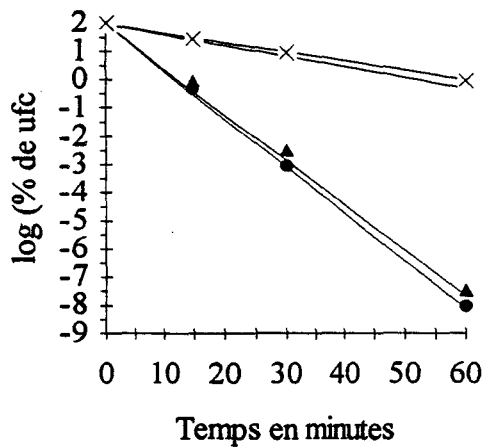


Figure 75 : Courbes de survie de *Megasphaera cerevisiae* DSM 20461 à 50°C dans le moût à pH 4 (■), 5,2 (▲), 6 (●) et 6,3 (×).

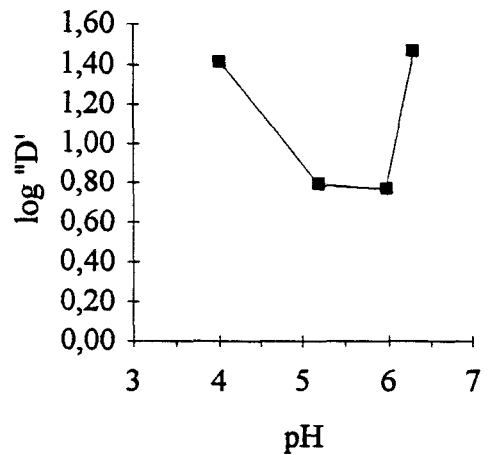


Figure 77 : Courbes de relation pH-temps de *Megasphaera cerevisiae* DSM 20461 dans le moût.

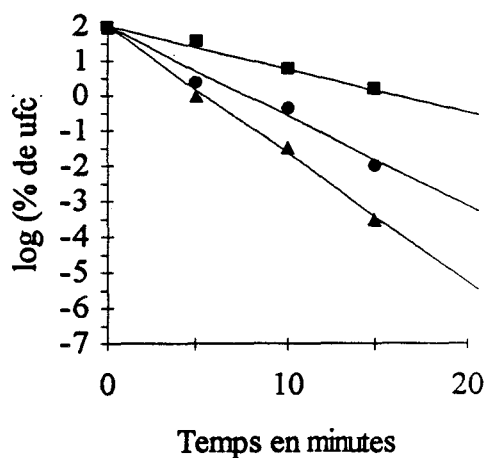


Figure 76 : Courbes de survie de *Megasphaera cerevisiae* DSM 20461 à 50°C dans MRS (■), avec addition de houblon (▲), ou d'éthanol 3,3 % v/v (●).

<i>Megasphaera cerevisiae</i> DSM 20461							
Milieu	pH	D_{50} (min)	r^2	Ecart-type	z (°C)	r^2	Ecart-type
Moût	4	25,89	0,99	0,50	/	/	/
	5,2	6,20	0,94	2,01			
	6,0	5,93	0,95	1,05			
	6,3	30,11	0,99	0,27			
Milieu	Aditif	D_{50} (min)	r^2	Ecart-type	z (°C)	r^2	Ecart-type
MRS	/	8,13	0,99	0,0079	/	/	/
	Houblon	2,76	0,98	0,025			
	Ethanol 3,5% v/v	3,92	0,98	0,024			

Tableau 15 : Valeurs des D_{50} avec coefficient de corrélation et écart-type dans le moût à différents pH et dans MRS en présence de Houblon ou d'éthanol pour la souche *Megasphaera cerevisiae* DSM 20461.

La thermorésistance de *Megasphaera* DSM 20461 est plus faible à pH 5,2 et surtout à pH 6 qui correspond au pH optimal de croissance de cette bactérie. A la fois pour des pH supérieurs ou inférieurs, la thermorésistance augmente fortement. Elle est 4,1 fois plus forte à pH 4 qu'à pH 5,2 et qu'à pH 6. La thermorésistance augmente quand le pH diminue. Les pH 4, 5,2 et 6 étant respectivement , celui de la bière, du moût et du milieu MRS, *Megasphaera* devrait avoir des thermorésistances différentes dans ces trois milieux. Hors à 60°C, nous remarquons que les différences entre les valeurs de D_{60} sont relativement faibles. A 50°C la différence est un peu plus marquée mais dans le sens inverse, c'est à dire que la thermorésistance diminue quand le pH diminue. Comme cela a été signalé dans les généralités, le pH n'est pas la seule différence entre deux milieux pouvant affecter la thermorésistance.

La figure 76 montre qu'en présence de houblon ou d'éthanol la thermorésistance décroît fortement. La quantité d'éthanol et de houblon introduite dans le milieu MRS correspond aux concentrations que l'on retrouve dans la bière. La résistance à la chaleur est 2,9 fois plus faible en présence de houblon et 2 fois plus faible avec l'éthanol. En 1989, Adams ses collaborateurs avaient constaté un effet identique du houblon sur *Lactobacillus*, une autre souche de bactérie contaminante des bières. Ils avaient alors proposé d'augmenter la quantité de houblon dans la bière pour compenser d'un point de vue thermorésistance l'absence d'éthanol dans la bière sans alcool. Cette remarque semble applicable à *Megasphaera* et pourrait être généralisée. Pour *Megasphaera* cela peut expliquer des valeurs de D_{60} identiques dans les trois milieux. Dans la bière, l'augmentation de la thermorésistance due à un pH proche de 4 pourrait compenser l'effet de d'éthanol. La même remarque peut être faite avec le moût vis-à-vis du milieu MRS en ce qui concerne le houblon.

Notre travail n'a pas porté sur la thermorésistance dans la bière sans alcool, mais on peut supposer qu'elle y serait plus élevée. Celle-ci pourrait être assimilable à celle dans le moût à pH 4. Dans ces conditions, la valeur de D_T pourrait être multipliée par 4 (valable pour 50°C).

3.1.3 Thermorésistance de *Pectinatus cerevisiophilus* DSM 20466, *Pectinatus* sp. DSM 20465 et *Pectinatus frisingensis* ATCC 33332

Comme pour *Megasphaera cerevisiae*, les "courbes de survie" des trois souches de *Pectinatus*, à différentes températures, dans MRS à pH 6 et dans le moût à pH 5,2 montrent que la destruction des micro-organismes suit la loi générale de destruction des cellules végétatives (figures 78 à 89). Il n'en est pas de même dans la bière où les courbes de survies ne sont pas linéaires (figures 90 et 91).

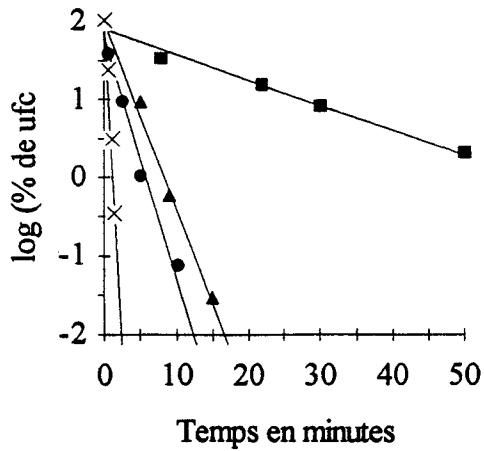


Figure 78 : Courbes de survie de *Pectinatus cerevisiophilus* DSM 20466 dans MRS à 50°C (■), 56°C (▲), 60°C (●) et 65°C (x).

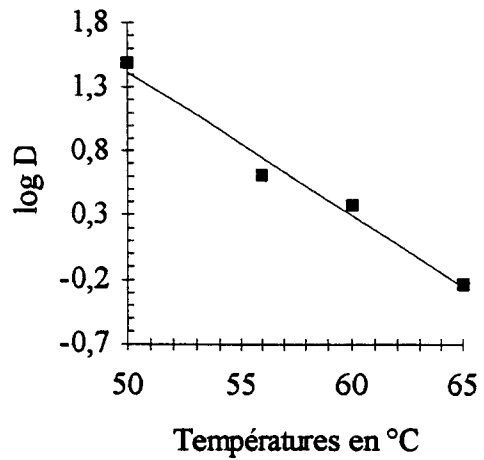


Figure 80 : Courbes de relation température-temps de *Pectinatus cerevisiophilus* DSM 20466 dans MRS.

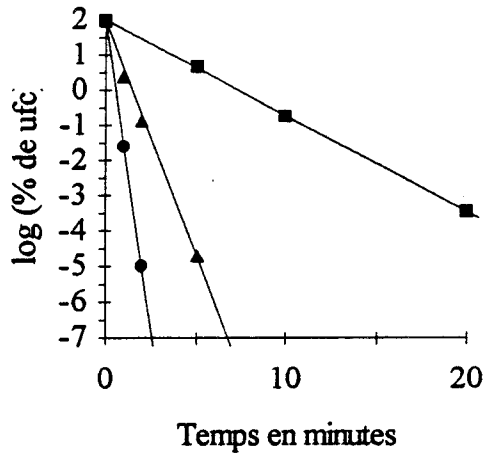


Figure 79 : Courbes de survie de *Pectinatus sp* DSM 20465 dans MRS à 51°C (■), 57°C (▲) et 60°C (●).

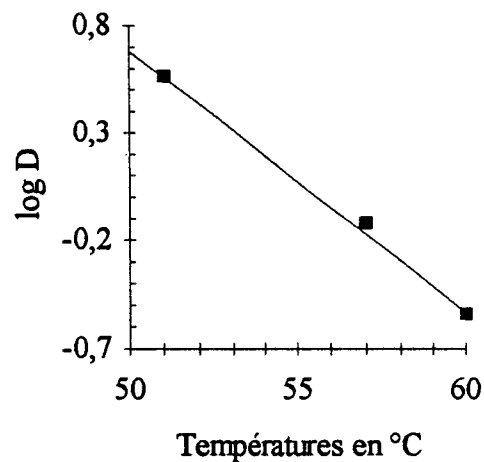


Figure 81 : Courbes de relation température-temps de *Pectinatus sp* DSM 20465 dans MRS.



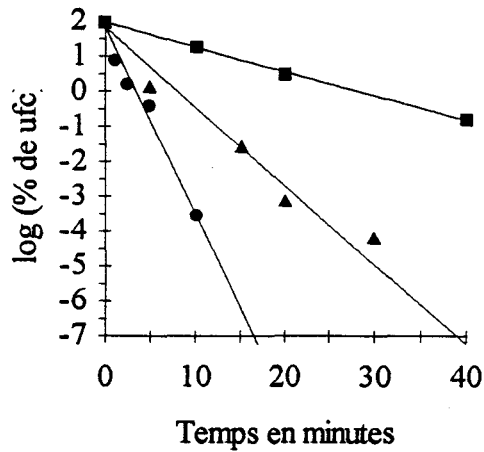


Figure 82 : Courbes de survie de *Pectinatus frisingensis* ATCC 33332 dans MRS à 50°C (■), 55°C (▲), 60°C (●) et 65°C (x).

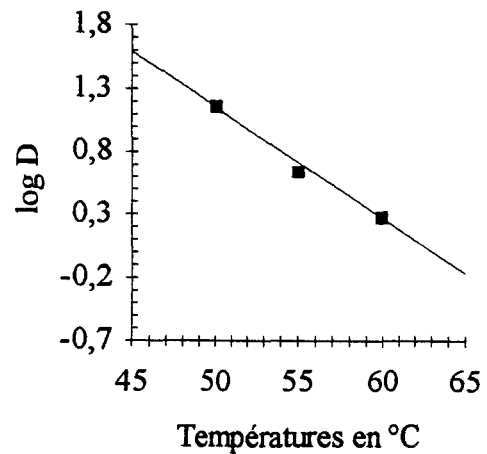


Figure 84 : Courbes de relation température-temps de *Pectinatus frisingensis* ATCC 33332 dans MRS.

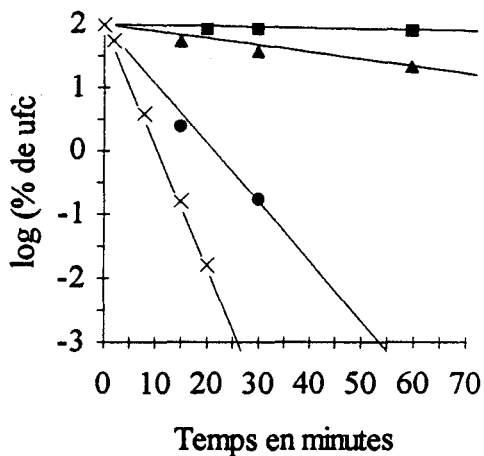


Figure 83 : Courbes de survie de *Pectinatus cerevisiophilus* DSM 20466 dans le moût à 46°C (■), 50°C (▲), 52°C (●) et 54°C (x).

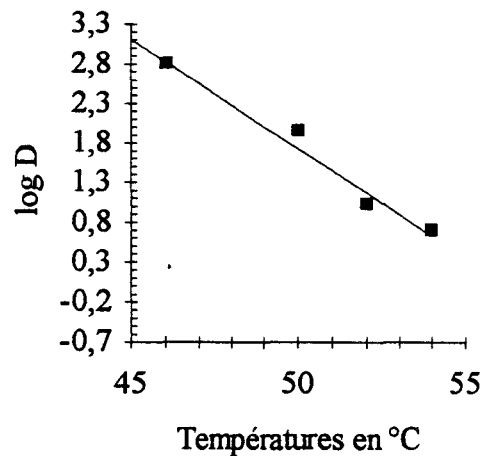


Figure 85 : Courbes de relation température-temps de *Pectinatus cerevisiophilus* DSM 20466 dans le moût.

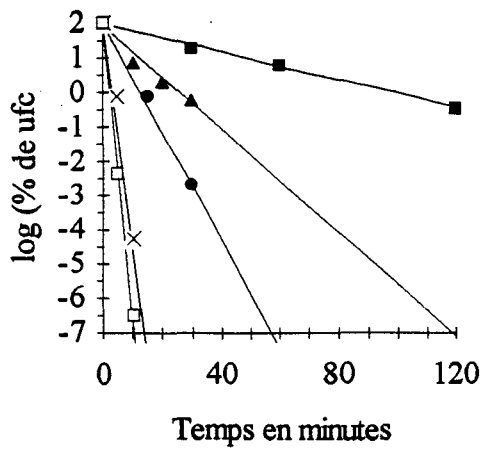


Figure 86 : Courbes de survie de *Pectinatus* sp DSM 20465 dans le moût à 48°C (■), 50°C (▲), 53°C (●) 55°C (×) et 60°C (□).

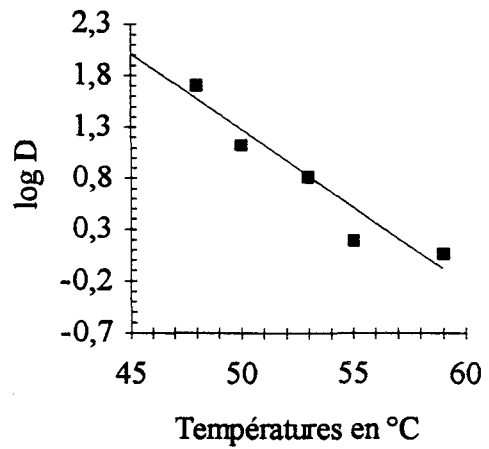


Figure 88 : Courbes de relation température-temps de *Pectinatus* sp DSM 20465 dans le moût.

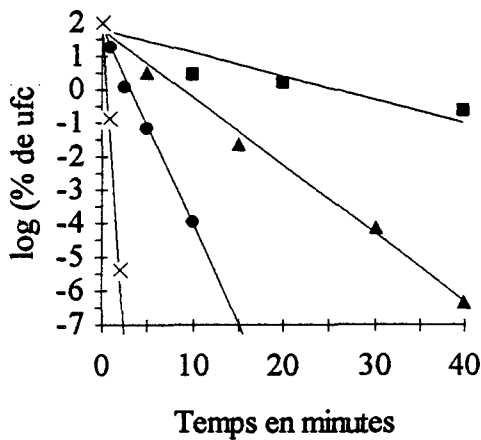


Figure 87 : Courbes de survie de *Pectinatus* frisingensis ATCC 33332 dans le moût à 50°C (■), 56°C (▲), 60°C (●) et 65°C (×).

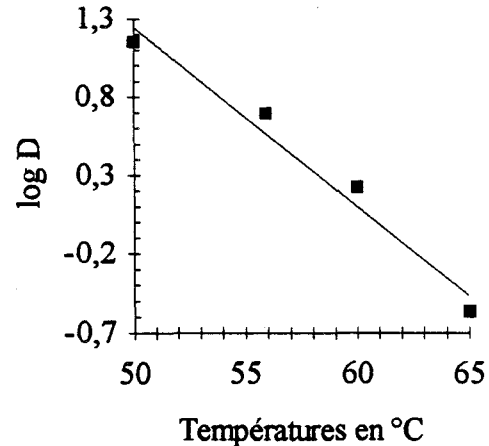


Figure 89 : Courbes de relation température-temps de *Pectinatus* frisingensis ATCC 33332 dans le moût.

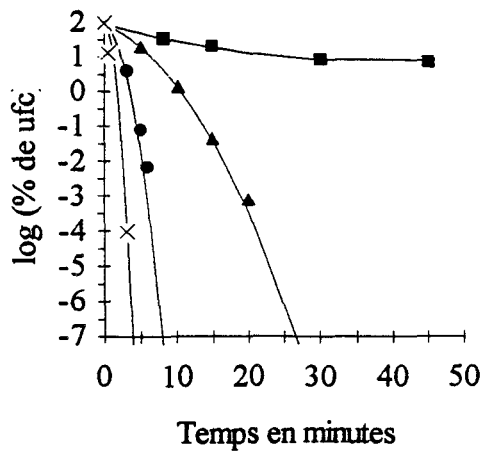


Figure 90 : Courbes de survie de *Pectinatus cerevisiophilus* DSM 20466 dans la bière à 48°C (■), 52°C (▲), 56°C (●) et 60°C (×).

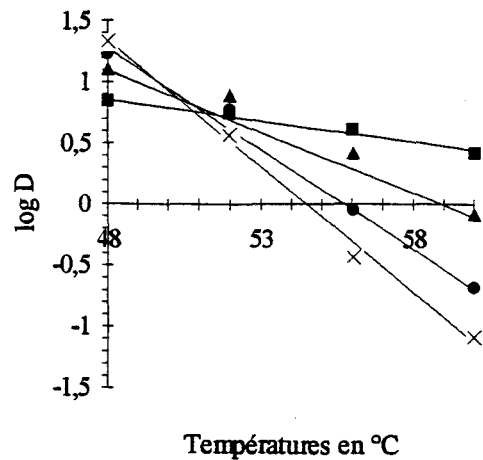


Figure 92 : Courbes de relation température-temps de *Pectinatus cerevisiophilus* DSM 20466 dans la bière pour des temps de traitement de 30 s (■), 2 min (▲), 8 min (●) et 15 min (×).

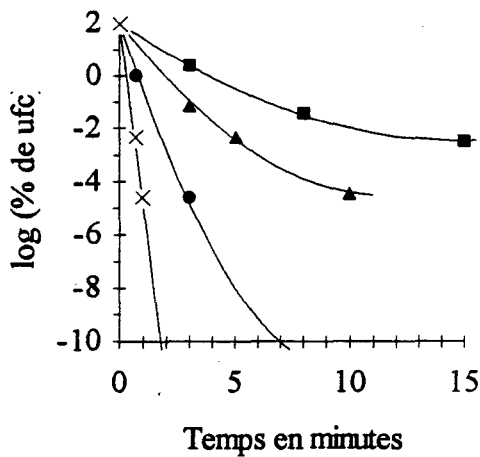


Figure 91 : Courbes de survie de *Pectinatus* sp. DSM 20465 dans la bière à 48°C (■), 52°C (▲), 56°C (●) et 60°C (×).

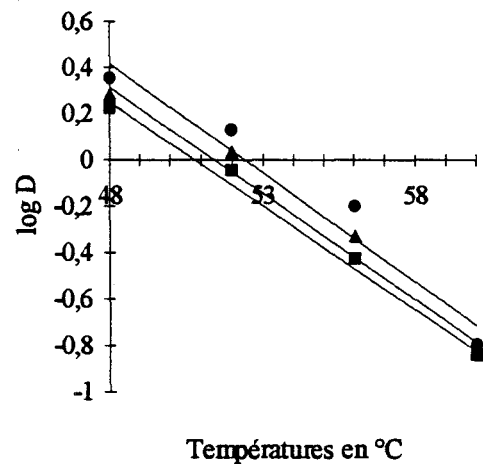


Figure 93 : Courbes de relation température-temps de *Pectinatus* sp. DSM 20465 dans la bière pour des temps de traitement de 30 s (■), 4 min (▲) et 8 min (●).

Nous nous intéresserons dans un premier temps exclusivement aux thermorésistances des trois souches dans le milieu MRS et dans le moût. La thermorésistance dans la bière sera traitée à part dans les paragraphes qui suivent. les valeurs de D_{60} sont rassemblées dans les tableaux 16, 17 et 18. Pour l'ensemble des valeurs de D_T , les coefficients de corrélation sont supérieurs à 0,95 sauf deux (0,84 et 0,91).

