

N° d'Ordre : 1 714

Jan 200 00021

50 576
1996
25

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

TCHANGO TCHANGO Jean
Docteur de 3ème Cycle

**QUALITE MICROBIOLOGIQUE DES JUS ET
NECTARS DE FRUITS EXOTIQUES
CROISSANCE ET THERMORESISTANCE
DES LEVURES D'ALTERATION**

Soutenue le 23 Février 1996, devant la Commission d'Examen :

Président : R. TAILLIEZ, Professeur (Lille I)

Rapporteurs : T. NJINE, Professeur (Yaoundé I)
J. BOHATIER, Professeur (Clermont-Ferrand I)

Examineurs : J.P. HORNEZ, Professeur (Lille I)
D. GUILLOCHON, Professeur (Lille I)
M. REYNES, Responsable UR CIRAD (Montpellier)

DEDICACE

*Mes très chères et dévouées épouses, **Généviève et Jacqueline**, mes enfants **Danielle Serbin, Arsène, Michel Florin, Marcelle, Stéphane, Adrien et Charlène**, ont particulièrement été moralement éprouvés par mes longs mois d'absence passés en France dans le cadre de cette Thèse dont les travaux très contraignants m'ont souvent obligé à passer de nombreuses nuits blanches au laboratoire pour le suivi des cinétiques de croissance microbienne.*

Je leur dédie spécialement ce mémoire.

*Que cette Thèse soit pour eux tous un motif de satisfaction totale, particulièrement aux épouses **TCHANGO** qui ont su, dans un contexte financier très difficile, assurer tout le poids des charges familiales pendant mon absence.*

REMERCIEMENTS

Ces travaux ont été réalisés sous la direction scientifique de Messieurs les Professeurs Thomas NJINE et Roger TAILLIEZ. Ils ont été effectués chronologiquement au Laboratoire de Technologie Alimentaire de la Station de l'Institut de la Recherche Agronomique (IRA) à Njombé, au Laboratoire de Biologie Générale de la Faculté des Sciences de l'Université de Yaoundé I, au Laboratoire de Bactériologie du Centre Pasteur de Yaoundé au Cameroun ainsi qu'au Laboratoire de Microbiologie Fondamentale et Appliquée de l'Université des Sciences et Technologies de Lille I (USTL) en France.

Ils rentrent dans le cadre des activités du Programme Technologie Alimentaire exécuté par l'IRA au Cameroun.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude et à remercier tout particulièrement Monsieur le Professeur Roger TAILLIEZ, Directeur du Laboratoire de Microbiologie Fondamentale et Appliquée de l'USTL qui a bien voulu m'accepter dans son laboratoire pour mon stage post-doctoral de recherches ayant permis de terminer mes travaux et de présenter cette Thèse de l'Université. Malgré ses multiples responsabilités et occupations, il a accepté de diriger mes travaux tout en m'apportant le soutien moral nécessaire pendant mon séjour en France. Il me fait l'honneur de présider le jury de cette Thèse.

Je suis heureux de pouvoir exprimer mes sentiments de très vive et sincère reconnaissance à Monsieur le Professeur Thomas NJINE du Laboratoire de Biologie Générale de l'Université de Yaoundé I, un des Rapporteurs de cette Thèse, qui, malgré son emploi du temps surchargé, a accepté de diriger la première phase des travaux de cette Thèse au Cameroun. Ses conseils bienveillants, ses encouragements incessants et son soutien moral et matériel m'ont toujours été précieux. Son dynamisme et son inlassable activité de chercheur resteront pour moi un exemple. Qu'il trouve ici l'expression de ma très profonde gratitude et de mon respectueux attachement.

Mes remerciements vont également à Monsieur Jean-Pierre HORNEZ du Laboratoire de Microbiologie Fondamentale et Appliquée de l'Université de Lille I qui a accepté volontier de participer à la correction de ce manuscrit. Ses remarques pertinentes ont été précieuses pour la qualité finale du présent document. Il me fait l'honneur d'être l'un des examinateurs dans le Jury de cette Thèse.

J'adresse mes vifs et sincères remerciements à Monsieur le Professeur Jacques BOHATIER de l'Université de Clermont-Ferrand I, Directeur URA CNRS 1944 - Protistologie, qui a spontanément accepté d'être l'un des Rapporteurs de cette Thèse.

Je demande à Monsieur le Professeur Didier GUILLOCHON de l'Université de Lille I qui me fait l'honneur de juger ce travail, d'accepter mes remerciements les plus chaleureux.

Monsieur Max REYNES, Responsable de l'Unité de Recherche de Technologie du Département des Productions Fruitières et Horticoles du Centre de Coopération Internationale en Recherche pour le Développement (CIRAD-FLHOR) de Montpellier, très habitué aux problèmes post-récoltes des fruits tropicaux, me fait l'honneur de participer au Jury de cette Thèse. Je lui adresse mes sincères remerciements.

Les travaux relatifs à cette Thèse n'auraient jamais été achevés sans la Bourse d'Excellence post-doctorale de l'Agence Francophone pour l'Enseignement Supérieur et la Recherche Scientifique (AUPELF-UREF) ayant permis la poursuite des travaux en France, ainsi que le soutien financier du Ministère de la Recherche Scientifique et Technique (MINREST) du Cameroun pour les crédits de fonctionnement mis à la disposition de mon laboratoire d'accueil.

Je tiens à témoigner toute ma reconnaissance et ma profonde gratitude à l'AUPELF-UREF pour cette action en faveur de l'Excellence Francophone qui aboutira, sans aucun doute, à la revalorisation de ma carrière scientifique et professionnelle.

J'adresse mes sincères remerciements à Monsieur le Professeur Joseph MBEDE, Ministre de la Recherche Scientifique et Technique du Cameroun, ainsi qu'à ses collaborateurs qui ont oeuvré pour m'apporter l'appui financier complémentaire indispensable à la réalisation de mon stage en France.

Grâce à une aide financière du CIRAD-FLHOR de Montpellier (France), mon laboratoire d'accueil a pu assurer l'organisation matérielle de la soutenance de cette Thèse. Je tiens à exprimer mon entière gratitude à ses Responsables, et plus particulièrement à Monsieur HUGON de la Direction Scientifique qui a beaucoup oeuvré pour ce dossier de financement.

Le Docteur Philippe EB, Maître de Conférences à l'Institut Agricole et Alimentaire (IAAL) de l'Université de Lille I, n'a ménagé aucun effort pour le suivi de mes travaux pendant le présent stage ainsi que pour la correction de ce manuscrit. Qu'il trouve ici l'expression de ma profonde gratitude.

La contribution du Docteur Denis WATIER, Maître de Conférences à l'Université du Littoral à Calais (France) pour la mise en route du plan d'expérience et les analyses statistiques relatives à la modélisation de croissance des levures a été hautement appréciée. Je lui exprime ici mes sincères remerciements et toute ma sympathie pour sa gentillesse et sa disponibilité.

La contribution de Madame Cathérine BISSUEL, Responsable du Service d'Aide au Diagnostic de Biomérieux à la Balme-les-Grottes (France), pour l'identification complète de nos souches de levures a été déterminante pour l'avancement de ces travaux. Qu'elle trouve ici l'expression de mes sincères remerciements.

Monsieur Michel FOYET, Chargé de Recherches à l'IRA, pionnier du Programme Technologie Alimentaire de l'Institut de la Recherche Agronomique du Cameroun en 1967 et Chef dudit Programme, aujourd'hui Conseiller Technique au MINREST, a été l'initiateur de ce thème de recherche au sein du programme. Le soutien moral et matériel qu'il n'a cessé de m'apporter depuis mon arrivée dans son laboratoire en 1983, ses encouragements sans cesse renouvelés resteront pour moi un souvenir inoubliable. Ses conseils de doyen m'ont permis de m'orienter en Microbiologie Alimentaire qui porte aujourd'hui ses fruits aux termes d'un travail extrêmement laborieux mais également très passionnant pendant cette dernière phase des recherches à Lille. Que l'aboutissement de cette Thèse soit pour lui un motif de fierté et de satisfaction personnelle. Je lui exprime du fond du coeur ma profonde gratitude et ma sincère reconnaissance.

L'ancien Ministre de la Recherche Scientifique et Technique du Cameroun, le Docteur Jacob AYUK-TAKEM, Maître de Recherches et Directeur de l'IRA, n'a jamais ménagé d'efforts pour la formation scientifique de haut niveau et l'efficacité des chercheurs de son Institut. Qu'il trouve ici l'expression de mes sincères remerciements et de ma profonde gratitude.

Les conseils scientifiques constructifs du Docteur Joseph Antoine NGALANI, Maître de Recherches au Programme Technologie Alimentaire de l'IRA et Chef de Centre Régional Bananiers et Plantains (CRBP) de Njombé au Cameroun ont été très bénéfiques dans le cadre des travaux de cette Thèse. Je lui exprime mes vifs remerciements et lui renouvelle toute ma sympathie.

Au Laboratoire de Bactériologie du Centre Pasteur de Yaoundé, j'ai bénéficié, pendant la phase des travaux réalisés au Cameroun, de l'expérience en Microbiologie, de la constante disponibilité et de la sympathie du Docteur Marguerite WOUAFO-NDAYO et de son équipe. Qu'elle trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance et de mes sincères remerciements.

Je tiens à associer tous mes collaborateurs et collègues du Laboratoire de Technologie Alimentaire de Njombé et du Laboratoire de Microbiologie Fondamentale et Appliquée de Lille I, en particulier Docteur Valérie LECLERE, Maître de Conférences et Monsieur Max BECHET, Ingénieurs d'Etudes, tous de Lille I, et Messieurs BABAGNAK et Sévérin NGANKOUM de Njombé, pour leur sympathie et leur disponibilité permanente. Je leur adresse mes vifs remerciements.

Enfin, des amis et connaissances m'ont beaucoup soutenu pendant mon séjour en France, en particulier Monsieur et Madame NSOTA BANGO au Mans, Monsieur et Madame TETANG à Paris, Monsieur et Madame BEBEY à Roubaix, Mademoiselle Rosine Prunelle DEUMAGA à Tourcoing, Monsieur et Madame KOUAKAM TAKOUGANG à Loos, Monsieur et Madame YOSSI à Saint-Pol-sur-mer. Je leur adresse mes sincères remerciements et leur renouvelle toute mon amitié et ma sympathie.

J. TCHANGO TCHANGO
Chargé de Recherches à l'IRA

QUALITE MICROBIOLOGIQUE DES JUS ET NECTARS DE FRUITS EXOTIQUES. CROISSANCE ET THERMORESISTANCE DES LEVURES D'ALTERATION.

RESUME

Les analyses microbiologiques des boissons produites en laboratoire révèlent que le jus d'ananas et les nectars de goyave, de grenadille et de pomélo surgelés en sachets plastiques sans pasteurisation préalable, hébergent de nombreux micro-organismes d'altération dont des levures (*Candida guilliermondii* et *Saccharomyces cerevisiae* en particulier), des coliformes totaux, des Staphylocoques non pathogènes et d'autres bactéries appartenant aux genres *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Leuconostoc*, *Micrococcus*, *Pediococcus* et *Acinetobacter*. Le jus d'ananas plus riche en sucres fermentescibles et ayant un pH relativement plus élevé héberge en plus des coliformes thermotolérants (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter agglomerans* et *Serratia rubidaea*). La pasteurisation des ces boissons par actinisation à 92°C (nectar de grenadille) ou à 94°C (jus d'ananas, nectars de goyave et de pomélo) pendant 10 secondes après une désaération à 80°C pendant environ 10 min améliore nettement leurs qualités microbiologiques sans altérer significativement leurs qualités organoleptiques.

L'étude des effets combinés des températures de stockage (2°C à 37°C) et des variations de pH (2,00 à 6,25) sur la croissance de *Candida pelliculosa*, *Candida holmii* et *Kloeckera apis*, levures d'altération isolées des jus d'ananas et des nectars de goyave et de grenadille pasteurisés produits en industrie, a permis de développer par régression linéaire multiple, des modèles mathématiques multifactoriels prédictifs de la croissance de ces micro-organismes dans le nectar de goyave et le jus d'ananas. Certains de ces modèles sont validés aussi bien pour la croissance de ces différentes souches de levures dans le jus d'ananas et le nectar de goyave, que pour leur croissance dans les autres jus et nectars de fruits (grenadille, pomélo, orange, pomme, raisin).

Candida pelliculosa semble être le micro-organisme le plus thermorésistant des trois espèces de levures étudiées. Les valeurs de z déterminées entre 60°C et 75°C pour *C. pelliculosa* sont de 31,75°C ($r^2=0,91$) dans le jus d'ananas et 27,70°C ($r^2=0,90$) dans le nectar de grenadille. Cette valeur de z déterminée entre 60°C et 70°C est de 34,84°C ($r^2=0,998$) dans le nectar de goyave. Les valeurs de z déterminées entre 55°C et 60°C pour *Kloeckera apis* sont de 21,88°C ($r^2=0,97$) dans le jus d'ananas, 22,73°C ($r^2=0,99$) dans le nectar de goyave et 29,07°C ($r^2=0,999$) dans le nectar de grenadille. En considérant 75°C comme température de référence pour la pasteurisation de ces boissons, et une efficacité de pasteurisation ($\log N_0/N$) de 9, les durées de traitement thermique nécessaires à 80°C et 94°C, températures de désaération et de flash pasteurisation au niveau industriel, sont respectivement de 9,39 min et 3,40 min dans le jus d'ananas, 5,94 min et 1,91 min dans le nectar de grenadille.

Mots clés: Jus et nectars de fruits exotiques, qualités microbiologiques et organoleptiques, coliformes thermotolérants, bactéries et levures d'altération, croissance, thermorésistance, pasteurisation.

MICROBIOLOGICAL QUALITY OF EXOTIC FRUIT JUICES AND NECTARS. GROWTH AND HEAT RESISTANCE OF SPOILAGE YEASTS.

ABSTRACT

Microbiological detections carried out on beverages produced in laboratory proved that deep-frozen pineapple juice, guava, passion-fruit and grapefruit nectars without previous pasteurization contained many spoilage micro-organisms such as yeasts (*Candida guilliermondii* et *Saccharomyces cerevisiae*, in particular), coliforms, non pathogenic *Staphylococcus* and members of *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Leuconostoc*, *Micrococcus*, *Pediococcus* and *Acinetobacter*. Only pineapple juice with higher content of available sugars and with relatively high pH contained thermotolerant coliforms such as *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter agglomerans* and *Serratia rubidaea*. Pasteurization of these beverages by actinisation at 92°C (passion-fruit nectar) or at 94°C (pineapple juice, guava and grapefruit nectars) for 10 seconds after deaeration at 80°C for 10 min clearly improved their microbiological qualities without significant changes on their organoleptic qualities.

Multifactorial mathematical models predicting the growth of the yeasts in guava nectar and pineapple juice were built by multiple linear regression from the combined effects of temperatures (2°C to 37°C) and pH (2,00 to 6,25) on the growth of *Candida pelliculosa*, *Candida holmii* and *Kloeckera apis*, spoilage yeasts isolated from pasteurized pineapple juice, guava and passion-fruit nectars produced at the industrial level. Some of the models constructed were validated for the growth of these yeasts in pineapple juice and guava nectar, and for their growth in others fruit juices and nectars such as commercial passion-fruit and grapefruit nectars, orange, apple and grape juices.

Candida pelliculosa seems to be the more heat-resistant of the three yeasts studied. z-values determined between 60°C and 75°C for *Candida pelliculosa* were 31.75°C ($r^2=0.91$) in pineapple juice and 27.70°C ($r^2=0.90$) in passion-fruit nectar, and between 60°C and 70°C, z-value was 34.84°C ($r^2=0.998$) for guava nectar. z-values obtained between 55°C and 60°C for *Kloeckera apis* were 21.88°C ($r^2=0.97$) in pineapple juice, 22.73°C ($r^2=0.99$) in guava nectar and 29.07°C ($r^2=0.999$) in passion-fruit nectar. Considering 75°C as reference temperature for the pasteurization of these beverages, and the pasteurization efficiency ($\log N_0/N$) of 9, the times of heat treatment required at 80°C and 94°C (deaeration and flash-pasteurization temperatures at the industrial level), were respectively 9.39 min and 3.40 min for pineapple juice, 5.94 min and 1.91 min for passion-fruit nectar.

Key words: Exotic fruits juices and nectars, microbiological and organoleptic qualities, thermotolerant coliforms, spoilage yeasts and bacteria, growth, heat-resistant, pasteurization.

Publications se rapportant à ce travail

Articles scientifiques

TCHANGO-TCHANGO J.; NJINE T.; TAILLIEZ R. Qualité microbiologique de jus et nectars de fruits exotiques. *Microbiol. Alim. Nutr.*, 1992, 10: 199-206.

TCHANGO-TCHANGO J.; NJINE T.; TAILLIEZ R. Effet de la pasteurisation sur les qualités sensorielles des jus et nectars de fruits exotiques. *Microbiol. Alim. Nutr.*, 1993, 11: 151-156.

TCHANGO-TCHANGO J.; WATIER D.; EB P.; TAILLIEZ R.; NJINE T.; HORNEZ J.P. Modeling growth for predicting the contamination level of guava nectar by *Candida pelliculosa* under different conditions of pH and storage temperature. *J. Indust. Microbiol.*, 1995 (soumise).

TCHANGO-TCHANGO J.; WATIER D.; EB P.; TAILLIEZ R.; NJINE T.; HORNEZ J.P. Prédiction des risques de développement des levures d'altération dans les jus et nectars de fruits exotiques: cas de *Kloeckera apis* dans le nectar de goyave. *Sci. Alim.*, 1996 (soumise).

TCHANGO-TCHANGO J.; TAILLIEZ R.; EB P.; NJINE T. Heat resistance of spoilage yeasts and pasteurization of tropical fruit juices and nectars. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1996 (soumise).

Communication scientifique

TCHANGO-TCHANGO J.; WATIER D.; EB P.; TAILLIEZ R.; NJINE T.; HORNEZ J.P. Modélisation de la croissance de *Candida pelliculosa* dans le nectar de goyave en fonction de la température de stockage et de la variation de pH. Poster présenté aux "Deuxièmes Journées d'Études sur le Contrôle Microbiologique de Denrées Alimentaires: Aspects pragmatiques - Progrès en méthodologie analytique", Paris, 9-10 Novembre 1995.

Liste des tableaux

<u>Tableau 1</u> : Schéma du procédé de fabrication du jus d'ananas (<i>Ananas comosus</i>) mis au point à la Station IRA de Njombé au Cameroun.	8
<u>Tableau 2</u> : Schéma du procédé de fabrication des nectars de goyave (<i>Psidium guajava</i>), de grenadille (<i>Passiflora edulis</i> Var. <i>flavicarpa</i>) et de pomelo (<i>Citrus paradisi</i>) mis au point à la Station IRA de Njombé au Cameroun..	9
<u>Tableau 3</u> : Composition chimique du jus d'ananas (<i>Ananas comosus</i> (L.) Merr.) en conserve, du jus pulpeux de grenadille (<i>Passiflora edulis</i> Sims Var. <i>edulis</i>) frais et de la pulpe de goyave (<i>Psidium guajava</i> L.).	10
<u>Tableau 4</u> : Composition chimique des jus en conserve de citron, d'orange, de pomélo, de mangue et des pulpes de bananes douces, de pomme cannelle, de pomme de cythère, de raisin de corinthe et du ramboutan.	11
<u>Tableau 5</u> : Classification des levures dans les Eumycètes.	25
Tableau 6: Classification des levures Ascosporogènes.	25
Tableau 7: Classification des levures Basidiosporogènes.	26
Tableau 8: Classification des levures imparfaites.	26
<u>Tableau 9a</u> : Caractéristiques biochimiques d'identification de <i>Candida pelliculosa</i> , <i>Candida holmii</i> et <i>Kloeckera apis</i> sur galeries API 20C AUX.	79
<u>Tableau 9b</u> : Caractéristiques biochimiques d'identification de <i>Candida pelliculosa</i> , <i>Candida holmii</i> et <i>Kloeckera apis</i> sur galeries ID 32C.	80
<u>Tableau 9c</u> : Aspects macroscopiques et microscopiques des colonies de <i>Candida pelliculosa</i> , <i>Candida holmii</i> et <i>Kloeckera apis</i> isolées des jus et nectars de fruits exotiques.	81

<u>Tableau 10</u> : Données utilisées pour l'établissement de l'équation et de la courbe d'étalonnage de la croissance de <i>Candida pelliculosa</i> dans le nectar de goyave commercial (pH 3,15).	92
<u>Tableau 11</u> : Données utilisées pour la construction de l'histogramme à 3 dimensions illustrant la croissance de <i>Candida pelliculosa</i> dans le nectar de goyave à différents pH et températures de stockage (moyenne de 2 répétitions).	98
<u>Tableau 12</u> : Données de validation du modèle de croissance de <i>Candida pelliculosa</i> dans le nectar de goyave par la croissance de la levure dans le nectar de goyave commercial (pH 3,15).	101
<u>Tableau 13</u> : Données utilisées pour l'établissement de l'équation d'étalonnage de la croissance de <i>Candida holmii</i> dans le jus d'ananas (pH 3,95) et le nectar de goyave (pH 3,15).	103
<u>Tableau 14</u> : Données utilisées pour la construction de l'histogramme à 3 dimensions illustrant la croissance de <i>Candida holmii</i> dans le jus d'ananas à différents pH et températures de stockage (moyenne de 2 répétitions).	110
<u>Tableau 15</u> : Données utilisées pour la construction de l'histogramme à 3 dimensions illustrant la croissance de <i>Candida holmii</i> dans le nectar de goyave à différents pH et températures de stockage (moyenne de 2 répétitions).	110
<u>Tableau 16</u> : Validation des modèles de croissance de <i>Candida holmii</i> dans le jus d'ananas et dans le nectar de goyave par la croissance respective de la levure dans les 2 boissons stockées à différentes températures.	114
<u>Tableau 17</u> : Données utilisées pour l'établissement de l'équation et de la courbe d'étalonnage de la croissance de <i>Kloeckera apis</i> dans le nectar de goyave commercial (pH 3,15).	115
<u>Tableau 18</u> : Données utilisées pour la construction de l'histogramme à 3 dimensions illustrant la croissance de <i>Kloeckera apis</i> dans le nectar de goyave à différents pH et températures de stockage (moyenne de 2 répétitions).	120

<u>Tableau 19</u> : Données de validation du modèle de croissance de <i>Kloeckera apis</i> dans le nectar de goyave par la croissance de la levure dans le nectar de goyave commercial (pH 3,15).	123
<u>Tableau 20</u> : Taux maximal de croissance, μ_{\max} (h^{-1}) et temps de génération, G (h) de <i>Candida pelliculosa</i> , <i>Candida holmii</i> et <i>Kloeckera apis</i> dans le jus d'ananas, le nectar de goyave et le nectar de grenadille à 25°C et 32°C.	133
<u>Tableau 21</u> : Non validation dans les autres boissons des modèles construits pour le nectar de goyave.	126
<u>Tableau 22</u> : Validation des différents modèles mathématiques contruits par la croissance des 3 souches de levures dans le nectar de goyave commercial (pH 3,15).	127
<u>Figure 23</u> : Validation du modèle de croissance de <i>Candida holmii</i> dans le jus d'ananas par la croissance de <i>Candida pelliculosa</i> et <i>Kloeckera apis</i> dans les autres jus et nectars de fruits.	128
<u>Tableau 24</u> : Destruction thermique de <i>Candida pelliculosa</i> et <i>Candida holmii</i> dans différents milieux à 60°C et 65°C.	147
<u>Tableau 25</u> : Valeurs de D_{60} dans différents milieux des espèces de levures, <i>Candida pelliculosa</i> et <i>Candida holmii</i> isolées des jus et nectars de fruits exotiques (t représente le temps de traitement thermique en secondes).	148
<u>Tableau 26</u> : Valeurs de D_T de <i>Candida pelliculosa</i> et <i>Kloeckera apis</i> dans le jus d'ananas commercial (pH 3,95), le nectar de grenadille commercial (pH 3,03), le nectar de goyave commercial (pH 3,15) et le tampon tartrate 0,01 M (pH 2,65) (t représente le temps de traitement thermique en secondes).	150
<u>Tableau 27</u> : Destruction thermique de <i>Candida pelliculosa</i> et <i>Kloeckera apis</i> dans différents milieux à différentes températures.	151
<u>Tableau 28</u> : Valeurs pasteurisatrices minimales $P^z_{Tréf.}$ déterminées dans le jus d'ananas, le nectar de goyave et le nectar de grenadille, à appliquer à 60°C, 65°C, 70°C et 75°C.	156

Tableau 29: Temps équivalent à 80°C et à 94°C pour la pasteurisation du jus d'ananas, du nectar de goyave et du nectar de grenadille en considérant 70°C et 75°C respectivement comme température de référence pour la pasteurisation de ces boissons, et une efficacité de pasteurisation ($\log N_0/N$) de 9 pour *Candida pelliculosa*.

Liste des figures

- Figure 1: Exemple de cinétique microbienne. 31
- Figure 2: Exemple de cinétique d'utilisation d'un substrat et de formation d'un produit par rapport à la croissance. 34
- Figure 3: Allure de la destruction d'une population microbienne en fonction du temps, pour une température létale et constante. 48
- Figure 4: Courbes de survie à la même température montrant l'influence du temps de traitement thermique sur le nombre de cellules microbiennes survivantes. 49
- Figure 5: courbes de survie à différentes températures 51
- Figure 6: Courbe des relations température-temps donnant une réduction de population microbienne. 52
- Figure 7: Exemples de déviations de courbes de survie. 57
- Figure 8: Schéma du dispositif pour l'obtention du filtrat de jus et de nectar de fruit. 67
- Figure 9: Photos des souches de *Candida pelliculosa*, *Candida holmii* et *Kloeckera apis* dans le jus d'ananas (pH 3,95) et le nectar de goyave (pH 3,15) après incubation à 32°C pendant 48 heures, grossissement x400. 82
- Figure 10: Courbe d'étalonnage de la croissance de *Candida pelliculosa* dans le nectar de goyave commercial (pH 3,15). 92
- Figure 11: Courbes de croissance de *Candida pelliculosa* dans le nectar de goyave à 2°C différentes valeurs de pH. 93
- Figure 12: Courbes de croissance de *Candida pelliculosa* à dans le nectar de goyave à 5°C à différentes valeurs de pH. 93
- Figure 13: Courbes de croissance de *Candida pelliculosa* dans le nectar de goyave à 10°C à différentes valeurs de pH. 94

<u>Figure 14</u> : Courbes de croissance de <i>Candida pelliculosa</i> à dans le nectar de goyave à 15°C à différentes valeurs de pH.	94
<u>Figure 15</u> : Courbes de croissance de <i>Candida pelliculosa</i> dans le nectar de goyave à 25°C à différentes valeurs de pH.	94
<u>Figure 16</u> : Courbes de croissance de <i>Candida pelliculosa</i> à dans le nectar de goyave à 32°C à différentes valeurs de pH.	94
<u>Figure 17</u> : Courbes de croissance de <i>Candida pelliculosa</i> dans le nectar de goyave à 35°C à différentes valeurs de pH.	95
<u>Figure 18</u> : Courbes de croissance de <i>Candida pelliculosa</i> à dans le nectar de goyave à 37°C à différentes valeurs de pH	95
<u>Figure 19</u> : Courbes de croissance de <i>Candida pelliculosa</i> dans le nectar de goyave à 39°C à différentes valeurs de pH.	95
<u>Figure 20</u> : Courbes de croissance de <i>Candida pelliculosa</i> à dans le nectar de goyave à 46°C à différentes valeurs de pH.	95
<u>Figure 21</u> : Courbes de croissance de <i>Candida pelliculosa</i> à 25°C dans les jus d'ananas, d'orange, de pamplemousse ou pomelo, de pomme , de raisin et dans le nectar de grena dille commerciaux.	96
<u>Figure 22</u> : Courbes de croissance de <i>Candida pelliculosa</i> à 32°C dans les jus d'ananas, d'orange, de pamplemousse ou pomelo, de pomme , de raisin et dans le nectar de grena dille commerciaux.	96
<u>Figure 23</u> : Courbes de croissance de <i>Candida pelliculosa</i> à 35°C dans les jus d'ananas, d'orange, de pamplemousse ou pomelo, de pomme, de raisin et dans le nectar de grena dille commerciaux.	96
<u>Figure 24</u> : Courbes de croissance de <i>Candida pelliculosa</i> à 37°C dans les jus d'ananas, d'orange, de pamplemousse ou pomelo, de pomme, de raisin et dans le nectar de grena dille commerciaux.	96
<u>Figure 25</u> : Histogramme à 3 dimensions illustrant la croissance de <i>Candida pelliculosa</i> dans le nectar de goyave en fonction des variations de pH et des températures de stockage.	97

<u>Figure 26</u> : Courbes modélisées de la croissance de <i>Candida pelliculosa</i> dans le nectar de goyave en fonction des variations de pH et des températures de stockage.	100
<u>Figure 27</u> : Ajustement des valeurs expérimentales et des valeurs prédites par le modèle de croissance de <i>Candida pelliculosa</i> dans le nectar de goyave.	100
<u>Figure 28</u> : validation du modèle de croissance de <i>Candida pelliculosa</i> dans le nectar de goyave par la croissance de la levure dans le nectar de goyave commercial.	101
<u>Figure 29a</u> : Courbe d'étalonnage de la croissance de <i>Candida holmii</i> dans le jus d'ananas commercial.	102
<u>Figure 29b</u> : Droite d'étalonnage de la croissance de <i>Candida holmii</i> dans le nectar de goyave commercial.	102
<u>Figure 30a</u> : Courbes de croissance de <i>Candida holmii</i> dans le jus d'ananas à 2°C à différentes valeurs de pH.	104
<u>Figure 30b</u> : Courbes de croissance de <i>Candida holmii</i> dans le nectar de goyave à 2°C à différentes valeurs de pH.	104
<u>Figure 31a</u> : Courbes de croissance de <i>Candida holmii</i> dans le jus d'ananas à 5°C à différentes valeurs de pH.	104
<u>Figure 31b</u> : Courbes de croissance de <i>Candida holmii</i> dans le nectar de goyave à 5°C à différentes valeurs de pH.	104
<u>Figure 32a</u> : Courbes de croissance de <i>Candida holmii</i> dans le jus d'ananas 10°C à différentes valeurs de pH.	105
<u>Figure 32b</u> : Courbes de croissance de <i>Candida holmii</i> dans le nectar de goyave à 10°C à différentes valeurs de pH.	105
<u>Figure 33a</u> : Courbes de croissance de <i>Candida holmii</i> dans le nectar de goyave à 15°C à différentes valeurs de pH.	105
<u>Figure 33b</u> : Courbes de croissance de <i>Candida holmii</i> dans le nectar de goyave à 15°C à différentes valeurs de pH.	105

<u>Figure 34a</u> : Courbes de croissance de <i>Candida holmii</i> dans le nectar de goyave à 25°C à différentes valeurs de pH.	106
<u>Figure 34b</u> : Courbes de croissance de <i>Candida holmii</i> dans le nectar de goyave à 25°C à différentes valeurs de pH.	106
<u>Figure 35a</u> : Courbes de croissance de <i>Candida holmii</i> dans le nectar de goyave à 32°C à différentes valeurs de pH.	106
<u>Figure 35b</u> : Courbes de croissance de <i>Candida holmii</i> dans le nectar de goyave à 32°C à différentes valeurs de pH.	106
<u>Figure 36a</u> : Courbes de croissance de <i>Candida holmii</i> dans le nectar de goyave à 35°C à différentes valeurs de pH.	107
<u>Figure 36b</u> : Courbes de croissance de <i>Candida holmii</i> dans le nectar de goyave à 35°C à différentes valeurs de pH.	107
<u>Figure 37a</u> : Courbes de croissance de <i>Candida holmii</i> dans le nectar de goyave à 37°C à différentes valeurs de pH.	107
<u>Figure 37b</u> : Courbes de croissance de <i>Candida holmii</i> dans le nectar de goyave à 37°C à différentes valeurs de pH.	107
<u>Figure 38a</u> : Courbes de croissance de <i>Candida holmii</i> dans le nectar de goyave à 39°C à différentes valeurs de pH.	108
<u>Figure 38b</u> : Courbes de croissance de <i>Candida holmii</i> dans le nectar de goyave à 39°C à différentes valeurs de pH.	108
<u>Figure 39</u> : Courbes de croissance de <i>Candida holmii</i> dans le nectar de grenadille commercial.	108
<u>Figure 40a</u> : Histogramme à 3 dimensions illustrant la croissance de <i>Candida holmii</i> dans le jus d'ananas en fonction des variations de pH et des températures de stockage.	109
<u>Figure 40b</u> : Histogramme à 3 dimensions illustrant la croissance de <i>Candida holmii</i> dans le nectar de goyave en fonction des variations de pH et des températures de stockage.	109

<u>Figure 41a</u> : Courbes modélisées de la croissance de <i>Candida holmii</i> dans le jus d'ananas en fonction des variations de pH et des températures de stockage.	112
<u>Figure 41b</u> : Courbes modélisées de la croissance de <i>Candida holmii</i> dans le nectar de goyave en fonction des variations de pH et des températures de stockage.	112
<u>Figure 42a</u> : Ajustement des valeurs expérimentales et des valeurs prédites par le modèle de croissance de <i>Candida holmii</i> dans le jus d'ananas.	112
<u>Figure 42b</u> : Ajustement des valeurs expérimentales et des valeurs prédites par le modèle de croissance de <i>Candida holmii</i> dans le nectar de goyave.	113
<u>Figure 43a</u> : validation du modèle de croissance de <i>Candida holmii</i> dans le jus d'ananas par la croissance de <i>Candida holmii</i> dans le jus d'ananas commercial.	114
<u>Figure 43b</u> : validation du modèle de croissance de <i>Candida holmii</i> dans le nectar de goyave par la croissance de <i>Candida holmii</i> dans le nectar de goyave commercial.	114
<u>Figure 44</u> : Droite d'étalonnage de la croissance de <i>Kloeckera apis</i> dans le nectar de goyave commercial.	115
<u>Figure 45</u> : Courbes de croissance de <i>Kloeckera apis</i> dans le nectar de goyave à 2°C à différentes valeurs de pH.	116
<u>Figure 46</u> : Courbes de croissance de <i>Kloeckera apis</i> dans le nectar de goyave à 5°C à différentes valeurs de pH.	116
<u>Figure 47</u> : Courbes de croissance de <i>Kloeckera apis</i> dans le nectar de goyave à 10°C à différentes valeurs de pH.	116
<u>Figure 48</u> : Courbes de croissance de <i>Kloeckera apis</i> dans le nectar de goyave à 15°C à différentes valeurs de pH.	116
<u>Figure 49</u> : Courbes de croissance de <i>Kloeckera apis</i> dans le nectar de goyave à 25°C à différentes valeurs de pH.	117

<u>Figure 50</u> : Courbes de croissance de <i>Kloeckera apis</i> dans le nectar de goyave à 32°C à différentes valeurs de pH.	117
<u>Figure 51</u> : Courbes de croissance de <i>Kloeckera apis</i> dans le nectar de goyave à 35°C à différentes valeurs de pH.	117
<u>Figure 52</u> : Courbes de croissance de <i>Kloeckera apis</i> dans le nectar de goyave à 39°C à différentes valeurs de pH.	117
<u>Figure 53</u> : Courbes de croissance de <i>Kloeckera apis</i> dans le nectar de goyave à 39°C à différentes valeurs de pH.	118
<u>Figure 54</u> : Courbes de croissance de <i>Kloeckera apis</i> dans le nectar de goyave à 46°C à différentes valeurs de pH.	118
<u>Figure 55</u> : Courbes de croissance de <i>Kloeckera apis</i> dans le jus d'ananas à 25°C et 32°C, le nectar de goyave à 25°C et 32°C, et le nectar de grenadille à 25°C et 32°C.	118
<u>Figure 56</u> : Courbes de croissance de <i>Kloeckera apis</i> dans le jus d'ananas à 35°C et 37°C, le nectar de goyave à 35°C et 37°C, et le nectar de grenadille à 35°C et 37°C.	118
<u>Figure 57</u> : Histogramme à 3 dimensions illustrant la croissance de <i>Kloeckera apis</i> dans le nectar de goyave en fonction des variations de pH et des températures de stockage.	119
<u>Figure 58</u> : Courbes modélisées de la croissance de <i>Kloeckera apis</i> dans le nectar de goyave en fonction des variations de pH et des températures de stockage.	121
<u>Figure 59</u> : Ajustement des valeurs expérimentales et des valeurs prédites par le modèle de croissance de <i>Kloeckera apis</i> dans le nectar de goyave.	122
<u>Figure 60</u> : Validation du modèle de croissance de <i>Kloeckera apis</i> dans le nectar de goyave commercial.	123
<u>Figure 61</u> : Non validation du modèle de croissance de <i>Candida pelliculosa</i> dans le nectar de goyave par la croissance de la levure dans le jus d'ananas commercial.	124

<u>Figure 62</u> : Non validation du modèle de croissance de <i>Candida pelliculosa</i> dans le nectar de goyave par la croissance de la levure dans le nectar de grenadille commercial.	124
<u>Figure 63</u> : Non validation du modèle de croissance de <i>Candida holmii</i> dans le nectar de goyave par la croissance de la levure dans le jus d'ananas commercial.	125
<u>Figure 64</u> : Non validation du modèle de croissance de <i>Candida holmi</i> dans le nectar de goyave par la croissance de la levure dans le nectar de grenadille commercial.	125
<u>Figure 65</u> : Non validation du modèle de croissance de <i>Kloekera apis</i> dans le nectar de goyave par la croissance de la levures dans le jus d'ananas de commercial.	125
<u>Figure 66</u> : Non validation du modèle de croissance de <i>Kloekera apis</i> dans le nectar de goyave par la croissance de la levure dans le nectar de grenadille commercial.	125
<u>Figure 67</u> : validation du modèle de croissance de <i>Candida pelliculosa</i> dans le nectar de goyave par la croissance de <i>Candida holmii</i> dans le nectar de goyave commercial.	129
<u>Figure 68</u> : validation du modèle de croissance de <i>Candida pelliculosa</i> dans le nectar de goyave par la croissance de <i>Kloekera apis</i> dans le nectar de goyave commercial.	129
<u>Figure 69</u> : validation du modèle de croissance de <i>Candida holmii</i> dans le nectar de goyave par la croissance de <i>Candida pelliculosa</i> dans le nectar de goyave commercial.	129
<u>Figure 70</u> : validation du modèle de croissance de <i>Candida holmii</i> dans le nectar de goyave par la croissance de <i>Kloekera apis</i> dans le nectar de goyave commercial.	129
<u>Figure 71</u> : validation du modèle de croissance de <i>Kloekera apis</i> dans le nectar de goyave par la croissance de <i>Candida pelliculosa</i> dans le nectar de goyave commercial.	130
<u>Figure 72</u> : validation du modèle de croissance de <i>Kloekera apis</i> dans le nectar de goyave par la croissance de <i>Candida holmii</i> dans le nectar de goyave commercial.	130

<u>Figure 73</u> : validation du modèle de croissance de <i>Candida holmii</i> dans le jus d'ananas par la croissance de <i>Candida holmii</i> dans le nectar de grenadille commercial.	130
<u>Figure 74</u> : validation du modèle de croissance de <i>Candida holmii</i> dans le le jus d'ananas par la croissance de <i>Candida pelliculosa</i> dans le jus d'ananas commercial.	130
<u>Figure 75</u> : validation du modèle de croissance de <i>Candida holmii</i> dans le jus d'ananas par la croissance de <i>Candida pelliculosa</i> dans le nectar de grenadille commercial.	131
<u>Figure 76</u> : validation du modèle de croissance de <i>Candida holmii</i> dans le le jus d'ananas par la croissance de <i>Candida pelliculosa</i> dans le jus d'orange commercial.	131
<u>Figure 77</u> : validation du modèle de croissance de <i>Candida holmii</i> dans le jus d'ananas par la croissance de <i>Candida pelliculosa</i> dans le jus de pomelo ou de pamplemousse commercial.	131
<u>Figure 78</u> : validation du modèle de croissance de <i>Candida holmii</i> dans le le jus d'ananas par la croissance de <i>Candida pelliculosa</i> dans le jus de pomme commercial.	131
<u>Figure 79</u> : validation du modèle de croissance de <i>Candida holmii</i> dans le jus d'ananas par la croissance de <i>Candida pelliculosa</i> dans le jus de raisin commercial.	132
<u>Figure 80</u> : validation du modèle de croissance de <i>Candida holmii</i> dans le le jus d'ananas par la croissance de <i>Kloeckera apis</i> dans le jus d'ananas commercial.	132
<u>Figure 81</u> : validation du modèle de croissance de <i>Candida holmii</i> dans le le jus d'ananas par la croissance de <i>Kloeckera apis</i> dans le nectar de grenadille commercial.	132
<u>Figure 82</u> : Comparaison des résultats de DO obtenus par ensemencement direct en cuves pour spectrophotomètre et par ensemencement en flacons (croissance de <i>Kloeckera apis</i> à 25°C et 32°C dans le nectar de goyave commercial.	134

- Figure 83: Exemple de courbes de croissance de *Kloeckera apis* à 37°C dans le nectar de goyave (pH 2,00), modélisées selon Gompertz. 134
- Figure 84: Courbes de survie de *Candida holmii* à 60°C dans le jus d'ananas pH 3,95, le nectar de goyave pH 3,15, le nectar de grenadille pH 3,03 et le tampon tartrate 0,01M pH 2,65. 148
- Figure 85: Courbes de survie de *Candida pelliculosa* à 60°C dans le jus d'ananas pH 3,95, le nectar de goyave pH 3,15, le nectar de grenadille pH 3,03 et le tampon tartrate 0,01M pH 2,65. 148
- Figure 86: Courbes de survie de *Kloeckera apis* à 55°C dans le jus d'ananas pH 3,95, le nectar de goyave pH 3,15 et le nectar de grenadille pH 3,03. 152
- Figure 87: Courbes de survie de *Kloeckera apis* à 58°C dans le jus d'ananas pH 3,95, le nectar de goyave pH 3,15 et le nectar de grenadille pH 3,03. 152
- Figure 88: Courbes de survie de *Kloeckera apis* à 60°C dans le jus d'ananas pH 3,95, le nectar de goyave pH 3,15 et le nectar de grenadille pH 3,03 et le tampon tartrate 0,01M pH 2,65. 152
- Figure 89: Courbes de survie de *Candida pelliculosa* à 65°C dans le jus d'ananas pH 3,95, le nectar de goyave pH 3,15 et le nectar de grenadille pH 3,03. 153
- Figure 90: Courbes de survie de *Candida pelliculosa* à 70°C dans le jus d'ananas pH 3,95, le nectar de goyave pH 3,15 et le nectar de grenadille pH 3,03. 153
- Figure 91: Courbes de survie de *Candida pelliculosa* à 75°C dans le jus d'ananas pH 3,95 et le nectar de grenadille pH 3,03. 153
- Figure 92: Courbes de relation températures-temps de *Kloeckera apis* dans le jus d'ananas pH 3,95, le nectar de goyave pH 3,15 et le nectar de grenadille pH 3,03. 155
- Figure 93: Courbes de relation températures- temps de *Candida pelliculosa* dans le jus d'ananas pH 3,95, le nectar de goyave pH 3,15 et le nectar de grenadille pH 3,03. 155

Liste des annexes

- Annexe 1: Photo du spectrophotomètre (modèle Unikon 940, Kontron Instruments, USA) utilisé pour le suivi des cinétiques de croissance microbienne par turbidimétrie. 185
- Annexe 2: Normes hygiéniques pour les jus de fruits, les concentrés de jus de fruits et les nectars de fruits (FAO/OMS, 1982). 186
- Annexe 3: Normes de composition microbiologique du sucre, des produits végétaux surgelés ou déshydratés, et des boissons non alcoolisées (GIURAUD et GALZY, 1980). 187
- Annexe 4a: Directive du Conseil du 15 Juillet 1980 (80/778/CEE) relative à la qualité des eaux destinées à la consommation humaine (CEE, 1980). 190
- Annexe 4b: Normes de qualité microbiologique des eaux destinées à la consommation humaine ou à l'industrie (GUIRAUD et GALZY, 1980; Ministère Français de la Solidarité, de la Santé et de la Protection Sociale, Avril 1990). 207
- Annexe 5: Données utilisées pour la modélisation de la croissance de *Candida pelliculosa* dans le nectar de goyave en fonction des variations de pH et des températures de stockage. 211
- Annexe 6: Données utilisées pour la modélisation de la croissance de *Candida holmii* dans le jus d'ananas et le nectar de goyave en fonction des variations de pH et des températures de stockage. 213
- Annexe 7: Données utilisées pour la modélisation de la croissance de *Kloeckera apis* dans le nectar de goyave en fonction des variations de pH et des températures de stockage. 215

TABLE DES MATIERES

Table des Matières

Introduction	1
Généralités	4
1. Procédés de fabrication des jus et nectars de fruits	4
1.1. Définition des jus et nectars de fruits	4
1.2. Procédés de fabrication	4
1.3. Composition physico-chimique et biochimique	10
2. Les contrôles microbiologiques en industries agricoles et alimentaires	12
2.1. Objectifs et exigences du contrôle microbiologique industriel	12
2.2. Réalisation du contrôle industriel	13
2.2.1. Les niveaux de contrôle	13
2.2.2. Les paramètres à mesurer	13
2.3. Contaminations des denrées alimentaires par les micro-organismes	15
2.4. Isolement et dénombrement des micro-organismes des aliments	18
2.4.1. Prélèvement	18
2.4.2. Transport et conservation des échantillons	18
2.4.3. Prise d'essai pour analyses	19
2.4.4. Ajustement de la concentration microbienne aux nécessités d'analyses: dilution et concentration.	20
2.4.5. Techniques globales d'évaluation de la microflore	21
3. Généralités sur les levures	22
3.1. Définition, morphologie et classification	22
3.2. Physiologie et métabolisme	26

3.3. Levures pathogènes	29
4. Croissance microbienne et modélisation	30
4.1 Rappels théoriques sur les cinétiques de croissance	30
4.1.1. Cinétiques de croissance	
4.1.2. Cinétiques de consommation d'un substrat ou de production d'un métabolite	33
4.2. Plans d'expériences et modélisation	35
4.2.1. Plans d'expériences	36
4.2.2. Les différents types de plans à variables stratifiées	37
4.3. Modèles mathématiques	38
4.3.1. Valeur à mesurer	39
4.3.2. Choix d'un modèle	39
4.3.3. Les différents modèles proposés dans la littérature	39
5. Thermorésistance	47
5.1. Théorie et lois de destruction thermique des micro-organismes	47
5.1.1. Première loi de la thermorésistance	47
5.1.2. Deuxième loi de la thermorésistance	50
5.1.3. Courbes de TDT	52
5.1.4. Notion de valeur pasteurisatrice	53
5.2. Facteurs modifiant les valeurs de D et z	53
5.2.1. Souche du micro-organisme	54
5.2.2. Conditions de culture	54
5.2.3. pH	55
5.2.4. Activité de l'eau (a_w)	55
5.2.5. Présence d'inhibiteurs	55
5.2.6. Modifications apparentes dues aux conditions expérimentales	56
5.3. Causes de déviations des courbes de survie	56
5.3.1. Présence de plusieurs sites thermosensibles	57
5.3.2. Présence de micro-organismes en amas ou en chaînettes	57
5.3.3. Diffusion de la chaleur	58
5.3.4. Activation des spores par la chaleur	58
5.3.5. Présence des populations différentes	58
5.3.6. Effet protecteur du milieu	59
5.3.7. Numération des micro-organismes survivants	59
5.3.8. Conditions de préculture	59
5.3.9. Solution d'essai et milieu de culture	59
5.4. Quantification des traitements thermiques et définition des objectifs:	
Application au cas des jus et nectars de fruits	60

Matériels et méthodes 63

1. Matériels 63

1.1. Matières premières 63

1.2. Milieux de culture 63

1.3. Origine des souches 64

1.4. Matériels utilisés 64

2. Méthodes 65

2.1. Préparation des milieux de culture 65

2.2. Dénombrement 66

2.3. Isolement et identification des micro-organismes 66

2.4. Conservation des souches 68

2.5. Réalisation du plan expérimental 69

2.5.1. Stérilisation du matériel 69

2.5.2. Préparation des milieux 69

2.5.3. Préparation des cultures mères 70

2.5.4. Remplissage des cuves 70

2.5.5. Suivi des cinétiques de croissance 70

2.5.6. Etalonnage de l'appareil de mesure 70

2.5.7. Calcul du taux de croissance 71

2.6. Modélisation de la croissance des levures 71

2.6.1. Modélisation et construction des équations mathématiques 71

2.6.2. Validation des modèles construits 71

2.7. Mesure de la thermorésistance de levures 72

2.7.1. Préparation des milieux de culture 72

2.7.2. Préparation des suspensions microbiennes 72

2.7.3. Tests de thermorésistance 72

2.7.4. Calcul des valeurs de D_T et z 73

2.7.5. Détermination des valeurs pasteurisatrices 74

2.8. Tests d'analyses sensorielles 74

Résultats et discussion 76

1. Isolement et identification de la flore microbienne contaminant les préparations de fruits exotiques 76

1.1. Boissons produites en laboratoire 76

1.2. Boissons produites en industrie 77

2. Etude de la croissance des levures d'altération	91
2.1. <i>Candida pelliculosa</i>	91
2.1.1. Equation et courbe d'étalonnage	91
2.1.2. Histogramme, courbes et taux de croissance	92
2.1.3. Equation polynomiale et courbes modélisées de croissance	97
2.1.4. Ajustement des valeurs expérimentales et prédites	100
2.1.5. Validation du modèle construit	101
2.2. <i>Candida holmii</i>	102
2.2.1. Equations et courbes d'étalonnage	102
2.2.2. Histogrammes, courbes et taux de croissance	103
2.2.3. Equation polynomiale et courbes modélisées de croissance	111
2.2.4. Ajustement des valeurs expérimentales et prédites	113
2.2.5. Validation des modèles construits	113
2.3. <i>Kloeckera apis</i>	114
2.3.1. Equation et courbe d'étalonnage	114
2.3.2. Histogramme, courbes et taux de croissance	116
2.3.3. Equation polynomiale et courbes modélisées de croissance	121
2.3.4. Ajustement des valeurs expérimentales et prédites	122
2.3.5. Validation du modèle construit	123
2.4. Application des modèles à d'autres souches et à d'autres boissons	123
2.5. Discussion	133
3. Etude de la thermorésistance	139
3.1. Pasteurisation et préservation des qualités sensorielles des jus et nectars de fruits exotiques	139
3.2. Etudes préliminaires	146
3.3. Thermorésistance de <i>Candida pelliculosa</i> et de <i>Kloeckera apis</i>	149
3.4. Valeurs pasteurisatrices	155
3.5. Discussion	157
Conclusion générale	163
Bibliographie	168
Annexes	185

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Depuis l'adoption en Juin 1993 de la directive européenne relative à l'hygiène des denrées alimentaires, la réglementation correspondante a considérablement évolué, exigeant notamment des industriels une obligation des moyens pour la maîtrise de la qualité microbiologique.

Au Cameroun comme dans la plupart des pays en voie de développement, ce problème de maîtrise de la qualité, de l'hygiène et de la salubrité des denrées alimentaires dans les industries locales est souvent négligé, et ce d'autant plus que les jeunes industries doivent faire face de nos jours à des sérieux problèmes de trésorerie aggravés par la crise économique mondiale. La situation des industries de jus et nectars de fruits s'inscrit parfaitement dans ce cadre.

Des études sur les procédés de fabrication et de conservation ainsi que sur la qualité microbiologique et les barèmes de pasteurisation des jus et nectars de fruits exotiques conduites depuis des décennies au Laboratoire de Technologie Alimentaire de la Station de l'Institut de la Recherche Agronomique (IRA) à Njombé au Cameroun ont permis ces dernières années de définir des barèmes de pasteurisation par actinisation susceptibles de garantir les qualités microbiologique et hygiénique et d'affecter le moins possible les qualités sensorielles de quelques unes de ces boissons (TCHANGO-TCHANGO et *coll.*, 1992, 1993). Cette pasteurisation par actinisation effectuée à l'aide d'un pasteurisateur électrique consiste à faire passer le liquide à traiter à travers des tubes en quartz de faible diamètre chauffés extérieurement par des résistances électriques.

Le transfert de ces technologies au niveau artisanal et industriel rencontre le plus souvent des problèmes à cause d'une part du non respect des conditions d'hygiène au cours des procédés de fabrication, et d'autre part du non respect des barèmes de pasteurisation ou tout simplement du manque d'équipement approprié pour réaliser ce traitement de conservation.

La Société Agro-Industrielle des Fruits de l'Ouest (SAIFO) basée à Bafoutlé près de Koutaba dans la province de l'Ouest Cameroun fait partie des petites et moyennes industries (PMI). En activité depuis 1993, elle dispose des équipements assez modernes de production et a été délibérément choisie pour exemple. Elle utilise en effet presque en totalité les procédés de fabrication et de conservation mis au point dans notre laboratoire, et a depuis le démarrage effectif de ses activités en 1993 le privilège de bénéficier de notre assistance technique pour sa production de jus et des nectars de fruits pasteurisés et commercialisés en sachets "doypack". En 1994, elle a perdu à cause des fermentations microbiennes, environ 30% de sa production de pulpes de goyave et de grenadille, 12% de sa production de jus d'ananas et 4% de sa production de nectars de goyave et de grenadille pasteurisés et stockés à la température ambiante (30°C à 32°C).

L'isolement et l'identification des germes microbiens mis en cause ainsi que l'étude de leur croissance devrait permettre de mieux connaître leur physiologie et de modéliser leur développement dans ces boissons. L'étude de leur thermorésistance devrait également renseigner sur leur comportement vis-à-vis des traitements thermiques ainsi que sur l'efficacité des barèmes de pasteurisation appliqués pour la conservation des boissons étudiées.

Ce manuscrit comporte trois parties principales:

La première partie passe en revue les procédés de fabrication des jus et nectars de fruits exotiques, les généralités sur le contrôle microbiologique en industries agricoles et alimentaires, les généralités sur les levures ainsi que les théories et les lois de la thermorésistance et de la modélisation de la croissance microbienne. Les méthodes et les techniques utilisées au cours de cette étude sont exposées dans la deuxième partie du mémoire. La troisième partie est consacrée à la présentation des résultats obtenus et des discussions, en rapport avec la qualité microbiologique et l'effet de la pasteurisation sur les qualités sensorielles des jus et

nectars de fruits exotiques, la croissance et la thermorésistance des trois souches de levures isolées dans ces boissons avec développement des modèles prédictifs de croissance en fonction des variations de pH et des températures de stockage.

GENERALITES

GENERALITES

1. Les procédés de fabrication des jus et des nectars de fruits

1.1. Définition des jus et nectars de fruits

D'après le programme mixte FAO/OMS sur les normes alimentaires, les jus de fruits sont des boissons troubles, non fermentées mais fermentescibles, destinées à la consommation directe; ils sont obtenus par un procédé mécanique à partir des fruits sains et mûrs, et conservés exclusivement par des moyens physiques. Quant aux nectars de fruits, ce sont des produits non pulpeux ou pulpeux, non fermentés mais fermentescibles, destinés à la consommation directe; ils sont obtenus par mélange de jus de fruits et/ou de la totalité de la partie comestible des fruits sains et mûrs, concentrés ou non, additionnés d'eau et de sucre ou de miel, et conservés exclusivement par des moyens physiques. L'addition d'acides (notamment acide citrique) dans les jus et nectars de fruits peut être admise.

1.2. Procédés de fabrication

Les différents procédés et techniques de fabrication des jus et nectars de fruits et de légumes ont fait l'objet de nombreuses études (APRIA, 1971; TRESSLER et JOSLYN, 1971; DUPAIGNE, 1972; GRET, 1984; BIT, 1990). L'évolution des techniques d'extraction des jus d'agrumes et en particulier de jus d'orange a permis de mettre au point des appareils qui limitent considérablement la teneur en jus des essences de la peau, en particulier le limonène qui constitue près de 95% des huiles essentielles de la peau d'orange (BERBEY, 1992).

La production du Cameroun en jus et nectars de fruits et légumes estimée à 4000 tonnes en 1990/91 pourrait atteindre près de 6000 tonnes en

1995/96 et 8000 tonnes en l'an 2000/2001 (SEDA, 1986).

Des études réalisées aux Etats-Unis d'Amérique (SILVA et CHAMUL, 1991) ont montré que le jus de melon pasteurisé présente un rendement de 93,2% par rapport à la pulpe ainsi qu'une meilleure saveur et couleur par rapport au jus non pasteurisé.

Des techniques et procédés de fabrication et de conservation de quelques jus et nectars de fruits tropicaux (ananas, goyave, grenadille, pomelo) facilement applicables au Cameroun et dans d'autres pays en voie de développement ont été mis au point à la Station de Recherches Agronomiques de Njombé au Cameroun (FOYET et TCHANGO-TCHANGO, 1994). Ces procédés sont généralement exploités artisanalement ainsi que par des petites et moyennes industries (PMI) pour la valorisation des fruits au Cameroun. Ils sont résumés aux tableaux 1 et 2.

Ce sont des procédés discontinus n'utilisant pas de conservateurs chimiques lors des traitements de conservation. Les risques de contamination microbienne pourraient être importants si les conditions de propreté et d'hygiène ne sont pas rigoureusement respectées. Les contaminants pourraient aussi bien provenir des matières premières (fruit, eau, sucre), des appareils de fabrication (pendant l'extraction, le malaxage, la filtration et le conditionnement), de l'air ambiant de l'usine, de l'emballage ou du personnel.

Depuis quelques années, l'industrie des jus et nectars de fruits est en pleine expansion au Cameroun. Ce pays dispose en 1995 de près d'une dizaine de PMI de jus et nectars de fruits en activité dont les plus importantes sont:

- La Société Industrielle de Transformation des Fruits (SITRAF) basée à Maroua au Nord Cameroun. C'est la plus importante et la plus ancienne qui dispose des équipements pour un travail en continu jusqu'au conditionnement. Le procédé utilisé ici a recours aux conservateurs chimiques tel que le benzoate de sodium pour la conservation des boissons. Les jus et les pulpes de

fruits produits sont pasteurisés et conditionnés respectivement en bouteilles de verre et en boites métalliques.

- La Société Industrielle des Fruits de l'Ouest (SAIFO) installée à Bafoutlé près de Koutaba à l'Ouest Cameroun. Créée il ya environ trois ans, elle dispose d'équipements modernes travaillant en continu en dehors du conditionnement qui reste semi-automatique; elle produit des pulpes, jus et nectars de fruits pasteurisés et conservés en sachets "doypack" sans utilisation de conservateurs chimiques.

- Les "Conserves Mbanga" de Douala au Cameroun dont les équipements ont été relativement modernisés ces dernières années par l'acquisition d'une chaîne artisanale de jus de fruits SIMACO-France. Cette unité produit des jus et nectars de fruits pasteurisés et conditionnés en bouteilles de verre sans utilisation des conservateurs chimiques. Les pulpes de fruits sont conservées par congélation. Le système de production est semi-continu avec conditionnement manuel.

- "SIPO fruits Industries" est une société semi-artisanale installée à Bafoussam à l'Ouest Cameroun; elle produit de manière discontinue des jus et des nectars de fruits aussi bien surgelés en sachets plastiques que pasteurisés en bouteilles de verre; elle n'utilise pas de conservateurs chimiques et conserve les pulpes de fruits par congélation.

- "Les Fruits de Pays" est la dernière née des ces industries; elle est installée à Douala et produit par un système discontinu, des jus et des nectars de fruits pasteurisés et conditionnés en bouteilles de verre. Cette société conserve ses pulpes de fruits par congélation et n'utilise pas de conservateurs chimiques.

Toutes ces industries qui utilisent pour la plupart, les procédés et techniques mis au point dans notre Laboratoire de Technologie Alimentaire de

l'IRA (Institut de la Recherche Agronomique) de Njombé, s'intéressent à la production et à la commercialisation du jus d'ananas, des nectars de goyave, de grenadille, de pomelo, d'orange, de mangue, de pomme cythère, et d'autres fruits locaux, la production des pulpes et des nectars de goyave étant de loin la plus importante (70% et plus). Elles ne disposent pas d'infrastructures de laboratoire équipées pour le contrôle de qualité microbiologique de leurs productions.

L'étude de faisabilité d'un projet de création et d'exploitation d'une usine de production de concentrés de pulpes et de nectars de goyave à Makak dans la province de Centre au Cameroun a été réalisée. Le promoteur qui dispose de plus d'une centaine d'hectares de goyaviers dans la région prévoit de lancer son unité en 1997 pour la production d'un tonnage important de concentrés de pulpe de goyave destinés aux industries de jus et nectars de fruits locaux ainsi qu'à l'exportation.

Tableau 1: Schéma du procédé de fabrication du jus d'ananas (*Ananas comosus*) mis au point à la Station IRA de Njombé au Cameroun.

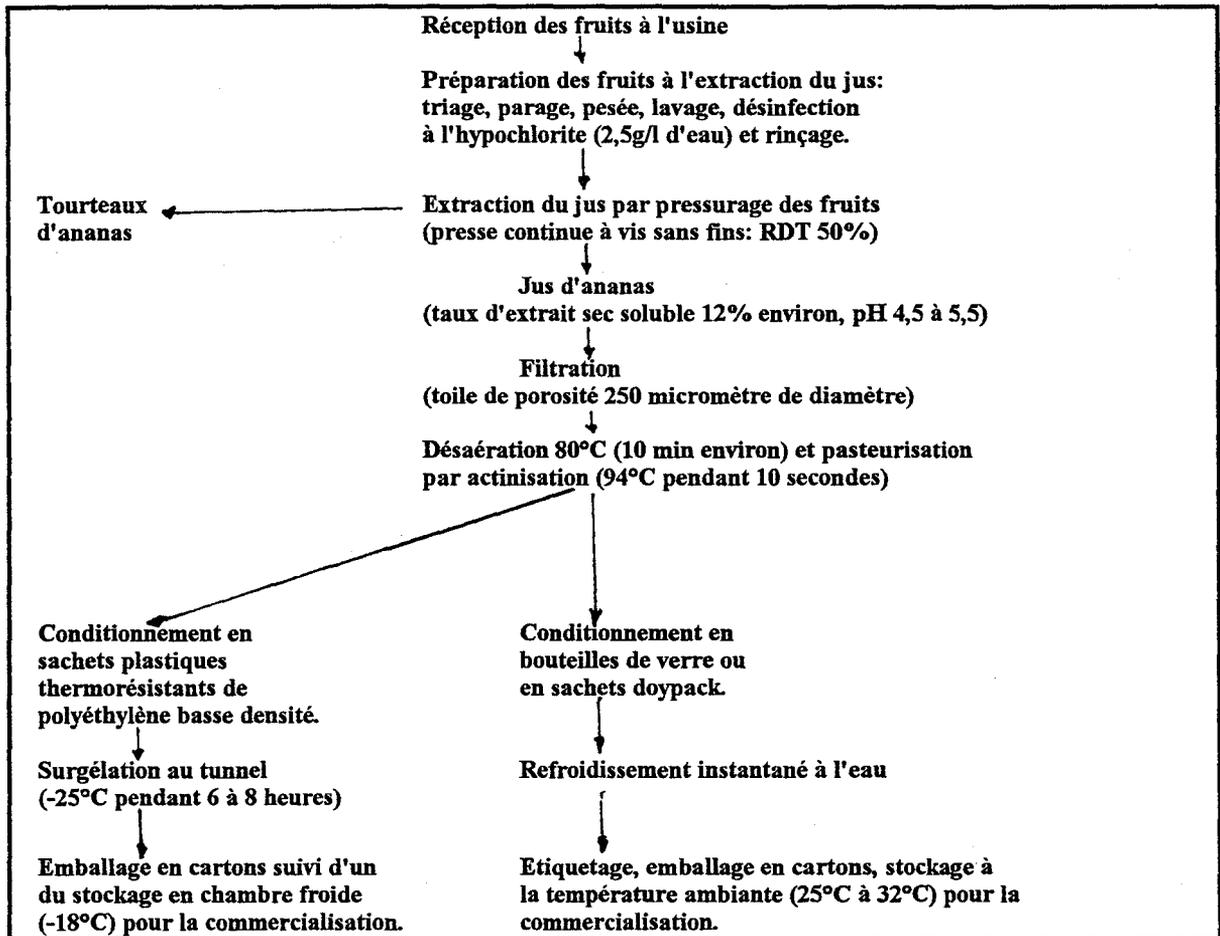
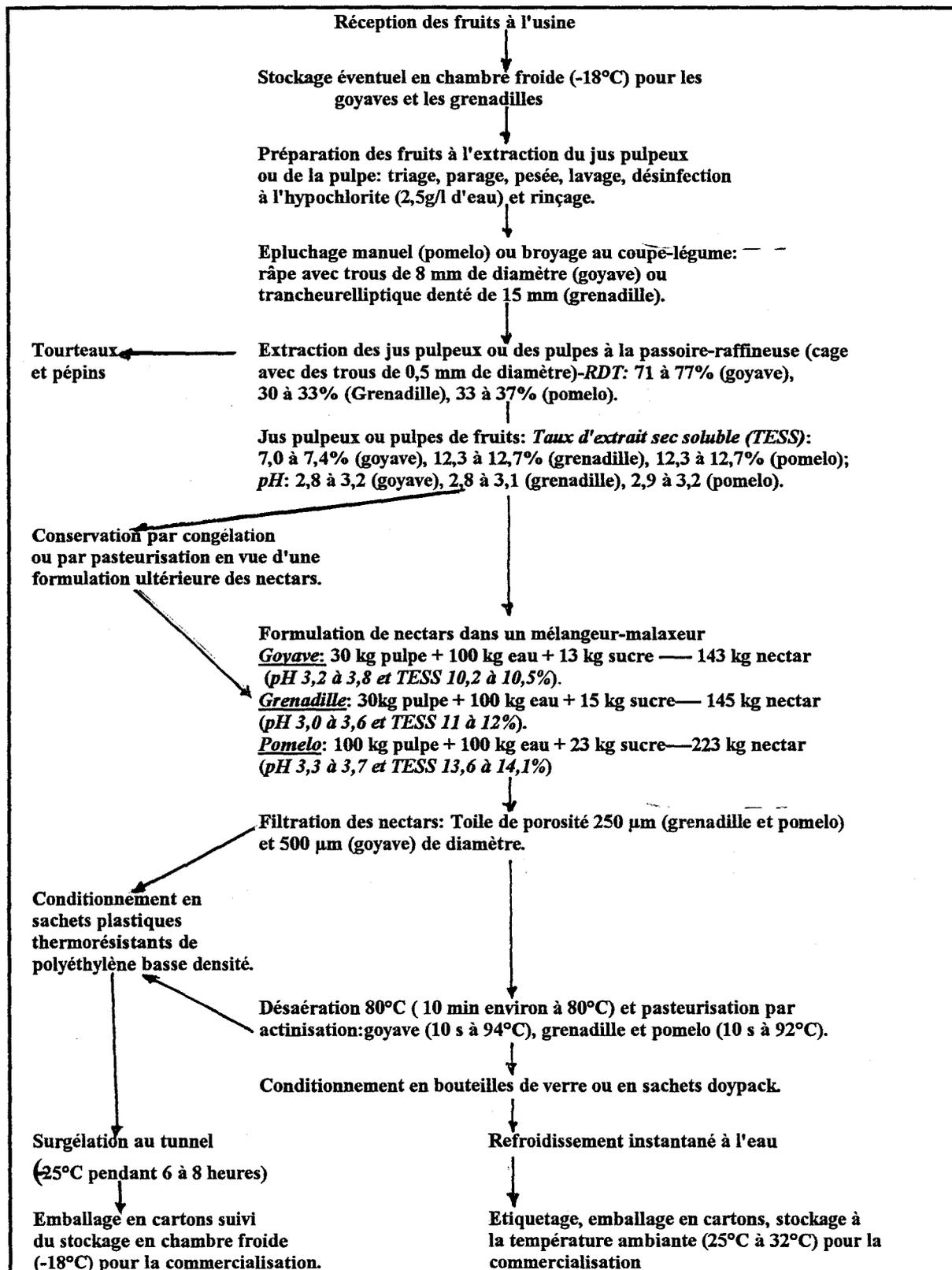


Tableau 2: Schéma du procédé de fabrication des nectars de goyave (*Psidium guajava*), de grenadille (*Passiflora edulis Var. flavicarpa*) et de pomelo (*Citrus paradisi*) mis au point à la Station IRA de Njombé au Cameroun.



1.3.:Composition chimique

La composition chimique du jus d'ananas en conserve, du jus pulpeux de grenadille et de la pulpe de goyave (FAVIER et coll., 1993) est présentée dans le tableau 3 ci-dessous.

