

**THESE**  
présentée à  
**L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES**  
**DE LILLE**

Pour obtenir le titre de  
**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE**

Spécialité : Sciences de la Vie et de la Santé

Option : **Microbiologie**

par

**Iffat CHOWDHURY**



**ETUDE DES INTERACTIONS ENTRE LA LEVURE**  
***Saccharomyces cerevisiae* ET DES BACTERIES**  
**ANAEROBIES STRICTES, CONTAMINANTS DE LA**  
**BIERE, DE TYPE *Pectinatus* ET *Megasphaera***

Soutenue le 13 février 1997 devant la Commission d'Examen

**Président:** Pr. R. TAILLIEZ (Université des Sciences et Technologies de Lille)  
**Rapporteurs:** Pr. M. RAHMAN (Université de Dhaka, Bangladesh)  
Dr. A. PAUSS (Université de Technologie de Compiègne)  
**Examineurs:** Pr. D. GUILLOCHON (Université des Sciences et Technologies de Lille)  
Pr. J.P. HORNEZ (Université des Sciences et Technologies de Lille)  
Dr. J. L. THOLOZAN (INRA, Villeneuve d'Ascq)

## *Remerciements*

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

*Que Monsieur **Jean-Pierre HORNEZ**, Professeur à l'I.U.T de l'Université des Sciences et Technologies de Lille, accepte toute ma gratitude pour m'avoir incité et aidé à faire ce travail. Sans lui je n'aurais jamais pu présenter cette thèse et je mesure la chance qu'il m'a offerte.*

*J'adresse mes plus vifs remerciements à Monsieur le Professeur **Mustafizur RAHMAN** de l'Université de Dhaka, Bangladesh, pour avoir spontanément accepté d'être Rapporteur de cette thèse.*

*Je tiens également à remercier Monsieur le Docteur **André PAUSS** de Université de Compiègne qui a accepté d'être rapporteur de mes travaux pour la soutenance de ma thèse.*

*J'adresse mes vifs et sincères remerciements à Monsieur le Professeur **Didier GUILLOCHON** de l'Université des Sciences et Technologies de Lille pour avoir accepté de faire partie du Jury.*

*Je demande à Monsieur le Docteur **Jean-Luc THOLOZAN** de l'I.N.R.A. de Villeneuve d'Ascq, qui me fait l'honneur de juger ce travail, d'accepter mes remerciements les plus chaleureux.*

*Je remercie également le Docteur **Ivan LEGUERINEL** de l'Université de Bretagne Occidentale à Quimper, ainsi que le Docteur **Denis WATIER** de l'Université du Littoral à Calais qui n'ont ménagé aucun effort pour le suivi de mes travaux durant ces quatre années ainsi que pour la correction de ce manuscrit. Qu'ils trouvent ici l'expression de ma profonde gratitude.*

*Je remercie Monsieur le Docteur **Claude DEFIVES** pour ses compétences en microscopie électronique.*

*Je réserve à Messieurs Les Docteurs **Max BECHET** et **Yann TIERNY** une mention particulière car ils m'a toujours encouragé avec beaucoup de patience, de gentillesse et de compétence. Qu'ils soient aussi remerciés pour l'aide et les conseils judicieux qu'ils m'ont apportés.*

*A tous les gens qui ont participé, de près ou de loin, à ce travail, notamment Mesdemoiselles **Sophie MAILLET** et **Annick ROSE**, étudiantes de 3ème cycle de l'U.S.T.L., s'adresse toute ma reconnaissance et mes remerciements pour leurs conseils amicaux et leur soutien moral constant.*

*Je remercie l'ensemble du personnel du Laboratoire de Microbiologie de l'Université des Sciences et Technologies de Lille pour la sympathie qu'il m'a toujours témoignée et qui a largement contribué au bon déroulement de cette thèse.*

*Les travaux relatifs à cette Thèse n'auraient jamais pu être achevés sans l'obtention d'une bourse de l'Ambassade de France au Bangladesh.*

*Enfin , ma famille, mes amis et connaissances m'ont beaucoup soutenu pendant mon séjour en France, en particulier mon frère Monsieur **Imrul CHOWDHURY**, mon oncle et ma tante, Monsieur et Madame les Docteurs **HAQUE**, chercheurs au CNRS, mes cousins Shujan et Nicolas **HAQUE** à Marseille; Monsieur et Madame **VOREUX** à Roubaix. Je leur adresse mes sincères remerciements pour leur soutien moral constant et leur renouvelle toute mon amitié et ma sympathie.*

*I thank my friend **Mr. Sohel AHMAD** of Austria for his help during a 8-months difficult period in France.*