<i>Pectinatus cerevisiiphilus</i> DSM 20466							
Milieu	Temp. (°C)	D_T (min)	r^2	Ecart-type	z (°C)	r^2	Ecart-type
MRS	50	30,8	0,96	3,36	8,84	0,96	1,25
	55	4,14	0,99	0,20			
	60	3,22	0,98	0,27			
	65	0,59	0,99	0,04			
Moût	46	666	0,99	18,6	3,53	0,97	0,42
	50	91,04	0,96	13,6			
	52	10,7	0,99	0,99			
	54	5,16	0,99	0,08			
	60	*0,12					
Milieu	Temp. (°C)	D_T (min)	r^2	pour t compris entre			
Bière	48	$1/(-0,0008t+0,06)$	0,99	0 et 20 min			
	52	$1/(0,009t+0,09)$	0,99	0 et 20 min			
	56	$1/(0,13t+0,09)$	0,98	0 et 8 min			
	60	$1/(0,6t-0,01)$	0,95	0 et 8 min			
Valeurs des D_{60} dans la bière pour différents temps de traitement							
Milieu	Temp. (°C)	D_T (min)		z (°C)	r^2	Ecart-type	
30 s	48	16,77		17,57	0,97	2,13	
	52	10,58					
	56	6,45					
	60	3,45					
	70	*1,26					
4 min.	48	17,60		7,52	0,96	1,01	
	52	7,93					
	56	1,64					
	60	0,42					
8 min.	48	18,66		6,09	0,95	0,61	
	52	6,17					
	56	0,88					
	60	0,21					

Tableau 16 : Valeurs des D_T et des z avec coefficient de corrélation et écart-type dans MRS, le moût et la bière pour la souche *Pectinatus cerevisiiphilus* DSM 20466.

* valeurs théoriques calculées à l'aide de la formule $\log(D_T) = -T/z + cte$

<i>Pectinatus cerevisiiphilus</i> DSM 20465							
Milieu	Temp. (°C)	D_T (min)	r^2	Ecart-type	z (°C)	r^2	Ecart-type
MRS	51	3,67	0,99	0,022	8,18	0,99	0,41
	57	0,75	0,99	0,024			
	60	0,28	0,99	0,004			
Moût	48	49,30	0,99	1,97	6,13	0,91	1,1
	50	13,23	0,96	1,90			
	53	6,34	0,95	0,41			
	55	1,54	0,97	0,28			
	60	1,17	0,99	0,017			
Milieu	Temp. (°C)	D_T (min)	r^2	Pour t compris entre			
Bière	48	1/(-0,02t-0,6)	0,98	0 et 15 min			
	52	1/(-0,048t-1,126)	0,97	0 et 11 min			
	56	1/((-0,14t-2,7)	0,95	0 et 8 min			
	60	1/(-0,1t-7)	0,95	0 et 30 min			
Valeurs des D_{60} dans la bière pour différents temps de traitement							
Milieu	Temp. (°C)	D_T (min)	r^2	Ecart-type	z (°C)	r^2	Ecart-type
30 s	48	1,69			11,14	0,95	1,81
	52	0,91					
	56	0,38					
	60	0,14					
	70	*0,018					
4 min.	48	1,92			10,89	0,96	1,75
	52	1,07					
	56	0,47					
	60	0,15					
8 min.	48	2,27			10,58	0,96	1,53
	52	1,35					
	56	0,63					
	60	0,16					

Tableau 17 : Valeurs des D_T et des z avec coefficient de corrélation et écart-type dans MRS, le moût et la bière pour la souche *Pectinatus cerevisiiphilus* DSM 20465.

* valeur théorique calculée à l'aide de la formule $\log(D_T) = -T/z + cte$

<i>Pectinatus frisingensis</i> ATCC 33332							
Milieu	Temp. (°C)	D_T (min)	r^2	Ecart-type	z (°C)	r^2	Ecart-type
MRS	50	14,12	0,99	0,47	11,37	0,99	0,57
	55	4,70	0,97	0,49			
	60	1,87	0,97	0,18			
Moût	50	14,29	0,84	4,34	8,49	0,97	1,07
	56	4,94	0,99	0,23			
	60	1,69	0,99	0,07			
	65	0,27	0,98	0,03			

Tableau 18 : Valeurs des D_T et des z avec coefficient de corrélation et écart-type dans MRS, le moût et la bière pour la souche *Pectinatus frisingensis* ATCC 33332.

Excepté pour la souche ATCC 33332, les valeurs de D_{60} des souches DSM 20465 et DSM 20466 varient fortement dans les deux milieux. La plus résistante des trois souches dans le milieu MRS est *Pectinatus* DSM 20466, avec une valeur de D_{60} de 3,22 minutes dans le milieu MRS. Cette valeur est très élevée, caractérisant un micro-organisme hautement thermorésistant, ce qui fait de *Pectinatus cerevisiiphilus*, dans ces conditions, le micro-organisme contaminant des bières le plus thermorésistant. Cependant, cela doit être nuancé puisque sa thermorésistance diminue fortement dans le moût. Elle y est 27 fois plus faible. Inversement *Pectinatus* DSM 20465 est le micro-organisme le moins thermorésistant avec un D_{60} 11 fois plus faible que celui de *Pectinatus* DSM 20466 dans le milieu MRS.

On observe le phénomène inverse dans le moût où avec un D_{60} de 1,2, *Pectinatus* DSM 20465 est 10 fois plus élevé que celui de *Pectinatus* DSM 20466 dans le moût. Avec une valeur de D_{60} de 1,69 minutes, *Pectinatus* ATCC 33332 est la plus résistante des trois souches. A 50°C et à pH 5,2 dans le moût, la thermorésistance augmente mais la souche DSM 20465 devient la moins résistante. Cela s'explique par le fait que cette souche possède la valeur de z la plus élevée.

Dans les mêmes conditions, la thermorésistance à 50°C de la souche DSM 20466 est 758 fois plus élevée qu'à 60°C. Au contraire, et quelque soit la température, dans MRS à pH 6, la souche DSM 20466 est toujours la plus résistante. Contrairement à *P. sp* et surtout à *P. cerevisiiphilus* les valeurs de D_{60} pour *P. frisingensis* sont sensiblement les mêmes quelque soit le milieu utilisé. Les différences ne sont pas significatives entre D_{60} dans le milieu MRS et dans le moût puisque les deux intervalles d'incertitude se superposent. Cependant cela ne se vérifie pas pour des températures supérieures ou inférieures. Les courbes de relation température-temps montrent que la différence s'accroît à l'avantage du D_T dans le milieu moût quand la température diminue. *P. frisingensis* est donc plus thermorésistant dans le milieu MRS que dans le moût pour une gamme de températures supérieures à 60°C.

Les figures 94, 95 et 98 représentent les "courbes de survie" de *Pectinatus sp.*, *P. cerevisiiphilus* et *P. frisingensis* à différents pH à 50°C dans le moût. Les valeurs de D_{50} sont très variables (Tableaux 19, 20 et 21).

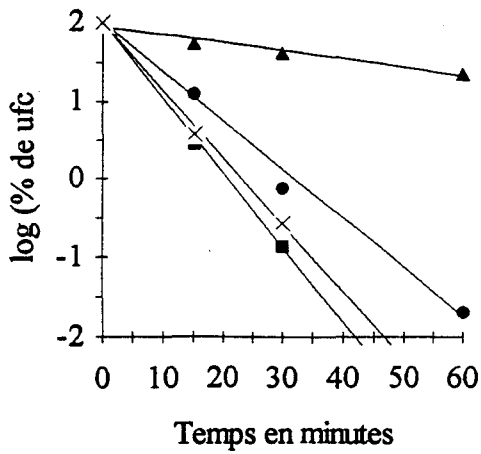


Figure 94 : Courbes de survie de *Pectinatus cerevisiiphilus* DSM 20466 dans le moût à 50°C et à pH : 4 (■), 5,2 (▲), 6 (●) et 6,3 (×).

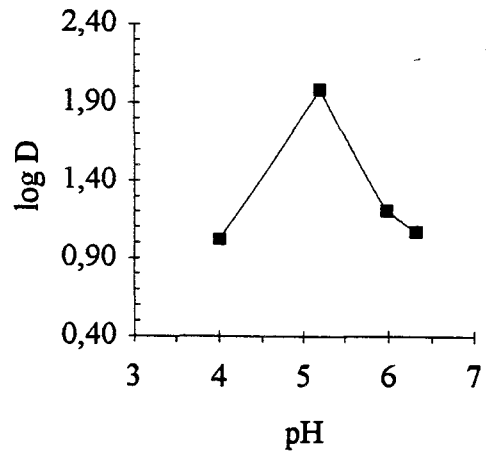


Figure 96 : Relation pH-temps de *Pectinatus cerevisiiphilus* DSM 20466 dans le moût à 50°C.

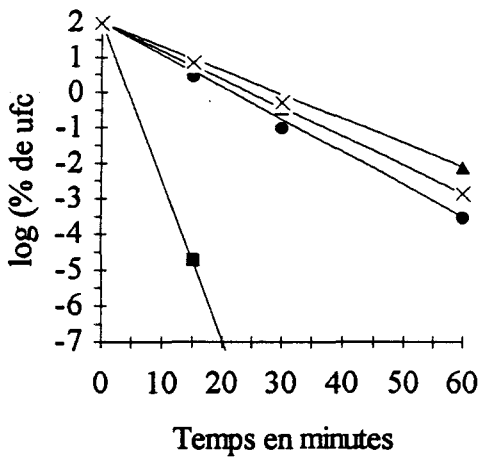


Figure 95 : Courbes de survie de *Pectinatus* sp DSM 20465 dans le moût à 50°C et à pH : 4 (■), 5,2 (▲), 6 (●) et 6,3 (×).

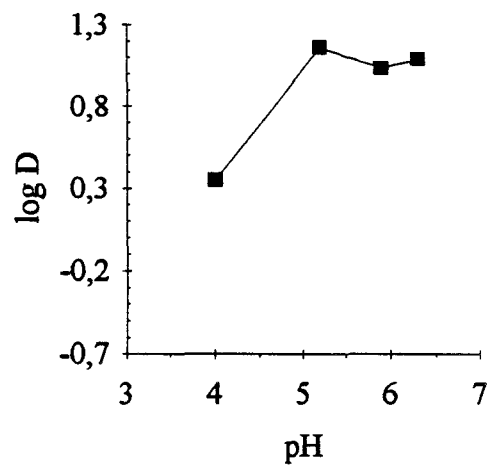


Figure 97 : Relation pH-temps de *Pectinatus* sp DSM 20465 dans le moût à 50°C.

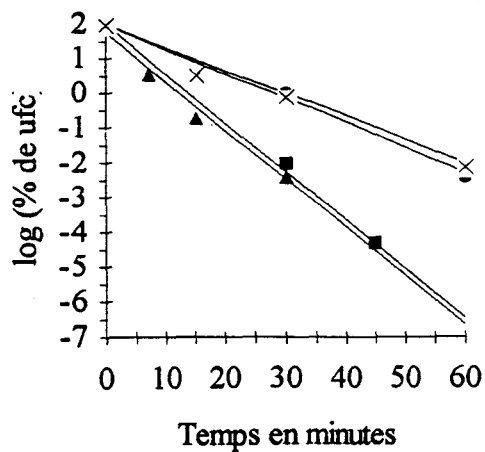


Figure 98 : Courbes de survie de *Pectinatus frisingensis* ATCC 33332 dans le moût à 50°C et à pH : 4 (■), 5,2 (▲), 6 (●) et 6,3 (×).

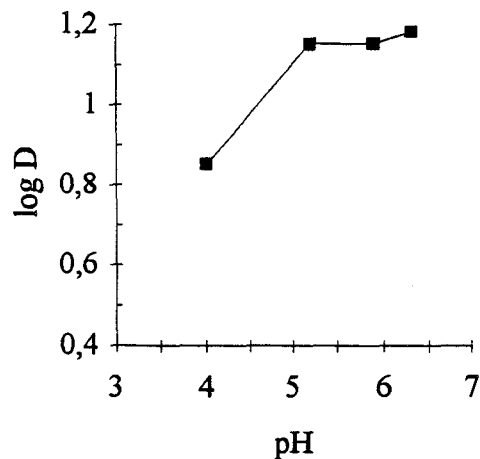


Figure 99 : Relation pH-temps de *Pectinatus frisingensis* ATCC 33332 dans le moût à 50°C.

<i>Pectinatus cerevisiiphilus</i> DSM 20466							
Milieu	pH	D_{50} (min)	r^2	Ecart-type	z (°C)	r^2	Ecart-type
Moût	4	10,45	0,99	0,45	/	/	/
	5,2	91,04	0,96	13,63			
	6,0	15,84	0,99	1,21			
	6,3	11,35	0,97	1,86			

Tableau 19 : Valeurs des D_{50} avec coefficient de corrélation et écart-type dans le moût à différents pH et dans MRS en présence de Houblon ou d'éthanol pour la souche *Pectinatus cerevisiiphilus* DSM 20466.

<i>Pectinatus cerevisiiphilus</i> DSM 20465							
Milieu	pH	D_{50} (min)	r^2	Ecart-type	z (°C)	r^2	Ecart-type
Moût	4	2,3	/	/	/	/	/
	5,2	14,48	0,99	1,05			
	6,0	10,87	0,99	0,38			
	6,3	12,33	0,99	0,25			

Tableau 20 : Valeurs des D_{50} avec coefficient de corrélation et écart-type dans le moût à différents pH et dans MRS en présence de Houblon ou d'éthanol pour la souche *Pectinatus cerevisiiphilus* DSM 20465.

<i>Pectinatus frisingensis</i> ATCC 33332							
Milieu	pH	D_{50} (min)	r^2	Ecart-type	z (°C)	r^2	Ecart-type
Moût	4	7,08	0,99	0,33	/	/	/
	5,2	14,16	0,95	2,15			
	6,0	13,98	0,99	0,92			
	6,3	14,90	0,99	1,24			

Tableau 21 : Valeurs des D_{50} avec coefficient de corrélation et écart-type dans le moût à différents pH et dans MRS en présence de Houblon ou d'éthanol pour la souche *Pectinatus frisingensis* ATCC 33332.

Pour les trois souches, la résistance est plus élevée à pH 5,2. Ce pH correspond au pH du moût. Cette caractéristique est plus marquée pour *Pectinatus* DSM 20466. Les deux autres souches possèdent une résistance proportionnellement plus forte pour des pH plus élevés que 5,2. Dans tous les cas, la thermorésistance est plus faible à pH 4 qu'aux pH supérieurs.

Pour les trois souches, les valeurs de z sont plus élevées dans MRS que dans le moût. La différence est moins marquée pour les souches ATCC 33332 et DSM 20465 que pour la souche DSM 20466 pour qui la valeur de z est 2,5 fois plus élevée dans le milieu MRS que dans le moût.

Schimd (1957) a classé en trois groupes les facteurs affectant la résistance thermique : résistance inhérente, conditions environnantes pendant la croissance et pendant le traitement thermique. La différence entre la résistance thermique dans le milieu MRS et celle obtenue dans le moût peut être expliquée par la composition différente des deux milieux. L'activité de l'eau plus basse dans le moût⁷ ainsi que les concentrations différentes en sels (Stumbo 1973), en cations et en ions phosphate (Sugiyama 1951; Amaha et Ordal 1957) et en sucres (Gibson 1973) devraient favoriser la résistance à la chaleur dans le moût.

La différence entre le pH des deux milieux est importante. La résistance thermique des micro-organismes est plus faible dans un milieu acide que dans un milieu à pH neutre (Hansen et Rieman 1963 ; Stumbo 1973). Le pH du moût (pH 5,2) étant inférieur à celui du MRS, (pH 6), devrait augmenter la sensibilité thermique. Cependant, dans le moût à pH 6, la résistance de *Pectinatus* n'est pas supérieure. En fait *Pectinatus* se développe en milieu acide au delà de pH 3,5 (Watier *et al.* 1993). Cette tolérance aux conditions acides peuvent expliquer une résistance meilleure dans le moût que dans le milieu MRS.

En outre, la présence humulones qui ont une activité antibactérienne (Simpson 1993), peut affecter la croissance dans le moût. Lorsqu'on ajoute des extraits de houblon à de la bière sans alcool, la résistance thermique de *Lactobacillus* diminue fortement (Adams 1989). *Pectinatus* peut être inhibé par un mécanisme similaire.

Les résultats de l'étude de la résistance thermique de *Pectinatus* sont très différents selon l'environnement physico-chimique, mais également selon les souches qui sont étudiées. On ne peut pas en déduire une règle générale concernant la résistance thermique de *Pectinatus* en raison de l'hétérogénéité importante du genre *Pectinatus*.

Dans le milieu bière, les "courbes de survie" de *Pectinatus* DSM 20465 et *Pectinatus* DSM 20466 ne sont pas linéaires. Elles présentent des formes biphasiques, sigmoïdes, concaves ou avec épaulement, ce qui est en désaccord avec la loi de la thermorésistance. Cela ne constitue pas une exception pour les micro-organismes impliqués dans la fabrication et la contamination des bières puisque, de nombreux cas de déviation de "courbes de survie" ont été signalés (Dallyn et Falloon 1976; Tsang et Ingledew 1982; Barillère *et al.* 1985). Les causes ont été passées en revue dans les généralités de cet ouvrage. Nous n'étudierons dans les paragraphes qui suivent que celles qui ont le plus de probabilité d'intervenir dans le cas de *Pectinatus*.

⁷ Le milieu MRS et le moût sont respectivement composés de 55 g et 100 g de matières sèches

Pour *Pectinatus* DSM 20466, les "courbes de survie" présentent un épaulement en début de "courbe de survie" (sauf à 48° C). Partant du principe que la mort d'une cellule est due à l'inactivation de molécules vitales, dans le cas où pour un organisme une molécule vitale peut palier à la destruction d'une autre, la mort n'intervient qu'après inactivation des deux molécules. Quand pour la majorité des cellules l'une des 2 molécules est détruite, la courbe devient exponentielle (Tsang et Ingledew 1982). Un raisonnement identique peut être fait dans le cas de cellules regroupées par deux, en chaînette ou en amas (Hansen et Reimann 1963). Lors du dénombrement, chaque groupe de cellules (amas par exemple) sera identifié à une unité formant colonie, soit à une cellule. La destruction de l'amas étant effective après destruction de la dernière cellule. Dans ce cas aussi, la destruction des micro-organismes est minimale au début du traitement et s'accélère pour devenir exponentielle quand il ne reste plus qu'une cellule vivante pour la grande majorité des amas. Cette explication de la déviation des "courbes de survie" semble être applicable à *Pectinatus* DSM 20466. En effet, nous avons remarqué que lors de croissances dans un environnement défavorable, (pH, éthanol) cette bactérie avait la faculté de s'agglutiner. Dans la bière, ce phénomène a souvent été observé. Malheureusement, une éventuelle agglutination de *Pectinatus* dans les précultures n'a pas pu être confirmée par observation⁸. Pour la souche *Pectinatus* DSM 20465, les "courbes de survie" ne présentent pas d'épaulement. Inversement au cas de *Pectinatus* 20466, les courbes sont curvilignes, la destruction est plus rapide en début de traitement pour ralentir par la suite. Des cas similaires ont été observés par (Tsang et Ingledew 1982). D'après ces auteurs, le phénomène pourrait s'expliquer par une induction de la formation d'amas par la chaleur. Dans ce cas la thermorésistance augmente dans le temps, lorsqu'un plus grand nombre de cellules s'associent.

Dans le cas de "courbes de survie" non linéaires, la détermination de D_T peut poser quelques problèmes puisqu'elle varie en fonction du temps. Il faut avant tout pour garantir la reproductibilité des valeurs de D_T trouvées, s'assurer que l'aspect non linéaire de la courbe ne soit pas dû à une quelconque hétérogénéité génétique, à l'âge ou à des mutations en cours de traitement. Pour cela il est nécessaire de vérifier que l'on obtient bien le même résultat lorsque l'on isole une colonie provenant d'une expérience précédente, d'une cellule survivante dans la deuxième partie de la courbe de survie (Tsang et Ingledew 1982; Barillère *et al.* 1985). Pour les courbes biphasiques, on peut utiliser les deux valeurs de D_T correspondantes aux deux pentes (Tsang et Ingledew 1982). Les "courbes de survie" sigmoïdes ou concaves peuvent être

⁸ pas visible à l'oeil nu et non observées au microscope

obtenues par régression polynomiale, il est alors possible de prendre en compte pour le calcul de D_T , la valeur de la tangente de la "courbe de survie" au temps zéro (Tsang et Ingledew 1982). Cette méthode peut toutefois entraîner des erreurs importantes dans l'établissement des barèmes de pasteurisation. Il nous a semblé plus juste de déterminer des valeurs de D_T pour différents temps de traitement. Nous avons choisi les temps 30 secondes (flash pasteurisation) 4 et 8 minutes (pasteurisation commerciales) (Wilcox 1966; Findlay 1971). La détermination de D_T pour un traitement de 15 minutes, qui est généralement utilisée en brasserie (Epstein et Dee Snell⁹ 1940; Del Vecchio *et al.* 1951; Scruggs et Baselt 1955; Wilcox 1966; Portono 1968; Findlay 1971) n'a malheureusement pas pu être faite pour des raisons techniques. La valeur de D_T correspond à la valeur négative de l'inverse de la pente de la droite reliant le nombre initial de micro-organismes et le nombre de micro-organismes survivants au temps choisi. Ceci est illustré par l'exemple graphique de la figure 100.

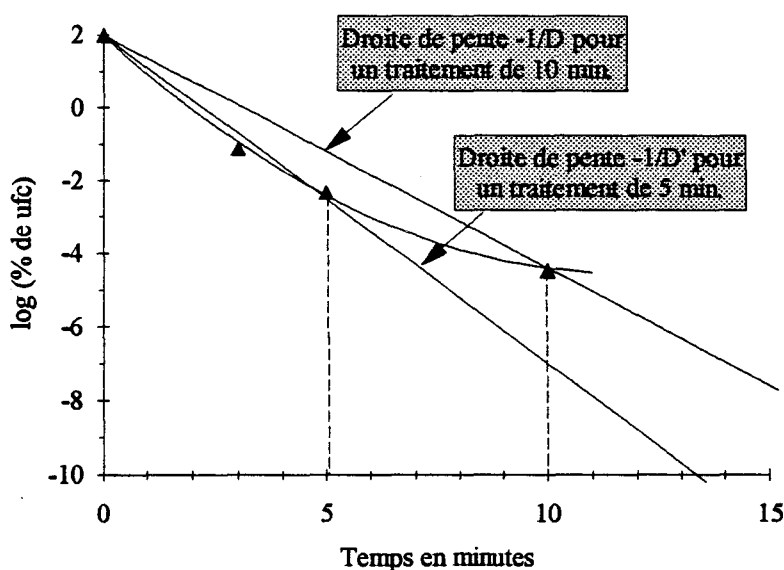


Figure 100 : Courbe de survie d'un micro-organisme. La valeur de D_T correspond à la valeur négative de l'inverse de la pente de la droite reliant le nombre initial de micro-organismes et le nombre de micro-organismes survivants au temps choisi.