Tableau 3: Composition chimique du jus d'ananas (*Ananas comosus* (L.) Merr.) en conserve, du jus pulpeux de grenadille (*Passiflora edulis* Sims Var. *edulis*) frais et de la pulpe de goyave (*Psidium guajava* L.)⁽¹⁾

Constituants	Unité	Ananas	Grenadille	Goyave
Proportion comestible		1,0	-	0,81
Energie	Kcal/100g	53,0	54,0	31,0
Eau	g/100g	86,2	84,0	83,0
Protéines	g/100g	0,4	0,8	1,0
Lipides totaux	g/100g	0,1	0,2	0,4
Glucides disponibles	g/100g	13,5	13,0	5,5
Fructose	g/100g	3,7	4,0	2,6
Glucose	g/100g	3,7	4,8	2,1
Saccharose	g/100g	6,1	4,2	0,7
Amidon	g/100g	0,0	0,0	nd ⁽²⁾
Fibre alimentaire	g/100g	0,1	0,1	6,0
Sodium	mg/100g	1,0	10,0	3,0
Potassium	mg/100g	127,0	241,0	273,0
Calcium	mg/100g	15,0	6,0	20,0
Magnésium	mg/100g	12,0	17,0	11,0
Fer	mg/100g	0,25	0,38	0,8
Zinc	mg/100g	0,09	0,8	0,2
Cuivre	mg/100g	0,05	nd	0,1
Phosphore	mg/100g	7,0	21,0	26,0
Eq. B carotène	µg/100g	20,0	1070,0	260,0
Vitamine C	mg/100g	11,0	20,0	243,0
Thiamine	mg/100g	0,05	0,01	0,05
Riboflavine	mg/100g	0,02	0,11	0,04
Niacine	mg/100g	0,25	1,6	1,2
Acide panthoténique	mg/100g	0,1	nd	0,15
Vitamine B6	mg/100g	0,1	nd	0,12
Folates totaux	µg/100g	23,0	nd	10,0
Sérotonine	mg/100g	nd	2,5	nd
Isoleucine	mg/100g	nd	nd	37,0
Leucine	mg/100g	nd	nd	67,0
Lysine	mg/100g	nd	nd	28,0
Méthionine	mg/100g	nd	nd	7,0
Phénylalanine	mg/100g	nd	nd	2,0
Tyrosine	mg/100g	nd	nd	12,0
Thréonine	mg/100g	nd	nd	38,0
Tryptophane	mg/100g	nd	nd	9,0
Valine	mg/100g	nd	nd	34,0
Arginine	mg/100g	nd	nd	26,0
Histidine	mg/100g	nd	nd	8,0
Alanine	mg/100g	nd	nd	50,0
Acide aspartique	mg/100g	nd	nd	63,0
Acide glutamique	mg/100g	nd	nd	131,0
Glycolle	mg/100g	nd	nd	50,0
Proline	mg/100g	nd	nd	31,0
Sérine	mg/100g	nd	nd	29,0

(1) FAVIER et coll. (1993) (2) Non déterminé

La composition chimique des jus en conserves de citron (*Citrus limon* (L.) Burn. f.), d'orange (*Citrus sinensis* (L) Obs.), de pomélo (*Citrus paradisi* MacFad.), de mangue (*Mangifera indica* L.) et des pulpes de banane douce (*Musa spp.*), de pomme cannelle (*Annona squamosa* L.), de pomme de cythère (*Spondias cytherea* Sonn.), de raisin de corinthe (*Vitis vignifera* L.) et du ramboutan (*Nephelium lappaceum* L.), couramment utilisés dans de nombreux pays en voie de développement pour la fabrication des jus et nectars de fruits aussi bien au niveau ménager, artisanal ou industriel est présentée dans le tableau 4 ci-dessous.

Tableau 4: Composition chimique des jus en conserve de citron, d'orange, de pomélo, de mangue et des pulpes de bananes douces, de pomme cannelle, de pomme de cythère, de raisin de corinthe et du ramboutan (1).

Constituants	Unité	Citron	Orange	Pomélo	Mangue	Banane douce	Pomme cannelle	Pomme cythère	Raisin	Ramboutan
Proportion comestible		1,0	1,0	1,0	1,0	0,68	0,46	0,71	1,0	0,41
Energie	Kcal/100g	23,0	40,0	37,0	55,0	89,0	92,0	44,0	269,0	67,0
Eau	g/100g	92,5	88,8	90,0	85,5	74,0	73,4	87,2	18,3	80,9
Protéines	g/100g	0,4	0,7	0,5	0,2	1,1	1,8	0,4	3,6	1,0
Lipides totaux	g/100g	0,3	0,15	0,1	0,3	0,3	0,2	0,1	0,3	0,3
Glucides disponibles	g/100g	2,5	8,8	9,1	13,7	21,8	22,2	11,0	65,7	16,0
Fructose	g/100g	nd	2,7	3,6	nd(2)	3,9	3,5	nd	32,3	3,0
Glucose	g/100g	nd	2,6	3,5	nd	4,6	5,2	nd	33,3	2,8
Saccharose	g/100g	nd	3,5	1,8	nd	8,2	3,3	nd	traces	10,2
Amidon	g/100g	nd	0,0	0,0	nd	4,2	nd	nd	0,0	0,0
Fibre alimentaire	g/100g	0,1	0,1	traces	0,2	2,0	1,6	1,0	5,2	2,0
Sodium	mg/100g	1,0	4,0	2,0	11,0	1,0	9,0	1,0	10,0	1,0
Potassium	mg/100g	102,0	120,0	150,0	21,0	385,0	264,0	93,0	846,0	113,0
Calcium	mg/100g	11,0	10,0	7,0	2,0	8,0	28,0	55,0	88,0	14,0
Magnésium	mg/100g	8,0	9,0	10,0	nd	30,0	21,0	nd	38,0	12,0
Fer	mg/100g	0,13		0,24	0,23	2,6	0,42	0,8	0,3	2,9
Zinc	mg/100g	0,06	0,05	0,08	nd	0,18	nd	nd	0,57	0,6
Cuivre	mg/100g	0,04	0,04	0,04	nd	0,11	nd	nd	0,56	nd
Phosphore	mg/100g	9,0	14,0	11,0	25,0	22,0	34,0	65,0	111,0	11,0
Iode	µg/100g	nd	1,0	nd	nd	4,0	nd	nd	nd	nd
Eq. B carotène	µg/100g	9,0	45,0	4,0	248,0	68,0	3,0	200,0	33,0	0,0
Vitamine E	mg/100g	nd	0,17	0,08	nd	0,29	nd	nd	nd	nd
Vitamine C	mg/100g	20,0	39,0	30,0	30,0	11,7	36,0	35,0	4,0	51,0
Thiamine	mg/100g	0,04	0,07	0,04	traces	0,04	0,11	0,05	0,16	0,02
Riboflavine	mg/100g	0,01	0,02	0,02	0,01	0,07	0,13	0,02	0,12	0,06
Niacine	mg/100g	0,2	0,24	0,23	0,6	0,61	0,91	1,4	1,42	0,6
Acide panthoténique	mg/100g	0,1	0,13	0,13	nd	0,28	0,22	nd	0,06	nd
Vitamine B6	mg/100g	0,04	0,07	0,02	nd	0,47	0,2	nd	0,26	nd
Folates totaux	µg/100g	10,0	20,0	7,0	nd	23,0	nd	7,0	6,0	24,0
biotine	mg/100g	nd	1,0	0,8	nd	2,6	nd	nd	4,7	nd
Acide malique	mh/100g	210,0	160,0	nd	nd	nd	nd	nd	2250,0	nd
Acide citrique	mg/100g	3600,0	1000,0	nd	nd	nd	nd	nd	2250,0	nd

(1) FAVIER et coll. (1993) (2) Non déterminé

2. Les contrôles microbiologiques en industries agricoles et alimentaires

La qualité et l'innovation sont considérées comme des concepts essentiels à la réussite d'une industrie et à la conquête des marchés intérieurs et extérieurs (MULTON, 1985). Les contrôles chimiques, microbiologiques et organoleptiques en industries alimentaires correspondent respectivement aux qualités nutritionnelles, hygiéniques et organoleptiques (KRAMER et TWIGG, 1970; ANDRE, 1985). Une démarche globale doit être appliquée pour la maîtrise rigoureuse de la qualité microbiologique des produits alimentaires fabriqués industriellement (LEVEAU, 1993); elle implique la mise au point du procédé de production, la conception du matériel, l'implantation et la réalisation des locaux, l'hygiène et la formation du personnel, l'organisation et la gestion de la production. Chaque étape ou opération unitaire doit être conçue dans un souci de cohérence et gérée en effectuant le bilan du flux des micro-organismes autochtones et de contamination.

2.1. Objectifs et exigences du contrôle microbiologique industriel

Le premier objectif du contrôle microbiologique est d'assurer une bonne sécurité hygiénique et une bonne qualité marchande du produit fabriqué (BOUIX et LEVEAU, 1984; BOURGEOIS et CLERET, 1991), dans la mesure où elles dépendent des micro-organismes; le second objectif du contrôle microbiologique est de favoriser un bon rendement en permettant de minimiser les pertes dues aux mauvaises conditions de fabrication et d'avoir le moins possible de produits non conformes (BOUIX et LEVEAU, 1984).

Les principales exigences de ce contrôle industriel sont d'une part la rapidité pour pouvoir réagir au plus vite à toute anomalie, et d'autre part le faible coût pour pouvoir multiplier les analyses de façon à surveiller de près la production sans alourdir excessivement les charges (BOURGEOIS et CLERET, 1991).

2.2. La réalisation du contrôle industriel

2.2.1. Les niveaux de contrôle

MESCLE et ZUCCA (1988) proposent trois niveaux de contrôle microbiologique industriel:

- Au premier niveau se situent les contrôles préventifs effectués sur les matières premières et les différents adjuvants.

- Les contrôles en cours de fabrication occupent le second niveau: ils comprennent les contrôles microbiologiques sur le produit lui-même ainsi que sur les facteurs pouvant avoir une influence sur sa qualité (hygiène des matériels, des locaux et du personnel).

- Le troisième niveau, enfin, est constitué des contrôles sur les produits finis; ceux-ci sanctionnent la fabrication en déterminant la qualité microbiologique du produit fini et sa conformité aux normes officielles ou aux normes établies par l'usine.

2.2.2. Les paramètres à mesurer

Ce sont généralement des microorganismes responsables d'une altération de la qualité hygiénique (germes témoins de contamination fécale, germes pathogènes de contamination des produits manipulés), et des microorganismes responsables d'une altération de la qualité marchande ou d'une perte de rendement qui doivent être recherchés du début de la fabrication (matières premières) jusqu'au produit fini; dans ce dernier cas, les microorganismes à rechercher dépendent étroitement du produit en cours de fabrication: levures dans les produits sucrés ou acides, bactéries lactiques et bactéries acétiques dans les produits acides, moisissures dans les produits peu hydratés (BOUIX et LEVEAU, 1984; LEVEAU, 1993). Dans le cas de l'autocontrôle industriel où l'on vise l'efficacité, il est indispensable de sélectionner un nombre réduit d'analyses, suffisamment informatives, pour

jouer le rôle d'indice de qualité (BOURGEOIS et CLERET, 1991) dont les plus utilisés sont les suivants:

a) Les indices de la qualité hygiénique

- *La flore totale mésophile*: elle permet d'avoir une idée sur les conditions d'hygiène au cours de la fabrication ainsi que sur la salubrité du produit; en effet même s'il n'y a pas une corrélation entre le nombre de mésophiles et le nombre de micro-organismes pathogènes, on constate généralement que la présence de pathogènes ne se manifeste que pour des flores totales élevées, de l'ordre de 10^6 à 10^7 germes par gramme ou par millilitre.

- *Les entérobactéries*: on peut utiliser comme indice, notamment pour les aliments à pH voisin de 7, le nombre total des entérobactéries, ou bien le nombre de coliformes, ou encore le nombre de coliformes fécaux ou thermotolérants, ou plus généralement le nombre d'*Escherichia coli*; la recherche directe des salmonelles peut être nécessaire pour certains produits.

- *Les staphylocoques*: lorsque l'aliment se prête à leur développement, il est souhaitable et relativement aisé de dénombrer les staphylocoques présumés pathogènes (coagulase +).

Selon MISKIMIN et coll. (1976), il existe une bonne corrélation entre la flore totale mésophile, le nombre de coliformes et le nombre d'*Escherichia coli*, si bien que n'importe lequel des trois indices peut être utilisé, sinon pour évaluer avec certitude le risque sanitaire, du moins pour contrôler la bonne pratique de fabrication. Dans ces conditions, c'est l'évaluation de la flore totale mésophile qui semble la mieux adaptée au contrôle industriel.

b) Les indices de la qualité organoleptique et de la conservabilité

En ce qui concerne la qualité organoleptique et la durée prévisible de conservation du produit, la flore totale peut apporter des informations utiles: l'altération n'apparaît que pour des flores élevées de l'ordre de 10^6 à 10^8 germes par gramme (BOURGEOIS et CLERET, 1991), l'essentiel de la flore étant constitué par l'association microbienne responsable de l'altération. Toutefois, cette évaluation globale de la flore doit se faire dans les conditions permettant d'évaluer effectivement la flore d'altération, c'est-à-dire dans les conditions proches de celles subies par le produit; c'est ainsi par exemple que pour les aliments conservés par réfrigération, c'est l'évaluation de la flore psychrotrophe qui est intéressante.

2.3 Contaminations des denrées alimentaires par les micro-organismes

La contamination primaire des matières premières se fait par l'eau, le sol, les poussières et par le produit lui-même (MESCLE et ZUCCA, 1988). Lorsqu'elles sont transformées, les matières premières subissent de nouvelles contaminations propres au contexte de l'usine ou au lieu de fabrication (air ambiant, surfaces, eau de fabrication, matériels, personnel) et aux processus technologiques qui conduisent aux produits finis.

La qualité microbiologique de l'eau a une très grande influence sur la contamination des produits alimentaires. Les germes hydriques sont surtout des bactéries provenant du sol (*Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Chromobacterium*, *Moraxella*,...) ou des matières fécales de l'homme et des animaux (entérobactéries, entérocoques). Ces micro-organismes sont parfois pathogènes (*Salmonella*, *Shigella*,...) ou seulement responsables d'altération des aliments. Lorsqu'aucun traitement de l'eau n'est effectué, comme c'est souvent le cas dans la plupart des pays en voie de développement, elle apparaît comme la principale cause des maladies entériques.

Les produits les plus exposés aux contaminations et aux altérations microbiennes sont les fruits et légumes, le lait et les produits laitiers, la viande et les produits carnés, ainsi que les produits élaborés qui sont en contact direct avec l'air.

La durée de vie de la plupart des aliments ainsi que la croissance des micro-organismes dépendent de paramètres divers tels que la température, le pH, l'acidité, l'activité de l'eau, la disponibilité de l'oxygène, le taux de CO₂, le potentiel redox, la teneur et la disponibilité des éléments nutritifs, la présence de facteurs et produits antimicrobiens (BUCHANAN, 1993; DEAK et BEUCHAT, 1993; LABUZA et FU, 1993).

La plupart des travaux publiés sur le contrôle de la qualité des jus et nectars de fruits traitent essentiellement du contrôle des qualités chimiques et organoleptiques. KRAMER et TWIGG (1970, 1973) fournissent une importante bibliographie dans ce domaine. Il en est de même du programme mixte FAO/OMS (1982) qui a publié une série de normes relatives aux qualités des jus de fruits, concentrés de jus de fruits et nectars de fruits. Peu de travaux ont par contre été consacrés à l'étude de la qualité microbiologique de ces boissons. Elles sont en effet, parmi les boissons rafraîchissantes, plus riches en substances azotées et en vitamines et par conséquent, plus sensibles aux altérations microbiennes (PLUSQUELLEC, 1980). PARISH (1991) a fait une revue critique des problèmes microbiologiques dans l'industrie des agrumes. Les travaux de BEECH (1977) et de GUIRAUD et GALZY (1980) montrent que le pH intervient dans la sélection des types de micro-organismes pouvant se développer dans les jus et nectars de fruits. Les levures apparaissent comme les micro-organismes d'altération généralement mis en cause dans la majorité

des aliments et des boissons ayant une teneur élevée en sucre et un pH bas (DEAK, 1991; KNEIFEL et BRETTBACHER, 1992; TRONG-MEYER, 1994). D'autres auteurs (BEECH, 1977; PLUSQUELLEC, 1980; FOX et LOGIN, 1982; LEUNG et coll., 1982; SPLITTSTOESSER, 1982; SIDHU et coll., 1984; SWANSON et coll., 1985) ont montré que parmi les micro-organismes altérant les boissons rafraîchissantes, les plus importants sont les levures dont celles couramment rencontrées appartiennent aux genres *Candida* et *Saccharomyces*; les bactéries d'altération sont essentiellement lactiques (*Lactobacillus spp.*, *Leuconostoc spp.*), acétiques (boissons non gazeuses), butyriques (jus de tomate) ou coliformes. Les moisissures appartenant aux genres *Aspergillus*, *Byssochlamys*, *Penicillium*, ainsi que les levures appartenant aux genres *Candida*, *Saccharomyces*, *Cryptococcus*, *Kloeckera*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Torulopsis*, et des bactéries du genre *Bacillus* (en particulier *B. brevis* et *B. coagulans*) ont été identifiées comme étant des micro-organismes thermorésistants rencontrés au cours des opérations de productions des jus et des cidres de pomme aux Etats-Unis d'Amérique (SWANSON et coll., 1985). Au Nigeria, les levures appartenant aux genres *Candida*, *Saccharomyces* et *Pichia* sont les plus couramment isolées des jus d'orange (EFIUVWEVWERE et OYELADE, 1991). Ces micro-organismes d'altération rencontrés dans les jus et nectars de fruits sont généralement responsables de la mauvaise qualité de ces boissons au cours du stockage et de la commercialisation; leurs actions sont susceptibles d'occasionner des pertes importantes de produits et de rendement, notamment dans les pays en voie de développement qui ne disposent pas souvent de structures adéquates et de politique rigoureuse de contrôle de qualité en industries agro-alimentaires.

2.4. Isolement et dénombrement des micro-organismes des aliments

Trois groupes de micro-organismes sont habituellement recherchés lors d'une étude des qualités microbiologiques des aliments:

- Les germes capables d'altérer les qualités marchandes et organoleptiques
- Les germes potentiellement pathogènes
- Les germes témoins de contamination fécale

La valeur des résultats de l'analyse microbiologique est tributaire de deux facteurs importants: le prélèvement qui doit être réalisé selon des critères d'échantillonnage statistiquement valables, et la prise d'essai servant à l'analyse qui ne doit pas avoir subi de transformations microbiologiques par rapport à l'aliment dont elle doit refléter la qualité (BOURGEOIS et PLUSQUELLEC, 1991).

2.4.1. Prélèvement

Il est souhaitable que les échantillons à analyser soient prélevés dans leurs unités de conditionnement en laissant les produits jusqu'au laboratoire dans leurs emballages d'origine, à l'exception des matières premières qui se présentent souvent en vrac ou sous forme de pièces trop volumineuses; dans ces derniers cas, il faut prélever l'échantillon de telle sorte qu'il soit représentatif du lot étudié en évitant en même temps d'y ajouter des micro-organismes étrangers.

2.4.2. Transport et conservation des échantillons

Depuis le prélèvement jusqu'au traitement de l'échantillon, tout devrait être mis en oeuvre pour stabiliser qualitativement et quantitativement la flore présente au moment du prélèvement (transport rapide et stockage de courte durée, conservation à une température comprise entre 0°C et 5°C pendant la durée du transport et du stockage ultérieur); ces basses températures permettent de stabiliser la microflore malgré le développement au ralenti des

micro-organismes psychrotrophes. Cependant, il a été démontré que la conservation aux basses températures négatives (état congelé) exerce un certain effet bactéricide sélectif et est susceptible de modifier qualitativement et quantitativement la microflore de l'échantillon (LEBERT et ROSSERT, 1976); toutefois, cet effet est moins marqué lorsque la congélation est très rapide (surgélation) et lorsque la conservation se fait à une température suffisamment basse (au moins -18°C).

L'effet du froid pouvant engendrer un stress pour les micro-organismes d'exigences nutritives particulières (LEBERT et ROSSERT, 1976), il est souhaitable de laisser séjourner la suspension mère à la température ambiante du laboratoire pendant une demi-heure à une heure avant l'analyse pour minimiser ce risque d'erreur.

2.4.3. Prise d'essai pour analyse

La fraction prélevée pour analyse doit être représentative autant que possible de l'échantillon à analyser. Pour la préparation des suspensions mères, 10 ml ou 10 g de chaque échantillon prélevé sont introduits aseptiquement dans 90 ml de diluant (tryptone-sel, eau peptonée tamponée, eau distillée) stérile. Le diluant ne doit pas induire des variations qualitatives ou quantitatives de la flore microbienne présente; il doit assurer la survie de tous les micro-organismes sans favoriser leur multiplication.

Pour les produits alimentaires contaminés uniquement en surface ou pour lesquels la flore superficielle présente un intérêt particulier pour le contrôle, on procède en règle générale en mettant la surface à analyser en contact avec un diluant approprié, et après agitation, on prélève la suspension microbienne à la pipette. Des procédés de contrôle des surfaces (en particulier la technique d'écouvillonnage) peuvent également être utilisés; un écouvillon de

coton permet alors de prendre les micro-organismes à la surface de l'échantillon et de les mettre en suspension dans un diluant, ou encore de les étaler directement sur un milieu gélosé.

2.4.4. Ajustement de la concentration microbienne aux nécessités

d'analyse: dilution et concentration

- Dilution: A partir de la suspension mère d'un liquide alimentaire, on réalise des dilutions successives en progression géométrique de 10. Le diluant utilisé est en général celui qui a servi à la préparation de la suspension mère.

- Concentration sur membrane filtrante: Il arrive parfois que le niveau de contamination normale par millilitre ou par gramme soit tel que la prise d'essai habituelle (en général 1 ml) du liquide alimentaire ou de la suspension mère soit insuffisante pour permettre un dénombrement ou une évaluation valable. C'est le cas par exemple du contrôle de stérilité de la bière, du vin, de jus de fruits, ou certaines analyses des eaux.. Dans ce cas, on a recours à la filtration sur membrane qui permet alors de concentrer les germes présents dans un volume donné à la surface d'une membrane (généralement en ester de cellulose) de 47 mm de diamètre et ayant une porosité variable en fonction du type de micro-organismes recherchés (0,45 μm de diamètre pour les bactéries et les levures).

Le colmatage de la membrane filtrante par des particules en suspension dans le liquide filtré est un phénomène qui limite le volume filtrable. On peut y remédier soit en réalisant une préfiltration pour éliminer sélectivement les grosses particules, soit en soumettant la suspension à un traitement enzymatique préalable, soit encore en filtrant sous une pression hyperbare (BOURGEOIS et PLUSQUELLEC, 1991).

Dans les pays en voie de développement ainsi que dans certains pays développés, les méthodes classiques de détection et de dénombrement des

micro-organismes sont les plus utilisées pour le contrôle de la qualité des denrées alimentaires. Le dénombrement de la totalité des micro-organismes, sans distinguer ceux qui sont capables de se développer et ceux qui sont morts se fait au moyen des procédés optiques (microscopie). En ce qui concerne la flore viable, on fait appel aux méthodes biologiques qui tiennent compte de la multiplication des germes microbiens (BOURGEOIS et MALCOSTE, 1991).

Toutes ces méthodes classiques de dénombrement ont l'inconvénient de demander une main d'oeuvre très importante ainsi qu'une quantité appréciable de matériels et de consommables pour des délais de réponse relativement longs (24 heures à quelques jours d'incubation).

2.4.5. Techniques globales d'évaluation de la microflore

Elles sont largement décrites par BOURGEOIS et MAFART (1991) et permettent de faire face plus efficacement aux exigences du contrôle microbiologique industriel qui ne sont qu'imparfaitement satisfaites par les procédés classiques de dénombrement. Ces techniques sont basées sur le principe suivant: la population microbienne est évaluée en mesurant à l'aide d'un détecteur sensible, un signal lié à la présence ou à l'activité des micro-organismes, le plus souvent une activité enzymatique ou la concentration d'une molécule (coenzyme, métabolite), ou encore une modification du milieu (variation du pH, du potentiel d'oxydo-réduction, d'impédance, production de chaleur), liée à cette activité.

Parmi toutes ces méthodes, nous parlerons essentiellement de la spectroscopie (ensemble des techniques d'étude et de mesure des rayonnements électro-magnétiques) qui englobe la turbidimétrie, la spectrophotométrie et les méthodes radiométriques, et plus particulièrement de la turbidimétrie qui intéresse notre étude.

La turbidimétrie est un procédé utilisé couramment pour étudier la croissance des micro-organismes (MARCELLIS et coll.,1980; DEAK et BEUCHAT, 1993). Elle peut également offrir des possibilités d'évaluation de la flore totale lors du contrôle microbiologique des aliments. Le principe du procédé est le suivant: si un faisceau lumineux traverse une suspension microbienne, une partie de la lumière incidente est diffusée par les cellules de telle sorte qu'à la sortie on distingue un faisceau central affaibli prolongeant le faisceau incident et un cône de diffusion; la réduction d'intensité du pinceau central à la traversée de la suspension s'exprime par l'absorption $A = \log_{10} I_0 / I$, I_0 et I représentant respectivement l'intensité de la lumière incidente et l'intensité de la lumière émergente. Cette absorption, qui peut être mesurée au photomètre ou au spectrophotomètre est, entre certaines limites, proportionnelle à la "concentration" microbienne de la suspension.

Toutes les techniques rapides d'évaluation globale de la microflore sont susceptibles de participer activement à l'évolution du contrôle microbiologique industriel. Elles sont plus fiables mais présentent quelques inconvénients dont les plus fréquemment évoqués semblent être l'absence de spécificité et le coût relativement élevé des équipements. Compte tenu des difficultés financières des pays en voie de développement qui ne disposent dans la plupart de cas que de petites et moyennes industries agricoles et alimentaires, ces équipements onéreux ne pourraient pas être facilement acquis par ces pays pour les besoins de contrôle microbiologique industriel.

3. Généralités sur les levures

3.1. Définition, morphologie et classification

Les levures sont classiquement définies comme étant des champignons unicellulaires immobiles (BONALY, 1991). Les critères taxonomiques pour leur description standard sont généralement les mêmes pour toutes les espèces.

Ils ont été largement spécifiés et décrits par KREGER VAN RIJ (1984) cités par BOUIX et LEVEAU (1993). Ce sont les caractères morphologiques, physiologiques, biochimiques et quelquefois écologiques et même sexuels pour les espèces sporogènes.

La composition chimique de la paroi, en particulier des polysaccharides, présente des différences chez les Ascomycètes qui contiennent essentiellement des glucanes et des mannanes et un peu de la chitine d'une part, et d'autre part, chez les Basidiomycètes qui contiennent essentiellement des glucanes et de la chitine (BOUIX et LEVEAU, 1993). La composition des polysaccharides des capsules (présence de galactose, xylose, mannose, acide glucuronique,...) permet d'établir des relations taxonomiques entre les souches (PHAFF et SPENCER, 1969, cités par BOUIX et LEVEAU, 1993).

Les levures appartiennent à trois grandes classes de champignons: les Ascomycètes, les Basidiomycètes et une troisième classe, les Deutéromycètes regroupant les formes imparfaites des levures ayant des affinités avec les Ascomycètes ou les Basidiomycètes (tableau 5). A l'intérieur de ces classes, elles sont regroupées en ordre, famille, sous-famille éventuellement, genres et espèces. (tableaux 6, 7 et 8).

Les levures appartenant aux genres *Candida* et *Kloeckera* et qui ont été isolées de nos jus et nectars de fruits sont des Deuteromycètes (tableau 4) de la famille des *Cryptococcaceae*. Aux Etats Unis d'Amérique, TÖROK et KING (1991) ont identifié 239 souches de levures des fruits et légumes partiellement ou entièrement transformés parmi lesquelles *Arthroascus javanensis*, *Aureobasidium pullulans*, *Candida* sp. (*C. ciferii*, *C. colliculosa*, *C. diversa*, *C. famata*, *C. haemulonii*, *C. humicola*, *C. intermedia*, *C. krusei*, *C. lambica*,

C. magnoliae, *C. parapsilosis*, *C. sake*, *C. tropicalis* et *C. versatilis*), *Cryptococcus* sp. (*Cryptococcus albidus*, *Cryptococcus curvatus*, *Cryptococcus flavus*, *Cryptococcus hungaricus*, *Cryptococcus laurentii*, *Cryptococcus luteolus*, *Cryptococcus macerans* et *Cryptococcus neoformans*), *Debaryomyces castellii*, *Debaryomyces hansenii* et *Debaryomyces marama*, *Hanseniaspora guilliermondii* et *Hanseniaspora valbyensis*, *Hansenula anomala*, *Issatchenkia orientalis*, ***Kloeckera apis*** et *Kloeckera japonica*, *Kluyveromyces marxianus* var. *lactis*, *Metschnikowia pulcherrima* et *Metschnikowia reukaufii*, *Pichia membranaefaciens*, *Rhodospiridium infirmo-miniatum*, *Rhodotorula glutinis*, *Rhodotorula minuta* et *Rhodotorula rubra*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Stephanoascus ciferrii*, *Torulaspora delbrueckii*, *Trichosporon adeninovorans*, *Trichosporon cutaneum* et *Trichosporon pullulans*, *Trichosporonoides* sp., *Wickerhamiella domercqii*, *Yarrowia lipolytica*, *Zygosaccharomyces bailii* et *Zygosaccharomyces rouxii*. Parmi ces levures identifiées, *Candida lambica* et *Saccharomyces cerevisiae* étaient les deux espèces les plus retrouvées dans les jus de fruits et de légumes.

La morphologie des levures est très variée (forme levure, pseudomycélium, mycélium). La forme levure est la plus simple des appareils végétatifs (thalle) et selon BONALY (1991), le micro-organisme se présente sous forme de cellules uniques libres indépendantes ou associées deux à deux ayant une morphologie caractéristique (sphérique, ovoïde, cylindrique, apiculée, triangulaire, pyramidale ou en bouteille); c'est la cas par exemple de l'espèce *Kloeckera apiculata* qui est apiculée et qui se multiplie par bourgeonnement bipolaire. Sous cette forme unicellulaire, les dimensions sont de l'ordre de 2,5 à 10,5 µm de large et de 4,5 à 30 µm et plus de long. Chez certaines espèces, on peut observer l'apparition des chaînettes constituées de plusieurs cellules (pseudomycélium) lorsque les cellules filles restent associées les unes aux autres après bourgeonnement de la cellule mère. D'autres espèces

de levures par contre (à l'exemple de *Candida albicans*) ont la propriété de donner un vrai mycélium séparé par des cloisons ou septa; cette différenciation

Tableau 5: Classification des levures dans les Eumycètes (1).

Ascomycètes	
Hémiascomycètes	
Endomycètes	<i>Spermophthoraceae</i> <i>Saccharomycetaceae</i>
Basidiomycètes	
Ustilaginales	<i>Filobasidiaceae</i> Levures formant des teliospores
Tremellades	<i>Sirobasidiaceae</i> <i>Tremellaceae</i>
Deuteromycètes	
Blastomycètes	<i>Cryptococcaceae</i> <i>Sporobolomycetaceae</i>

(1) D'après KREGER VAN RIJ (1984) cités par BOUIX et LEVEAU (1993).

Tableau 6: Classification des levures Ascosporogènes (1).

<i>Spermophthoraceae</i>	<i>Coccidiascus</i> <i>Metschnikowia</i> <i>Nematospora</i>
Saccharomycetaceae	
<i>Schizosaccharomycetoideae</i>	<i>Schizosaccharomyces</i>
<i>Nadsonioideae</i>	<i>Hanseniaspora</i> <i>Nadsonia</i> <i>Saccharomyces</i> <i>Wickerhamia</i>
<i>Lipomycetoideae</i>	<i>Lipomyces</i>
<i>Saccharomycetoideae</i>	<i>Ambrosiozyma</i> <i>Pachysolen</i> <i>Arthroascus</i> <i>Pachyticospora</i> <i>Citeromyces</i> <i>Pichia</i> <i>Clavispora</i> <i>Saccharomyces</i> <i>Cyniclomyces</i> <i>Saccharomycopsis</i> <i>Debaryomyces</i> <i>Schwaniomyces</i> <i>Dekkera</i> <i>Sporopachydermia</i> <i>Guilliermondella</i> <i>Stephanoascus</i> <i>Hansenula</i> <i>Torulaspota</i> <i>Issatchenkia</i> <i>Wickerhamiella</i> <i>Kluyveromyces</i> <i>Wingea</i> <i>Lodderomyces</i> <i>Zygosaccharomyces</i>

(1) D'après KREGER VAN RIJ (1984) cités par BOUIX et LEVEAU (1993).

résulte d'un allongement important des cellules avec prolifération de l'hyphe formée par une croissance apicale. Lorsque le milieu ambiant est défavorable, les levures Ascomycètes, outre la possibilité de se différencier en hyphe, peuvent produire des spores. Le phénomène de sporulation (reproduction

sexuée chez les Ascomycètes et les Basidiomycètes) s'observe aussi bien sous la forme unicellulaire que sous la forme mycélium et confère aux cellules un aspect souvent utile en taxonomie.

Tableau 7: Classification des levures Basidiosporogènes (1).

<i>Filobasidiaceae</i>	<i>Chionosphaera</i> <i>Filobasidiella</i> <i>Filobasidium</i>
<i>Levures formant des teliospores</i>	<i>Leucosporidium</i> <i>Rhodospodium</i> <i>Sporidiobolus</i>
<i>Sirobasidiaceae</i>	<i>Fibulobasidium</i> <i>Sirobasidium</i>
<i>Tremellaceae</i>	<i>Holtermannia</i> <i>Tremella</i>

(1) D'après KREGER VAN RIJ (1984) cités par BOUIX et LEVEAU (1993).

Tableau 8: Classification des levures imparfaites (1).

<i>Cryptococcaceae</i>	<i>Aciculoconidium</i>	<i>Rhodotorula</i>
	<i>Brettanomyces</i>	<i>Sarcinosporon</i>
	<i>Candida</i>	<i>Schizoblastosporion</i>
	<i>Cryptococcus</i>	<i>Sterigmatomyces</i>
	<i>Kloeckera</i>	<i>Symptodiomyces</i>
	<i>malassezia</i>	<i>Trichosporon</i>
	<i>Oosporidium</i>	<i>Trigonopsis</i>
	<i>Phaffia</i>	
<i>Sporobolomycetaceae</i>	<i>Bullera</i>	<i>Sporobolomyces</i>

(1) D'après KREGER VAN RIJ (1984) cités par BOUIX et LEVEAU 1993).

3.2. Physiologie et métabolisme

Les levures sont considérées comme des micro-organismes chimiohétérotrophes car elles puisent leur énergie par dégradation des substances organiques variées.

La voie de dégradation des glucides étant la glycolyse ou voie d'Embden-Meyerhof-Parnas qui convertit les sucres en pyruvate, l'entrée dans cette voie varie selon le glucide tandis que la destinée du pyruvate dépend à la

fois du sucre utilisé et de l'espèce de levure considérée. En se référant au catabolisme du pyruvate formé à partir du glucose, les levures peuvent se subdiviser en aérobies strictes et en anaérobies facultatives. La plupart des levures sont en général anaérobies facultatives et sont capables d'utiliser le glucose en conditions d'aérobiose ou d'anaérobiose (HEIKKIS et ERKKI, 1971; BOTTON, 1991); dans ce dernier cas, le sucre est métabolisé en éthanol par fermentation. Durant la croissance en aérobiose, la respiration et la fermentation contribuent ensemble à la dégradation du glucose, et selon l'importance de ces voies métaboliques, deux sous-groupes de levures peuvent être distingués:

- Les levures de type respiratoire: durant la croissance en présence d'oxygène, moins de 30% de glucose est fermenté. L'intensité respiratoire est élevée (100 à 250 micronmoles d'O₂ consommé par gramme de matière sèche et par minute). Le glucose étant entièrement dégradé en CO₂ et H₂O, le rendement énergétique est élevé, la croissance est rapide et peu de glucose est utilisé pour synthétiser une masse de levures par unité de temps (10 à 40 micronmoles de glucose par gramme de matière sèche et par minute). La majorité des levures appartient à cet ensemble qui inclut presque en totalité les genres *Hansenula* et *Kluyveromyces* ainsi que quelques espèces des genres *Pichia* et *Candida* (BOTTON, 1991).

- Les levures de type fermentaire: durant la croissance en présence d'O₂, la grande partie du glucose est fermentée (souvent plus de 90%). L'intensité respiratoire est faible (5 à 50 micronmoles d'O₂ consommé par gramme de matière sèche et par minute). Le glucose étant complètement oxydé lorsqu'il y a production d'éthanol, le rendement énergétique est faible, la croissance est souvent moins rapide que dans le précédent cas et beaucoup de glucose est utilisé par gramme de matière sèche et par minute (100 à 300 micronmoles). A

ce groupe appartiennent les genres *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, et *Brettanomyces* ainsi que certaines espèces des genres *Candida* et *Kloeckera*.

La distinction entre les types fermentaires et respiratoires ne s'applique qu'à la croissance en aérobiose sur glucose, fructose et mannose (BOTTON, 1991). Ceci s'explique par une répression par les sucres de plusieurs enzymes respiratoires chez les levures qui fermentent. Avec d'autres glucides tels que le galactose et les diholosides, la répression des enzymes respiratoires est diminuée et la respiration intervient pour une grande part dans le catabolisme glucidique. Les levures peuvent également utiliser les polysaccharides comme source de carbone à condition qu'elles possèdent les hydrolases nécessaires à la dépoliarisation de ces composées.

Certaines levures sont aérobies strictes et sont incapables d'utiliser le glucose en absence d'oxygène. Leur métabolisme est par conséquent exclusivement respiratoire et le pyruvate est oxydé par le cycle de Krebs (ou cycle de l'acide citrique ou des acides tricarboxyliques) qui se déroule dans les mitochondries. L'absence d'alcool déshydrogénase (enzyme catalysant la réduction de l'acétaldéhyde en éthanol) peut expliquer dans certains cas l'incapacité de ces micro-organismes à fermenter. Dans ce groupe, on retrouve les genres *Rhodotorula*, *Rhodospiridium*, *Lipomyces*, *Saccharomycopsis*, *Cryptococcus* et *Sporobolomyces*. Quelques espèces appartenant à d'autres genres sont aussi à inclure dans ce groupe: *Candida famata*, *Pichia fluxuum*, *Debaryomyces hansenii* et *Hansenula canadensis* (BOTTON, 1991).

Les levures dans leur très grande majorité sont capables d'utiliser les sources azotées minérales simples mais aussi des composés organiques divers tels que les acides aminés et les peptides (HEIKKI et ERKKI, 1971; BOTTON, 1991). Elles ont des exigences très variées en facteurs de croissance, ceux les plus utilisés étant la biotine, l'acide pantothénique, l'inositol, la thiamine, l'acide nicotinique et le pyridoxine (HEIKKI et ERKKI,

1971). Elles ont également besoin des éléments minéraux (potassium, magnésium, calcium, phosphore, soufre, cuivre, fer, zinc, manganèse,...) pour assurer leur croissance.

Les levures des genres *Candida* et *Kloeckera* sont psychrotrophes, osmotolérantes et osmophiles; elles peuvent donc altérer facilement les fruits et légumes (pois, fraises, framboises,...), les produits à base de fruits et légumes (vins, cidres, jus, pulpes, nectars, concentrés, confitures, marmelades, sirops,...), les aliments réfrigérés, les produits laitiers (crème, fromage, lait, yaourt), les viandes et les poissons (GUY et LARPENT, 1991). Ces mêmes auteurs rapportent que *Kloeckera apiculata* est responsable du ramollissement et de la décoloration des fraises, et que de nombreuses espèces de levures dont *Candida holmii* ont été isolées des concombres altérés.

3.3. Levures pathogènes

Certaines levures peuvent être pathogènes chez l'homme et l'animal et provoquer des maladies de types levuroses ou mycoses à levures. Les espèces de levures reconnues comme pathogènes sont en nombre limité (un peu plus d'une vingtaine); elles sont toutes capables de se développer à 37°C et appartiennent aux genres *Candida* (*C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. pseudotropicalis*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii*, *C. lusitaniae*, *C. zeilanoïdes*, *C. viswanathii*,...), *Cryptococcus* (*Cryptococcus neoformans*,...), *Torulopsis* (*T. glabrata* ou *Candida glabrata*, *T. haemulonii*, *T. candida*, *T. pulcherrima*), *Trichosporon* (*T. cutaneum* ou *T. beigelii*, *T. capitatum*), *Rhodotorula* (*R. glutinis*, *R. rubra* ou *R. mucilaginosa*), *Malassezia* (*M. furfur*, *M. pachydermatis*), *Saccharomyces* (*S. cerevisiae* dans certains cas exceptionnels). Les infections dues aux levures sont sans doute les plus fréquentes et les plus répandues des mycoses. Elles peuvent éventuellement être graves, voire mortelles. Leur symptomatologie comme leur

gravité dépendent à la fois des conditions de réceptivité et résistance de l'hôte ainsi que de la capacité de développement et de l'envahissement du champignon. Le tableau des manifestations pathologiques comprend des infections de la peau (dermatites, intertrigos, onyxis et périonyxis), des muqueuses (stomatites, glossites, oesophagites, vaginites, balanites, atteintes des muqueuses bronchiques et pulmonaires), des organes profonds (endocardites, méningites) ainsi que des septicémies (DROUHET et MARIAT, 1991).

4. Croissance microbienne et modélisation

4.1. Rappels théoriques sur les cinétiques microbiennes

4.1.1. Cinétiques de croissance

La croissance peut être définie comme un accroissement ordonné de tous les composants d'un organisme. Chez les micro-organismes unicellulaires, elle aboutit non pas à une augmentation de taille comme chez les organismes pluricellulaires, mais à une augmentation du nombre d'individus par une division cellulaire (MEYER et coll., 1994). La croissance microbienne se traduit par un appauvrissement du milieu en substrats catabolisables et par un enrichissement en divers métabolites. Les techniques de mesure de cette croissance sont basées sur l'évolution du nombre de micro-organismes ou de leur masse par unité de volume ou de poids du milieu. Les cinétiques sont les évolutions, lors d'une culture discontinue, de la concentration en biomasse sèche, en nombre de cellules viables, en substrats divers et métabolites en fonction du temps. La courbe de croissance est obtenue en traçant l'évolution de la biomasse ou du nombre de cellules viables en fonction du temps $X=f(t)$. Les croissances microbiennes se faisant en général par division binaire, seule une représentation logarithmique permet de mieux distinguer les différentes phases de croissance et de calculer les paramètres d'état (taux de croissance et

temps de génération) qui décrivent le comportement d'une culture discontinue (figure 1 ci-dessous).

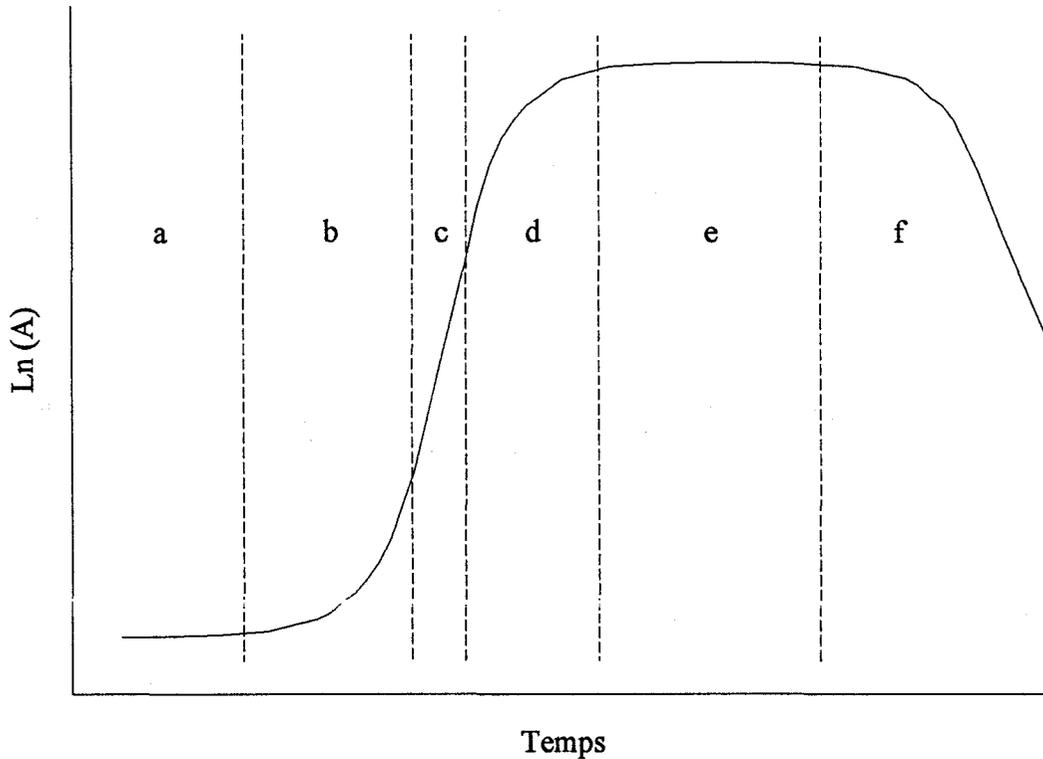


Figure 1: Exemple de cinétique microbienne. Les phases de croissance sont : a) latence (Q_X (ou μ_X) = 0), b) accélération (Q_X augmente), c) phase exponentielle ($Q_{X\text{expo}}$, $A = A_0 \text{ expo}(Q_{X\text{expo}} t)$, Q_X est constant et maximum), d) ralentissement (Q_X diminue car un substrat au moins devient limitant), e) phase stationnaire ($Q_X = 0$), f) mortalité.

Ce graphe représentant le logarithme népérien de la biomasse en fonction du temps permet d'obtenir une zone linéaire (au niveau de la phase c de la courbe) de coefficient directeur k , dont l'équation peut s'écrire:

$$\text{Ln}X = \text{Ln}X_0 + k(t-t_0) \quad (1), \text{ où } X_0, t_0 \text{ et } k \text{ sont des constantes.}$$

En tout point de la courbe $X=f(t)$, l'accroissement de la biomasse peut donc être exprimé en terme de vitesse. La vitesse de croissance est définie selon la relation:

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

Elle peut être exprimée en biomasse par unité de volume et par unité de temps. Lorsque l'espèce microbienne le permet, on pourrait également l'exprimer en nombre de cellules par unité de volume et par unité de temps. Dans cette expression de la vitesse, μ_x est un facteur dépendant du germe microbien et des conditions de culture. Ce facteur représente la vitesse spécifique de croissance également notée Q_x . Le taux de croissance μ_x doit être déterminé pendant la phase exponentielle de croissance au cours de laquelle il est maximal et constant. Dans ce cas précis, on peut écrire la relation suivante:

$$\ln X - \ln X_0 = \mu_x(t-t_0), \text{ ou encore } X = X_0 e^{\mu_x \cdot (t-t_0)} \quad (2)$$

Différentes phases de la courbe de croissance peuvent être ainsi définies:

- La phase a de la courbe (ou phase de latence) où $X=X_0$ est caractérisée par $\mu_x=0$. Elle dure plus ou moins longtemps selon les cas et parfois même n'existe pas, la culture démarrant immédiatement en phase exponentielle.
- La phase b ou phase d'accélération: X et μ_x augmentent.
- La phase c ou phase exponentielle où X augmente en fonction du temps de façon exponentielle, $\ln X$ proportionnel à t et où μ_x atteint la valeur maximale (taux de croissance) dans les conditions expérimentales données; elle est alors notée $\mu_{x\text{expo}}$. Pour la calculer, on déterminera la pente de la droite correspondant à cette phase en prenant deux points d'abscisses t_1 et t_2 durant la dite phase, et de coordonnées respectives X_1 et X_2 . En appliquant la relation (2) on obtiendra:

$$\mu_{x\text{expo}} = (\ln X_2 - \ln X_1) / (t_2 - t_1)$$

Pendant cette phase, on définit le temps de génération, noté G , qui exprime le temps correspondant à un doublement de la biomasse (ou à un doublement de la population). On peut l'exprimer mathématiquement (X passant de X_0 à $2X_0$) d'après l'équation (2) par:

$$G = t - t_0 = \ln 2 / \mu_{x\text{expo.}}$$

Pour déterminer graphiquement G sur la courbe $\ln X = f(t)$, on prend deux points en phase exponentielle d'ordonnées respectives $\ln X_1$ et $\ln 2X_1$; la différence des abscisses correspondantes donnera la valeur du temps de génération G .

- La phase d ou phase de décélération pendant laquelle l'augmentation de X ralentit et μ_x diminue.
- La phase e ou phase stationnaire pendant laquelle X est à son maximum et $\mu_x=0$.
- La phase f ou phase de mortalité au cours de laquelle le nombre de cellules vivantes diminue avec la mort des cellules et où $\mu_x < 0$.

4.1.2. Cinétique de consommation d'un substrat ou de production d'un métabolite

La courbe de consommation et de formation rend compte de l'évolution des concentrations en différents substrats et produits carbonés ou azotés pendant la culture (figure 2).

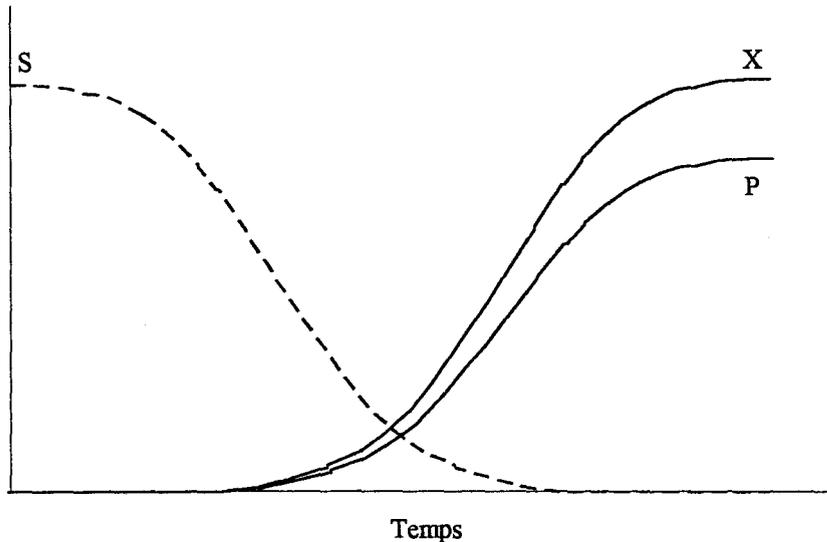


Figure 2 : Exemple de cinétique d'utilisation d'un substrat et de formation d'un produit par rapport à la croissance. avec : S = concentration en substrat g.l^{-1} , P = concentration en produit g.l^{-1} t = temps de culture, X = concentration en biomasse sèche g.l^{-1}

Les vitesses de consommation d'un substrat et de formation d'un produit sont données respectivement par les équations:

$$r_s = dS/dt \text{ et } r_p = dP/dt$$

L'équation de PIRT donne la relation entre ces deux équations. Elle utilise des constantes et des paramètres cinétiques; les variables X et P étant les concentrations respectives en biomasse et en produit, cette équation s'écrit:

$$dS/dt = (1/Y_{X/S})(dX/dt) + mX + (1/Y_{P/S})(dP/dt)$$

Etant donné que $\mu_x = (dX/dt)(1/X)$, cette équation devient:

$$dS/dt = \mu_x X / Y_{X/S} + mX + (1/Y_{P/S})(dP/dt), \text{ avec}$$

$Y_{X/S}$ = rendement maximal limite de croissance.

$Y_{P/S}$ = rendement maximal limite de conversion du substrat en produit.

m = coefficient de maintenance en h^{-1} ; il représente la vitesse spécifique d'utilisation du substrat pour conserver la structure cellulaire en absence de croissance.

Ces rendements s'expriment en gramme de biomasse (ou de produit) formée par gramme de substrat réellement utilisé pour faire de la biomasse (ou

du produit). Y peut changer pendant la croissance. La biomasse comprend ici la biomasse constitutive et les enzymes de croissance. Cette équation est facilement applicable si Y , m et μ_x sont constants pendant la période considérée.

4.2. Plans d'expériences et modélisation

Les principes de biométrie appliquée à la modélisation des phénomènes biologiques, et qui ont été suffisamment discutés ces dernières années (McMEEKIN et *coll.*, 1993; TOMASSONE et *coll.*, 1993), sont largement utilisés de nos jours en microbiologie prévisionnelle.

La croissance microbienne est un phénomène très complexe. Elle fait intervenir un grand nombre de réactions dépendantes des facteurs extérieurs chimiques, physico-chimiques ou physiologiques susceptibles d'avoir des interactions les unes par rapport aux autres. Il y a encore quelques années, il était impossible de déterminer les conditions optimales de croissance d'un micro-organisme sans réaliser un grand nombre d'études de croissance microbienne qui souvent ne prenaient pas en compte les interactions entre les facteurs extérieurs.

De nos jours, les laboratoires de recherche et de développement industriel, sans cesse confrontés au contexte d'innovation et de création de nouveaux produits, sont amenés à réaliser des études de microbiologie prévisionnelle et de modélisation devant les aider à prévoir le comportement d'un micro-organisme ou d'un groupe de micro-organismes donnés dans un environnement particulier sans pour autant mettre en oeuvre des analyses microbiologiques lourdes et coûteuses. En effet, l'application des méthodes mathématiques et statistiques à l'étude de la croissance microbienne conduit rapidement à un résultat exploitable sans pour autant réaliser un grand nombre d'analyses. Le développement de cette microbiologie prévisionnelle a largement été facilité par la micro-informatique qui a mis des moyens de calcul

nécessaires, c'est-à-dire des logiciels de plus en plus puissants et d'utilisation simple, à la disposition des laboratoires et des entreprises.

4.2.1. Plans d'expériences

Ils permettent l'étude d'un phénomène soumis à l'action de plusieurs variables. 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, les valeurs seront choisies en fonction du domaine à explorer. Dans tous les cas, les différentes valeurs choisies pour l'ensemble des variables dépendront du nombre maximal d'expériences pratiquement réalisables. Très souvent, toutes les variables agissant sur le phénomène ne peuvent pas être prises en compte; seules les variables jugées importantes seront alors examinées. Ceci constitue une première source d'erreur dans l'interprétation d'un plan d'expériences, la deuxième étant le niveau de précision dans la mesure de la valeur d'une variable. Il est donc important de prendre toutes ces remarques en considération lorsqu'on doit mettre sur pied un plan d'expériences pour un essai; celui-ci doit conduire au résultat avec une certaine chance de succès sans toutefois exiger un nombre très important d'essais.

Les variables peuvent être de deux types et conditionner le choix du plan d'expériences:

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

- 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 alors que pour certaines valeurs ainsi que pour toutes ou une partie de leurs combinaisons.

Dans ce cas, il n'est pas nécessaire de faire une hypothèse sur la loi régissant le phénomène.

Les deux types de variables peuvent être associés dans un même 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. Seuls les plans à variables stratifiées intéressent notre étude.

4.2.2. Les différents types de plans à variables stratifiées

Les plans à variables stratifiées sont très étendus. Les plus utilisés sont les plans orthogonaux car leur analyse paraît nettement plus facile que celle des plans non orthogonaux.

Les plans orthogonaux peuvent à leur tour être subdivisés en plans factoriels, latins, multifactoriels, greco-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 pas d'hypothèse sur la négligibilité des interactions sauf sur celle d'ordre le plus élevé. Le plan factoriel peut se faire avec répétition, le nombre d'essais est alors multiplié par le nombre de répétitions. Il permet l'étude de toutes les interactions possibles et a l'avantage d'être sans risque dans l'étude d'un phénomène. Il nécessite malheureusement 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, le nombre maximal de facteurs qu'il est possible d'introduire du point de vue combinatoire étant $f=(n-1)/(p-1)$ où n et p sont respectivement le nombre d'essais et le nombre de niveaux commun à tous les facteurs.

4.3. Modèles mathématiques

Un modèle est fait pour simuler le phénomène que l'on veut analyser, par une équation mathématique établie à partir des résultats expérimentaux (ANON, 1990; DUQUENOY, 1993; McMEEKIN et *coll.*, 1993; TOMASSONE et *coll.*, 1993, SKINNER et *coll.*, 1994). Cette équation peut faire intervenir les différents paramètres que l'on souhaite étudier ainsi que les interactions possibles entre ceux-ci. Cette équation qui s'obtient généralement par régression linéaire multiple (HUET et *coll.*, 1992; TOMASSONE et *coll.*, 1993) ou par les formules des modèles existant dans la littérature (GOMPertz, 1825; ARRHENIUS, 1889; SCHOOLFIELD et *coll.*, 1981; RATKWOSKY et *coll.*, 1982; DAVEY, 1989; JOLICOEUR et PONTIER, 1989; ZWIETERING et *coll.*, 1990) sera du type:

$$Y = f[(X_0, T, \text{pH}, a_w, \dots)]$$

Contrairement à l'analyse microbiologique statique qui est un moyen de certification de la qualité, la microbiologie prévisionnelle qui est un outil interne à l'entreprise n'est pas astreinte à l'utilisation des méthodes officielles d'analyses et peut avantageusement recourir aux méthodes rapides telles que l'impédancemétrie, la turbidimétrie, etc...

4.3.1. Valeur à mesurer

La valeur à mesurer doit être quantifiable et ne pas présenter une réponse "tout ou rien". En microbiologie, on peut mesurer la production d'un produit de synthèse, le taux de croissance, la production de biomasse ou le nombre de contaminants. 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 choisie se rapproche le plus possible des conditions réelles tout en restant simple dans son application.

4.3.2. Choix d'un modèle

Le choix d'un modèle mathématique est souvent arbitraire car plusieurs modèles peuvent convenir à une même 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.

4.3.3. Les différents modèles proposés dans la littérature

4.3.3.1. Modèles de croissance

Le modèle le plus simple est celui qui, à un seul paramètre, ne rend compte que de la phase exponentielle de la croissance. A l'intervalle de temps régulier t , une cellule se scinde en deux ou donne naissance à un bourgeon. La cinétique de croissance s'écrit alors:

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

Historiquement, la première amélioration apportée à ce premier modèle fut l'introduction d'un second paramètre rendant compte du niveau maximal atteint par la population microbienne et décrivant la phase stationnaire. Ce second paramètre est la concentration cellulaire maximale X' atteinte en fin de croissance avec $v = \text{Ln}(X'/X_0)$.

Si l'arrêt de la croissance s'explique par la disparition d'un substrat limitant, le modèle de MONOD (qui a largement été utilisé) peut être appliqué à partir de l'équation différentielle suivante:

$$dX/dt = [\mu_{\max} X] [S/(S+K)], \text{ avec}$$

- . S la concentration en substrat limitant
- . K la "constante de saturation" de Monod.

Alors que les modèles intégrant seulement la phase exponentielle de croissance et la phase stationnaire ont tous un caractère analytique, voire explicatif (même s'ils partent d'une équation différentielle empirique), les

modèles intégrant en plus la phase de latence ne sont que purement descriptifs et ne sont obtenus que par ajustements à des courbes expérimentales.

Parmi ces derniers, le plus simple est le modèle "trilinéaire" qui introduit un troisième paramètre λ (durée de la phase de latence). Ce modèle se décompose en trois domaines représentés chacun par un segment de droite:

- Phase de latence pour $t < \lambda$: $x=0$
- Phase de croissance exponentielle pour $\lambda < t < (\lambda + v/\mu)$: $x = \mu(t - \lambda)$.
- Phase stationnaire pour $t > (\lambda + v/\mu)$: $x = v$.

Dans ce modèle, les paramètres λ , μ et v sont déterminés séparément et de manière indépendante. A première vue, le modèle trilinéaire qui "stylise" l'allure de la courbe de croissance en trois segments de droite pourrait paraître suffisant pour les besoins de la microbiologie. Dans la pratique, deux difficultés apparaissent:

- Il est parfois difficile de trouver dans la phase exponentielle de croissance une zone vraiment linéaire. Même si celle-ci existe plus ou moins, sa détermination risque d'être arbitraire.

- D'autre part, il est toujours très difficile de déterminer expérimentalement avec précision la valeur d'une grandeur qui, par essence, est asymptotique, ce qui est le cas du niveau maximal de concentration cellulaire.

Aussi on s'oriente de plus en plus vers des fonctions à trois ou à quatre paramètres épousant l'allure sigmoïdale de la courbe de croissance. Les paramètres entrant dans le modèle sont alors déterminés simultanément par régression non linéaire. Dans certains cas, ces paramètres peuvent être transformés de manière à leur donner une signification biologique. On parle alors de "reparamétration". Parmi ces modèles, les plus utilisés actuellement sont:

a) La fonction logistique: elle est représentée par une courbe sigmoïdale symétrique par rapport au point d'inflexion et se présente de la forme:

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

Celle-ci a été reparamétrée (ZWIETERING et coll., 1990) en:

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

b) La fonction de GOMPERTZ

GOMPERTZ en 1825 a proposé un modèle rendant compte de la mortalité humaine en fonction de l'âge. La courbe est sigmoïde, asymétrique par rapport au point d'inflexion. L'équation est de la forme:

$$Y = a \cdot \exp[-\exp(b - cx)]$$

Il existe d'autres modèles dont certains ont été revus par ZWIETERING et coll.(1990), et qui ont par ailleurs introduit des paramètres avec significations microbiologiques pour la phase de latence, le taux de croissance maximal et la population maximale. Le modèle reparamétré est de la forme:

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

JOLICOEUR et PONTIER(1989) ont également proposé un modèle à quatre paramètres prenant en compte la phase de déclin en plus des trois autres, sans qu'il soit possible de donner le moindre sens physique aux paramètres impliqués. L'équation s'écrit:

$$X = 1/(Ce^{kt} + C'e^{-kt})$$

4.3.3.2. Modèles secondaires

Soit K l'un des paramètres entrant dans le modèle principal. Celui-ci

dépend d'un certain nombre de facteurs (dont principalement la température, unique facteur étudié par certains modèles) qui constituent les variables d'une modélisation secondaire.

a) Modèle d'ARRHENIUS et dérivés

Etudiant l'effet de la température sur les cinétiques de réactions chimiques, le modèle d'ARRHENIUS(1889 et 1915) s'écrit:

$$K=K_0e^{-Ea/RT}, \text{ avec}$$

T: température absolue

R: constante des gaz parfaits

Ea: énergie d'activation

K_0 : constante cinétique à la température T_0

K: constante cinétique à la température T.

En supposant implicitement que le taux de croissance d'un micro-organisme est limité par une réaction enzymatique unique, et en l'appliquant au taux de croissance microbien, l'équation ci-dessus devient:

$$\mu = \mu_0 e^{-Ea/RT}$$

Cette loi simple est en fait souvent en défaut et n'apparaît valide que dans une plage étroite de température. L'énergie d'activation n'est pas constante mais augmente lorsque la température diminue. De nombreux modèles dérivés de celui d'ARRHENIUS ont été proposés et décrits par RATKOWSKY et coll.(1991), à l'instar de celui proposé par EYRING (1935) dont l'équation s'écrit

$$\mu = \mu_0 T e^{-Ea/RT}$$

Le modèle proposé par DAVEY(1989) est une forme à la fois modifiée et généralisée du modèle d'ARRHENIUS, dans la mesure où il fait intervenir, en plus de la température, l'activité de l'eau. Ce modèle de type "additif" présuppose qu'il n'y a pas d'interactions entre la température et l' a_w et s'écrit:

$$\ln(K) = C_0 + C_1/T + C_2/T^2 + C_3a_w + C_4(a_w)^2$$

Plus léger que celui de SCHOOLFIELD et plus robuste qu'un modèle polynomial, le modèle de DAVEY est plus facile à ajuster. En contre partie, il ne fournit pas les limites de T et a_w , et ses coefficients ne présentent aucune signification physique.

b) Le modèle de SCHOOLFIELD

Le modèle de SCHOOLFIELD (1981) repose sur les hypothèses suivantes: une seule réaction enzymatique est limitante, la quantité d'enzymes dans la cellule reste constante, la réaction enzymatique limitante obéit à une cinétique d'ordre zéro, la réaction enzymatique est inactivée aux températures éloignées de la température optimale et les cinétiques d'inactivation (aux basses ou aux hautes températures) obéissent à la loi d'ARRHENIUS. L'équation s'écrit:

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

μ_{\max} : Taux de croissance maximal

T_{opt} : Température optimale de croissance

$T_{1/2}$: Température inférieure à T_{opt} pour laquelle $\mu=(1/2) \cdot \mu_{\max}$.

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

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

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

Le même modèle est appliqué au calcul du temps de latence en remplaçant μ par $K = 1/\lambda$.

La valeur prédictive du modèle de SCHOOLFIELD, unanimement reconnue, en fait sa force essentielle. Toutefois, le modèle n'est pas linéarisable, et sa relative complexité (7 paramètres) qui explique en partie son

efficacité ne justifie pas, selon McMEEKIN et *coll.*(1989) et DAVEY(1989), son intérêt explicatif. Toutefois, ADAIR et *coll.*(1989) avaient auparavant trouvé ce modèle très indiqué pour une description efficace des données expérimentales, contrairement au modèle des "racines carrées" qui déviait significativement les données observées aux basses températures.

BROUGHALL et *coll.*(1983) en étudiant l'effet de l'activité aqueuse du milieu de croissance sur les paramètres entrant dans le modèle de SCHOOLFIELD ont proposé les équations suivantes:

$$\text{Ln}(\mu_{\text{max}}) = F_1 + G_1 (a_w - 0,95)$$

$$E = F_2 + G_2 (a_w - 0,95)$$

$$\text{Ln}(-E') = F_3 + G_3 (a_w - 0,95)$$

$$T_{1/2} = F_4 + G_4 (a_w - 0,95)$$

c) Modèle de RATKOWSKY et dérivés ou "modèle de la racine carrée"

Le modèle de RATKOWSKY et *coll.*(1982) s'écrit:

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

b: constante

T_{min}: température minimale de croissance (caractéristique intrinsèque d'une souche microbienne).

Le succès de ce modèle, adopté par de nombreux auteurs, s'explique par sa simplicité et son efficacité puisque sa valeur descriptive s'est avérée très bonne pour de nombreuses souches bactériennes. Toutefois, dans sa forme originelle, il ne peut s'appliquer qu'aux températures comprises entre la température minimale et la température optimale de croissance. Des modifications ont été apportées pour généraliser ledit modèle (RATKOWSKY et *coll.*, 1983), et l'équation devient:

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

T_{max}: température maximale de croissance et c une constante.

En cherchant à valider ce modèle généralisé pour l'étude de la croissance d'*Escherichia coli* sur différents milieux, GILL et PHILIPS (1985) constatent dans certains cas une divergence importante entre les valeurs de T_{min} et T_{max} déterminées par ajustement selon le modèle d'une part, et déterminées par expérimentation directe d'autre part. Cette non concordance occasionnelle n'enlève rien au bon accord entre les valeurs des taux de croissance calculées et les valeurs expérimentales.

McMEEKIN et coll.(1987) intègrent l'activité aqueuse du milieu dans le modèle de RATKOWSKY par l'équation:

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

La même démarche a été adoptée par ADAMS et coll.(1991) pour l'effet de pH avec l'équation:

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

Les modèles de SCHOOLFIELD et de RATKOWSKY paraissent difficiles à départager selon des critères purement statistiques mais ZWIETERING et coll.(1991) préfèrent le dernier en raison de son nombre plus faible de paramètres et de sa stabilité. ADAIR et coll.(1989) ont toutefois obtenu de bons résultats avec le modèle de SCHOOLFIELD.

Gênés par le fait que l'équation de RATKOWSKY prévoit des taux de croissance positifs pour des températures supérieures à T_{max}, ZWIETERING et coll.(1991) ont proposé les modifications suivantes:

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

Ces mêmes auteurs préconisent, pour le calcul de la concentration microbienne (celle-ci étant pratiquement constante aux basses températures), l'utilisation du modèle de RATKOWSKY sous la forme simplifiée suivante:

$$v = b[1 - e^{c(T - T_{max})}]$$

Enfin, pour le calcul du temps de latence, ces auteurs s'inspirant d'un modèle hyperbolique proposé par ADAIR et *coll.*(1989), préconisent l'équation

$$\text{Ln}(\lambda) = P/(T - q).$$

d) Modèles multifactoriels

Très différents des précédents, ces modèles sont basés sur des régressions multiples non linéaires du second degré (modèle "quadratique") ou de troisième degré (modèle "cubique"). Par exemple un modèle quadratique à trois facteurs X_1 , X_2 , et X_3 s'écrit (X_n étant les facteurs étudiés):

$$Y = a + bX_1 + cX_2 + dX_3 + eX_1X_2 + fX_1X_3 + gX_2X_3 + hX_1X_2X_3 + iX_1^2 + jX_2^2 + kX_3^2$$

Ce type de modèle présente trois avantages essentiels:

- Le nombre de facteurs étudiés n'est pas en principe limité; on peut par exemple faire intervenir dans un seul modèle la température, le pH, l' a_w , la teneur en sel, etc...

- Le modèle dégage les interactions éventuelles entre les facteurs étudiés.

- On obtient généralement une bonne fidélité avec les valeurs expérimentales.

En contre partie, de tels modèles deviennent rapidement très complexes lorsque le nombre de facteurs étudiés est important et posent des problèmes de fragilité (BRATCHELL et *coll.*, 1989; PALUMBO et *coll.*, 1991). C'est ainsi que les auteurs des modèles multifactoriels ont tendance à valider leurs équations avec d'autres résultats expérimentaux obtenus dans les mêmes

conditions, tout en comparant à d'autres modèles issus d'expériences différentes (LITTLE et *coll.*, 1992), car ces modèles supportent parfois mal les changements, même négligeables, de conditions expérimentales.

Des modifications du paramètre modélisé peuvent améliorer le modèle. De nombreux auteurs (GIBSON et *coll.*, 1988; BRATCHELL et *coll.*, 1989; ZAIKA et *coll.*, 1992; MEMBRE et BURLOT, 1994) ont recours à la transformation de μ en $\ln(\mu)$.

5. Thermorésistance

La destruction des micro-organismes par la chaleur est la méthode de conservation la plus utilisée en industries agricoles et alimentaires. Elle a pour but de détruire les formes végétatives et de neutraliser les formes nuisibles à la bonne conservation de produit (pasteurisation), ou de détruire tous les micro-organismes, y compris les spores (stérilisation) qu'il comporte (COURTOISIER, 1984; BANCE, 1990; LELIEVELD et *coll.*, 1992). En détruisant la grande partie des micro-organismes et en inactivant les enzymes, la pasteurisation permet de mieux conserver et de stabiliser les qualités organoleptiques de la plupart des denrées alimentaires à l'exemple des jus et nectars de fruits.