## DEDICACE

*A mes parents pour toute l'admiration que j'ai envers vous.*

*A toute ma famille, et tout particulièrement ma femme, pour  
m'avoir toujours soutenu même dans les moments difficiles et qui  
a été moralement éprouvée par mes longues absences en France  
dans le cadre de cette Thèse.*

# ETUDE DES INTERACTIONS ENTRE LA LEVURE *Saccharomyces cerevisiae* ET DES BACTERIES ANAEROBIES STRICTES, CONTAMINANTS DE LA BIERE, DE TYPE *Pectinatus* ET *Megasphaera*

## RESUME

Pendant la fermentation du moût, par la levure *Saccharomyces cerevisiae*, nous avons montré que l'oxygénation préalable, traditionnelle en brasserie, n'élimine pas totalement le risque de contamination de la bière par des bactéries anaérobies strictes telles que *Pectinatus cerevisiiphilus* ou *Megasphaera cerevisiae*. En effet, à 15°C, les conditions anaérobies sont rapidement retrouvées grâce à la croissance des levures; les bactéries contaminantes survivantes se développent alors lentement pour atteindre des concentrations cellulaires finales de  $2,6 \times 10^6$  cellules/ml pour *Pectinatus* et  $6 \times 10^6$  cellules/ml pour *Megasphaera*. Dans ces conditions leurs produits de fermentation, acide propionique, acide butyrique et acide acétique s'accumulent en quantité telle qu'ils altèrent les qualités organoleptiques de la bière contaminée. L'étude en condition pilote de l'évolution des populations de *P. cerevisiiphilus* et *M. cerevisiae* lors de la réutilisation répétée de fonds de cuve montre que la qualité de la bière est significativement altérée à partir du troisième recyclage pour un ensemencement de 4800 cellules bactériennes/ml et à partir du cinquième recyclage pour un ensemencement de 180 cellules bactériennes/ml.

L'étude de la résistance à l'oxygène en culture pure a montré que *P. cerevisiiphilus* et *M. cerevisiae* sont capables de résister plusieurs heures dans du moût saturé en oxygène malgré leur caractère anaérobie strict. La résistance à l'oxygène est fortement influencée par la température, elle est beaucoup plus faible à 32°C qu'à 15°C et 8°C. La résistance est nettement plus élevée en culture mixte avec *S. cerevisiae* qui protégerait ces bactéries en absorbant l'oxygène et en créant à sa périphérie une zone pauvre en oxygène dissous.

Les effets de la température sur la croissance des différents organismes et la synthèse de leurs produits de fermentation ont été étudiés lors de cultures pures et lors de cultures mixtes bactérie-levure. Dans ce dernier cas, on observe peu de modifications de la fermentation du moût en-dessous de 15°C. Au delà, et avec un maximum à 32°C (température optimale de développement des bactéries), les interactions entre levures et bactéries sont nettement plus marquées. La croissance de la levure est régulièrement ralentie, de même que la synthèse d'éthanol. Les effets de la concentration en acide propionique, en acide acétique et en acide butyrique produits par les bactéries ont été mesurés sur la croissance des levures (population maximale et taux maximal de croissance). Au-dessus de 36 mmol/l d'acide propionique, de 25 mmol/l d'acide acétique ou de 10 mmol/l d'acide butyrique les levures ne se développent plus. Une additivité des effets du pH et de l'accumulation des acides organiques a été également observée. Par ailleurs, nous avons pu constater que *P. cerevisiiphilus* est capable en absence de toute autre source de substrat carboné de consommer l'éthanol produit par les levures; par contre *M. cerevisiae* en est incapable.

**Mots clés :** *Pectinatus*, *Megasphaera*, *Saccharomyces*, résistance, interaction, bière, culture mixte.

# STUDY OF INTERACTIONS BETWEEN YEAST *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* AND TWO STRICTLY ANAEROBIC BEER SPOILAGE BACTERIA *PECTINATUS* AND *MEGASPHAERA*

## SUMMARY

During the fermentation of the wort by yeast *Saccharomyces cerevisiae*, we have shown that the traditional prior oxygenation in breweries doesn't completely eliminate the risk of beer contamination by strictly anaerobic bacteria such as *Pectinatus cerevisiiphilus* or *Megasphaera cerevisiae*. Effectively, at 15°C, the anaerobic conditions are quickly found thanks to the developing of yeast; the surviving contaminating bacteria develop slowly to reach a final cellular concentration of  $2.6 \times 10^6$  cells/ml for *Pectinatus* and  $6 \times 10^6$  cells/ml for *Megasphaera*. In these conditions, their fermentation product, propionic acid, butyric acid and acetic acid accumulate in such quantities that they altered the flavour qualities of the contaminated beer. The study of *P. cerevisiiphilus* and *M. cerevisiae* population evolution during the repetitive re-utilisation of mash tub bottoms show that the beer quality is significantly altered starting at the third recycling for inoculation of 4800 bacteria cells/ml and starting at the fifth recycling for inoculation of 180 bacteria cells/ml.