Il apparaît clairement sur le graphique que pour une température donnée, les pentes peuvent être différentes pour des temps différents. Il est alors possible de tracer des courbes de relation température-temps pour les différents temps. Les valeurs de D_T et de z sont rassemblées dans

⁹ cités par Benard *et al.* (1975)

les tableaux 16 et 17 et les courbes de relation température-temps sont représentées sur les figures 92 à 93. Il existe une valeur de z différente pour chaque temps. Les temps de traitement choisis correspondent aux temps de flash pasteurisation (30 secondes) et à des temps de pasteurisation utilisés en brasserie (4 et 8 minutes : pasteurisation légère). Il n'a pas été possible de calculer pour un temps de traitement supérieur à 8 minutes puisque les "courbes de survie" obtenues par régression polynomiale ne sont représentatives que dans la fenêtre de temps utilisée dans les expérimentations.

Pour *Pectinatus* DSM 20466, les valeurs de D_T diffèrent fortement selon le temps de traitement d'une façon d'autant plus marquée que la température augmente. La valeur de D_{60} est 8,2 fois plus élevée à 30 secondes qu'à 4 minutes et 4 fois plus qu'à 8 minutes. Ces résultats expliquent donc la grande variabilité de la valeur de z . Les valeurs de z sont respectivement 2,3 et 2,9 fois plus élevées pour un traitement de 4 et 8 minutes que pour un traitement similaire d'une durée de 30 secondes. La thermorésistance ne varie plus en fonction du temps de traitement pour une température de 51°C. Dans ce cas la "courbe de survie" doit être linéaire. En d'autres termes, pour une température supérieure à 51°C, cas le plus courant en pasteurisation, plus le temps de traitement est court, plus la thermorésistance est forte. Ces résultats montrent que pour des temps de traitement courts comme dans le cas de la flash pasteurisation, la thermorésistance de *Pectinatus* peut être très élevée malgré une température de 70°C. On notera que l'inverse est observé pour des températures inférieures.

Les valeurs de D_T pour les différentes températures et les différents temps rassemblées dans le tableau 15 ont permis de déterminer une équation par régression polynomiale. L'équation est la suivante :

$$D_T = -14,3247.T + 1,8895.t + 0,1222.T^2 + 0,0781.t^2 - 0,0543.T.t + 424,6063$$

$$r^2 = 0,98$$

$$\text{test F} = 54,90$$

Avec T = Température en degrés Celsius

t = durée du traitement thermique

La représentation graphique de cette équation (Figure 101) montre que les valeurs de D_T diminuent quand la température mais aussi quand la durée de traitement augmente. Nous

remarquons que pour des températures supérieures à 57°C et des temps supérieurs à 5 minutes, les valeurs de D_T sont négatives. Cette équation ne reste donc utilisable que dans les bornes définies dans les tableaux 16 et 17.

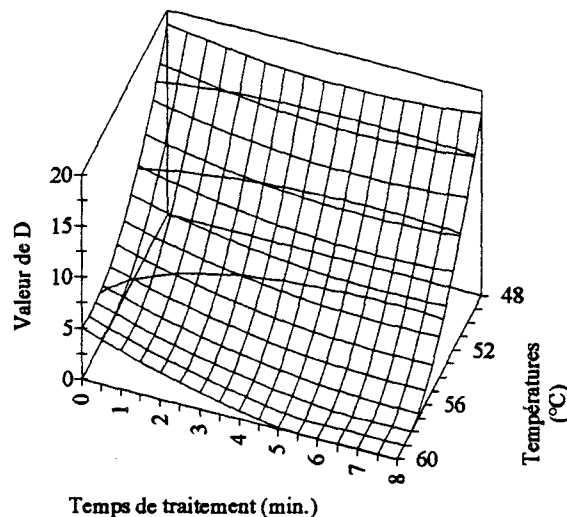


Figure 101 : Valeur de D_T en fonction de la température et de la durée du traitement thermique dans la bière pour la souche *Pectinatus cerevisiophilus* DSM 20466.

Pour *Pectinatus* DSM 20465, les courbes présentent une forme curviligne. La thermorésistance est d'autant plus grande que le temps de traitement augmente. Ces différences sont effectives pour des températures inférieures à celles utilisées en pasteurisation classique, mais sont négligeables à 60°C, ne portant pas à conséquence pour l'établissement des barèmes de pasteurisation. Cependant on peut supposer que pour un traitement plus long, la différence est plus importante. La valeur de z , quant à elle, reste sensiblement constante quel que soit le temps de traitement.

Il existe de nombreux cas de "courbes de survie" non linéaire (Tsang et Ingledew 1982; Barillère *et al.* 1985; Kilgour et Smith 1985; Adams *et al.* 1989...) ce qui nous conduit à relativiser les lois de la thermorésistance qui sont donc dépendantes de la température et du temps de traitement. Dans ces conditions l'appellation de la destruction décimale devrait être : $D_{T,t}$ (T correspond à la température et t au temps de traitement).

Il faut toutefois être conscient que les calculs pour des temps courts de l'ordre d'une demi minute ne reposent pas sur des données expérimentales. En effet dans ce cas, l'expérimentation n'apporte que des résultats difficilement exploitables. Nous n'avons pas la certitude que les équations polynomiales traduisent fidèlement le phénomène pour des temps inférieurs à 30

secondes. Malheureusement aucune solution au problème ne semble envisageable puisque quelle que soit la technique employée, on se heurte à des problèmes de transfert de chaleur qui interdisent toute montée en température instantanée.

L'ensemble des résultats montre que la thermorésistance est très variable selon l'environnement et l'état physiologique des micro-organismes, d'autant plus que certains facteurs pouvant influencer la thermorésistance ne sont pas toujours contrôlables. Il faut donc rester prudent dans l'analyse de ces résultats et dans l'utilisation des valeurs calculées de D_T ou de z pour l'établissement des barèmes de pasteurisation. En conséquence de quoi, nous n'utiliserons que les valeurs de D_T et de z déterminées dans la bière afin d'être proche des conditions de la pasteurisation en brasserie.

3.1.4 Discussion sur l'efficacité des barèmes de pasteurisation utilisés en brasserie

L'optimisation du traitement par la chaleur dans les brasseries nécessite la connaissance des caractéristiques de la résistance thermique des micro-organismes contaminants des bières. Dans les paragraphes précédents nous avons déterminé et analysé les valeurs de D_T et celles de z habituellement utilisées pour apprécier la thermorésistance des micro-organismes.

Tsang et Ingledew (1982) proposent de prendre comme référence le D_{60} de *Pediococcus acidilactici* qui est de 0,867 minutes. Nous avons vu précédemment que les souches les plus résistantes de chaque genre possédaient un D_{60} dans la bière de 0,55 minutes pour *Megasphaera* DSM 20461 et de 0,21 pour *Pectinatus*¹⁰ DSM 20466. Ces valeurs étant toutes deux inférieures à 0,867 minutes, le choix de *Pediococcus acidilactici* comme micro-organisme de référence ne semble pas devoir être remis en cause pour une pasteurisation classique. Il en va tout autrement pour une flash pasteurisation puisque pour un traitement de plus court, le D_{60} de *Pectinatus* DSM 20466 est bien supérieur (Tableau 16). Ce micro-organisme pourrait donc être pris comme référence dans le calcul des barèmes de flash pasteurisation. Toutefois si la stérilité d'une bière dépend directement du D_T du micro-organisme le plus résistant, elle est également liée au nombre de micro-organismes présents. Il est donc nécessaire d'introduire dans les calculs le nombre de micro-organismes. Pour cela, Tsang et Ingledew (1982) ont introduit le degré de stérilité qui permet d'estimer les risques de contamination. Il correspond à la proportion d'unités de conditionnement contenant encore une cellule vivante pouvant entraîner un développement bactérien. Il est déterminé par l'équation : Degré de stérilité = FI / nombre moyen d'organismes par unité de conditionnement. Afin de

¹⁰ pour un temps de traitement de 8 minutes

connaître la population contaminante pouvant être présente dans la bière, des simulations de fermentations avec contamination par *Megasphaera* ou *Pectinatus* ont été réalisées. Elles montrent que la population finale peut atteindre $1,3 \cdot 10^5$ bactéries/ml pour *Megasphaera* et $1,25 \cdot 10^6$ bactéries/ml pour *Pectinatus* en fin de fermentation pour une bière à 3,3 % v/v d'éthanol. Dans le cas d'une bière non filtrée, mise en bouteille d'un litre, le degré de stérilité pour une pasteurisation de 8 UP (cas d'une pasteurisation légère) est de $2,7 \cdot 10^7$ pour *Megasphaera* et de 0,984 pour *Pectinatus* (Tableau 22).

	<i>Megasphaera</i> DSM 20461		<i>Pectinatus</i> DSM 2046	
	FI	Degré de stérilité	FI	Degré de stérilité
Pasteurisation				
Traitement de 20 min. à 60°C conditionnement en bouteilles (1l)	$2,3 \cdot 10^{36}$	$1,7 \cdot 10^{28}$	/	/
Traitement de 8 min. à 60°C conditionnement en bouteilles (1l)	$3,5 \cdot 10^{14}$	$2,7 \cdot 10^6$	$1,23 \cdot 10^9$	0,984
Traitement minimum pour un risque de contamination inférieur à 1/1000	6,1 minutes		/	
Flash pasteurisation				
Traitement de 30 s à 70°C conditionnement en bouteilles (1l)	$2,1 \cdot 10^8$	1,65 (1 bouteille sur 2)	2,49	$1,99 \cdot 10^{-9}$ ($5 \cdot 10^8$ bact/bout.)
Traitement de 30 s à 70°C conditionnement en fût (30l)	$2,1 \cdot 10^8$	0,055 (18 bact/fût)	2,49	$6,66 \cdot 10^{-11}$ ($1,5 \cdot 10^{10}$ bact/fût)

Tableau 22 : Valeur des FI et des degrés de stérilité pour la souche la plus thermorésistante des genres *Megasphaera* et *Pectinatus*.

Les risques sont donc pour *Megasphaera* d'une bouteille contaminées sur 27 millions ce qui reste très faible. Les calculs pour des pasteurisations plus couramment utilisées (20 UP) donnent bien entendu des risques encore plus faibles pour *Megasphaera*. Pour *Pectinatus*, inversement, 100% des bouteilles seraient contaminées dans le cas d'une pasteurisation de 8 minutes, ce qui montre la gravité d'une contamination ayant lieu pendant la fermentation. Les risques pour une pasteurisation de 20 minutes ne peuvent malheureusement pas être calculés.

De nos jours, la flash pasteurisation est de plus en plus souvent utilisée, notamment pour la bière conditionnée en fût. Dans ce cas la pasteurisation se fait à une température proche de 70°C pour un temps de 30 secondes (Adams *et al.* 1989). Pour une bière flash pasteurisée, conditionnée en bouteilles d'un litre, le degré de stérilité est de 1,65 soit plus d'une bouteille contaminée sur deux pour *Megasphaera* et de $1,99 \cdot 10^{-9}$ pour *Pectinatus* correspondant à une population de $5 \cdot 10^8$ bactéries par bouteille. Pour un conditionnement en fûts de 30 litres, le

degré de stérilité est de 0,055 soit 18 bactéries par fût pour *Megasphaera* et de $6,63 \cdot 10^{-1}$ pour *Pectinatus* soit plus de $1,5 \cdot 10^{10}$ bactéries par fût.

On remarque que *Megasphaera* risque de contaminer l'ensemble de la production d'une bière lorsque celle-ci est flash pasteurisée. Il en va de même pour *Pectinatus* mais d'une façon beaucoup plus importante à la fois pour la pasteurisation et la flash pasteurisation. Toutefois, dans l'industrie, la grande majorité des bières sont filtrées avant conditionnement et pasteurisation, ce qui réduit considérablement la charge bactérienne. Dans ce cas les risques de contamination sont quasi nuls. Pour estimer la population de *Megasphaera* et de *Pectinatus* dans de telles bières nous avons simulé une filtration. Le montage utilisé se rapproche des filtres à plaque à Kieselguhr utilisés en brasserie (Narziss *et al.* 1977; Stippler 1977; Macron *et al.* 1982). A partir d'une bière contenant 10^7 levures/ml et 10^6 bactéries/ml nous avons obtenu après filtration sur Kieselguhr une bière sans contamination. Dans ces conditions, quand la filtration est de qualité, la pasteurisation comme la flash pasteurisation doivent être efficaces.

On peut donc conclure de ce travail que les barèmes supérieurs à 8 UP pour une pasteurisation, permettent d'éviter tous risques de contaminations des bières par *Megasphaera*, des barèmes inférieurs ne semblant efficaces qu'associés à une filtration de qualité. La filtration est indispensable dans le cas d'une flash pasteurisation.

Pour *Pectinatus*, la pasteurisation n'est efficace que si elle est associée à une filtration de qualité. Il est plus prudent de ne pas baisser les barèmes de pasteurisation en dessous de 20 UP.

La recrudescence des contaminations par *Megasphaera* et par *Pectinatus*, des bières conditionnées, pourrait provenir de barèmes mal adaptés aux bières sans alcool pour lesquelles la thermorésistance des micro-organismes est plus élevée. La plus grande fréquence de contamination par *Pectinatus* comparativement à *Megasphaera* peut s'expliquer par sa plus grande thermorésistance. Toutefois, les contaminations peuvent aussi avoir une origine postérieure à la pasteurisation (sauf si le contenu est pasteurisé dans le contenant).

3.2 Etude de la survie de *Pectinatus cerevisiiphilus* en milieu oxygéné

En brasserie, l'anaérobiose est assurée pendant tout le procédé de fabrication et lors du stockage afin de protéger la bière contre les effets néfastes de l'oxygène (Chelak et Ingledew 1987). Cela permet un développement éventuel de bactéries anaérobies strictes comme *Pectinatus*. Toutefois, le moût est oxygéné au début de la fermentation principale, avant l'ensemencement du levain pour favoriser l'augmentation de biomasse des levures. Cette étape pourrait donc limiter les contaminations du moût par *Pectinatus*. Ce travail a pour objet, l'étude de la résistance de *Pectinatus* à l'oxygène pour déterminer dans quelle mesure cette bactérie, susceptible d'être présente dans le levain (Haikara 1985), peut survivre à l'oxygénation du moût.

Les températures et les pH choisis pour l'expérimentation, correspondent aux conditions rencontrées en brasserie. Le pH 5,2 est celui du moût. Les températures de 8 et 15°C sont des températures usuellement rencontrées en fermentation principale. La température de 32°C correspond à la température optimale de croissance de la souche (Watier *et al.* 1993).

Les courbes de survie des souches *Pectinatus cerevisiiphilus*, *P. sp.* et *P. frisingensis* sont rassemblées sur la figure 102. Pour les trois souches, la destruction par l'oxygène en fonction du temps est une fonction exponentielle, la représentation du log (% d'ufc) en fonction du temps permet de visualiser la résistance de la bactérie à l'oxygène. La première loi de la thermorésistance semble applicable à la destruction des micro-organismes par l'oxygène dissous. Les pentes des droites rendent compte des valeurs du temps de destruction décimale¹¹ (D_{oxy}) de *Pectinatus*. La destruction décimale est calculée par régression linéaire de la droite ($t = D_{oxy} \cdot \log(N_0/N)$) de pente D_{oxy} . L'exactitude de cette valeur est estimée par le coefficient de corrélation r^2 et par l'écart type.

¹¹ le temps de destruction décimal correspond au temps nécessaire pour réduire par 10 le nombre de bactéries survivantes. Nous avons choisi de le terme (D_{oxy}) par analogie au D_T propre à la thermorésistance

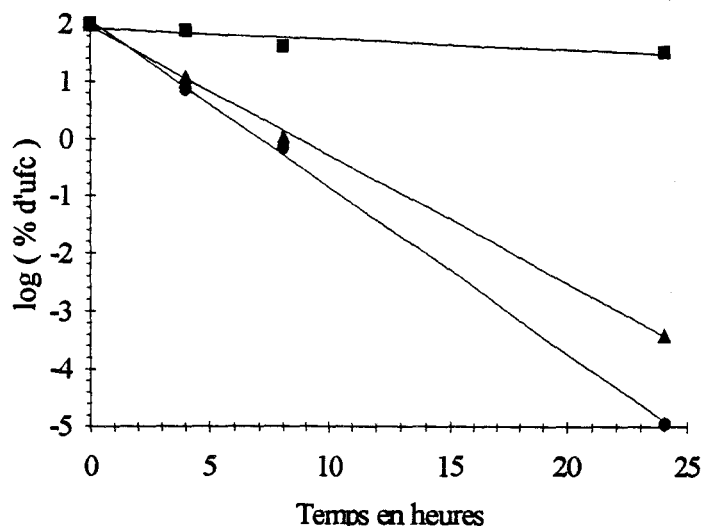


Figure 102 : Courbes de destruction de *Pectinatus cerevisiiphilus* (▲), *P. sp.* (●) et *P. frisingensis* (■) par l'oxygène à 32°C et un taux d'oxygène dissous de 4,78 mg/l.

Les valeurs des D_{oxy} pour les trois souches sont rassemblées dans le tableau 23. On peut remarquer que la souche *P. frisingensis* a une résistance 16 et 12 fois plus élevée que celle de *P. sp.* et de *P. cerevisiiphilus*. Une population de $1,6 \cdot 10^7$ bactéries/ml n'est pas totalement détruite après 24 heures d'exposition à 4,78 mg/l d'oxygène dissous. Pour les autres expérimentations, nous avons utilisé la souche *P. cerevisiiphilus*.

Souche	D_{oxy} (min.)	Ecart-type	r^2
DSM 20466	0198	15	0,99
DSM 20465	206	4	0,99
0ATCC 33332	3310	1000	0,99

Tableau 23 : Valeurs des temps de destruction décimale (D_{oxy}) des souches *Pectinatus cerevisiiphilus* DSM 20466, *P. sp.* DSM 20465 et *P. frisingensis* ATCC 33332 (4,78 mg/l d'oxygène dissous, 32°C, pH 5,2).

Les valeurs des temps de destruction décimale de *Pectinatus*, calculées en fonction de l'oxygène dissous, montrent que cette bactérie survit d'autant moins longtemps que la quantité d'oxygène dissous est importante (Figure 103).

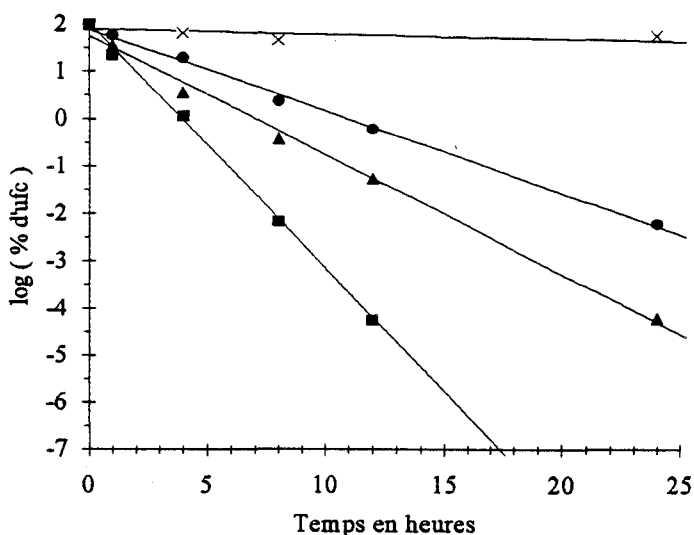


Figure 103 : Courbes de destruction de *Pectinatus cerevisiophilus* DSM 20466 par l'oxygène à 32°C en fonction du temps pour différents taux d'oxygène dissous, 5,74 mg/l (■) 4,78 mg/l (▲) 3,34 mg/l (●) et 0,96 mg/l (x).

Les valeurs de D_{oxy} sont rassemblées dans le Tableau 24. *P. cerevisiophilus* est une bactérie anaérobie stricte, cependant elle parvient à résister plusieurs heures à l'oxygène dissous dans le moût. Si à 5,74 mg/l d'oxygène dissous, 115 minutes suffisent pour réduire d'un facteur 10 le nombre de bactéries, il faut 2,8 fois plus de temps à 3,34 mg/l pour obtenir la même destruction.

La figure 104 représente les différentes valeurs des taux de croissance en fonction de la concentration en oxygène dissous. La concentration minimale requise pour qu'il y ait développement est d'environ 1 mg/l. Soberka *et al.* (1989) ont obtenu une croissance de *P. sp.* pour des concentrations allant de 1 à 1,9 mg/l suivant le nombre de cellulesensemencées.

Oxygène (mg/l)	D_{oxy} (min.)	Ecart-type	r^2
5,74	115	4	0,99
4,78	198	15	0,99
3,34	319	24	0,99
0,96	survie des cellules		

Tableau 24 : Valeurs des temps de destruction décimale (D_{oxy}) de *Pectinatus cerevisiophilus* DSM 20466 pour différents taux d'oxygène dissous (32°C, pH 5,2).