5.1. Théorie et lois de destruction thermique des micro-organismes

Comme pour les autres micro-organismes, ceux présents dans les pulpes, jus et nectars de fruits obéissent aux lois de destruction thermique des micro-organismes. Ces lois sont expliquées par de nombreux auteurs (COURTOISIER, 1984; FELLOW, 1988; MAFART, 1991; TOLEDO, 1994).

5.1.1. Première loi de la thermorésistance

Lorsqu'on porte une suspension homogène de micro-organismes (formes végétatives ou spores) à une température létale, il se produit en fonction du temps une diminution du nombre de micro-organismes vivants

capables de se multiplier dans les conditions normales. Expérimentalement, ce phénomène de destruction suit très généralement la loi de cinétique de réaction du premier ordre, autrement dit, la vitesse de destruction du micro-organisme, à un instant donné, est proportionnelle au nombre de cellules vivantes à cet instant (COURTOISIER, 1984; FELLOW, 1988; MAFART, 1991; TOLEDO, 1994). Ceci peut être exprimé par l'équation différentielle:

$$dN/dt = -kN, \text{ avec}$$

. N: nombre de cellules vivantes par litre (ou par kilogramme) du produit au début du chauffage.

. dN: réduction de la population microbienne au cours du traitement de durée t.

.k: vitesse relative de destruction thermique (appelée également constante de vitesse de réaction à une température donnée en secondes ou en minutes).

L'équation ci-dessus peut également s'écrire $dN/N = -kdt$ (1).

La courbe des variations de la concentration des cellules vivantes en fonction du temps à une température donnée est de la forme suivante (figure 3 ci-après).

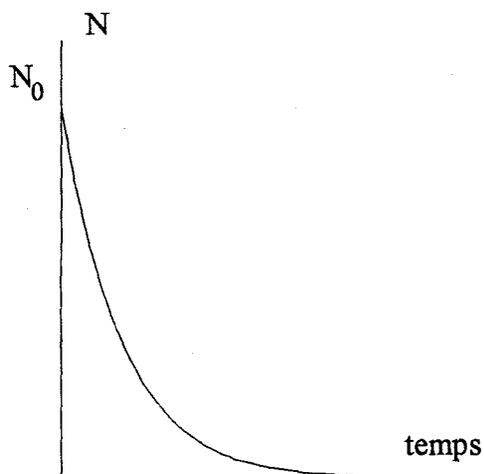


Figure 3: Allure de la destruction d'une population microbienne en fonction du temps, pour une température létale et constante.

En intégrant l'équation (1) entre les limites du nombre de micro-organismes vivants N_0 au temps $t=0$ et du nombre de micro-organismes vivants N_1 après un temps t de traitement à température constante, on obtient

$$\int_{N_0}^N \frac{dN}{N} = -k \int_0^t dt, \text{ soit } \text{Ln}(N_0) - \text{Ln}(N) = kt$$

En passant aux logarithmes décimaux, on obtient:

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

N_0/N et $\log(N_0/N)$ sont respectivement considérés comme étant "la réduction de la population" et "l'efficacité".

Il en résulte une relation linéaire entre le logarithme du nombre de cellules survivantes et la durée du traitement thermique. La figure 4 ci-dessous présente les variations du logarithme de la concentration en cellules microbiennes survivantes en fonction du temps; la droite obtenue porte le nom de "courbe de survie".

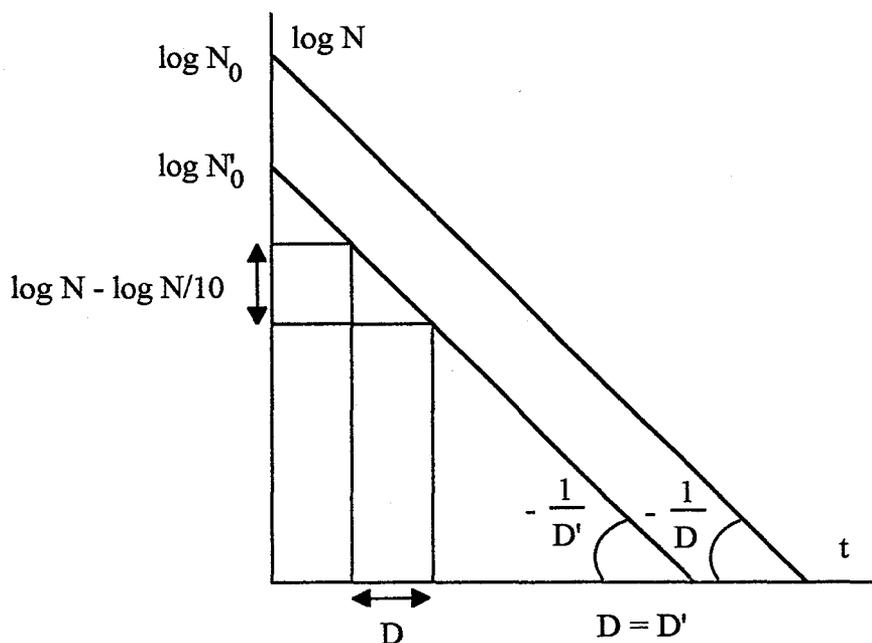


Figure 4: Courbes de survie à la même température montrant l'influence du temps de traitement thermique sur le nombre de cellules microbiennes survivantes.

L'équation (2) peut aussi s'écrire sous la forme:

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

A partir de cette droite, il est possible de calculer la durée de traitement D pour laquelle 90% de la population des cellules microbiennes vivantes est détruite (c'est-à-dire pour avoir $N = N_0/10$). On obtient $D = 2,302/k$ et l'équation devient alors:

$\log N = \frac{-t}{D} + \log N_0$ qui est une fonction linéaire pouvant également s'écrire sous la forme exponentielle $N = N_0 \cdot 10^{-t/D}$ (3).

Cette équation est la première loi de la thermorésistance. D est communément appelé la durée de réduction décimale et représente le temps de traitement pour lequel la population des cellules vivantes est divisée par 10 (ou pour lequel la proportion des cellules détruites est de 90%); il est défini pour une température donnée T et est désigné par D_T .

Cette équation montre que le temps de destruction totale des micro-organismes dépend du nombre de cellules microbiennes présentes au départ. Par conséquent, les barèmes et l'efficacité de pasteurisation des jus et nectars de fruits dépendront donc de la charge microbienne des matières premières et des adjuvants utilisés pour la fabrication.

5.1.2. 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 5).

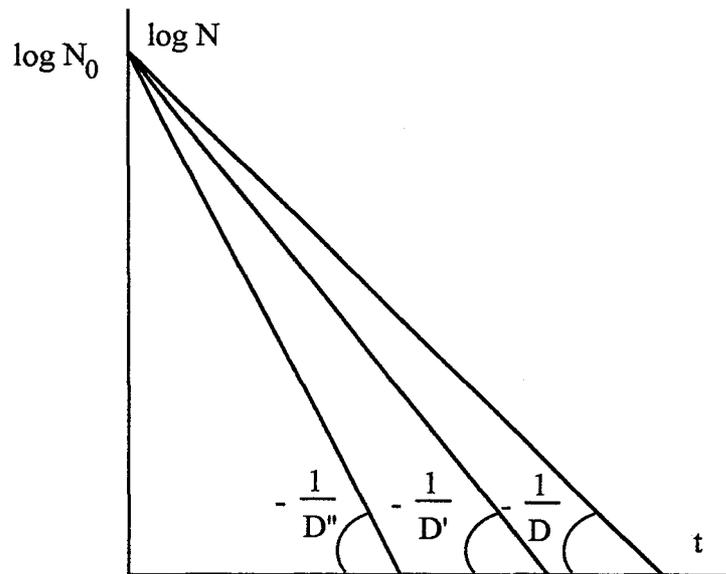


Figure 5 : courbes de survie à différentes températures

On remarque que la vitesse de destruction des micro-organismes augmente avec la température. Par conséquent, D_T diminue quand la résistance du micro-organisme diminue et quand la température T augmente.

Pour quantifier les traitements thermiques, on utilise souvent des températures fixées arbitrairement à $121,1^\circ\text{C}$ pour la stérilisation et à 60°C pour la pasteurisation ($D_{121,1}$ et D_{60} respectivement).

En reportant le logarithme de D_T en fonction de la température, on obtient une droite appelée "courbe des relations température-temps" dont l'équation s'écrit:

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

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

Cette équation peut également s'écrire sous la forme:

$$\log\left(\frac{D_T}{D_{ref}}\right) = \frac{T_{ref} - T}{z}, \quad \text{soit} \quad \log\left(\frac{D_T}{D_{60}}\right) = \frac{60 - T}{z} \quad \text{et}$$

$$\log\left(\frac{D_T}{D_{121,1}}\right) = \frac{121,1 - T}{z} \quad \text{respectivement pour la pasteurisation et la stérilisation.}$$

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 6):

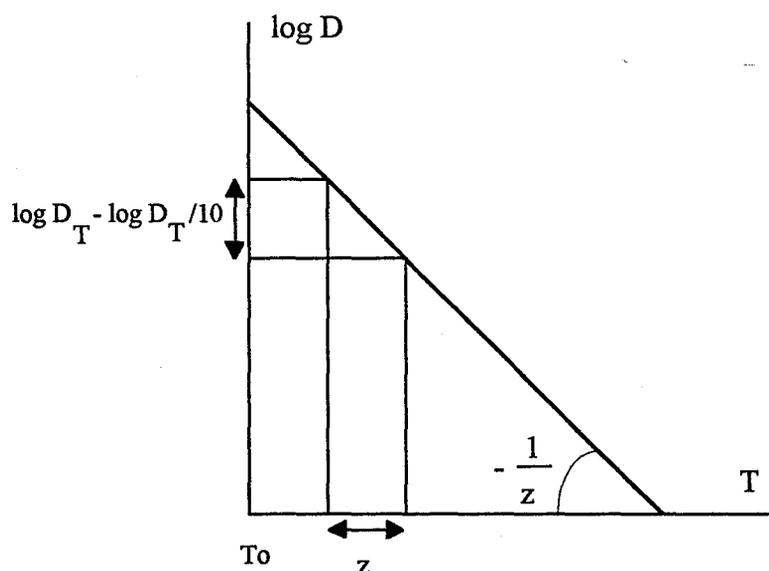


Figure 6: Courbe des relations température-temps donnant une réduction de population microbienne.

z est caractéristique de chaque espèce de micro-organisme; ces valeurs, moins fluctuantes que celles de D , sont généralement de l'ordre de 4°C à 7°C pour les formes végétatives et de l'ordre de 10°C pour les spores bactériennes (MAFART, 1991).

5.1.3. Courbe de TDT

Le temps de destruction thermique (TDT) pour une souche pure de micro-organisme correspond au temps nécessaire pour réduire une population de cette souche de concentration donnée dans un milieu de pH donné. Le TDT

est compris entre le temps le plus long où l'on observe des survivants et le temps le plus court où l'on obtient une stérilité du milieu; il est donc fonction du nombre initial de micro-organismes et diminue lorsque la température augmente. Dans la pratique, une seule réduction décimale ne suffit pas pour éliminer la totalité des micro-organismes présents dans un milieu donné. Il faudrait donc considérer un certain nombre de réductions décimales; on parlera alors de relation temps-température (TRT_n) de $n^{\text{ième}}$ réduction décimale; n est choisi en fonction des critères technologiques et doit garantir la stérilité pratique du produit sans apporter des modifications physico-chimiques, nutritionnelles et organoleptiques significatives. En rapportant sur le graphique le logarithme des temps nécessaires pour obtenir une $n^{\text{ième}}$ réduction décimale (soit $n.D_T$) en fonction de la température, quelque soit n , on obtient une droite parallèle à celle de la figure 6. 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 ; à l'inverse en dessous de la droite, les couples température-temps ne sont pas suffisants pour donner une réduction correspondant à la $n^{\text{ième}}$ réduction décimale.

5.1.4. Notion de valeur pasteurisatrice

La valeur pasteurisatrice est définie comme étant le temps nécessaire pour une réduction décimale à une température donnée, d'un micro-organisme caractérisé par une valeur donnée de z (STUMBO, 1973; ROSSET et POUMEYROL, 1986; MULAK *et coll.*, 1995).

5.2. Facteurs modifiants les valeurs de D et de z

Les valeurs de D_T et de z varient très largement avec la nature physico-chimique du milieu d'environnement du micro-organisme (MAFART, 1991) et

un grand nombre de facteurs peut plus ou moins modifier la thermorésistance des germes microbiens (MOLZAHN et *coll.*, 1983; SPLITTSTOESSER et *coll.*, 1986; MULAK et *coll.*, 1995).

5.2.1. Souche du micro-organisme

La thermorésistance varie selon les espèces et peut également varier selon les souches d'une même espèce. La sporulation qui est une forme de résistance ne se déclenche chez les micro-organismes possédant cette propriété que lorsque l'environnement devient défavorable à ces derniers. Les germes sporulés seront donc beaucoup plus thermorésistants que les formes végétatives (GOULD et DRING, 1975; PECK et *coll.*, 1995). Les micro-organismes thermophiles sont également plus thermorésistants que les mésophiles et les psychrotrophes. La structure de la paroi des germes à Gram positif les rendrait également plus thermorésistants que les germes à Gram négatif. A cela peuvent s'ajouter des différences dues à l'état physiologique des cellules, car l'âge aurait une influence sur la thermosensibilité de celles-ci. Pendant les phases de latence et les phases stationnaires, la thermorésistance des germes microbiens serait également plus élevée que lors de phases exponentielles de croissance.

L'étude des micro-organismes thermorésistants des jus de raisin (LEUNG et *coll.*, 1982) a montré que les valeurs de z étaient respectivement de $7,68 \pm 0,14^{\circ}\text{C}$, $5,62 \pm 0,51^{\circ}\text{C}$ et $5,44 \pm 0,01^{\circ}\text{C}$ pour *Lactobacillus mesenteroides*, pour une espèce de levure pigmentée et pour une espèce de levure non pigmentée isolés de cette boisson.

5.2.2. Conditions de culture

Les travaux de 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 comme dans l'autre suivant la souche choisie. Par ailleurs, les

micro-organismes qui ont déjà été soumis à un choc thermique sont plus thermorésistants (MACKEY et DERRICK, 1986). Toutefois, il a été démontré que la composition du milieu chauffé pouvait réduire le taux de croissance des micro-organismes thermorésistants revivifiables présents (TRUONG-MEYER et STREHALANO, 1994), et que le taux d'oxygénation dans les vins n'interviendrait pas sur la destruction thermique des micro-organismes présents mais plutôt sur leurs qualités organoleptiques (COURTOISIER, 1984).

5.2.3. pH

Les valeurs de D et z varient très largement avec la nature physico-chimique du milieu environnemental du germe microbien, et en règle générale, les micro-organismes sont nettement moins thermorésistants en milieu acide qu'en milieu neutre (MAFART, 1991).

5.2.4. Activité de l'eau (a_w)

L' a_w a également une influence sur la thermorésistance des micro-organismes qui est d'autant plus élevée lorsque l'activité de l'eau du milieu est faible (MAFART, 1991). Il a été démontré que la thermorésistance des spores était maximale pour les valeurs d' a_w voisines de 0,3 (CERF et *coll.*, 1988). 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 sucres comme dans le cas des jus et nectars de fruits a un effet sur la résistance des micro-organismes à la chaleur (GIBSON, 1973; JUVEN et *coll.*, 1978; BEUCHAT, 1981). Il est également bien établi que dans une huile complètement exempte d'eau, la thermorésistance d'un micro-organisme est nettement plus élevée qu'en milieu aqueux (GAZE, 1985).

5.2.5. Présence d'inhibiteurs

La présence d'inhibiteurs dans le milieu a une certaine influence sur la thermorésistance des germes microbiens. Ainsi dans le moût et dans la bière,

les substances antiseptiques apportées par le houblon ont tendance à diminuer la thermorésistance des micro-organismes présents (ADAMS et coll., 1989). D'une manière plus marquante, la présence d'éthanol rend les micro-organismes beaucoup moins résistants aux traitements thermiques (COURTOISIER, 1984; MAFART, 1991), résultats qui ont été confirmés pour les souches de *Lactobacillus* (ADAMS et coll., 1989).

5.2.6. Modifications apparentes dues aux conditions expérimentales

Les conditions de numération ne modifient pas intrinsèquement les valeurs de D_T puisqu'elles sont postérieures à l'action de la chaleur. Toutefois, elles peuvent apparemment modifier la thermorésistance de manière non négligeable. En effet, le nombre de micro-organismes survivants peut être différent selon la durée et la température d'incubation du milieu de culture (TRUONG-MEYER et coll., 1994). Ce nombre est maximal pour une température d'incubation voisine de la température optimale de croissance (BEUCHAT et LECHOWICH, 1968). LINTON et coll.(1992) ont montré que les courbes de survie obtenues avec utilisation des milieux de culture différents pour la numération présentent des différences pour une même souche. De même, il a été démontré que le nombre d'unités formant colonies (UFC) de *Listeria monocytogenes* était différent suivant que la numération se faisait dans les conditions d'anaérobiose ou d'aérobiose (KNABEL et coll., 1990; LINTON et coll., 1992).

5.3. Causes de déviations des courbes de survie

Les lois de la thermorésistance restent théoriques. Dans la pratique, on observe souvent des déviations de la courbe de survie qui n'est plus alors tout à fait linéaire. La formule $\log N = \log N_0 - t/D_T$ n'est plus vérifiée. Les courbes de survie peuvent alors devenir bilinéaires, présentant un épaulement dû à une combinaison de mécanismes d'activation et d'inactivation, ou même curvilignes

avec une traînée en fin de courbes (figure 7). Les facteurs influençant la forme des courbes de survie ont été énumérés par BARILLERE et *coll.*(1985). Les déviations importantes seraient dues à l'âge de la préculture ainsi qu'à la composition physico-chimique du milieu de culture (WATIER, 1994; WATIER et *coll.*, 1995).

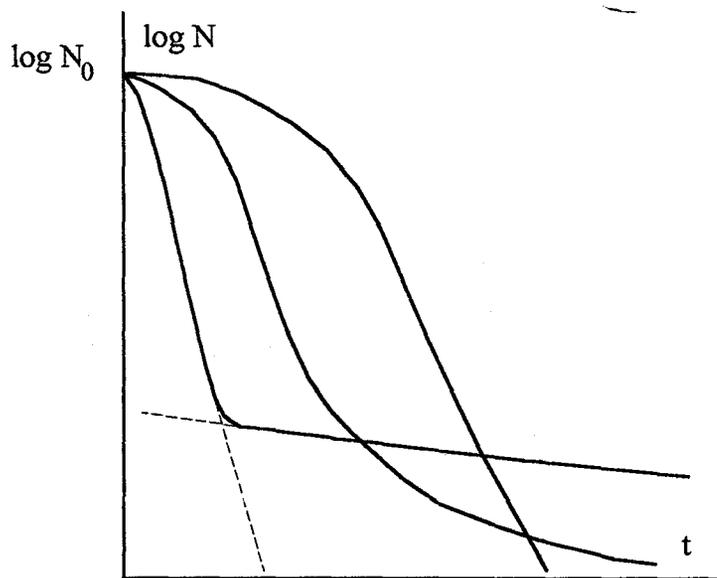


Figure 7 : Exemples de déviations de courbes de survie

5.3.1. Présence de plusieurs sites thermosensibles

La présence dans les micro-organismes de plusieurs sites thermosensibles (ALLWOOD et RUSSEL, 1967 et 1970; MAGNUS et *coll.*, 1986) peut engendrer un épaulement au début de la courbe de survie; la mort des germes microbiens dans ce cas ne serait pas due à l'inactivation d'une seule molécule mais de plusieurs.

5.3.2. Présence de micro-organismes en amas ou en chaînettes

Un grand nombre de micro-organismes peut, dans les conditions normales de croissance, se présenter en chaînettes, en tétrades ou en amas. Ces germes microbiens dans ces conditions peuvent alors induire des artefacts sur

la courbe de survie. MAGNUS et coll.(1986) ont pu montrer que les épaulements des courbes de survie de *Streptococcus faecium* et *Streptococcus faecalis*, chauffés dans différents milieux, sont dûs à la présence de chaînettes de 4 à 6 bactéries.

5.3.3. Diffusion de la chaleur

CERF et coll.(1988) ont montré que lorsque la diffusion de la chaleur n'est pas homogène dans une suspension microbienne, la relation logarithmique entre le nombre de germes survivants et la durée du traitement thermique n'était plus linéaire. Il est donc indispensable que le traitement thermique soit homogène lors des études de thermorésistance des micro-organismes.

5.3.4. Activation des spores par la chaleur

Il existe, pour des suspensions de spores, des distorsions aux lois de la thermorésistance au début ou en fin de chauffage (CERF, 1977; ETOA, 1983). La plupart des spores ont en effet besoin d'une activation pour germer. La chaleur étant un excellent activateur, il est possible d'avoir une compétition entre la destruction des spores par la chaleur et leur germination.

5.3.5. Présence des populations différentes

Lorsque deux espèces génétiquement différentes se retrouvent ensemble au sein d'une même population, la courbe de survie devient biphasique. La première partie de la courbe correspond à la destruction de l'espèce la plus thermosensible. La présence de sous-populations de thermorésistances différentes entraîne des courbes de survie curvilignes. Par ailleurs, la présence au sein de la population génétiquement homogène d'individus possédant des degrés différents de thermorésistance peut expliquer l'obtention des courbes de survie biphasiques. Dans certains cas, cette variabilité serait physiologique et pourrait être liée à l'âge des cellules (MOATS et coll., 1971).

5.3.6. Effet protecteur du milieu

Pendant le traitement thermique des aliments, de nombreuses réactions chimiques se produisent, modifiant ainsi l'environnement des germes microbiens présents. Le milieu peut alors avoir un effet protecteur sur les micro-organismes ou leurs spores qui deviennent plus thermorésistants (MARSHALL et WALKEY, 1952; CERF et *coll.*, 1967; SENHAJI, 1973).

5.3.7. Numération des micro-organismes survivants

La numération des micro-organismes survivants pour des faibles populations (moins de 100 UFC.ml⁻¹) est imprécise et source de nombreuses variations. La présence des traînées pourrait être liée à l'imprécision de la méthode de numération, notamment lorsqu'un nombre trop faible de dénombrement est effectué (CERF, 1977).

5.3.8. Conditions de préculture

Des courbes de survie non linéaires ont été observées pour *Listeria monocytogenes* (FEDIO et JACKSON, 1989 cités par WATIER, 1994). Ces courbes deviennent linéaires lorsque la préculture est soumise à un préchauffage d'une heure à 48°C.

5.3.9. Solution d'essai et milieu de culture

Les courbes de survie des souches de levures traitées dans des solutions alcooliques ou dans des solutions sucrées peuvent être bilinéaires ou curvilignes (BARILLERE et *coll.*, 1985). En modifiant les conditions expérimentales, il est possible d'obtenir des courbes de survie rectilignes. Des différences physico-chimiques entre le milieu de culture et le milieu d'essai conduisent à l'obtention des courbes de survie non linéaires. La présence d'éthanol ou une différence supérieure à une unité de pH entre le milieu de culture et le milieu d'essai affecte significativement la forme des courbes de survie dans le cas des levures (BARILLERE et *coll.*, 1985). Ces auteurs ont

par ailleurs montré que les courbes de survie sont rectilignes lorsque le milieu de culture et la solution d'essai ont le même pH et la même teneur en ethanol.

Enfin, les déviations des courbes de survie peuvent trouver leurs causes dans les caractéristiques intrinsèques de l'espèce. BARILLERE et coll.(1985) ont ainsi trouvé, pour des conditions expérimentales identiques, des courbes de survie linéaires, bilinéaires et curvilignes respectivement pour *Saccharomyces bailli*, *S. cerevisiae* et *S. bayanus*.

5.4. Quantification des traitements thermiques et définition des objectifs: Application au cas des jus et nectars de fruits.

Différentes échelles arbitraires sont utilisées pour quantifier les traitements thermiques, selon les domaines d'application (MAFART, 1991). Un couple standard température-temps (T^* , t^*) est arbitrairement choisi comme **unité de traitement**. Ainsi, pour la stérilisation l'unité adoptée est $T^*=250^\circ\text{F}=121,1^\circ\text{C}$ et $t^*=1\text{min}$ alors que pour la pasteurisation des boissons, l'unité de pasteurisation correspond à $T^*=60^\circ\text{C}$ et $t^*=1\text{min}$.

Le nombre d'unités cumulées au cours du traitement thermique définit la valeur pasteurisatrice ou la valeur stérilisatrice notée F_{T^*} . Ainsi la valeur pasteurisatrice d'un traitement de t min à 60°C est par définition $F_{60^\circ\text{C}} = t$.

Si on souhaite obtenir un traitement thermique équivalent à $F_{T^*}=1$ à une température $T=T^*$, le temps nécessaire pour atteindre cet objectif sera (en minutes) de $t = 1 \times 10^{-(T-T^*)/z}$.

Cette valeur pasteurisatrice obtenue à la température T pendant 1 min est, par définition, la valeur de destruction biologique (VDB) affectée à la température T . Elle est généralement notée L_T , avec $L_T = 10^{-(T-T^*)/z}$.

En stérilisation industrielle, on adopte l'échelle $T^*=121,1^\circ\text{C}$ et $z=10^\circ\text{C}$ alors que dans le domaine de la pasteurisation des boissons, l'échelle adoptée est $T^*=60^\circ\text{C}$ et $z=7^\circ\text{C}$.

Par définition on peut écrire $F_{T^*} = L_T \cdot t$. Dans le cas d'un traitement thermique par paliers successifs à température T_i pendant des intervalles de temps t_i , la valeur stérilisatrice sera $F_{T^*} = L_{T^*} \cdot t_i$, et pour une variation continue de la température, $F_T = L(T)dt$. Pour des raisons de sécurité, le choix de la valeur stérilisatrice appliquée est basée sur la destruction du micro-organisme dangereux le plus résistant. Ainsi en appertisation, on visera la destruction des spores de *Clostridium botulinum* alors que c'est la destruction d'*Enterococcus faecalis* (Streptocoque-D), réputé le plus résistant, qui est visée lors de la cuisson du jambon. Le choix du micro-organisme test permet ainsi de fixer le taux de réduction décimale à atteindre (une réduction décimale n correspond à un taux de survivants $N/N_0 = 10^{-n}$). Cette réduction décimale n est telle que, conformément à la première loi de la thermorésistance, on peut écrire $t = n \cdot D$ qui correspond à la valeur stérilisatrice ou à la valeur pasteurisatrice suivant qu'on réalise une stérilisation ou une pasteurisation.

Autour de l'objectif principal du traitement thermique qui est la destruction des micro-organismes gravitent un certain nombre d'objectifs secondaires (destruction d'enzymes nuisibles) et de contraintes (préservation de la qualité nutritionnelle telle que la non destruction des vitamines, préservation des qualités organoleptiques du produit tels que l'absence de brunissement, de goût et d'odeurs indésirables). En règle générale, ces réactions secondaires obéissent à une cinétique de premier ordre, de même type que celle de la destruction thermique des micro-organismes (MAFART, 1991). C'est ainsi que les valeurs de z et $D_{121,1^\circ\text{C}}$ pour la destruction des anthocyanes du jus de raisin sont respectivement de 23°C et 18 mn.

Par analogie avec la notion de valeur pasteurisatrice, on peut également introduire la notion de "valeur destructrice" $G^z_{T^*}$ pour les micro-organismes qui correspond à un traitement thermique de G minutes à la température T^* .

Le problème d'optimisation du traitement thermique se posera alors en ces termes: on veut une valeur stérilisatrice ou pasteurisatrice F avec G supérieure à un certain seuil (destruction d'enzymes), ou au contraire avec G inférieure à un certain plafond (destruction des vitamines par exemple). Des méthodes permettant l'optimisation des traitements thermiques à température constante ou à température variable présentées par certains auteurs (FELLOW, 1988; MAFART, 1991; TOLEDO, 1994), permettent d'établir des barèmes de stérilisation ou de pasteurisation qui assurent une bonne stabilité du produit tout en affectant au minimum ses qualités nutritionnelles et organoleptiques.

MATERIELS ET METHODES

MATERIELS ET METHODES

1. Matériels

1.1. Matières premières

Les fruits utilisés pour la production des jus et nectars de fruits sont produits respectivement dans les régions de Njombé (ananas, pomelo) et de Foubot (goyave et grenadille) au Cameroun. Le sucre granulé entrant dans la formulation des nectars de fruits est acheté dans le commerce. Quant à l'eau de fabrication, elle est captée dans une source et traitée soit au Laboratoire de Technologie Alimentaire de Njombé, soit à l'usine de la Société Agro-industrielle des Fruits de l'Ouest (SAIFO) à Bafoutlé près de Foubot respectivement pour les productions en laboratoire et en industrie.

Les échantillons de jus et de nectars de fruits utilisés pour les études de caractérisation de la flore microbienne des boissons ont été produits au laboratoire de Njombé. Ceux ayant servi aux études de la croissance et de la thermorésistance des levures d'altération ont été prélevés des différents stocks des boissons pasteurisées de la SAIFO fabriquées entre Septembre 1994 et Février 1995 et conditionnées en sachets "doypack" de 25 centilitres.

1.2. Milieux de culture

Les différents milieux de culture utilisés pour l'isolement et l'identification des micro-organismes sont présentés dans la publication scientifique parue en 1992 dans la revue *Microbiologie-Aliments-Nutrition* (voir page 83 du présent mémoire).

Le bouillon (Sigma, France) et la gélose (Biokar Diagnostics, France) glucosés à l'extrait de pomme de terre acidifiés à l'aide d'une solution d'acide L(+)

tartrique ($C_4H_6O_6$, $M=150,09g/mol$) cristallisé (Prolabo, France), ainsi que les filtrats de jus d'ananas, de nectar de goyave et de nectar de grenadille sont les milieux de culture utilisés lors des études de croissance et de thermorésistance des levures.

La composition au litre des milieux à l'extrait de pomme de terre est respectivement de 4g d'extrait de pomme de terre, 20g de glucose et 15g d'agar agar bactériologique pour le milieu gélosé, et 4g de d'extrait de pomme de terre avec 20g de glucose pour le bouillon.

La composition chimique du jus d'ananas (*Ananas comosus (L) Merr.*) en conserve, de pulpe de goyave (*Psidium guajava L.*) et de jus frais de grenadille (*Passiflora edulis Sims var edulis*) empruntée à FAVIER *et coll.* (1993) et présentée au tableau 1 dans la partie "Généralités" donne une idée de la composition des surnageants et filtrats de jus et nectars de fruits utilisés comme milieux de culture.

1.3. Origine des souches

Les souches de levures utilisées pour les études de croissance et de thermorésistance ont été isolées par nos soins des sachets de jus d'ananas, de nectar de goyave et de nectar de grenadille pasteurisés ayant subi des fermentations microbiennes au cours du stockage.

1.4. Matériels utilisés

Ce sont essentiellement:

- Une centrifugeuse programmable (Beckman, type J2-21M, USA) pour la centrifugation des jus et nectars de fruits.

- Un spectrophotomètre (modèle Unikon 940, Kontron Instruments, USA) dont la photo est présentée à l'annexe 1 et des cuves pour spectrophotomètre en plastique (code 05 928.806, Prolabo, France) pour la lecture de la densité optique.

- Un autoclave vertical (Réf. Avx 6131, SMI, France) pour la stérilisation des milieux et des matériels.

- Une balance de précision (Mettler K7, Prolabo, France) pour les pesées.
- Un pH-mètre électronique de haute précision (modèle WTW, pH522, Vasse Industries, France) pour l'ajustement des valeurs de pH des milieux.
- Un bain-marie thermostaté (type EM/4, Julabo, Allemagne) et des tubes de Félix en verre (8x16 mm) munis des bouchons à vis pour les tests de thermorésistance.
- Des chambres froides, des chambres chaudes et des étuves thermostatées pour l'incubation des cultures microbiennes.
- Des dispositifs Minisart adaptables aux seringues (SM 16555, Sartorius GmbH, Allemagne) pour les filtrations stériles sur membrane (0,45 μm de diamètre de pores).
- Un compteur de colonies (APELAB, France) et des boîtes de Pétri 90 avec ergots supérieurs (Réf. 9NE25, Flandres-Chimie, France) pour le dénombrement des micro-organismes.
- Un Vortex (Type 600, Prolabo, France) pour l'agitation des produits en tubes.
- Des pipettes de 1ml et 10ml stériles à usage unique (Vasse Industries, France).

2. Méthodes

2.1. Préparation des milieux de culture

La gélose glucosée à l'extrait de pomme de terre et le bouillon glucosé à l'extrait de pomme de terre ont été préparés comme suit: 39 g de milieu gélosé déshydraté et 24 g de bouillon sont respectivement introduits dans un litre d'eau distillée; chaque milieu est porté lentement à l'ébullition en agitant régulièrement jusqu'à dissolution complète, puis réparti en flacons pour la stérilisation à 120°C pendant 20 minutes. Après refroidissement à 45°C, le pH est ajusté à 3,5 par addition de 1% d'une solution stérile d'acide tartrique à 10% préalablement stérilisée à 120°C pendant 20 minutes.

Les surnageants et filtrats de jus et de nectars de fruits sont obtenus par centrifugation des boissons à 4°C (pour limiter la prolifération de la flore microbienne contaminante) à 10.000 tours par minute pendant 30 minutes. Le filtrat est alors obtenu en faisant passer le surnageant sous pression à travers un papier filtre ordinaire superposé d'une couche de kieselguhr d'environ 2 cm d'épaisseur comme l'indique la figure 8. Ces surnageants et filtrats sont ensuite conservés en flacons plastiques au congélateur (-18°C) pour les études ultérieures.

2.2. Dénombrement

Le dénombrement des levures a été effectué, à l'aide d'un compteur de colonies, en boîtes de pétri contenant 1 ml d'inoculum sur lequel la gélose PDA a été coulée et homogénéisée.

2.3. Isolement et identification des micro-organismes

Les méthodes utilisées sont résumées dans la publication scientifique parue en 1992 dans *Microbiologie-Aliments-Nutrition* (voir page 83 du présent mémoire).

La recherche des micro-organismes dans les produits fermentés (sachets gonflés) a été réalisée sur différents milieux de culture: gélose pour dénombrement (PCA) pour les germes totaux mésophiles, gélose de Man, Rogosa et Sharpe (MRS) additionnée d'actidione (cycloheximide) pour les lactobacilles, gélose lactosée au désoxycholate à 0,1% pour les coliformes, gélose glucosée à l'extrait de pomme de terre (PDA) acidifiée à pH 3,5 par addition de 1% de solution stérile d'acide tartrique à 10% pour les levures et moisissures.

Seuls les milieux PCA et PDA ont donné des résultats positifs. Les colorations de Gram effectuées sur les germes isolés de ces deux milieux ont révélé que tous les micro-organismes présents sont des levures.

Les levures provenant aussi bien du jus d'ananas (*Ananas comosus* (L.) Merr.) que des nectars de goyave (*Psidium guajava* L.) et de grenadille (*Passiflora edulis* var. *flavicarpa*) fermentés ont été isolées sur milieu PDA après incubation à 32°C pendant 48 à 72 heures. Elles ont ensuite été identifiées respectivement à

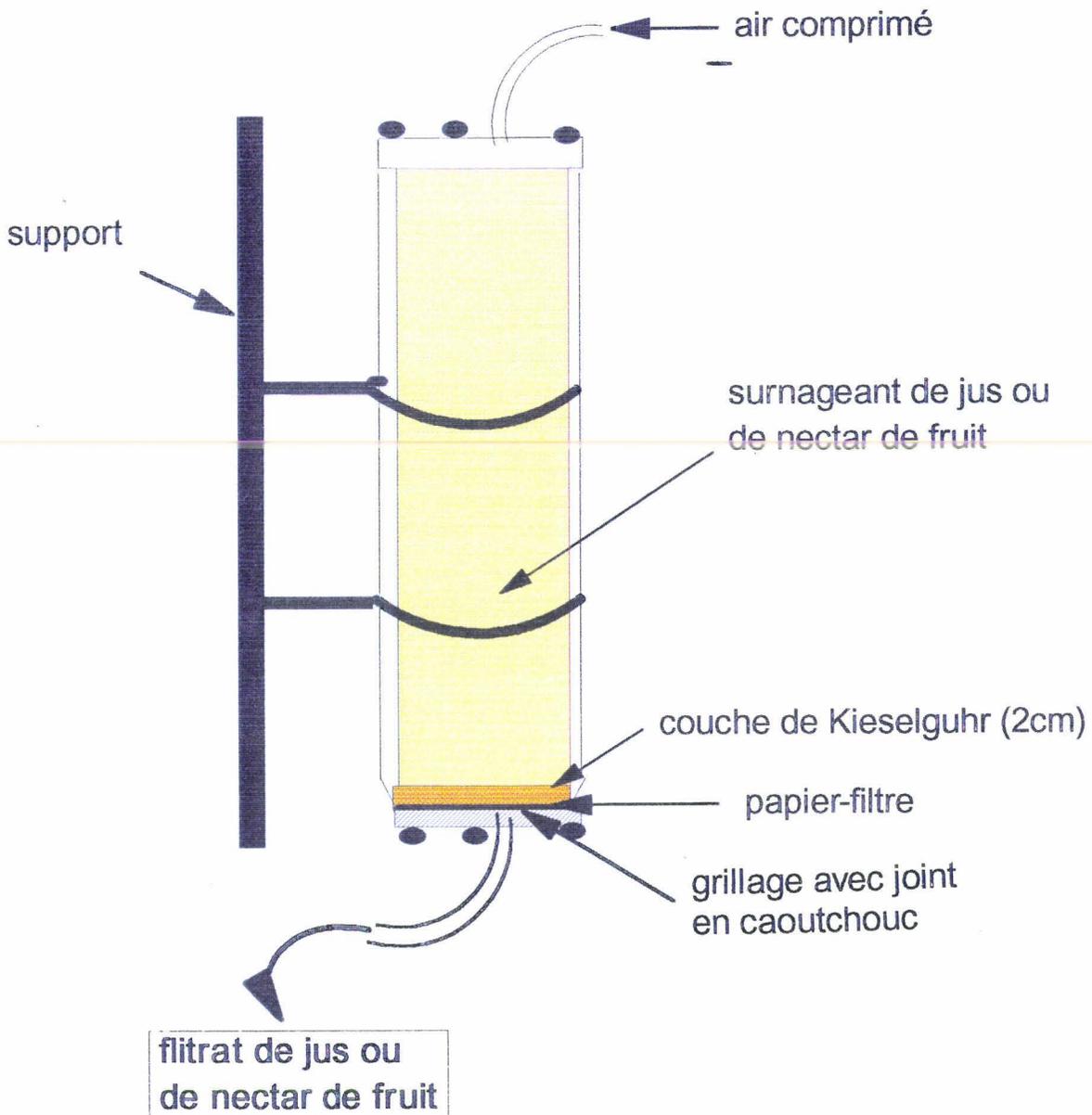


Figure 8 : Schéma du dispositif pour l'obtention du filtrat de jus ou de nectar de fruit.

l'aide des galeries ID 32C et API 20C AUX après incubation à 30°C pendant 48 heures et 72 heures, avec l'assistance technique du "Service d'Aide au Diagnostic" de Biomérieux de la Balme-Les-Grottes (France).

Les principes de ces tests d'identification réalisés dans les conditions *in vitro* sont les suivants:

- Pour les galeries API 20 C AUX, elles sont constituées de 20 cupules contenant des substrats déshydratés qui permettent d'effectuer 19 tests d'assimilation. Les cupules sont inoculées avec un milieu minimum semi-gélosé et les levures poussent seulement si elles sont capables d'utiliser le substrat correspondant. La lecture des réactions qui se fait (après 24 à 72 heures d'incubation à 30°C) par comparaison aux témoins de croissance et d'identification est obtenue soit à l'aide du tableau d'identification, du catalogue analytique ou de la disquette APILAB.

- Quant aux galeries ID 32 C, elles comportent 32 cupules contenant chacune un substrat carboné déshydraté. La levure à tester est mise en suspension dans un milieu synthétique semi-solide. Après 24 à 48 heures d'incubation à 30°C, la croissance dans chaque cupule est lue par les automates ATB ou visuellement. L'identification est obtenue à l'aide du catalogue analytique ou des logiciels d'identification correspondants.

2.4. Conservation des souches

Les souches pures de *Candida pelliculosa*, *Candida holmii* et *Kloeckera apis* isolées des boissons ont été conservées à 2°C dans un bouillon glucosé à l'extrait de pomme de terre acidifié à pH 3,5. Elles peuvent ainsi conserver leur viabilité dans ces conditions pendant environ 5 mois.

Chaque souche est relancée à 32°C pendant 48 à 72 heures soit dans le filtrat de jus d'ananas, de nectar de goyave ou de grenadille servant de préculture pour les différentes études de croissance et de thermorésistance.

2.5. Réalisation du plan expérimental

Le suivi des cinétiques de croissance a été réalisé directement dans des cuves pour spectrophotomètre en plastique stériles, à usage unique, fermées hermétiquement par des bouchons de tubes à hémolyse stériles. Toutefois, dans le jus d'ananas et le nectar de grenadille qui favorisent de façon très significative la croissance des souches étudiées avec un dégagement gazeux important, les cultures ont été effectuées dans des flacons en verre de 125 ml stérilisés dans lesquels 1 ml de milieu est prélevé périodiquement et stérilement pour les lectures de densité optique (DO) au moyen des cuves pour spectrophotomètre. La même cuve est utilisée pour la lecture de la DO d'un échantillon donné pendant toute l'expérimentation, avec rinçage à l'eau distillée et séchage à l'étuve à 50°C après chaque lecture.

2.5.1. Stérilisation du matériel

Les cuves sont stérilisées par immersion pendant 24 heures dans un erlenmeyer contenant de l'éthanol à 95°. L'alcool est ensuite éliminé par injection sous pression d'air stérile selon un montage utilisé par WATIER (1994). Ce courant d'air ainsi créé permet, une fois l'alcool vidé, de sécher les cuves. L'ensemble est stocké à l'étuve entre 50°C et 60°C pendant 24 à 48 heures pour parfaire le séchage.

2.5.2. Préparation des milieux de culture

Une gamme de milieux de culture à différents pH est préparée à partir des filtrats de jus d'ananas et de nectar de goyave commerciaux dont les valeurs de pH sont ajustées à l'aide d'une solution d'acide citrique à 20% ou d'une solution de NaOH 2N. Ces milieux sont ensuite stérilisés d'une part par filtration stérilisante à l'aide d'un dispositif Minisart adaptable aux seringues, et d'autre part en flacons de verre à 110°C pendant 30 minutes pour les essais en flacons. En fonction des différentes valeurs de pH rencontrées dans les pulpes, jus et nectars de fruits, nous

avons choisi les pH 1,55, 1,85, 2,00, 2,50, 3,15, 4,00, 5,00 et 6,25 pour le plan d'expérience; les basses valeurs de pH permettront de se rendre compte des pH limites de développement de nos souches en milieux acides.

2.5.3 Préparation des cultures mères

Elles sont réalisées en flacons contenant 50 ml de filtrat de nectar de goyave, de jus d'ananas ou de nectar de grenadille préalablement stérilisés à 110°C pendant 30 minutes. Chaque flacon est ensuite inoculé avec 1 ml d'une suspension contenant environ 10^8 levures/ml, puis incubé à 32°C pendant 48 à 72 heures.

2.5.4. Remplissage des cuves

Chaque cuve est remplie stérilement avec 1 ml de milieu de culture etensemencée avec 20 μ l d'une suspension microbienne provenant de la préculture en fin de phase exponentielle de croissance, ce qui correspond à environ 10^5 à 10^6 levures/ml selon les souches. Les cuves sont alors bouchées et incubées à différentes températures. Pour les essais en flacons, l'inoculation se fait à la même dose que pour les essais en cuves.

2.5.5. Suivi des cinétiques de croissance

Après homogénéisation, la densité optique (turbidimétrie) de chaque cuve est mesurée à 630 nm toutes les 6 heures pendant les deux premiers jours, puis toutes les 3 heures jusqu'à la phase de déclin, à l'aide du spectrophotmètre. Cet appareil permet de lire simultanément 6 à 10 cuves selon le choix de l'expérimentateur.

Les températures d'incubation choisies pour le plan d'expérience sont respectivement de 2°C, 5°C, 10°C, 15°C, 25°C, 32°C, 35°C, 37°C, 39°C et 46°C.

2.5.6. Etalonnage de l'appareil de mesure

Les relations entre les densités de populations (UFCml^{-1}) et les densités optiques (DO) consécutives à la croissance des levures dans les milieux de culture ont été établies au cours de la phase exponentielle de croissance par lecture de la DO suivie du dénombrement en profondeur sur gélose PDA.

2.5.7. Calcul du taux de croissance

Le taux maximal de croissance μ_{\max} ou μ_{expo} pour chaque souche de levure étudiée a été calculé en phase exponentielle de croissance respectivement dans le jus d'ananas (pH 3,95), le nectar de goyave (pH 3,15) et le nectar de grenadille (pH 3,03) à 25°C et 32°C, selon la formule suivante:

$$\mu_{\max} = [\text{Ln}(N_2) - \text{Ln}(N_1)] / (t_2 - t_1), \text{ avec}$$

N_1 : nombre d'UFCml⁻¹ au temps t_1

N_2 : nombre d'UFCml⁻¹ au temps t_2

μ_{\max} : taux maximal de croissance.

2.6. Modélisation de la croissance

2.6.1. Modélisation et construction des équations mathématiques

La modélisation de la croissance a été réalisée sur les trois souches de levures étudiées, dans le nectar de goyave ou dans le jus d'ananas en fonction des valeurs de pH initiaux (variable P) et des températures de stockage (variable T).

La version 5,0 du logiciel STAT-ITCF (Institut Technique des Céréales et des Fourrages, France) a été utilisée pour toutes les analyses statistiques de régression ayant servi à la construction des équations mathématiques.

2.6.2. Validation des modèles construits

La validation des modèles construits a été obtenue par des "challenge-tests" effectués sur la croissance des levures dans les jus et nectars de fruits commerciaux stockés à différentes températures.

2.7. Mesure de la thermorésistance

La méthode utilisée est celle de "Thermal Death Tubes" (TDT) souvent préférée par beaucoup d'auteurs (STUMBO, 1973; LEUNG et coll., 1982; MULAK et coll., 1995) , mais qui a été légèrement modifiée (TRUONG-MEYER et coll., 1994) et adaptée en fonction des types tubes à notre disposition (tubes de Félix en verre), avec inoculation des milieux avant chauffage (SWANSON et coll., 1985).

2.7.1. Préparation des milieux de culture

Les surnageants de jus d'ananas (pH 3,95), de nectar de goyave (pH 3,15), de nectar de grenadille (pH 3,03) obtenus par centrifugation et le tampon Tartrate 0,01M (pH 2,65) préparé à partir de l'acide L(+)-tartrique cristallisé ont été utilisés comme milieux d'étude. 4,5 ml de chaque milieu sont introduits dans des tubes de Félix en verre et fermés hermétiquement à l'aide des bouchons à vis. Les tubes sont ensuite stérilisés à 110°C pendant 30 minutes.

2.7.2. Préparation des suspensions microbiennes

Elles sont effectuées à partir des cultures mères, dans les mêmes milieux que ceux à utiliser pour les essais de thermorésistance. 10 ml de chaque milieu stérilisé en flacon de verre de 125 ml sont inoculés avec 5 ml de culture mère, puis incubés à 32°C pendant 48 heures pour *Kloeckera apis* et 72 heures pour *Candida pelliculosa* et *Candida holmii*, ce qui permet d'atteindre des concentrations de l'ordre de 10^7 à 10^8 levures/ml selon les souches et selon les milieux. Les levures utilisées pour les test de thermorésistance sont toutes prélevées en phase exponentielle de croissance.

2.7.3. Tests de thermorésistance

Ils sont réalisés dans des tubes de Félix en bain-marie thermostaté. Les températures testées sont comprises entre 55°C et 75°C en fonction de la souche considérée.

Les tubes de Félix contenant 4,5 ml de milieu préalablement stérilisé sont inoculés avec 0,5 ml d'inoculum issu de chaque milieu respectif, puis bouchés hermétiquement. Après homogénéisation par agitation au vortex, les tubes sont préchauffés à 45 °C pendant environ 10 min, puis plongés ensuite dans le bain-marie thermostaté ajusté à la température du test. Les milieux dans les tubes doivent être entièrement immergés dans le bain thermostaté d'eau chaude pour permettre un chauffage homogène. Par intervalle de temps fixé (1; 1,5; 2; 3; 5; 8; 10; 12; 16 et 20 minutes respectivement selon la souche étudiée), un tube de chaque milieu est enlevé du bain thermostaté et plongé aussitôt dans un bain de glace pour un refroidissement rapide. Les tubes ainsi refroidis sont remis à la température ambiante environ une vingtaine de minutes avant les dénombrements des levures survivantes. Celles-ci sont dénombrées, après dilution dans l'eau distillée stérile, dans des boîtes de Pétri en profondeur (1 ml de solution mère ou des dilutions) sur milieu PDA. L'incubation des boîtes est faite à 32°C pendant 48 heures pour *Kloeckera apis* et 72 heures pour *Candida pelliculosa* et *Candida holmii*. Chaque test a été réalisé avec deux répétitions.

2.7.4. Calcul des valeurs de D_T et z .

Les courbes de destruction thermique et de résistance thermique obtenues par regression linéaire à l'aide du logiciel STAT-ITCF (version 5,0) permettent respectivement de calculer les valeurs de D_T et z à partir des équations suivantes:

$$\log N = \log N_0 - (1/D_T).t \quad (1)$$

et

$$\log D_T - \log D_{T_{\text{réf}}} = (1/z)(T_{\text{réf}} - T) \quad (2), \text{ avec}$$

- t: temps de traitement thermique.
- T: température de traitement.
- N_0 : nombre initial de micro-organismes.
- N: nombre de micro-organismes survivants après traitement thermique pendant un temps t.

- D_T : temps nécessaire pour la destruction de 90% des micro-organismes ou temps de réduction décimale qui est égal à l'inverse de la pente de la droite (1).
- $D_{T_{réf}}$: temps de réduction décimale à la température de référence fixée.
- $T_{réf}$: température de référence fixée.
- z : écart de température nécessaire pour réduire D_T de 90%.

2.7.5. Détermination des valeurs pasteurisatrices

Les valeurs pasteurisatrices $P^z_{T_{réf}}$ sont calculées à partir de la relation suivante:

$$P^z_{T_{réf}} = D_{T_{réf}} \cdot \log(N_0/N), \text{ avec}$$

- z et $D_{T_{réf}}$: paramètres du micro-organisme considéré.
- $T_{réf}$: température de référence à laquelle est défini le temps de réduction décimale.
- (N_0/N) : taux de destruction souhaité.

Le calcul a été réalisé en considérant un niveau de contamination initial de l'ordre de 10^7UFCml^{-1} et un taux final de micro-organismes de l'ordre de $10^{-2} \text{UFCml}^{-1}$ qu'il serait souhaitable d'atteindre dans les boissons après la pasteurisation.

2.8. Tests d'analyses sensorielles

Quelques caractéristiques sensorielles (couleur, arôme, goût et odeur) des jus et nectars de fruits conservés en sachets plastiques par surgélation sans pasteurisation préalable et présentant des caractéristiques semblables à celles des fruits frais ont été comparées à celles des boissons conservées soit après pasteurisation avec conditionnement en bouteilles de verre, soit après surgélation en sachets plastiques avec pasteurisation préalable. Des tests de dégustation ont été organisés pour le jus d'ananas, les nectars de goyave, de grenadille et de pomélo fabriqués au laboratoire.

L'épreuve de notation permettant d'étudier chaque caractéristique séparément et d'évaluer les différences entre les caractéristiques a été choisie en tenant compte

des aspects méthodologiques de l'évaluation sensorielle (AFNOR, 1980; LARMOND, 1970; SAUVAGEOT, 1989).

Un jury de dégustation composé de 18 membres, entraînés et habitués à la consommation des jus et nectars de fruits surgelés en sachets plastiques sans pasteurisation préalable, a été utilisé. Les juges devaient observer et déguster les échantillons codés présentés pour chaque type de boisson, puis les classer en portant leur code sur une échelle à 9 points. Les boissons surgelées étaient entièrement décongelées alors que celles pasteurisées et conservées en bouteilles étaient bien réfrigérées avant d'être soumises à la dégustation. Les tests étaient répétés deux fois pour s'assurer de la fiabilité des notes attribuées.

Les résultats des différents tests ont été traités par l'analyse de la variance: la comparaison des valeurs de F calculées aux valeurs théoriques données par les tables de Snedecor a permis de préciser le risque pris (5%, 2,5%, 1% ou 0,1%) pour chaque caractéristique testée. En outre, une évaluation des étendues de différenciation à l'aide du test de classement multiple de Duncan a été établie pour les valeurs significativement différentes.

RESULTATS ET DISCUSSION

RESULTATS ET DISCUSSION

1. Isolement et identification de la flore microbienne contaminant les préparations de fruits exotiques

1.1. Boissons produites en laboratoire

Ces travaux ont été réalisés sur les échantillons de jus et nectars produits au Laboratoire de Technologie Alimentaire de l'IRA à Njombé au Cameroun.

Les analyses microbiologiques révèlent que le jus d'ananas, les nectars de goyave, de grenadille et de pomelo surgelés sans pasteurisation préalable hébergent de nombreux micro-organismes d'altération dont les levures (*Candida guilliermondii* et *Saccharomyces cerevisiae* en particulier), les Staphylocoques non pathogènes et autres bactéries appartenant aux genres *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Micrococcus*, *Bacillus*, *Pediococcus* et *Acinetobacter*. Le jus d'ananas plus riche en sucres fermentescibles et en facteurs de croissance et ayant un pH relativement plus élevé héberge également des coliformes thermotolérants (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter agglomerans* et *Serratia rubidaea*).

Les germes microbiens présents dans les boissons étudiées proviendraient non seulement des matières premières (fruits et sucre notamment), mais aussi de l'environnement, des manipulateurs et de l'ensemble du matériel de la chaîne de fabrication. L'importance de toutes les étapes liées au procédé de fabrication a déjà été signalée pour divers produits alimentaires (DAVENPORT, 1980; GUIRAUD et GALZY, 1980).

La flore microbienne des nectars de goyave, de grenadille et de pomélo surgelés en sachets plastiques sans pasteurisation préalable est constituée des seuls germes d'altération. Ce résultat est pratiquement en accord avec les normes Codex des jus et nectars de fruits (FAO/OMS, 1982) présentées à l'annexe 2 et les normes de composition microbiologique des produits végétaux surgelés rapportées par

GUIRAUD et GALZY (1980). Ces dernières recommandent en effet un seuil tolérable de 500 germes totaux mésophiles, 1000 coliformes totaux et 50 levures par gramme de produit surgelé (annexe 3). D'autres normes industrielles plus rigoureuses recommandent que les boissons froides issues des distributeurs automatiques doivent satisfaire aux normes microbiologiques de potabilité de l'eau de consommation (CEE, 1980) telles que définies par la réglementation en vigueur (annexes 4a et 4b), et considèrent une teneur en micro-organismes acido-tolérants (levures et moisissures en particulier) supérieure à 10 UFCml⁻¹ comme un témoin de défaut de qualité microbiologique.

La pasteurisation des ces boissons par actinisation à 92°C (nectar de grenadille) ou à 94°C (jus d'ananas, nectars de goyave et de pomélo) pendant 10 s après une désaération à 80°C pendant environ 10 min améliore leur qualité microbiologique.

Tous ces résultats se retrouvent dans la publication scientifique parue en 1992 dans la revue *Microbiologie-Aliments-Nutrition* (voir page 83 du présent mémoire).

1.2. Boissons produites en industrie

Les procédés de fabrication des jus et nectars de fruits développés au laboratoire de Njombé sont actuellement exploités par la Société Agro-Industrielle des Fruits de l'Ouest (SAIFO) au Cameroun. La pasteurisation est ici effectuée à la vapeur à l'aide d'un pasteurisateur tubulaire, à 92°C (nectar de grenadille) et à 94°C (jus d'ananas et nectar de goyave) pendant environ 1 minute après une désaération sous vide à 80°C pendant 10 à 20 minutes. Les produits pasteurisés sont conditionnés à chaud (aux environs de 75°C) en sachets "doypack" de 25 centilitres, puis refroidis rapidement à travers un tunnel à tapis roulant dans lequel circulent des jets d'eau froide. Le stockage des produits pasteurisés en vue de la commercialisation se fait à la température ambiante (30 à 32°C au niveau du site de l'usine).

Cette jeune PMI Camerounaise subit, depuis le démarrage de ses activités en

1993, de nombreuses pertes de produits au cours du stockage et de la commercialisation (gonflement et éclatement des sachets) occasionnées par des fermentations microbiennes.

Des échantillons de jus d'ananas, de nectar de goyave et de nectar de grenadille produits par cette industrie entre Septembre 1994 et Février 1995 ont été utilisés. Parmi tous les échantillons ramenés du Cameroun, environ une dizaine de sachets par type de produit ont subi des fermentations avec gonflement des sachets après quelques jours de stockage à 32°C. Ces boissons fermentées nous ont permis d'isoler et ensuite d'identifier (grâce à l'assistance technique du "Service d'Aide aux Diagnostics de Biomérieux de France"), les micro-organismes en cause. Il s'agit de trois espèces de levures d'altération: *Candida pelliculosa* et *Kloeckera apis* dans 100% des produits fermentés, et *Candida holmii* exclusivement dans du jus d'ananas (environ 60% de produits fermentés).

Les caractéristiques ayant permis l'identification de ces levures sont résumées dans les tableaux 9a, 9b et 9c. Les photos de ces souches de levures prises dans le jus d'ananas (pH 3,95) et le nectar de goyave (pH 3,15) commerciaux après 48 heures d'incubation à 32°C sont présentées à la figure 9.

L'analyse de l'ensemble des caractéristiques biochimiques des ces souches obtenues dans les conditions *in vitro* met en évidence une hétérogénéité des activités enzymatiques et biochimiques des espèces de levures isolées; cette hétérogénéité est également marquante entre *C. pelliculosa* et *C. holmii*, confirmant ainsi les résultats obtenus par SCHMIDT et coll. (1993) qui ont relevé, en conditions *in vitro*, une grande hétérogénéité intra et inter-espèces des activités enzymatiques et biochimiques des levures appartenant au genre *Candida* isolées de fromage de chèvre.

Les souches de levures que nous avons isolées présentent des risques pour la qualité organoleptique des boissons: une étude plus approfondie leur a donc été consacrée.

Tableau 9a: Caractéristiques biochimiques d'identification de *Candida pelliculosa*, *Candida holmii* et *Kloeckera apis* sur galeries API 20C AUX.⁽¹⁾

	Temps d'incubation (heures)	O	GLU	GLY	2KG	ARA	XYL	ADO	XLT	GAL	INO	SOR	MDG	NAG	CEL	LAC	MAL	SAC	TRE	MLZ	RAF	HYPH	Tests complémentaires P			
																								ESC	Croissance à 37°C (G. Sabouraud)	%
<i>Candida pelliculosa</i>	24	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	?	-	-	-	+	+		
	48	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	?	-	-	-	+	++		
	72	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+++	99,9
	24		6			0		0		4		0		0									0			
	48		6			0		0		4		0		0									0			
	72		6			4		0		6		6		2				7					1			
	<i>Candida holmii</i>	24	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	nd ⁽²⁾	-
		48	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	nd	+
		72	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	nd	+
24			2			0		4		0		0		0				2					0			
48			2			0		4		0		0		0				6					2			
72			2			0		4		0		0		0				6					2			
<i>Kloeckera apis</i>	24	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	
	48	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+++	
	72	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+++	
	24		2			0		0		0		0		2				0					0			
	48		2			1		0		0		0		2				0					0			
	72		2			1		0		0		0		2				0					0			

(1) Identification non valide avant 72 heures d'incubation à 30°C.

(2) Non déterminé.

N.B: P représente la probabilité d'identification.

Liste des tests

O: Contrôle
 GLU: GLUcose
 GLY: GLYcérol
 2KG: 2-Ceto-D-Gluconate
 ARA: L-ARAbinose
 XYL: D-XYLose
 ADO: ADOnitol
 XLT: XyLiTol
 GAL: GALactose
 INO: INOsitol
 SOR: SORbitol
 MDG: Alpha-Methyl-D-Glucoside
 NAG: N-Acetyl-D-Glucosamine
 CEL: CELiobiose

LAC: LACtose
 MAL: MALtose
 SAC: SACcharose
 TRE: TREhalose
 MLZ: MéLéZitose
 RAF: RAFfinose
 HYPH: HYPHes ou pseudomycélium

ESC: ESCuline

Tableau 9b: Caractéristiques biochimiques d'identification de *Candida pelliculosa*,
Candida holmii et *Kloeckera apis* sur galeries ID 32C.⁽¹⁾

	Temps d'incubation (heures)	GAL	ACT	SAC	NAG	LAT	ARA	CEL	RAF	MAL	TRE	2KG	MDG	SOR	XYL	RIB	GLY	RHA	PLE	ERY	MEL	GRT	MLZ	GNT	LVT	MAN	LAC	INO	GLU	SBE	GLN	
<i>Candida pelliculosa</i>	24	-	-	+	-	+	-	-	+	+	?	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	
	48	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	
	72	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	
	24		4			2		6		/			0		5		1		0		1		1		1		1		1		1	
	48		4			2		6		5		3		5		1		1		1		1		1		1		1		1		1
	72		4			2		6		5		3		5		1		1		1		1		1		1		1		1		1
	<i>Candida holmii</i>	24	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
48		+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
72		+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
24			5			0		2		0		0		0		0		0		0		0		0		0		0		1		1
48			5			0		2		1		0		0		0		0		0		0		0		0		0		1		1
72			5			0		2		1		0		0		0		0		0		0		0		0		0		1		1
<i>Kloeckera apis</i>		24	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
	48	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
	72	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
	24		2			0		1		0		0		0		0		0		0		0		0		0		0		1		1
	48		2			0		1		0		0		0		0		0		0		0		0		0		0		1		1
	72		2			0		1		0		0		0		0		0		0		0		0		0		0		1		1

(1) Identification non valide avant 48 heures d'incubation à 30°C.

N.B: P représente la probabilité d'identification.

Liste des tests

O: Contrôle

GLU: GLUcose

GLY: GLYcérol

2KG: 2-Ceto-D-Gluconate

ARA: L-ARAbinose

XYL: D-XYLose

ADO: ADOnitol

XLT: XyLiTol

GAL: GALactose

INO: INOsitol

SOR: SORbitol

MDG: Alpha-Methyl-D-Glucoside

NAG: N-Acetyl-D-Glucosamine

CEL: CELiobiose

LAC: LACtose

MAL: MALtose

SAC: SACcharose

TRE: TREhalose

MLZ: MéLÉZitose

RAF: RAFinose

RHA: RHAmnose

ERY: ERYthritol

MEL: LELibiose

GRT: GlucoRonaTe

GNT: GlucoNaTe

LVT: LéVulinaTe

SBE: SorBosE

GLN: GLucosamiNe

ACT: ACTidione

ESC: ESCuline

HYPH: HYPPhes

ou pseudomycélium

LAT: DL-LAcTate

MAN: MANnitro

RIB: RIBose

PLE: PaLatinosE

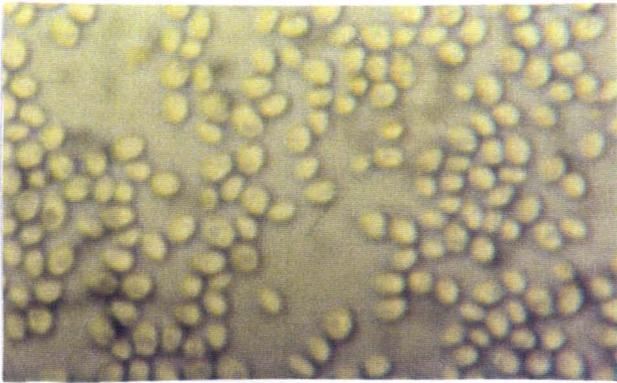
Tableau 9b (suite): Tests complémentaires pour l'identification de *Candida pelliculosa*, *Candida holmii* et *Kloeckera apis* sur galeries ID 32C.

	Temps d'incubation. (heures)	Tests complémentaires			probabilité d'identification (%)
		Hyphes ou pseudomycélium	Esculine	Croissance à 37°C (gélose Sabouraud)	
<i>Candida pelliculosa</i>	24	-	+	+	99,9
	48	-	+	++	
	72	-	+	++	
<i>Candida holmii</i>	24	-	nd(2)	-	99,1
	48	-	nd	+	
	72	-	nd	+	
<i>Kloeckera apis</i>	24	-	+	+	99,9
	48	-	+	++	
	72	-	+	++	

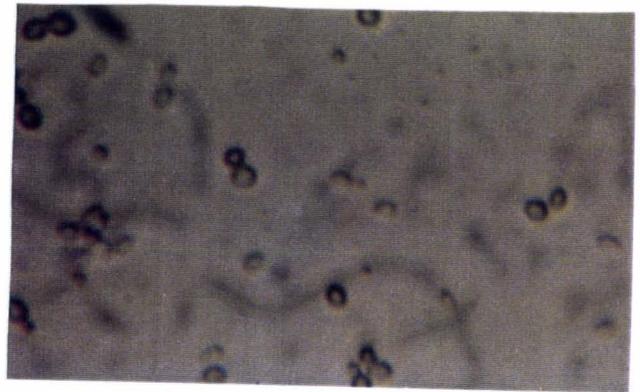
(2) Non déterminé.

Tableau 9c: Aspects macroscopiques et microscopiques des colonies de *Candida pelliculosa*, *Candida holmii* et *Kloeckera apis* isolées des jus et nectars de fruits exotiques.

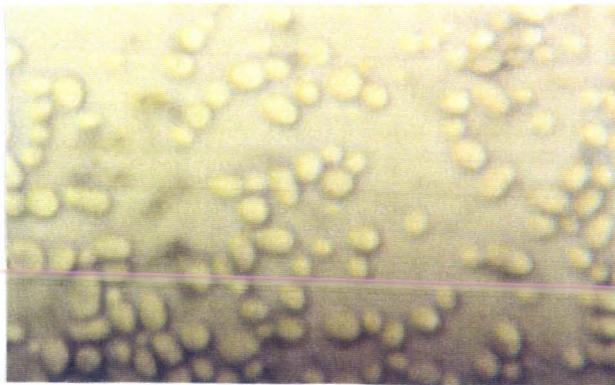
	Examen microscopique		Examen macroscopique sur gélose Sabouraud		
	Taille	Morphologie	Taille	Aspect des colonies	pigment
<i>Candida pelliculosa</i>	petite	levure	1 mm	lisse	blanc
<i>Candida holmii</i>	petite	levure/ovale	1 mm	lisse	blanc
<i>Kloeckera apis</i>	petite	levure/ovale	1 mm	lisse	blanc



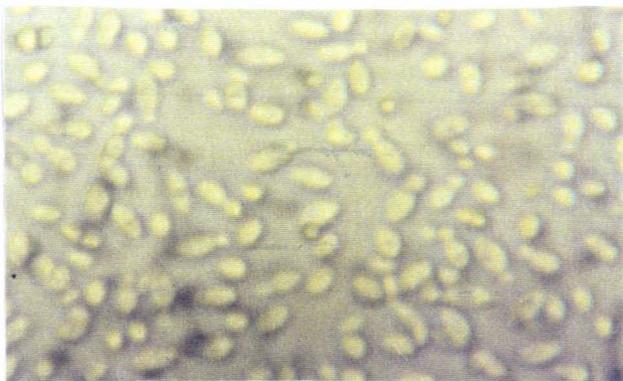
Candida holmii dans
le jus d'ananas.



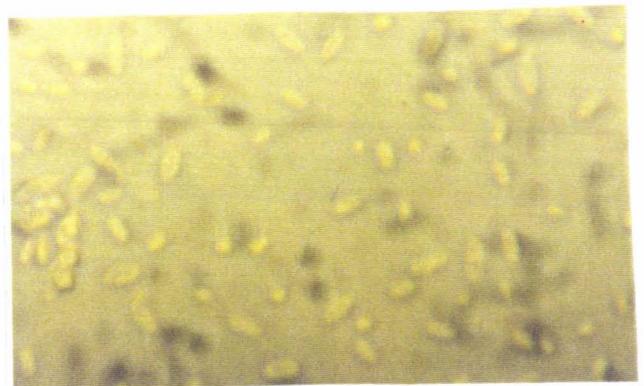
Candida holmii dans
le nectar de goyave.



Candida pelliculosa dans
le jus d'ananas.



Kloeckera apis dans
le jus d'ananas.



Kloeckera apis dans
le nectar de goyave.

Figure 9: Photos des souches de *Candida pelliculosa*, *Candida holmii* et *Kloeckera apis* dans le jus d'ananas (pH 3,95) et le nectar de goyave (pH 3,15) après incubation à 32°C pendant 48 heures (Photos Tchango, Décembre 1995), grossissement x 400.

QUALITE MICROBIOLOGIQUE DE JUS ET NECTARS DE FRUITS EXOTIQUES

J. TCHANGO-TCHANGO (*), T. NJINE (**), R. TAILLIEZ ***

MICROBIOLOGICAL QUALITY OF EXOTIC FRUITS JUICES AND NECTARS

Summary

Microbiological detections have been carried out on pineapple juice, guava, passion-fruit and grapefruit nectars produced at Njombe Agronomic Research Station in Cameroon.

Deep-frozen pineapple juice, guava, passion-fruit and grapefruit nectars without previous pasteurization were proved to contain many spoilage microorganisms such as yeasts (*Saccharomyces cerevisiae* and *Candida guilliermondii*, in particular), coliforms non pathogenic *Staphylococcus* and members of *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Micrococcus*, *Pediococcus* and *Acinetobacter* genera. Only pineapple juice with higher content of growth factors and with relatively high pH contained thermotolerant coliforms such as *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter agglomerans* and *Serratia rubidaea*. The microbiological quality of fruit nectars studied was acceptable. Nevertheless the presence of faecal microorganisms in non pasteurized pineapple juice considerably reduced its hygienic quality and made it unsuitable for consumption.

Pasteurization of these beverages by actinisation at 92°C (passion-fruit nectar) and at 94°C (pineapple juice, guava and grapefruit nectars) for 10 seconds clearly improved their microbiological qualities.

KEY-WORDS: Food microbiology - Microbiological quality - Fruit juices - Nectars - Deep-frozen - Pasteurization - Actinisation - Spoilage microorganisms - Thermotolerant coliforms.

INTRODUCTION

Depuis plus d'une décennie, les petites et moyennes industries de fabrication des jus et des nectars de fruits naturels sont en pleine expansion au Cameroun. Comme dans la plupart des pays du Sud producteurs de ces denrées, les productions ne sont malheureusement pas accompagnées du contrôle de la qualité de boissons obtenues.

Pour la plupart les travaux publiés sur le contrôle de la qualité des jus et nectars des fruits traitent essentiellement du contrôle des qualités chimiques et organoleptiques [2, 15, 16].

(*) Laboratoire de Technologie Alimentaire, Station de Recherches Agronomiques, B.P. 13, Njombe (Cameroun).

(**) Laboratoire de Biologie Générale, Faculté des Sciences, Université de Yaoundé, B.P. 812, Yaoundé (Cameroun).

(***) Laboratoire de Microbiologie, Institut Agricole et Alimentaire de Lille, Université des Sciences et Technologies de Lille, 59655 Villeneuve d'Ascq cedex (France).

Peu de travaux par contre ont été consacrés à l'étude des qualités microbiologiques. On pense en effet que grâce à leur pH acide, les jus et les nectars de fruits présentent un faible risque sanitaire pour les consommateurs [4, 10, 11].

La présente étude est une première contribution à la connaissance des qualités microbiologiques des principaux jus et nectars de fruits produits à l'unité de transformation des fruits et légumes de la Station de Recherches Agronomiques de Njombe au Cameroun.

MATERIELS ET METHODES

Préparation des échantillons - L'étude a porté sur le jus d'ananas (*Ananas comosus*) et les nectars de goyave (*Psidium guajava*), de grenadille (*Passiflora edulis* var. *flavicarpa*) et de pomelo (*Citrus paradisi*); les fruits frais utilisés pour leur fabrication ont été récoltés au stade de maturité normale dans les régions de Njombe et de Nkongsamba. La désinfection des fruits était assurée en maintenant ceux-ci 30 minutes dans une solution aqueuse d'hypochlorite de sodium titrant 2,5% (P/V). Les boissons étaient présentées sous la forme surgelée en sachets de plastique (polyéthylène de basse densité) d'un litre de contenance; elles étaient fabriquées selon des procédés discontinus (Tableaux I et II).

Des échantillons de ces jus et nectars ont également été pasteurisés par actinisation à l'aide d'un pasteurisateur électrique (Stoutz Actinator) à 92°C (nectar de grenadille) ou à 94°C (jus d'ananas, nectars de goyave et de pomelo) pendant 10 secondes après une désaération à 80°C, et ont été soit conditionnés en sachets de plastique (polyéthylène basse densité) pour être surgelés et conservés en chambre froide négative, soit conditionnés en bouteilles en verre pour être conservés à la température ambiante. Les barèmes de pasteurisation utilisés sont ceux qui n'affectent pas significativement les caractéristiques organoleptiques des produits traités.

96 échantillons de jus et de nectars de fruits ont été analysés, répartis en 24 échantillons respectivement pour les jus d'ananas, les nectars de goyave, de grenadille et de pomelo. Les eaux de lavage des fruits ont également été analysées ainsi que les eaux utilisées pour la fabrication des boissons.

Tableau I - Schéma du procédé de fabrication du jus d'ananas

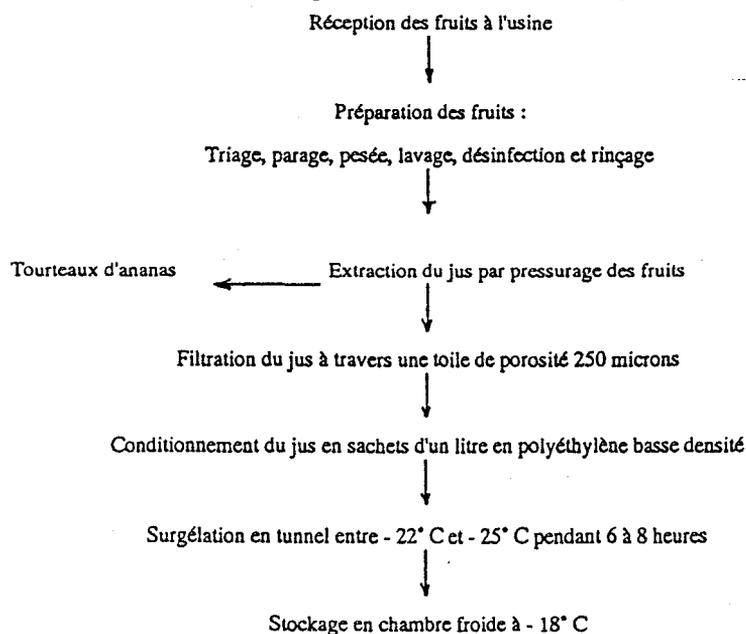
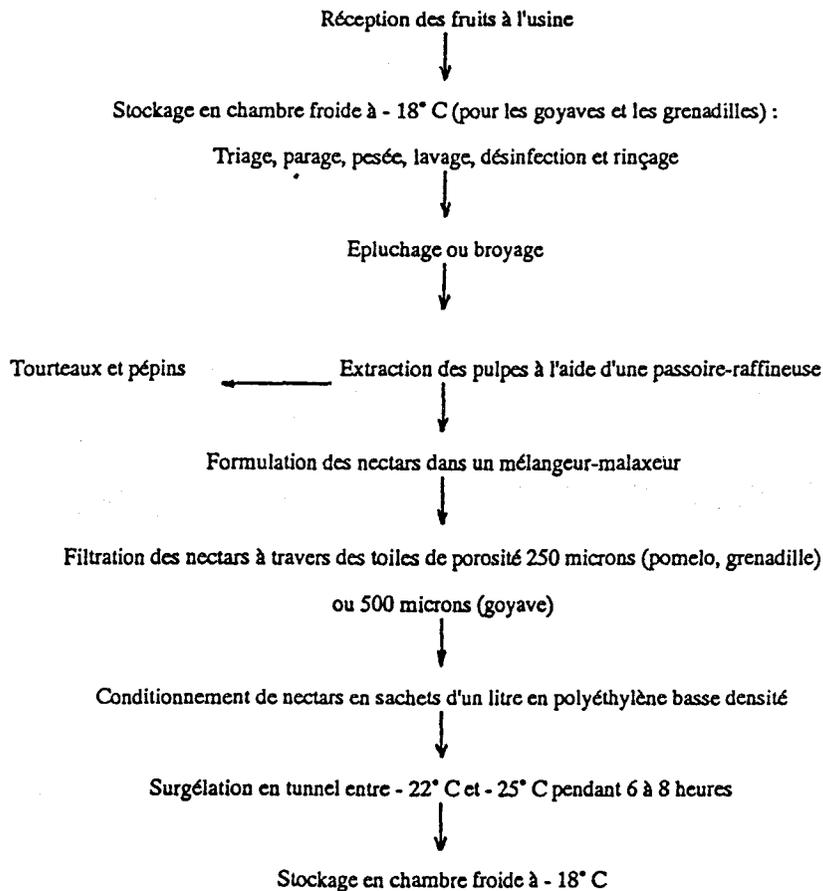


Tableau II - Schéma du procédé de fabrication des nectars de pomelo, de goyave et de grenadille



Analyses physico-chimiques et microbiologiques - Le pH des jus et nectars étudiés a été mesuré à l'aide d'un pH-mètre électronique de poche (Aquadata modèle APH 300).

Les analyses microbiologiques ont porté sur les germes présentant un intérêt en hygiène alimentaire. Il s'agit:

- des germes responsables d'altérations des aliments par modifications de l'aspect, du goût, de l'odeur, de la texture et de la saveur,
- des microorganismes indicateurs de contaminations tels que *Escherichia coli*, les coliformes thermotolérants et les streptocoques fécaux,
- des germes pathogènes susceptibles de provoquer des toxi-infections alimentaires.

Les milieux de culture (Sartorius et Institut Pasteur Production) utilisés sont indiqués dans le Tableau III).

Compte tenu de la forte acidité des produits étudiés, ceux-ci ont été neutralisés avant les analyses microbiologiques à l'aide d'une solution stérile de phosphate tripotassique à 20% afin de ne pas entraver le développement microbien sur les différents milieux de culture utilisés.

Les différentes dilutions des échantillons ont été analysées selon la technique des membranes filtrantes. L'identification des microorganismes a été complétée avec des tests biochimiques: coloration de GRAM, recherche de l'oxydase, de la coagulase ou de la

désoxyribonucléase, recherche du type respiratoire, utilisation des galeries API 20E et API 20C AUX.

Tableau III - Milieux de culture pour caractérisation et dénombrement des microorganismes [1, 3, 7]

Milieux de culture	Utilisation	Incubation
Gélose PCA	Dénombrement des germes totaux aérobies mésophiles	24 h à 37° C
Gélose TTC - Tergitol	Recherche et dénombrement des coliformes totaux	24 h à 37° C
Milieu ENDO	Recherche et dénombrement des coliformes thermotolérants	24 h à 44° C
Gélose EMB (lactosée à l'éosine et au bleu de méthylène)	Isolément des Entérobactéries issues des différents milieux (TTC-Tergitol, Endo, etc...) en vue de l'identification	24 h à 37° C
Gélose TSN (tryptone - sulfite-néosine)	Isolément et dénombrement des <u>Clostridium perfringens</u> en tube avec ensemencement en profondeur	24 h à 44° C
Milieu de Chapman mannité	Recherche et dénombrement des Staphylocoques	24 à 48 h à 37° C
Gélose OGA (glucosée à l'oxytétracycline)	Recherche et dénombrement des levures et des moisissures	48-72 h à 28-32° C
Gélose MRS (Man, Rogosa et Sharpe)	Recherche et dénombrement des <u>Lactobacillus</u> et éventuellement des <u>Bacillus</u>	24 à 48 h à 30° C en atmosphère enrichie de 10 % de CO ₂
Gélose viande-foie à 6 %	Recherche du mode respiratoire des bactéries	24 h à 37° C
Milieu de Slanetz et Bartley	Recherche et dénombrement des Streptocoques fécaux	24 h à 37° C
Gélose à l'ADN (acide désoxyribonucléique)	Recherche de la désoxyribonucléase des bactéries	24 h à 37° C
Milieu glucose-tryptone sur carton (Sartorius)	Recherche et dénombrement des germes mésophiles et thermophiles sporulants	2 à 3 j à 30° C pour les germes mésophiles et 1 à 2 j à 55° C pour les germes thermophiles sporulants
Milieu de Weman sur carton (Sartorius)	Recherche et dénombrement des bactéries mésophiles favorisant les dépôts mucilagineux (<u>Leuconostoc mesenteroides</u>)	48 à 72 h à 30° C
Milieu VLB-S-7 agar sur carton (Sartorius)	Recherche et dénombrement des Pédicoques et Lactobacilles	en anaérobiose 2 à 3 j à 25-28° C
Milieu au bleu de Chine sur carton (Sartorius)	Recherche et dénombrement des germes acidifiants et non acidifiants	24 à 48 h à 30° C
Milieu au sérum à l'orange sur carton (Sartorius)	Recherche et dénombrement des germes acidotolérants	48 à 72 h à 25-30° C
Milieu au Cétrimide	Isolément de <u>Pseudomonas aeruginosa</u>	24 h à 42° C

RESULTATS

Les eaux de fabrication des boissons étudiées sont exemptes de levures et moisissures, de coliformes (totaux ou thermotolérants), de staphylocoques pathogènes, de streptocoques fécaux, de *Pseudomonas aeruginosa* (absence dans 100 ml d'eau) ainsi que de spores de *Clostridium* sulfite-réducteurs (absence dans 20 ml). Elles contiennent en outre quelques germes mésophiles (11 ± 3 pour 100 ml) et présentent ainsi une qualité microbiologique irréprochable.

Les résultats d'analyses des premières eaux de lavage des fruits (Tableau IV) révèlent que les ananas et les pomelos sont plus chargés en germes totaux mésophiles à leur surface

(environ 10^8 germes par gramme de fruits lavés) que les goyaves et les grenadilles (de l'ordre de 10^5 germes par gramme de fruits lavés). Il en est de même pour leurs charges en levures et moisissures ainsi qu'en coliformes (totaux et thermotolérants). Les streptocoques fécaux, les staphylocoques pathogènes, les *Pseudomonas aeruginosa* et les spores de *Clostridium* sulfito-réducteurs sont en outre absents dans ces eaux de lavage; les eaux de rinçage des fruits, quant à elles, ne contiennent plus que quelques microorganismes. Il s'en suit que le traitement de désinfection des fruits réalisé avant leur rinçage est relativement efficace.

Tableau IV - Analyses microbiologiques des eaux de lavage des fruits utilisés
(nombre de germes par gramme de fruits lavés)

		Germes totaux mésophiles	Coliformes totaux	Coliformes thermo- tolérants	Levures et moisissures
Ananas	EL (a)	$(130 \pm 3) 10^6$	$(20 \pm 1) 10^5$	$(64 \pm 2) 10^2$	$(128 \pm 5) 10^3$
	ER (b)	19 ± 2	5 ± 1	0	13 ± 2
Pomelo	EL	$(124 \pm 5) 10^6$	$(253 \pm 9) 10^4$	$(47 \pm 2) 10^2$	$(121 \pm 4) 10^3$
	ER	15 ± 3	6 ± 1	0	13 ± 3
Goyave	EL	$(100 \pm 4) 10^3$	$(75 \pm 4) 10$	$(50 \pm 2) 10$	41 ± 2
	ER	10 ± 1	4 ± 1	0	6 ± 1
Grenadille	EL	$(150 \pm 5) 10^3$	$(108 \pm 7) 10$	$(58 \pm 2) 10$	43 ± 3
	ER	12 ± 1	6 ± 1	0	6 ± 2

(a) EL: Premières eaux de lavage des fruits (en moyenne 100 kg de fruits dans 100 l d'eau) - (b) ER: Eaux de rinçage des fruits après leur désinfection dans l'eau additionnée d'hypochlorite de sodium à 2,5% (P/V).

Les jus et les nectars de fruits surgelés en sachets de plastique sans pasteurisation préalable ont une charge microbienne variée et non négligeable (Tableau V). Cette charge est caractérisée par la présence de germes d'altération: on y trouve des levures (*Saccharomyces cerevisiae* et *Candida guilliermondii* en particulier), des coliformes, des microcoques, des lactobacilles, des pédiocoques, des staphylocoques non pathogènes et des représentants des genres *Acinetobacter*, *Bacillus* et *Leuconostoc*. On y dénombre en outre des quantités variant de $2 \cdot 10^3$ à $1 \cdot 10^5$ germes totaux mésophiles par ml de boisson. Le jus d'ananas non pasteurisé contient par ailleurs environ $2 \cdot 10^3$ coliformes thermotolérants par ml, dont *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter agglomerans* et *Serratia rubidaea*.

Après pasteurisation, les jus et les nectars de fruits n'hébergent plus que quelques germes d'altération: les germes totaux mésophiles sont alors de 130 à 140 par ml de jus d'ananas, et de 40 à 80 par ml dans les divers nectars (goyave, grenadille et pomelo); les coliformes totaux sont en nombre inférieur à 100 par ml dans le jus d'ananas, et de 0 à 15 dans les divers nectars; les levures sont toujours en quantité inférieure à 15 unités revivifiables par ml pour toutes les boissons; les lactobacilles sont uniquement retrouvés dans le jus d'ananas à moins de 20 germes par ml. La pasteurisation en bouteilles de verre permet d'obtenir des charges microbiennes encore plus basses. Cette opération de destruction

thermique est favorisée par l'acidité des boissons étudiées: le jus d'ananas étudié a un pH compris entre 4,5 et 5,5; il est moins acide que les nectars de goyave, de grenadille et de pomelo dont le pH se situe entre 3,2 et 3,8. En outre, ce facteur joue un rôle important dans la stabilité du produit ainsi que dans la sélection des types de microorganismes qui se développent dans les jus et les nectars de fruits [4, 11].

Qu'elles soient pasteurisées ou non, les boissons étudiées ne contiennent pas de spores anaérobies de *Clostridium* sulfite-réducteurs. Elles sont exemptes par ailleurs de staphylocoques pathogènes et de streptocoques fécaux.

Tableau V - Analyses microbiologiques du jus d'ananas et de nectars de goyave, de grenadille et de pomelo surgelés en sachets de plastique sans pasteurisation préalable (nombre de germes par millilitre)

Germes recherchés	Jus d'ananas	Nectar de goyave	Nectar de grenadille	Nectar de pomelo
Germes totaux mésophiles	(100±6) 10 ³	(21±3) 10 ²	(38±2) 10 ²	(26±2) 10 ³
Coliformes totaux	(30±3) 10 ³	115±4	240±32	(19±2) 10 ²
Coliformes thermotolérants	(19±2) 10 ²	0	0	0
Levures	(50±5) 10 ³	(5±1) 10 ²	270±16	(27±3) 10 ²
Leuconostoc	700±25	150±3	70±2	600±20
Pédiocoques	0	50±2	60±2	650±60
Lactobacilles	150±16	140±3	55±2	65±3
Bacillus spp.	0	15±2	15±2	80±2
Germes acido-tolérants				
-Microcoques	(50±3) 10 ²	254±9	45±4	950±30
-Levures	(20±2) 10 ³	300±20	105±4	600±20
Germes acidifiants et non acidifiants				
-Staphylocoques non pathogènes	(10±4) 10 ²	0	100±6	500±30
-Levures	(20±2) 10 ³	200±20	200±11	(25±4) 10 ²
Germes mésophiles et germes thermophiles sporulants				
-Levures	(75±3) 10 ²	300±20	150±4	(17±2) 10 ²
-Acinetobacter calcoaceticus var. Iwoffii	(30±3) 10 ²	0	50±2	300±20

DISCUSSION

Les premières eaux de lavage des ananas et des pomelos sont plus chargées en microorganismes que celles des goyaves et des grenadilles. Cette situation peut s'expliquer par le fait que les goyaves et les grenadilles, dès leur réception à l'usine, sont généralement stockées en chambre froide à -18°C; elles n'en sortent qu'au moment où seront réalisés le lavage et la transformation, contrairement aux ananas et aux pomelos qui restent toujours à la température ambiante avant ces deux opérations. Les germes microbiens présents dans les jus et les nectars étudiés doivent provenir non seulement des matières premières (fruits et sucre notamment) mais aussi de l'environnement, des manipulateurs et de l'ensemble

du matériel de la chaîne de fabrication: l'importance de toutes les étapes liées au procédé de fabrication a déjà été signalée pour divers produits alimentaires [9, 11].

La flore microbienne des nectars de goyave, de grenadille et de pomelo surgelés en sachets de plastique sans pasteurisation préalable est constituée des seuls germes d'altération. Ce résultat est pratiquement en accord avec les normes Codex pour les jus et nectars de fruits [2] et avec les normes de composition microbiologique des produits végétaux surgelés rapportées par Guiraud et Galzy [11]. Ces dernières recommandent en effet un seuil tolérable de 500 germes totaux mésophiles, 1000 coliformes totaux et 50 levures par gramme de produit surgelé. Pour les autres germes qui sont absents dans les nectars étudiés, les normes Codex recommandent en outre un seuil tolérable de 10 *Escherichia coli*, 10 staphylocoques pathogènes et 10 spores anaérobies de *Clostridium* sulfite-réducteur par gramme de produit surgelé.

La nature de la flore microbienne des nectars étudiés semble être en rapport avec le pH acide (3,2 à 3,8) de ceux-ci: de telles conditions sont en effet favorables au développement des germes d'altération, en particulier des bactéries acidophiles (lactiques et acétiques notamment), des levures et des moisissures [6, 12, 14, 18, 19, 20]. Ces germes sont susceptibles de devenir préjudiciables à la qualité marchande des boissons si celles-ci ne sont pas conservées dans des conditions appropriées qui empêchent le développement de ces microorganismes. Bien conservés, les nectars de goyave, de grenadille et de pomelo paraissent ne présenter aucun risque sanitaire pour les consommateurs.

La présence non négligeable d'*Escherichia coli* et d'autres coliformes thermotolérants dans le jus d'ananas surgelé en sachets de plastique sans pasteurisation préalable, présence probablement favorisée par un pH moins acide (compris entre 4,5 et 5,5) et une certaine richesse en facteurs de croissance, déprécie considérablement sa qualité hygiénique et le rend impropre à la consommation. Toutefois, les bactéries responsables de toxi-infections alimentaires telles que *Salmonella*, *Shigella*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, ne se développent pas dans les aliments très acides (pH voisin de 3) ou acides (pH compris entre 3 et 5), mais peuvent y survivre [5, 12, 13]. En outre, leurs toxines ne sont généralement pas produites dans un milieu à pH inférieur à 5 à l'exemple des jus de fruits acides.

La faible charge microbienne du jus d'ananas et des nectars de goyave, de grenadille et de pomelo conservés après pasteurisation, ainsi que l'absence des germes de contamination fécale et autres coliformes thermotolérants dans le jus d'ananas pasteurisé, montrent que ce traitement thermique améliore considérablement les qualités microbiologiques et hygiéniques des boissons étudiées [17].

CONCLUSION

Les nectars de goyave, de grenadille et de pomelo, qu'ils soient pasteurisés ou non, n'hébergent que des microorganismes d'altération. Par leurs qualités microbiologiques conformes aux normes, ces boissons ne présentent aucun risque sanitaire pour leurs consommateurs.

La présence massive de coliformes thermotolérants (en l'occurrence *Escherichia coli*) dans le jus d'ananas surgelé en sachets de plastique sans pasteurisation préalable déprécie sa qualité hygiénique et le rend impropre à la consommation. Pour l'amélioration des qualités microbiologiques et hygiéniques de cette boisson, sa pasteurisation avant la surgélation est indispensable.

Les résultats de cette étude permettent de souligner la nécessité du contrôle des qualités microbiologiques des jus et des nectars des fruits produits au Cameroun, en vue de leur commercialisation.

REMERCIEMENTS

Nous tenons à remercier Madame Marguerite Wouafo-Ndayo, responsable du laboratoire de bactériologie du Centre Pasteur du Cameroun à Yaoundé, pour son concours dans l'identification des souches microbiennes, ainsi que la Direction de l'Institut de Recherches Agronomiques pour l'appui financier apporté dans le cadre de ce travail.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] Anonyme - Techniques microbiologiques pour l'eau, les boissons et les produits alimentaires. Ed. Sartorius (Paris), 1971.
- [2] Anonyme - Normes Codex pour les jus de fruits, les concentrés de jus de fruits et les nectars de fruits. Programme mixte FAO/OMS, 1ère ed., 1982.
- [3] Anonyme - Milieux et réactifs de laboratoire. Microbiologie, Immunologie, Diagnostics Pasteur, 3e ed., Paris, 1987.
- [4] BEECH F.W. - Microbiology of fruits juices, in "Congrès International des jus de fruits". Merano, Zurich, Juris Druck Verlag, 1977, 8, 107-134.
- [5] BOCQUET J. - Généralités sur les microorganismes, in R. SCRIBAN (Coord.), *Biotechnologie*, 2e ed., Techn. et Doc. (Paris), 1984, 13-63.
- [6] BOUDAREL M.J., RAMIREZ A. - Détermination des différentes souches bactériennes contaminantes du jus de betterave et du moût fermenté en distillerie agricole. Ind. Aliment. Agric., 1984, 103, 5-11.
- [7] BOURGEOIS C.M., LEVEAU J.Y. - Techniques d'analyse et de contrôle dans les industries agro-alimentaires. III - Le contrôle microbiologique. Techn. Doc. Lavoisier (Paris), 1980.
- [8] COURTOISIER A.J. - Action destructive de la chaleur sur les microorganismes. Calcul pratique d'un traitement thermique et application au vin. Ind. Aliment. Agric., 1984, 103, 103-114.
- [9] DAVENPORT R. - Microbiology in prospective, in "Symposium sur les progrès récents dans le domaine des jus de fruits et de légumes". Féd. Internat. Producteurs de Jus de Fruits (Zurich), 1980, 155-175.
- [10] DOORES S. - The microbiology of apples and apple products. CRC Crit. Rev. Food Sci. and Nutrition, 1983, 19, 133-149.
- [11] GUIRAUD J., GALZY P. - L'analyse microbiologique dans les industries alimentaires. Collection Génie Alimentaire, 1ère ed., (Paris), 1980.
- [12] HSU E.J., BEUCHAT L.R. - Factors affecting microflora in processed fruits, in "Commercial fruit processing". The AVI Publ. Co (Westport), 1986, 129-161.
- [13] JOHNSON K.M. - Microbiology of apple juice. Apple juice workshop. Special report. New York State Agric. Exp. Station (Geneva), 1984, 54, 24-27.
- [14] JUVEN B.J. - Bacterial spoilage of citrus products at pH lower than 3.5. J. Milk Food Technol., 1976, 39, 819-822.
- [15] KRAMER A., TWIGG B.A. - Quality control for the food industry, 3rd ed., Vol. I: Fundamentals. The AVI Publ. Co (Westport), 1970.
- [16] KRAMER A., TWIGG B.A. - Quality control for the food industry, 3rd ed., Vol. 2: Applications. The AVI Publ. Co. (Westport), 1973.
- [17] LEUNG H.K., SWANSON B.G., AW T.L., DAVIS D.C., KRANZIER G.A. - Thermal resistance of microorganisms and polyphenol oxydase as related to solar pasteurization of concord grape juice. J. Food Protection, 1982, 45, 913-918.
- [18] MAGAUDA P.L. - Les problèmes microbiologiques dans le contrôle de la qualité des jus de fruits. Proc. Congrès Int. Ind. Agric. Aliment. (Athènes), 1974, 12, 701-704.
- [19] SPLITTSTOESSER D.F. - Microorganisms involved in the spoilage of fermented fruit juices. J. Food Protection, 1982, 45, 874-877.
- [20] SWANSON K.M.J., LEASOR S.B., DOWNING D.L. - Aciduric and heat resistant microorganisms in apple juice and cider processing operations. J. Food Sci., 1985, 50, 336-339.

2. Etude de la croissance des levures d'altération

Dans la perspective des solutions éventuelles à proposer à la SAIFO et à d'autres industries de jus de fruits confrontées aux mêmes problèmes, nous avons envisagé l'étude de la croissance et de la thermorésistance des souches de levures isolées.

Le nectar de goyave qui représente plus de 70% de la production des jus et nectars de fruits au Cameroun a été choisi comme milieu de culture pour le plan expérimental de l'étude. Le jus d'ananas a également été utilisé comme milieu de culture et selon le même plan d'expérience pour l'étude de la croissance de *Candida holmii* qui a été isolée exclusivement dans cette boisson.

2.1. *Candida pelliculosa*

2.1.1. Equation et courbe d'étalonnage

L'équation de la croissance de la levure a été établie pendant la phase de croissance. Une régression exponentielle a permis de définir la relation entre le nombre de cellules viables (UFCml⁻¹) et la densité optique (DO) à 630 nm consécutive à la croissance de la levure dans le nectar de goyave commercial (pH 3,15). Le dénombrement des cellules viables a été réalisé sur gélose glucosée à l'extrait de pomme de terre (PDA) acidifiée à pH 3,5 par addition de 1% d'une solution d'acide tartrique à 10%, après incubation à 32°C pendant 48 à 72 heures.

Cette relation illustrée par la courbe d'étalonnage (figure 10) est la suivante:

$$\text{UFCml}^{-1} \text{ de } C. \textit{pelliculosa} = (3190794,27) \cdot e^{2,29(\text{DO})}$$

Les valeurs utilisées pour établir cette équation sont présentées au tableau 10.

Tableau 10: Données utilisées pour l'établissement de l'équation et de la courbe d'étalonnage de la croissance de *Candida pelliculosa* dans le nectar de goyave commercial (pH 3,15).

DO à 630 nm	UFC/ml	UFC/ml (cal)
0.1294	235000	4292992.63
0.5869	15500000	12256195.6
0.6563	14350000	14370331.6
0.7782	23000000	19004627
0.9095	22000000	25681050.2
1.0079	26500000	32181268.9
1.0309	35500000	33924028.7
1.0363	33500000	34346694.1
1.0525	38500000	35646550.2
1.0932	40500000	39133445

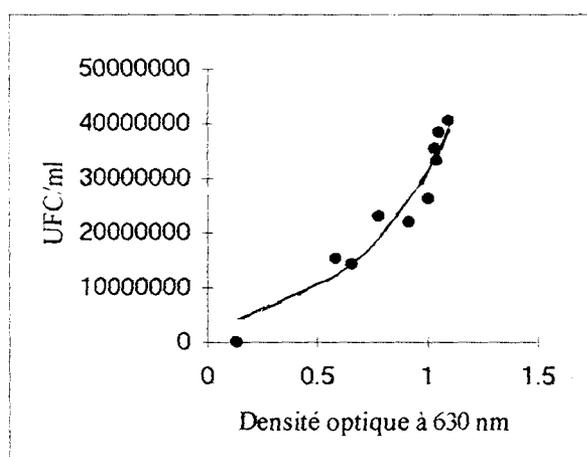


Figure 10: Courbe d'étalonnage de la croissance de *Candida pelliculosa* dans le nectar de goyave commercial (pH 3,15).

2.1.2. Histogramme, courbes et taux de croissance

Les courbes de croissance (moyenne de deux répétitions) donnant la DO en fonction du temps à 2°C, 5°C, 10°C, 15°C, 25°C, 32°C, 35°C, 37°C, 39°C et 46°C, de *Candida pelliculosa* dans le nectar de goyave ajusté à différents pH (1,55; 1,85; 2,00; 2,50; 3,15; 4,00; 5,00 et 6,25) sont présentées respectivement dans les figures 11 à 20. Les valeurs maximales de la DO s'obtiennent en général après environ 90 heures d'incubation. De même, les courbes de croissance de la levure dans le jus d'ananas (pH 3,95) et le nectar de grenadille (pH 3,03) commerciaux ainsi que dans

les jus d'orange (pH 3,85), de pomélo ou pamplemousse (pH 3,13), pomme (pH 3,50) et raisin (pH 3,57) à 25°C, 32°C, 35°C et 37°C sont illustrées par les figures 21 à 24.

Le taux maximal de croissance de la levure (μ_{max} ou μ_{expo}) dans ces différentes boissons, calculé pendant les phases exponentielles de croissance respectivement à 25°C et 32°C, est consigné au tableau 20. Il varie de 0,038 h⁻¹ (dans le nectar de goyave à 25°C) à 0,079 h⁻¹ (dans le nectar de grenadille à 32°C).

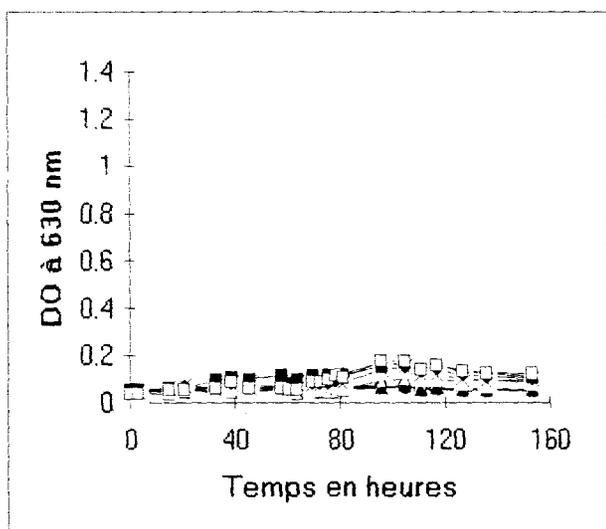


Figure 11: Courbes de croissance de *Candida pelliculosa* dans le nectar de goyave à 2°C à différentes valeurs de pH, 1.55 (●), 1.85 (○), 2.00 (▲), 2.50 (△), 3.15 (×), 4.00 (◆); 5.00 (■) et 6.25 (□).

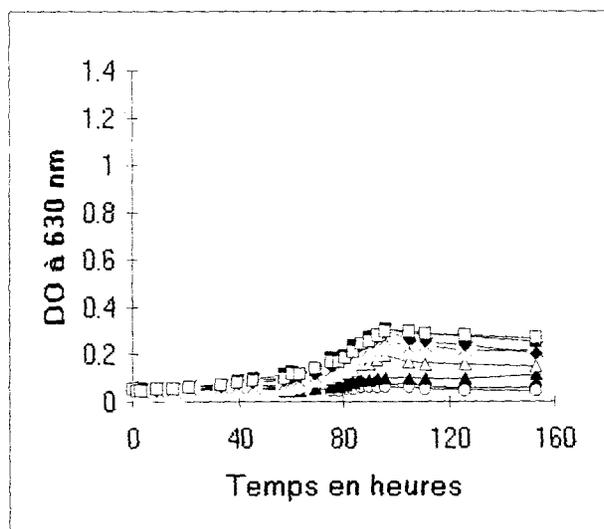


Figure 12: Courbes de croissance de *Candida pelliculosa* à dans le nectar de goyave à 5°C à différentes valeurs de pH, 1.55 (●), 1.85 (○), 2.00 (▲), 2.50 (△), 3.15 (×), 4.00 (◆); 5.00 (■) et 6.25 (□).

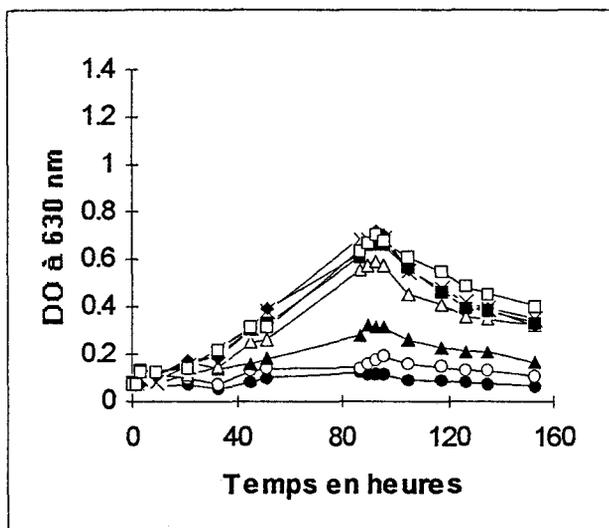


Figure 13: Courbes de croissance de *Candida pelliculosa* dans le nectar de goyave à 10°C à différentes valeurs de pH, 1.55 (●), 1.85 (○), 2.00 (▲), 2.50 (△), 3.15 (×), 4.00 (◆), 5.00 (■) et 6.25 (□).

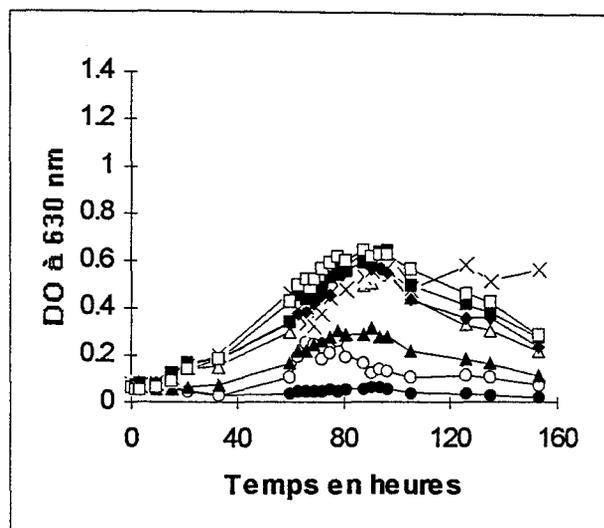


Figure 14: Courbes de croissance de *Candida pelliculosa* à dans le nectar de goyave à 15°C à différentes valeurs de pH, 1.55 (●), 1.85 (○), 2.00 (▲), 2.50 (△), 3.15 (×), 4.00 (◆), 5.00 (■) et 6.25 (□).

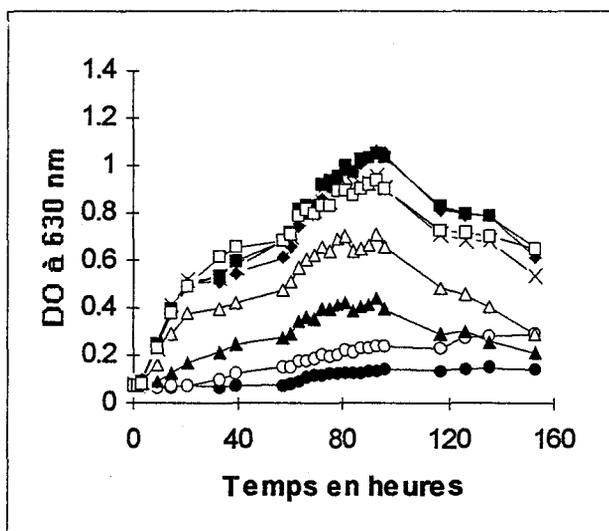


Figure 15: Courbes de croissance de *Candida pelliculosa* dans le nectar de goyave à 25°C à différentes valeurs de pH, 1.55 (●), 1.85 (○), 2.00 (▲), 2.50 (△), 3.15 (×), 4.00 (◆), 5.00 (■) et 6.25 (□).

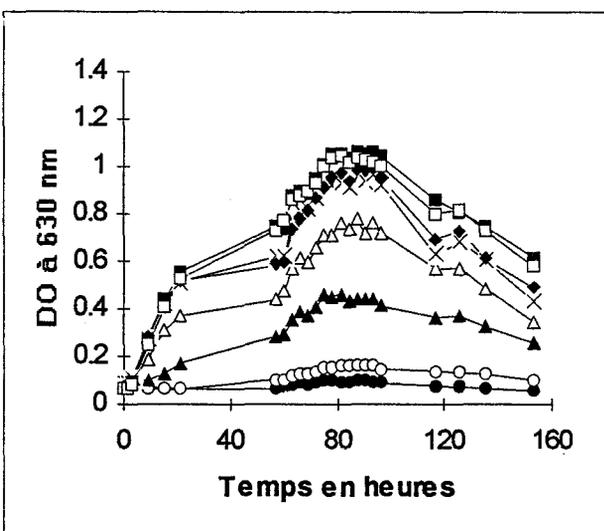


Figure 16: Courbes de croissance de *Candida pelliculosa* à dans le nectar de goyave à 32°C à différentes valeurs de pH, 1.55 (●), 1.85 (○), 2.00 (▲), 2.50 (△), 3.15 (×), 4.00 (◆), 5.00 (■) et 6.25 (□).

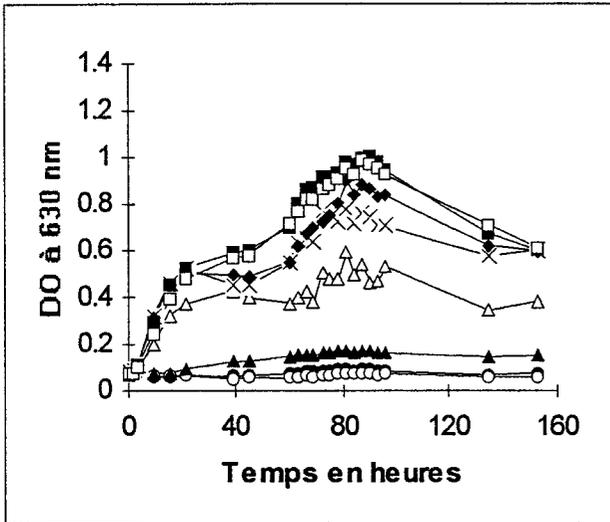


Figure 17: Courbes de croissance de *Candida pelliculosa* dans le nectar de goyave à 35°C à différentes valeurs de pH, 1.55 (●), 1.85 (○), , 2.00 (▲), 2.50 (△), 3.15 (×), 4.00 (◆); 5.00 (■) et 6.25 (□).

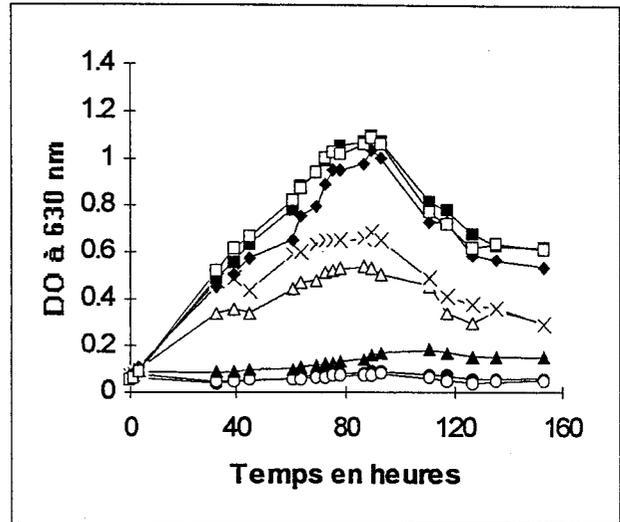


Figure 18: Courbes de croissance de *Candida pelliculosa* à dans le nectar de goyave à 37°C à différentes valeurs de pH, 1.55 (●), 1.85 (○), 2.00 (▲), 2.50 (△), 3.15 (×), 4.00 (◆); 5.00 (■) et 6.25 (□).

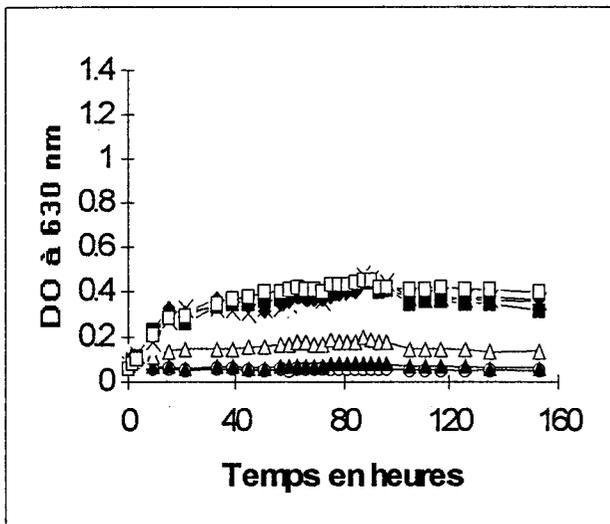


Figure 19: Courbes de croissance de *Candida pelliculosa* dans le nectar de goyave à 39°C à différentes valeurs de pH, 1.55 (●), 1.85 (○), , 2.00 (▲), 2.50 (△), 3.15 (×), 4.00 (◆); 5.00 (■) et 6.25 (□).

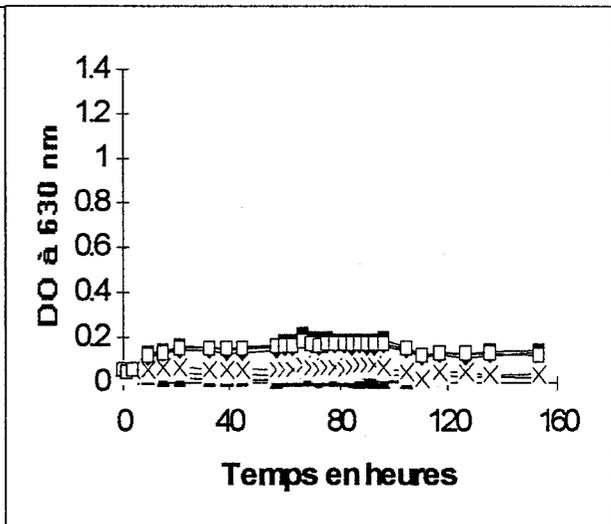


Figure 20: Courbes de croissance de *Candida pelliculosa* à dans le nectar de goyave à 46°C à différentes valeurs de pH, 1.55 (●), 1.85 (○), 2.00 (▲), 2.50 (△), 3.15 (×), 4.00 (◆); 5.00 (■) et 6.25 (□).

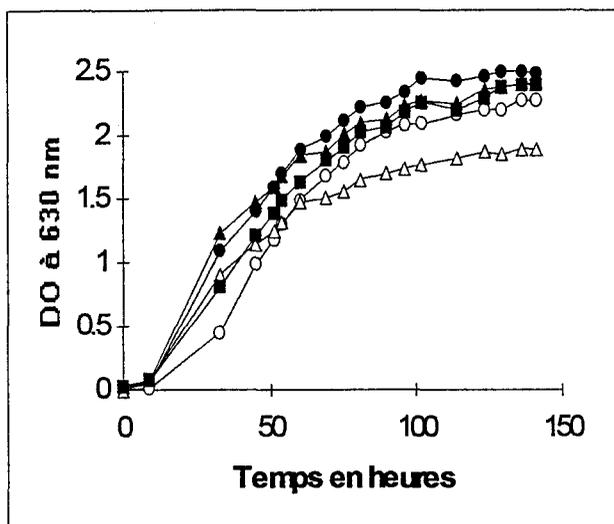


Figure 21: Courbes de croissance de *Candida pelliculosa* à 25°C dans le jus d'ananas pH 3,95 (●), (●), le nectar de grenadille pH 3,03 (○), le jus d'orange pH 3,85 (▲), le jus de pamplemousse ou pomelo pH 3,13 (△), le jus de pomme pH 3,50 (■) et le jus de raisin pH 3,57 (□).

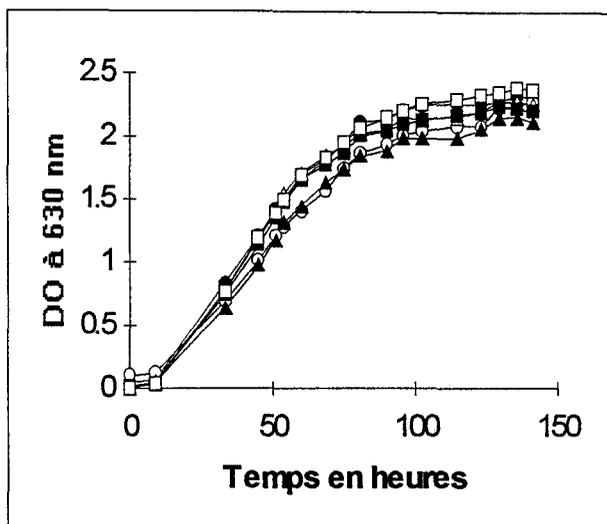


Figure 22: Courbes de croissance de *Candida pelliculosa* à 32°C dans le jus d'ananas pH 3,95 le nectar de grenadille pH 3,03 (○), le jus d'orange pH 3,85 (▲), le jus de pamplemousse ou pomelo pH 3,13 (△), le jus de pomme pH 3,50 (■) et le jus de raisin pH 3,57 (□).

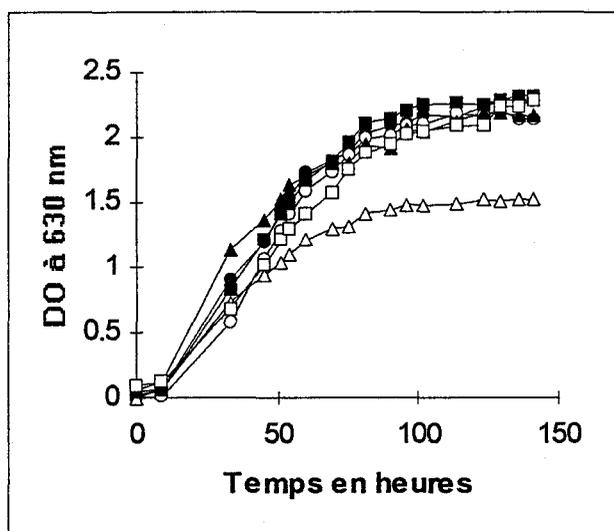


Figure 23: Courbes de croissance de *Candida pelliculosa* à 35°C dans le jus d'ananas pH 3,95 (●), (●), le nectar de grenadille pH 3,03 (○), le jus d'orange pH 3,85 (▲), le jus de pamplemousse ou pomelo pH 3,13 (△), le jus de pomme pH 3,50 (■) et le jus de raisin pH 3,57 (□).

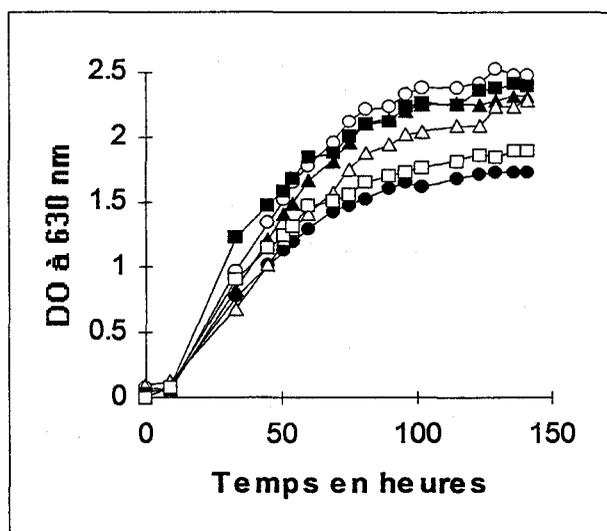


Figure 24: Courbes de croissance de *Candida pelliculosa* à 37°C dans le jus d'ananas pH 3,95 le nectar de grenadille pH 3,03 (○), le jus d'orange pH 3,85 (▲), le jus de pamplemousse ou pomelo pH 3,13 (△), le jus de pomme pH 3,50 (■) et le jus de raisin pH 3,57 (□).

L'histogramme à 3 dimensions montrant la DO maximale (moyenne de 2 répétitions) en fonction des valeurs de pH et des températures de stockage (figure 25) montre que la valeur la plus élevée (1,095 pour environ $39,2 \times 10^6$ UFCml⁻¹) s'observe à 37°C et pH 6,25. Les valeurs de DO maximale obtenues pour les pH compris entre 1,55 et 2,00 sont très faibles, particulièrement à 2°C, 39°C et 46°C (tableau 11).

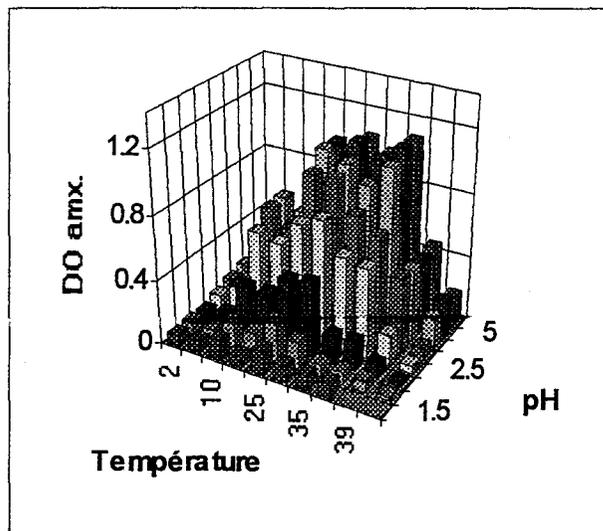


Figure 25: Histogramme à 3 dimensions illustrant la croissance de *Candida pelliculosa* dans le nectar de goyave en fonction des variations de pH et des températures de stockage.

2.1.3. Equation polynomiale et courbes modélisées de croissance

En considérant la température ambiante maximale rencontrée au Cameroun (environ 37°C) et dans la majeure partie des régions tropicales d'une part, et les valeurs de pH des pulpes, jus et nectars de fruits d'autre part, seules les valeurs de température de 2°C à 37°C et pH de 2,00 à 6,25 ont été considérées pour la modélisation.

Tableau 11: Données utilisées pour la construction de l'histogramme à 3 dimensions illustrant la croissance de *Candida pelliculosa* dans le nectar de goyave à différents pH et températures de stockage (moyenne de 2 répétitions).

pH/T°C	2	5	10	15	25	32	35	37	39	46
1.5	0.06725	0.07385	0.121	0.0633	0.14805	0.09765	0.09115	0.08805		
1.85	0.0714	0.06925	0.1559	0.1392	0.24435	0.16665	0.0769	0.0771	0.06385	0.02125
2	0.0691	0.1032	0.3149	0.3137	0.43915	0.46105	0.1741	0.1801	0.0851	0.0204
2.5	0.104	0.1946	0.5932	0.55755	0.71565	0.77905	0.589	0.56085	0.1931	0.04475
3.15	0.14035	0.26015	0.6813	0.5868	0.95935	0.9685	0.77585	0.68915	0.4724	0.0767
4	0.1695	0.29975	0.6885	0.62905	1.05935	0.99615	0.8989	1.04005	0.4525	0.18345
5	0.1725	0.3061	0.125	0.64785	1.0484	1.07755	1.001	1.10055	0.4436	0.2111
6.25	0.1737	0.3021	0.1616	0.649	0.93795	1.04645	0.9848	1.0951	0.45705	0.1787

L'équation mathématique du modèle permettant de prédire les effets et les interactions des deux paramètres environnementaux sur le développement de la levure a été obtenue par régression linéaire multiple sans terme constant entre la DO maximale (variable expliquée) donnée par la croissance *Candida pelliculosa* dans le nectar de goyave, le pH initial du milieu de culture (variable P) et la température de stockage (variable T). Elle est la suivante:

$$\text{DO max.} = 0,0288T + 0,0726P - 0,0008T^2 - 0,012P^2 + 0,0056TP,$$

avec $r^2=0,97$, ddl=82 et p=100% (probabilité pour que cette équation soit vérifiée).

Les valeurs de la densité optique maximale prédites par le modèle à différents pH et températures de stockage sont illustrées par les courbes de la figure 26. Les données expérimentales utilisées pour construire le présent modèle sont présentées à l'annexe 5.

D'après ce modèle polynomial construit, la densité maximale de population de *C. pelliculosa* (DO max de 1,25) est environ de $55,9 \times 10^6$ UFCml⁻¹ au pH de 6,25 et à la température de 37°C. Dans le nectar de goyave commercial (pH 3,15) stocké à 10°C (température de réfrigération), 25°C, 32°C et 37°C (températures ambiantes dans différentes régions du Cameroun et de nombreux pays tropicaux), les valeurs prédites des densités maximales de population de *C. pelliculosa* sont respectivement de $8,67 \times 10^6$ UFCml⁻¹ (DO max de 0,44), $13,74 \times 10^6$ UFCml⁻¹ (DO max de 0,64), $12,85 \times 10^6$ UFCml⁻¹ (DO max de 0,61) et $10,97 \times 10^6$ UFCml⁻¹ (DO max de 0,54).

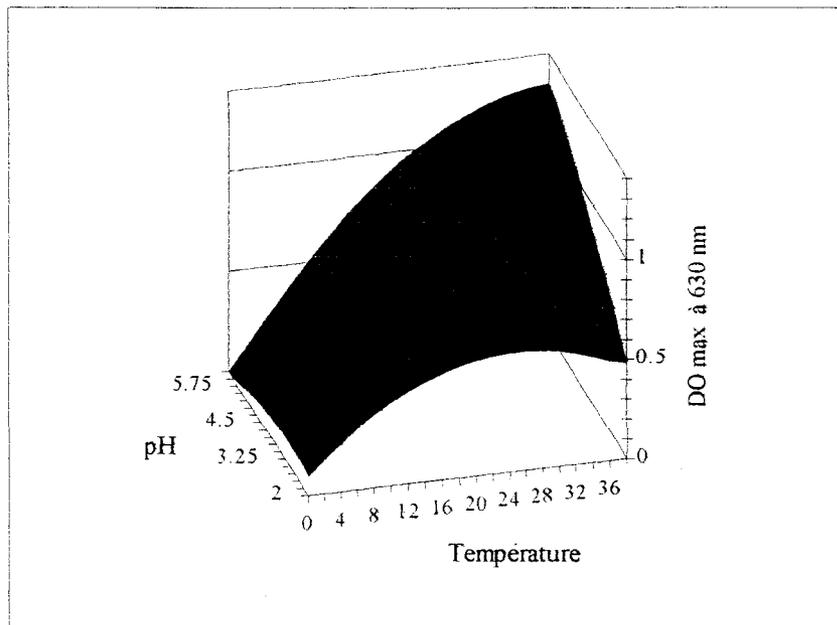


Figure 26: Courbes modélisées de la croissance de *Candida pelliculosa* dans le nectar de goyave en fonction des variations de pH et des températures de stockage.

2.1.4. Ajustement des valeurs expérimentales et prédites

Un bon ajustement a été obtenu entre les valeurs expérimentales et les valeurs prédites par le modèle (figure 27).

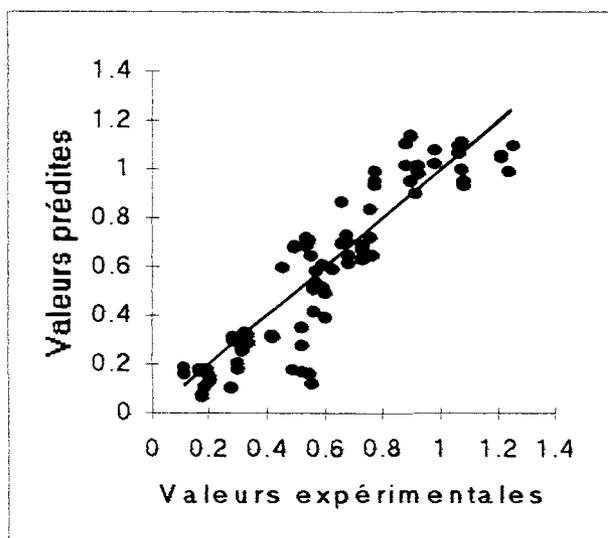


Figure 27: Ajustement des valeurs expérimentales et des valeurs prédites par le modèle de croissance de *Candida pelliculosa* dans le nectar de goyave.

2.1.5. Validation du modèle construit

Elle a été effectuée avec les données issues d'une expérimentation particulière sur la croissance de *Candida pelliculosa* dans le nectar de goyave commercial (pH 3,15) à 2°C, 5°C, 8°C, 10°C, 15°C, 25°C, 32°C, 35°C et 37°C (moyenne de 2 répétitions). Le présent modèle se valide parfaitement ($r^2 = 0,99$, ddl=7) dans cette boisson (tableau 12 et figure 28).

Tableau 12: Données de validation du modèle de croissance de *Candida pelliculosa* dans le nectar de goyave par la croissance de la levure dans le nectar de goyave commercial (pH 3,15).

Température de stockage	DO max Cal.	DO max Exp.
2°C	0.1993	0.1631
5°C	0.3218	0.2805
8°C	0.4299	0.4187
10°C	0.494	0.7049
15°C	0.6262	0.6991
25°C	0.7706	0.792
32°C	0.7765	0.8203
35°C	0.755	0.7242
37°C	0.7327	0.8325

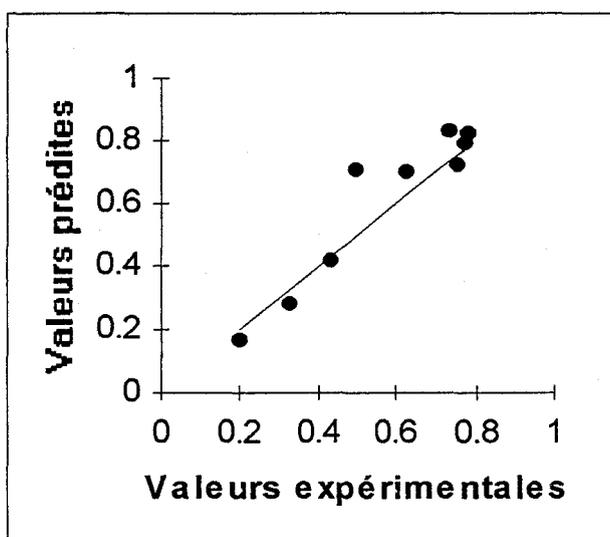


Figure 28: validation du modèle de croissance de *Candida pelliculosa* dans le nectar de goyave par la croissance de la levure dans le nectar de goyave commercial ($r^2 = 0,99$).

2.2. *Candida holmii*

3.2.2.1. Equations et courbes d'étalonnage

Elles ont été établies pendant la phase exponentielle de croissance respectivement pour le développement de la levure dans le jus d'ananas (pH 3,95) et le nectar de goyave (pH 3,15) commerciaux.

Une régression exponentielle et une régression linéaire simple permettent de définir les relations entre le nombre de cellules viables dénombrées sur milieu PDA, après incubation à 32°C pendant 48 à 72 heures, et la densité optique à 630 nm consécutive à la croissance respective de la levure dans le jus d'ananas et le nectar de goyave. Ces relations illustrées par les courbes de calibrations des figures 29a et 29b sont données par les équations suivantes:

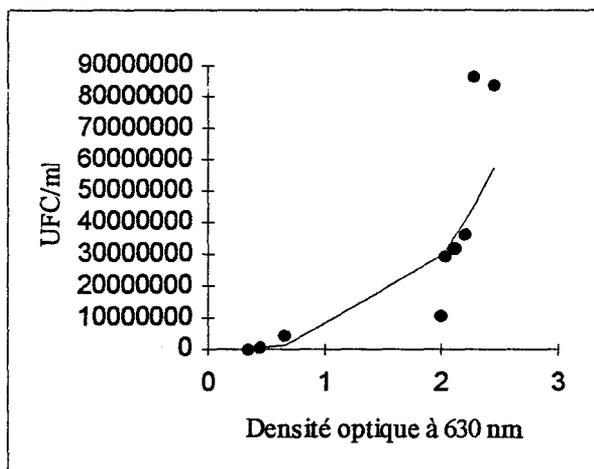


Figure 29a: Courbe d'étalonnage de la croissance ($r^2=0,99$) de *Candida holmii* dans le jus d'ananas commercial (pH 3,95).

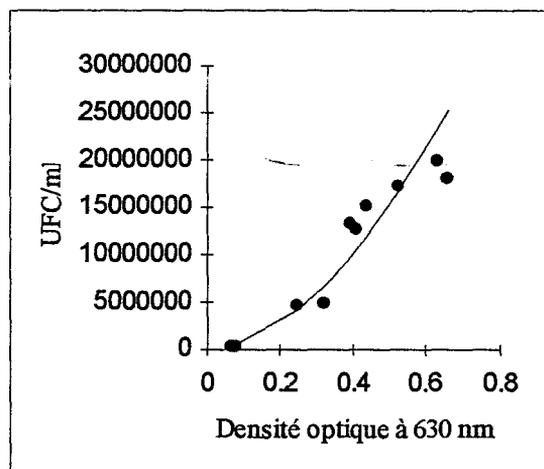


Figure 29b: Droite d'étalonnage de la croissance ($r^2=0,98$) de *Candida holmii* dans le nectar de goyave commercial (pH 3,15).

a) Croissance de *C. holmii* dans le jus d'ananas

$$\ln(\text{UFCml}^{-1} \text{ de } C. \text{ holmii}) = 15,1584.\exp(0,1829\ln(\text{DO})),$$

avec $r^2=0,998$ et $\text{ddl}=8$.

b) Croissance de *C. holmii* dans le nectar de goyave

$$\log(\text{UFCml}^{-1} \text{ de } C. \text{ holmii}) = 1,8120\log(\text{DO}) + 7,7272,$$

avec $r^2= 0,98$ et $\text{ddl}=8$.

Les valeurs ayant servi à l'établissement de ces équations sont présentées dans le tableau 13.

Tableau 13: Données utilisées pour l'établissement de l'équation d'étalonnage de la croissance de *Candida holmii* dans le jus d'ananas (pH 3,95) et le nectar de goyave (pH 3,15).

Jus d'ananas		Nectar de goyave	
DO à 630 nm	UFC/ml	DO (630 nm)	UFC/ml
0.3535	103000	0.0689	435000
0.4521	700000	0.0793	460000
0.6677	3950000	0.2471	4750000
1.9947	10350000	0.3196	5050000
2.0389	29000000	0.3933	13200000
2.1111	31500000	0.4088	12600000
2.1224	31950000	0.4334	15250000
2.216	36000000	0.5225	17350000
2.2835	86000000	0.6297	19900000
2.4575	83500000	0.662	18000000

2.2.2. Histogrammes, courbes et taux de croissance

Les courbes de croissance (moyenne de 2 répétitions) en fonction du temps et de la DO à 2°C, 5°C, 10°C, 15°C, 25°C, 32°C, 35°C, 37°C et 39°C de *Candida holmii* respectivement dans le jus d'ananas et le nectar de goyave ajustés à différents pH (1,55; 1,85; 2,00; 2,50; 3,15; 4,00; 5,00 et 6,25) et dans le nectar de grenadille commercial (pH 3,03) à 25°C, 32°C, 35°C et 37°C sont présentées respectivement aux figures 30a, 30b, 31a, 31b, 32a, 32b, 33a, 33b, 34a, 34b, 35a, 35b, 36a, 36b, 37a, 37b, 38a, 38b et 39.

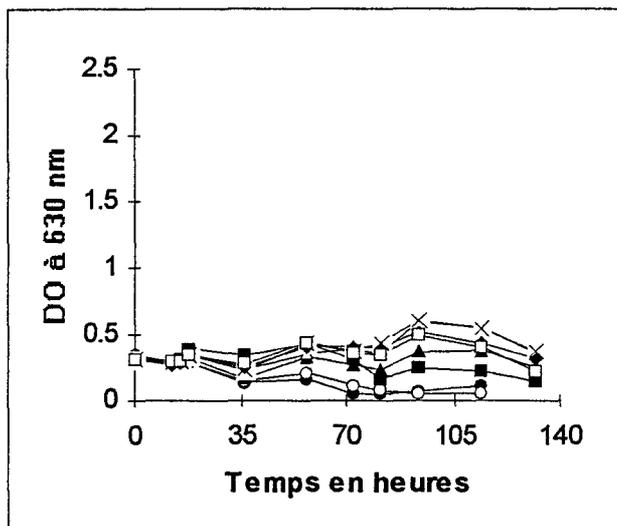


Figure 30a: Courbes de croissance de *Candida holmii* dans le jus d'ananas à 2°C à différentes valeurs de pH, 1.55 (●), 1.85 (○), 2.00 (▲), 2.50 (△), 3.15 (×), 4.00 (◆); 5.00 (■) et 6.25 (□).

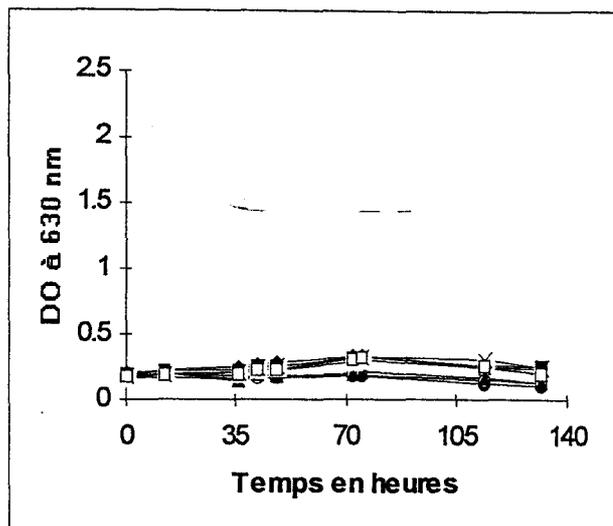


Figure 30b: Courbes de croissance de *Candida holmii* dans le nectar de goyave à 2°C à différentes valeurs de pH, 1.55 (●), 1.85 (○), 2.00 (▲), 2.50 (△), 3.15 (×), 4.00 (◆); 5.00 (■) et 6.25 (□).

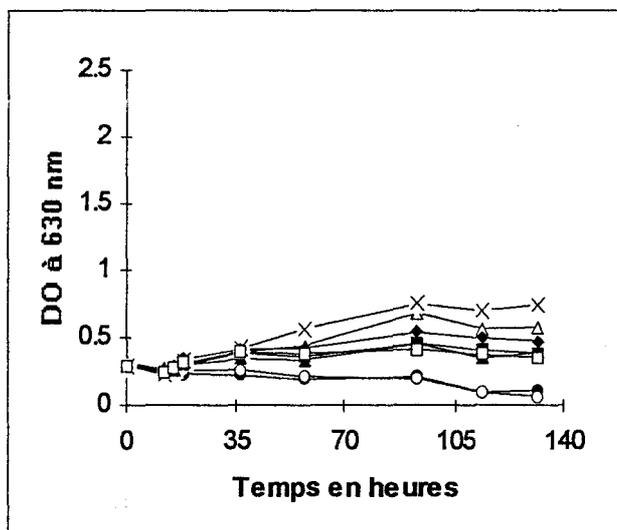


Figure 31a: Courbes de croissance de *Candida holmii* dans le jus d'ananas à 5°C à différentes valeurs de pH, 1.55 (●), 1.85 (○), 2.00 (▲), 2.50 (△), 3.15 (×), 4.00 (◆); 5.00 (■) et 6.25 (□).

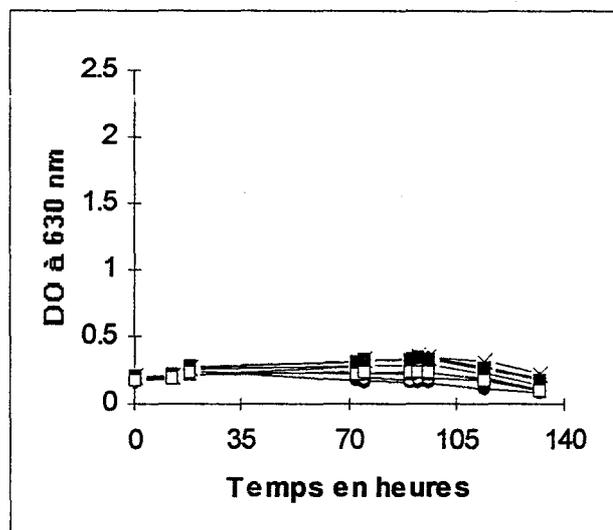


Figure 31b: Courbes de croissance de *Candida holmii* dans le nectar de goyave à 5°C à différentes valeurs de pH, 1.55 (●), 1.85 (○), 2.00 (▲), 2.50 (△), 3.15 (×), 4.00 (◆); 5.00 (■) et 6.25 (□).