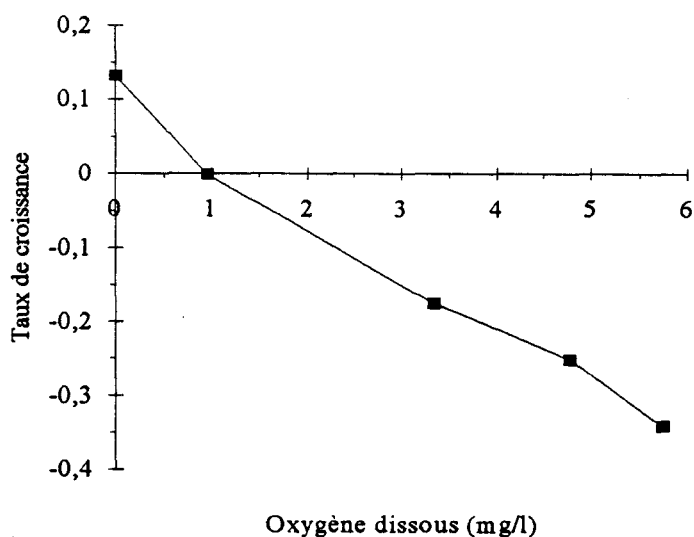


Figure 104 : Relation entre le taux de croissance de *P. cerevisiiphilus* DSM 20466 et la concentration en oxygène dissous

La résistance à l'oxygène de *P. cerevisiiphilus* a également été étudiée en fonction de la température (32°C, 15°C et 8°C) à pH 5,2 dans un moût saturé en oxygène par bullage d'air (Figure 105).

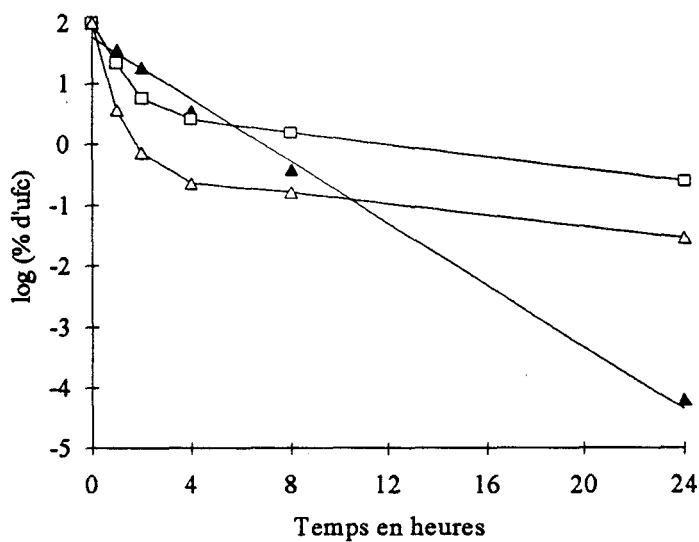


Figure 105 : Courbes de destruction de *Pectinatus cerevisiiphilus* DSM 20466 par l'oxygène (saturation par bullage d'air) en fonction du temps pour différentes températures, 32°C (▲), 15°C (□) et 8°C (△).

La destruction de *Pectinatus* à 15 et 8°C est beaucoup plus importante dans les premières heures de la cinétique que par la suite. Par contre, à 32°C la courbe de survie est toujours exponentielle. Les précultures ayant été réalisées à 32°C, on peut penser que le métabolisme cellulaire reste encore actif durant quelques heures avant de s'adapter aux nouvelles conditions de température. Dans ce cas, la toxicité provient de la formation d'H₂O₂ qui n'est pas réduit par la catalase absente chez *Pectinatus* (Haikara *et al.* 1981b). Pour le calcul de D_{oxy} , nous avons pris en considération que la partie linéaire des courbes. Les résultats sont rassemblés dans le tableau 25. On remarque que la résistance à l'oxygène est fortement influencée par la température, celle-ci étant 6,7 fois plus faible à 32°C qu'à 15 et 8°C. Quand la température d'un moût saturé en air diminue, la teneur en oxygène dissous augmente ce qui devrait réduire la résistance de *Pectinatus*. Or nous observons un comportement contraire : le temps de réduction décimale est multiplié par 6,7 quand la température passe de 32°C à 8°C. Cette évolution peut s'expliquer par le ralentissement du métabolisme quand la température baisse.

Température	Oxygène (mg/l)	D_{oxy} (min.)	Ecart-type	r^2
32°C	4,78	0198	15	0,99
15°C	8,35	1200	22	0,99
08°C	9,82	1323	54	0,99

Tableau 25 : Valeurs des destructions décimales (D_{oxy}) de *P. cerevisiophilus* DSM 20466 dans le moût saturé en oxygène (air) à différentes températures.

Pectinatus croît rapidement à 32°C alors qu'à 8°C on n'observe qu'une très faible croissance.

Lors de la fabrication de la bière, avant la fermentation alcoolique, le moût est oxygéné à froid pour fournir l'oxygène nécessaire à la multiplication des levures. Les levures se développant, consomment l'oxygène, le moût devient anaérobie après 14 heures de fermentation.

Nous pouvons voir d'après nos résultats que l'oxygénation du moût ne peut pas éliminer totalement une contamination même faible par *Pectinatus*. A 8°C après 14 heures en milieu aérobie seule la moitié des bactéries contaminantes a disparu.

La contamination par cette bactérie, relativement résistante à l'oxygène, se retrouvant rapidement en condition anaérobie au cours de la fermentation, peut s'amplifier après chaque réutilisation des pieds de cuve. Le caractère anaérobie strict de ce micro-organisme n'empêche donc pas son développement lors de la fermentation en brasserie.

3.3 Résistance aux pH acides

L'une des conséquences de la fermentation du moût par des levures est la baisse du pH. Cette évolution du pH est en fait recherchée par le brasseur pour limiter les risques de contamination. Le développement d'un contaminant dans la bière est donc très étroitement lié à sa tolérance aux bas pH. Il est donc important de savoir comment ces micro-organismes se comportent dans de telles conditions et de déterminer quel est le pH minimal non bactéricide. La figure 104 montre que les pH inférieurs ou égaux à 4 ont un effet bactéricide sur *Pectinatus* DSM 20466. Plus le pH est bas, plus la mortalité est élevée. Les courbes de survie sont linéaires comme pour la thermorésistance. Cette étude montre que, comme l'avait signalé Kroning¹² *et al.* en 1897 et Madsen¹² en 1907, il est possible de généraliser les lois de la thermorésistance à l'ensemble des agents létaux.

Les valeurs de D pour les différents pH sont rassemblés dans le tableau 25. Elles nous ont permis de tracer la droite, $\log D = -pH/z + cte$ (Figure 106) et de déterminer la valeur de z qui est de 0,085 unités pH. Le pH limite entre l'effet bactéricide et bactériostatique est de 4. Ce pH correspond au pH minimum de croissance calculé pour *Pectinatus* DSM 20466 dans le moût à l'aide de l'équation polynomiale numéro 13.

¹² cités par Schmid (1957)

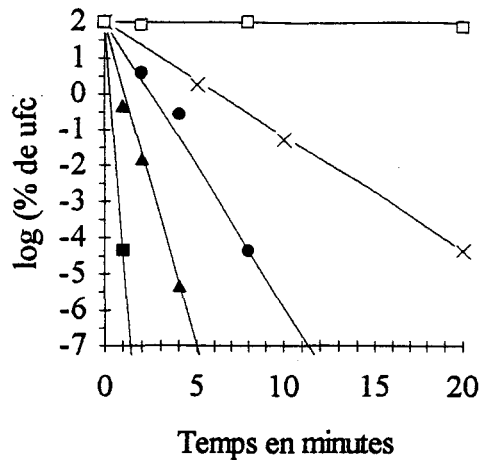


Figure 106 : Courbes de survie de *Pectinatus cerevisiophilus* DSM 20466 dans le moût à pH : 2 (■), 2,5 (▲), 3 (●), 3,5 (×) et 4 (□).

pH	2	2,5	3	3,5
D (min.)	0,15	0,56	1,25	3,16

Tableau 26 : Valeurs de D de *Pectinatus cerevisiophilus* DSM 20466 dans le moût pour différents pH (25°C).

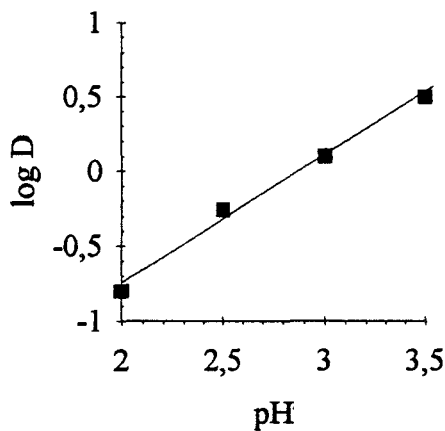


Figure 107 : Relation entre le pH et le temps de réduction décimal, de *Pectinatus cerevisiophilus* DSM 20466 dans le moût (25°C).

Ces résultats montrent que *Pectinatus* peut survivre et même se développer à des pH inférieurs à celui de la bière. L'acidification du moût lors de la fermentation par la levure ne peut garantir l'absence d'un développement de *Pectinatus*.

4. Etude de l'évolution des populations de *Pectinatus* et de *Megasphaera* lors de la fabrication de la bière en micro-brasserie

La contamination du moût par *Pectinatus* ou par *Megasphaera* peut avoir lieu à différents stades de la production. Le manque de données pratiques et statistiques dans ce domaine, rend difficile la détermination de l'origine des contaminations. Les résultats obtenus et présentés dans les chapitres précédents peuvent nous apporter de précieux renseignements. Les travaux réalisés sur la thermorésistance de ces deux bactéries dans le moût montrent qu'une contamination en amont de l'ébullition du moût est impossible, celui-ci étant porté à ébullition pendant plusieurs heures. Il paraît beaucoup plus probable que la contamination se produise à l'ensemencement des levures. En effet, il est difficile de cultiver une souche de levures parfaitement pure à l'échelle industrielle surtout après plusieurs recyclages. De surcroît, la détection des contaminants présents en très petit nombre est longue et difficile. Des techniques plus rapides et plus sensibles ont été mises au point (Kigour et Day 1983; Miller et Galston 1989; Parker 1989) mais celles-ci restent complexes et coûteuses. A cela s'ajoute le fait que les industries sont rarement équipées pour la détection de contaminants anaérobies strictes. L'isolement d'une souche de *Pectinatus* sp. et d'une souche de *Megasphaera cerevisiae* par Haikara (1985) dans le levain, conforte cette hypothèse. Il est donc possible que ces deux contaminants puissent se développer dans le moût lors de la fermentation. Nous avons étudié comment pouvait évoluer les populations de ces bactéries au cours de l'ensemble du procédé de fabrication de la bière et quelles en étaient les conséquences notamment d'un point de vue organoleptique dans le cas d'une contamination à l'ensemencement.

4.1.1 Evolution de la population lors d'une contamination expérimentale

Pour mieux appréhender les risques et les conséquences d'une contamination par *Pectinatus* ou *Megasphaera*, nous avons réalisé des contaminations expérimentales dans des conditions proches de celles rencontrées en industrie. L'installation utilisée peut être assimilable à une microbrasserie (De Clerck et De Clerck 1966; Harrison *et al.* 1987). Cependant nous y avons apporté quelques améliorations. L'ensemble des processus d'ensemencement, fermentation, traversage et mise en fût y sont effectués en circuit fermé et en anaérobie (☞ page 68).

La stérilité parfaite du moût et de l'ensemble du montage avant fermentation est assurée par une stérilisation de 30 minutes à 105°C. Ces précautions ainsi que l'utilisation d'une souche pure de levure permettent d'éviter les contaminations lors de la fermentation et lors du traversage par d'autres micro-organismes que ceux étudiés. Le chauffage du moût peut provoquer un développement de goûts de caramel, mais il nous a semblé que les considérations d'ordre microbiologique prévalaient. En effet la moindre contamination par un micro-organisme étranger, pas toujours détectable d'ailleurs, peut perturber les résultats biochimiques et organoleptiques. Afin d'éviter les mauvais goûts engendrés par l'oxydation (peroxydes) et la photodégradation de la bière (Kuroiwa et Hashimoto 1961, Gunst et Verzele 1978, Kattein *et al.* 1988), nous avons réalisé l'ensemble du procédé de fabrication de la bière et du stockage à basse température à l'abri de la lumière et de l'oxygène.

Fermentation principale

La figure 108 montre l'évolution des populations microbiennes, bactéries et levures, ainsi que l'évolution du pH et de la concentration en éthanol lors d'une contamination de 300 cellules/ml de *Pectinatus cerevisiiphilus* DSM 20466.

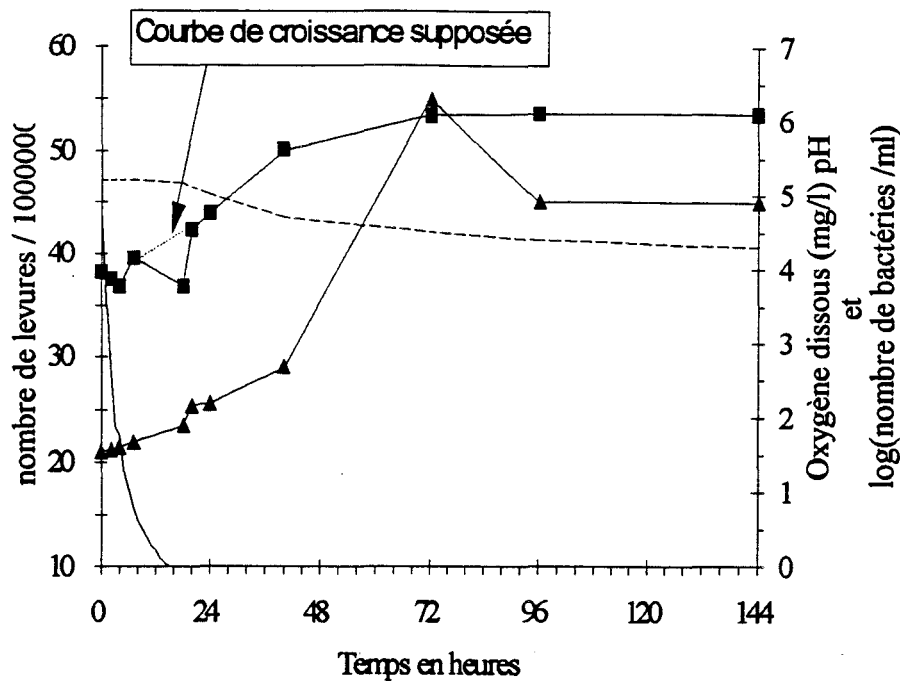


Figure 108 : Cinétique de développement de *Pectinatus cerevisiophilus* DSM 20466 (■), lors de la fermentation d'un moût par *Saccharomyces cerevisiae* (▲) en microbrasserie. pH (---), oxygène dissous (---).

Dans les premières heures de fermentation l'oxygène dissous décroît, le milieu est parfaitement anaérobie après 15 heures de fermentation. Après ensemencement du moût ($2,1 \cdot 10^6$ levures/ml), les levures se développent. La cinétique de croissance ne présente pas de phase de latence. En phase exponentielle, le taux de croissance est de $0,007 \text{ h}^{-1}$. La phase stationnaire est atteinte après 72 heures de croissance, la population finale étant de $45 \cdot 10^6$ levures/ml. Cette population est inférieure à celle généralement obtenue en brasserie industrielle qui est proche de $90 \cdot 10^6$ levures/ml soit deux fois plus élevée. Cela pourrait s'expliquer par la présence de *Pectinatus* DSM 20466. En effet des études en cultures mixte, réalisées au laboratoire ont montré qu'un développement de *Pectinatus* pouvait limiter la croissance des levures à 32 comme à 8°C . Nous ne connaissons pas dans l'état actuel des recherches les causes de cette inhibition. Après inoculation du moût par *Pectinatus*, il y a dans un premier temps, mort des cellules, la croissance reprenant pour un taux d'oxygène dissous de 1 à 2 mg/l. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus dans l'étude de la résistance à l'oxygène et à ceux de Soberka *et al.* (1989). La croissance de *Pectinatus* après environ 6 heures de fermentation est rapide, il n'est malheureusement pas possible de déterminer un taux de

croissance maximal mais celui-ci semble supérieur à celui obtenu dans le moût en culture pure. Cela peut s'expliquer par le fait que la croissance n'est pas réalisée dans les mêmes conditions : culture mixte et culture pure, moût aéré en début de fermentation et moût anaérobie, fermenteur et cuves. Il est aussi très probable que les méthodes différentes utilisées pour le dénombrement bactérien soient à l'origine de telles différences. Dans ce cas ci nous utilisons un dénombrement en gélose profonde alors que dans le paragraphe 1.2.1 (☞ page 77) nous suivions la croissance de la biomasse par mesure de l'absorbance. Cette technique, bien que beaucoup plus rapide n'a pas été utilisée ici puisqu'elle est moins sensible et qu'il était indispensable de différencier les levures des bactéries ainsi que les cellules vivantes des cellules mortes. Dans ces conditions, il serait plus correct de parler d'unités formant colonie (ufc) plutôt que de nombre de bactérie. Après 12 heures de fermentation nous observons une chute significative du nombre d'ufc. Il est peu probable que cela soit dû à la mort des cellules mais plutôt à une agglutination en amas de celles-ci. Dans ce cas chacun des amas est assimilé a une ufc. Des observations, déjà mentionnées dans ce manuscrit, faites sur des suspensions bactériennes de *Pectinatus* ont mis en évidence la présence d'amas (☞ page 87). L'environnement défavorable, une température basse, la baisse du pH, la disparition du substrat et la présence d'éthanol, pourrait favoriser la formation d'amas. La population finale de *Pectinatus* atteinte est de l'ordre de $1,2 \cdot 10^6$ ufc/ml.

Une expérimentation similaire a été réalisée avec *Megasphaera* DSM 20461. La courbe de l'évolution de la population de *Megasphaera cerevisiae* et de *Saccharomyces cerevisiae* sont reportées sur la figure 109.

Pour *Megasphaera*, un plus grand nombre de cellules ont dû être inoculées pour permettre d'en suivre l'évolution de la population. Le nombre d'ufc diminue fortement dans les premières heures de fermentation. Entre 8 et 18 heures de fermentation nous obtenons une forte chute du nombre d'ufc. Il parait fort improbable que cela soit dû exclusivement à la mort des cellules. En effet ceci voudrait dire que la mort des cellules serait plus rapide lorsque le taux d'oxygène dissous est plus faible. De plus la croissance entre 14 et 18 heures serait caractérisée par un taux de croissance d'environ $0,7 \text{ h}^{-1}$, ce qui est en fait 2 fois plus élevé que dans les meilleures conditions de croissance. Pour expliquer cette chute du nombre d'ufc, on peut émettre l'hypothèse que les bactéries, sous l'effet de l'oxygène dissous se regroupent par deux ou par trois, ce qui divise le nombre d'ufc par autant. Ce mécanisme a d'ailleurs été proposé pour d'autres bactéries dans le cas d'agents létaux comme la température (Tsang et Ingledew 1982). Dans ces conditions, le nombre d'ufc déterminé ne correspondrait plus au nombre de bactéries

réellement présentes. Nous estimons donc que la ligne en pointillés pourrait être une approximation de la véritable courbe de la croissance. La population maximale de *Megasphaera* éteinte en fin de fermentation est de $1,3 \cdot 10^6$ ufc/ml.

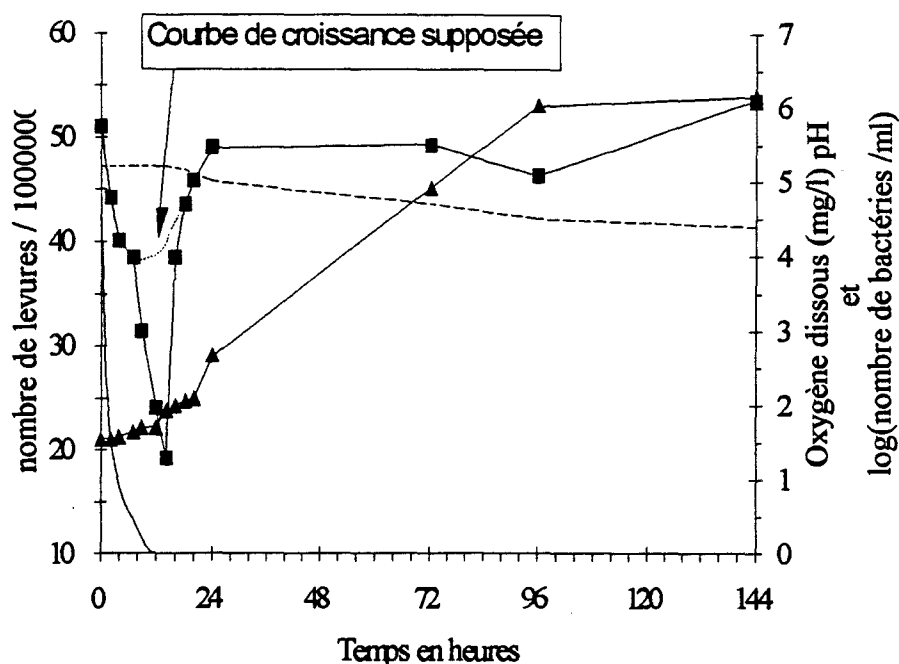


Figure 109 : Cinétique de développement de *Megasphaera cerevisiae* DSM 20461 (■), lors de la fermentation d'un moût par *Saccharomyces cerevisiae* (▲) en microbrasserie. pH (---), oxygène dissous (—).

Dans le cas de *Pectinatus* comme dans le cas de *Megasphaera*, Cette étude montre que la croissance est relativement élevée malgré des conditions défavorables de température, de pH, et de substances inhibitrices comme l'éthanol et les humulones ainsi que la présence d'oxygène dissous en début de fermentation. Ces résultats mettent en évidence les risques bactériologiques encourus par une contamination de l'une ou de l'autre de ces deux bactéries.

Sédimentation

En fin de fermentation, la sédimentation des levures et des bactéries entraîne une diminution significative du nombre de micro-organismes en suspension. Ce phénomène de sédimentation est recherché par le brasseur et permet de réduire la charge cellulaire lors de la garde. Pour augmenter cette sédimentation, la bière est refroidie en fin de fermentation.

Pour suivre l'évolution des populations microbiennes, il est crucial de connaître les proportions de sédimentation de chacun des micro-organismes et de les comparer entre eux. De nombreux auteurs se sont penchés sur le sujet et ont proposé des test de sédimentation (Burns 1937; Helm *et al.* 1953; Stewart *et al.* 1975). La floculation ou la sédimentation de la levure en brasserie reste encore un domaine mal connu sur le plan physico-chimique. Nous nous contenterons dans ce travail d'une approche du phénomène en observant la sédimentation dans les conditions expérimentales utilisées en microbrasserie. Nous définirons le coefficient de sédimentation comme étant le rapport entre le nombre de cellules sédimentées par rapport au nombre de cellules en suspension.

coefficient de sédimentation = nombre de cellules sédimentées / nombre de cellules en suspension.

Nous avons lors de fermentations en microbrasserie déterminé le nombre de micro-organismes sédimentés et en suspension. Dans le cas d'un refroidissement de la bière en fin de fermentation principale (de 8 à 4°C), nous obtenons pour *S. cerevisiae* un coefficient de 17 et de 19 pour *P. cerevisiophilus*. Ces résultats montrent que ces deux micro-organismes sédimentent à la même vitesse, on les retrouvera après traversage ,en fermentation secondaire, dans les mêmes proportions qu'en fermentation principale. La chute de la température a pour effet de favoriser la sédimentation des levures mais ne semble pas avoir d'effet sur la sédimentation de *Pectinatus*.

Fermentation secondaire

Il n'a malheureusement pas été possible de compter de façon fiable le nombre de bactéries durant la fermentation secondaire en raison de l'agglutination et de la sédimentation de cellules. A basse températures Les levures ont tendance à sédimenter et à adhérer aux parois emprisonnant par la même occasion les bactéries. Il semble toutefois que l'on puisse estimer pour *Pectinatus*, à dix la multiplication du nombre de cellules lors d'une fermentation secondaire à 2°C d'une duré de 3 semaines.

4.1.2 Aspect métabolique et organoleptique de la contamination

L'analyse sensorielle est l'ensemble des méthodes permettant de percevoir par les organes des sens un certain nombre de propriétés des boissons ou des aliments, comme : l'aspect, la

texture, l'arôme/odeur, le goût et l'arrière-goût. Elle est soumise à un système international de terminologie (Meilgaard *et al.* 1979; Analytica IV-EBC 1987; AFNOR 1988) Cette analyse est très lourde à mettre en place puisqu'elle s'effectue dans une salle de dégustation et demande la mise en place d'un panel de dégustation composé de spécialistes ou de consommateurs. Le but de cette analyse est d'estimer les conséquences d'un développement de *Pectinatus* ou *Megasphaera* d'un point de vue organoleptique et de trouver si possible la liaison entre les données analytiques sur des composés de la bière et l'évolution sensorielle.

Nous avons réalisé une analyse sensorielle sur des bières fabriquées en micro-brasserie, contaminées en début de fermentation par 300 cellules/ml de *Pectinatus* ou de *Megasphaera*, avec des populations finales respectivement de $1,2 \cdot 10^6$ ufc/ml et de $1,3 \cdot 10^6$ ufc/ml. Un panel de dégustation restreint n'a mis en évidence aucune différence décelable entre les bières contaminées par *Pectinatus* ou par *Megasphaera* et la bière témoin. Il n'a pas été jugé utile d'élargir le panel de dégustation. La croissance de ces deux bactéries dans nos conditions expérimentales n'a donc pas provoqué l'apparition de mauvais goûts décelables.

Ces résultats concordent avec ceux de l'analyse en Chromatographie Liquide Haute Pression qui de la même façon n'ont décelé aucune différence significative entre les bières contaminées et la bière témoin.

Il est curieux qu'un développement bactérien ne soit pas accompagné de la synthèse de substance de dégradation. L'explication pourrait venir du "petit nombre" de cellules présentes. Pour *Pectinatus* comme pour *Megasphaera*, la population finale est d'environ $1,2 \cdot 10^6$ cellules/ml. On peut supposer que la synthèse des métabolites est proportionnelle au nombre de bactéries présentes. Dans le cas *Pectinatus* par exemple, la synthèse d'acide propionique (métabolite majeur) pouvant être de 3,6 g/l pour une population de $4 \cdot 10^8$ bactéries/ml, ne serait plus que de 0,01 g/l pour une population de $1,2 \cdot 10^6$ cellules/ml. Cette quantité ne peut être détectée et mesurée en HPLC par réfractométrie et est inférieure au seuil de détection des papilles gustatives humaines (Moll 1991).

4.1.3 Evolution de la population contaminante : essai de modélisation

En brasserie, de nombreux modèles mathématiques ont été développés ces dernières années. Ils trouvent leurs applications dans le génie des procédés (Kiefer 1990) et dans les procédés de brassage (Marc *et al.* 1983) et de fermentation (Engasser *et al.* 1981; Tepper *et al.* 1981; Marc 1982; Marc *et al.* 1983). A notre connaissance aucun modèle concernant le développement

d'une bactérie contaminante n'a été développé de nos jours. A partir des résultats obtenus précédemment nous avons tenté de modéliser l'évolution d'une population bactérienne contaminante de *Pectinatus* DSM en fonction des conditions physico-chimiques rencontrées lors de la fermentation. Ce modèle aura davantage un rôle descriptif que prédictif, permettant de connaître l'influence des différents paramètres sur le développement de *Pectinatus*. Le modèle se décompose en 5 étapes caractérisées chacune par une équation.

Etape I : présence d'oxygène dissous supérieur à 1,9 mg/l

Cette phase correspond aux premières heures de fermentation après oxygénation du moût. La première équation rend compte de l'évolution de la population en présence d'oxygène. Elle permet de calculer à tout instant la vitesse de mortalité de la bactérie en fonction de l'oxygène dissous bien que cette vitesse dépende aussi de la température. Par simplification et par manque de données, nous n'en tiendrons pas compte.

Nous prendrons donc les valeurs correspondantes à une température de 32°C. La résistance de *Pectinatus* DSM étant plus élevée à 8°C, l'équation minimisera les risques encourus d'une contamination par *Pectinatus* DSM.

Une régression linéaire des vitesses de mortalité en fonction de l'oxygène dissous donne l'équation :

$$v = -0,0772 \cdot O_2 + 0,1001 \text{ (avec : } O_2 \text{ en mg/l)}$$

$$\text{écart-type : } 0,006 \text{ et } 0,03$$

$$r^2 = 0,92$$

Etape II : milieu "anaérobie" (oxygène dissous inférieur à y)

Nous savons qu'il peut y avoir croissance pour un taux d'oxygène dissous inférieur à 1,9 mg/l. Dans ces conditions pour connaître la vitesse de croissance (μ) de *Pectinatus* DSM nous utiliserons l'équation 13.

Cette équation est de la forme :

$$\text{Taux de croissance} = - 3,01766 e^a e^{(Ea/RK)} + 0,08392 P - 0,00082 E - 0,00902 P^2$$

$$+ 0,97488 e^a e^{(Ea/RK)} \cdot P + 0,30371 e^a e^{(Ea/RK)} \cdot E - 0,09870 e^a e^{(Ea/RK)} \cdot P \cdot E - 0,18595$$

$$\text{Degrés de liberté} = 77 \quad r^2 = 0,93 \quad \text{test } F = 139,60$$

Cette équation tient compte du pH, de la température et de la concentration en éthanol (v/v). Elle permet de déterminer à chaque instant de la fermentation le taux de croissance maximal en fonction de ces trois paramètres.

Cette seconde étape doit également tenir compte de la population maximale en fonction des paramètres physico-chimiques. Cette population maximale correspond à la phase stationnaire. L'équation correspondante est l'équation N°14 :

$$\begin{aligned} \text{Population maximale de micro-organismes} = & - 21,04043 e^a e^{(Ea/RK)} + 2,56613 P \\ & - 0,02127 E - 222,09414 e^a e^{2(Ea/RK)} - 0,26997 P^2 + 16,49015 e^a e^{(Ea/RK)}.P \\ & + 4,17185 e^a e^{(Ea/RK)}.E - 1,58736 e^a e^{(Ea/RK)}.P.E - 6,02883 \end{aligned}$$

$$\text{Degrés de liberté} = 77 \quad r^2 = 0,83 \quad \text{test } F = 43,46$$

On considérera qu'il y a croissance jusqu'à ce que la population maximale soit atteinte. Dans ces conditions le nombre de bactérie à chaque instant de la fermentation sera calculé à l'aide de l'équation qui donnera la valeur la plus basse.

Etape III : traversage

Le traversage de la bière (après sédimentation des levures et bactéries) de la cuve de fermentation principale à celle de fermentation secondaire entraîne une diminution du nombre de micro-organismes. Des essais de sédimentation ont montré que le rapport entre bactéries sédimentées et surnageantes était de 19.

L'étape III du modèle correspondra à une division par 19 du nombre de bactéries présentes en fin d'étape II.

Etape IV

Cette étape correspond à la fermentation secondaire. Le nombre de bactéries sera déterminé de la même façon que dans l'étape II.

Etape V : filtration

Des essais de filtration ont été réalisés montrant que toutes les bactéries étaient retenues.

Une filtration entraîne l'absence de bactérie dans la bière. Si cette étape n'a pas lieu (bières non filtrées : blanches et bières refermentées) on passe à l'étape VI.

Etape VI : pasteurisation

L'étude de la thermorésistance nous a permis de déterminer les valeurs de D pour *Pectinatus* DSM dans la bière en fonction de la température. La vitesse de mortalité correspond à $-1/D$. Ces valeurs varient en fonction du temps. Une régression polynomiale des différentes valeurs calculées nous donne l'équation suivante :

$$D = -14,3247.T + 1,8895.t + 0,1222.T^2 + 0,0781.t^2 - 0,0543.T.t + 424,6063$$

$$r^2 = 0,98$$

$$\text{test } F = 54,90$$

Avec T = Température en degrés Celsius

t = durée du traitement thermique

d'où l'équation :

$$v = 1 / (14,3247.T - 1,8895.t - 0,1222.T^2 - 0,0781.t^2 + 0,0543.T.t - 424,6063)$$

La vitesse de mortalité est donnée en fonction du temps de traitement (traitement à température constante) et permet de calculer la population bactérienne restant à partir de la population initiale.

Etape VII : stockage de la bière conditionnée

Cette étape est équivalente aux étapes II et IV avec toutefois un pH et une concentration en éthanol qui peuvent être différents.

Pour établir le modèle, donnant le nombre de micro-organismes présents à chaque stade de la fabrication, il est nécessaire de calculer le nombre de bactéries à partir de la vitesse. Cela peut être réalisé de la façon suivante : le temps est découpé en intervalles de temps petits. On considère que pour un intervalle de temps ($t_2 - t_1$) la vitesse reste constante et maximale. Cela peut introduire une erreur mais qui sera d'autant plus faible que l'intervalle de temps est petit.

Connaissant le nombre de bactéries au début de l'intervalle de temps (N_1) et la vitesse de croissance ou de mortalité, ainsi que le pH, la température et la concentration en éthanol correspondant à l'intervalle de temps, on peut déterminer le nombre de bactéries N_2 à la fin de l'intervalle. On procède alors pas à pas, d'intervalle en intervalle. La figure 110 en donne une explication schématique. Ces calculs fastidieux peuvent être réalisés sur tableur. Nous avons mis au point un fichier calculant à partir des conditions physico-chimiques rencontrées, l'évolution des populations pour chaque étape et traçant le graphique correspondant.

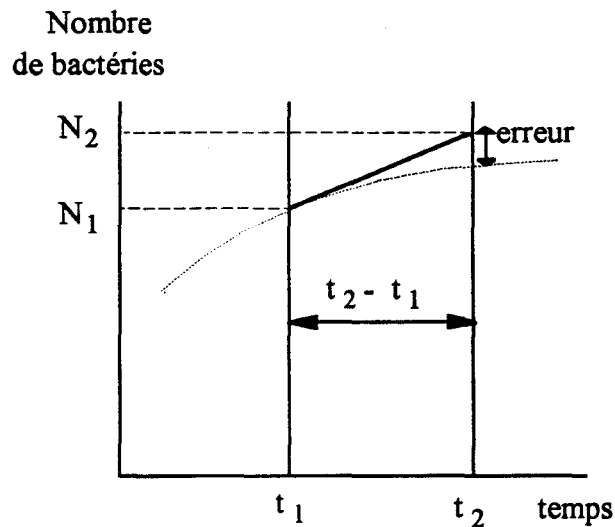


Figure 110 : Relation entre le nombre de bactéries et le temps. Ce graphique montre comment est calculé le nombre de bactéries N_2 à la fin d'un intervalle ($t_2 - t_1$). On considère que le taux de croissance est toujours maximal et constant pour un intervalle et pour des conditions physico-chimiques données.

Ce modèle nous a permis de réaliser une simulation de l'évolution la population de *Pectinatus cerevisiophilus* DSM 20466 durant le processus de fabrication de la bière dans des conditions standards. La figure 111 nous en donne un aperçu. Les populations bactériennes au début ou à la fin de chaque étape sont rassemblées dans le tableau 27.

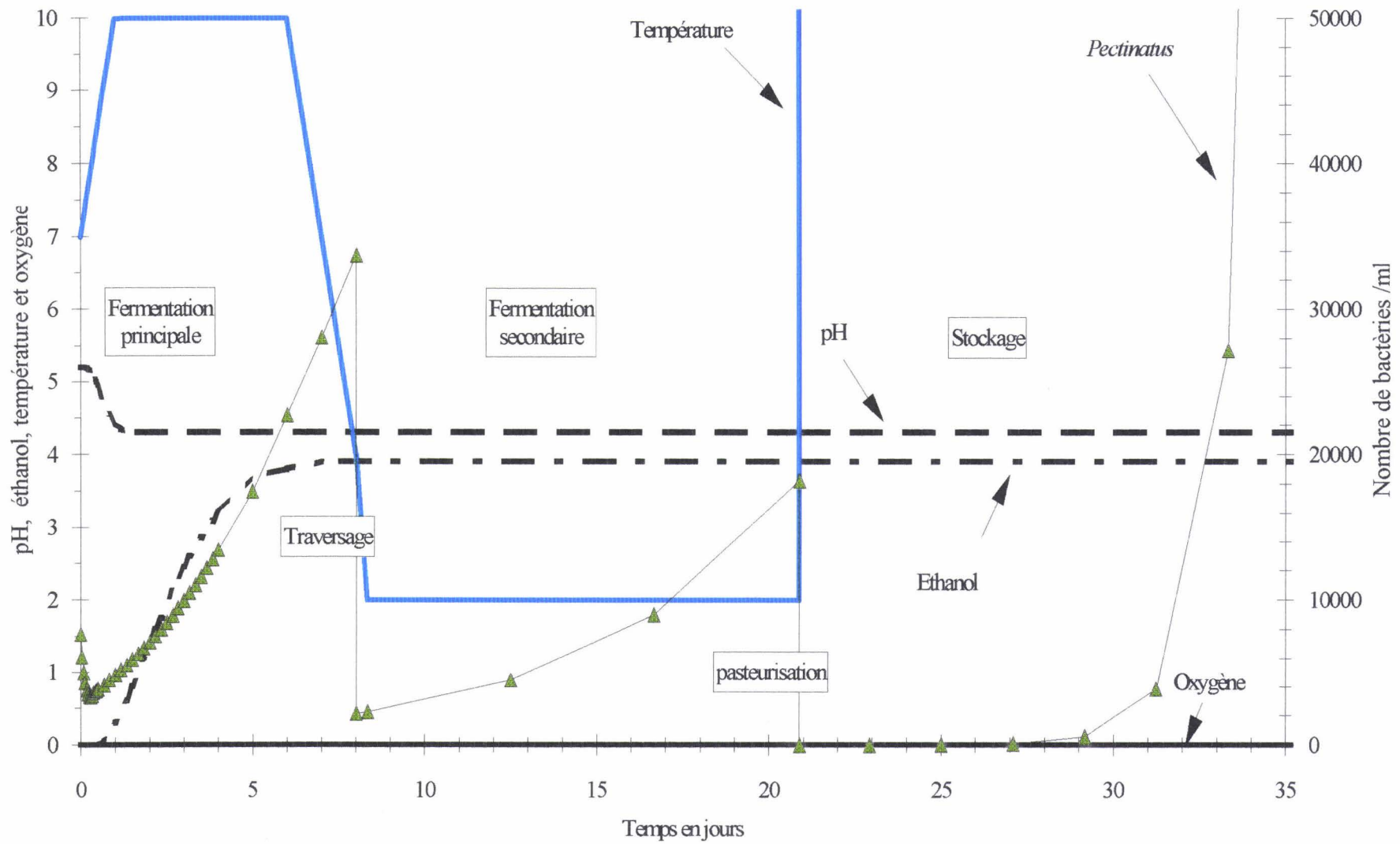


Figure 111 : Evolution de la population de *Pectinatus* lors de la fabrication de la bière

	début de	fin de	fin de	fin de	fin de	fin de	fin de
	l'étape 1	l'étape 1	l'étape 2	l'étape 3	l'étape 4	l'étape 5	l'étape 6
nombre de	1000	357	3369	210	1819	0,024	1,3 10 ⁸
bactéries / ml	0,1	0,0357	0,336	0,21	0,181	2,4 10 ⁻⁶	1,3 10 ⁸

Tableau 27 : Nombre de bactéries présentes à chaque étape de la fabrication de la bière en fonction du taux d'inoculation. Calcul à l'aide du modèle. Etape 1 et 2 : fermentation, étape 3 : traversage, étape 4 : fermentation secondaire, étape 5 : pasteurisation, étape 6 : stockage.

Dans les procédés de fabrication de la bière, de nombreux paramètres peuvent évoluer. Il va donc de soit que ces résultats ne peuvent être qu'un exemple. Il existe en réalité une multitude de possibilités dans le choix de la température, la durée des fermentations et des paramètres de pasteurisation. Il est évident qu'il n'est pas possible d'étudier tous les cas. Par conséquent, nous nous sommes limités à un exemple standard. Ces résultats montrent que pour des contaminations faibles, les risques de prolifération de *Pectinatus* DSM 20466 dans le moût puis dans la bière restent importants. L'évolution de la contamination semble proportionnelle à la population de départ. D'autres simulations pour des températures plus élevées et des temps plus courts (fermentation haute) montrent que ces conditions semblent favoriser la croissance de *Pectinatus* par rapport à celle de la levure.

Ce modèle reste encore très imparfait puisqu'il ne tient pas compte de certains paramètres comme les interactions bactéries-levures ainsi que de la quantité de substrat restant dans le milieu. Le modèle proposé n'est qu'une approche du phénomène. Il permet de connaître l'influence de certains paramètres mis en jeu lors de la fabrication de la bière sur l'évolution de la population de *Pectinatus*.

- Conclusion générale -

5. Conclusion générale

Deux bactéries anaérobies strictes, contaminants de la bière ont été étudiées du point de vue de leur physiologie de croissance et de leur résistance aux pH acides, à l'oxygène et surtout à la chaleur. Les souches étudiées sont *Pectinatus* sp., *P. cerevisiophilus*, *P. frisingensis* et *Megasphaera cerevisiae*. Cette étude a été faite dans un milieu synthétique (MRS), dans le moût et dans la bière.

Dans la première partie de cette recherche, nous avons réalisé des cinétiques de croissance en étudiant l'influence de la température, du pH et de la concentration en éthanol, ce qui nous a permis de délimiter les bornes de plans d'expériences. Les cinétiques de croissance provenant de ces différents plans d'expériences (milieu MRS) ont été modélisées pour déterminer les taux de croissance maximaux. Nous avons utilisé le modèle logistique pour *Pectinatus* et celui de Gompertz pour *Megasphaera*. Les populations maximales, quant à elles, correspondent aux valeurs déterminées expérimentalement. Les résultats des taux de croissance maximaux et des populations maximales de la souche *Pectinatus* sp. ont permis de construire différents modèles polynomiaux quadratiques. Il s'avère que l'introduction de l'équation d'Arrhénius, en tenant compte de la variation de l'énergie d'activation améliore le modèle. Celui-ci a été validé pour les deux autres souches. A partir de ce modèle et des résultats expérimentaux, les limites et les conditions optimales de croissance pour les différentes souches ont été déterminées. Il est à noter que le modèle est plus fidèle pour les conditions optimales que pour les conditions limites. Pour *Pectinatus* les conditions optimales sont peu différentes pour les trois souches : 33-35°C, pH 6,3-6,6, 0 % v/v d'éthanol. Le taux de croissance maximal est alors de 0,31 h⁻¹ et la population maximale est de 3,7 10⁸ bact./ml. Il y a croissance jusqu'au pH 4,1 et jusqu'à une concentration en éthanol de 7,3 % v/v. Des plans d'expériences réalisés dans le moût ont permis de construire d'autres équations polynomiales simulant la croissance lors du procédé industriel. Nous avons mis en évidence, dans ces conditions, une croissance de *Pectinatus* pour des conditions de température, de pH et de concentration en éthanol proches de celles rencontrées lors de la fermentation de la bière.