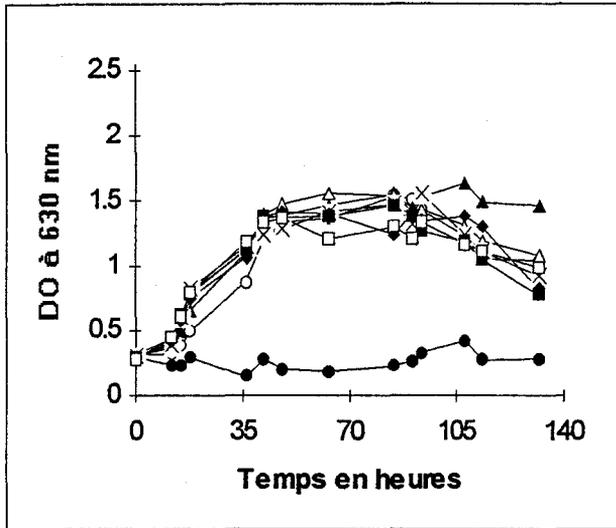


Figure 32a: Courbes de croissance de *Candida holmii* dans le jus d'ananas 10°C à différentes valeurs de pH, 1.55 (●), 1.85 (○), 2.00 (▲), 2.50 (△), 3.15 (×), 4.00 (◆); 5.00 (■) et 6.25 (□).

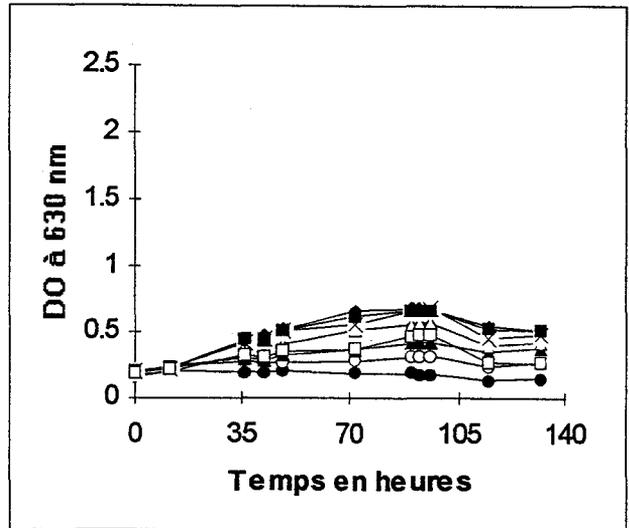


Figure 32b: Courbes de croissance de *Candida holmii* dans le nectar de goyave à 10°C à différentes valeurs de pH, 1.55 (●), 1.85 (○), 2.00 (▲), 2.50 (△), 3.15 (×), 4.00 (◆); 5.00 (■) et 6.25 (□).

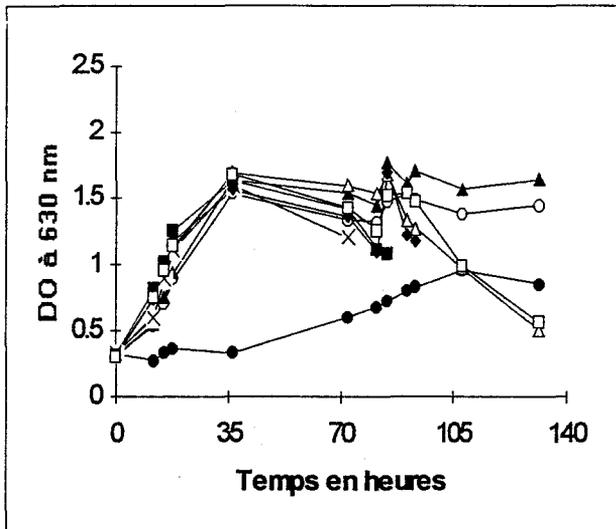


Figure 33a: Courbes de croissance de *Candida holmii* dans le jus d'ananas 15°C à différentes valeurs de pH, 1.55 (●), 1.85 (○), 2.00 (▲), 2.50 (△), 3.15 (×), 4.00 (◆); 5.00 (■) et 6.25 (□).

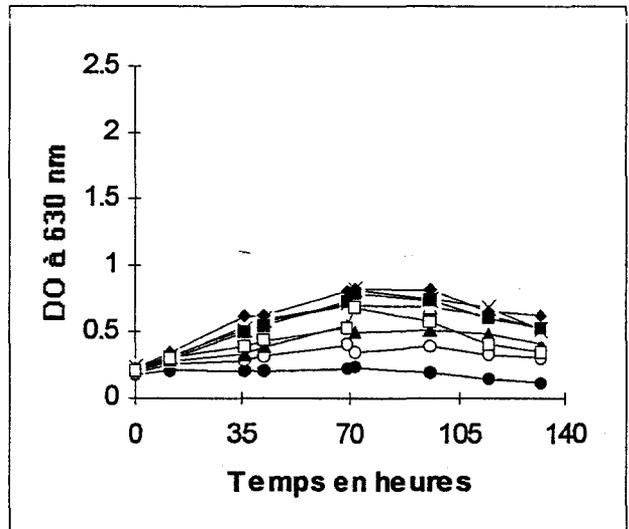


Figure 33b: Courbes de croissance de *Candida holmii* de dans le nectar de goyave à 15°C à différentes valeurs de pH, 1.55 (●), 1.85 (○), 2.00 (▲), 2.50 (△), 3.15 (×), 4.00 (◆); 5.00 (■) et 6.25 (□).

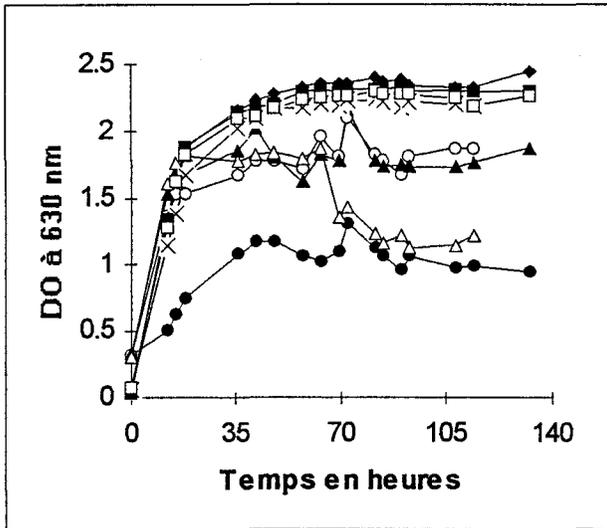


Figure 34a: Courbes de croissance de *Candida holmii* dans le jus d'ananas 25°C à différentes valeurs de pH, 1.55 (●), 1.85 (○), 2.00 (▲), 2.50 (△), 3.15 (×), 4.00 (◆); 5.00 (■) et 6.25 (□).

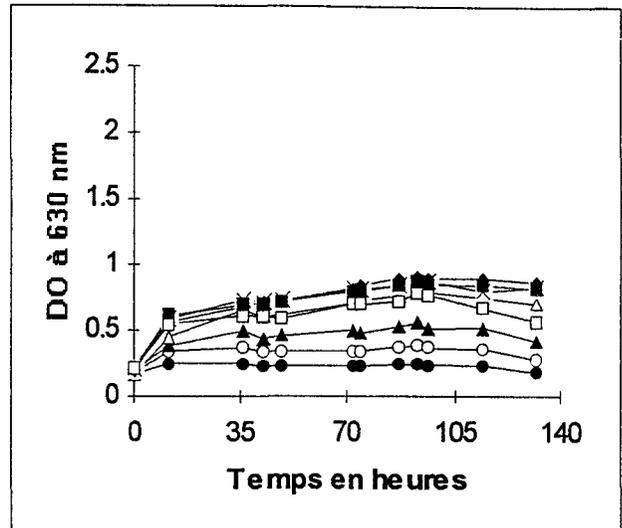


Figure 34b: Courbes de croissance de *Candida holmii* dans le nectar de goyave à 25°C à différentes valeurs de pH, 1.55 (●), 1.85 (○), 2.00 (▲), 2.50 (△), 3.15 (×), 4.00 (◆); 5.00 (■) et 6.25 (□).

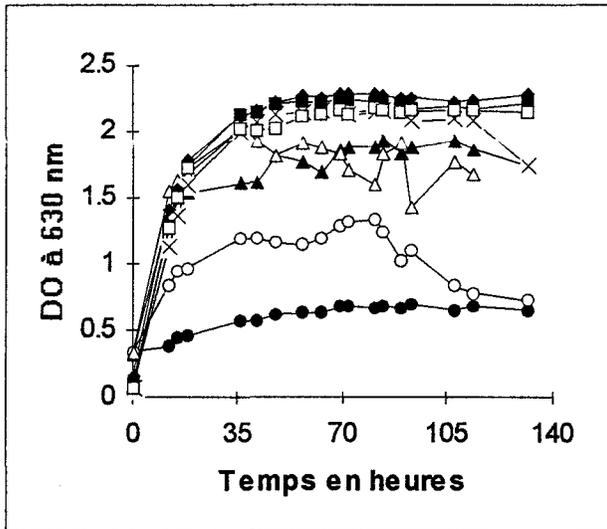


Figure 35a: Courbes de croissance de *Candida holmii* dans le jus d'ananas 32°C à différentes valeurs de pH, 1.55 (●), 1.85 (○), 2.00 (▲), 2.50 (△), 3.15 (×), 4.00 (◆); 5.00 (■) et 6.25 (□).

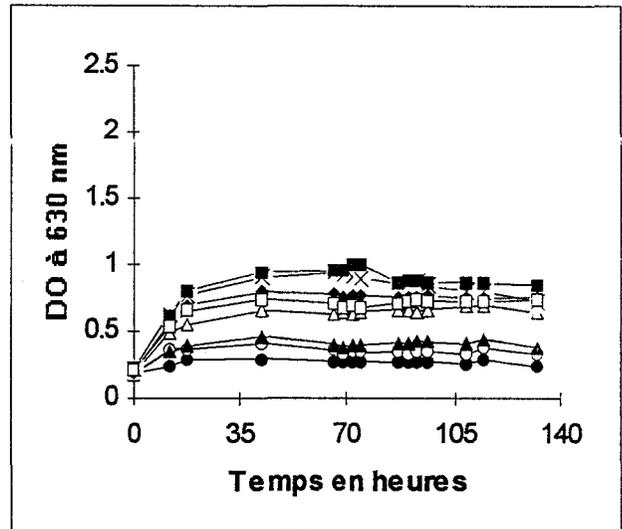


Figure 35b: Courbes de croissance de *Candida holmii* dans le nectar de goyave à 32°C à différentes valeurs de pH, 1.55 (●), 1.85 (○), 2.00 (▲), 2.50 (△), 3.15 (×), 4.00 (◆); 5.00 (■) et 6.25 (□).

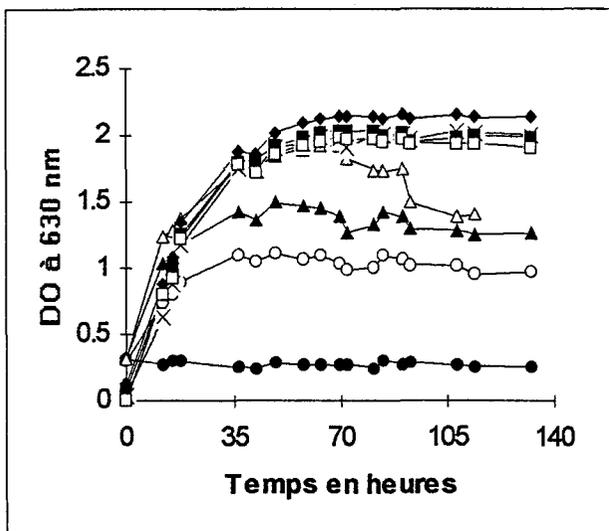


Figure 36a: Courbes de croissance de *Candida holmii* dans le jus d'ananas 35°C à différentes valeurs de pH, 1.55 (●), 1.85 (○), 2.00 (▲), 2.50 (△), 3.15 (×), 4.00 (◆); 5.00 (■) et 6.25 (□).3.15 (x),

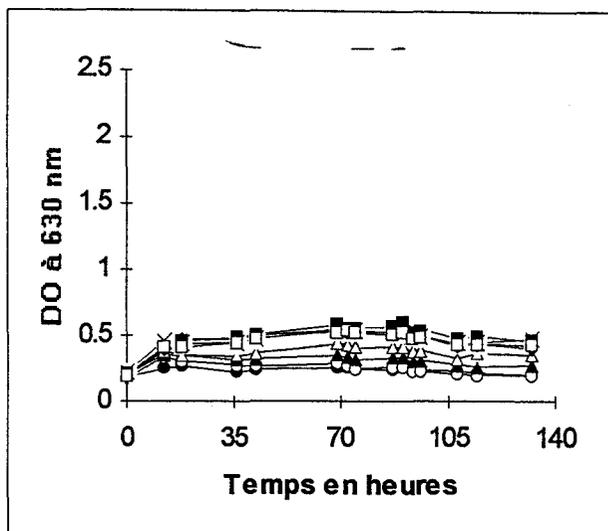


Figure 36b: Courbes de croissance de *Candida holmii* dans le nectar de goyave à 35°C à différentes valeurs de pH, 1.55 (●), 1.85 (○), 2.00 (▲), 2.50 (△), 4.00 (◆); 5.00 (■) et 6.25 (□).

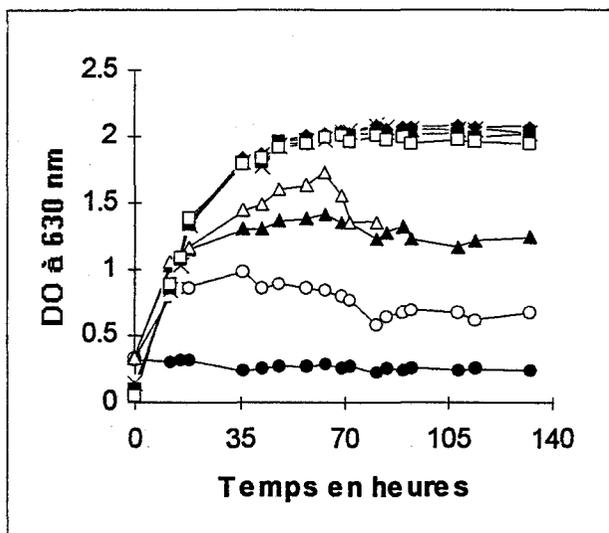


Figure 37a: Courbes de croissance de *Candida holmii* dans le jus d'ananas 37°C à différentes valeurs de pH, 1.55 (●), 1.85 (○), 2.00 (▲), 2.50 (△), 3.15 (×), 4.00 (◆); 5.00 (■) et 6.25 (□).3.15 (x),

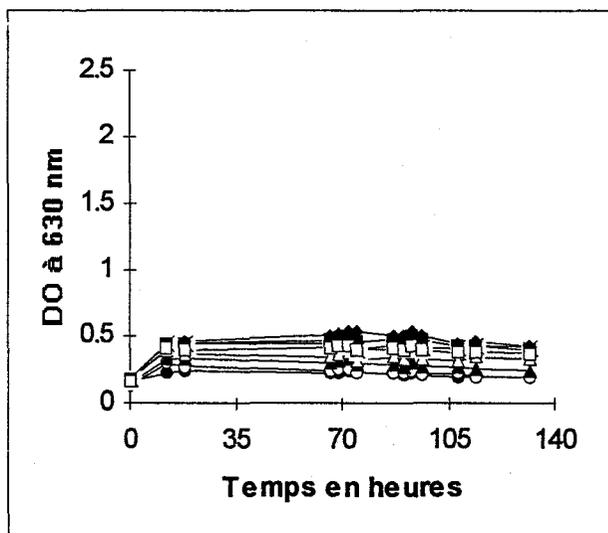


Figure 37b: Courbes de croissance de *Candida holmii* dans le nectar de goyave à 37°C à différentes valeurs de pH, 1.55 (●), 1.85 (○), 2.00 (▲), 2.50 (△), 4.00 (◆); 5.00 (■) et 6.25 (□).

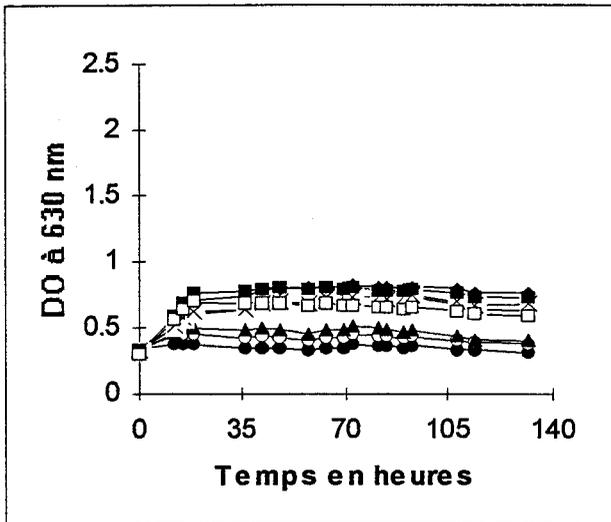


Figure 38a: Courbes de croissance de *Candida holmii* dans le jus d'ananas 39°C à différentes valeurs de pH, 1.55 (●), 1.85 (○), 2.00 (▲), 2.50 (△), 3.15 (×), 4.00 (◆); 5.00 (■) et 6.25 (□).

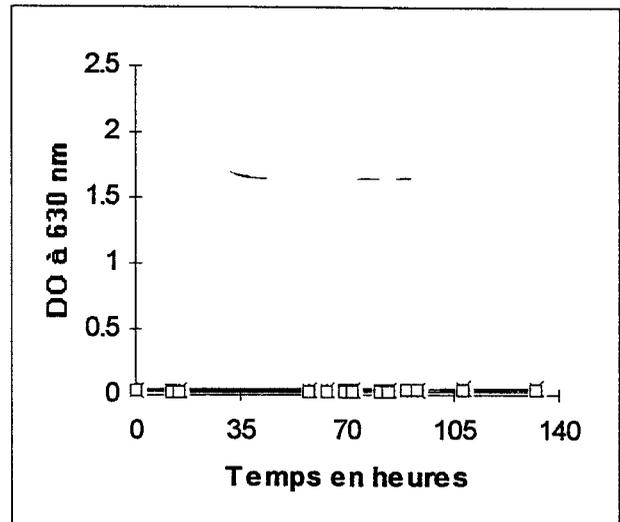


Figure 38b: Courbes de croissance de *Candida holmii* dans le nectar de goyave à 39°C à différentes valeurs de pH, 1.55 (●), 1.85 (○), 2.00 (▲), 2.50 (△), 3.15 (×), 4.00 (◆); 5.00 (■) et 6.25 (□).

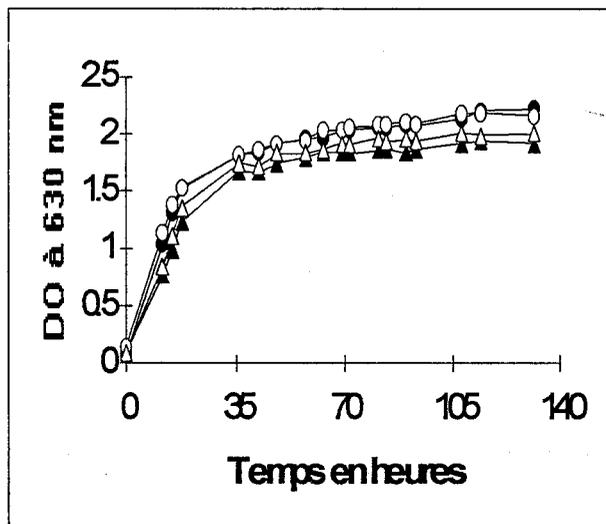


Figure 39: Courbes de croissance de *Candida holmii* dans le nectar de grenadille commercial (pH 3,03) à 25°C (●), 32°C (○), 35°C (▲) et 37°C (△).

Le taux maximal de croissance (μ_{\max} ou μ_{expo}) de la levure dans ces différentes boissons à 25°C et 32°C (tableau 20), calculé pendant la phase exponentielle de croissance, fluctue entre $0,024 \text{ h}^{-1}$ (nectar de goyave à 25°C) et $0,190 \text{ h}^{-1}$ (jus d'ananas à 25°C).

Les histogrammes à 3 dimensions montrant la DO maximale (moyenne de 2 répétitions) en fonction des valeurs de pH et des températures de stockage sont illustrés par les figures 40a et 40b. Les valeurs les plus élevées de DO maximale, 2,45 et 1,00 ont été obtenues respectivement à 25°C et pH 4,00 dans le jus d'ananas, et à 32°C et pH 5,00 dans le nectar de goyave (tableaux 14 et 15). Les valeurs de DO maximale obtenues pour les pH de 1,55 à 1,85 sont de l'ordre de 1,33 à 2,10 et 0,38 à 0,46 respectivement à 25°C et 39°C dans le jus d'ananas, et de 0,29 à 0,41 et 0,05 respectivement à 25°C et 39°C dans le nectar de goyave.

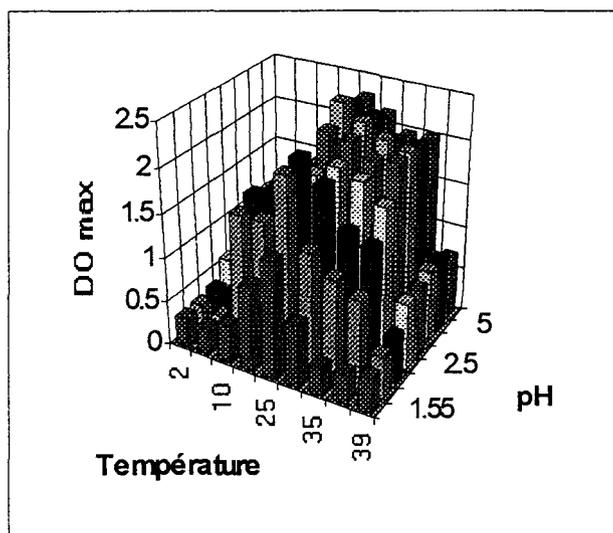


Figure 40a: Histogramme à 3 dimensions illustrant la croissance de *Candida holmii* dans le jus d'ananas en fonction des variations de pH et des températures de stockage.

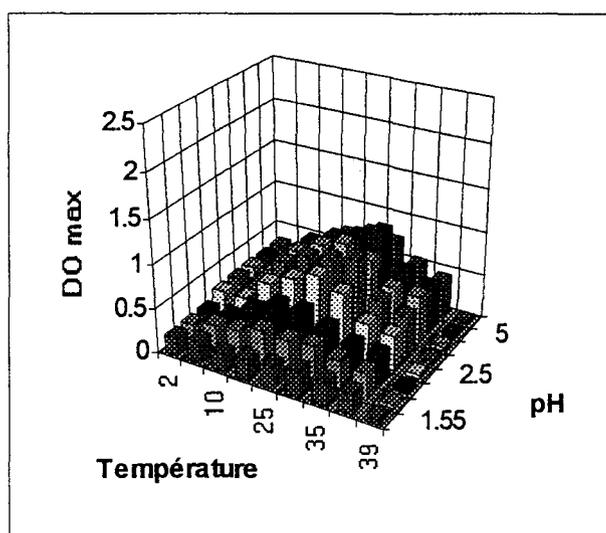


Figure 40b: Histogramme à 3 dimensions illustrant la croissance de *Candida holmii* dans le nectar de goyave en fonction des variations de pH et des températures de stockage.

Tableau 14: Données utilisées pour la construction de l'histogramme à 3 dimensions illustrant la croissance de *Candida holmii* dans le jus d'ananas à différents pH et températures de stockage (moyenne de 2 répétitions).

pH/T°C	2	5	10	15	25	32	35	37	39
1.55	0.32845	0.29695	0.42055	0.95775	1.3113	0.6912	0.3128	0.32305	0.37955
1.85	0.33625	0.29465	1.5336	1.5306	2.1016	1.3362	1.1183	0.9875	0.45565
2	0.37975	0.45095	1.6383	1.7616	2.1599	1.9323	1.49755	1.4193	0.51085
2.5	0.596	0.6822	1.5583	1.68805	1.86785	2.0162	1.93055	1.7284	0.73545
3.15	0.60325	0.7505	1.5562	1.5945	2.22675	2.1796	2.03425	2.0858	0.74475
4	0.51625	0.5383	1.4143	1.6967	2.44745	2.28745	2.1596	2.08025	0.8187
5	0.42905	0.4563	1.46755	1.6311	2.32445	2.2436	2.04265	2.02925	0.8066
6.25	0.49005	0.41575	1.37085	1.6809	2.29335	2.1689	1.9837	2.0032	0.695

Tableau 15: Données utilisées pour la construction de l'histogramme à 3 dimensions illustrant la croissance de *Candida holmii* dans le nectar de goyave à différents pH et températures de stockage (moyenne de 2 répétitions).

pH/T°C	2	10	25	35	39				
1.55	0.2041	0.2415	0.2007	0.23025	0.2489	0.29165	0.26825	0.23925	0.05085
1.85	0.2048	0.277	0.31245	0.3985	0.3819	0.40935	0.33765	0.29385	0.04545
2	0.2122	0.2391	0.4128	0.5481	0.5533	0.45865	0.35445	0.33135	0.04595
2.5	0.3009	0.30875	0.56305	0.69865	0.81275	0.69525	0.43565	0.389	0.04445
3.15	0.3249	0.35375	0.67655	0.8199	0.87145	0.93535	0.54245	0.4545	0.04525
4	0.32625	0.3485	0.6714	0.82155	0.9095	0.7936	0.54765	0.53725	0.0444
5	0.3225	0.33775	0.6562	0.78725	0.87495	0.99605	0.59625	0.4985	0.0398
6.25	0.3235	0.24405	0.474	0.68625	0.78105	0.7405	0.5388	0.4306	0.03535

2.2.3. Equations polynomiales et courbes modélisées de croissance

Les équations mathématiques donnant le modèle de croissance de *C. holmii* dans le jus d'ananas et le nectar de goyave, en tenant compte uniquement des températures comprises entre 2°C et 37°C et au pH compris entre 2,00 et 6,25, établies par régression multiple entre la DO maximale (variable expliquée), le pH initial des milieux de culture (variable explicative P) et la température de stockage (variable explicative T) sont les suivantes:

a) Jus d'ananas

$$\text{DO max.} = 0,1190T + 0,2066P - 0,0026T^2 - 0,0374P^2 + 0,0067TP \quad (1),$$

avec $r^2=0,96$, ddl=96 et $p=100\%$ (probabilité pour que l'équation soit vérifiée).

b) Nectar de goyave

$$\text{DO max} = 0,0524T + 0,1094P - 0,0014T^2 - 0,0166P^2 + 0,0022TP \quad (2),$$

avec $r^2=0,97$, ddl=94 et $p=100\%$ (probabilité pour que l'équation soit vérifiée).

Les valeurs de DO maximale prédites par ces modèles à différents pH et températures de stockage sont illustrées par les courbes des figures 41a et 41b. Par ailleurs, les données expérimentales ayant servi à l'établissement des présents modèles sont présentées en annexes 6.

Les valeurs prédites de la densité maximale de population de *Candida holmii* dans le jus d'ananas (DO max. de 2,34) et dans le nectar de goyave (DO max. de 0,85) sont respectivement de $49,06 \times 10^6 \text{UFCml}^{-1}$ au pH 5,00 et à la température de 30°C, et de $39,75 \times 10^6 \text{UFCml}^{-1}$ au pH 4,75 et à la température de 22°C. Dans le jus d'ananas commercial (pH 3,95) stocké à 2°C, 5°C, 10°C, 15°C, 20°C, 25°C, 32°C, 35°C et 37°C, les valeurs maximales de densité de population prédites par le modèle de l'équation (1) sont respectivement de $79,68 \times 10^4 \text{UFCml}^{-1}$ (DO max. de 0,55), $29,55 \times 10^5 \text{UFCml}^{-1}$ (DO max. de 0,91), $10,24 \times 10^6 \text{UFCml}^{-1}$ (DO max. de 1,41), $20,67 \times 10^6 \text{UFCml}^{-1}$ (DO max. de 1,78), $31,15 \times 10^6 \text{UFCml}^{-1}$ (DO max. de 2,03), $36,82 \times 10^6 \text{UFCml}^{-1}$ (DO max. de 2,14), $33,64 \times 10^6 \text{UFCml}^{-1}$ (DO max de 2,08),

28,34x10⁶UFCml⁻¹ (DO max. de 1,97) et 24,49x10⁶UFCml⁻¹ (DO max. de 1,88). Dans le nectar de goyave commercial (pH 3,15) stocké dans les mêmes conditions, les valeurs maximales de densité de population prédites par le modèle de l'équation (2) sont respectivement de 56,63x10⁵UFCml⁻¹ (DO max. de 0,29), 12,05x10⁶UFCml⁻¹ (DO max. de 0,44), 23,10x10⁶UFCml⁻¹ (DO max. de 0,63), 31,68x10⁶UFCml⁻¹ (DO max. de 0,75), 36,42x10⁶UFCml⁻¹ (DO max. de 0,81), 34,81x10⁶UFCml⁻¹ (DO max. de 0,79), 23,77x10⁶UFCml⁻¹ (DO max. de 0,64), 17,47x10⁶UFCml⁻¹ (DO max. de 0,54) et 13,06x10⁶UFCml⁻¹ (DO max. de 0,46).

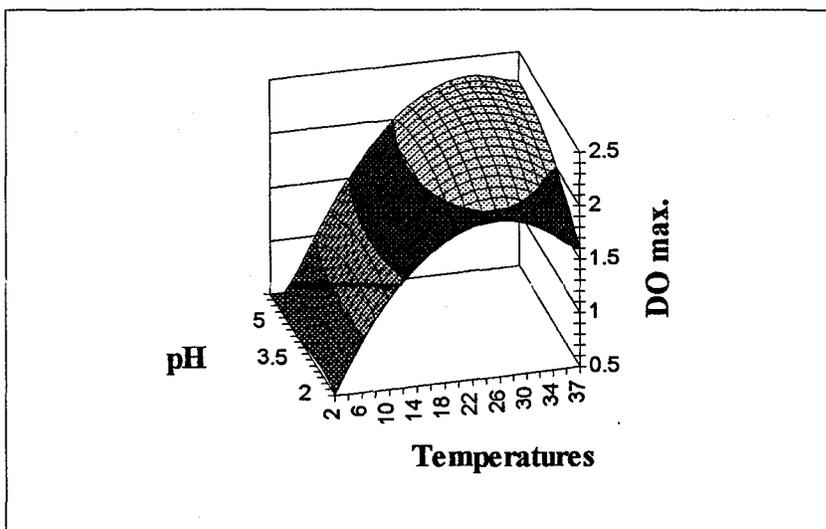


Figure 41a: Courbes modélisées de la croissance de *Candida holmii* dans le jus d'ananas en fonction des variations de pH et des températures de stockage.

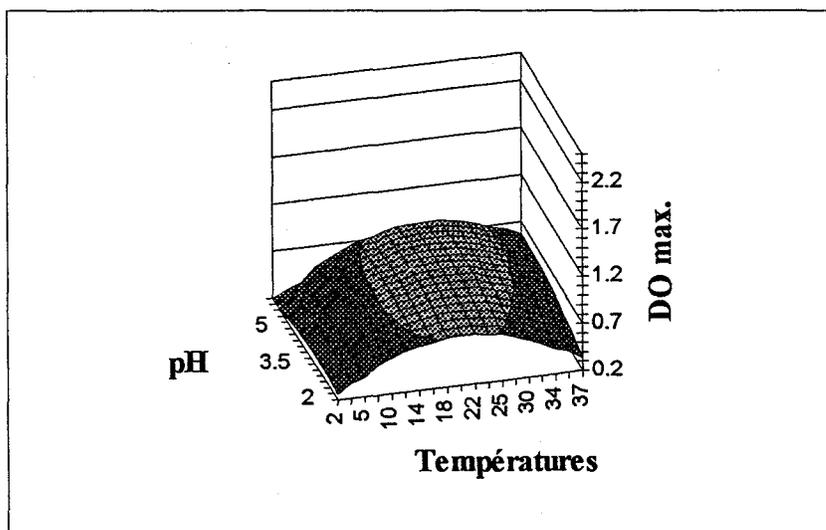


Figure 41b: Courbes modélisées de la croissance de *Candida holmii* dans le nectar de goyave en fonction des variations de pH et des températures de stockage.

2.2.4. Ajustement des valeurs expérimentales et des valeurs prédites

Un bon ajustement a été obtenu, entre les valeurs expérimentales et prédites, respectivement pour le modèle établi dans le jus d'ananas et celui établi dans le nectar de goyave (figures 42a et 42b).

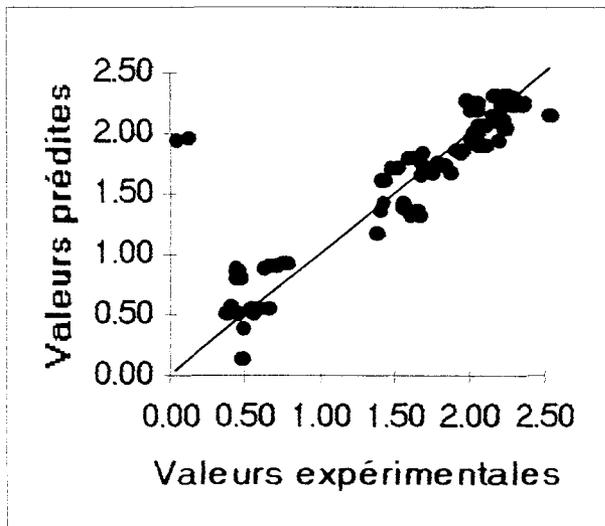


Figure 42a: Ajustement des valeurs expérimentales et des valeurs prédites par le modèle de croissance de *Candida holmii* dans le jus d'ananas.

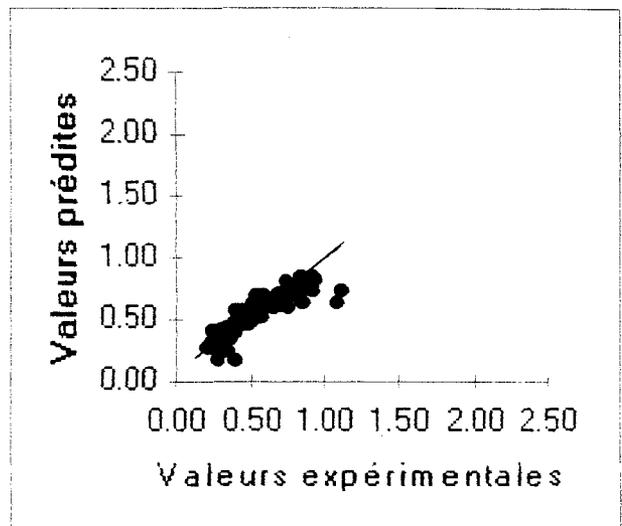


Figure 42b: Ajustement des valeurs expérimentales et des valeurs prédites par le modèle de croissance de *Candida holmii* dans le nectar de goyave.

2.2.5. Validation des modèles construits

Elle a été effectuée à l'aide des valeurs expérimentales obtenues à la suite d'expérimentations distinctes ayant permis de suivre la croissance de *Candida holmii* respectivement dans le jus d'ananas (pH 3,95) et le nectar de goyave (pH 3,15) commerciaux stockés à 2°C, 5°C, 10°C, 15°C, 20°C, 25°C, 32°C, 35°C et 37°C (moyenne de 2 répétitions). Les deux modèles construits sont validés parfaitement respectivement dans le jus d'ananas commercial pour le modèle de l'équation (1) et dans le nectar de goyave commercial pour le modèle de l'équation (2) (tableau 16, figures 43a et 43b).

Tableau 16: Validation des modèles de croissance de *Candida holmii* dans le jus d'ananas et dans le nectar de goyave par la croissance respective de la levure dans les 2 boissons stockées à différentes températures.

Température de stockage	Valeurs cal. goyave	Valeurs exp. goyave	Valeurs cal. ananas	Valeurs exp. ananas
2°C	0.293	0.3169	0.5131	0.5008
5°C	0.4415	0.3601	0.8949	0.8897
10°C	0.6332	0.6582	1.4272	1.4194
15°C	0.7548	0.8206	1.7594	1.7589
20°C	0.8065	0.9565	2.1018	2.1109
25°C	0.7881	0.85314	2.2442	2.5356
32°C	0.6449	0.8935	2.225	2.4085
35°C	0.5414	0.5483	2.1388	2.35465
37°C	0.4585	0.4496	2.022	2.2356

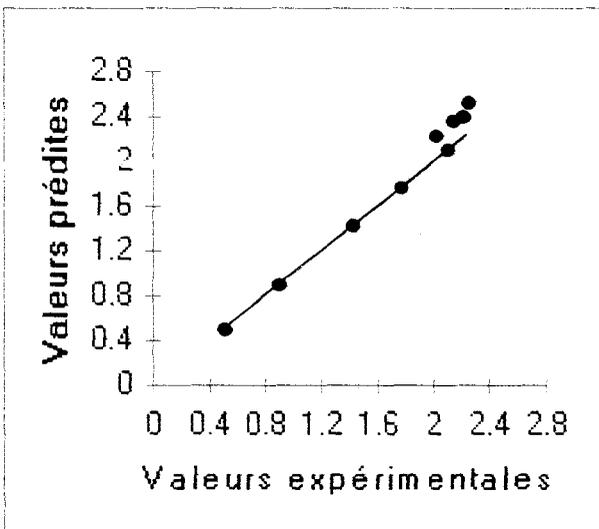


Figure 43a: validation du modèle de croissance de *Candida holmii* dans le jus d'ananas par la croissance de *Candida holmii* dans le jus d'ananas commercial.

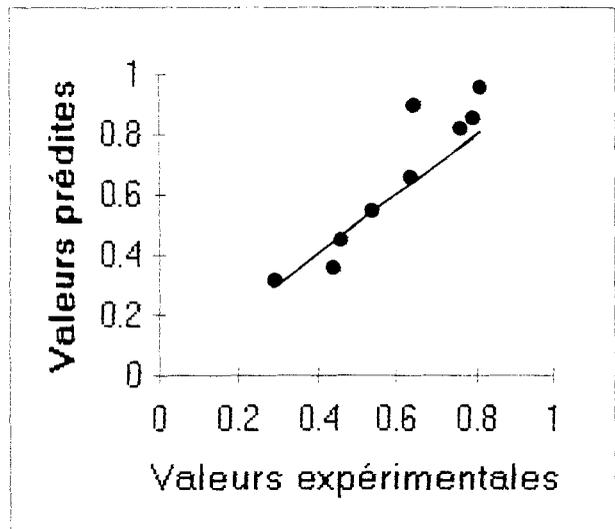


Figure 43b: validation du modèle de croissance de *Candida holmii* dans le nectar de goyave par la croissance de *Candida holmii* dans le nectar de goyave commercial.

2.3. *Kloeckera apis*

2.3.1. Equation et courbe d'étalonnage

Elles ont été établies pendant la phase de croissance de la levure dans le nectar de goyave commercial (pH 3,15). Une régression linéaire simple permet de définir la relation entre le nombre de cellules viables dénombrées sur milieu PDA, après incubation à 32°C pendant 48 heures, et la densité optique à 630 nm consécutive à la croissance de la levure dans le nectar de goyave. Les valeurs ayant

servi à l'établissement de l'équation sont présentées au tableau 17. Cette relation illustrée par la courbe de calibration de la figure 44 est donnée par l'équation suivante:

$$\log(\text{UFCml}^1 \text{ de } Kloeckera \text{ apis}) = 1,0555\log(\text{DO}) + 7,5235,$$

Tableau 17: Données utilisées pour l'établissement de l'équation et de la courbe d'étalonnage de la croissance de *Kloeckera apis* dans le nectar de goyave commercial (pH 3,15).

DO à 630 nm	UFC/ml	UFC/ml (cal)
0.04	1035000	984614
0.44	9300000	14120987
0.48	12000000	15467902
0.50	18500000	16158977
0.53	20600000	17113438
0.56	20350000	18125296
0.57	20100000	18582809
0.61	20450000	19828562
0.72	23050000	23451390
0.74	26550000	24188667

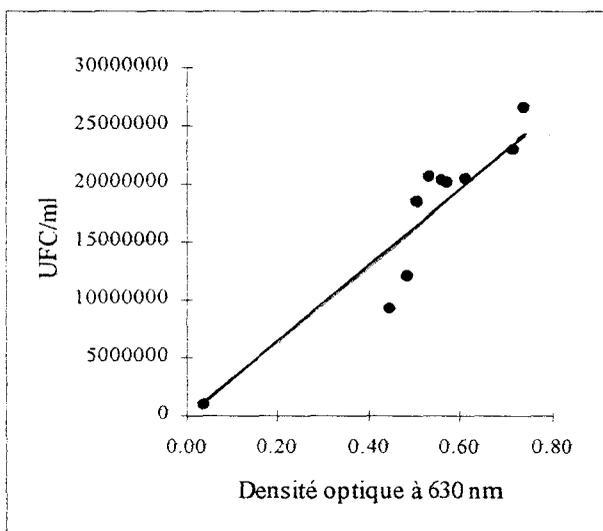


Figure 44: Droite d'étalonnage de la croissance de *Kloeckera apis* dans le nectar de goyave commercial (pH 3,15).

2.3.2. Histogramme, courbes et taux de croissance

Les courbes de croissance (moyenne de 2 répétitions) en fonction du temps et de la DO à 2°C, 5°C, 10°C, 15°C, 25°C, 32°C, 35°C, 37°C, 39°C et 46°C de *Kloeckera apis* dans le le nectar de goyave ajusté à différents pH (1,55; 1,85; 2,00; 2,50; 3,15; 4,00; 5,00 et 6,25) et dans le jus d'ananas (pH 3,95) et le nectar de grenadille (pH 3,03) commerciaux à 25°C, 32°C, 35°C et 37°C sont présentées dans les figures 45 à 56.

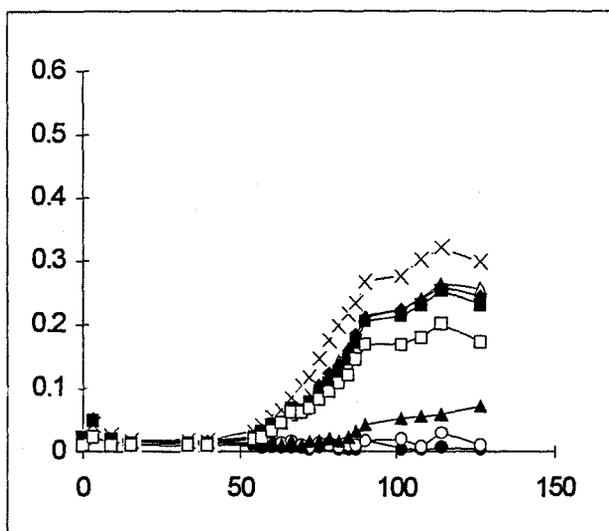


Figure 45: Courbes de croissance de *Kloeckera apis* dans le nectar de goyave à 2°C à différentes valeurs de pH, 1,55 (●), 1,85 (○), 2,00 (▲), 2,50 (△), 3,15 (×), 4,00 (◆); 5,00 (■) et 6,25 (□).

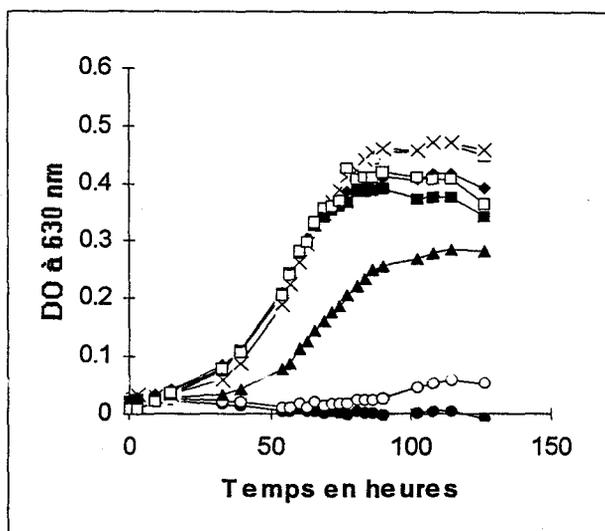


Figure 46: Courbes de croissance de *Kloeckera apis* dans le nectar de goyave à 5°C à différentes valeurs de pH, 1,55 (●), 1,85 (○), 2,00 (▲), 2,50 (△), 3,15 (×), 4,00 (◆); 5,00 (■) et 6,25 (□).

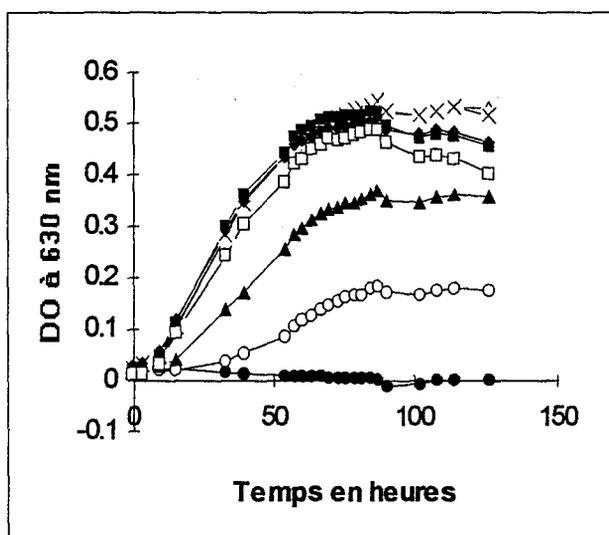


Figure 47: Courbes de croissance de *Kloeckera apis* dans le nectar de goyave à 10°C à différentes valeurs de pH, 1,55 (●), 1,85 (○), 2,00 (▲), 2,50 (△), 3,15 (×), 4,00 (◆); 5,00 (■) et 6,25 (□).

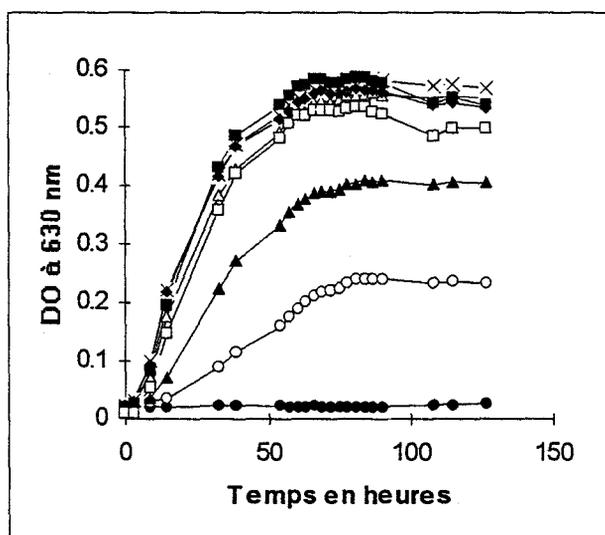


Figure 48: Courbes de croissance de *Kloeckera apis* dans le nectar de goyave à 15°C à différentes valeurs de pH, 1,55 (●), 1,85 (○), 2,00 (▲), 2,50 (△), 3,15 (×), 4,00 (◆); 5,00 (■) et 6,25 (□).

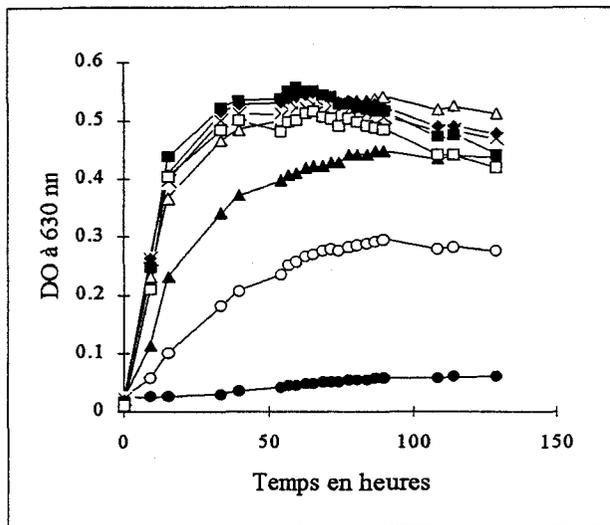


Figure 49: Courbes de croissance de *Kloeckera apis* dans le nectar de goyave à 25°C à différentes valeurs de pH, 1.55 (●), 1.85 (○), 2.00 (▲), 2.50 (△), 3.15 (×), 4.00 (◆); 5.00 (■) et 6.25 (□).

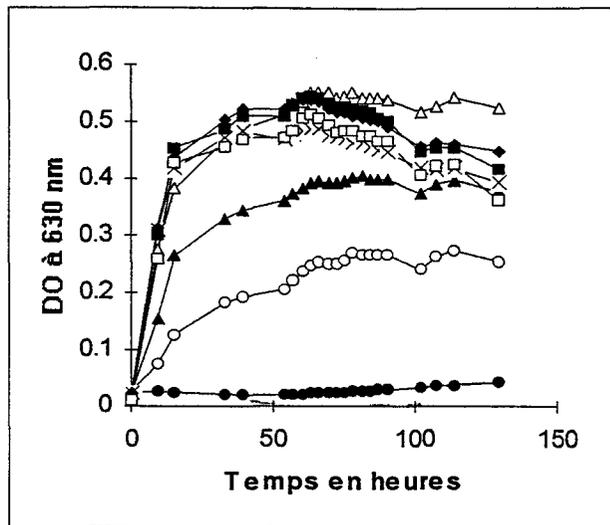


Figure 50: Courbes de croissance de *Kloeckera apis* dans le nectar de goyave à 32°C à différentes valeurs de pH, 1.55 (●), 1.85 (○), 2.00 (▲), 2.50 (△), 3.15 (×), 4.00 (◆); 5.00 (■) et 6.25 (□).

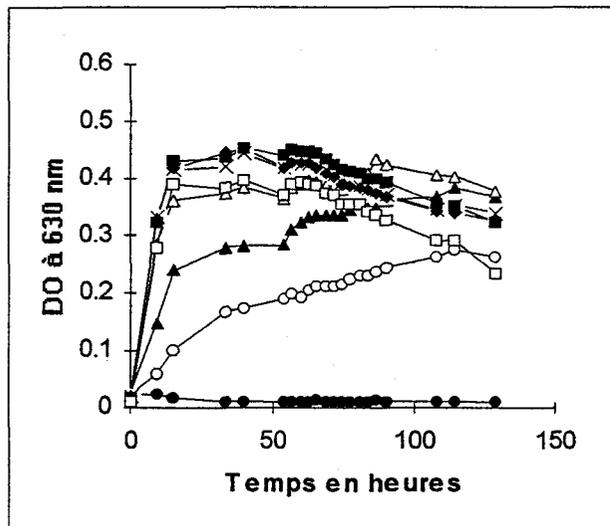


Figure 51: Courbes de croissance de *Kloeckera apis* dans le nectar de goyave à 35°C à différentes valeurs de pH, 1.55 (●), 1.85 (○), 2.00 (▲), 2.50 (△), 3.15 (×), 4.00 (◆); 5.00 (■) et 6.25 (□).

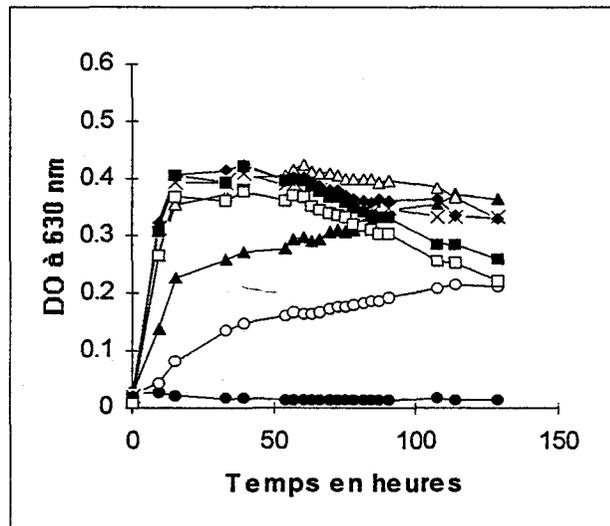


Figure 52: Courbes de croissance de *Kloeckera apis* dans le nectar de goyave à 39°C à différentes valeurs de pH, 1.55 (●), 1.85 (○), 2.00 (▲), 2.50 (△), 3.15 (×), 4.00 (◆); 5.00 (■) et 6.25 (□).

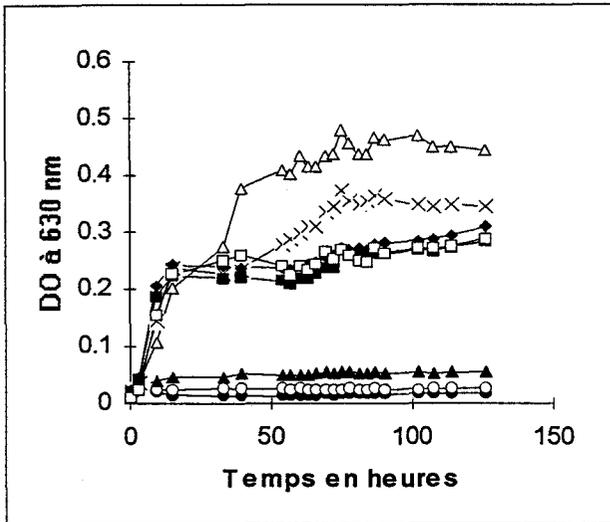


Figure 53: Courbes de croissance de *Kloeckera apis* dans le nectar de goyave à 39°C à différentes valeurs de pH, 1.55 (●), 1.85 (○), 2.00 (▲), 2.50 (△), 3.15 (×), 4.00 (◆), 5.00 (■) et 6.25 (□).

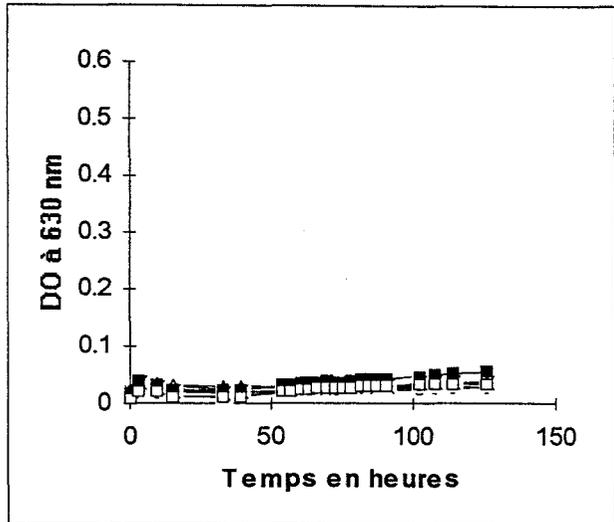


Figure 54: Courbes de croissance de *Kloeckera apis* dans le nectar de goyave à 46°C à différentes valeurs de pH, 1.55 (●), 1.85 (○), 2.00 (▲), 2.50 (△), 3.15 (×), 4.00 (◆), 5.00 (■) et 6.25 (□).

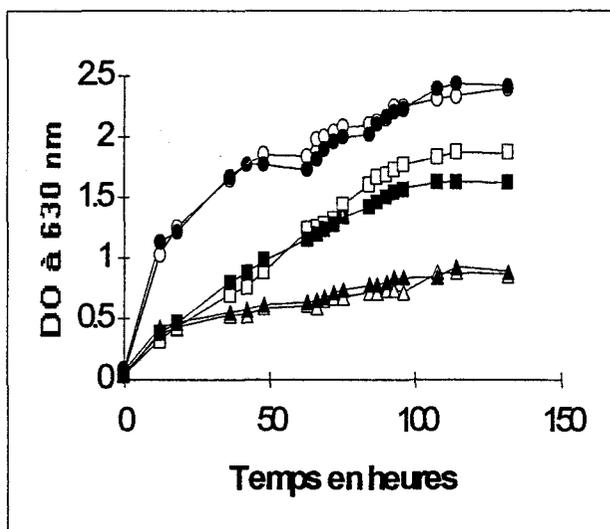


Figure 55: Courbes de croissance de *Kloeckera apis* dans le jus d'ananas pH 3,95 à 25°C (○) et 32°C (●), le nectar de goyave pH 3,15 à 25°C (△) et 32°C (▲), et le nectar de grenadille pH 3,03 à 25°C (□) et 32°C (■).

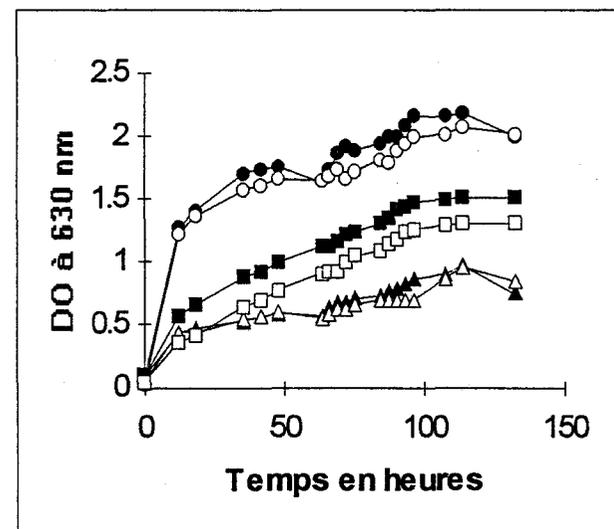


Figure 56: Courbes de croissance de *Kloeckera apis* dans le jus d'ananas pH 3,95 à 35°C (○) et 37°C (●), le nectar de goyave pH 3,15 à 35°C (△) et 37°C (▲), et le nectar de grenadille pH 3,03 à 35°C (□) et 37°C (■).

Le taux maximal de croissance (μ_{\max} ou μ_{expo}) de la levure dans ces différentes boissons, calculé respectivement à 25°C et 32°C pendant la phase exponentielle de croissance (tableau 20) fluctue entre 0,007 h⁻¹ (nectar de goyave à 32°C) et 0,047 h⁻¹ (nectar de grenadille à 25°C).

L'histogramme à 3 dimensions montrant la DO maximale (moyenne de 2 répétitions) en fonction des valeurs de pH et des températures de stockage (figure 57) montre que la valeur la plus élevée (0,59 pour environ 18,13x10⁶ UFCml⁻¹) s'observe à 15°C et pH 5,00. Les valeurs de DO maximale obtenues pour les pH compris entre 1,55 et 1,85 sont très faibles (0,06 et 0,30) et s'observent à 25°C (tableau 18).

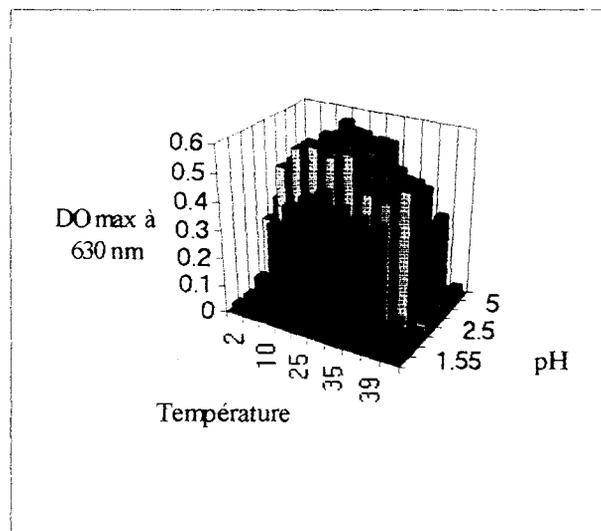


Figure 57: Histogramme à 3 dimensions illustrant la croissance de *Kloeckera apis* dans le nectar de goyave en fonction des variations de pH et des températures de stockage.

Tableau 18: Données utilisées pour la construction de l'histogramme à 3 dimensions illustrant la croissance de *Kloeckera apis* dans le nectar de goyave à différents pH et températures de stockage (moyenne de 2 répétitions).

pH/T°C	2	5	10	15	25	32	35	37	39	46
1.55	0.03405	0.02925	0.02515	0.03035	0.06075	0.04255	0.02315	0.02625	0.02285	0.03195
1.85	0.0368	0.0608	0.18305	0.2414	0.296	0.2728	0.2751	0.21575	0.02755	0.02915
2	0.0719	0.2856	0.36995	0.41075	0.4477	0.40495	0.3833	0.37265	0.05705	0.0377
2.5	0.2646	0.4682	0.54665	0.5614	0.54165	0.56015	0.4418	0.4264	0.47835	0.03435
3.15	0.3204	0.47465	0.544	0.58425	0.5291	0.4913	0.4441	0.40935	0.37445	0.03745
4	0.26	0.4204	0.51185	0.5675	0.54665	0.5397	0.4535	0.42535	0.3093	0.03955
5	0.2532	0.3932	0.52305	0.5881	0.55895	0.54605	0.4537	0.423	0.2838	0.0547
6.25	0.2013	0.4395	0.4889	0.53825	0.516	0.5141	0.39765	0.3768	0.2892	0.03435

2.3.3. Equation polynomiale et courbes modélisées de croissance

L'équation mathématique donnant le modèle de croissance de *Kloeckera apis* dans le nectar de goyave, en tenant compte uniquement des températures comprises entre 2°C et 37°C et le pH compris entre 2,00 et 6,25, établie par régression multiple entre la DO maximale (variable expliquée), le pH initial des milieux de culture (variable explicative P) et la température de stockage (variable explicative T) est définie comme suit:

$$DO \max = 0,0321T + 0,1179P - 0,0007T^2 - 0,0134P^2,$$

avec $r^2=0,99$, ddl=93 et p=100% (probabilité pour que l'équation soit vérifiée).

Ce modèle ne prévoit pas d'interactions entre la température de stockage et le pH initial du milieu sur la croissance de la levure dans le nectar de goyave (p=99,19%) alors que de telles interactions sont notées pour *Candida pelliculosa* (TCHANGO-TCHANGO et coll., 1995) et *Candida holmii*.

Les valeurs de la densité optique maximale prédites par le modèle à différents pH et températures de stockage sont illustrées par les courbes de la figure 58. Les données expérimentales utilisées pour construire le présent modèle sont présentées à l'annexe 7.

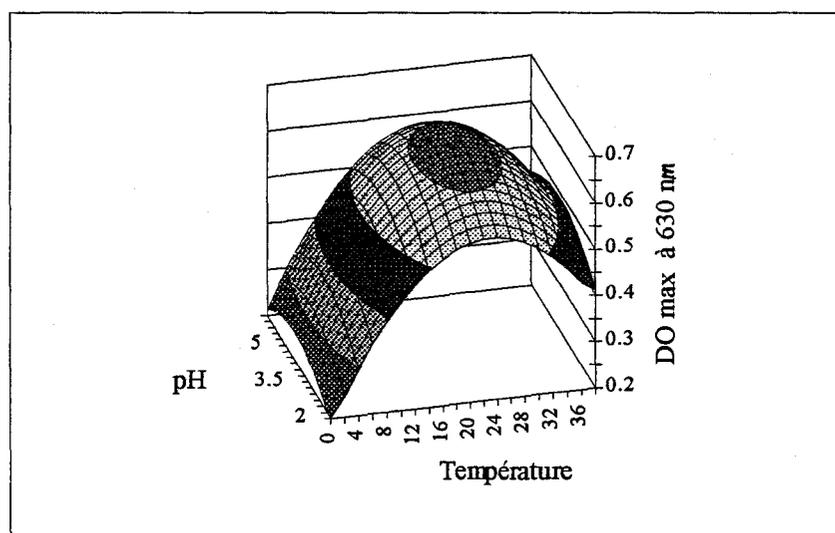


Figure 58: Courbes modélisées de la croissance de *Kloeckera apis* dans le nectar de goyave en fonction des variations de pH et des températures de stockage.

D'après ce modèle multifactoriel construit, la densité maximale de population de *Kloeckera apis* (DO max de 0,63) est environ de $20,50 \times 10^6 \text{ UFCml}^{-1}$ au pH de 4,5 et à la température de 22°C. Dans le nectar de goyave commercial (pH 3,15) stocké à 2°C, 5°C, 10°C, 15°C, 20°C, 25°C, 32°C, 35°C et 37°C, les valeurs prédites de densité maximale de population atteinte par la levure sont respectivement de $93,67 \times 10^5 \text{ UFCml}^{-1}$ (DO max. de 0,30), $12,02 \times 10^6 \text{ UFCml}^{-1}$ (DO max. de 0,38), $15,72 \times 10^6 \text{ UFCml}^{-1}$ (DO max. de 0,49), $18,10 \times 10^6 \text{ UFCml}^{-1}$ (DO max. de 0,56), $19,47 \times 10^6 \text{ UFCml}^{-1}$ (DO max. de 0,60), $19,47 \times 10^6 \text{ UFCml}^{-1}$ (DO max. de 0,60), $17,76 \times 10^6 \text{ UFCml}^{-1}$ (DO max. de 0,55), $16,06 \times 10^6 \text{ UFCml}^{-1}$ (DO max. de 0,50) et $15,04 \times 10^6 \text{ UFCml}^{-1}$ (DO max. de 0,47).

2.3.4. Ajustement des valeurs expérimentales et des valeurs prédites

Un bon ajustement a été obtenu entre les valeurs expérimentales et prédites par le modèle (figure 59).

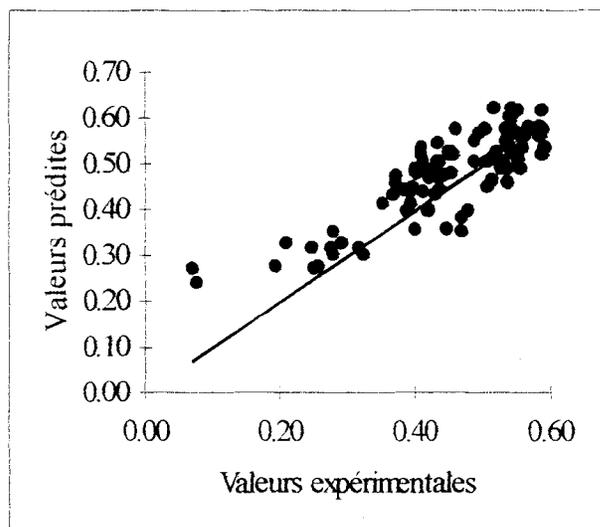


Figure 59: Ajustement des valeurs expérimentales et des valeurs prédites par le modèle de croissance de *Kloeckera apis* dans le nectar de goyave.

2.3.5. Validation du modèle construit

Elle a été effectuée à l'aide des valeurs expérimentales obtenues à la suite d'autres expérimentations ayant permis de suivre la croissance de *Kloeckera apis*

dans le nectar de goyave (pH 3,15) commercial stocké à 2°C, 5°C, 10°C, 15°C, 20°C, 25°C, 32°C, 35°C et 37°C (moyenne de 2 répétitions). Le présent modèle se valide parfaitement dans le nectar de goyave commercial (tableau 19 et figure 60).

Tableau 19: Données de validation du modèle de croissance de *Kloeckera apis* dans le nectar de goyave par la croissance de la levure dans le nectar de goyave commercial (pH 3,15).

Température de stockage	DO max	
	Cal.	Exp.
2°C	0.2998	0.3285
5°C	0.3814	0.4772
10°C	0.4894	0.5247
15°C	0.5624	0.5711
25°C	0.6034	0.6135
32°C	0.5488	0.5501
35°C	0.5044	0.4896
37°C	0.4678	0.4397

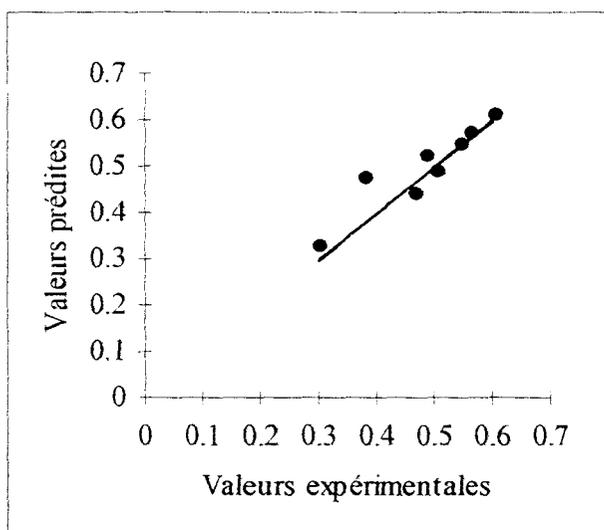


Figure 60: Validation du modèle de croissance de *Kloeckera apis* dans le nectar de goyave commercial.

2.4. Application des modèles à d'autres souches et à d'autres boissons

L'application des modèles contruits à d'autres boissons et à d'autres souches de levures permet de se rendre compte que:

- Les modèles de croissance de *Candida pelliculosa*, *Candida holmii* et *Kloeckera apis* dans le nectar de goyave ne sont pas validés dans le jus d'ananas et

le nectar de grenadille (figures 61 à 66 et tableau 21). Ces modèles se valident entre les trois souches pour la croissance dans le nectar de goyave avec des bons coefficients de détermination (figures 67 à 72 et tableau 22).

- Le modèle de croissance de *Candida holmii* dans le jus d'ananas est parfaitement validé par la croissance de cette levure dans le nectar de grenadille (pH 3,03) commercial (figure 73 et tableau 23). De même, il se valide également très bien pour la croissance de *Candida pelliculosa* dans le nectar de grenadille, les jus d'ananas, d'orange, de pomélo ou pamplemousse, de pomme et de raisin de commerce (figures 74 à 79 et tableau 24), ainsi que pour la croissance de *Kloeckera apis* dans le jus d'ananas et le nectar de grenadille commerciaux (figures 80, 81 et tableau 23).

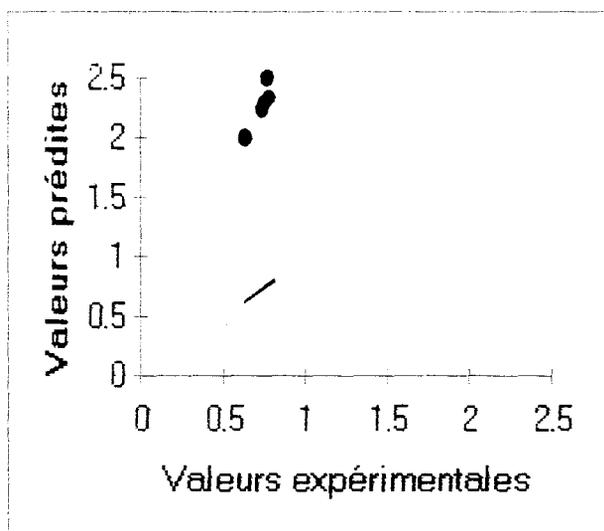


Figure 61: Non validation du modèle de croissance de *Candida pelliculosa* dans le nectar de goyave par la croissance de la levure dans le jus d'ananas commercial.

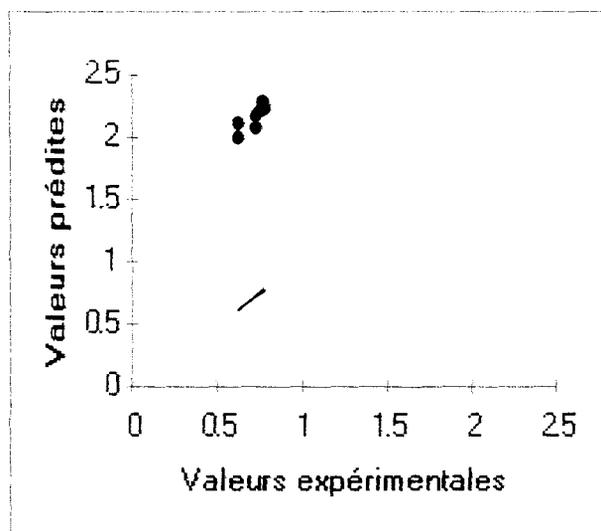


Figure 62: Non validation du modèle de croissance de *Candida pelliculosa* dans le nectar de goyave par la croissance de la levure dans le nectar de grenadille commercial.

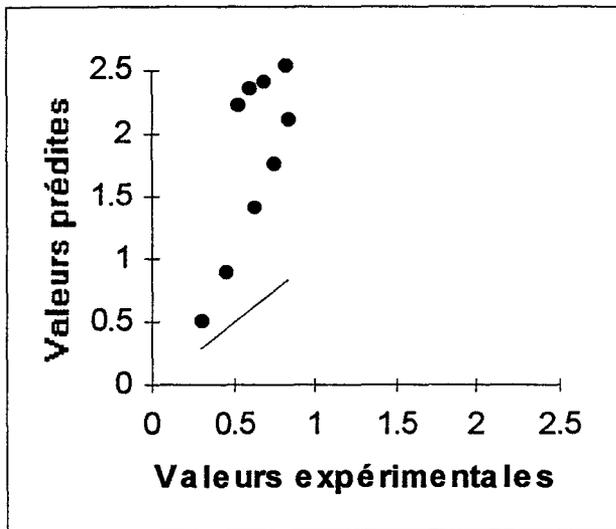


Figure 63: Non validation du modèle de croissance de *Candida holmii* dans le nectar de goyave par la croissance de la levure dans le jus d'ananas commercial.

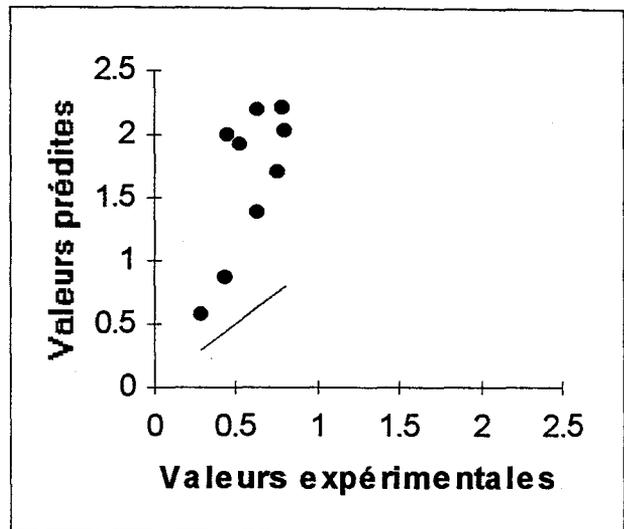


Figure 64: Non validation du modèle de croissance de *Candida holmii* dans le nectar de goyave par la croissance de la levure dans le nectar de grenadille commercial.

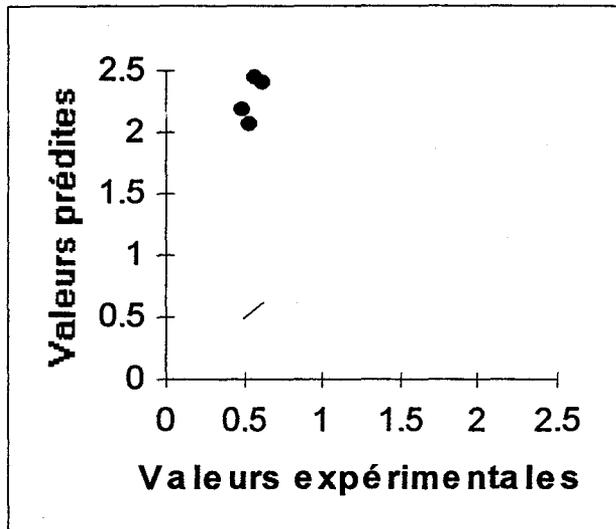


Figure 65: Non validation du modèle de croissance de *Kluyveromyces fragilis* dans le nectar de goyave par la croissance de la levures dans le jus d'ananas de commercial.

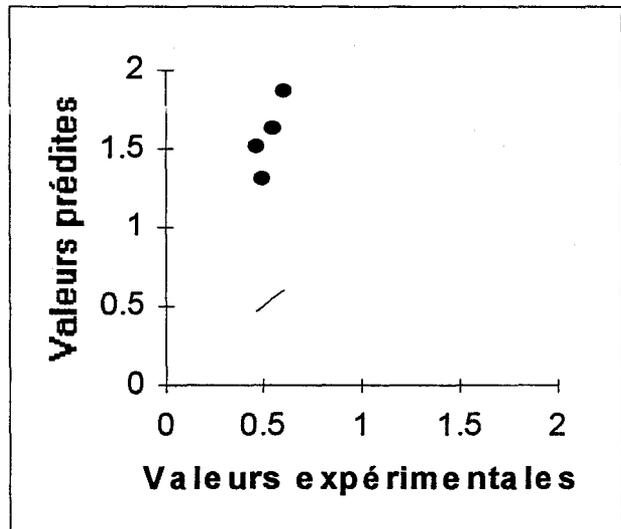


Figure 66: Non validation du modèle de croissance de *Kluyveromyces fragilis* dans le nectar de goyave par la croissance de la levure dans le nectar de grenadille commercial.

Tableau 21: Non validation dans les autres boissons des modèles contruits pour le nectar de goyave.

Kloeckera apis				Candida holmii			
Températ. de stockage	DO max modèle	DO max exp. ananas	DO max. grenadille	Températ. de stockage	DO max modèle	DO max exp. ananas	DO max exp. grenadille
25°C	0.6034	2.4427	1.8567	2°C	0.293	0.5008	0.5791
25°C	0.6034	2.3594	1.8746	5°C	0.4415	0.8897	0.8697
32°C	0.5488	2.4396	1.6284	10°C	0.6332	1.4194	1.3886
32°C	0.5488	2.4056	1.6838	15°C	0.7548	1.7589	1.7089
35°C	0.5044	2.0688	1.3176	20°C	0.8065	2.1109	2.0299
35°C	0.4678	2.0407	1.3113	25°C	0.7881	2.5356	2.2219
37°C	0.4678	2.1862	1.5155	32°C	0.6449	2.4085	2.20305
37°C	0.4678	2.1921	1.5119	35°C	0.5414	2.35465	1.9392
				37°C	0.4585	2.2356	2.00965

Candida pelliculosa							
Températ. de stockage	DO max modèle	DO max exp. ananas	DO max exp. grenadille	DO max exp. orange	DO max exp. pomelo	DO max exp. pomme	DO max exp. raisin
20°C	0.6262	1.9987	2.1097	2.2098	1.8049	2.0917	2.2015
20°C	0.6262	2.0175	1.9989	2.2103	1.7987	2.0099	2.1958
25°C	0.7706	2.4948	2.2779	2.4174	1.9054	2.3931	2.3049
25°C	0.7706	2.5107	2.2771	2.3966	1.8879	2.3975	2.2869
32°C	0.7765	2.3418	2.2369	2.3331	1.774	2.5136	2.2567
32°C	0.7765	2.345	2.2216	2.3173	1.7171	2.5459	2.3239
35°C	0.755	2.2922	2.2057	2.182	1.5363	2.3355	2.2364
35°C	0.755	2.287	2.2119	2.2011	1.5238	2.3651	2.2805
37°C	0.7327	2.2321	2.177	2.1033	1.4492	2.1519	
37°C	0.7327	2.2559	2.0747	2.0835	1.4359	2.1931	

Tableau 22: Validation des différents modèles mathématiques construits par la croissance des 3 souches de levures dans le nectar de goyave commercial (pH 3,15).

Températ. de stockage	DO max modèle C. holmii	DO max exp. C.pellicu..	DO max exp. K. apis	DO max modèle C.pellicu.	DO max exp. C. holmii	DO max exp K. apis
2°C	0.293	0.1631	0.3285	0.1993	0.3169	0.3285
5°C	0.4415	0.2805	0.4772	0.3218	0.3601	0.4772
8°C				0.4299	0.6582	0.5247
10°C	0.6332	0.4187	0.5247	0.494	0.8206	0.5711
15°C	0.7548	0.7049	0.5711	0.6262	0.9565	/
20°C	0.8065	0.6991	0.6135			
25°C	0.7881	0.792	0.5501	0.7706	0.85314	0.6135
32°C	0.6449	0.8203	0.4896	0.7765	0.8935	0.5501
35°C	0.5414	0.7242	0.4397	0.755	0.5483	0.4896
37°C	0.4585	0.8325		0.7327	0.4496	0.4397

Températ. de stockage	DO max modèle K. apis	DO max C. holmii	DO max C.pellicu.
2°C	0.2998	0.3169	0.1631
5°C	0.3814	0.3601	0.2805
10°C	0.4894	0.6582	0.4187
15°C	0.5624	0.8206	0.7049
25°C	0.6034	0.85314	0.792
32°C	0.5488	0.8935	0.8203
35°C	0.5044	0.5483	0.7242
37°C	0.4678	0.4496	0.8325

Figure 23: Validation du modèle de croissance de *Candida holmii* dans le jus d'ananas par la croissance de *Candida pelliculosa* et *Kloeckera apis* dans les autres jus et nectars de fruits.

Températ de stockage	DO max modèle C. holmii	DO max grenadille C. holmii	DO max ananas C. pellicu.	DO max orange C. pellicu.	DO max pomelo C. pellicu.	DO max pomme C. pellicu.	DO max raisin C. pellicu.	DO max grenadille K. apis	DO max ananas K. apis
20°C	2.1018	0.5791	1.9987	2.2098	1.8049	2.0917	2.2015	1.8999	1.8997
20°C	2.1018	0.8697	2.0175	2.2103	1.7987	2.0099	2.1958	1.9908	1.9012
25°C	2.2442	1.3886	2.4948	2.4174	1.9054	2.3931	-	1.8567	2.4427
25°C	2.2442	1.7089	2.5107	2.3966	1.8879	2.3975	-	1.8746	2.3594
32°C	2.225	2.0299	2.3418	2.3331	1.774	2.5136	2.3049	1.6284	2.4396
32°C	2.225	2.2219	2.345	2.3173	1.7171	2.5459	2.2869	1.6838	2.4056
35°C	2.1388	2.20305	2.2922	2.182	1.5363	2.3355	2.2567	1.3176	2.0688
35°C	2.1388	1.9392	2.287	2.2011	1.5238	2.3651	2.3239	1.3113	2.0407
37°C	2.022	2.00965	2.2321	2.1033	1.4492	2.1519	2.2364	1.5155	2.1862
37°C	2.022		2.2559	2.0835	1.4359	2.1931	2.2805	1.5119	2.1921

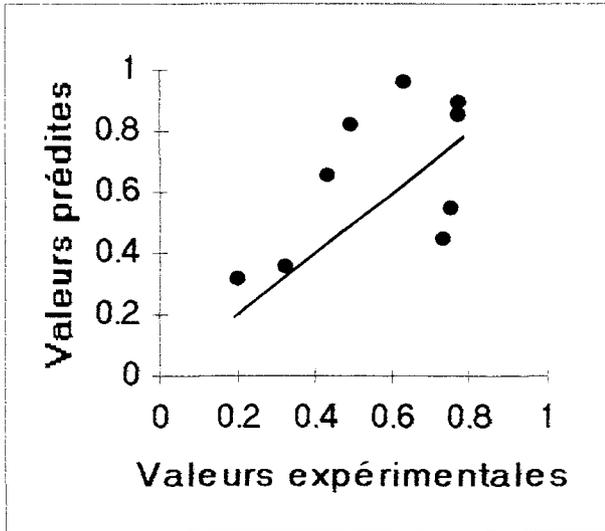


Figure 67 : validation du modèle de croissance de *Candida pelliculosa* dans le nectar de goyave par la croissance de *Candida holmii* dans le nectar de goyave commercial.

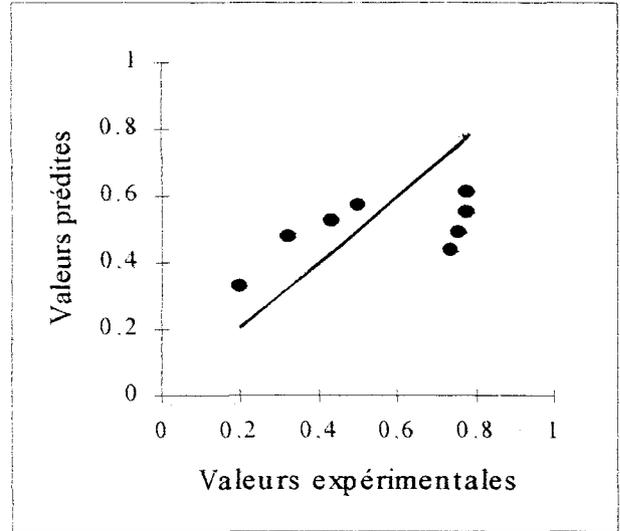


Figure 68 : validation du modèle de croissance de *Candida pelliculosa* dans le nectar de goyave par la croissance de *Kloeckera apis* dans le nectar de goyave commercial.

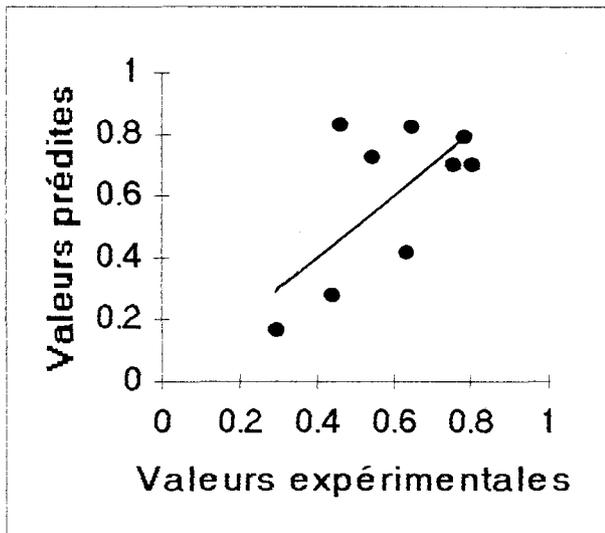


Figure 69 : validation du modèle de croissance de *Candida holmii* dans le nectar de goyave par la croissance de *Candida pelliculosa* dans le nectar de goyave commercial.

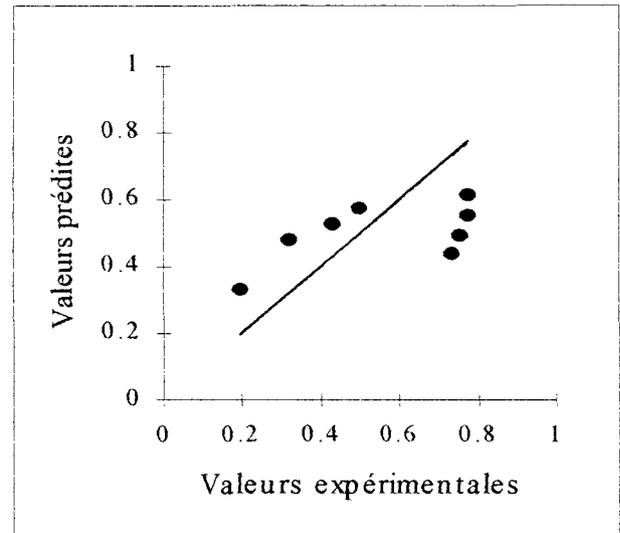


Figure 70 : validation du modèle de croissance de *Candida holmii* dans le nectar de goyave par la croissance de *Kloeckera apis* dans le nectar de goyave commercial.

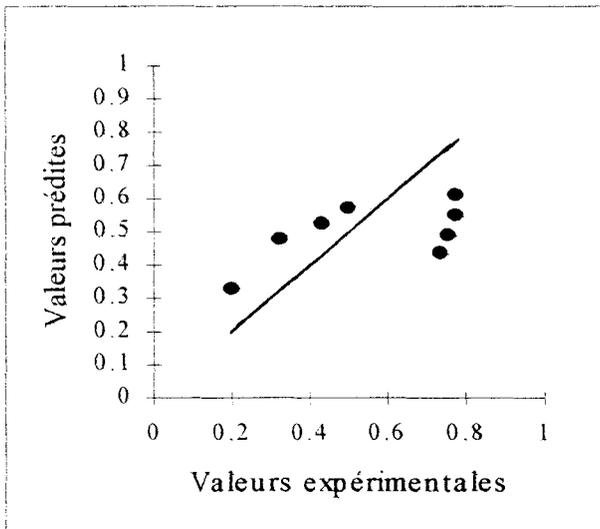


Figure 71 : validation du modèle de croissance de *Kloeckera apis* dans le nectar de goyave par la croissance de *Candida pelliculosa* dans le nectar de goyave commercial.

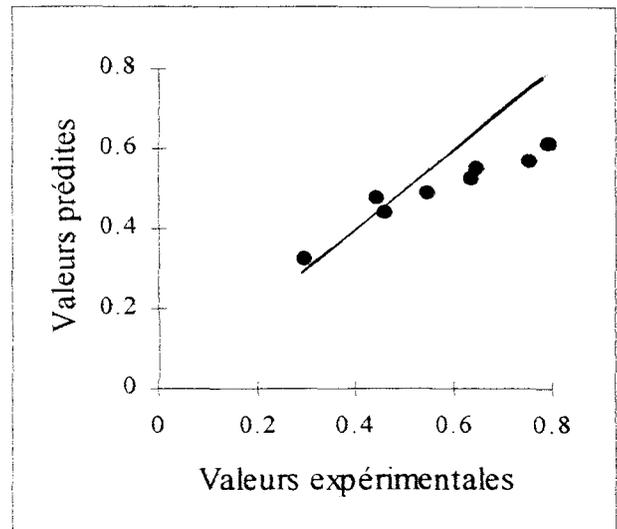


Figure 72 : validation du modèle de croissance de *Kloeckera apis* dans le nectar de goyave par la croissance de *Candida holmii* dans le nectar de goyave commercial.

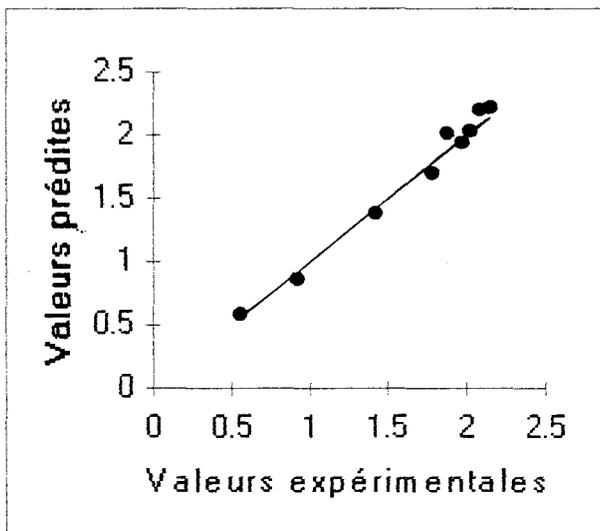


Figure 73 : validation du modèle de croissance de *Candida holmii* dans le jus d'ananas par la croissance de *Candida holmii* dans le nectar de grenadille commercial.

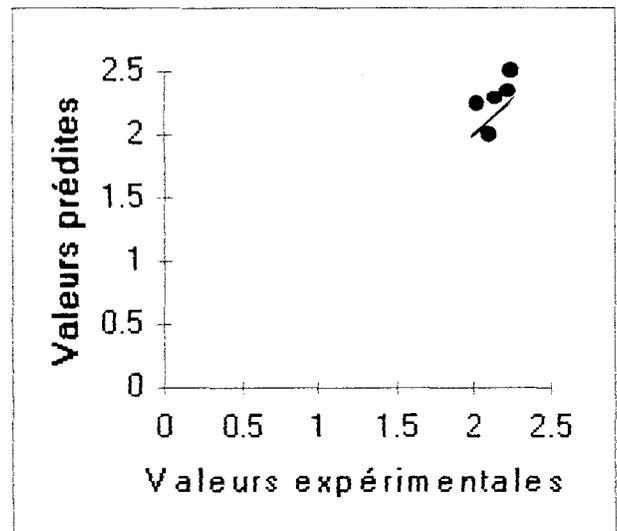


Figure 74 : validation du modèle de croissance de *Candida holmii* dans le jus d'ananas par la croissance de *Candida pelliculosa* dans le jus d'ananas commercial.

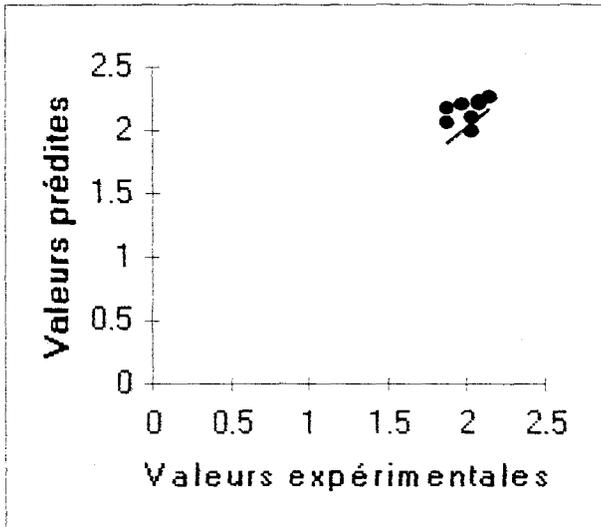


Figure 75 : validation du modèle de croissance de *Candida holmii* dans le jus d'ananas par la croissance de *Candida pelliculosa* dans le nectar de grenadille commercial.

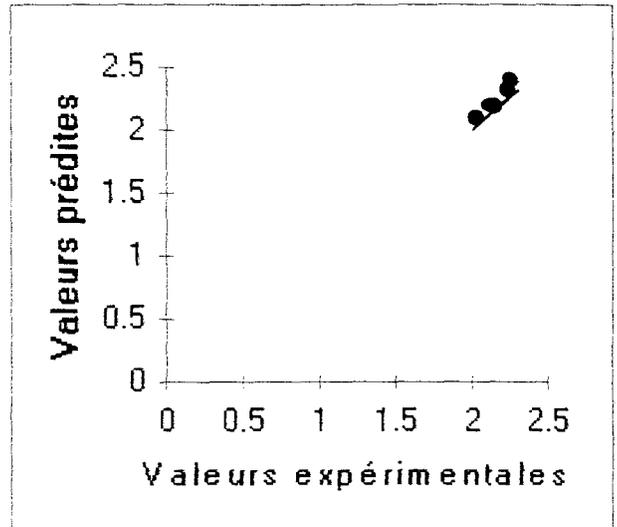


Figure 76 : validation du modèle de croissance de *Candida holmii* dans le le jus d'ananas par la croissance de *Candida pelliculosa* dans le jus d'orange commercial.

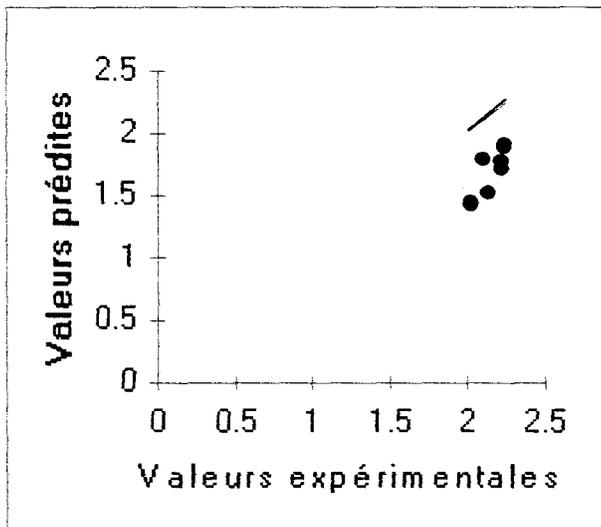


Figure 77 : validation du modèle de croissance de *Candida holmii* dans le jus d'ananas par la croissance de *Candida pelliculosa* dans le jus de pomelo ou de pamplemousse commercial.

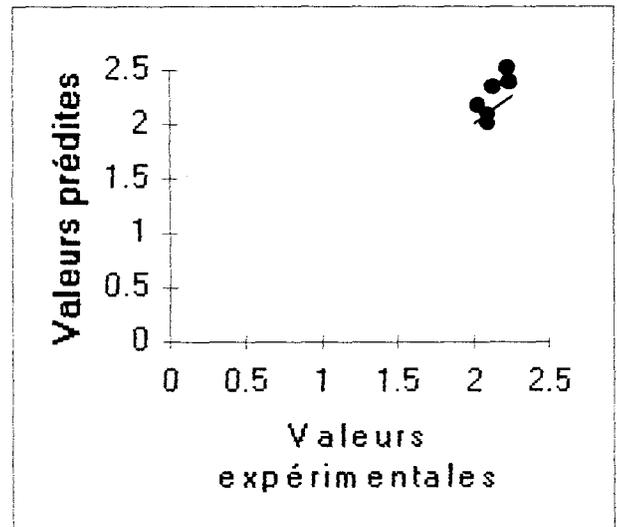


Figure 78 : validation du modèle de croissance de *Candida holmii* dans le le jus d'ananas par la croissance de *Candida pelliculosa* dans le jus de pomme commercial.

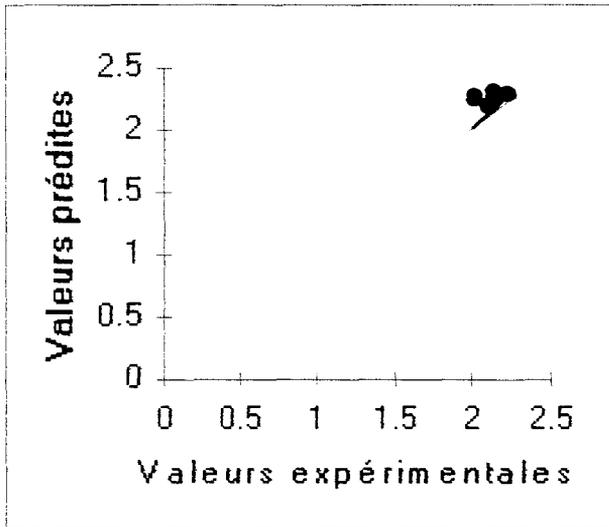


Figure 79 : validation du modèle de croissance de *Candida holmii* dans le jus d'ananas par la croissance de *Candida pelliculosa* dans le jus de raisin commercial.

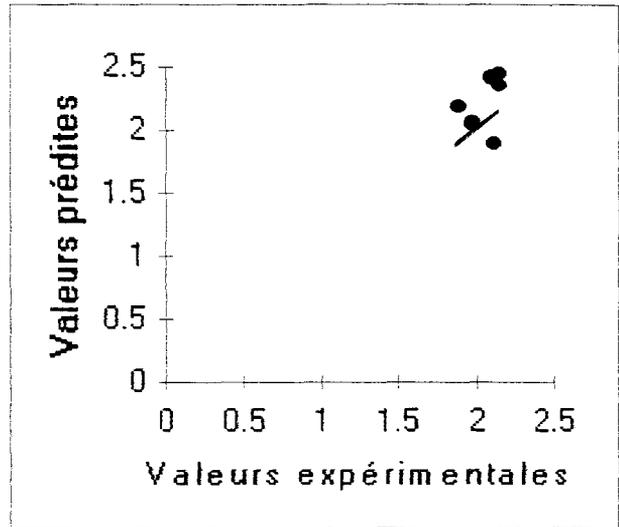


Figure 80 : validation du modèle de croissance de *Candida holmii* dans le le jus d'ananas par la croissance de *Kloeckera apis* dans le jus d'ananas commercial.

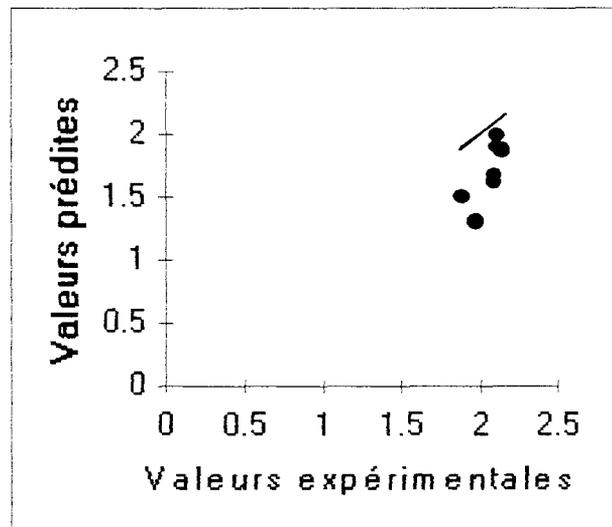


Figure 81 : validation du modèle de croissance de *Candida holmii* dans le le jus d'ananas par la croissance de *Kloeckera apis* dans le nectar de grenadille commercial.

Les taux maximaux de croissance de ces levures dans le jus d'ananas, le nectar de goyave et le nectar de grenadille commerciaux sont présentés au tableau 20.

Tableau 20: Taux maximal de croissance, μ_{\max} (h^{-1}) de *Candida pelliculosa*, *Candida holmii* et *Kloeckera apis* dans le jus d'ananas, le nectar de goyave et le nectar de grenadille à 25°C et 32°C.

	Jus d'ananas		Nectar de goyave		Nectar de grenadille	
	25°C μ_{\max}	32°C μ_{\max}	25°C μ_{\max}	32°C μ_{\max}	25°C μ_{\max}	32°C μ_{\max}
<i>Candida pelliculosa</i>	0,072	0,076	0,038	0,075	0,075	0,079
<i>Candida holmii</i>	0,190	0,170	0,024	0,060	0,185	0,148
<i>Kloeckera apis</i>	0,035	0,013	0,013	0,007	0,047	0,030

2.5. Discussion

Le suivi des cinétiques de croissance des levures dans le nectar de goyave moins riche en sucres fermentescibles (FAVIER et coll., 1993) s'est effectué directement en cuves pour spectrophotomètre. Dans le jus d'ananas, le nectar de grenadille et les autres boissons beaucoup plus riches en sucre fermentescibles que le nectar de goyave, le suivi des fermentations a été réalisé dans des flacons en verre, avec lecture de la densité optique à l'aide des cuves pour spectrophotomètre. Ces deux méthodes d'étude de cinétique de croissance des levures dans les jus de fruits donnent des résultats comparables. En effet, un coefficient de détermination (r^2) de 0,97 a été obtenu avec un degré de liberté de 108 et une probabilité pour que l'équation de régression soit vérifiée de 100%, en comparant les résultats obtenus avec les deux méthodes pour le suivi de la croissance de *Kloeckera apis* dans le

nectar de goyave ajusté à différents pH (2,5, 3,15, 4,00, 5,00 et 6,25) et stocké à 25°C et 32°C (figure 82).

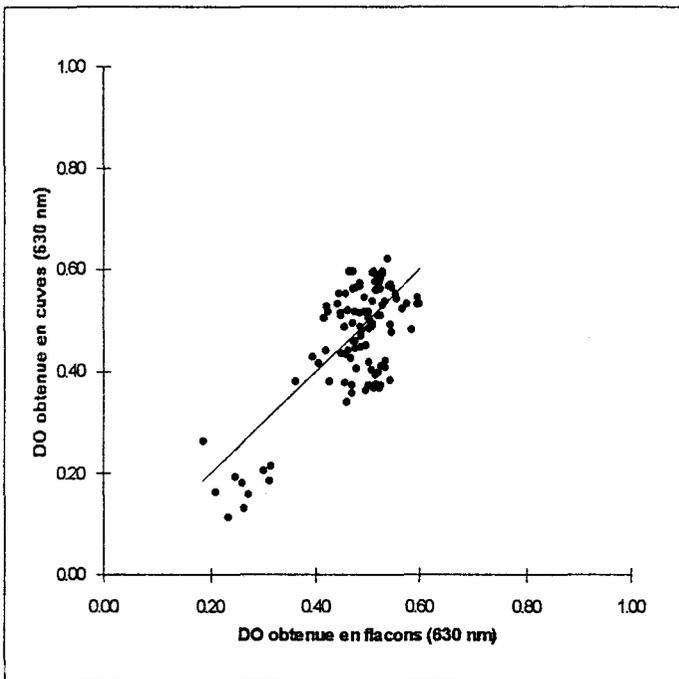


Figure 82: Comparaison des résultats de DO obtenus par ensemencement direct en cuvettes pour spectrophotomètre et par ensemencement en flacons (croissance de *Kloeckera apis* à 25°C et 32°C dans le nectar de goyave commercial (pH 3,15)).

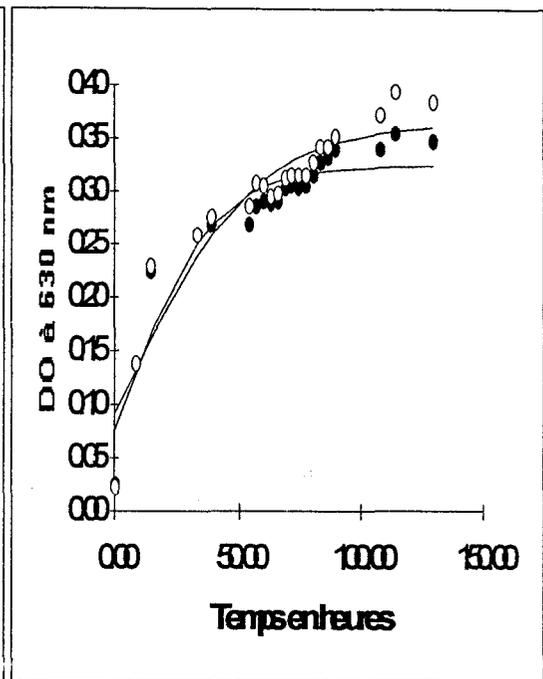


Figure 83: Exemple de courbes de croissance de *Kloeckera apis* à 37°C dans le nectar de goyave (pH 2,00), modélisées selon Gompertz: série de données 1 (●) et série de données 2 (○).

L'allure générale des courbes de croissance obtenues au cours de cette étude ne présente pas de phase de latence à l'exception de quelques courbes obtenues dans les conditions de températures extrêmes. La phase exponentielle paraît courte avec des segments de courbes qui n'ont pas réellement une allure exponentielle classique. De même, il n'existe pratiquement pas d'allure constante sur les courbes pouvant matérialiser la phase stationnaire. On observe plus facilement la phase de mortalité brusque sur nos courbes de croissance. Toutefois, à des températures de l'ordre de 35°C à 37°C, la croissance de *Candida pelliculosa* dans la plupart des jus de fruits présente les phases classiques (figures 23 et 24). On note une phase de ralentissement importante et une phase stationnaire qui survient aux environs de 100 heures. La croissance dans le nectar de goyave à ces mêmes températures est très différente (figures 17 et 18) avec une décroissance rapide de la levure dès la 80^{ème}

heure et une quasi-absence de la phase stationnaire: ce phénomène pourrait être dû à la présence d'un métabolite toxique.

Aux températures favorables de croissance pour la plupart des levures (25°C-32°C), le taux de croissance maximal le plus faible s'observe à 25°C (0,038 h⁻¹), à 25°C (0,024 h⁻¹) et à 32°C (0,007 h⁻¹) respectivement pour *C. pelliculosa*, *C. holmii* et *K. apis* dans le nectar de goyave. Les valeurs élevées de taux maximal de croissance sont obtenues à 32°C pour *C. pelliculosa* (0,076 h⁻¹, 0,075 h⁻¹ et 0,079 h⁻¹ respectivement dans le jus d'ananas, les nectars de goyave et de grenadille), à 25°C et 32°C pour *C. holmii* (0,190 h⁻¹ et 0,185 h⁻¹ respectivement à 25°C dans le jus d'ananas et le nectar de grenadille, et 0,060 h⁻¹ à 32°C dans le nectar de goyave). Ces résultats confirment les faits observés en industrie, notamment pour le cas du jus d'ananas considéré comme une boisson très délicate et très sensible aux altérations microbiennes qui pose le plus de problèmes aux producteurs pour sa conservation. Ceci serait favorisé par son pH relativement élevé (3,95 à 5,50) et sa richesse en sucres fermentescibles et éventuellement en facteurs de croissance.

En ce qui concerne la modélisation du développement des levures dans les jus et nectars de fruits exotiques, le choix du modèle polynomial a été préféré dans la mesure où il semble donner des résultats beaucoup plus proches de la réalité. En effet, l'utilisation du modèle de GOMPERTZ donne des résultats beaucoup moins proches de la réalité que le modèle polynomial. Un exemple de courbes modélisées de la croissance de *Kloeckera apis* dans le nectar de goyave par GOMPERTZ au pH 2,00 et à 37°C (figure 83) illustre cette affirmation.

Le choix de la densité optique maximale comme paramètre de modélisation, parmi tant d'autres tels que le taux maximal de croissance, a été guidé par le fait qu'il permet d'avoir directement la densité de population maximale des levures dans les boissons pour une comparaison éventuelle avec les normes microbiologiques des jus et des nectars de fruits.

Le facteur "temps" n'a pas été pris en compte dans les modèles dans la mesure où les densités maximales de population des levures sont atteintes pendant une durée de stockage inférieure à une semaine généralement observée par la plupart des industries de jus de fruits avant la commercialisation des produits.

Une transformation logarithmique du paramètre modélisé préconisée ou utilisée par certains auteurs (GIBSON et coll., 1988; BRATCHELL et coll., 1989; BUCHANAN et PHILLIPS, 1990; ALBER et SCHAFFER, 1992; ZAIKA et coll., 1992; McMEEKIN et coll., 1993; MEMBRE et THOLOZAN, 1994, ZWIETERING et coll., 1994) pour améliorer les modèles mathématiques prédictifs en microbiologie alimentaire n'a pas été nécessaire pour la construction de nos modèles.

Les modèles développés qui permettent, aussi bien que d'autres modèles multifactoriels, d'étudier plusieurs facteurs à la fois ainsi que leurs interactions éventuelles, ont donné un bon ajustement entre les valeurs prédites et les valeurs expérimentales. BUCHANAN et PHILLIPS (1990) ont développé un modèle polynomial pour étudier les effets et les interactions de cinq facteurs, température (5°C à 37°C), pH (4,5 à 7,5), teneur en chlorure de sodium, NaCl (5 à 45 g^l⁻¹), concentration en nitrite de sodium, Na₂NO₂ (0 à 1000 µgml⁻¹) et atmosphère gazeux (aérobie ou anaérobie) sur la croissance de *Listeria monocytogenes*. Ils ont développé dans le cadre du "Pathogen Modelling Program" (PMP), en utilisant une transformation logarithmique (Ln), un modèle multifactoriel cubique très intéressant mais très complexe, qui tient compte des effets et des interactions potentielles à 3 dimensions des facteurs étudiés dans l'intervalle de variation des valeurs des

variables considérées, sur la croissance en aérobiose et en anaérobiose de *Listeria monocytogenes*. Toutefois, ces types de modèles deviennent très complexes et fragiles lorsque le nombre de facteurs étudiés est très important (BRATCHELL et coll., 1989; PALUMBO et coll., 1991). Ceci explique pourquoi les auteurs des modèles multifactoriels ont souvent recours, pour la validation de leurs modèles, aux valeurs expérimentales obtenues dans les mêmes conditions au cours d'expériences distinctes (LITTLE et coll., 1992).

Le modèle mathématique de croissance de *Candida holmii* dans le jus d'ananas a été parfaitement validé avec les valeurs observées pour la croissance des trois souches de levures étudiées dans le jus d'ananas et le nectar de grenadille commerciaux beaucoup plus riches en sucres fermentescibles que le nectar de goyave (FAVIER et coll., 1993). Ce modèle est également validé avec les valeurs observées pour la croissance de *Candida pelliculosa* respectivement dans les jus commerciaux d'orange, de pomélo, de pomme et de raisin. Ce résultat permet d'envisager une généralisation aux autres levures d'altération, de l'application de ce modèle de croissance aux jus et nectars de fruits (exotiques ou non) riches en sucres fermentescibles (mangue, banane, ramboutan, pomme de cythère, etc...). Par contre, le modèle ne semble pas être validé dans le nectar de goyave beaucoup moins riches en sucres fermentescibles.

Les modèles de croissance *Candida pelliculosa*, *Candida holmii* et *Kloeckera apis* dans le nectar de goyave se valident très bien entre les trois souches de levures dans cette boisson, mais pas dans les jus d'ananas et le nectar de grenadille beaucoup plus riches en sucres fermentescibles.

D'après tous nos modèles contruits, on constate qu'il y a croissance des levures d'altération dans les milieux en cas de contamination des boissons. Cette croissance pourrait être limitée par un abaissement optimal du pH des boissons (addition d'acide citrique ou autre acide recommandé par les normes alimentaires) et

un stockage des produits pasteurisés aux basses températures. Dans tous les cas, le seul moyen de conserver les bonnes qualités microbiologiques et marchandes des jus et nectars de fruits serait une pasteurisation efficace associée à un conditionnement rigoureusement aseptique qui limiteraient tout risque de recontamination des produits. Toutefois, à la lumière des résultats obtenus, il serait fortement déconseillé aux producteurs de jus et nectars de fruits, et plus particulièrement aux ménagères qui ne pasteurisent pas leurs produits, de les conserver même en cas de réfrigération, plus de 12 heures après la fabrication au risque d'altérer les qualités des boissons.

L'utilisation de la turbidimétrie, ou toute autre méthode rapide en microbiologie telle que la conductimétrie ((DEAK et BEUCHAT, 1993), semble être bien adaptée à l'étude de l'activité des levures dans les aliments et les boissons. Ces méthodes permettent, dans un délai de réponse relativement court, l'obtention des masses de données expérimentales pouvant permettre de développer des modèles mathématiques prédictifs de la croissance des levures d'altération dans ces denrées alimentaires.

3. Etude de la thermorésistance

3.1. Pasteurisation et préservation des qualités sensorielles des jus et nectars de fruits exotiques

L'étude de l'effet du traitement thermique sur les qualités sensorielles des jus et nectars de fruits exotiques a été réalisée par une pasteurisation par actinisation à 92°C (nectar de grenadille) et à 94°C (jus d'ananas, nectars de goyave et de pomélo) pendant 10 secondes après une désaération à 80°C pendant environ 10 min. Ce traitement thermique industriel n'affecte pas significativement la couleur, le goût et la flaveur du jus d'ananas et du nectar de goyave moins riches en constituants volatils et en acides organiques que les nectars de grenadille et de pomélo. Par contre, l'odeur, le goût et l'arôme des nectars de grenadille et de pomélo pasteurisés et conservés en bouteilles à la température ambiante sont significativement différents au seuil de 1% de ceux des mêmes boissons surgelées en sachets plastiques après ou sans pasteurisation préalable. Des modifications provoquées par des acides organiques et des composés volatils présents en quantités relativement importantes dans ces fruits surviennent probablement au cours du traitement thermique et du stockage des boissons: ces réactions seraient à l'origine de l'altération des qualités organoleptiques qui rend ainsi inconsommable le nectar de pomélo pasteurisé et conservé en bouteilles. Le froid aurait une action inhibitrice sur ces modifications au cours du stockage puisque les caractéristiques sensorielles (odeur, couleur, goût et arôme) du jus d'ananas, des nectars de goyave, de grenadille et de pomélo surgelés en sachets plastiques et conservés à -18°C après ou sans pasteurisation préalable ne présentent aucune différence significative au seuil de 5%.

Tous ces résultats sont consignés dans un article scientifique paru en 1993 dans la revue *Microbiologie-Aliments-Nutrition* (voir page 140 du présent mémoire).

EFFET DE LA PASTEURISATION SUR LES QUALITES SENSORIELLES DES JUS ET NECTARS DE FRUITS EXOTIQUES

J. TCHANGO-TCHANGO (*), T. NJINE (**), R. TAILLIEZ (***)

EFFECT OF PASTEURIZATION ON SENSORY QUALITIES OF EXOTIC FRUITS JUICES AND NECTARS

Summary

Effect of pasteurization on sensory qualities of pineapple juice, guava, passion-fruit and grapefruit nectars produced at Njombe Agronomic Research Station in Cameroun has been studied.

Pasteurization of these beverages by actinisation at 92°C (passion-fruit nectar) and at 94°C (pineapple juice, guava and grapefruit nectars) for 10 seconds after deaeration at 80°C did not significantly affect colour, taste and flavour of pineapple juice and guava nectar in which volatile flavour constituents and organic acids contents are lower than in passion-fruit and grapefruit nectars. There was a significant different between odour, taste and flavour of these latter nectars pasteurized and preserved in glass bottles, and those of deep-frozen passion-fruit and grapefruit nectars preserved in plastic bags after or without previous pasteurization.

The odour, colour, taste and flavour of deep-frozen pineapple juice, guava, passion-fruit and grapefruit nectars preserved in plastic bags at -18°C after of without previous pasteurization were not significantly different.

KEY-WORDS: Sensory qualities - Fruit juices and nectars - Deep-frozen - Pasteurization by actinisation.

INTRODUCTION

Depuis des décennies, la pasteurisation est l'une des techniques les plus utilisées pour le traitement de conservation des denrées alimentaires en général et des boissons en particulier. Dans la plupart des cas, ce traitement thermique, tout en visant l'élimination du risque d'intoxication alimentaire par la destruction d'une bonne partie des micro-organismes contenus dans l'aliment [5], entraîne des modifications organoleptiques du produit ainsi que des variations de couleur par brunissement dû à la réaction de Maillard [6].

(*) Laboratoire de Technologie Alimentaire, Station de Recherches Agronomiques, B.P. 13, Njombe (Cameroun).

(**) Laboratoire de Biologie Générale, Faculté des Sciences, Université de Yaoundé, B.P. 812, Yaoundé (Cameroun).

(***) Laboratoire de Microbiologie, Institut Agricole et Alimentaire de Lille, Université des Sciences et Technologies de Lille, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex (France).

Des travaux antérieurs [9] ont permis de définir des barèmes de pasteurisation par actinisation qui permettent une bonne conservation de certains jus et nectars de fruits tropicaux (ananas, goyave, grenadille et mangue). D'autres études récentes [10] ont montré que la pasteurisation par actinisation à 92°C (nectar de grenadille) ou à 94°C (jus d'ananas, nectars de goyave et de pomelo) pendant 10 secondes après une désaération à 80°C contribue considérablement à l'amélioration des qualités microbiologiques et hygiéniques des jus et nectars de fruits exotiques.

Le présent travail se propose d'étudier à l'aide de tests d'évaluation sensorielle l'effet de la pasteurisation sur les qualités organoleptiques des principaux jus et nectars de fruits produits à l'Unité de transformation des fruits et légumes de la Station de Recherches Agronomiques de Njombé au Cameroun.

MATERIELS ET METHODES

Préparation des échantillons - L'étude était axée sur les jus d'ananas (*Ananas comosus*) et les nectars de goyave (*Psidium guajava*), de grenadille (*Passiflora edulis* var. *flavicarpa*) et de pomelo (*Citrus paradisi*): trois échantillons de chaque type de boisson ont été examinés; les fruits frais utilisés pour leur fabrication ont été récoltés au stade de maturité normale dans les régions de Njombé et de Nkongsamba. Ces fruits étaient désinfectés par un trempage durant 30 minutes dans une solution aqueuse d'hypochlorite de sodium titrant 2,5% (p/v).

Les boissons étaient fabriquées après broyage ou pressurage des fruits selon des procédés discontinus déjà décrits [10]. Après filtration les jus obtenus ont subi trois types de traitements de conservation sans utilisation de conservateurs chimiques:

- Conditionnement sans pasteurisation préalable en sachets de plastique (polyéthylène basse densité) d'un litre de contenance, suivi d'une surgélation en tunnel à une température comprise entre -22°C et -25°C pendant 6 à 8 heures et enfin d'un stockage en chambre froide à -18°C.
- Pasteurisation préalable par actinisation à l'aide d'un pasteurisateur électrique à 92°C (nectar de grenadille) ou à 94°C (jus d'ananas, nectars de goyave et de pomelo) pendant 10 secondes après une désaération à 80°C, suivie, successivement, du conditionnement à chaud en sachets de plastique (polyéthylène basse densité) d'un litre de contenance, de la surgélation en tunnel entre -22°C et -25°C pendant 6 à 8 heures et du stockage en chambre froide à -18°C.
- Pasteurisation dans les conditions ci-dessus, suivie du conditionnement à chaud en bouteilles de verre de 33 centilitres, puis d'un refroidissement rapide à l'eau courante et enfin stockage à température ambiante (28 à 30°C).

Le pasteurisateur utilisé présente les caractéristiques suivantes: marque Stoutz Actinator, type intégral, débit 150 l/h, puissance électrique 13 kW, tension 380 V triphasé 50 Hz, consommation électrique 10,75 kWh, température d'entrée de l'ordre de 28 à 30°C, température de sortie 75°C, temps de chambrage dans les tubes en quartz 10 secondes, rendement électrique minimal 95%. La section de traitement par rayonnement infrarouge est composée d'une série de tubes en quartz pur de faible diamètre dans lesquels la boisson circule en régime turbulent. Chaque tube est entouré d'une résistance d'émission infrarouge et est isolé par un réflecteur de silice-alumine.

Analyses sensorielles - Quelques caractéristiques organoleptiques (couleur, arôme, goût et odeur) des jus et nectars de fruits conservés en sachets par surgélation sans pasteurisation préalable et présentant des caractéristiques semblables à celles des fruits frais ont été comparées à celles des mêmes boissons conservées soit après pasteurisation avec condi-

tionnement en bouteilles, soit après surgélation en sachets de plastique avec pasteurisation préalable. Des tests de dégustation ont ainsi été organisés pour les 4 boissons (jus d'ananas, nectars de goyave, de grenadille et de pomelo) préparées et conservées selon les trois modalités décrites.

L'épreuve de notation permettant d'étudier chaque caractéristique séparément et d'évaluer les différences entre les caractéristiques a été choisie en tenant compte des aspects méthodologiques de l'évaluation sensorielle [1, 4, 8].

Un jury de dégustation composé de 18 membres entraînés et habitués à la consommation des jus et nectars de fruits surgelés en sachets de plastique sans pasteurisation préalable, habituellement fabriqués et commercialisés à l'unité de transformation des fruits et légumes de la Station de Recherches Agronomiques de Njombé, a été utilisé. Les juges devaient observer et déguster les échantillons codés présentés à chaque test pour chaque type de boisson, puis les classer en portant leur code sur une échelle à 9 points. Les boissons surgelées étaient entièrement décongelées alors que celles pasteurisées et conservées en bouteilles étaient bien réfrigérées avant d'être soumises à la dégustation. Les tests ont été répétés deux fois pour s'assurer de la fiabilité des notes attribuées.

Les résultats des différents tests ont été traités par l'analyse de la variance: la comparaison des valeurs de F calculées aux valeurs théoriques données dans les tables de Snedecor a permis de préciser le risque pris (5%, 2,5%, 1% ou 0,1%) pour chaque caractéristique testée; en outre, une évaluation des étendues de différenciation à l'aide du test de classement multiple de Duncan a été établie pour les valeurs significativement différentes.

RESULTATS

Les résultats des tests de dégustation du jus d'ananas et des nectars de goyave, de grenadille et de pomelo sont donnés dans le tableau I.

Le jus d'ananas pasteurisé et conditionné en bouteilles de verre et les jus d'ananas surgelés en sachets de plastique après ou sans pasteurisation préalable ne présentent pas de différence significative au seuil de 5% en ce qui concerne l'odeur, le goût, la couleur et l'arôme de la boisson. La pasteurisation par actinisation n'affecte donc pas de façon significative les qualités sensorielles principales de cette boisson.

Le nectar de goyave pasteurisé et conditionné en bouteilles et les nectars de goyave surgelés en sachets de plastique après ou sans pasteurisation préalable n'ont pas montré de différence significative au seuil de 5% pour leur goût, leur arôme et leur couleur; par contre, l'odeur du nectar de goyave pasteurisé et conditionné en bouteilles est très significativement différente de celle des nectars surgelés en sachets après ou sans pasteurisation préalable. Toutefois, les dégustateurs trouvent que ce nectar pasteurisé et conservé en bouteilles est tout aussi consommable que les formes surgelées, malgré une préférence pour ces dernières dont les caractéristiques sont beaucoup plus proches de celles du fruit frais.

En dehors de la couleur des nectars de grenadille qui n'est pas significativement modifiée par la pasteurisation, l'odeur, le goût et l'arôme de cette boisson pasteurisée et conditionnée en bouteilles sont significativement différents au seuil de 0,1% de ceux des nectars de grenadille surgelés en sachets de plastique après ou sans pasteurisation préalable; ces deux derniers types de préparation ne présentent pas entre eux de différences significatives pour toutes les caractéristiques testées. Les dégustateurs tout en notant que le nectar de grenadille pasteurisé et conditionné en bouteilles de verre est parfaitement consommable relèvent cependant qu'il a un goût de cuit assez marqué et qu'il est légèrement aigre à la dégustation. Ils préfèrent tous, et de façon très significative (seuil infé-

rieur à 0,1%), les nectars surgelés en sachets, après ou sans pasteurisation préalable, aux nectars pasteurisés en bouteilles.

Pour le nectar de pomelo, la couleur des trois catégories de préparations ne présente pas de différence significative au seuil de 5%. Il en est de même des caractéristiques sensorielles des nectars de pomelo surgelés en sachets de plastique après ou sans pasteurisation préalable. Par contre, l'odeur, le goût et l'arôme du nectar de pomelo pasteurisé et conservé en bouteilles sont significativement différents de ceux des nectars surgelés en sachets après ou sans pasteurisation préalable. Les dégustateurs trouvent que le nectar de pomelo pasteurisé et conditionné en bouteilles n'est pas consommable car il développe un goût piquant et très aigre: les tests statistiques confirment de façon hautement significative (seuil très inférieur à 0,1%) cette observation qualitative.

Tableau I - Analyse statistique des tests d'évaluation sensorielle pour le jus d'ananas et les nectars de goyave, de grenadille et de pomelo préparés selon diverses techniques

CARACTERISTIQUES TRAITEMENT (a)	ODEUR			GOUT			COULEUR			AROME		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Jus d'ananas												
Note moyenne	6,89	6,66	6,72	7,17	7,00	7,05	6,82	6,66	6,78	7,00	6,89	6,94
Ecart type	1,56	1,10	1,32	1,50	1,05	1,02	1,49	1,53	1,47	1,67	1,24	1,39
F (b)	0,54 (NS)			0,22 (NS)			0,65 (NS)			0,06 (NS)		
Classement (c)	1. 3. 2			1. 3. 2			1. 3. 2			1. 3. 2		
Nectar de goyave												
Note moyenne	7,83	5,61	7,50	7,39	6,39	6,83	7,50	6,72	7,28	7,72	6,61	6,94
Ecart type	1,86	1,80	1,07	1,95	2,11	1,26	1,83	1,97	1,48	1,79	1,77	1,35
F (b)	10,95 (++++)			1,62 (NS)			1,71 (NS)			2,61 (NS)		
Classement (c)	1. 3. 2			1. 3. 2			1. 3. 2			1. 3. 2		
Nectar de grenadille												
Note moyenne	7,52	4,28	7,33	7,59	4,24	7,38	6,86	7,00	7,14	7,57	5,05	7,38
Ecart type	1,79	1,64	1,21	1,76	1,85	1,21	1,88	1,95	1,21	1,50	2,08	1,00
F (b)	35,55 (++++)			31,99 (++++)			0,18 (NS)			18,59 (++++)		
Classement (c)	1. 3. 2			1. 3. 2			1. 3. 2			1. 3. 2		
Nectar de pomelo												
Note moyenne	8,15	4,20	8,05	8,00	3,85	7,85	7,60	7,45	7,50	7,80	4,15	7,60
Ecart type	0,91	1,72	1,02	1,00	1,27	0,79	1,24	0,86	0,92	1,17	1,52	1,16
F (b)	105,68 (++++)			181,65 (++++)			0,17 (NS)			85,06 (++++)		
Classement (c)	1. 3. 2			1. 3. 2			1. 3. 2			1. 3. 2		

(a) 1 = produit surgelé en sachets plastiques sans pasteurisation préalable

2 = produit pasteurisé et conditionné en bouteilles

3 = produit surgelé en sachets plastiques après une pasteurisation préalable

(b) La valeur minimale du risque pris pour une différence significative des moyennes dans leur ensemble est indiquée: + (5%); ++ (2,5%); +++ (1%), ++++ (0,1%). Une différence non significative au risque de 5% est notée: NS.

(c) Le classement des traitements est présenté dans l'ordre décroissant pour chaque caractéristique étudiée; les *ex aequo* (ne présentant pas de différence significative entre eux au seuil de 5%) sont soulignés conjointement.

DISCUSSION

Contrairement aux ananas et aux goyaves, les agrumes sont très riches en acides organiques (acide citrique en particulier) et en constituants volatils (terpènes et composés carbonylés principalement) qui contribuent avec leurs caractéristiques sucrées et leurs principes amers au goût et à l'arôme de ces produits [2]. Au cours de la pasteurisation et surtout du stockage du nectar de pomelo en bouteilles à la température ambiante, ces constituants volatils et ces acides organiques contenus dans la boisson doivent très certainement subir des modifications qui conduisent à l'altération significative de l'odeur, du goût et de l'arôme du pomelo [2, 7] et le rendent inconsommable.

Les grenadilles jaunes sont également riches en acides organiques et en constituants volatils [3] mais pas autant que les agrumes. Les variations significatives de l'odeur, du goût et de l'arôme du nectar de grenadille pasteurisé et conditionné en bouteilles seraient également imputables aux modifications des acides organiques et de certains constituants volatils de cette boisson au cours de la pasteurisation et du stockage à température ambiante. Toutefois, ces modifications ne rendent pas inconsommable le nectar de grenadille comme dans le cas du nectar de pomelo. Il est par ailleurs très probable que les réactions chimiques qui conduisent à de telles modifications soient inhibées par le froid dans le cas des nectars de grenadille et de pomelo surgelés en sachets de plastique après une pasteurisation préalable, car l'odeur, le goût et l'arôme de ces derniers ne présentent plus de différence significative avec ceux des nectars surgelés en sachets sans pasteurisation préalable.

Le jus d'ananas, les nectars de goyave, de grenadille et de pomelo surgelés en sachets de plastique après une pasteurisation préalable ne présentent aucune différence significative au seuil de 5% avec les mêmes boissons surgelées en sachets sans pasteurisation préalable, actuellement commercialisées au Cameroun, en ce qui concerne l'odeur, l'arôme, la couleur et le goût. Ces dernières boissons peuvent, sans inquiétude pour les consommateurs sur le plan organoleptique, être remplacées sur le marché par les mêmes produits conservés par surgélation après une pasteurisation préalable: ces traitements ont en outre l'avantage de conférer aux boissons des qualités microbiologiques irréprochables et conformes aux normes [10].

Le jus d'ananas, les nectars de goyave et de grenadille pasteurisés et conditionnés en bouteilles de verre peuvent également être commercialisés sans problèmes puisqu'ils ont été jugés consommables par les dégustateurs. Ils présentent également de très bonnes qualités microbiologiques [10] et ont l'avantage de ne pas nécessiter une chaîne de froid pour leur distribution.

CONCLUSION

La pasteurisation par actinisation semble être une méthode de traitement thermique de conservation qui n'affecte pas significativement les caractéristiques sensorielles (goût, couleur, arôme) du jus d'ananas et du nectar de goyave pasteurisés et conditionnés en bouteilles de verre. Par contre, l'odeur, le goût et l'arôme des nectars de grenadille et de pomelo pasteurisés et conservés en bouteilles à température ambiante sont significativement différents de ceux des mêmes boissons surgelées en sachets de plastique après ou sans pasteurisation préalable. Des modifications indésirables provoquées par des acides organiques et des composés volatils présents en quantités relativement importantes dans ces fruits surviennent probablement au cours du traitement thermique et du stockage des boissons: ces réactions seraient à l'origine de l'altération des qualités organoleptiques qui rend ainsi inconsommable le nectar de pomelo pasteurisé en bouteilles. Le froid aurait une

action inhibitrice sur ces modifications au cours du stockage puisque les caractéristiques sensorielles (odeur, couleur, goût et arôme) du jus d'ananas, des nectars de goyave, de grenadille et de pomelo surgelés en sachets de plastique et conservés à -18°C après ou sans pasteurisation préalable ne présentent entre elles aucune différence significative.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] Anonyme - Recueil des normes françaises des méthodes générales d'analyse des produits agro-alimentaires: chimie, microbiologie, analyse sensorielle. Association Française de Normalisation (AFNOR), 1ère ed., 1980.
- [2] BLUNDSTONE H.A.W., WOODMAN J.S., ADAMS J.B. - Canned citrus products in A.C. HULME (ed.), *The biochemistry of fruits and their products*, vol. 2, Academic Press (London, New York), 1971, 505-572.
- [3] CHAN H.T. - Passion-fruit in S. NAGY, P.E. SHAW (ed.), *Tropical and subtropical fruits: composition, properties and uses*, AVI publ. inc. (Westport), 1979, 300-315.
- [4] LARMOND E. - Methods for sensory evaluation of food. Ministère de l'Agriculture Publ. (Ottawa), 1970.
- [5] LELIEVELD H.L.M., HUGELSHOFER W., JEPSON P.C., LALANDE M., MOSTERT M.A., NASSAUER J., RINGSTROM R. - Pasteurisation continue des aliments liquides microbiologiquement sûre. *Ind. Alim. Agric.*, 1992, 3, 109-114.
- [6] PHILIPPOT E. - Fabrication et qualité des sirops et concentrés. *Bios.*, 1979, 12, 4-11.
- [7] POLLARD A., TIMBERLAKE C.F. - Fruit juices in A.C. HULME (ed.), *The biochemistry of fruits and their products*, vol. 2, Academic Press (London, New York), 1971, 373-621.
- [8] SAUVAGEOT F. - L'évaluation sensorielle des denrées alimentaires. Aspects méthodologiques. *Techn. Doc. Lavoisier (Paris) et C.D.I.U.P.A. (Massy)*, 1989.
- [9] TCHANGO-TCHANGO J., FOYET M. - Pasteurisation de quelques jus et nectars de fruits (jus d'ananas, nectars de goyave, de grenadille et de mangue). Rapport de recherche IRA, 1986.
- [10] TCHANGO-TCHANGO J., NJINE T., TAILLIEZ R. - Qualité microbiologique de jus et nectars de fruits exotiques. *Microbiol. Alim. Nutr.*, 1992, 10, 199-206.

3.2. Etude préliminaire sur la thermorésistance des souches de levures isolées

Afin de préciser si les levures étudiées résistent aux barèmes de pasteurisation des jus et des nectars de fruits actuellement appliqués, nous nous sommes intéressés dans cette partie du travail à l'étude de la thermorésistance de *Kloeckera apis* et de la souche présumée plus thermorésistante des deux espèces appartenant au genre *Candida*.

Une étude préliminaire a permis de déterminer les temps de réduction décimale (D_T) des deux espèces de *Candida* à 60°C dans chaque milieu de culture (tableau 25). Nous avons tenu compte de la phase de montée de température (de l'ordre de 1 min) et seule la partie linéaire de la courbe $\log N=f(t)$ a été utilisée, comme préconisée par TOLEDO (1994), pour la détermination de D_T . Dans le jus d'ananas commercial (pH 3,95), les valeurs de D_{60} sont respectivement de 3,20 min pour *Candida holmii* et 4,90 min pour *Candida pelliculosa*. Dans le nectar de goyave commercial (pH 3,15), elles sont de 2,16 min pour *C. holmii* et 3,62 min pour *C. pelliculosa*. Les temps de réduction décimale à 60°C dans le nectar de grenadille commercial (pH 3,03) et dans le tampon tartrate 0,01M (pH 2,65) sont respectivement de 2,31 min et 0,66 min pour *C. holmii*, 3,70 min et 1,81 min pour *C. pelliculosa*. Les courbes de survie de *Candida holmii* et *Candida pelliculosa* à 60°C sont présentées aux figures 84 et 85.

Pour un traitement thermique à 60°C dans ces différents milieux, l'espèce *Candida pelliculosa* semble être plus thermorésistante que *Candida holmii*. En outre, à 65°C, le nombre d'UFCml⁻¹ de *C. holmii* dans le jus d'ananas après un traitement de 5 min est inférieur à 10 alors que *C. pelliculosa* continue à résister aux traitements thermiques jusqu'à 75°C dans ce milieu (tableau 24).

Tableau 24: Destruction thermique de *Candida pelliculosa* et *Candida holmii* dans différents milieux à 60°C et 65°C.

		UFC/ml				
T (°C)	t (s)	jus d'ananas (pH 3,95)	Nectar de goyave (pH 3,15)	Nectar de grenadille (pH 3,03)	Tampon tartrate 0,01M (pH 2,65)	
<i>Candida holmii</i>	60	0	22500000	15100000	33000000	1110000
		60		2800000		17500
		120				1055
		300	470000			
		480		2950	15550	
		600		225	1195	
		720	3550		245	
	65	0	2300000	15300000	32500000	1120000
		300	<10	<10	<10	0
<i>Candida pelliculosa</i>	60	0	83500000	31000000	76000000	340000
		300	3300000		3300000	2300
		480	690000	36500	271000	150
		720	157500	3600	13400	
		960		450		
		1200	5900	105	400	
		65	0	92000000	26500000	35000000
	60				75500	
	300	2750000	56000	750000	<10	
	480	345000	9550	59000		
	720	17450	350	3100		
	960	6850				

Tableau 25: Valeurs de D_{60} dans différents milieux des espèces de levures, *Candida pelliculosa* et *Candida holmii* isolées des jus et nectars de fruits exotiques (t représente le temps de traitement thermique en secondes).

Souches de levure	Milieux d'étude	T°C	Equation de destruction thermique	r^2	DDL ⁽¹⁾	Ecart type	D_{60} (min.)	P ⁽²⁾ (%)
<i>Candida holmii</i>	Jus d'ananas (pH 3.95)	60	$\log N = -0,0052t + 7,3102$	0,9996	2	0,0001	3,20	0,02
	Nectar de goyave (pH 3.15)	60	$\log N = -0,0077t + 7,0640$	0,9966	2	0,0003	2,16	0,11
	Nectar de grenadille (pH 3.03)	60	$\log N = -0,0072t + 7,5335$	0,9978	2	0,0002	2,31	0,07
	Tampon tartrate (pH 2.65)	60	$\log N = -0,0252t + 5,9482$	0,9878	1	0,0028	0,66	7,14
<i>Candida pelliculosa</i>	Jus d'ananas (pH 3.95)	60	$\log N = -0,0034t + 7,6706$	0,9840	3	0,0002	4,90	0,06
	Nectar de goyave (pH 3.15)	60	$\log N = -0,0046t + 7,1376$	0,9729	3	0,0004	3,62	0,13
	Nectar de grenadille (pH 3.03)	60	$\log N = -0,0045t + 7,7372$	0,9842	3	0,0003	3,70	0,05
	Tampon tartrate (pH 2.65)	60	$\log N = -0,0092t + 6,4219$	0,9871	1	0,0011	1,81	7,34

(1) Degré de liberté = nombre d'observation-2.

(2) Probabilité pour que l'équation obtenue par régression linéaire ne soit pas vérifiée.

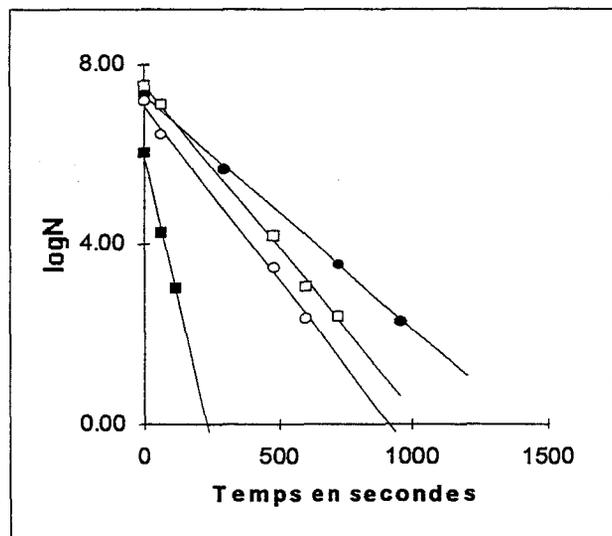


Figure 84: Courbes de survie de *Candida holmii* à 60°C dans le jus d'ananas pH 3,95 (●), le nectar de goyave pH 3,15 (○), le nectar de grenadille pH 3,03 (□) et le tampon tartrate 0,01M pH 2,65 (■).