Une étude similaire dans le milieu MRS a été faite pour *Megasphaera*. Pour cette bactérie les meilleurs résultats ont été obtenus avec un modèle plus simple ne faisant pas intervenir l'équation d'Arrhénius. Les conditions optimales de croissance sont : 33-35°C pour un pH de 6,2-6,6 avec un taux de croissance de 0,16 h⁻¹. *Megasphaera* est plus sensible que *Pectinatus* aux pH acides et à l'éthanol et semble moins adapté au milieu bière. Cela peut expliquer pourquoi cette bactérie est moins couramment mise en cause lors des accidents de contamination des bières.

Le métabolisme de *Pectinatus* a été abordé. Nous avons mis en évidence une synthèse de propionate via la voie du succinate. La croissance s'accompagne d'une synthèse importante d'acétate. Dans le moût lors d'une fermentation haute ou lors du stockage de la bière, une

contamination par *Pectinatus* peut avoir de graves conséquences, entraînant la formation d'une quantité non négligeable de propionate qui altère les qualités organoleptiques de la bière.

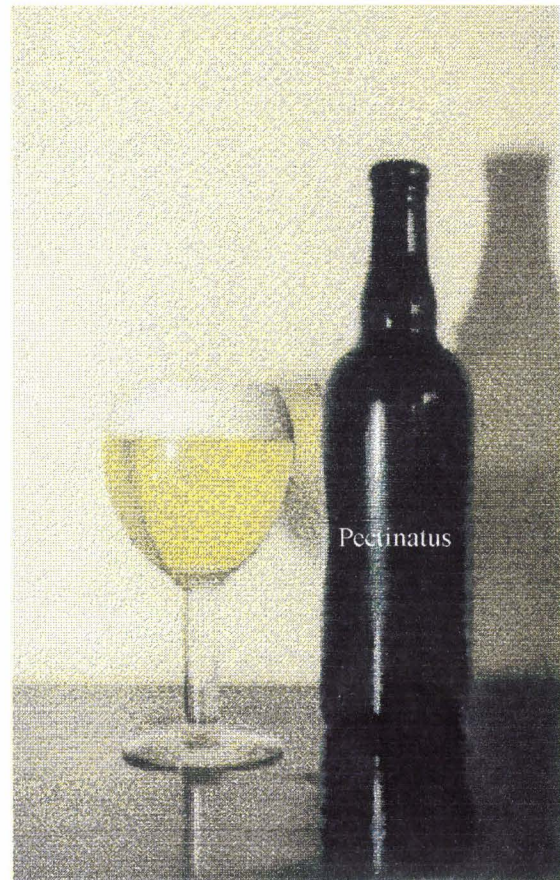
La seconde partie du travail a consisté à étudier la thermorésistance et la résistance à l'oxygène dissous. En ce qui concerne la thermorésistance, les valeurs des D_{60} et des z ont été déterminées dans le milieu MRS, dans le moût et dans la bière. Pour *Pectinatus*, dans la bière le D_{60} est supérieur à 0,88 minute et le z supérieur à 6°C. La thermorésistance de *Megasphaera* est plus faible puisque nous avons un D_{60} de 0,55 minute et un z de 11°C. La pasteurisation ne semblent pas devoir poser de problème si elle est accompagnée d'une filtration préalable. Cependant pour *Pectinatus* les risques sont plus importants pour une flash pasteurisation.

L'étude de la résistance à l'oxygène a montré que *Pectinatus* est capable de résister plusieurs heures dans du moût saturé en oxygène malgré son caractère anaérobie stricte. Dans ces conditions l'oxygénation du moût en début de fermentation en brasserie n'empêche pas le développement de ce contaminant.

L'ensemble de ces résultats montre que *Pectinatus* semble être bien adapté au milieu bière. Le plus faible développement de *Megasphaera* et sa thermorésistance plus basse en font un contaminant moins dangereux. Ceci est d'ailleurs la raison pour laquelle le travail a été davantage approfondi pour *Pectinatus*.

Une étude de l'évolution des populations de *Pectinatus* et de *Megasphaera* lors de la fabrication de la bière en micro-brasserie conclut ce travail. Il a été montré que les populations en fin de fermentation de ces micro-organismes pouvaient atteindre $2,6 \cdot 10^6$ bact./ml. Une contamination à l'ensemencement, en début de fermentation, peut entraîner des risques importants de prolifération de *Pectinatus*. Même si les liens entre le développement au cours de la fermentation principale et l'altération organoleptique de la bière n'ont pu être démontrés, il reste vrai que son développement dans le moût et la bière ainsi que sa thermorésistance relativement élevée font de *Pectinatus* un contaminant particulièrement dangereux.

Nous avons dans ce travail étudié la croissance de *Pectinatus* et de *Megasphaera* en culture pure. La fermentation en micro-brasserie mais



à consommer avec modération

aussi d'autres travaux réalisés au laboratoire ont montré qu'il pouvait y avoir des interactions entre les levures et *Pectinatus* ou *Megasphaera*. Cette étude en culture mixte reste à approfondir et permettra de mieux comprendre et d'évaluer les conséquences des contaminations par ces bactéries. Ce travail fait actuellement l'objet d'une thèse de troisième cycle et devrait être complété par une étude plus approfondie du métabolisme de *Pectinatus*.

- Références bibliographiques -

6. Références bibliographiques

A.F.N.O.R. (Association Française de Normalisation) 1988. Contrôle de la qualité des produits alimentaires : analyse sensorielle, 3^e édition, Paris-la-Défense, AFNOR.

Adair, C., Kilsby, D. C., et Whittall, P. T. 1989. Comparison of the Schoolfield (non-linear Arrhenius) model and the square root model for predicting bacterial growth in foods. *Food Microbiol.* 6:7

Adams, M. R., O'Brien P. J., et Taylor, G. T. 1989. Effect of the ethanol content of beer on the heat resistance of a spoilage *Lactobacillus*. *J. Appl. Bacteriol.* 66:491

Adams, M., Little, C., Easter, M. 1991. Modelling the effect of pH, acidulant and temperature on the growth rate of *Yersinia enterocolitica*. *J. Appl. Bacteriol.* 71:65

Alber, S. A., et Schaffner, D. W. 1992. Evaluation of data transformations used with the square root and Schoolfield models for predicting bacterial growth rate. *App. Env. Microbiol.* 58:3337

Allen, S. H. G., Kellermeyer, R. W., R. L., et Wood, H. G. 1964. Purification and properties of enzymes involved in the propionic acid fermentation. *J. Bacteriol.* 87:171

Allwood, M. C., et Russel, A. D. 1970 Mechanisms of thermal injury in nonsporulating bacteria. *Adv. Appl. Microbiol.*, 12: 89

Amaha, M., et Ordal, Z. J. 1957. Effects of divalent cations in the sporulation medium on the thermal death rate of *B. coagulans* Var *thermacidurans*. *J. Bacteriol.* 75:596

Anderson, R. J., Howard, G. A. et Hough, J. S. 1971. The sulphur metabolism of brewing yeasts and spoilage bacteria. *Eur. Brew. Conv. Proc. 13th Congr. Salzburg.* p:253

Anderson, R. J., et Howard, G. A. 1974. The production of hydrogen sulphide by yeast and by *Zymonas anaerobia*. *J. Inst. Brew.* 80:245

Angelotti, R., Maryanski, J. H., Butler, T. F., Peeler, J. T., et Campbell, J. E. 1968 Influence of spore moisture content on the dry heat resistance of *Bacillus subtilis* Var. *Niger*. *Appl. Microbiol.* 16:735

Arrhenius, S. 1889. Über die reaktiongeschwindigkeit bei der inversion von rohrzucker durch säuren. *Z. Phys. Chem.* 4:226

Ault, R. G. 1965. Spoilage bacteria in brewing-a review. *J. Inst. Brew.* 71:376

Ault, R. G., et Newton, R. 1971. Spoilage organisms. Dans : brewing. Modern brewing technology. 1^{ère} édition (ed.) W. P. K. Findlay Macmillam Press, London et Basingstoke. p:164

- Back, W.** 1978. Zur Taxonomie der Gattung *Pediococcus*. Phänotypische und genotypische Abgrenzung der bisher bekannten Arten sowie Beschreibung einer neuen bierschädlichen Art: *Pediococcus inopinatus*. Brauwiss. 31:237
- Back, W., Weiss, N., et Seidel, H.** 1979. Isolierung und systematische Zuordnung bierschädlicher gramnegativer Bakterien. II: Gramnegative anaerobe Stäbchen/Anhang: Aus Bier isolierte gramnegative fakultativ Stäbchen. Brauwissenschaft. 32:233
- Back, W., Breu, S., et Weiget, C.** 1988. Infektionsursachen im Jahre 1987. Brauwelt. 128:1358
- Ball, C. O.** 1923. Determining by methods of calculation on the time necessary to process canned foods Introduction to the thermal processing of foods. Avi. Publ. Com. Inc. 1961, 1:935
- Ball, C.O., et Olson, F.C.W.** 1957. Sterilization in food technology. Theory, practice and calculations. (ed.) Mc Graw-Hill, New-York.
- Barbour, E. A., et Priest, F. G.** 1986. The preservation of *Lactobacilli* : a comparison of three methods. Lett. Appl. Microbiol. 2:69
- Barillère, J. M., Mimouni, A., Dubois, C., et Bidan, P.** 1985. Thermorésistance de souches de levures isolées de vins. Sci. Aliments. 5:365
- Benard, M., Leveau, J. Y., et Scriban, R.** 1975. La pasteurisation de la bière. Extraits de la revue de l'embouteillage et des Industries du conditionnement. 153:25 et 154:27
- Beuchat, L. R.** 1978. Injury and repair of gram-negative bacteria, with special consideration of the involvement of cytoplasmic membrane. Adv. Appl. Microbiol. 23:219
- Beuchat, L. R.** 1983. Influence of aw on growth, metabolic activities and survival of yeasts and moulds. J. Food Prot., 46:135
- Bigelow, W.D.** 1921. Infections diseases. 24:528
- Bigelow, W.D., et Esty, J. R.** 1920. Thermal death point in relation to time of typical thermophilic organisms. J. Infections diseases. 27:602
- Bond, W. W., Favero, M. S., Petersen, N. J., et Marshall, J. H.** 1970 Dry-heat inactivation kinetics of naturally occurring spore populations. Appl. Microbiol., 20:573
- Boudon, M.** 1973. La pasteurisation de la bière. Echo de la brasserie. 29:72
- Bratchell, N., Gibson, A. M., Truman, M., Kelly, T. M. et Roberts, T. A.** 1989. Predicting microbial growth : the consequences of quantity of data. Int. J. Food Microbiol. 8:47
- Brockmann, H. L., et Wood, W. A.** 1975. Electron-transferring flavoprotein of *Peptostreptococcus elsdenii* that function in the reduction of acrylyl-coenzyme A. J. Bacteriol. 124:1447

Broughall, J., Anslow, P., et Kilsby, D. 1983. Hazard analysis applied to microbial growth in foods : development of mathematical models describing the effect of water activity. *J. Appl. Bacteriol.* **55**:101

Buchanan, R. L., Bagi, L. K., Goins, R. V., et Phillips, J. G. 1993. Response surface models for the growth kinetics of *Escherichia coli* O157:H7. *Food Microbiol.* **10**:303

Burns, J. A. 1937. Yeast flocculation. *J. Inst. Brew.* **43**:31

Cerf, O. 1977. Tailing of survival curves of bacterial spores. *J. Appl. Bacteriol.*, **42**:1

Cerf, O., Dousset, X., Brossard, J. 1988. Pasteurisation et stérilisation thermique. Microbiologie alimentaire 1: Aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité alimentaires. (ed.) Bourgeois C.M., Mescle J.F. et Zucca J. Tech. et Doc. Lavoisier. APRIA. p:308

Cheftel, H., et Thomas, G. 1963. Principes et méthodes pour l'établissement des barèmes de stérilisation des conserves alimentaires. Ets. J. J. Carnaud. Forges de Basse Indre. Bull. n°14.

Chelack, B. J., et Ingledew, W. M. 1987. Anaerobic Gram-negative bacteria in brewing - a review. *J. American Society of Brewing Chemists.* **45**:123

Cogan, T. M. 1987. Co-metabolism of citrate and glucose by *Leuconostoc spp* : effects on growth, substrates and products. *J. Appl. Bacteriol.* **63**:551

Cook, A. M., et Gilbert, R. J. 1968. Factors affecting the heat resistance of *B. stearothermophilus* spores. *J. Food Technol.* **3**:285

Courtoisier, A. 1984. Action destructrice de la chaleur sur les microorganismes. Calcul pratique d'un traitement thermique et application au vin. *Ind. Alim. Arg.* **101**:103

Cowbourne, M. A., Priest, F. G. et Hough, J. S. 1972. Gram-negative wort bacteria. *Brew. Dig.* **10**:76

Dachs, E. 1978. Innovation im Bereich der biologischen Betriebskontrolle. *Brauwelt* **118**:1519

Dadds, M. J. S., Macpherson, A. L., et Sinclair, A. 1971. *Zymomonas* and acetaldehyde levels in beer. *J. Inst. Brew.* **77**:453

Dadds, M. J. S., et Martin, P. A. 1973. The genus *Zymomonas*-a review. *J. Inst. Brew.* **79**:386

Dallyn, H., et Failloon, W. C. 1976. The heat resistance of yeasts and the pasteurisation of beer. *The Brewer.* **62**:354

Davey, K. R. 1989. A predictive model for combined temperature and water activity on microbial growth during the growth phase. *J. Appl. Bacteriol.* **67**:483

De Clerck J., et Van Cauwenberge H. 1956. Bulletin de l'association des Anciens Etudiants en Brasserie de l'Université de Louvain. **52**:1 et 61

- De Clerck J., et De Clerck E.** 1966. Microbrewery, Technical Quarterly, Master Brewers Association of the Americas. **2:183**
- De Vries, W., Rietveld-Struijk, T. R. M., et Stouthamer, A. H.** 1977. ATP formation associated with fumarate and nitrate reduction in growing cultures of *Veillonella alcalescens*. J. Microbiol Serol. **43:153**
- Del Vecchio, H. W., Dayharsh, C. A. et Baselt, F. C.** 1951. Thermal death time studies on beer spoilage organisms. A. S. B. C. Proceedings. **p:45**
- Doelle,** 1969. Bacterial metabolism. (ed.) Academic Press. New York and London.
- Doutsias, G.** 1974. Etude de la thermorésistance d'une souche de *Pichiaetchellsii* isolée de saumure d'olives vertes. D.E.S., Université de Dijon.
- Driard, C.** 1974. Méthode de détermination de la valeur stérilisatrice des conserves appertisées. Etudes des facteurs intervenant dans la thermorésistance des spores bactériennes. Mémoire de fin d'études. Edition : Institut Appert, Paris.
- Dürr, P.** 1983. Luftkeimindikation bierschädlicher bakterien, neue methode mittels luftkeimsammelgerät und luftkeimindikator. Brauwelt. **123:1652**
- El-Bisi, H. M., et Ordal, Z. J.** 1956. The effect of certain sporulation condition on thermal death rate of *B. Coagulans* Var thermoacidurans. J. Bacteriol. **71:16**
- Elliker, P. R., et Frazier, W. C.** 1938. Influence of time and temperature of incubation on heat resistance of *Escherichia coli*. J Bacteriol. **36:83**
- Engasser, J. M., Marc, L., Moll, M. et Duteurtre, B.** 1981. Kinetic modelling of beer fermentation. Dans : European Brewery Convention, Proceedings of the 18th Congress, 1981, Copenhagen. Oxford, IRL Press LTD. **p:579**
- Engelmann, U., et Weiss, N.** 1985. *Megasphaera cerevisiae* sp. nov.: A new gram-negative obligately anaerobic coccus isolated from spoiled beer. System. Appl. Microbiol. **6:287**
- Eschenbecher, F.** 1968. Zur Kenntnis der biersäuernden Laktobazillen. Brauwiss. **21:424**
- Eschenbecher, F.** 1969. Zur Kenntnis der biersäuernden Laktobazillen. Brauwiss. **22:14**
- Eschenbecher, F., et Ellenrieder, M.** 1975. Eine Artenanalyse der Würzebakterien. Eur. Brew. Conv. Proc. 15th Congr. Nice. **p:497**
- Eto, M., et Nakagawa, A.** 1975. Identification of a growth factor in tomato juice for a newly isolated strain of *Pediococcus cerevisiae*. J. Inst. Brew. **81:232**
- Etoa, F. X.** 1983. Miniaturisation de la méthode biologique de détermination de la valeur stérilisatrice dans les conserves. D.E.A. Université Paris VI. Edition : Institut Appert, Paris.
- Eyring, H.** 1935. The activated complex in chemical reactions. J. Chem. Phys. **3:107**

- Fedio, W. M. et Jackson, H.** 1989. Effect of tempering on the heat resistance of *listeria monocytogenes*. Letters Appl. Microbiol. 9:157
- Findlay, W. P. K.** 1971. Modern Brewery Technology. (ed.) Macmillan Press, London. p:214
- Galivan, J. H., et Allen, S. H. G.** 1968. Methylmalonyl-coenzyme A decarboxylase. Its role in succinate decarboxylation by *Micrococcus lactilyticus*. J. Biol. Chem. 243:1253
- Gares, S. L., Whiting, M. S. et Ingledew, W. M.** 1993. Detection and identification of *Pectinatus cerevisiiphilus* using surface-reactive monoclonal antibodies in a membrane filter-based fluoroimmunoassay. Am. Soc. Brew. Chem. 4:158
- Garrick, C.C. et Mc Neil, K. E.** 1984. Influence of product composition on pasteurisation efficiency. Proc. Conv. Inst. Brew. 18:244
- Gaze, J. E.,** 1985. The effect of oil on the heat resistance of *Staphylococcus aureus*. Food Microbiol. 2:277
- Gibson, A. L., Bratchell, N. et Roberts, T. A.** 1987. The effect of sodium chloride and temperature on the rate and extent of growth of *Clostridium botulinum* type A in pasteurized pork slurry. J. Appl. Bacteriol. 62:479
- Gibson, A. M., Bratchell, N. et Roberts, T. A.** 1988. Predicting microbial growth : growth responses of *Salmonellae* in laboratory medium as affected by pH, sodium chloride and storage temperature. Int. J. Food Microbiol. 6:155
- Gibson, B.** 1973. The effect of high sugar concentrations on the heat resistance of vegetative micro-organisms. J. Appl. Bacteriol. 36:365
- Gillilet, R. B.** 1957. The flocculation of brewing yeast. Wallerstein Laboratories Communications. 20:41
- Gompertz, B.** 1825. On the nature of the function expressive of the law of human mortality, and on a new mode of determining the values of life contingencies. Philos. Trans. R. Soc. London. 115:513
- Gunst, F. et Verzele, M.** 1978. On the sunstroke flavour of beer, Journal of the Institute of Brewing. 84:291
- Haikara, A.** 1982. *Pectinatus* panimokontaminanttita. Mallas ja Olut. p:101
- Haikara, A.** 1983. Immunological characterization of *Pectinatus cerevisiiphilus* strains. Appl. Environ. Microbiol. 46:1054
- Haikara, A.** 1984. Beer spoilage organisms. Occurrence and detection with particular reference to a new genus *Pectinatus*. Tech. Res. Cent. of Finlet. 14:07
- Haikara, A.** 1985a Detection of anaerobic, gram-negative bacteria in beer. Monatsschrift fr Brauwissenschaft. 6:239

Haikara, A. 1985b. Detection of *Pectinatus* contaminants in beer. J. Am. Soc. Brew. Chem. 43:43

Haikara, A. 1986. Uudet panimokontaminantit. Mallas ja Olut. p:69

Haikara, A. 1989. Invasion of anaerobic bacteria into pitching yeast. Proc 22nd Congr. Eur. Brew. Conv. p:537

Haikara, A. 1991. The Genera *Pectinatus* and *Megasphaera*. Dans : The Prokaryotes, second ed. (ed.) Albert Balows *et al.* p:1994

Haikara, A., Mäkinen, V. et Hakulinen, R. 1977. On the microflora of barley after harvesting, during storage and in malting. Eur. Brew. Conv. Proc. 16th Congr. Amsterdam. p:35

Haikara, A., Enari, T.-M. et Lounatmaa, K. 1981a. The genus *Pectinatus*, a new group of anaerobic beer spoilage bacteria. EBC Congress. 24:229

Haikara, A., Penttilä, L., Enari, T. M. et Lounatmaa, K. 1981b. Microbiological, Biochemical, and electron microscopic characterization of a *Pectinatus* strain. Appl. Environ. Microbiol. 2:511

Haikara, A., et Lounatmaa, K. 1987. Characterisation of *Megasphaera* sp., a new anaerobic beer spoilage coccus. EBC Congress. 21st Congress. p:473

Hakalehto, E., Haikara, A., Enari, T.-M., et Lounatmaa, K. 1984. Hydrochloric acid extractable protein patterns of *Pectinatus cerevisiiphilus* stains. Food Microbiol. 1:209

Hakalehto, E., et Finne, J. 1990. Identification by immunoblot analysis of major antigenic determinants of the anaerobic beer spoilage bacterium genus *Pectinatus*. FEMS Microbiol. Lett. 67:307

Hansen, N. H., et Riemann, H. 1963. Factors affecting the heat resistance of nonsporing organisms. J. Appl. Bacteriol. 26:314

Harrison, J. C., Apsey, N., Badger, T., et Moon, D. 1987. Small-scale (non-industrial) Brewing. Dans : Brewing Science, volume 3, (ed.) Pollock J. R. A. London, Academic Press. p:573

Haukeli, A. D. 1980 En ny ølskadelig bakterie i tappet øl. Referat från det 18. Skan dinaviska Bryggeritekniska Mötet, Stockholm. p:112

Hayakawa, M., et Nonomura, H. 1987. Humic acid-vitamin agar, a new medium for the selective isolation of soil actinomycetes. J. Ferment. Technol. 5:501

Helander, I. M., Haikara, A., et Moran, A. P. 1992. Separation and characterization of two chemically distinct lipopolysaccharides in two *Pectinatus* species. J. Bacteriol. 10:3348