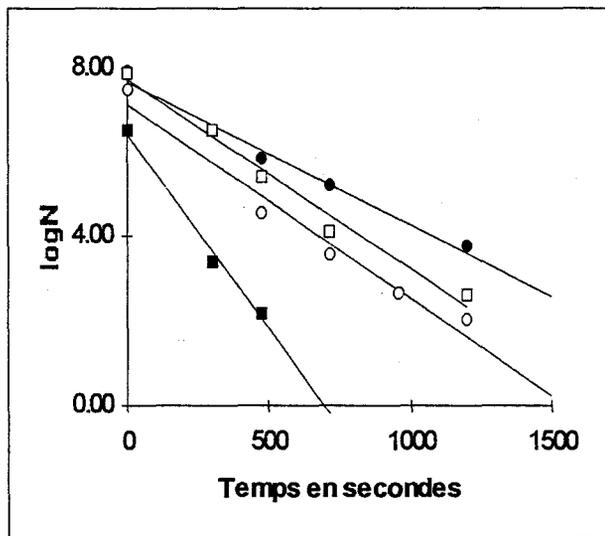


Figure 85: Courbes de survie de *Candida pelliculosa* à 60°C dans le jus d'ananas pH 3,95 (●), le nectar de goyave pH 3,15 (○), le nectar de grenadille pH 3,03 (□) et le tampon tartrate 0,01M pH 2,65 (■).

Pour la suite de l'étude, des tests de thermorésistance seront réalisés à différentes températures uniquement pour *Kloeckera apis* et *Candida pelliculosa* dans le jus d'ananas, le nectar de goyave et le nectar de grenadille commerciaux.

3.3. Thermorésistance de *Candida pelliculosa* et de *Kloeckera apis*

Elle a été étudiée respectivement dans le jus d'ananas commercial (pH 3,95), le nectar de goyave commercial (pH 3,15) et le nectar de grenadille (pH 3,03) aux températures comprises entre 55°C et 75°C, et dans le tampon tartrate 0,01M (pH 2,65) à 60°C. Les résultats obtenus (tableau 26) révèlent qu'il faut, à 75°C dans le jus d'ananas et le nectar de grenadille, respectivement 1,50 min et 1,03 min pour réduire de 90% une population initiale de *Candida pelliculosa* contenue dans ces milieux. Les courbes de survie de ces deux levures aux températures testées sont présentées respectivement aux figures 86, 87 et 88 pour *Kloeckera apis*, et 89, 90 et 91 pour *Candida pelliculosa*. A 75°C, *Candida pelliculosa* est très rapidement détruite dans le nectar de goyave (N<10 après 2 min de traitement) de telle sorte qu'il nous a été pratiquement impossible d'en réaliser des dénombrements après le traitement thermique (tableau 27). Il en est de même pour ces deux souches de levure à 65°C dans le tampon tartrate et pour *Kloeckera apis* dans les autres milieux (tableau 27).

Tableau 26: Valeurs de D_T de *Candida pelliculosa* et *Kloeckera apis* dans le jus d'ananas commercial (pH 3,95), le nectar de grenadille commercial (pH 3,03), le nectar de goyave commercial (pH 3,15) et le tampon tartrate 0,01 M (pH 2,65) (t représente le temps de traitement thermique en secondes).

Souches de levure	Milieux d'étude	T°C	Equation de destruction thermique	r^2	DDL ⁽¹⁾	Ecart type	D_T (min.)	P ⁽²⁾ (%)
<i>Candida pelliculosa</i>	Jus d'ananas (pH 3,95)	60	$\log N = -0,0034t + 7,6706$	0,98	3	0,0002	4,90	0,06
		65	$\log N = -0,0052t + 7,9790$	0,9997	2	0,0001	3,20	0,02
		70	$\log N = -0,0054t + 7,3359$	0,99	2	0,0003	3,09	0,15
		75	$\log N = -0,0111t + 7,6816$	0,99	2	0,0007	1,50	0,25
	Nectar de grenadille (pH 3,03)	60	$\log N = -0,0045t + 7,7372$	0,98	3	0,0003	3,70	0,05
		65	$\log N = -0,0054t + 7,4801$	0,998	3	0,0002	3,09	0,00
		70	$\log N = -0,0074t + 7,3180$	0,98	2	0,0008	2,25	0,90
		75	$\log N = -0,0161t + 7,7396$	0,99	1	0,0016	1,03	6,31
	Nectar de goyave (pH 3,15)	60	$\log N = -0,0046t + 7,1376$	0,97	3	0,0004	3,62	0,13
		65	$\log N = -0,0067t + 7,1230$	0,98	2	0,0007	2,49	0,80
		70	$\log N = -0,0089t + 6,9917$	0,94	3	0,0013	1,87	0,56
	Tampon tartrate (pH 2,65)	60	$\log N = -0,0092t + 6,4219$	0,99	1	0,0011	1,81	7,34
	<i>Kloeckera apis</i>	Jus d'ananas (pH 3,95)	55	$\log N = -0,0067t + 7,3985$	0,99	3	0,0003	2,49
58			$\log N = -0,0087t + 7,8269$	0,99	2	0,0005	1,91	0,19
60			$\log N = -0,0114t + 7,9727$	0,999	1	0,0002	1,46	1,54
Nectar de goyave (pH 3,15)		55	$\log N = -0,0071t + 7,3277$	0,997	3	0,0002	2,35	0,01
		58	$\log N = -0,0093t + 7,3635$	0,9999	2	0,0001	1,79	1,05
		60	$\log N = -0,0118t + 7,3302$	0,99	1	0,0010	1,41	5,18
Nectar de grenadille (pH 3,03)		55	$\log N = -0,0070t + 7,5006$	0,996	3	0,0003	2,38	0,01
		58	$\log N = -0,0088t + 7,3832$	0,997	2	0,0004	1,89	0,10
		60	$\log N = -0,0104t + 7,4863$	0,999	1	0,0002	1,60	1,57
Tampon tartrate (pH 2,65)		60	$\log N = -0,0354t + 6,1973$	0,95	1	0,0080	0,47	14,79

(1) Degré de liberté = nombre d'observation-2.

(2) Probabilité pour que l'équation obtenue par régression linéaire ne soit pas vérifiée.

Tableau 27: Destruction thermique de *Candida pelliculosa* et *Kloeckera apis* dans différents milieux à différentes températures.

		UFC/ml					
T (°C)	t (s)	jus d'ananas (pH 3,95)	Nectar de goyave (pH 3,15)	Nectar de grenadille (pH 3,03)	Tampon tartrate 0,01M (pH 2,65)		
<i>Kloeckera apis</i>	55	0	32000000	24500000	42500000		
		120	3550000	3650000	9850000		
		300	35500	197000	3900000		
		480		1015			
		600	3300		2950		
		720	350		250		
		58	0	56500000	22500000	21000000	
		120	5050000				
		300	297500	39500			
		480		740	1015		
		600	290		125		
		60	0	88500000	27000000	33000000	835000
			60				840
			90				755
			120	4400000	555000	815000	
		300	33500	7150	23000		
	65	0	36000000	33500000	31000000	850000	
		120	<10	<10	<10	0	
<i>Candida pelliculosa</i>	70	0	27500000	31000000	34500000		
		120	3900000	3050000			
		300		26000	92000		
		480	41500	730	21125		
		720	2300		210		
		75	0	77000000	27500000	80000000	
			120	1160000	3050000		
			300	25000	<10	1025	
			480	266			

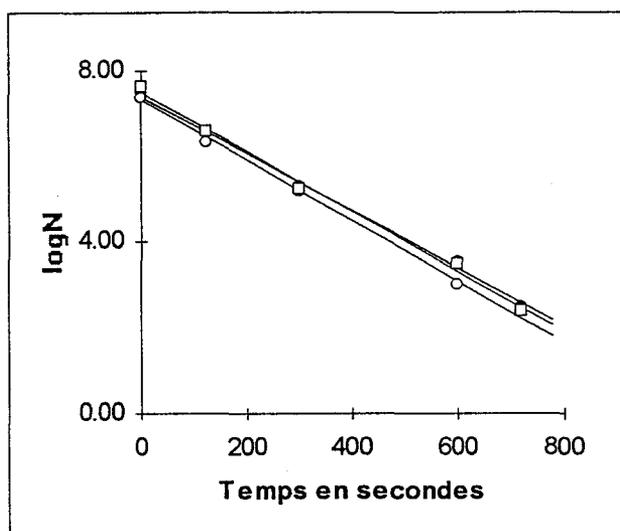


Figure 86: Courbes de survie de *Kloeckera apis* à 55°C dans le jus d'ananas pH 3,95 (●), le nectar de goyave pH 3,15 (○) et le nectar de grenadille pH 3,03 (□).

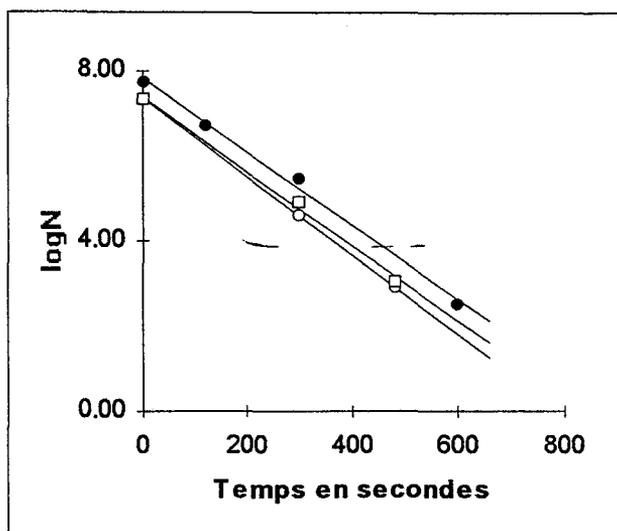


Figure 87: Courbes de survie de *Kloeckera apis* à 58°C dans le jus d'ananas pH 3,95 (●), le nectar de goyave pH 3,15 (○) et le nectar de grenadille pH 3,03 (□).

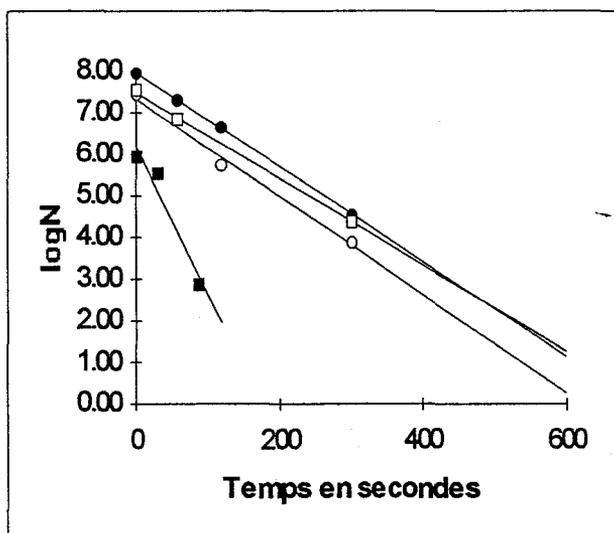


Figure 88: Courbes de survie de *Kloeckera apis* à 60°C dans le jus d'ananas pH 3,95 (●), le nectar de goyave pH 3,15 (○), le nectar de grenadille pH 3,03 (□) et le tampon tartrate 0,01M pH 2,65 (■).

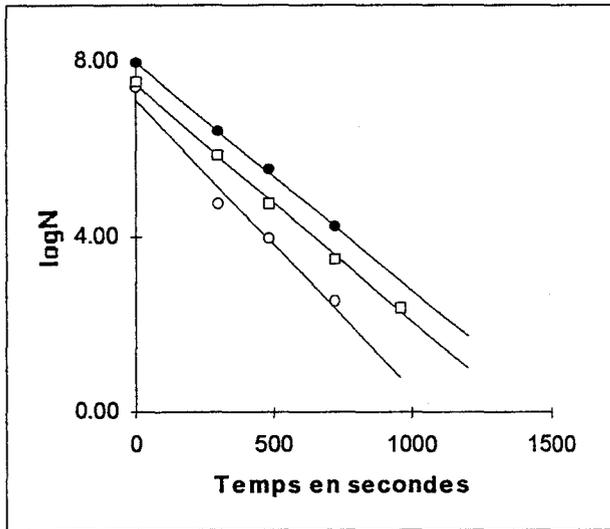


Figure 89: Courbes de survie de *Candida pelliculosa* à 65°C dans le jus d'ananas pH 3,95 (●), le nectar de goyave pH 3,15 (○) et le nectar de grenadille pH 3,03 (□).

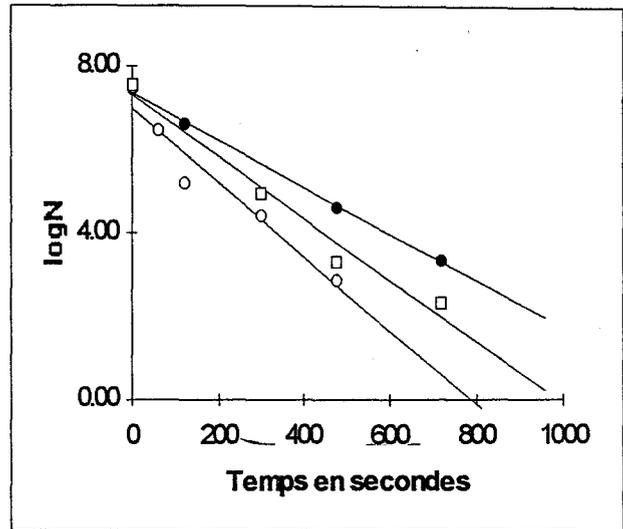


Figure 90: Courbes de survie de *Candida pelliculosa* à 70°C dans le jus d'ananas pH 3,95 (●), le nectar de goyave pH 3,15 (○) et le nectar de grenadille pH 3,03 (□).

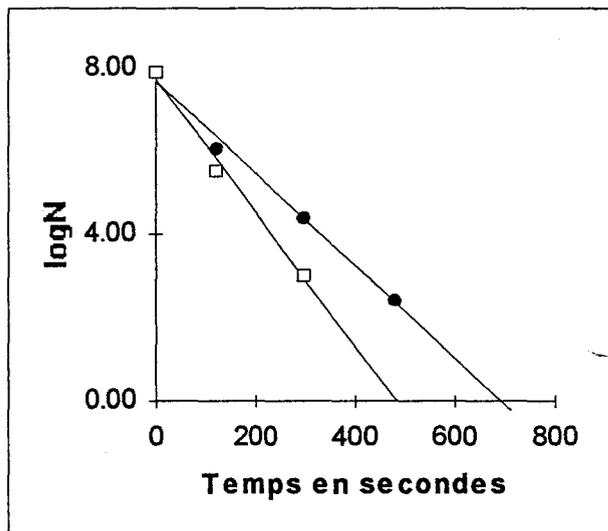


Figure 91: Courbes de survie de *Candida pelliculosa* à 75°C dans le jus d'ananas pH 3,95 (●) et le nectar de grenadille pH 3,03 (□).

L'écart de température z nécessaire pour réduire D_T de 90%, a été déterminé entre 60°C et 75°C pour *Candida pelliculosa* dans le jus d'ananas et le nectar de grenadille, et entre 60°C et 70°C dans le nectar de goyave: il est de 27,70°C, 31,75°C et 34,84°C respectivement dans le nectar de grenadille, le jus d'ananas et le nectar de goyave. Quant à *Kloeckera apis*, les valeurs de z déterminées entre 55°C et 60°C sont de 21,88°C dans le jus d'ananas, 22,73°C dans le nectar de goyave et 29,07°C dans le nectar de grenadille. Les droites de relation température-temps (résistance thermique) obtenues par régression linéaire simple pour *Candida pelliculosa* et *Kloeckera apis* dans le jus d'ananas, les nectars de goyave et de grenadille sont illustrées par les figures 92 et 93.

Les équations de ces droites sont les suivantes:

a) Dans le jus d'ananas

*Pour *Candida pelliculosa*

$\log D = -0,0315T + 2,5852$, soit $z = 31,75^\circ\text{C}$, avec

$r^2=0,91$, ddl= 2, écart-type (ET)=0,0069 et $p=4,27\%$ (probabilité pour que l'équation ne soit pas vérifiée). D_T représente le temps de réduction décimale et T la température de traitement (°C).

*Pour *Kloeckera apis*

$\log D = -0,0457T + 2,9178$, soit $z = 21,88^\circ\text{C}$, avec

$r^2=0,97$, ddl=1, ET=0,0054 et $p=7,66\%$.

b) Dans le nectar de goyave

* Pour *Candida pelliculosa*

$\log D = -0,0287T + 2,2760$, soit $z = 34,84^\circ\text{C}$, avec

$r^2=0,998$, ddl=1, ET=0,0014 et $p=3,05\%$.

* Pour *Kloeckera apis*

$\log D = -0,0440T + 2,7944$, soit $z = 22,73^\circ\text{C}$, avec

$r^2=0,99$, ddl=1, ET=0,0034 et $p=4,85\%$.

c) Dans le nectar de grenadille

* Pour *Candida pelliculosa*

$\log D = -0,0361T + 2,7912$, soit $z = 27,70^{\circ}\text{C}$, avec

$r^2=0,90$, $ddl=2$, $ET=0,0085$ et $P=4,88\%$.

* Pour *Kloeckera apis*

$\log D = -0,0344T + 2,2701$, soit $z = 29,07^{\circ}\text{C}$, avec

$r^2=0,999$, $ddl=1$, $ET=0,0008$ et $p=1,58\%$.

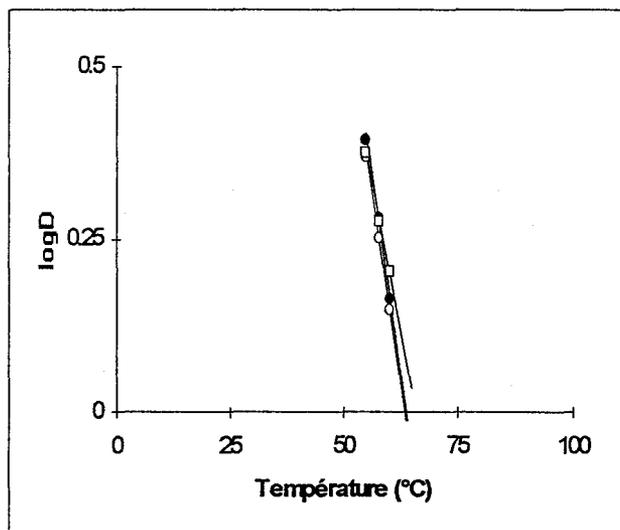


Figure 92: Courbes de relation températures-temps de *Kloeckera apis* dans le jus d'ananas pH 3,95 (●), le nectar de goyave pH 3,15 (○), le nectar de grenadille pH 3,03 (□).

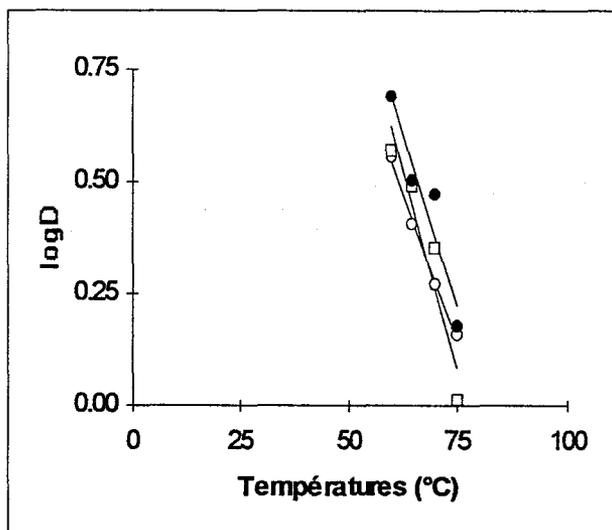


Figure 93: Courbes de relation températures-temps de *Candida pelliculosa* dans le jus d'ananas pH 3,95 (●), le nectar de goyave pH 3,15 (○), le nectar de grenadille pH 3,03 (□).

3.4. Valeurs pasteurisatrices

La pasteurisation des jus de fruits au niveau artisanal au Cameroun s'effectue généralement en bocaux dans un bain-marie entre 60°C et 75°C , les producteurs n'ayant pas en effet de moyens financiers pour se doter d'un appareil moderne de pasteurisation. Etant donné que *Candida pelliculosa* semble être la souche la plus thermorésistante des trois espèces de levures isolées des jus et nectars de fruits exotiques étudiés, nous avons calculé les valeurs pasteurisatrices minimales à appliquer pour détruire cette levure dans le jus d'ananas et dans les nectars de goyave et de grenadille. Nous avons ainsi considéré 4 températures pour le calcul:

60°C, 65°C, 70°C et 75°C. Le tableau 28 présente les valeurs pasteurisatrices minimales à appliquer à 60°C, 65°C, 70°C et 75°C dans le jus d'ananas, le nectar de goyave et le nectar de grenadille pour réduire de 10^9 fois ($N_0/N=10^9$) une population initiale de *Candida pelliculosa* contenue dans ces boissons.

Tableau 28: Valeurs pasteurisatrices minimales $P^z_{Tréf}$ déterminées dans le jus d'ananas, le nectar de goyave et le nectar de grenadille, à appliquer à 60°C, 65°C, 70°C et 75°C.

Milieu de culture	N_0	N	$\log(N_0/N)$	$D_{60}(\text{réf.})$ min	P^z_{60} min	D_{65} min	P^z_{65} min	D_{70} min	P^z_{70} min	D_{75} min	P^z_{75} min	z (°C)
Jus d'ananas commercial (pH 3,95)	10^7	10^{-2}	9	4,90	44,10	3,20	28,80	3,09	27,81	1,50	13,5	31,75
Nectar de goyave commercial (pH 3,15)	10^7	10^{-2}	9	3,62	32,58	2,49	22,41	1,87	16,83	nd ⁽¹⁾	nd	34,84
Nectar de grenadille commercial (pH 3,03)	10^7	10^{-2}	9	3,70	33,30	3,09	27,81	2,25	20,25	1,03	9,27	27,70

(1) Non déterminé.

L'équation $P^z_{Tréf} = t \cdot 10^{(T-Tréf.) / z}$ (T et Tréf. étant respectivement la température de traitement donnée et la température de référence choisie) permet de calculer, d'après une valeur pasteurisatrice donnée prise comme référence, la durée de traitement thermique t équivalent à toute autre température pour obtenir le même résultat.

En considérant 70°C comme température de référence pour la pasteurisation des jus et nectars de fruits, les durées de traitement thermique nécessaires à 80°C et 94°C, températures de désaération et de flash-pasteurisation couramment utilisées au niveau industriel pour les jus et nectars de fruits, sont respectivement de 13,47 min et 4,88 min pour le jus d'ananas, 8,69 min et 3,44 min pour le nectar de goyave, 8,82 min et 2,75 min pour le nectar de grenadille. Par contre si on prend 75°C

comme température de référence, les durées de traitement thermique nécessaires à 80°C et 94°C seront respectivement 9,39 min et 3,40 min dans le jus d'ananas, 5,94 min et 1,91 min dans le nectar de grenadille (tableau 29).

Tableau 29: Temps équivalent à 80°C et à 94°C pour la pasteurisation du jus d'ananas, du nectar de goyave et du nectar de grenadille en considérant 70°C et 75°C respectivement comme température de référence pour la pasteurisation de ces boissons, et une efficacité de pasteurisation ($\log N_0/N$) de 9 pour *Candida pelliculosa*.

Type de boisson	Températures de référence	
	70°C	75°C
Jus d'ananas	13,47 min (80°C)	9,39 min (80°C)
	4,88 min (94°C)	3,40 min (94°C)
Nectar de goyave	8,69 min (80°C)	nd (1)
	3,44 min (94°C)	
Nectar de grenadille	8,82 min (80°C)	5,94 min (80°C)
	2,75 min (94°C)	1,91 min (94°C)

3.5. Discussion

Il est connu que les ascospores des moisissures du genre *Byssochlamys* parfois présentes dans les jus de fruits sont résistantes aux barèmes de pasteurisation de ces boissons (MURDOCK et HATCHER, 1978). Il est donc

nécessaire de rechercher les bactéries, les levures et les moisissures thermorésistantes dans les jus et nectars de fruits. A l'exception de quelques moisissures thermorésistantes telles que *Botrytis cinera*, *Byssochlamys sp.*, *Byssochlamys fulva* et *Penicillium sclerotia* (SPLITTSTOESSER et coll., 1975, SAPI, 1978; BEUCHAT et RICE 1979; SPLITTSTOESSER, 1976 et 1982, LEUNG et coll., 1982), des bactéries thermorésistantes telles que *Bacillus sp.*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus mesenteroides*, *Lactobacillus fructivorans*, *Leuconostoc mesenteroides* (MURDOCK et coll., 1953; SPLITTSTOESSER et coll., 1975; JUVEN, 1976; JUVEN et coll., 1978; LEUNG et coll., 1982, SPLITTSTOESSER, 1982), ainsi que quelques levures thermorésistantes telles que *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces bayanus*, *Saccharomyces bailii* et *Saccharomyces ludwigii* (MEYRATH, 1962; HANSEN et RIEMAN, 1963; GIBSON, 1973; STUMBO, 1973; KOPELMAN et SCHYER, 1976; DEVEZE et RIBEREAU-GAYON, 1977; LEUNG et coll., 1982; SPLITTSTOESSER, 1982; SPLITTSTOESSER et coll., 1975 et 1986; BARILLERE et coll., 1985; SWANSON et coll., 1985; CONDON et coll., 1989; TRUONG-MEYER et coll., 1994), peu d'informations relatives à la thermorésistance des micro-organismes dans les jus et nectars de fruits ainsi que dans les vins sont disponibles.

Les valeurs de D_T obtenues au cours de cette étude sont plus élevées dans le jus d'ananas commercial (pH 3,95) que dans le nectar de goyave commercial (pH 3,15), le nectar de grenadille commercial (pH 3,03) et le tampon tartrate 0,01M (PH 2,65). Ceci confirme les faits selon lesquels la thermorésistance des micro-organismes est en général faible dans un milieu plus acide que dans un milieu moins acide (HANSEN et RIEMAN, 1963; STUMBO, 1973). Ces valeurs de D_T sont plus élevées que celles obtenues par AREF et CRUESS (1934) cités par COURTOISIER (1984) qui ont trouvé un D_{60} de 0,3 min pour *Saccharomyces cerevisiae* dans le jus de raisin, et celles reportées par TOLEDO (1994) dans une synthèse bibliographique sur la thermorésistance des micro-organismes d'altération

des aliments, avec un $D_{82,2}$ de 0,0095 min pour les levures et les moisissures. Elles sont toutefois inférieures aux valeurs de D_{60} trouvées dans les viandes de boeuf et de poulet qui varient de 5,02 min à 8,32 min pour *Listeria monocytogenes* (GAZE et coll., 1989). En outre, BOYLE et coll. (1990) ont trouvé pour *Listeria monocytogenes* dans un tampon phosphate (pH 7,2), des valeurs de D_T de 2,5 min ($r^2=0,82$), 0,75 min ($r^2=0,89$) et 0,23 min ($r^2=0,92$) respectivement pour D_{60} , D_{65} et D_{70} . Toutefois, LINTON et coll. (1992) ont obtenu des valeurs de D_{55} relativement plus élevées que celles obtenues dans cette étude, variant de 18,7 min à 26,4 min pour des cellules de *Listeria monocytogenes* Scott A soumises à un préchauffage de 48°C pendant 10 min, contre 8,89 min à 12,0 min pour les mêmes cellules non préchauffées avant le test de thermorésistance.

Les valeurs de z obtenues au cours de notre étude, 31,75°C, 27,70°C et 34,84°C déterminées pour *Candida pelliculosa* respectivement entre 60°C et 75°C dans le jus d'ananas et le nectar de grenadille, et entre 60°C et 70°C dans le nectar de goyave sont largement supérieures à celles trouvées par de nombreux auteurs. Il en est de même des valeurs de z obtenues pour *Kloeckera apis* qui sont de 21,88°C dans le jus d'ananas, 22,73°C dans le nectar de goyave et 29,07°C dans le nectar de grenadille. LEUNG et coll. (1982) ont en effet trouvé des valeurs de z de 7,68±0,14°C, 5,6±0,09°C, 5,62±0,51°C et 5,44±0,01°C respectivement pour *Lactobacillus mesenteroides*, *Saccharomyces cerevisiae*, une levure pigmentée (pigment marron) et une levure non pigmentée toutes deux non identifiées. Leurs valeurs de z sont comparables à celles obtenues pour *Byssochlamys falva asci* ($z=5,7^\circ\text{C}$) dans un tampon à pH 3,0, et pour *Penicillium sclerotia* ($z=4,8^\circ\text{C}$) dans un jus dilué de baie bleue (MEYRATH, 1962). Toutefois, nos valeurs de z se rapprochent de celles de GIBSON (1973) qui a étudié l'effet des concentrations élevées en sucre sur la thermorésistance des formes végétatives de micro-organismes. Il a en effet trouvé, en fonction des valeurs de l'activité de l'eau (a_w) comprises entre 0,85 et 0,995, des valeurs de z de 14,49°C ($a_w=0,98$) à 31,67°C

($a_w=0,85$) pour *Salmonella typhimurium*, et de 10,87°C ($a_w=0,98$) à 19,70°C ($a_w=0,85$) pour *Salmonella senftenberg*. Il est donc possible, dans des solutions sucrées et visqueuses ayant une activité de l'eau élevée telles que les jus et nectars de fruits, d'obtenir des valeurs très élevées de z. Il a été également démontré que la composition du milieu d'étude avait une influence importante sur la thermorésistance des micro-organismes (MARSHALL et WALKEY, 1952; BEUCHAT, 1981; STECCHINI et BEUCHAT, 1985; SPLITTSTOESSER et coll., 1986; WATIER et coll., 1995). La présence de l'huile dans le milieu aurait également un effet protecteur pour les micro-organismes contre les traitements thermiques (GAZE, 1985). En outre, la thermorésistance des germes microbiens peut être différemment affectée par la présence dans le milieu de sels minéraux (STUMBO, 1973), de cations et d'ions phosphates (SUGIYAMA, 1951; AMAHA et ORDAL, 1957); la présence d'antiseptiques (éthanol et SO₂ par exemple) dans le milieu fait baisser la thermorésistance des micro-organismes (DEVEZE et RIBEREAU-GAYON, 1977; BARILLERE et coll., 1985; SPLITTSTOESSER et coll., 1975 et 1986).

Les valeurs élevées des paramètres de thermorésistance de *Candida pelliculosa* et de *Kloeckera apis* obtenues au cours de cette étude pourraient également trouver une explication dans le fait que les milieux d'étude, après inoculation, ont été préchauffés à 45°C pendant environ 10 min immédiatement avant les tests de thermorésistance. Il a en effet été démontré, particulièrement pour *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium* et *Salmonella thompson* que ce léger préchauffage préalable augmente très significativement la résistance des micro-organismes à la chaleur (MACKEY et DERRICK, 1982, 1986, 1987a et 1987b; BUNNING et coll., 1990; FARBER et BROWN, 1990; QUINTAVALLA et CAMPANINI, 1991; LINTON et coll., 1992).

Les valeurs pasteurisatrices de 44,10 min, 28,80 min, 27,81 min et 13,50 min ont été obtenues dans le jus d'ananas commercial (pH 3,95) respectivement à 60°C, 65°C, 70°C et 75°C. Elles sont de 33,30 min, 27,81 min, 20,25 min et 9,27 min

dans le nectar de grenadille commercial (pH 3,03) respectivement aux mêmes températures, et de 32,58 min, 22,41 min et 16,83 min dans le nectar de goyave commercial (pH 3,15) respectivement à 60°C, 65°C et 70°C.

En considérant 75°C comme température de référence pour la pasteurisation de jus et nectars de fruits exotiques (température de pasteurisation la plus utilisée au niveau des ménages et au niveau artisanal au Cameroun), les durées de traitement thermique nécessaires à 80°C et à 94°C sont respectivement de 9,39 min et 3,40 min dans le jus d'ananas, 5,94 min et 1,91 min dans le nectar de grenadille. Ces durées sont de respectivement de 8,69 min et 3,44 min à 80°C et 94°C dans le nectar de goyave lorsqu'on considère 60°C ou 70°C comme température de référence. TOLEDO (1994) propose d'utiliser 82,2°C et 121,1°C comme températures de référence pour le calcul des temps de traitement à température constante respectivement pour la pasteurisation et la stérilisation des denrées alimentaires.

La désaération des jus et nectars de fruits au niveau industriel s'effectue au Cameroun généralement sous vide à 80°C pendant environ 10 min, suivie immédiatement de la pasteurisation à 92°C (nectar de grenadille) ou à 94°C (jus d'ananas, nectars de goyave et de pomélo) pendant 10 s à 1 min. Sur la base des calculs des valeurs pasteurisatrices effectués, *Candida pelliculosa*, levure la plus thermorésistante des trois espèces de levures isolées de nos produits, serait complètement détruite pendant l'opération de désaération. Il est donc très probable que toutes les levures retrouvées dans les jus et nectars de fruits commerciaux pasteurisés et conditionnés en sachets "doypack" (*Candida pelliculosa*, *Candida holmii* et *Kloeckera apis*) proviennent d'une recontamination des produits après la pasteurisation. Cette recontamination pourrait provenir aussi bien du personnel au moment du conditionnement, de l'air ambiant que des sachets d'emballage qui ne sont pas stérilisés au préalable avant utilisation. LILIEVELD et coll. (1992) ont en effet montré qu'il pouvait avoir risque de recontamination d'un produit pasteurisé par

un produit non encore pasteurisé ou par du matériel de conditionnement du produit pasteurisé. Le moyen utilisé pour le refroidissement de l'aliment pasteurisé peut également être une source de recontamination.

CONCLUSION GENERALE

CONCLUSION GENERALE

Les résultats de cette étude révèlent que les jus et nectars de fruits produits en laboratoire, en l'occurrence le jus d'ananas, les nectars de goyave, de grenadille et de pomélo surgelés en sachets plastiques sans pasteurisation préalable, hébergent de nombreux micro-organismes d'altération dont les levures (*Candida guilliermondii* et *Saccharomyces cerevisiae* en particulier), les Staphylocoques non pathogènes et autres bactéries appartenant aux genres *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Leuconostoc*, *Micrococcus*, *Pediococcus* et *Acinetobacter*. Le jus d'ananas plus riche en sucres fermentescibles et éventuellement en facteurs de croissance, et ayant un pH relativement plus élevé (pouvant atteindre 5,50 et plus), héberge en plus des coliformes thermotolérants (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter agglomerans* et *Serratia rubidaea*). Ces germes microbiens proviendraient de l'eau de fabrication, du personnel, des matériels de fabrication, de l'air ambiant et des murs intérieurs de l'atelier de fabrication.

La présence des germes témoins de contamination fécale dans le jus d'ananas surgelé en sachets plastiques sans pasteurisation préalable déprécie considérablement sa qualité hygiénique et le rend impropre à la consommation.

Des entérobactéries thermotolérantes n'ont pas été mises en évidence dans les nectars de goyave, de grenadille et de pomélo surgelés en sachets plastiques sans pasteurisation préalable. Leur consommation semble ne pas présenter de risques sanitaires pour les consommateurs. Toutefois, les germes d'altération présents dans ces boissons pourraient déprécier considérablement leur qualité marchande et les rendre inconsommables si elles étaient placées dans des conditions de températures ambiantes ou soumises à un stockage prolongé à basse température.

La pasteurisation des ces boissons par actinisation à 92°C (nectar de grenadille) ou à 94°C (jus d'ananas, nectars de goyave et de pomélo) pendant 10 s après une désaération à 80°C pendant environ 10 min améliore nettement leur qualité microbiologique. Elle n'affecte en outre de façon significative ni la couleur,

ni l'arôme, ni le goût de certaines d'entre elles. Le nectar de pomélo conditionné en bouteilles après pasteurisation acquiert cependant un goût piquant et aigre pour devenir pratiquement inconsommable. Il est donc évident que la pasteurisation doit systématiquement être appliquée aux boissons conservées par surgélation à proposer dans le commerce.

L'étude des effets combinés des températures de stockage (2°C à 37°C) et des variations de pH (2,00 à 6,25) sur la croissance de *Candida pelliculosa*, *Candida holmii* et *Kloeckera apis*, levures d'altération isolées du jus d'ananas (pH 3,95), du nectar de goyave (pH 3,15) et du nectar de grenadille (pH 3,03) produits en industrie, a permis de développer par régression linéaire multiple, des modèles mathématiques multifactoriels de croissance de ces micro-organismes dans le nectar de goyave et le jus d'ananas. Certains de ces modèles se valident aussi bien entre ces différentes souches que dans les autres jus et nectars de fruits (grenadille, pomélo, orange, pomme, raisin).

Aux températures favorables de croissance de la plupart de levures (25° à 32°C), le taux maximal de croissance le plus faible s'observe à 25°C (0,038 h⁻¹), à 25°C (0,024 h⁻¹) et à 32°C (0,007 h⁻¹) respectivement pour *Candida pelliculosa*, *Candida homii* et *Kloeckera apis* dans le nectar de goyave commercial. Les valeurs les plus élevées du taux maximal de croissance ont été obtenues à 32°C pour *C. pelliculosa* (0,076 h⁻¹, 0,075 h⁻¹ et 0,079 h⁻¹ respectivement dans le jus d'ananas, les nectars de goyave et de grenadille), à 25°C et 32°C pour *C. holmii* (0,190 h⁻¹ et 0,185 h⁻¹ respectivement à 25°C dans le jus d'ananas et le nectar de grenadille, et 0,060 h⁻¹ à 32°C dans le nectar de goyave).

résultats confirment les faits observés en industrie, notamment pour le jus d'ananas qui est considéré comme une boisson très délicate et très sensible aux altérations microbiennes, et qui par conséquent pose le plus de problèmes de conservation aux producteurs.

Candida pelliculosa semble être le micro-organisme le plus thermorésistant des trois espèces de levures étudiées. Les valeurs de z déterminées entre 60°C et 75°C pour *C. pelliculosa* sont de 31,75°C ($r^2=0,91$) dans le jus d'ananas et 27,70°C ($r^2=0,90$) dans le nectar de grenadille. Cette valeur de z déterminées entre 60°C et 70°C est de 34,84°C ($r^2=0,998$) dans le nectar de goyave. Ces valeurs de z déterminées entre 55°C et 60°C pour *Kloeckera apis* sont de 21,88°C ($r^2=0,97$) dans le jus d'ananas, 22,73°C ($r^2=0,99$) dans le nectar de goyave et 29,07°C ($r^2=0,999$) dans le nectar de grenadille.

En considérant 75°C comme température de référence pour la pasteurisation de ces boissons, et une efficacité de pasteurisation ($\log N_0/N$) de 9, les durées de traitement thermique nécessaires à 80°C et 94°C, températures de désaération et de flash pasteurisation au niveau industriel, sont respectivement de 9,39 min et 3,40 min dans le jus d'ananas, 5,94 min et 1,91 min dans le nectar de grenadille. Ces durées sont de 8,69 min et 3,44 min dans le nectar de goyave lorsqu'on considère 70°C comme références. Ceci permet de penser que les levures d'altération (*Candida pelliculosa*, *Candida holmii* et *Kloeckera apis*) retrouvées dans ces jus et nectars de fruits exotiques proviendraient d'une recontamination des produits après pasteurisation. Il serait donc impératif pour les industries qui ont à faire face aux problèmes de fermentations microbiennes de leurs jus et nectars de fruits au cours du stockage et de la commercialisation, comme c'est le cas de la Société Agro-Industrielle des Fruits de l'Ouest (SAIFO) au Cameroun, de suivre la ligne de conduite ci-dessous pour limiter les pertes de rendements et de qualité marchande de leurs produits:

- Stocker les sachets d'emballage dans une enceinte propre et régulièrement désinfectée, et éventuellement les stériliser avant utilisation (opération assez difficile dans la pratique compte tenu de la nature des sachets qui sont très délicats à manutentionner). Dans ce dernier cas, une analyse microbiologique préalable des sachets vides serait nécessaire.

- Respecter scrupuleusement les barèmes de désaération et de pasteurisation et s'assurer que les boissons sont conditionnées à chaud aux environs de 75°C.

- Observer les mesures strictes de propreté, d'hygiène, de salubrité et d'aseptie dans le périmètre réservé au conditionnement.

- N'envoyer les sachets de produits conditionnés dans le circuit de refroidissement qu'après environ 10 à 15 min après le conditionnement. Ce petit temps, même s'il contribue à altérer légèrement certaines qualités sensorielles des boissons, permettrait au jus chaud en provenance du pasteurisateur, de détruire la majorité des formes végétatives de micro-organismes susceptibles de se retrouver dans les sachets scellés contenant le produit.

- Observer une période de stockage à la température ambiante du magasin (20°C à 28°C) d'au moins une semaine des produits pasteurisés en magasin avant de les mettre dans le commerce. Il faudrait également faire un stockage parallèle, à une température plus élevée (32°C par exemple), des boissons fabriquées pour provoquer un vieillissement accéléré des produits et favoriser ainsi le développement des éventuels micro-organismes de contamination.

Les résultats obtenus au cours de cette étude pourraient être considérés comme notre modeste contribution à la fois sur le plan fondamental de la physiologie et de la croissance des levures d'altération dans les jus et nectars de fruits exotiques, et sur le plan appliqué de l'étude de la qualité microbiologique de ces boissons ainsi que de la "Microbiologie Prédictive" et de la thermorésistance de ces levures d'altération dans les jus et nectars de fruits.

Dans un proche avenir, nous envisageons réaliser l'identification des produits responsables de l'altération des qualités sensorielles (odeurs, goût, couleur...) des jus et nectars de fruits par un examen des sous-produits issus du métabolisme de ces micro-organismes au cours de leur croissance dans les boissons (analyses quantitatives et qualitatives par chromatographie).

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

ADAIR C.; KILSBY D.C.; WHITTALL P.T. Comparison of Schoolfield (non-linear Arrhenius) model and square root model for predicting bacterial growth in foods. *Food Microbiol.*, 1989, 6:7-18.

ADAMS M.R.; O'BRIEN P.J.; TAYLOR G.J. Effect of ethanol content of beer on the heat resistance of spoilage *Lactobacillus*. *J. Appl. Bacteriol.*, 1989, 66:491-495.

AFNOR. Recueil des normes Françaises des méthodes générales d'analyses des produits agro-alimentaires: chimie, microbiologie, analyse sensorielle. Association Française de Normalisation (AFNOR), 1980, 1^{ère} éd.

ALBER S.A.; SCHAFFNER D.W. Evaluation of data transformations used with the Square Root and Schoolfield models for predicting bacterial growth rate. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1992, 58:3337-3342.

ALLWOOD M.C.; RUSSEL A.D. Mechanism of thermal injury in *Staphylococcus aureus*. *Appl. Microbiol.*, 1967, 15:1266-1269.

ALLWOOD M.C.; RUSSEL A.D. Mechanisms of thermal injuring in non-sporulating bacteria. *Adv. Appl. Microbiol.*, 1970, 12:89-119.

AMOAKO E.B.; SYEDTOORA; ABLETT R.F.; SMITH J. Evaluation of the ability of primary selective enrichment to resuscitate heat injured and freeze injured *Listeria monocytogenes* cells. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1992, 58:3177-3179.

AMAHA M.; ORDAL Z.J. Effects of divalent cations in the sporulation medium on the thermal death rate of *B. coagulans var. thermacidurans*. *J. Bacteriol.*, 1957, 75:596-604.

ANDRE P. Politique et stratégie du contrôle de qualité dans la distribution *in* La qualité des produits alimentaires-politique, incitation, gestion et contrôle (coord. J.C. Multon). Tec. & Doc. et APRIA, Collection Sci. Tec. Agro-Alim., Paris, 1985, 71-82.

ANON. Predictive modelling of micro-organisms in foods: Protocols documents for the production of data. Campden Food and Drink. Research Association, Chipping Campden, U.K.

APRIA. Les nouveaux procédés mécaniques et continus dans l'industrie alimentaire. Tome 2- Industrie des jus de fruits. Association pour la Promotion Industrie Agriculture (APRIA), Paris, 1971, 116p.

ARRHENIUS S. Über die Reaktionsgeschwindigkeit bei der Inversion von Rohrzucker durch Säuren. *Zeitschrift für Physiological Chemistry*, 1889, 4, 226-248.

ARRHENIUS S. Quantitative laws in biological chemistry. G. Bell and Sons LTD, London. Reproduced, Readex Microprints, New York, 1973.

ARYANTA R.W.; FLEET G.H.; BUCKLE K.A. The occurrence and growth of micro-organisms during the fermentation of sausage. *Int. J. Food Microbiol.*, 1991, 13(2):143-155.

BANCE G. Traitement thermique des boissons et liquides alimentaires à débit variable et à nombre d'unités de pasteurisation programmable et contrôlé. Extrait de *Bios*, 21, Technique appliquée, Décembre 1990, 21p.

BARILLERE J.M.; MINOUNI A.; DUBOIS C.; BIDAN P. Thermorésistance des souches de levures isolées de vins. *Sci. Alim.*, 1985, 5:365-378.

BEECH F.W. Microbiology of fruit juices *in* Congrès International des jus de fruits. Merano, Zurich, Juris Druck Verlag, 1977, 8: 107-134.

BERBEY J.Y. Evolution de l'industrie des jus de fruits. *Ind. Agric. Alim.*, 1992, 5:276-282.

BEUCHAT L.R. Effect of potassium sorbate and sodium benzoate on inactivating yeasts heated in broth containing sodium chloride and sucrose. *J. Food Protect.*, 1981, 44:765-769.

BEUCHAT L.R.; LECHOWICH R.V. Survival of heated *Streptococcus faecalis* as affected by phase of growth and incubation temperature after thermal exposure. *J. Appl. Bacteriol.*, 1968, 31:414-419.

BEUCHAT L.R.; RICE S.L. *Byssochlamys* sp. and their importance in processed fruits. *Adv. Food Research*, 1979, 25:237-288.

BIT. Conservation des fruits à petite échelle. Bureau International du Travail, Série Technologie No 14, Genève, 1990, 226p.

BOCQUET J. Généralités sur les micro-organismes *in* Biotechnologie, (Coord. R. Scriban). 2^{ème} éd., Tec. & Doc. Lavoisier, Paris, 1984, 13-63.

BONALY R. Morphologie et reproduction asexuée des levures *in* Biotechnologie des levures, (coord. J.P. Larpent). Collection Biotechnologies, Masson, Paris, 1991, 3-22.

BOTTON B. La physiologie des levures *in* Biotechnologies (Coord. J.P. Larpent). Collection Biotechnologies, Masson, Paris, 1991, 97-169.

BOUIX M.; LEVEAU J.Y. Contrôle microbiologique *in* Biotechnologie, (Coord. R. Scriban). 2^{ème} éd., Tec. & Doc. Lavoisier, Paris, 1984, 469-478.

BOUIX M.; LEVEAU J.Y. Les levures *in* Biotechnologie industrielle: les micro-organismes d'intérêt industriel, (Coord. J.Y. Leveau et M. Bouix). Collection Sci. Tec. Agro-Alim., Tec. & Doc. Lavoisier et APRIA, 1993, 1-110.

BOURGEOIS M.C. Prédiction de la durée de conservation des produits *in* Techniques d'analyse et de contrôle dans les IAA - tome 3 - Le contrôle microbiologique, (Coord. C.M Bourgeois et J.Y. Leveau). Collection Sci. Tec. Agro-Alim., Tec. & Doc. Lavoisier, Paris, 1991.

BOURGEOIS M.C.; CLERET. Principes de base du contrôle microbiologique industriel et de l'exploitation de ses résultats *in* Techniques d'analyse et de contrôle dans les IAA - Tome 3 - Le contrôle microbiologique, (Coord. C.M Bourgeois et J.Y. Leveau). Collection Sci. Tec. Agro-Alim., Tec. & Doc. Lavoisier, Paris, 1991, 3-12.

BOURGEOIS M.C.; MAFART P. Techniques globales d'évaluation de la microflore *in* Techniques d'analyse et de contrôle dans les IAA - Tome 3 - Le contrôle microbiologique, (Coord. C.M Bourgeois et J.Y. Leveau). Collection Sci. Tec. Agro-Alim., Tec. & Doc. Lavoisier, Paris, 1991, 50-71.

BOURGEOIS M.C.; MALCOSTE R. Les méthodes rapides de dénombrement des micro-organismes *in* Techniques d'analyse et de contrôle dans les IAA - Tome 3 - Le contrôle microbiologique, (Coord. C.M Bourgeois et J.Y. Leveau). Collection Sci. Tec. Agro-Alim., Tec. & Doc. Lavoisier, Paris, 1991, 25-49.

BOURGEOIS M.C.; PLUSQUELLEC A. Prélèvement, transport et préparation des échantillons *in* Techniques d'analyse et de contrôle dans les IAA - Tome 3 - Le contrôle microbiologique, (Coord. C.M Bourgeois et J.Y. Leveau). Collection Sci. Tec. Agro-Alim., Tec. & Doc. Lavoisier, Paris, 1991, 14-24.

BOYLE D.L. SOFOS J.N.; SCHMIDT G.R. Thermal destruction of *Listeria monocytogenes* in the meat slurry and in ground beef. *J. Food Sci.*, 1990, 55:327-329.

BRATCHELL N.; GIBSON A.M.; TRUMAN M.; KELLY T.M.; ROBERTS T.A. Predicting microbial growth: The consequences of quantity of data. *Int. J. Food Microbiol.*, 1989, **8**: 47-58.

BROURGHALL J.; ANSLOW P.; KILSBY D. Hazard analysis applied to microbial growth in foods: Development of mathematical models describing the effect of water activity. *J. Appl. Bacteriol.*, 1983, **55**:101-110.

BUNNING V.K.; CRAWFORD R.G.; TIERNEY J.T.; PEELER J.T. Thermotolerance of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* after sublethal heat-shock. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1990, **56**:3216-3219.

BUCHANAN R.L. Predictive food microbiology. *Trends Food Sci. Technol.*, 1993, **4**: 6-11.

BUCHANAN R.L.; PHILLIPS J.G. Response surface model for predicting the effects of temperature, pH, sodium chloride content, sodium nitrite concentration and atmosphere on growth of *Listeria monocytogenes*. *J. Food Protect.*, 1990, **53**: 370-376, 381.

CEE. Directive du Conseil relative à la qualité des eaux destinées à la consommation humaine (80/778/CEE du 15 Juillet 1980). Communauté Economique Européenne, 1980.

CERF O. Tailing of survival curves of bacteria spores. *J. Appl. Bacteriol.*, 1977, **42**:1-19.

CERF O.; BERGERE J.L.; HERMIER J. Thermorésistance des spores de *Clostridium tyrobutyricum* et *Clostridium butyricum*. *J. Dairy Res.*, 1967, **34**:221-229.

CERF O.; DOUSSET X.; BROSSARD J. Pasteurisation et stérilisation thermique *in* Microbiologie Alimentaire, 1: Aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité alimentaires, (Coord. C.M. Bourgeois, J.F. Mescle et J. Zucca). Tec. & Doc. Lavoisier et APRIA, Paris, 1988, 308-328.

CONDON S.; LOPEZ P.; ORIA R.; SALA F.J. Heat resistance of micro-organisms: an improved method for survival counting. *J. Microbiol. Methods*, 1989, **7**:37-44.

COURTOISIER A.J. Action destructive de la chaleur sur les micro-organismes. Calcul pratique d'un traitement thermique et application au vin. *Ind. Alim. Agric.*, 1984, **101**:103-114.

CRAIG E.A. The heat-shock response. *C.R.C. Crit. Rev. Biochem.*, 1985, 18:239-280.

DAVENPORT R. Microbiology in perspective *in* "Symposium sur les progrès récents dans le domaine des jus de fruits et de légumes". Fédération Internationale des Producteurs de Jus de Fruits, Zurich, 1980, 155-175.

DAVEY K. A predictive model for combined temperature and water activity on microbial growth during growth phase. *J. Appl. Bacteriol.*, 1989, 67:483-488.

DAVEY K. Comparison of the Schoolfield (non-linear Arrhenius) model and the Square Root model for predicting bacterial growth in foods. A reply to Adair et al.. *Food Microbiol.*, 1989, 6:302-303.

DEAK T. Foodborne yeasts. *Adv. Appl. Microbiol.*, 1991, 36: 179-278.

DEAK T.; BEUCHAT L.R. Use of indirect conductimetry for predicting growth of food spoilage yeasts under various environmental conditions. *J. Indust. Microbiol.*, 1993, 12: 301-308.

DEVEZE M.; RIBEREAU-GAYON P. Thermorésistance des levures dans le vin. *Conn. Vigne Vin*, 1977, 11:131-163.

DODDS K.L. An introduction to predictive microbiology and the development and use of probability models with *Clostridium botulinum*. *J. Indust. Microbiol.*, 1993, 12: 139-143.

DROUHET E.; MARIAT F. Les levures pathogènes pour l'homme et l'animal *in* Biotechnologies des levures, (Coord. J.P. Larpent). Collection Biotechnologies, Masson, Paris, 1991, 405-420.

(DUPAIGNE P. Les boissons de fruits. Presse Universitaire, éd. S.D., Paris, 1972, 226p.

DUQUENOY F. Contribution à la modélisation et à l'identification d'une croissance bactérienne. Thèse de Doctorat de l'Université, USTL, 1993, 82p.

EFIUVWEVWERE B.J.O.; OYELADE J.A. Biodeteriorative and physico-chemical changes in modified atmosphere packaged oranges and the microbial quality of preserved and unpreserved juices. *Trop. Sci.*, 1991, 31: 325-333.

EYRING H. The activated complex in chemical reaction. *J. Chem. Phys.*, 1935, 3:107-115.

ETOA F.X. Miniaturisation de la méthode biologique de détermination de la valeur stérilisatrice dans les conserves. DEA, Université de Paris VI, Edition Institut Appert, Paris, 1983.

FAO/OMS. Normes Codex pour les jus de fruits, les concentrés de jus de fruits et les nectars de fruits. Programme mixte FAO/OMS, 1ère éd., Rome, 1982, 100p.

FARBER J.M.; BROWN B.E. Effect of prior heat shock on heat resistance of *L. monocytogenes* in meat. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1990, **56**:1584-1587.

FAVIER J.C.; IRELAND-RIPERT J.; LAUSSUCQ C.; FEINBERG M. Répertoire général des aliments- Tome 3- Table de composition des fruits exotiques, fruits de cueillettes d'Afrique. CIQUAL-CNEVA, ORSTOM et INRA. Tec. & Doc. Lavoisier, 1993, 207p.

FEDIO W.N.; JACKSON H. Effect of tempering on the heat resistance of *Listeria monocytogenes*. *Letters Appl. Microbiol.*, 1989, **9**:157.

FELLOW P.J. Food processing Technology - Principles and practise. Ellis Horwood LTD, New York, 1988, 505p.

FOX M.; LONCIN M. Investigations into microbiological stability of water-rich foods processed by a combination of methods. *Lebensm Wiss. Technol.*, 1982, **15**:321-325.

FOYET M.; TCHANGO-TCHANGO J. Transformation de la goyave et de la grenadille: extraction de pulpe, formulation et conservation de nectars. *Fruits*, 1994, **49**:61-70.

FRANCIS D.W.; SPAULDING P.L.; LOVETT J. Enterotoxin production and thermal resistance of *Yersinia enterocolitica* in milk. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1980, **40**:174-176.

GAZE J.E. The effect of oil on the heat resistance of *Staphylococcus aureus*. *Food Microbiol.*, 1985, **2**:277-283.

GAZE J.E.; BROWN G.D.; GASKELL D.E.; BANKS J.G. Heat resistance of *Listeria monocytogenes* in non-dairy mentrua. Technical memorandum No 523. Campden Food and Drink Research Association, Chipping Campden, Gloucestershire, UK, 1989.

GIBSON A.M. The effect of sugar concentration on the heat resistance of vegetative micro-organisms. *J. Appl. Bacteriol.*, 1973, **36**:365-376.

GIBSON A.M.; BRATCHELL N.; ROBERTS T.A. Predicting microbial growth: growth responses of Salmonellae in a laboratory medium as affected by pH, sodium chloride and storage temperature. *Int. J. Food Microbiol.*, 1988, 6: 155-178.

GILL C.; PHILLIPS D. The effect of media composition on the relationship between temperature and growth rate of *E. coli*. *Food Microbiol.*, 1985, 2:285-290.

GOULD G.W.; DRING G.L. mechanisms of spores heat resistance. *Adv. Microbiol. Physiol.*, 1975, 11:137-164.

GRET. Le point sur la transformation des fruits tropicaux. Groupe de Recherche et d'Echanges Technologiques (GRET), Paris, 1984, 59p.

GUIRAUD J.; GALZY P. L'analyse microbiologique dans les industries alimentaires. Collection Génie Alimentaire, 1^{ère} éd., 1980, 236p.

GUY Ph.; LARPENT J.P. Les levures d'altération des aliments *in* Biotechnologies des levures, (Coord. J.P. Larpent). Collection Biotechnologies, Masson, Paris, 1991, 377-388.

HAN Y.W. Death rate of bacterial spores: non linear survivor curves. *Can. J. Microbiol.*, 1975, 21:1464-1467.

HANNA N.H.; STEWART J.C.; CARPENTER Z.C; VANDERZANT C. Heat resistance of *Yersinia enterocolitica* in skim milk. *J. Food Sci.*, 1977, 21:1134-1136.

HANSEN N.H.; RIEMAN H. Factors affecting the heat resistance of non-sporing organisms. *J. Appl. Bacteriol.*, 1963, 26:314-333.

HARNULV B.G.; JOHANSSON M.; SNYGY B.G. Heat resistance of *B. stearothermophilus* spores at different water activities. *J. Food Sci.*, 1977, 42:91-93.

HEIKKI S.; ERKKI O. Yeasts - Volume 2 - Yeast physiology and biochemistry (Coord. A.H. Rose and J.S. Harrison). Academic Press Inc., London LTD., 1971, 3-74.

HSIEH F.; ACOTT K.; LABUZA T.P. death kinetics of pathogens in a pasta product. *J. Food Sci.*, 1976, 41:516-519.

HSU E.J.; BEUCHAT L.R. Factors affecting microflora *in* processed fruits in "Commercial fruits processing". The AVI Publ. Co., Westport, 1986, 129-161.

HUET S.; JOLIVE E.; MESSEAN A. La régression linéaire, méthodes et applications en biologie, INRA, Paris, 1992.

HUI Y.I. Food preservation techniques. Encyclopedia of Food Science and Technology, 1991, volume 2, 1100-1102.

HURST A.; HUGHES A. The protective effect of some food ingredients on *Staphylococcus aureus* MF31. *J. Appl. Bacteriol.*, 1983, **55**:81-88.

JOHNSON K.M. Microbiology of apple juice. Apple juice workshop - Special report, New York State Agric. Exp. Station, Geneva, 1984, 54:24-27.

JOLICOEUR P.; PONTIER J. Population growth and decline: a four parameters generalization of the logistic curve. *J. Theor. Biol.*, 1989, **141**:563-571.

JUVEN B.J. Bacterial spoilage of citrus products at pH lower than 3.5. *J. Milk Food Technol.*, 1976, **39**:812-822.

JUVEN B.J.; KANNER J.; WEISSLOWICZ H. Influence of orange juice composition on the thermal resistance of spoilage yeasts. *J. Food Sci.*, 1978, **43**:1074-1076, 1080.

KNABEL S.J.; WALKER P.A.; HARTMAN P.A.; MENDONCA A.F. Effects of growth temperature and strictly anaerobic recovery on the survival of *Listeria monocytogenes* during pasteurisation. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1990, **56**:370-376.

KNEIFEL W.; BRETTBACHER S. A simple method for the detection of fermenting yeasts in fruit mixes, fruit yogurts, and dessert products by using CO₂-sensitive gaz diffusion tubes. *Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm.*, 1992, **14**: 169-176.

KOPEMAN I.J.; SCHYER M. Thermal resistance of endogenous flora in reconstituted orange juice. *Sci. Technol. Alim.*, 1976, **9**:91-92.

KRAMER A.; TWIGG B.A. Quality control for the food industry. 3rd ed., Volume 1 - Fundamentals. The AVI Publishing Company, Inc., Westport Conn., 1970, 556p.

KRAMER A.; TWIGG B.A. Quality control for the food industry. 3rd ed., Volume 2 - Applications. The AVI Publishing Company, Inc., Westport Conn., 1970, 550p.

KREGER VAN RIJ N.J.W. The yeasts, a taxonomy study. 3rd ed., Elsevier, Amsterdam, 1984.

LABUZA T.P.; FU B. Growth kinetics for shelf-life prediction: theory and practice. *J. Indust. Microbiol.*, 1993, 12: 309-323.

LARMOND E. Methods for sensory evaluation of food. Ministère de l'Agriculture Publ., Ottawa, 1970.

LA ROCCO K.A.; GALLIGAN P.; LITTEL K.J.; SPURGASH A. A rapid bioluminescent ATP method for determining yeast contamination in a carbonated beverage. *Food Technol.*, 1985, 7:49-53.

LEBERT F.; ROSSERT R. Incidence de la congélation sur la microflore des plats cuisinés et des viandes hachées. *Bulletin de l'Académie Vétérinaire de France*, 1976, 49:285-301.

LIELIEVELD H.L.M.; HUGELSHOFER W.; JEPSON P.C.; LALANDE M.; MOSTERT M.A.; NASSAUER J.; RINGSTROM R. Pasteurisation continue des aliments liquides microbiologiquement sûre. *Ind. Alim. Agric.*, 1992, 3:109-114.

LEUNG H.K.; SWANSON B.G.; AW T.L.; DAVIS D.C.; KRANZLER G.A. Thermal resistance of micro-organisms and polyphenol oxidase related to solar pasteurization of concord grape juice. *J. Food Protect.*, 1982, 45:913-918.

LEVEAU J.Y. Cinétiques microbiennes et niveaux d'hygiène des chaînes de fabrication des produits alimentaires. *Ind. Alim. Agric.*, 1993, 5:293-299.

LINTON R.H.; WEBSTER J.B.; PIERSON M.D.; BISHOP J.R.; HACKNEY C.R. The effect of sublethal heat shock and growth atmosphere on the heat resistance of *Listeria monocytogenes* Scott A. *J. Food Protect.*, 1992, 55:84-87.

LITTEL K.J.; LA ROCCO K.A. Bioluminescent standard curves for quantitative determination of yeast contaminants in carbonated beverages. *J. Food Protect.*, 1985, 48:1022-1024.

LITTEL K.J.; LA ROCCO K.A. ATP screening method for presumptive detection of microbiology contaminated carbonated beverages. *J. Food Sci.*, 1986, 51:474-476.

LITTLE C.L.; ADAMS M.R.; ANDERSON W.A.; COLE M.B. Comparison of a quadratic response surface model and a square root model for predicting the growth rate of *Yersinia enterocolitica*. *Letters Appl. Microbiol.*, 1992, 15: 63-68.

LITTLE C.L.; ADAMS M.R.; ANDERSON W.A.; COLE M.B. Application of a log-logistic model to describe the survival of *Yersinia enterocolitica* at sub-optimal pH and temperature. *Int. J. Food Microbiol.*, 1994, 22:63-71.

MACKEY B.M.; BRATCHELL N. The heat resistance of *Listeria monocytogenes*. *Letters Appl. Microbiol.*, 1989, 9:89-94.

MACKEY B.M.; DERRICK C.M. The effect of sublethal injury by heating, freezing, drying and gamma-radiation on the duration of the lag phase of *Salmonella typhimurium*. *J. Appl. Bacteriol.*, 1982, 53:243-251.

MACKEY B.M.; DERRICK C.M. Elevation of the heat resistance of *Salmonella typhimurium* by sublethal heat shock. *J. Appl. Bacteriol.*, 1986, 61:389-393.

MACKEY B.M.; DERRICK C.M. Changes in the heat resistance of *Salmonella typhimurium* during heating at rising temperatures. *Lett. Appl. Microbiol.*, 1987, 4:13-16.

MACKEY B.M.; DERRICK C.M. The effect of prior heat shock of *Salmonella thompson* in foods. *Lett. Appl. Microbiol.*, 1987, 5:115-118.

MAFART P. Génie Industriel Alimentaire. Tome 1: Les procédés physiques de conservation. Tec. & Doc. Lavoisier et APRIA, Paris, 1991, 295p.

MAGNUS C.A.; INGLEDEW W.M.; McOURDY A.R. Thermal resistance of *Streptococci* isolated from pasteurised ham. *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.*, 1986, 19:62-67.

MARCELIN J.H.; VERSTEEG H.; MANSVELT BECK H.J.; VINKE D. Semi-electronic turbidimeter for automated monitoring a bacterial growth in test tubes. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1980, 39:281-284.

MARSHALL C.R.; WALKEY V.T. Some aspects of microbiology applied to commercial apple juice production. Part V: Thermal death rates of spoilage organisms in apple juice. *Adv. Food Res.*, 1952, 9:221-284.

McCLURE P.J.; ROBERTS T.A.; OGURU O. Comparison of the effects of sodium choride, pH and temperature on the growth of *Listeria monocytogenes* on gradient plates and in liquid medium. *Lett. Appl. Microbiol.*, 1989, 9:95-99.

- McMEEKIN T.; CHANDLER R.; DOE P.; GARLANG G.; OLLEY J.; PUTROS S.; RATKOWSKY D.A. Model for combined effects of temperature and salt concentration/water activity on the growth rate of *Staphylococcus xylosus*. *J. Appl. Bacteriol.*, 1987, **62**:543-550.
- McMEEKIN T.; OLLEY J.; RATKOWSKY D.A.; ROSS T. Comparison of the Schoolfield (non-linear Arrhenius) model and the Square Root model for predicting bacterial growth in foods. *Food Microbiol.*, 1989, **6**:304-307.
- McMEEKIN T.; ROSS T.; OLLEY J. Application of predictive microbiology to assure the quality and safety of fish and fish products. *Int. J. Food Microbiol.*, 1991, **15**:13-32.
- McMEEKIN T.; OLLEY J.; ROSS T.; RATKOWSKY D.A. Predictive microbiology - Theory and application. Research Studies Press LTD, England, 1993, 340p.
- MEMBRE J.M.; BURLOT P.M. Effects of temperature, pH, and NaCl on growth and pectinolytic activity of *Pseudomonas marginalis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1994, **6**:2017-2022.
- MEMBRE J.M.; THOLOZAN J.L. Modeling growth and off-flavours production of spoilage beer bacteria, *Pectinatus frisingensis*. *J. Appl. Bacteriol.*, 1994, **77**: 456-460.
- MESCLE J.F.; ZUCCA J. Le comportement des micro-organismes en milieu alimentaire *in* Aspect microbiologique de la qualité et de la sécurité alimentaire, (Coord. C.M. Bourgeois, J.F Mescle et J Zucca). Tec. & Doc. Lavoisier, Paris, 1988, 7-15.
- MEYER A.; DEIANA J.; LECLERC H. Cours de Microbiologie Générale - Nouveau Programme. Collection Biosciences et Techniques, Doin éd., Paris, 1994, 244p.
- MEYER M.D.; DONNELLY C.W. Effect of incubation temperature on repair of heat injured *Listeria* in milk. *J. Food Protect.*, 1992, **55**:579-582.
- MEYRATH J. Problems in fruit juices pasteurization *in* Recent Advances in Food Science - Volume 2 - Processing, (eds) J. hawthorn and J.M. Leitch, Butterworths Inc., London, 1962, 117-127.

MISKIMIN D.K.; BERKOWITZ K.A.; SOLBERG M.; RIHA W.E.Jr.; FRANKE W.C.; BUCHANAN R.L.; O'LEARY V. Relationships between indicator organisms and specific pathogens in potentially hazardous foods. *J. Food Sci.*, 1976, **41**:1001-1006.

MOATS W.A.; DABBAH R.; ECWARDS V.M. Interpretation of non-logarithmic survivor curves of heated bacteria. *J. Food Sci.*, 1971, **36**:523-526.

MOLZAHN S.W.; HOCKNEY R.C.; KELSEY P. Factors influencing the flash pasteurisation of beer. EBC Congress, 1983, p255.

MULAK V.; TAILLIEZ R.; EB P.; BECEL P. Heat resistance of bacteria isolated from preparation based on seafood products. *J. Food Protect.*, 1995, **58**:49-53.

MULTON J.L. La Qualité des produits alimentaires - Politique, incitations, gestion et contrôle. Collection Sci. Tec. Agro-Alim., Tec. & Doc. Lavoisier et APRIA, 1985, 487p.

MURDOCK D.I.; HATCHER W.S.Jr. A simple method to screen fruit juices and concentrates for heat-resistant mold. *J. Food Protect.*, 1978, **41**:254-256.

MURDOCK D.I.; TROY U.S.; FOLINAZZO J.F. Thermal resistance of lactic acid bacteria and yeast in orange juice and concentrate. *Food Research*, 1953, **18**:85-89.

NIKDEL S.; CHEN C.S.; PARISH M.E.; McKELLAR D.G.; FRIEDRICH L.M. Pasteurization of citrus juice with microwave energy in a continuous-flow unit. *J. Agric. Food Chem.*, 1993, **41**:2116-2119.

NISHIKAWA S.; SAKAI S.; KARUBE I.; MATSUNAGA T.; SUZIKI S. Dye-coupled electrode system for the rapid determination of cell population in polluted water. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1982, **43**:814-818.

NOTERMANS S.; INTVELD P. Microbiological challenge testing for insuring safety of food products. *Int. J. Food Microbiol.*, 1994, **24**:33-39.

PALUMBO S.A.; SMITH J.L. Repair of heated injured *Staphylococcus aureus* 196 E on food substrates and additives and at different temperatures. *J. Food Protect.*, 1982, **45**:548-461.