Heleter, L., Hakalehto, E., Ahvenainen, J., et Haikara, A. 1983. Characterization of lipopolysaccharides of *Pectinatus cerevisiiphilus*. FEMS Microbiol. Lett. 18:223

Heleter, I., Saukkonen, K., Hakalehto, E., et Vaara, M. 1984. Biological activities of lipopolysaccharides from *Pectinatus cerevisiophilus*. FEMS Microbiol. Lett. **24**:39

Helm, E., Nohr, B., et Thorne, R. S. W. 1953. The measurement of yeast flocculence and its significance in brewing. Wallerstein Laboratories Communications. **26**:315

Hettinga, D. H., et Reinhold, G. W. 1972. The propionic acid bacteria-a review, II Metabolism. J. Milk Food Technol. **25**:358

Holdeman, L. V., et W. 1974. Gram-negative anaerobic rods: Family I. *Bactroidaceae*. Dans : R. E. Buchanam et N. E. Gibbons (ed.), Bergey's Manual of determinative Bacteriology, 8th ed. Williams et Wilkins Co., Baltimore. p:384

Hsu, S. T., et Yet, S. T. 1991. Propionic acid fermentation of lactose by *Propionibacterium acidipropionici*: effects of pH. Biotechnol. Bioeng. **38**:571

Hungate, R. E. 1969. A roll tube method for the cultivation of strict anaerobes. Dans : J. R. Norris et D. W. Ribbons (ed.), Methods in microbiology, vol. 3B. Academic Press, Inc., New York. p:117

Hurst, A., Hughes, A., et Collins-Thompson, D. L. 1974. The effect of sub-lethal heating on *Staphylococcus aureus* at different physiological ages. Can. J. Microbiol. **20**:765

Ingledeu, W. M. 1979. Effect of bacterial contaminants on beer. A review. J. Am. Soc. Brew. Chem. **37**:145

Ingram, M. 1969. Spore former as food spoilage organisms. Dans : Gould, G. W., et Hurst, A., (ed.) The Bacterial Spore, Academic Press : New York. p: 449

Jason, A. C. 1983. A deterministic model for monophasique growth of batch cultures of bacteria. Antonie van Leeuwenhoek. **49**:513

Kattein, U., Miedaner, H., et Narziss, L. 1988. Zur Problematik des Lichtgeschmackes im Bier, Monatsschrift für Brauwissenschaft. **21**:205

Keevil, W. J., Hough, J. S., et Cole, J. A. 1979. The influence of a coliform bacterium on fermentation by yeast. J. Brew. **85**:99

Kidney, E., et White, F. H. 1979. The influence of yeast strains on beer spoilage bacteria. Eur. Brew. Conv. Proc. 18th Congr. Berlin. p:801

Kiefer, J. 1990. Kieselgurfiltration. Ein Überblick über die theoretischen Grundlagen, Brauwelt. **130**:1730

Kilgour, W. J., et Day, A. 1983. The application of new techniques for the rapid determination of microbial contamination in brewing. Proc. Congr. Eur. Brew. Conv. **19**:177

Kilgour, W. J., et Smith, P. 1985. The determining of pasteurisation regimes for alcoholic and alcohol-free beer. EBC Congress. p:435

- Kirchner, G., Lurz, R., et Matsuzawa, K.** 1980. Biertrübungen durch Bakterien der Gattung *Bacteroides*. *Monatsschr. Brauwissenschaft.* **33**:461
- Kitahara, K.** 1974. Gram-positive cocci, Genus III. *Pediococcus*. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. R. E. Buchaman et N. E. Gibbons. 8ème édition (ed.) The Williams and Wilkins Co., Baltimore. p:513
- Klugbauer, N., Ludwig, W., Bäuerlein, E., et Schleifer, K. H.** 1992. Subunit β of adenosine triphosphate synthase of *Pectinatus frisingensis* and *Lactobacillus casei*. *System. Appl. Microbiol.* **15**:323
- Knabel, S. J., Walker, P. A., Hartman, P. A., et Mendonca, A. F.** 1990. Effects of growth temperature and strictly anaerobic recovery on the survival of *Listeria monocytogenes* during pasteurisation. *Appl. Env. Micro.* **56**:370
- Kuroiwa, Y., et Hashimoto, H.** 1961. The role of flavine compounds in the evolution of hydrogen sulfide in beer on the exposure of sunlight, Report of the Research Laboratories of the Kiirin Brewery Co., Ltd., Yokohama. **4**:29
- Lawrence, D. R., et Priest, F. G.** 1981. Identification of brewery cocci. *Eur. Brew. Conv. Proc. 18th Congr. Copenhagen.* p:217
- Leaver, F. W., Wood, H. G., et Stjernholm, R.** 1955. The fermentation of three carbon substrates by *Clostridium propionicum* and *Propionibacterium*. *J. Bacterol.* **70**:521
- Lee, S. Y.** 1984. Genus XI *Pectinatus*. Dans : N. R. Krieg, et J. G. Holt (ed.) *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol. 1. Williams et Wilkins, Baltimore. p:655
- Lee, S. Y., Mabee, M. S., et Jangaard, N. O.** 1978. *Pectinatus*, a new genus of the family Bacteroidaceae. *International Journal of Systematic Bacteriology.* **28**:582
- Lee, S. Y., Mabee, M. S., Jangaard, N. O., et Horiuchi, E. K.** 1980. *Pectinatus*, a new genus of bacteria capable of growth in hopped beer. *J. Inst. Brew.* **86**:28
- Lee, S. Y., Moore, S. E., et Mabee, M. S.** 1981. Selective-differential medium for isolation and differentiation of *Pectinatus* from other brewery microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.* **41**:386
- Lewin, R.** 1984. Microbial adhesion is sticky problem. *Science.* **224**:375
- Linton, R. H., Webster, J. B., Pierson, M. D., Bishop, J. R., et Hackney, C. R.** 1992. The effect of sublethal heat shock and growth atmosphere on the heat resistance of *Listeria monocytogenes* Scott A. *J. Food Prot.* **55**:84
- Little, C. L., Adams, M. R., Etersson, W. A., et Cole, M. B.** 1992. Comparison of a quadratic response surface model and a square root model for predicting the growth rate of *Yersinia enterocolitica*. *Lett. Appl. Microbiol.* **15**:63

- Mac Meekin, T., Chandler, R., Doe, P., Garland, C. et Olley, T.** 1987. Model for combined effects of temperature and salt concentration/water activity on the growth rate of *Staphylococcus xylosus*. *J. Appl. Bacteriol.* **62**:543
- Mac Meekin, T., Olley, T., Ratkowsky, D., et Ross, T.** 1989. Comparison of the Schoolfield (non linear Arrhenius) model and the square root model for predicting bacterial growth in foods. A reply to C. Adair *et al.* *Food Microbiol.* **6**:304
- Mac William, I. C.** 1968. Wort composition - a review. *J. Inst. Brewing.* **74**:38
- Mackey, B. M., et Derrick, C. M.** 1986. Elevation of the heat resistance of *Salmonella typhimurium* by sublethal heat shock. *J. Appl. Bacteriol.* **61**:389
- Macron, J. Y., Delorme, J. J., et Moll, M.** 1982. Beer filtration : Setting up a pilot plant installation comparable with industrial filters, *Technical Quarterly. Master Brew. Associa. Ame.* **19**:142
- Mafart, P.** 1991. Les traitements thermiques. Dans : *Génie Industriel Alimentaire, Tome I, Les procédés physiques de conservation.* (ed.) *Technique et documentation-Lavoisier.* **4**:85
- Magnus, C. A., Ingledew, W. M., et Mc Curdy, A. R.** 1986. Thermal resistance of *Streptococci* isolated from pasteurized ham. *Can. Inst. Food. Sci. Technol. J.* **19**:62
- Marc, A., Engasser, J. M., Moll, M., et Flayeux, R.** 1983. A kinetic model of starch hydrolysis by α and β -amylase during mashing. *Biotechnology and Bioengineering.* **25**:481
- Marc, I.** 1982. Modélisation de la fermentation de la bière dans un réacteur cylindro-conique, Thèse de Docteur Ingénieur, Institut National Polytechnique de Lorraine, Nancy.
- Marshall, K. C.** 1984. Introduction. Dans : *Microbial adhesion and aggregation.* (ed.) K. C. Marshall. Springer-Verlag, Berlin. p:1
- Meilgaard, M. C., Dalglish, C. E., et Clapperton, J. F.** 1979. Terminologie de flaveur de la bière. *Bios.* **10**:23
- Membré, J. M., et Burlot, P. M.** 1994. Effects of temperature, pH, and NaCl on growth and Pectinolytic activity of *Pseudomonas marginalis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **6**:2017
- Michiels, L., Vigneron, J., et Lucas, J. C.** 1978. Facteurs divers influençant la thermorésistance des spores bactériennes. Communication présentée au VIIème Congrès International de la Conserve, Tunis.
- Middlekauff, J. E., et Sondag, R.** 1972. Studies on quality and quantity of end products during *Pediococcus* growth and metabolism. *Proc. Am. Soc. Brew.* p:17
- Miller, R., et Galston, G.** 1989. Rapid methods for the detection of yeast and *Lactobacillus* by ATP bioluminescence. *J. Inst. Brew.* **95**:317
- Moats, W. A., Dabbah, R., et Edwards, V. M.** 1971. Interpretation of nonlogarithmic survivor curves of heated bacteria. *J. Food Sci.* **36**:523

- Molin, N., et Snygg, B. G.** 1967. Effect of lipid materials on heat resistance of bacterial spores. *Appl. Microbiol.* **15**:1422
- Moll, M.** 1987. *Analytica EBC*, 4ème édition, CH-8047 Zurich, Brauerei-und Getränke-Rundschau.
- Moll, M.** 1991. *Bières et coolers*. (ed.) Tec et Doc-Lavoisier Apria, Paris.
- Moll, M., et Moll, N.** 1993. La composition ionique du moût. *Brauerei-und Getränke-Rundschau.* **3**:29
- Molzahn, S. W., Hockney, R. C, et Kelsey, P.** 1983. Factors influencing the flash pasteurisation of beer. *EBC Congress.* p:255
- Moore, W. B., et Rainbow, C.** 1955. Nutritional requirements and biochemical activities of brewery *lactobacilli* *J. Gen. Microbiol.* **13**:190
- Morgan, R. W., Christman, M. F., Jacobson, F. S., Storz, G., et Ames, B. N.** 1986. Hydrogen peroxide-inducible proteins in *Salmonella typhimurium* overlap with heat shock and other stress proteins. *Proc. Nat. Aca. Sci. USA.* **83**:8059
- Murell, W. G., et Scott, W. J.** 1966. The heat resistance of bacterial spores at various water activities. *J. Gen. Microbiol.* **43**:411
- Nelson, F. E.** 1943a. Factors which affect the growth of heat-treated bacteria. *J. Bact.* **45**:395
- Nelson, F. E.** 1943b. Further studies of the effect of the medium on the apparent survival of heat-treated bacteria. *J. Bact.* **46**:486
- Nelson, F. E.** 1944. Factors which influence the growth of heat treated bacteria. *J. Bact.* **48**:473
- Niefind, H. J., et Späth, G.** 1971 Die Bildung flüchtiger Aromastoffe durch Mikroorganismen *Eur. Brew. Conv. Proc. 13th Congr. Estoril.* p:459
- Niefind, H. J. et Späth, G.** 1975 Some aspects of the formation of dimethyl sulfide through brewer's yeast and beer spoilage microorganisms *Proc. Am. Soc. Brew. Chem.* **33**:54
- O'Connor-cox E. S. C., Yiu, P. M., et Ingledew, W. M.** 1991. Pasteurization : Thermal death of microbes in brewing. *MBAA T. Q.* **28**:67
- Ogg, J. E., Lee, S. Y., et Ogg, B. J.** 1979. A modified tube method for the cultivation and enumeration of anaerobic bacteria. *Can. J. Microbiol.* **25**:987
- Pace, B., et Campbel, L. L.** 1967. Correlation of maximal growth temperature and ribosome heat stability. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.,* **57**:1110
- Palumbos, S., Williams, A., Buchanan, R., et Phillips, J.** 1991. Model for aerobic growth of *Aeromonas hydrophila* k144. *J. Food Protec.* **54**:429

- Parker, M. J.** 1989. The application of automated detection and enumeration of microcolonies using optical brightness and image analysis to brewery microbiological control. Proc. Congr. Eur. Brew. Conv. **25**:545
- Penn, K.** 1986. Low and no alcohol beers. Soft Drinks. July. p:278
- Pirt, S. J.** 1974. Effects of temperature. Dans : Principles of microbe and cell cultivation. 140, Blackwell Scientific Publication.
- Ploss, M., Erber, J., et Eschenbecher, F.** 1979. Die Essigsäurebakterien in der Brauerei Eur. Brew. Conv. Proc. 17th Congr. Berlin (West). p:521
- Priest, F. G., Cowbourne, M. A., et Hough, J. S.** 1974. Wort enterobacteria - a review J. Inst. Brew. **80**:342
- Prucha, J., et Scheible, E.** 1970. Der Einfluss von Infektionen der Würze bzw. des Bieres auf den Geschmack des Bieres Brauwelt. **110**:1233
- Purohit, K., et Stokes, J. L.** 1967. Heat labile enzymes in a psychrophilic bacterium. J. Bacteriol. **93**:199
- Rainbow, G.** 1971. Spoilage organisms in breweries. Proc. Biochem. **6**:15
- Rainbow, G.** 1981. Beer spoilage microorganisms. Brewing Science. Vol. 2. (ed.) J. R. A. Pollock and Pool Limited Reading, England, Academic Press, London. p:491
- Ratkowsky, D., Olley, J. Mac Meekin, T., et Ball, A.** 1982. Relation ship between temperature and growth rate bacterial cultures. J. Bacteriol. **149**:1
- Ratkowsky, D., Lowry, R. Mac Meekin, T., Stokes, A., et Chandler, R.** 1983. Model for bacteria culture growth rate throughout the entire biokinetic temperature range. J. Bacteriol. **154**:1222
- Ratkowsky, D., Ross, T., Mac Meekin, T., et Olley, J.** 1991. Comparison of Arrhenius - type and Belehrek-type models for prediction of bacterial growth in foods. J. Appl. Bacteriol. **71**:452
- Reichart, O.** 1979. Acta Alimentaria. **8**:131
- Ricker, W. E.** 1979. Growth rates and models. Fish Physiol. **8**:677
- Riemann, J., et Scheible, E.** 1969. Der Einfluss von Infektionen der Würze bzw. des Bieres auf den Geruch und Geschmack des Bieres Brauwelt. **109**:1074
- Roberts, T. A., Ingram, M.** 1965. The resistance of spores of *Clostridium botulinum* to heat and radiation. J. Appl. Bacteriol. **28**: 125
- Rogosa, M.** 1974. Gram-negative anaerobic cocci. Genus III *Megasphaera*. Dans : R. E. Buchanan, et N. E. Gibbons (ed.), Bergey's manual of determinative bacteriology. p:448

Rogosa, M. 1984. Anaerobic Gram-negative cocci. Genus III *Megasphaera*. dans : N. R. Holt (ed.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol. 1. Williams et Wilkins, Baltimore. p:685

Russel, A. D. 1971. The destruction of bacterial spores. Inhibition and destruction of the microbial cell. Academic Press. London. p:451

Russel, C., Hetari, R. R., et Walker, T. K. 1954. Vitamin requirements of thirty-four lactic acid bacteria associated with brewery products. *J. Gen. Microbiol.* 10:371

Sadoff, H. L. 1970. Heat resistance of spore enzymes. *J. Appl. Bacteriol.* 33:130

Schmid, C. F. 1957. Thermal resistance of micro-organisms. In *Antiseptics, Disinfectants, Fungicides and Sterilization*. (2ème édition). (ed.) Reddish, G. F. Philadelphia : Lea and Febiger.

Schink, B. D. R. Kremer, et T. A. Hansen 1987. Pathway of propionate formation from ethanol in *Pelobacter propionicus*. *Arch. Microbiol.* 147:321

Schisler, D. O., Mabee, M. S., et Hahn, C. W. 1979. Rapid identification of important beer microorganisms using gas chromatography. *Am. Soc. Brew. Chem.* 37:69

Schleifer, K. H., Centeritz, M., Weiss, N., Ludwig, W., Kirchof, G., et Seidel-Rüfer, H. 1990. Taxonomic study of anaerobic, gram-negative, rod shaped bacteria from breweries : emended description of *Pectinatus cerevisiiphilus* and description of *Pectinatus frisingensis* sp. nov., *Selenomonas lactificifex* sp. nov., *Zymophilus raffinovorans* gen. nov., sp. nov. and *Zymophilus paucivorans* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 40:19

Scruggs, C. E., et Baselt, F. C. 1955. *Wallerstein Lab. Commun.* 18:159

Seidel, H. 1989. *Pectinatus* und andere morphologisch ähnliche gram-negative, anaerobe Stäbchen aus dem Brauereibereich. *Monatsschrift für Brauwissenschaft.* 11:428

Seidel, H. 1990. *Pectinatus* und andere morphologisch ähnliche gram-negative, anaerobe Stäbchen aus dem Brauereibereich. *Monatsschrift für Brauwissenschaft.* 3:101

Seidel, H., Back, W., et Weiss, N. 1979. Isolierung und systematische Zuordnung bierschädlicher gramnegativer Bakterien III: Welche Gefahr stellen die in den beiden vorausgegangenen Mitteilungen vorgestellten gramnegativen Kokken und Stäbchen für das Bier dar. *Brauwissenschaft.* 32:262

Senhaji, A. F. 1973. Protection des micro-organismes par les matières grasses au cours des traitements thermiques. Thèse de Docteur-Ingénieur, Université Paris VII.

Senhaji, A. F., et Loncin, M. 1977. The protective effect of fat on the heat resistance of bacteria. *J. Food. Technol.* 12:203

Shoolfields, R., Sharpe, P., et Magnuson, C. 1981. Non linear regression of biological temperature-dependant rate models based on absolute reaction rate theory. *J. Theor. Biol.* 88:719

Simpson, W. J. 1993. Studies on the sensitivity of lactic acid bacteria to hop bitter acids. *Journal of the Institute of Brewing*. 99:405

Skerman, V. R., Mc Gowan, D. V., et Sneath, P. H. A. 1980. Approved lists of bacterial names. *Int. J. syst. Bacteriol.* 30:341

Soberka, R., et Warzecha, A. 1986. Influence de certains facteurs sur le taux d'oxygène dissous au cours de la fabrication de la bière. *Bios* 17:31

Soberka, R., Sciazko, D., et Warzecha, A., 1988. *Pectinatus* : nouvelle bactérie pouvant affecter la stabilité biologique du moût et de la bière, 1re partie. *Bios*. 19:31

Soberka, R., Sciazko, D., et Warzecha, A., 1989. *Pectinatus* : nouvelle bactérie pouvant affecter la stabilité biologique du moût et de la bière, 2ème partie. *Bios*. 20:51

Sokal, R. R., et Rohlf, F. J. 1969. *Biometry, the Principles and Practice of Statistics*. Dans : *Biological Research*. (ed.) W. H. Freeman et Co., San Francisco.

Solberg, O., et Clausen, O. G. 1973. Classification of certain *Pediococci* isolated from brewery products. *J. Indt. Brew.* 79:227

Splittstoesser, D. F., Lienk, L. L., Wilkison, M., et Stamer, J. R. 1975. Influence of wine composition on the heat resistance of potential spoilage organisms. *App. Microbiol.* 30:369

Stewart, G. G., Russel, I., et Goring, T. 1975. Nature-nature anomalies- future studies in yeast flocculation. *J. Ame. Soc. Brew. Chem.* 33:137

Strandskov, F. B., Baker, H. W., et Bockelmann, J. B. 1953 A study of the Gramnegatigve bacterial rod infection of brewery yeast and brewery fermentation. *Wallerstein Lab. Commun.* 16:261

Stumbo, C. R. 1973. *Thermobacteriology*. Dans : *food processing*. (2ème édition). (ed), Acad. Press. New-York.

Sugiyama, H. 1951. Studies on factors affecting the heat resistance of spores of *Cl. Botulinum*. *J. Bacteriol.* 62:81

Suihko, M. L. et Haïkara, A. 1990. Maintenance of the anaerobic spoilage bacteria *Pectinatus* and *Megasphaera*. *Food Microbiol.* 7:33

Swick, R. W., et Wood, H. G. 1960. The role of transcarboxylation in propionic acid fermentation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 46:28

Takahashi, N. 1983. Presumed *Pectinatus* strain isolated from Japanese beer. *Bull. Brew. Sci.* 28:11

Tepper, P., Marc, L., Engasser, J. M., Moll, M., et Duteurtre, B. 1981. Kinetics of sugar and amino acid consumption, Yeast growth and ethanol production during beer fermentation.

Dans : Current developments in yeast research, (ed.) Stewart, G. C., Russel, I. Toronto, Pergamon Press. p:129

Tholozan, J. L., Delattre, G., Grivet, J. P., et Kubaczka. M. 1993a. Succinate pathway from glucose to propionate in *Pectinatus frisingensis* metabolism, a strictly anaerobic bacterium. Med. Fac. Landbouww. Univ. Gent, 58/4b. p:1891

Tholozan, J. L., Vallet, C., et Ronse, A. 1993b. Implications of sodium and potassium in *Pectinatus frisingensis* metabolism, a strictly anaerobic beer spoilage bacterium. Med. Fac. Landbouww. Univ. Gent, 58/4b. p:1895

Tholozan, J. L., Grivet, J. Ph., et Vallet, C. 1994. Metabolisme carboné et énergétique de *Pectinatus frisingensis*, Bactérie anaérobie stricte contaminant de la bière. SFM Nouvelles tendances en microbiologie anaérobie. Colloque mars. p:13

Thomas, M., Cole, J. A., et Hough, J. S. 1972. Biochemical physiology of *Obesumbacterium proteus*, a common brewery contaminant J. Inst. Brew. 78:332

Thompson, T. E., Conrad, R., et Zeikus, J. G. 1984. Regulation of carbon and electron flow in *Propionispira arboris* : physiological function of hydrogenase and its role in homopropionate formation. FEMS Microbiol. Lett. 22:265

Tsang, E. W. T., et Ingledew, W. M. 1982. Studies on the heat resistance of wild yeasts and bacteria in beer. Am. Soc. Brew. Chem. 40:1

Van Engel, E. L. 1971. *Pediococcus cerevisiae* in fermentation. Proc. Am. Soc. Brew. Chem. p:89

Van Huuren, H. J. J., Cosser, K., et Prior, B. A. 1980. The influence of *Enterobacter agglomerans* on beer flavour. J. Inst. Brew. 86:31

Van Vuuren, H. J. J., Kersters, K., de Ley, K., Toerien, D. F., et Meisel, R. 1978 *Enterobacter agglomerans* - a new contaminant isolated from lager beer breweries. J. Inst. Brew. 84:315

Wackerbauer, K., et Emeis, C. C. 1968 Über die bierschädlichen Bakterien der Gattung *Lactobacillus* (Biermilchsäurestäbchen). II. Physiologische Untersuchungen an Laaktobazillen. Mschr. Brau. 21:328

Wainwright, T. 1987 The low alcohol revolution. Brewer's Guardian. 116:16

Wallnöfer, P., et Baldwin, R. L. 1967. Pathway of propionate formation in *Bacteroides ruminicola*. J. Bacteriol. 93:504

Watier, D., Leguerinel, L., Hornez, J. P., et Dubourguier, H. C. 1993. Influence de facteurs physico-chimiques sur les cinétiques de croissance de *Pectinatus cerevisiophilus* et de *Megaspheera cerevisiae*. Sci. Aliments. 13:297

- Weiss, N., Seidel, H., et Back, W.** 1979. Isolierung und systematische Zuordnung bierschädlicher gramnegativer bakterien. I: Gramnegative strikt anaerobe Kokken. Brauwissenschaft. **32**:189
- Whiting, M., Crichlow, M., Ingledew, W. M., et Ziola, B.** 1992. Detection of *Pediococcus* spp. in brewing yeast by a rapid immunoassay. Appl. Environ. Microbiol. **2**:713
- Wilcox, I. C.** 1966. J. Inst. Brew. **72**:236
- Winnewisser, W., et Donhauser, S.** 1987. Enzymimmunttest zum Nachweis von *Pectinatus* in bier. Proc. 21st Congr. Eur. Brew. Conv. p:481
- Wood, B. J. B., et Rainbow, C.** 1961. The maltophosphorylase of beer *lactobacilli*. Biochem. J. **78**:204
- Zaika, L. L., Phillips, J. G., et Buchanan, R. L.** 1992. Model for Aerobic Growth of *Shigella flexneri* under various conditions of temperature, pH, sodium chloride and sodium nitrite concentrations. J. Food Prot. **7**:509
- Zweitering, M., H. I. Jongenburger, F. M. Rombouts, et K. Van'T Riet.** 1990. Modelling of the bacterial growth curve. Appl. Environ. Microbiol. **56**:1875

- Annexes -

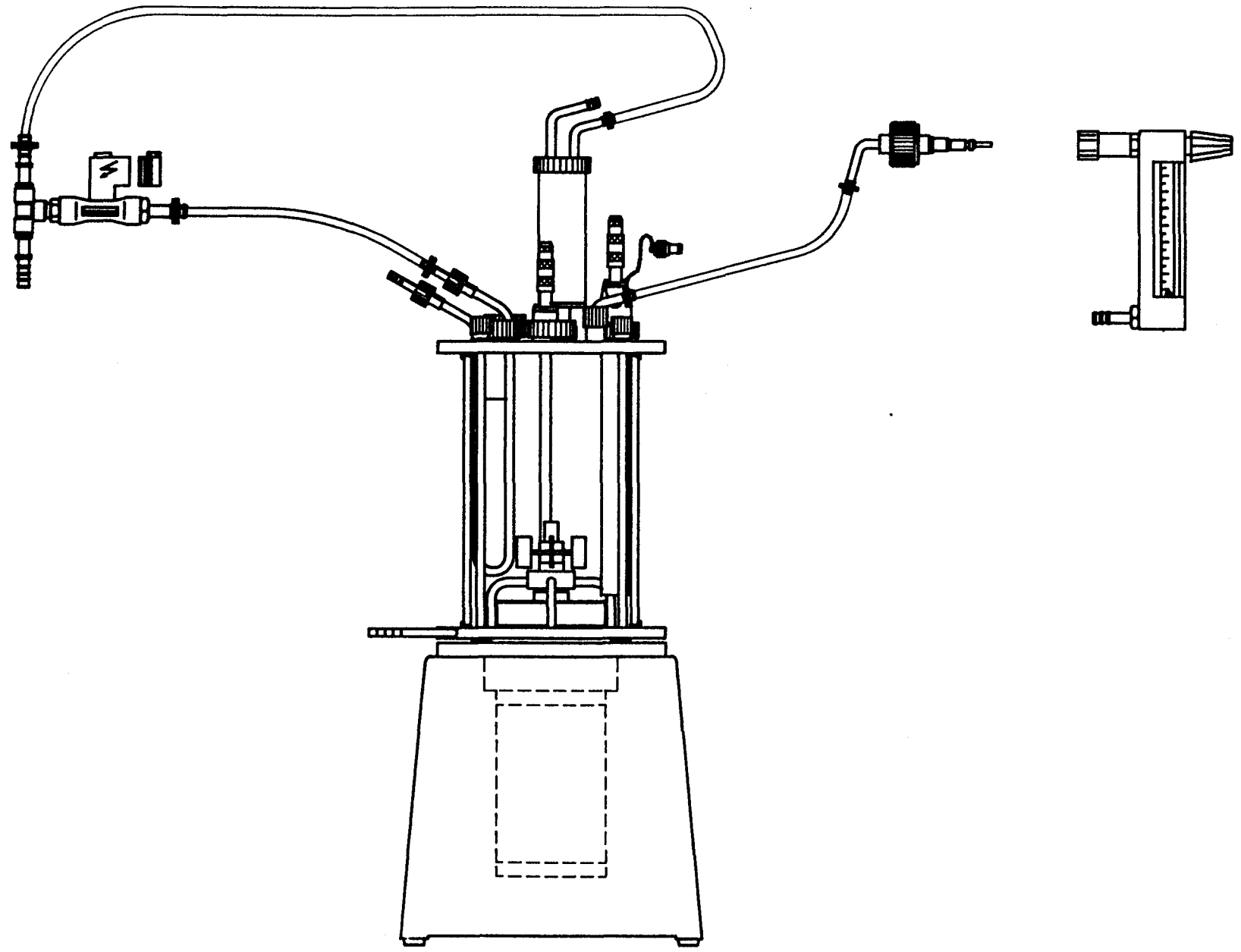
Annexe 1

°C	UP	°C	UP	°C	UP	°C	UP	°C	UP
46	0,01	53	0,1	60	1	67	10	74	100
46,5	0,012	53,5	0,12	60,5	1,2	67,5	12	74,5	120
47	0,014	54	0,14	61	1,4	68	14	75	140
47,5	0,016	54,5	0,16	61,5	1,6	68,5	16	75,5	160
48	0,019	55	0,19	62	1,9	69	19	76	190
48,5	0,023	55,5	0,23	62,5	2,3	69,5	23	76,5	230
49	0,027	56	0,27	63	2,7	70	27	77	270
49,5	0,032	56,5	0,32	63,5	3,2	70,5	32	77,5	320
50	0,037	57	0,37	64	3,7	71	37	78	370
50,5	0,045	57,5	0,45	64,5	4,5	71,5	45	78,5	450
51	0,052	58	0,52	65	5,2	72	52	79	520
51,5	0,062	58,5	0,62	65,5	6,2	72,5	62	79,5	620
52	0,072	59	0,72	66	7,2	73	72	80	720
52,5	0,086	59,5	0,86	66,5	8,6	73,5	86	80,5	860

Tableau de correspondance entre la température et les Unités de Pasteurisation.

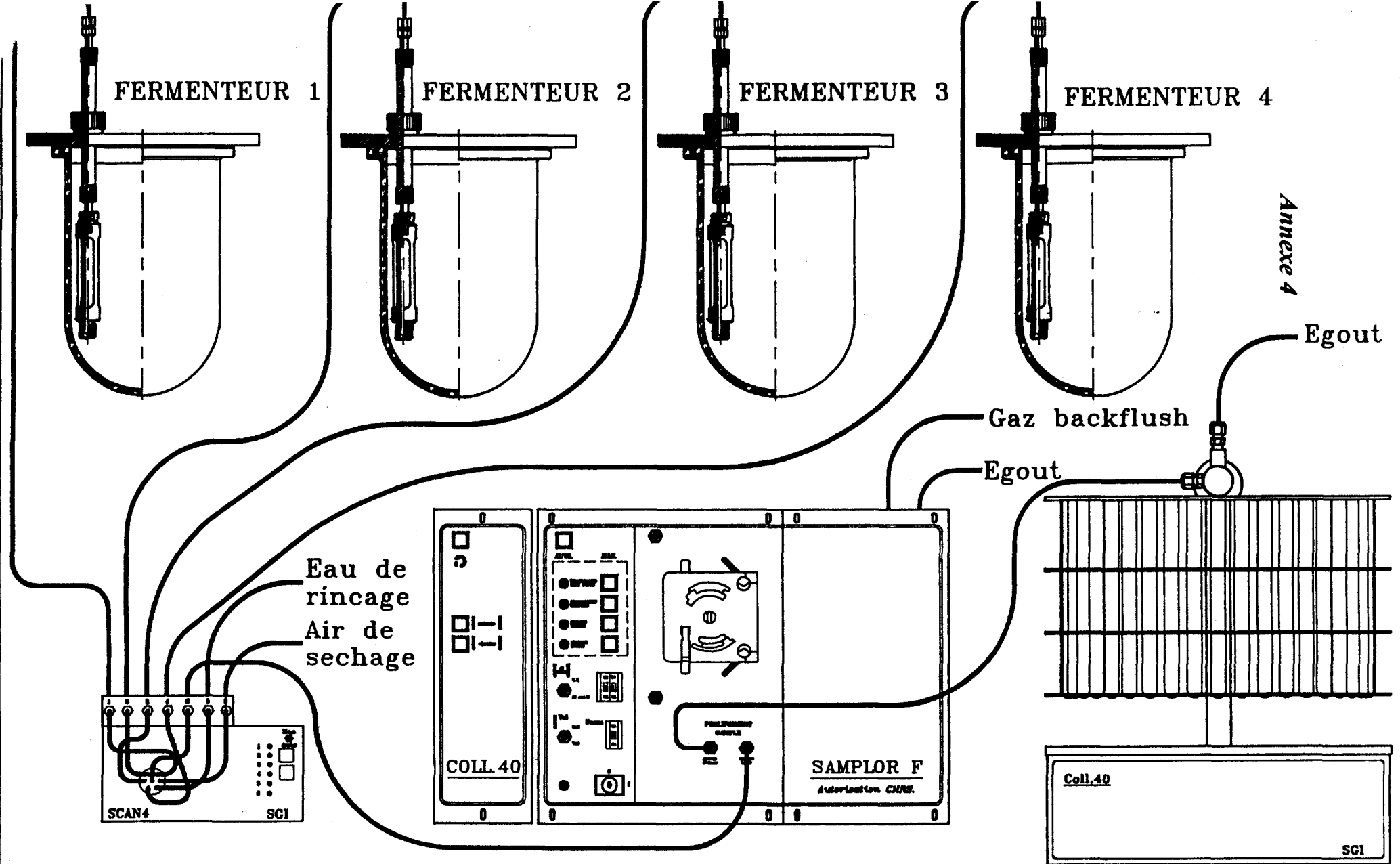
1566

Annexe 3



Ce document est la propriété de S.G.I. et ne peut être reproduit ou communiqué à un tiers sans son autorisation

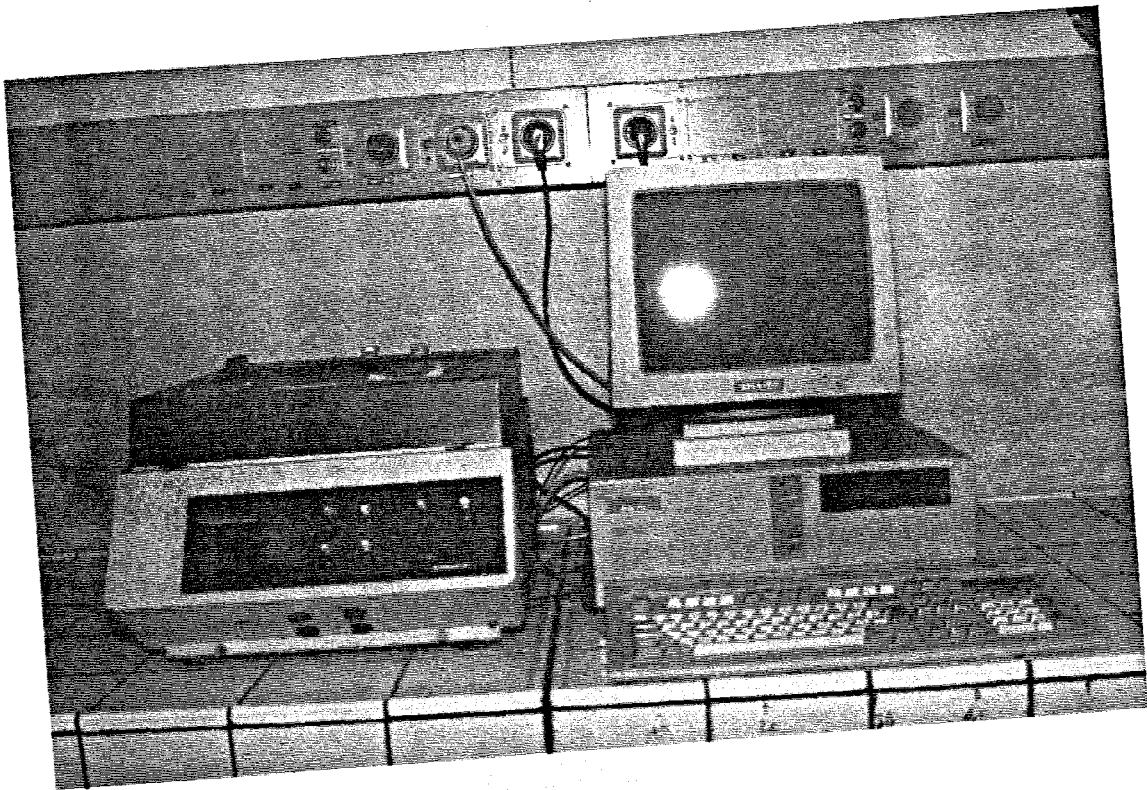
SGI	Setric Genie Industriel 15, allée de Bellefontaine 31100 Toulouse (France)	Tel: 61.40.85.85	Desg: SCHEMA N°5	Page: 1/1
		Fax: 61.41.51.78	Affaire: VERSION: N.U/SET002M/1/B	NPI: N0931817/A
			App: SET 2M	Date: 07/05/93 D. D.P



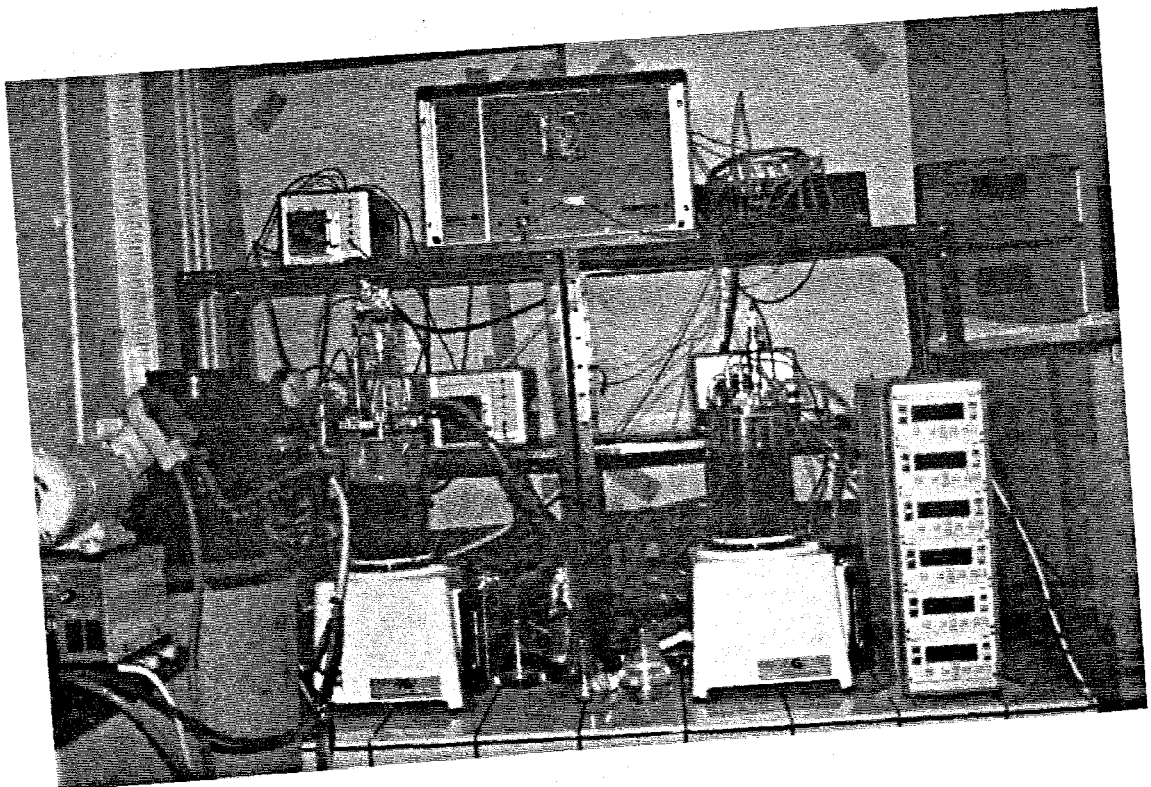
Ce document est la propriété de S.G.I et ne peut être reproduit ou communiqué à un tiers sans son autorisation

SGI	Setric Genie Industriel	Telex: 531 930F	Desg: VANNE MULTIVOIES	Page: 1/1
	15, allée de Bellefontaine	Tel: 61.40.85.85	Affaire: NOTICE	NPI: N0921804/A
	Adres: 31100 Toulouse (France)	Fax: 61.41.51.78	App: SAMPLOR.F	Date: 29/04/92 D.P: D.P

Annexe 2

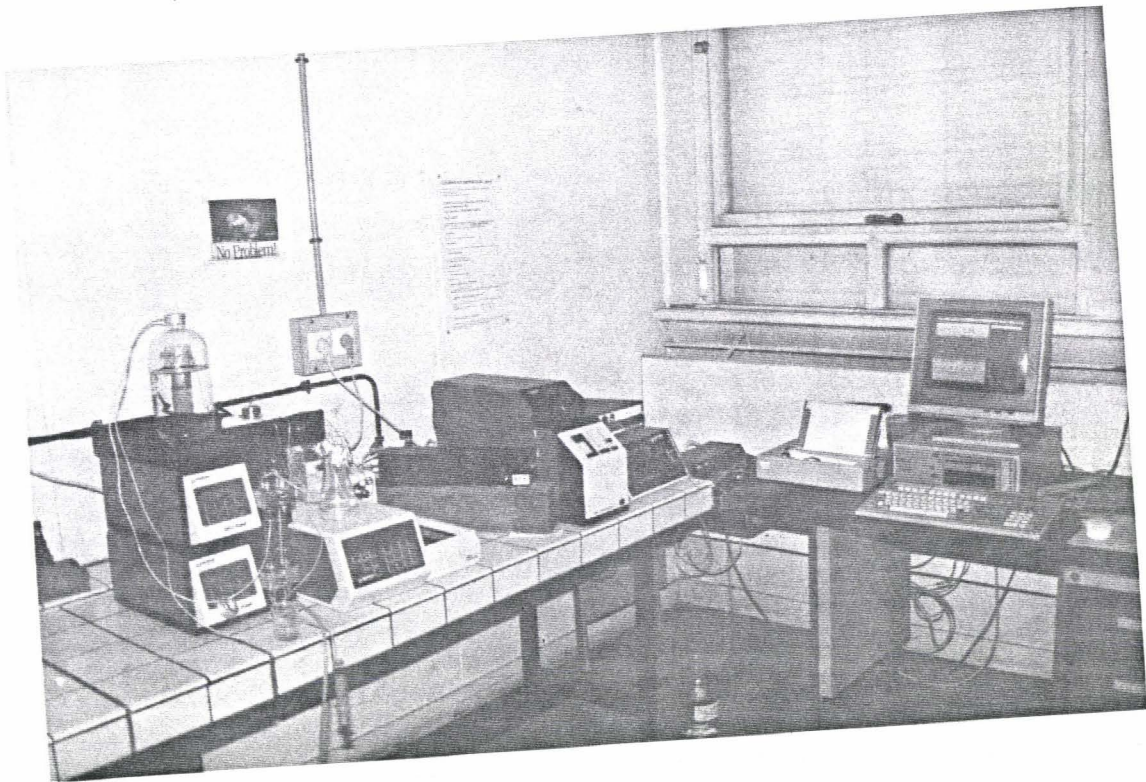


Biophotomètre S.L.E.L 01V. (Société Lilloise d'Équipement de Laboratoire)



Fermenteurs avec échantillonneur automatique Samplor-F, SGI

Annexe 2



Chaîne H.P.L.C Kontron 360