PALUMBO S.A.; WILLIAMS A.; BUCHANAN R.L.; PHILLIPS J.G. Model for aerobic growth of *Aeromonas hydrophila* K144. *J. Food Protect.*, 1991, **54**: 429-435.

PARISH M.E. Microbiological concerns in citrus juice processing. *Food Technol.*, 1991, **45**:128, 130, 132, 136.

PECK M. W.; LUND B.M.; FAIRBAIRN D.A.; KASPERSSON A.S.; UNDELAND P.C. Effect of heat treatment on survival of, and growth from, spores of nonproteolytic *Clostridium botulinum* at refrigeration temperatures. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1995, **61**:1780-1785.

PEREIR J.L.; SALZBERG G.P.; BERGDOLL M.S. Effect of temperature, pH and sodium chloride concentrations on production of staphylococcal enterotoxins A and B. *J. Food Protect.*, 1982, **45**:1306-1309.

PLUSQUELLEC A. Le contrôle des matières premières et des produits *in* Techniques d'analyses et de contrôle dans les industries agro-alimentaires - Volume 3 - Le contrôle microbiologique, (Coord. C.M Bourgeois et J.Y. Leveau). 1ère éd., Collection Sci. Tec. Agro-Alim., Tec. & Doc. Lavoisier et APRIA, Paris, 1980, 223-294.

PUROHIT K.; STOKES J.L. Heat labile enzymes in a psychrophilic bacterium. *J. Bacteriol.*, 1967, **93**:199-206.

QUINTAVALLA S.; CAMPANINI M. Effect of rising temperature on the heat resistance of *Listeria monocytogenes* in meat emulsion. *Lett. Appl. Microbiol.*, 1991, **12**:184-187.

RATKOWSKY D.A.; LOWRY R.; McMEEKIN T.A.; STOKES A.; CHANDLER R. Model for bacteria culture growth rate throughout the entire biokinetic temperature range. *J. Bacteriol.*, 1983, **154**:1222-1226.

RATKOWSKY D.A.; OLLEY J.; McMEEKIN T.A.; BALL A. Relationship between temperature and growth rate of bacterial starter cultures. *J. Bacteriol.*, 1982, **149**:1-5.

RATKOWSKY D.A.; ROSS T.; McMEEKIN T.A.; OLLEY J. Comparison of Arrhenius-type and Belehrek-type models for prediction of bacterial growth in foods. *J. Appl. Bacteriol.*, 1991, **71**:452-459.

ROBERTS T.A.; INGRAM M. The resistance of spores of *Clostridium botulinum* to heat and radiation. *J. Appl. Bacteriol.*, 1965, **28**:125-141.

ROSS T.; McMEEKIN T.A. Predictive microbiology. *Int. J. Food Microbiol.*, 1994, **23**:241-264.

ROSSET R.; POUMEYROL G. Procédés modernes de préparation de plat cuisinés à l'avance par cuisson ou suivant le conditionnement sous vide. *Sci. Alim.*, 1986, 6:161-167.

ROWE M.T. Predictive microbiology: uses for assessing quality and safety of dairy products. *J. Indust. Microbiol.*, 1993, 12: 330-336.

SADOFF H.L. Heat resistance of spore enzymes. *J. Appl. Bacteriol.*, 1970, 33:130-140.

SAPIS J.C. Modification du raisin parasité par *Botrytis cinera* et par différents micro-organismes. *Ann. Technol. Agric.*, 1978, 27:137-139.

SAUVAGEOT F. L'évaluation sensorielle des denrées alimentaires. Aspects méthodologiques. Tec. & Doc. et CDIUPA, Massy, 1989, 195p.

SCHOOLFIEDS R.; SHARPE P.; MAGNUSON C. Non linear regression of biological temperature-dependent rate models based on absolute reaction rate theory. *J. Theor. Biol.*, 1981, 88:719-731.

SCHMIDT J.L.; ROUGER C.; DIEZ M.; LENOIR J. Activités biochimiques de levures du genre *Candida* isolées de fromages de chèvre. *Microbiol. Alim. Nutr.*, 1993, 11:165-182.

SEDA. Plan alimentaire à long terme: 1985-1995. Rapport provisoire pour le Ministère de Plan et de l'Aménagement du Territoire du Cameroun, Mai 1986. Société d'Etudes pour le Développement de l'Afrique (SEDA), 1986, 119p.

SENHAJI A.F. Protection des micro-organismes par les matières grasses au cours des traitements thermiques. Thèse de Docteur-Ingénieur, Université de Paris VII, 1973.

SENDER S.D.; COX N.A.; BAILEY J.S; FORBUS W.R.Jr. Microbiological changes in fresh market tomatoes during packing operations. A research note. *J. Food Sci.*, 1985, 50:254-255.

SIDHU J.S.; BHUMBLA V.K.; JOSHI B.C. Preservation of tomato juice under acid conditions. *J. Sci. Food Agric.*, 1984, 35:345-352.

SILVA J.L.; CHAMUL P.S. Yield, color and sensory attributes of pasteurized watermelon juice. *J. Food Service Systems*, 1991, 6:141-146.

SKINNER G.E.; LARKIN J.W.; RHODEHAMEL E.J. Mathematical modeling of microbial growth: a review. *J. Food Safety*, 1994, **14**:175-217.

SPLITTSTOESSER D.F. Enumeration of heat resistant mold (*Byssochlamys*), ch. 17, in "Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods", (ed) M.L. Speck, American Public Health Association, Washington D.C., 1976, p.230.

SPLITTSTOESSER D.F. Micro-organisms involved in the spoilage of fermented fruit juices. *J. Food Protect.*, 1982, **45**:874-877.

SPLITTSTOESSER D.F.; LEASOR S.B.; SWANSON K.M.J. Effect of food composition on heat resistance of yeasts ascospores. *J. Food Sci.*, 1986, **51**:1265-1267.

SPLITTSTOESSER D.F.; LIENK L.L.; WILKINSON M; STAMER J.R. Influence of wine composition on the heat resistance of potential spoilage organisms. *Appl. Microbiol.*, 1975, **30**:369-373.

STECCHINI M.; BEUCHAT L.R. Effect of sugar in growth media on survival and recovery of *Saccharomyces* heated in peach puree. *Food Microbiol.*, 1985, **2**:85-95.

STEVENSON K.E.; GRAUMLICH T.R. Injury and recovery of yeasts and molds. *Adv. Appl. Microbiol.*, 1978, **23**:203-217.

STEVENSON K.E.; RICHARD L.J. Thermal injury and recovery of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Food Sci.*, 1976, **41**:136-137.

STOKES J.L. Influence of temperature on the growth and metabolism of yeasts *in* The Yeasts - Volume 2 - Yeast Physiology and Biochemistry, (Coord. A.H. Rose and J.S. Harrison). Academic Press Inc.LTD, London, 1971, 119-134.

STUMBO C.R. Thermobacteriology in food processing, 2nd ed., Academic Press, New-York, 1973.

SUGIYAMA H. Studies on factors affecting the heat resistance of spores of *Cl. botulinum*. *J. Bacteriol.*, 1951, **62**:81-96.

SWANSON K.M.J.; DOWNING D.L.; SPLITTSTOESSER D.F. Incidence of potential spoilage micro-organisms in the processing of apple for juice. 1985 Processed Apple Products Report Worksop, special report, New-York State Agric. Exp. Station, Geneva, 1985, **57**:4-7.

SWANSON K.M.J.; LEASOR S.B.; DOWNING D.L. Aciduric and heat resistant micro-organisms in apple juice and cider processing operations. *J. Food Sci.*, 1985, **50**:336-339.

TCHANGO-TCHANGO J.; NJINE T.; TAILLIEZ R. Qualité microbiologique de jus et nectars de fruits exotiques. *Microbiol. Alim. Nutr.*, 1992, **10**: 199-206.

TCHANGO-TCHANGO J.; NJINE T.; TAILLIEZ R. Effet de la pasteurisation sur les qualités sensorielles des jus et nectars de fruits exotiques. *Microbiol. Alim. Nutr.*, 1993, **11**: 151-156.

TCHANGO-TCHANGO J.; WATIER D.; EB P.; TAILLIEZ R.; NJINE T.; HORNEZ J.P. Modélisation de la croissance de *Candida pelliculosa* dans le nectar de goyave en fonction de la température de stockage et de la variation de pH. Poster présenté aux "Deuxièmes Journées d'Etudes sur le Contrôle Microbiologique de Denrées Alimentaires: Aspects pragmatiques - Progrès en méthodologie analytique", Paris, 9-10 Novembre 1995.

TOLEDO R.T. Fundamentals of food process engineering, 2nd ed., Chapman & Hall, New-York, 1994, 602p.

TOMASSONE R.; DERVIN C.; MASSON J.P. Biométrie - Modélisation de phénomènes biologiques, Masson, Paris, 1993, 553p.

TÖROK T.; KING A.D.Jr. Comparative study on the identification of food-borne yeasts. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1991, **57**:1207-1212.

TRESSLER D.K.; JOSLYN M.A. Fruit and vegetable juice processing technology, 2nd ed., The AVI Publishing company Inc., Westport Conn., 1971, 486p.

TRUONG-MEYER X.M.; STREHAINO P.; RIBA J.P. Thermal treatment of yeast cells in a strawberry product - Enumeration procedure. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1994, **41**: 262-266.

WATIER D. Etude de la croissance et de la thermorésistance de *Pectinatus* et de *Megasphaera*, bactéries anaérobies strictes, contaminants de la bière. Thèse de Doctorat de l'Université de Lille I, 1994, 215p.

WATIER D.; LEGUERINEL I.; HORNEZ J.P.; CHOWDHURY I.; DUBOURGUIER H.C. Heat resistance of *Pectinatus* sp., a beer spoilage anaerobic bacterium. *J. Appl. Bacteriol.*, 1995, **78**:164-168.

WHITING R.C.; BUCHANAN R.L. Microbial modeling. *Food Technol.*, 1994, **48**: 113-120.

WIJZES T.; McCLURE P.J.; ZWIETERING M.H.; ROBERTS T.A. Modeling bacterial growth of *Listeria monocytogenes* as a function of water activity, pH and temperature. *Int. J. Food Microbiol.*, 1993, **18**:139-149.

ZAICA L.; PHILLIPS J.G.; BUCHANAN R.L. Model of aerobic growth *Shigella flexneri* under various conditions of temperature, pH, sodium chloride and sodium nitrite concentration. *J. Food Protect.*, 1992, **55**: 509-513.

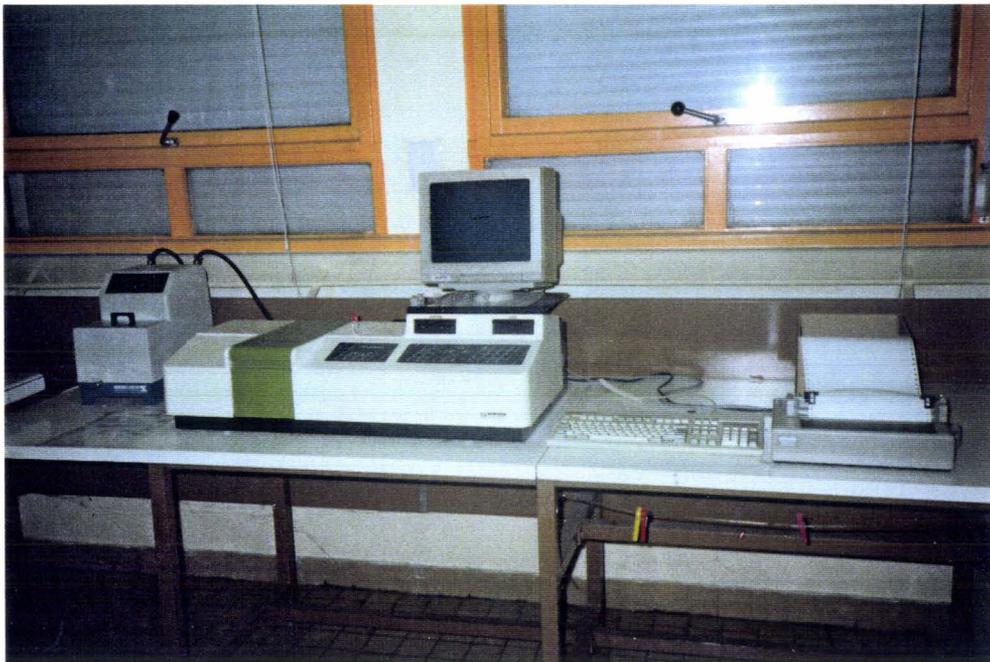
ZWIETERING M.H.; DE KOOS J.; HASENACK B.; DE WIT J.; VAN'TRIET K. Modeling of bacterial growth as a function of temperature. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1991, **57**:1094-1101.

ZWIETERING M.H.; JONGENBURGER I.; ROMBOUTS F.M.; VAN'TRIET K. Modeling of bacterial growth curve. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1990, **56**:1875-1881.

ZWIETERING M.H.; CUPPERS H.G.A.; DE WITT J.C.; VAN'T RIET K. Evaluation of data transformation and validation of a model for the effect of temperature on bacterial growth. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1994, **60**:195-203.

ANNEXES

Annexe 1: Photo du spectrophotomètre (modèle Unikon 940, Kontron Instruments, USA) utilisé pour le suivi des cinétiques de croissance microbienne par turbidimétrie.



Spectrophotomètre (modèle Unikon 940, Kontron Instruments, USA).

ANNEXE 2

Normes hygiéniques pour les jus de fruits, les concentrés de jus de fruits et les nectars de Fruits (FAO/OMS, 1982).

Sur le plan hygiénique :

- Il est recommandé que le produit visé par la présente norme soit préparé conformément aux dispositions du code d'usage international recommandé en matière d'hygiène pour les fruits et légumes en conserves (document CAC/RCP 2 - 1969) et aux principes généraux d'hygiène alimentaire (document CAC/RCP 1 - 1969, Rév.1) recommandés par la commission du Codex Alimentarius.

- Quant il est analysé selon les méthodes appropriées d'échantillonnage et d'examen, le produit :

a) doit être exempt des microorganismes capables de se développer dans les conditions d'entreposage normales ; et

b) ne doit contenir aucune substance provenant des microorganismes en quantités qui pourraient être toxiques ou présenter un risque pour la santé.

Normes de composition microbiologique du sucre, des produits végétaux surgelés ou deshydratés, et des boissons non alcoolisées. (GUIRAUD, J. et GALZY, P. (1980)).

a) Sucre (composition microbiologique pour 10 g)

- . Flore totale mésophile inférieure à 200
- . Flore sporulée mésophile totale inférieure à 125
- . Flore sporulée thermophile totale inférieure à 150
- . Flore sporulée thermophile acidifiante inférieure à 50
- . Flore sporulée thermophile anaérobie inférieure à 10
- . Flore sporulée thermophile sulfito-reductrice inférieure à 5
- . Levures inférieures à 10
- . Moisissures inférieures à 10
- . Flore osmophile inférieure à 10

b) Produits végétaux surgelés ou deshydratés (composition microbiologique par gramme) :

- . Flore fongique inférieure à 500
- . Levures inférieures à 500
- . Flore totale inférieure à 5×10^5
- . Flore psychrophile inférieure à 5×10^5
(seulement pour les congelés)
- . Coliformes inférieurs à 10^3
- . Escherichia coli inférieur à 10

- . Spores anaérobies sulfito-réductrices inférieures à 10
- . Staphylocoques inférieurs à 10
- . Absence de salmonella dans 25 g.

La législation sur l'analyse microbiologique des produits végétaux est quasi-inexistante à cause probablement du faible danger sanitaire présenté par la microflore de ces produits.

c) Boissons non alcoolisées

Il n'existe pas de normes microbiologiques très strictes pour ces boissons à cause du faible danger d'ordre sanitaire qu'elles présentent. Du point de vue industrielle il est difficile de donner des normes de composition valables globalement en raison des conditions particulières de stabilisation de la flore intervenant dans les divers produits.

Toutefois, pour toutes les industries de boissons non alcoolisées, on peut considérer, au niveau de la fabrication, les valeurs suivantes :

- eau

- . Flore totale inférieure à 100/ml
- . Flore fongique inférieure à 1/ml
- . Coliformes inférieurs à 1/ml

- Sirop de sucre

- . Flore totale inférieure à 20/ml
- . Flore fongique inférieure à 1/ml

- Concentré de fruit de base

- . Flore totale inférieure à 10^3 /ml
- . Flore fongique inférieure à 10/ml

Pour les produits finis, les valeurs varient en fonction de leur nature et du traitement subi. Dans de nombreux cas, la nature de la flore est beaucoup plus importante que son niveau.

Pour les jus de fruits, on peut appliquer les normes suivantes :

- . Levures osmophiles, inférieures à 10/litre
- . moisissures inférieures à 10/100 ml
- . absence de coliformes dans 10 ml
- . absence de Clostridium butyriques dans 100 ml

Au niveau de la réglementation, il existe un grand nombre de textes concernant ces boissons, mais ils ne se rapportent pas à des problèmes purement microbiologiques.

DIRECTIVE DU CONSEIL

du 15 juillet 1980

relative à la qualité des eaux destinées à la consommation humaine

(80/778/CEE)

LE CONSEIL DES COMMUNAUTÉS EUROPÉENNES,

vu le traité instituant la Communauté économique européenne, et notamment ses articles 100 et 235,

vu la proposition de la Commission,

vu l'avis de l'Assemblée ⁽¹⁾,vu l'avis du Comité économique et social ⁽²⁾,

considérant que l'importance pour la santé publique des eaux destinées à la consommation humaine rend nécessaire la fixation de normes de qualité auxquelles doivent satisfaire ces eaux ;

considérant qu'une disparité entre les dispositions déjà applicables ou en cours de préparation dans les différents États membres en ce qui concerne la qualité des eaux destinées à la consommation humaine peut créer des conditions de concurrence inégales et avoir, de ce fait, une incidence directe sur le fonctionnement du marché commun ; qu'il convient donc de procéder dans ce domaine au rapprochement des législations prévu à l'article 100 du traité ;

considérant qu'il apparaît nécessaire d'assortir ce rapprochement des législations d'une action de la Communauté visant à réaliser, par une réglementation plus ample en matière d'eaux destinées à la consommation humaine, l'un des objectifs de la Communauté dans les domaines de l'amélioration des conditions de vie, d'un développement harmonieux des activités économiques dans l'ensemble de la Communauté et d'une expansion continue et équilibrée ; qu'il convient donc de prévoir à ce titre certaines dispositions spécifiques ; que les pouvoirs d'action requis en la matière n'ayant pas été prévus par le traité, il convient de recourir à l'article 235 du traité ;

considérant que les programmes d'action des Communautés européennes en matière d'environnement de 1973 ⁽³⁾ et de 1977 ⁽⁴⁾ prévoient la fixation de

normes applicables aux substances chimiques toxiques et aux germes nocifs pour la santé présents dans les eaux destinées à la consommation humaine, ainsi que la définition de paramètres physiques, chimiques et biologiques correspondant aux différentes utilisations des eaux, et notamment des eaux destinées à la consommation humaine ;

considérant que, pour les eaux minérales naturelles, il est envisagé un régime particulier et qu'il y a lieu d'exclure du champ d'application de la présente directive les eaux médicinales ainsi que certaines eaux utilisées dans des industries alimentaires lorsque cette utilisation n'est pas préjudiciable à la santé publique ;

considérant que, par la directive 75/440/CEE ⁽⁵⁾, le Conseil a déjà établi des normes pour les eaux superficielles destinées à la production d'eau alimentaire ;

considérant que les valeurs fixées pour certains paramètres doivent être inférieures ou égales à une concentration maximale admissible ;

considérant que, pour les eaux livrées à la consommation humaine et ayant subi un traitement d'adoucissement, les valeurs fixées pour certains paramètres doivent être égales ou supérieures à une concentration minimale requise ;

considérant que les valeurs correspondant à un « niveau guide » doivent être considérées comme satisfaisantes ;

considérant que la préparation des eaux destinées à la consommation humaine pouvant nécessiter l'utilisation de certaines substances, il convient d'en réglementer l'usage pour éviter d'éventuels effets préjudiciables à la santé publique dus à des quantités excessives de ces substances ;

considérant que, afin d'atteindre une certaine souplesse dans l'application de la présente directive, il y a lieu d'autoriser les États membres à prévoir, sous certaines conditions, des dérogations à la présente directive, notamment pour tenir compte de situations particulières ;

considérant que, afin de vérifier les valeurs des concentrations des différents paramètres, il y a lieu de prévoir que les États membres prennent les dispositions

⁽¹⁾ JO n° C 28 du 9. 2. 1976, p. 27.⁽²⁾ JO n° C 131 du 12. 6. 1976, p. 13.⁽³⁾ JO n° C 112 du 20. 12. 1973, p. 1.⁽⁴⁾ JO n° C 69 du 11. 6. 1970, p. 1.⁽⁵⁾ JO n° L 194 du 25. 7. 1975, p. 34.

ANNEXE III

MENTIONS ET CRITÈRES PRÉVUS À L'ARTICLE 9 PARAGRAPHE 2

Mentions	Critères
Oligominérale ou faiblement minéralisée	La teneur en sels minéraux, calculée comme résidu fixe, n'est pas supérieure à 500 mg/l
Très faiblement minéralisée	La teneur en sels minéraux, calculée comme résidu fixe, n'est pas supérieure à 50 mg/l
Riche en sels minéraux	La teneur en sels minéraux, calculée comme résidu fixe, est supérieure à 1 500 mg/l
Bicarbonatée	La teneur en bicarbonate est supérieure à 600 mg/l
Sulfatée	La teneur en sulfates est supérieure à 200 mg/l
Chlorurée	La teneur en chlorure est supérieure à 200 mg/l
Calcique	La teneur en calcium est supérieure à 150 mg/l
Magnésienne	La teneur en magnésium est supérieure à 50 mg/l
Fluorée ou contient du fluor	La teneur en fluor est supérieure à 1 mg/l
Ferrugineuse ou contient du fer	La teneur en fer bivalent est supérieure à 1 mg/l
Acidulée	La teneur en gaz carbonique libre est supérieure à 250 mg/l
Sodique	La teneur en sodium est supérieure à 200 mg/l
Convient pour la préparation des aliments des nourrissons	—
Convient pour un régime pauvre en sodium	La teneur en sodium est inférieure à 20 mg/l
Peut être laxative	—
Peut être diurétique	—

— pour la fixation des valeurs les États membres s'inspirent de celles figurant dans la colonne « Niveau guide ».

4. En ce qui concerne les paramètres figurant dans le tableau F de l'annexe I, les valeurs à fixer par les États membres doivent être supérieures ou égales aux valeurs figurant dans la colonne « Concentration minimale requise » pour les eaux visées à l'article 2 premier tiret ayant subi un traitement d'adoucissement.

5. L'interprétation des valeurs figurant à l'annexe I doit se faire en tenant compte des observations.

6. Les États membres prennent les dispositions nécessaires pour que les eaux destinées à la consommation humaine soient au moins conformes aux exigences spécifiées à l'annexe I.

Article 8

Les États membres prennent toutes les dispositions nécessaires pour que toute substance utilisée lors de la préparation des eaux destinées à la consommation humaine ne se retrouve pas dans les eaux mises à la disposition de l'utilisateur en concentrations supérieures aux concentrations maximales admissibles concernant ces substances et ne puisse pas entraîner directement ou indirectement un risque pour la santé publique.

Article 9

1. Les États membres peuvent prévoir des dérogations à la présente directive pour tenir compte:

a) de situations relatives à la nature et à la structure des terrains de l'aire dont est tributaire la ressource considérée.

Lorsqu'un État membre décide une telle dérogation, il en informe la Commission dans les deux mois qui suivent sa décision en précisant les motifs de la dérogation ;

b) de situations relatives à des circonstances météorologiques exceptionnelles.

Lorsqu'un État membre décide une telle dérogation, il en informe la Commission dans les quinze jours qui suivent sa décision en précisant les motifs et la durée de la dérogation.

2. Les États membres n'informent la Commission des dérogations visées au paragraphe 1 que si celles-ci concernent un approvisionnement en eau au moins égal à 1 000 mètres cubes par jour ou une population au moins égale à 5 000 personnes.

3. Les dérogations prises en vertu du présent article ne peuvent en aucun cas concerner les facteurs toxiques et

microbiologiques ni entraîner un risque pour la santé publique.

Article 10

1. En cas de circonstances accidentelles graves, les autorités nationales compétentes peuvent autoriser, pendant une période de temps limitée et jusqu'à concurrence d'une valeur maximale qu'elles fixent, un dépassement des concentrations maximales admissibles figurant à l'annexe I, dans la mesure où ce dépassement ne présente aucun risque inacceptable pour la santé publique et où l'approvisionnement en eau destinée à la consommation humaine ne peut être assuré d'aucune autre façon.

2. Sans préjudice de l'application de la directive 75/440/CEE, et, en particulier, de son article 4 paragraphe 3, lorsqu'un État membre est contraint, pour son approvisionnement en eau potable, d'avoir recours à une eau superficielle qui n'atteint pas les concentrations impératives de la catégorie d'eau A 3 au sens de l'article 2 de ladite directive, et qu'il ne peut envisager un traitement approprié pour obtenir une eau alimentaire de la qualité définie par la présente directive, cet État membre peut autoriser, pendant une période de temps limitée et jusqu'à concurrence d'une valeur maximale admissible qu'il fixe, un dépassement des concentrations maximales admissibles figurant à l'annexe I, dans la mesure où ce dépassement ne présente aucun risque inacceptable pour la santé publique.

3. Les États membres qui ont recours aux dérogations visées au présent article en informent immédiatement la Commission en lui indiquant les motifs et la durée probable de ces dérogations.

Article 11

Les États membres veillent à ce que l'application des dispositions prises en vertu de la présente directive ne puisse avoir pour effet de permettre directement ou indirectement, d'une part, la dégradation de la qualité actuelle des eaux destinées à la consommation humaine et, d'autre part, l'accroissement de la pollution des eaux destinées à la production d'eau potable.

Article 12

1. Les États membres prennent toutes les dispositions nécessaires pour que soit effectué un contrôle régulier de la qualité des eaux destinées à la consommation humaine.

2. Ces contrôles portent sur toutes les eaux destinées à la consommation humaine, au point de mise à la disposition de l'utilisateur, afin de vérifier leur conformité aux exigences spécifiés à l'annexe I.

3. Les lieux de prélèvement des échantillons sont déterminés par les autorités nationales compétentes.

nécessaires pour que soit effectué un contrôle régulier de la qualité des eaux destinées à la consommation humaine ;

considérant que le progrès scientifique et technique nécessite une adaptation rapide des méthodes analytiques de référence de la présente directive ; qu'il convient, pour faciliter la mise en œuvre des mesures nécessaires à cet effet, de prévoir une procédure instaurant une coopération étroite entre les États membres et la Commission au sein d'un comité pour l'adaptation aux progrès scientifique et technique,

A ARRÊTÉ LA PRÉSENTE DIRECTIVE :

Article premier

La présente directive concerne les exigences auxquelles doit satisfaire la qualité des eaux destinées à la consommation humaine.

Article 2

Au sens de la présente directive on entend par eaux destinées à la consommation humaine toutes les eaux utilisées à cette fin, soit en l'état, soit après traitement, de quelque origine qu'elles soient :

- qu'il s'agisse d'eaux livrées à la consommation
- ou
- qu'il s'agisse d'eaux :
 - utilisées dans une entreprise alimentaire à des fins de fabrication, de traitement, de conservation ou de mise sur le marché de produits ou substances destinés à être consommés par l'homme
 - et
 - affectant la salubrité de la denrée alimentaire finale.

Article 3

En ce qui concerne les eaux visées à l'article 2 deuxième tiret, les États membres appliquent les valeurs pour les paramètres toxiques et microbiologiques visés respectivement aux tableaux D et E de l'annexe I, ainsi que les valeurs des autres paramètres considérés par les autorités nationales compétentes comme susceptibles d'affecter la salubrité de la denrée alimentaire finale.

Article 4

1. La présente directive ne s'applique pas :

- a) aux eaux minérales naturelles reconnues ou définies comme telles par les autorités nationales compétentes ;

- b) aux eaux médicinales reconnues comme telles par les autorités nationales compétentes.

2. Les États membres ne peuvent, pour des motifs concernant la qualité des eaux utilisées, interdire ni entraver la mise sur le marché des denrées alimentaires si la qualité des eaux utilisées est conforme à la présente directive, à moins que cette mise sur le marché ne comporte des risques pour la santé publique.

Article 5

La présente directive s'applique sans préjudice des dispositions spécifiques contenues dans d'autres réglementations communautaires.

Article 6

1. Les États membres communiquent à la Commission :

- les informations appropriées au niveau des secteurs industriels pour lesquels les autorités nationales compétentes considèrent que la salubrité du produit final, au sens de l'article 2, n'est pas effectuée par la qualité de l'eau utilisée,
- les valeurs nationales des paramètres autres quotoxiques et microbiologiques visés à l'article 3.

2. La Commission procède à un examen de ces informations et, le cas échéant, entreprend les actions appropriées. Elle prépare périodiquement un rapport de synthèse à l'intention des États membres.

Article 7

1. Les États membres fixent les valeurs applicables aux eaux destinées à la consommation humaine pour les paramètres figurant à l'annexe I.

2. En ce qui concerne les paramètres pour lesquels aucune valeur ne figure à l'annexe I, les États membres peuvent ne pas fixer de valeurs en application du paragraphe 1, tant qu'elles n'ont pas été déterminées par le Conseil.

3. En ce qui concerne les paramètres figurant dans les tableaux A, B, C, D et E de l'annexe I :

- les valeurs à fixer par les États membres doivent être inférieures ou égales aux valeurs figurant dans la colonne « Concentration maximale admissible »

Cette demande dûment motivée devra faire état des difficultés rencontrées et devra proposer un plan d'action, accompagné d'un calendrier, à mettre en œuvre pour l'amélioration de la qualité des eaux destinés à la consommation humaine.

La Commission procédera à un examen des plans d'action, y compris les calendriers. En cas de désaccord avec l'État membre concerné, elle présentera au Conseil, à leur sujet, des propositions appropriées.

Article 21

Les États membres sont destinataires de la présente directive.

Fait à Bruxelles, le 15 juillet 1980.

Par le Conseil

Le président

J. SANTER

4. Pour effectuer les contrôles, les États membres se conforment à l'annexe II.

5. Les États membres utilisent dans toute la mesure du possible les méthodes analytiques de référence mentionnées à l'annexe III.

Les laboratoires qui utilisent d'autres méthodes doivent s'assurer qu'elles conduisent à des résultats équivalents ou comparables à ceux obtenus avec les méthodes indiquées à l'annexe III.

Article 13

Les modifications nécessaires pour adapter les méthodes analytiques de référence figurant à l'annexe III au progrès scientifique et technique sont arrêtées conformément à la procédure prévue à l'article 15.

Article 14

a) Il est institué un comité pour l'adaptation au progrès scientifique et technique, ci-après dénommé « comité », composé de représentants des États membres et présidé par un représentant de la Commission.

b) Le comité établit son règlement intérieur.

Article 15

1. Dans le cas où il est fait référence à la procédure définie au présent article, le comité est saisi par son président, soit à l'initiative de celui-ci, soit à la demande du représentant d'un État membre.

2. Le représentant de la Commission soumet au comité un projet de mesures à prendre. Le comité émet son avis sur ce projet dans un délai que le président peut fixer en fonction de l'urgence de la question en cause. Il se prononce à la majorité de quarante et une voix, les voix des États membres étant affectées de la pondération prévue à l'article 148 paragraphe 2 du traité. Le président ne prend pas part au vote.

3. a) La Commission arrête les mesures envisagées lorsqu'elles sont conformes à l'avis du comité.

b) Lorsque les mesures envisagées ne sont pas conformes à l'avis du comité, ou en l'absence d'avis, la Commission soumet sans tarder au Conseil une proposition relative aux mesures à prendre. Le Conseil statue à la majorité qualifiée.

c) Si, à l'expiration d'un délai de trois mois à compter de la saisine du Conseil, celui-ci n'a pas statué, les mesures proposées sont arrêtées par la Commission.

Article 16

Les États membres peuvent prendre, pour les destinées à la consommation humaine, des dispositions plus sévères que celles prévues par la présente directive sans préjudice de l'article 4 paragraphe 2.

Article 17

Les États membres peuvent arrêter des dispositions particulières pour des mentions — tant sur les emballages ou étiquettes que dans la publicité — concernant la caractéristique appropriée d'une eau destinée à l'alimentation des nourrissons. Ces dispositions concernent également les propriétés de l'eau conditionnent l'utilisation desdites mentions.

Les États membres qui ont l'intention de prendre de telles mesures en informant préalablement les autres États membres et la Commission.

Article 18

1. Les États membres mettent en vigueur les dispositions législatives, réglementaires et administratives nécessaires pour se conformer à la présente directive et à ses annexes dans un délai de deux ans à compter de sa notification. Ils en informent immédiatement la Commission.

2. Les États membres communiquent à la Commission le texte des dispositions essentielles de leur droit interne qu'ils adoptent dans le domaine régi par la présente directive.

Article 19

Les États membres prennent les dispositions nécessaires pour que la qualité des eaux destinées à la consommation humaine soit rendue conforme à la présente directive dans un délai de cinq ans à compter de sa notification.

Article 20

Les États membres peuvent, dans des cas exceptionnels et pour des groupes de population géographique délimités, introduire auprès de la Commission une requête particulière quant à un délai supplémentaire pour le respect de l'annexe I.

	Paramètres	Expression des résultats	Niveau guide	Concentration maximale admissible	Observations
8	Chlorure	mg/l Cl	25		Concentration approximative au-delà de laquelle des effets risquent de se produire : 200 mg/l
9	Sulfates	mg/l SO ₄	25	250	
10	Silice	mg/l SiO ₂			Voir article 8
11	Calcium	mg/l Ca	100		
12	Magnésium	mg/l Mg	30	50	
13	Sodium	mg/l Na	20	175 à partir de 1984 et avec un percentile de 90) 150 (à partir de 1987 et avec un percentile de 80) (ces percentiles sont à calculer sur une période de référence de 3 ans)	<p>Les valeurs de ce paramètre tiennent compte des recommandations d'un groupe de travail de l'Organisation mondiale de la santé (OMS) (La Haye, mai 1978) concernant une réduction progressive de l'apport quotidien actuel total en chlorure de sodium à 6 grammes.</p> <p>La Commission présentera au Conseil à partir du 1^{er} janvier 1984 des rapports sur l'évolution concernant l'ingestion totale quotidienne de chlorure de sodium par la population.</p> <p>Dans ces rapports, la Commission examinera dans quelle mesure la concentration maximale admissible de 120 mg/l citée par le groupe de travail de l'OMS est nécessaire pour atteindre un niveau satisfaisant pour l'ingestion totale de chlorure de sodium et proposera, le cas échéant, au Conseil une nouvelle valeur de concentration maximale admissible pour le sodium et un délai pour atteindre une telle valeur</p> <p>La Commission présentera au Conseil, avant le 1^{er} janvier 1984, un rapport concernant la question de savoir si la période de référence de 3 ans relative au calcul des percentiles est fondée ou non sur le plan scientifique</p>
14	Potassium	mg/l K	10	12	
15	Aluminium	mg/l Al	0,05	0,2	
16	Dureté totale				Voir tableau F, page 23
17	Résidus secs	mg/l après séchage à 180 °C		1 500	
18	Oxygène dissous	% O ₂ de saturation			Valeur de saturation > 75 % excepté pour les eaux souterraines
19	Anhydride carbonique libre	mg/l CO ₂			L'eau ne devrait pas être agressive

ANNEXE I

LISTE DES PARAMÈTRES

A. PARAMÈTRES ORGANOLEPTIQUES

	Paramètres	Expression des résultats ⁽¹⁾	Niveau guide	Concentration maximale admissible	Observations
1	Couleur	mg/l échelle Pt/Co	1	20	
2	Turbidité	mg/l Si O ₂ unités Jackson	1 0,4	10 4	Mesure remplacée en certaines circonstances par celle de la transparence évaluée en m au disque de Secchi : — niveau guide : 6 m — concentration maximale admissible : 2
3	Odeur	taux de dilution	0	2 à 12 °C 3 à 25 °C	À rapprocher des déterminations gustatives
4	Saveur	taux de dilution	0	2 à 12 °C 3 à 25 °C	À rapprocher des déterminations olfactives

⁽¹⁾ Si, sur la base de la directive 71/354/CEE telle que modifiée en dernier lieu, un État membre utilise dans sa législation nationale adoptée conformément à la présente directive des unités de mesure autres que les unités indiquées dans la présente annexe, les leurs indiquées doivent avoir le même degré de précision.

B. PARAMÈTRES PHYSICO-CHIMIQUES (en relation avec la structure naturelle des eaux)

	Paramètres	Expression des résultats	Niveau guide	Concentration maximale admissible	Observations
5	Température	°C	12	25	
6	Concentration en ions hydrogène	unité pH	6,5 ≤ pH ≤ 8,5		L'eau ne devrait pas être agressive. Les valeurs du pH ne s'appliquent pas aux conditionnés. Valeur maximale admissible : 9,5
7	Conductivité	μS cm ⁻¹ à 20 °C	400		En correspondance avec la minéralisation eaux Valeurs correspondantes de la résistivité ohm/cm : 2 500

	Paramètres	Expression des résultats	Niveau guide	Concentration maximale admissible	Observations
32	Autres composés organochlorés ne relevant pas du paramètre n° 55	µg/l	1		La concentration en haloformes doit être réduite dans toute la mesure du possible
33	Fer	µg/l Fe	50	200	
34	Manganèse	µg/l Mn	20	50	
35	Cuivre	µg/l Cu	100 À la sortie des installations de pompage et/ou de préparation et de leurs annexes 3 000 Après 12 heures de stagnation dans la canalisation et au point de mise à la disposition du consommateur		Au-delà de 3 000 µg/l peuvent apparaître des saveurs astringentes, des colorations et des corrosions
36	Zinc	µg/l Zn	100 À la sortie des installations de pompage et/ou de préparation et de leurs annexes 5 000 Après 12 heures de stagnation dans la canalisation et au point de mise à la disposition du consommateur		Au-delà de 5 000 µg/l peuvent apparaître des saveurs astringentes, de l'opalescence et des dépôts granuleux
37	Phosphore	µg/l P ₂ O ₅	400	5 000	

C. PARAMÈTRES CONCERNANT DES SUBSTANCES INDÉSIRABLES (quantités excessives) (1)

	Paramètres	Expression des résultats	Niveau guide	Concentration maximale admissible	Observations
20	Nitrates	mg/l NO ₃	25	50	
21	Nitrites	mg/l NO ₂		0,1	
22	Ammonium	mg/l NH ₄	0,05	0,5	
23	Azote Kjeldahl (N de NO ₂ et NO ₃ exclus)	mg/l N		1	
24	Oxydabilité (KMnO ₄)	mg/l O ₂	2	5	Mesure faite à chaud et en milieu acide
25	Carbone organique total (TOC)	mg/l C			Toute cause d'augmentation des concentrations habituelles doit être recherchée
26	Hydrogène sulfuré	µg/l S		non détectable organoleptiquement	
27	Substances extractibles au chloroforme	résidu sec mg/l	0,1		
28	Hydrocarbures dissous ou émulsionnés (après extraction par éther) ; huiles minérales	µg/l		10	
29	Phénols (indice phénols)	µg/l C ₆ H ₅ OH		0,5	À l'exclusion des phénols naturels qui ne réagissent pas au chlore
30	Bore	µg/l B	1 000		
31	Agents de surface (réagissant au bleu de méthylène)	µg/l (lauryl sulfate)		200	

(1) Certaines de ces substances peuvent même être toxiques lorsqu'elles sont présentes en quantités très importantes.

	Paramètres	Expression des résultats	Niveau guide	Concentration maximale admissible	Observations
52	Antimoine	µg/l Sb		10	
53	Sélénium	µg/l Se		10	
54	Vanadium	µg/l V			
55	Pesticides et produits apparentés : — par substance individualisée — au total	µg/l		0,1 0,5	On entend par pesticides et produits apparentés : — les insecticides : — organochlorés persistants — organophosphorés — carbamates — les herbicides — les fongicides — les PCB et PCT
56	Hydrocarbures polycycliques aromatiques	µg/l		0,2	Substances de référence : — fluoranthène — benzo 3,4 fluoranthène — benzo 11,12 fluoranthène — benzo 3,4 pyrène — benzo 1,12 pérylène — indeno (1,2,3 — cd) pyrène

	Paramètres	Expression des résultats	Niveau guide	Concentration maximale admissible	Observations
38	Fluor	$\mu\text{g}/\text{F}$ 8 — 12 °C 25 — 30 °C		1 500 700	Concentration maximale admissible variable suivant la température moyenne de l'aire géographique considérée
39	Cobalt	$\mu\text{g}/\text{l Co}$			
40	Matières en suspension		Absence		
41	Chlore résiduel	$\mu\text{g}/\text{l Cl}$			Voir article 8
42	Baryum	$\mu\text{g}/\text{l Ba}$	100		
43	Argent	$\mu\text{g}/\text{l Ag}$		10	Si, dans un cas exceptionnel, il est fait un usage non systématique de l'argent pour le traitement des eaux, une valeur de concentration maximale admissible de 80 $\mu\text{g}/\text{l}$ peut être admise

D. PARAMÈTRES CONCERNANT DES SUBSTANCES TOXIQUES

	Paramètres	Expression des résultats	Niveau guide	Concentration maximale admissible	Observations
44	Arsenic	$\mu\text{g}/\text{l As}$		50	
45	Beryllium	$\mu\text{g}/\text{l Be}$			
46	Cadmium	$\mu\text{g}/\text{l Cd}$		5	
47	Cyanures	$\mu\text{g}/\text{l CN}$		50	
48	Chrome	$\mu\text{g}/\text{l Cr}$		50	
49	Mercurc	$\mu\text{g}/\text{l Hg}$		1	
50	Nickel	$\mu\text{g}/\text{l Ni}$		50	
51	Plomb	$\mu\text{g}/\text{l Pb}$		50 (en eau courante)	Dans le cas de canalisations en plomb, la teneur en plomb ne devrait pas être supérieure à 50 $\mu\text{g}/\text{l}$ dans un échantillon prélevé après écoulement. Si l'échantillon est prélevé directement ou après écoulement et que la teneur en plomb dépasse fréquemment ou sensiblement 100 $\mu\text{g}/\text{l}$, des mesures appropriées doivent être prises afin de réduire les risques d'exposition du consommateur au plomb.

F. CONCENTRATION MINIMALE REQUISE POUR LES EAUX LIVRÉES À LA CONSOMMATION HUMAINE ET AYANT SUBI UN TRAITEMENT D'ADOUCCISSEMENT

	Paramètres	Expression des résultats	Concentration minimale requise (eaux adoucies)	Observations
1	Dureté totale	mg/l Ca	60	} l'eau ne devrait pas être agressive
2	Concentration en ions hydrogène	pH		
3	Alcalinité	mg/l HCO ₃	30	
4	Oxygène dissous			

NB : — Les dispositions relatives à la dureté, à la concentration en ions hydrogène, à l'oxygène dissous et au calcium s'appliquent aussi aux eaux provenant de dessalement.

— Si, du fait de sa dureté naturelle excessive, l'eau est adoucie conformément au tableau F, avant d'être livrée à la consommation, sa teneur en sodium peut, dans des cas exceptionnels, être supérieure aux valeurs figurant dans la colonne des concentrations maximales admissibles. On s'efforcera toutefois de maintenir cette teneur à un niveau aussi bas que possible et il ne pourra pas être fait abstraction des impératifs imposés par la protection de la santé publique.

TABLEAU DE CORRESPONDANCE ENTRE DIVERSES UNITÉS DE MESURES DE LA DURETÉ DE L'EAU

	Degré français	Degré anglais	Degré allemand	Milligrammes de Ca	Millimoles de Ca
Degré français	1	0,70	0,56	4,008	0,1
Degré anglais	1,43	1	0,80	5,73	0,143
Degré allemand	1,79	1,25	1	7,17	0,179
Milligrammes de Ca	0,25	0,175	0,140	1	0,025
Millimoles de Ca	10	7	5,6	40,08	1

E. PARAMÈTRES MICROBIOLOGIQUES

	Paramètres	Résultats : volume de l'échantillon (en ml)	Niveau guide	Concentration maximale admissible	
				Méthode des membranes filtrantes	Méthode des tubes multiples (NPP)
57	Coliformes totaux ⁽¹⁾	100	—	0	NPP < 1
58	Coliformes fécaux	100	—	0	NPP < 1
	<i>Serratia</i> <i>sulfitoréducteurs</i>	20	—	—	NPP ≤ 1

Les eaux destinées à la consommation humaine ne doivent pas contenir d'organismes pathogènes.

En vue de compléter, en tant que de besoin, l'examen microbiologique des eaux destinées à la consommation humaine, il convient de rechercher, outre les germes figurant au tableau E, les germes pathogènes, en particulier :

- les salmonelles,
- les staphylocoques pathogènes,
- les bactériophages fécaux,
- les entérovirus.

Par ailleurs, ces eaux ne devraient contenir :

- ni organismes parasites,
- ni algues,
- ni autres éléments figurés (animalcules).

(¹) Sous réserve qu'un nombre suffisant d'échantillons soit examiné (95 % de résultats conformes).

	Paramètres		Résultats : volume de l'échantillon (en ml)	Niveau guide	Concentration maximale admissible	Observations
61	Dénombrements des germes totaux pour les eaux livrées à la consommation	37 °C	1	10 (¹) (²)	—	
		22 °C	1	100 (¹) (²)	—	
62	Dénombrement des germes totaux pour les eaux conditionnées	37 °C	1	5	20	Les États membres peuvent, sous leur responsabilité, lorsque sont respectés les paramètres 57, 58, 59 et 60 et en l'absence de germes pathogènes conditionner, pour leur usage interne des eaux dont le dénombrement de germes totaux dépasse les valeurs de concentration maximale admissible prescrites pour le paramètre 62 Les valeurs de concentration maxi- male admissible doivent être mesurées dans les 12 heures suivant le conditionnement, l'eau de échantillons étant maintenue une température constante pendant cette période de 12 heures
		22 °C	1	20	100	

(¹) Pour les eaux désinfectées les valeurs correspondantes doivent être nettement inférieures à la sortie de la station de traitement

(²) Tout dépassement de ces valeurs persistant au cours de prélèvements successifs doit donner lieu à vérification.

26. Hydrogène sulfuré	Spectrophotométrie d'absorption
27. Substances extractibles au chloroforme	Extraction liquide/liquide par du chloroforme purifié à pH neutre pesée du résidu
28. Hydrocarbures (dissous ou émulsionnés); huiles minérales	Spectrophotométrie d'absorption infrarouge
29. Phénols (indice phénols)	Spectrophotométrie d'absorption, méthode à la paranitraniline et méthode à l'amino-4-antipyrine
30. Bore	Absorption atomique — Spectrophotométrie d'absorption
31. Agents de surface (réagissant au bleu de méthylène)	Spectrophotométrie d'absorption au bleu de méthylène
32. Autres composés organochlorés	Chromatographie en phase gazeuse ou liquide après extraction par solvants appropriés et purification — Identification si nécessaire des constituants des mélanges. Détermination quantitative.
33. Fer	Absorption atomique — Spectrophotométrie d'absorption
34. Manganèse	Absorption atomique — Spectrophotométrie d'absorption
35. Cuivre	Absorption atomique — Spectrophotométrie d'absorption
36. Zinc	Absorption atomique — Spectrophotométrie d'absorption
37. Phosphore	Spectrophotométrie d'absorption
38. Fluor	Spectrophotométrie d'absorption — Méthode avec électrodes spécifiques
39. Cobalt	—
40. Matières en suspension	Méthode par filtration sur membrane poreuse 0,45 μ ou centrifugation (temps minimum 15 mn et accélération moyenne 2 800 à 3 200 g) séchage à 105 °C et pesée
41. Chlore résiduel	Titrimétrie — Spectrophotométrie d'absorption
42. Baryum	Absorption atomique

D. PARAMÈTRES CONCERNANT LES SUBSTANCES TOXIQUES

43. Argent	Absorption atomique
44. Arsenic	Spectrophotométrie d'absorption — Absorption atomique
45. Béryllium	—
46. Cadmium	Absorption atomique
47. Cyanures	Spectrophotométrie d'absorption
48. Chrome	Absorption atomique — Spectrophotométrie d'absorption
49. Mercure	Absorption atomique
50. Nickel	Absorption atomique
51. Plomb	Absorption atomique
52. Antimoine	Spectrophotométrie d'absorption

ANNEXE III

MÉTHODES ANALYTIQUES DE RÉFÉRENCE

A. PARAMÈTRES ORGANOLEPTIQUES

- | | |
|--------------|--|
| 1. Couleur | Méthodes photométrique aux étalons de l'échelle Pt/Co |
| 2. Turbidité | Méthode à la silice — Méthode à la formazine — Méthode de Secchi |
| 3. Odeur | Par dilutions successives, mesures faites à 12 °C ou à 25 °C |
| 4. Saveur | Par dilutions successives, mesures faites à 12 °C ou à 25 °C |

B. PARAMÈTRES PHYSICO-CHIMIQUES

- | | |
|------------------------------------|--|
| 5. Température | Thermométrie |
| 6. Concentration en ions hydrogène | Électrométrie |
| 7. Conductivité | Électrométrie |
| 8. Chlorures | Titrimétrie — Méthode de Mohr |
| 9. Sulfates | Gravimétrie — Complexométrie — Spectrophotométrie |
| 10. Silice | Spectrophotométrie d'absorption |
| 11. Calcium | Absorption atomique — Complexométrie |
| 12. Magnésium | Absorption atomique |
| 13. Sodium | Absorption atomique |
| 14. Potassium | Absorption atomique |
| 15. Aluminium | Absorption atomique — Spectrophotométrie d'absorption |
| 16. Dureté totale | Complexométrie |
| 17. Résidu sec | Dessiccation à 180 °C et pesée |
| 18. Oxygène dissous | Méthode de Winkler — Méthode avec électrodes spécifiques |
| 19. Anhydride carbonique libre | Acidimétrie |

C. PARAMÈTRES CONCERNANT LES SUBSTANCES INDÉSIRABLES

- | | |
|-----------------------------------|---|
| 20. Nitrates | Spectrophotométrie d'absorption — Méthode avec électrodes spécifiques |
| 21. Nitrites | Spectrophotométrie d'absorption |
| 22. Ammonium | Spectrophotométrie d'absorption |
| 23. Azote Kjeldahl | Oxydation — Titrimétrie/Spectrophotométrie d'absorption |
| 24. Oxydabilité | KMnO ₄ à l'ébullition pendant 10 minutes en milieu acide |
| 25. Carbone organique total (TOC) | — |

Bactériophages fécaux	Technique de Guélin
Entérovirus	Concentration par filtration, par flocculation ou par centrifugation et identification
Protozoaires	Concentration par filtration sur membrane, examen microscopique, test de pathogénicité
Animalcules (vers — larves)	Concentration par filtration sur membrane — Examen microscopique — Test de pathogénicité.

F. CONCENTRATION MINIMALE REQUISE

Alcalinité	Acidimétrie au méthylorange
------------	-----------------------------

Normes de qualité microbiologique des eaux destinées à la consommation humaine ou à l'industrie.

1. MINISTERE FRANCAIS DE LA SOLIDARITE, DE LA SANTE ET DE LA PROTECTION SOCIALE. (Avril 1990)

- L'eau destinée à la consommation humaine ne doit pas contenir des micro-organismes pathogènes, en particulier de salmonelles dans 5 litres d'eau prélevée, de staphylocoques pathogènes dans 100 ml d'eau prélevée, de bactériophages fécaux dans 50 ml d'eau prélevée, et d'enterovirus dans un volume ramené à 10 litre d'eau prélevée.

- 95 % au moins des échantillons prélevés ne doivent pas contenir des coliformes dans 100 ml d'eau.

- L'eau ne doit pas contenir de coliformes thermotolérants et de streptocoques fécaux dans 100 ml d'eau prélevée.

- L'eau ne doit pas contenir plus d'une spore de bactéries anaérobies sulfito-réductrices par 20 ml d'eau prélevée.

- Lorsque les eaux sont livrées sous forme conditionnée, le dénombrement des bactéries aérobies revivifiables à 37°C et après 24 heures, doit être inférieur ou égal à 20 par ml d'eau prélevée; à 22°C et après 72 heures, il doit être inférieur ou égal à 100 par ml d'eau prélevée. L'analyse est commencée dans les 12 heures suivant le conditionnement.

(Extrait du Décret n°90 - 330 du 10 avril 1990).

2. GUIRAUD, J. et GALZY, P. (1980) P. 116 - 117.

En France les critères microbiologiques d'une eau potable pouvant être distribuée sont les suivants :

- Eau non traitée :

- . Absence de germes pathogènes et de parasites
- . Absence d'Escherichia coli dans 100 ml d'eau
- . Absence de Streptocoques fécaux dans 50 ml d'eau
- . Absence de Clostridium sulfito-réducteurs dans 20 ml d'eau.

- Eau traitée :

- . Absence de germes pathogènes et de parasites
- . Absence d'Escherichia coli dans 100 ml d'eau
- . Absence de streptocoques fécaux dans 50 ml d'eau
- . La présence de Clostridium sulfito-réducteur en petit nombre est tolérable.

Ces caractéristiques s'appliquent aux eaux conservées, embouteillées et à la glace pour usage alimentaire.

Au niveau international, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) préconise les normes suivantes (outre l'absence générale de germes pathogènes et parasites) :

* Eau d'adduction à l'entrée du réseau :

- Eau désinfectée

. Absence de coliformes dans 100 ml d'eau traitée

- Eau non désinfectée

. Absence d'Escherichia coli dans 100 ml d'eau traitée.

. Nombres de coliformes tolérés dans 100 ml d'eau: au maximum 3.

* Eau d'adduction à l'intérieur du réseau :

. Sur une année, la proportion d'échantillons de 100 ml exempts de coliformes ne doit pas être inférieure à 95%

. Absence d'Escherichia coli dans 100 ml d'eau

. Aucun échantillon ne doit contenir plus de 10 coliformes.

. Des coliformes ne doivent pas être décelés dans deux échantillons successifs de 100 ml.

* Eau d'approvisionnement isolé

. Nombre de coliformes tolérés dans 100 ml d'eau : au maximum 10.

. Absence d'Escherichia coli dans 100 ml d'eau.

Ces normes microbiologiques sont variables d'un pays à l'autre. Ces normes sanitaires s'appliquent aux eaux utilisées dans l'industrie en particulier lorsque l'eau est directement

utilisée en contact de l'aliment. Toutefois, en milieu industriel, il sera dangereux de dépasser 1000 bactéries/ml.

Les normes de MIQUEL dépassées du point de vue sanitaire donnent des indications utiles sur la qualité de l'eau au niveau industriel.

0 à 100 bactéries/ml	eau très pure
100 à 1.000 bactéries/ml	eau pure
1.000 à 10.000 bactéries/ml	eau médiocre
10.000 à 100.000 bactéries/ml	eau impure
plus de 100.000 bactéries/ml	eau très impure

annexe 5: Données utilisées pour la modélisation de la croissance de *Candida pelliculosa* dans le nectar de goyave en fonction des variations de pH et des températures de stockage.

température (°C)	pH	DO max.
2.0000	2.0000	0.0732
2.0000	2.5000	0.1040
2.0000	3.1500	0.1477
2.0000	4.0000	0.1648
2.0000	5.0000	0.1693
2.0000	6.2500	0.1848
2.0000	2.0000	0.0650
2.0000	3.1500	0.1330
2.0000	4.0000	0.1742
2.0000	5.0000	0.1757
2.0000	6.2500	0.1626
5.0000	2.0000	0.1015
5.0000	2.5000	0.2070
5.0000	3.1500	0.2484
5.0000	4.0000	0.2838
5.0000	5.0000	0.2872
5.0000	6.2500	0.2970
5.0000	2.0000	0.1049
5.0000	2.5000	0.1822
5.0000	3.1500	0.2719
5.0000	4.0000	0.3157
5.0000	5.0000	0.3250
5.0000	6.2500	0.3072
10.0000	2.0000	0.3149
10.0000	2.5000	0.5932
10.0000	5.0000	0.6813
10.0000	6.2500	0.6885
10.0000	2.0000	0.3129
10.0000	3.1500	0.6894
10.0000	4.0000	0.7199
10.0000	5.0000	0.6440
10.0000	6.2500	0.7122
15.0000	2.0000	0.3506
15.0000	2.5000	0.5320
15.0000	3.1500	0.5868
15.0000	4.0000	0.6090
15.0000	5.0000	0.6670
15.0000	6.2500	0.6490
15.0000	2.0000	0.2768
15.0000	2.5000	0.5831
15.0000	4.0000	0.6491
15.0000	5.0000	0.6287
25.0000	2.0000	0.4871
25.0000	2.5000	0.7245
25.0000	3.1500	0.9276
25.0000	4.0000	1.1041
25.0000	5.0000	1.0197
25.0000	6.2500	0.9294

25.0000	2.0000	0.3912
25.0000	2.5000	0.7068
25.0000	3.1500	0.9911
25.0000	4.0000	1.0146
25.0000	5.0000	1.0771
25.0000	6.2500	0.9465
32.0000	2.0000	0.5025
32.0000	2.5000	0.6945
32.0000	3.1500	0.9869
32.0000	4.0000	0.9785
32.0000	5.0000	1.0626
32.0000	6.2500	1.0421
32.0000	2.0000	0.4196
32.0000	2.5000	0.8636
32.0000	3.1500	0.9501
32.0000	4.0000	1.0138
32.0000	5.0000	1.0925
32.0000	6.2500	1.0508
35.0000	3.1500	0.7199
35.0000	4.0000	0.9025
35.0000	5.0000	1.0010
35.0000	6.2500	0.9848
35.0000	2.0000	0.1741
35.0000	2.5000	0.5890
35.0000	3.1500	0.8318
35.0000	4.0000	0.8953
37.0000	2.5000	0.6070
37.0000	3.1500	0.6894
37.0000	4.0000	0.9463
37.0000	5.0000	1.0917
37.0000	2.0000	0.1801
37.0000	2.5000	0.5147
37.0000	3.1500	0.6889
37.0000	4.0000	1.1338
37.0000	5.0000	1.1094
37.0000	6.2500	1.0951

Annexe 6: Données utilisées pour la modélisation de la croissance de *Candida holmii* dans le jus d'ananas et le nectar de goyave en fonction des variations de pH et des températures de stockage.

<i>Candida holmii</i> dans le jus d'ananas			<i>Candida holmii</i> dans le nectar de goyave		
T (°C)	pH	DO max	T (°C)	pH	DO max
2.0000	2.0000	0.3857	2.0000	2.0000	0.2228
2.0000	2.0000	0.3738	2.0000	2.0000	0.2016
2.0000	2.5000	0.5987	2.0000	2.5000	0.2974
2.0000	2.5000	0.5933	2.0000	2.5000	0.3070
2.0000	3.1500	0.6677	2.0000	3.1500	0.3296
2.0000	3.1500	0.5388	2.0000	3.1500	0.3202
2.0000	4.0000	0.5691	2.0000	4.0000	0.3235
2.0000	4.0000	0.4634	2.0000	4.0000	0.3305
2.0000	5.0000	0.4964	2.0000	5.0000	0.3103
2.0000	5.0000	0.4887	2.0000	5.0000	0.3376
2.0000	6.2500	0.4964	2.0000	6.2500	0.3834
2.0000	6.2500	0.4837	2.0000	6.2500	0.2636
5.0000	2.0000	0.4425	5.0000	2.0000	0.2572
5.0000	2.0000	0.4594	5.0000	2.0000	0.2401
5.0000	2.5000	0.6557	5.0000	2.5000	0.3135
5.0000	2.5000	0.7087	5.0000	2.5000	0.3040
5.0000	3.1500	0.7871	5.0000	3.1500	0.3359
5.0000	3.1500	0.7396	5.0000	3.1500	0.3716
5.0000	4.0000	0.6302	5.0000	4.0000	0.3446
5.0000	4.0000	0.4513	5.0000	4.0000	0.3534
5.0000	5.0000	0.4724	5.0000	5.0000	0.3449
5.0000	5.0000	0.4402	5.0000	5.0000	0.3355
5.0000	6.2500	0.4156	5.0000	6.2500	0.2466
5.0000	6.2500	0.4159	5.0000	6.2500	0.2415
10.0000	2.0000	1.6757	10.0000	2.0000	0.3888
10.0000	2.0000	1.6009	10.0000	2.0000	0.4408
10.0000	2.5000	1.5630	10.0000	2.5000	0.5704
10.0000	2.5000	1.5739	10.0000	2.5000	0.5660
10.0000	3.1500	1.5562	10.0000	3.1500	0.6573
10.0000	4.0000	1.4143	10.0000	3.1500	0.7050
10.0000	5.0000	1.4028	10.0000	4.0000	0.6705
10.0000	5.0000	1.6496	10.0000	4.0000	0.6851
10.0000	6.2500	1.3615	10.0000	5.0000	0.6248
10.0000	6.2500	1.3830	10.0000	5.0000	0.6959
15.0000	2.0000	1.8724	10.0000	6.2500	0.5058
15.0000	2.0000	1.7616	10.0000	6.2500	0.4527
15.0000	2.5000	1.8367	15.0000	2.0000	0.5675
15.0000	2.5000	1.6848	15.0000	2.0000	0.5287
15.0000	3.1500	1.5945	15.0000	2.5000	0.7311
15.0000	4.0000	1.6967	15.0000	2.5000	0.7314
15.0000	5.0000	1.6311	15.0000	3.1500	0.7993
15.0000	6.2500	1.6809	15.0000	3.1500	0.8405
25.0000	2.0000	0.0397	15.0000	4.0000	0.8465
25.0000	2.0000	2.1958	15.0000	4.0000	0.8314
25.0000	2.5000	2.2396	15.0000	5.0000	0.7866

25.0000	2.5000	2.2267	15.0000	5.0000	0.8323
25.0000	3.1500	2.5492	15.0000	6.2500	0.6806
25.0000	3.1500	2.5220	15.0000	6.2500	0.7235
25.0000	4.0000	2.3543	25.0000	2.0000	0.5724
25.0000	4.0000	2.3018	25.0000	2.0000	0.5342
25.0000	5.0000	2.3028	25.0000	2.5000	0.7901
25.0000	5.0000	2.2839	25.0000	2.5000	0.8354
25.0000	6.2500	2.2267	25.0000	3.1500	0.8354
25.0000	6.2500	2.2171	25.0000	3.1500	0.9106
32.0000	2.0000	1.9459	25.0000	4.0000	0.9247
32.0000	2.0000	1.9479	25.0000	4.0000	0.8943
32.0000	2.5000	0.1227	25.0000	5.0000	0.8275
32.0000	2.5000	2.0162	25.0000	5.0000	0.9224
32.0000	3.1500	2.2292	25.0000	6.2500	0.7332
32.0000	3.1500	2.1683	25.0000	6.2500	0.8336
32.0000	4.0000	2.3552	32.0000	2.0000	0.4535
32.0000	4.0000	2.2931	32.0000	2.0000	0.4638
32.0000	5.0000	2.2648	32.0000	2.5000	0.7425
32.0000	5.0000	2.2306	32.0000	2.5000	0.6480
32.0000	6.2500	2.1663	32.0000	3.1500	1.0903
32.0000	6.2500	2.1774	32.0000	3.1500	0.8469
35.0000	2.0000	1.4747	32.0000	4.0000	0.7895
35.0000	2.0000	1.5204	32.0000	4.0000	0.7977
35.0000	2.5000	1.9511	32.0000	5.0000	0.9171
35.0000	2.5000	1.9100	32.0000	5.0000	1.1107
35.0000	3.1500	2.0217	32.0000	6.2500	0.7593
35.0000	3.1500	2.0630	32.0000	6.2500	0.7217
35.0000	4.0000	2.1583	35.0000	2.0000	0.3619
35.0000	4.0000	2.1782	35.0000	2.0000	0.3543
35.0000	5.0000	2.0665	35.0000	2.5000	0.3914
35.0000	5.0000	2.0411	35.0000	2.5000	0.4877
35.0000	6.2500	1.9827	35.0000	3.1500	0.5579
35.0000	6.2500	1.9955	35.0000	3.1500	0.5416
37.0000	2.0000	1.4387	35.0000	4.0000	0.5540
37.0000	2.0000	1.3999	35.0000	4.0000	0.5413
37.0000	2.5000	1.7819	35.0000	5.0000	0.6189
37.0000	2.5000	1.6749	35.0000	5.0000	0.5736
37.0000	3.1500	2.1043	35.0000	6.2500	0.5848
37.0000	3.1500	2.0673	35.0000	6.2500	0.5121
37.0000	4.0000	2.1151	37.0000	2.0000	0.3605
37.0000	4.0000	2.0681	37.0000	2.0000	0.3057
37.0000	5.0000	2.0526	37.0000	2.5000	0.3973
37.0000	5.0000	2.0129	37.0000	2.5000	0.3833
37.0000	6.2500	2.0150	37.0000	3.1500	0.4784
37.0000	6.2500	2.0187	37.0000	3.1500	0.4407
			37.0000	4.0000	0.5236
			37.0000	4.0000	0.5525
			37.0000	5.0000	0.4992
			37.0000	5.0000	0.4999
			37.0000	6.2500	0.4396
			37.0000	6.2500	0.4216

Annexe 7: Données utilisées pour la modélisation de la croissance de *Kloeckera apis* dans le nectar de goyave en fonction des variations de pH et des températures de stockage.

Température (°C)	pH	DO max
2.0000	2.0000	0.0760
2.0000	2.0000	0.0678
2.0000	2.5000	0.2488
2.0000	2.5000	0.2804
2.0000	3.1500	0.3245
2.0000	3.1500	0.3163
2.0000	4.0000	0.2741
2.0000	4.0000	0.2459
2.0000	5.0000	0.2486
2.0000	5.0000	0.2578
2.0000	6.2500	0.1940
2.0000	6.2500	0.2086
5.0000	2.0000	0.2917
5.0000	2.0000	0.2795
5.0000	2.5000	0.4680
5.0000	2.5000	0.4684
5.0000	3.1500	0.4694
5.0000	3.1500	0.4799
5.0000	4.0000	0.4175
5.0000	4.0000	0.4233
5.0000	5.0000	0.3857
5.0000	5.0000	0.4007
5.0000	6.2500	0.4478
5.0000	6.2500	0.4312
10.0000	2.0000	0.3686
10.0000	2.0000	0.3713
10.0000	2.5000	0.5365
10.0000	2.5000	0.5568
10.0000	3.1500	0.5365
10.0000	3.1500	0.5515
10.0000	4.0000	0.5143
10.0000	4.0000	0.5094
10.0000	5.0000	0.5316
10.0000	5.0000	0.5145
10.0000	6.2500	0.4889
15.0000	2.0000	0.4122
15.0000	2.0000	0.4093
15.0000	2.5000	0.5600
15.0000	2.5000	0.5628
15.0000	3.1500	0.5850
15.0000	3.1500	0.5835
15.0000	4.0000	0.5680
15.0000	4.0000	0.5670
15.0000	5.0000	0.5868
15.0000	5.0000	0.5894
15.0000	6.2500	0.5410
15.0000	6.2500	0.5355
25.0000	2.0000	0.4353
25.0000	2.0000	0.4601

25.0000	2.5000	0.5430
25.0000	2.5000	0.5403
25.0000	3.1500	0.5417
25.0000	3.1500	0.5165
25.0000	4.0000	0.5416
25.0000	4.0000	0.5517
25.0000	5.0000	0.5861
25.0000	5.0000	0.5318
25.0000	6.2500	0.5058
25.0000	6.2500	0.5262
32.0000	2.0000	0.4003
32.0000	2.0000	0.4096
32.0000	2.5000	0.5884
32.0000	2.5000	0.5319
32.0000	3.1500	0.4887
32.0000	3.1500	0.4939
32.0000	4.0000	0.5371
32.0000	4.0000	0.5423
32.0000	5.0000	0.5507
32.0000	5.0000	0.5414
32.0000	6.2500	0.5210
32.0000	6.2500	0.5072
35.0000	2.0000	0.3950
35.0000	2.0000	0.3716
35.0000	2.5000	0.4444
35.0000	2.5000	0.4392
35.0000	3.1500	0.4357
35.0000	3.1500	0.4525
35.0000	4.0000	0.4508
35.0000	4.0000	0.4562
35.0000	5.0000	0.4526
35.0000	5.0000	0.4548
35.0000	6.2500	0.4034
35.0000	6.2500	0.3919
37.0000	2.0000	0.3531
37.0000	2.0000	0.3922
37.0000	2.5000	0.4139
37.0000	2.5000	0.4389
37.0000	3.1500	0.4204
37.0000	3.1500	0.3983
37.0000	4.0000	0.4216
37.0000	4.0000	0.4291
37.0000	5.0000	0.4067
37.0000	5.0000	0.4393
37.0000	6.2500	0.3832
37.0000	6.2500	0.3704
39.0000	2.0000	0.0471
39.0000	2.0000	0.0670
39.0000	2.5000	0.4676
39.0000	2.5000	0.4891
39.0000	3.1500	0.4048
39.0000	3.1500	0.3441
39.0000	4.0000	0.3198
39.0000	4.0000	0.2988
39.0000	5.0000	0.2368
39.0000	5.0000	0.3308
39.0000	6.2500	0.2708

39.0000	6.2500	0.3076
46.0000	2.0000	0.0390
46.0000	2.0000	0.0364
46.0000	2.5000	0.0357
46.0000	2.5000	0.0330
46.0000	3.1500	0.0386
46.0000	3.1500	0.0363
46.0000	4.0000	0.0402
46.0000	4.0000	0.0389
46.0000	5.0000	0.0621
46.0000	5.0000	0.0473
46.0000	6.2500	0.0354
46.0000	6.2500	0.0333