The study of the resistance to oxygen in pure culture showed that *P. cerevisiiphilus* and *M. cerevisiae* can resist to several hours in oxygen saturated wort despite their strict anaerobic character. The resistance to oxygen is strongly influenced by temperature, it is a lot lower at 32°C than at 15°C and 8°C. The resistance is clearly higher in mixed cultures with *S. cerevisiae* which creates a zone with a low amount of dissolved oxygen at its periphery and could protect these bacteria by absorbing the oxygen.

The effect of temperature on the growth of different organisms and of the synthesis of their fermentation product have been studied during pure and mixed cultures: yeast-bacteria. In the latter case, little change is observed in the wort fermentation under 15°C. Above that and upto a maximum of 32°C (optimal temperature for bacteria growth), interactions between yeast and bacteria are clearer. The yeast growth steadily decreases, similarly to the ethanol synthesis. The effects of the concentration in propionic acid, acetic acid and butyric acid produced by the bacteria have been measured on the yeast growth (maximum population and maximum growth rate). Above 36 mmol/l in propionic acid, 25 mmol/l in acetic acid, or 10 mmol/l in butyric acid the yeast cease developing. An additivity of the pH and of the organic acid accumulation has also been observed. We have also been able to observe that *P. cerevisiiphilus* can in the absence of any carbonated substrate consume the ethanol produced by the yeast; on the contrary *M. cerevisiae* cannot do it.

**Keywords:** *Pectinatus*, *Megasphaera*, *Saccharomyces*, resistance, interaction, beer, mixed culture.



## LISTE DES PUBLICATIONS SE RAPPORTANT A CE TRAVAIL

- 1) WATIER D., LEGUERINEL I., HORNEZ J. P., **CHOWDHURY I.**, DUBOURGUIER H-C. 1995. Heat resistance of *Pectinatus* sp, a beer spoilage anaerobic bacterium. **Journal of Applied Bacteriology** **78**:164-168
- 2) **CHOWDHURY I.**, WATIER D., HORNEZ J. P. 1995. Variability in survival of *Pectinatus cerevisiiphilus*, strictly anaerobic bacteria, under different oxygen conditions. **Anaerobe** **1**: 151-156
- 3) **CHOWDHURY I.**, WATIER D., LEGUERINEL I., HORNEZ J. P. 1996. Effect of *Pectinatus cerevisiiphilus* on *Saccharomyces cerevisiae* concerning its growth and alcohol production during wort fermentation. **Food Microbiology** ( sous presse; FM 291)
- 4) WATIER D., **CHOWDHURY I.**, LEGUERINEL I., HORNEZ J. P. 1996. Survival of *Megasphaera cerevisiae* heated in laboratory media, wort and beer. **Food Microbiology** **13**:205-212
- 5) **CHOWDHURY I.**, WATIER D., HORNEZ J. P. Conditions of oxygen resistance of *Megasphaera cerevisiae*, a strictly anaerobic bacterium. **Anaerobe** (soumise, UK 96/018)
- 6) WATIER D., **CHOWDHURY I.**, LEGUERINEL I., HORNEZ J. P. 1996. Influence of physicochemical and biological environment on the growth of anaerobic beer spoilage bacteria: *Megasphaera cerevisiae*. **Applied and Environmental Microbiology** (soumise, AEM 1530-96)

### COMMUNICATIONS:

- 1) **CHOWDHURY I.**, WATIER D., LEGUERINEL I., et HORNEZ J. P. 1994. Thermorésistance de *Megasphaera cerevisiae*. **Colloque SFM : Nouvelles Tendances en Microbiologie Anaérobie**. Villeneuve d'Ascq, France. 17-18 Mars 1994. (affiche)  
**Communication développée dans :** Nouvelles Tendances en Microbiologie Anaérobie. Colloque SFM Villeneuve d'Ascq, France. Mars 1994. Edité par la **Société Française de Microbiologie, Paris**. P. 335-338.
- 2) WATIER D., **CHOWDHURY I.**, LEGUERINEL I., et HORNEZ J. P. 1994. Etude de la survie de *Pectinatus cerevisiiphilus* en milieu oxygéné. **Colloque SFM : Nouvelles Tendances en Microbiologie Anaérobie**. Villeneuve d'Ascq, France. 17-18 Mars 1994. (affiche)  
**Communication développée dans :** Nouvelles Tendances en Microbiologie Anaérobie. Colloque SFM Villeneuve d'Ascq, France. Mars 1994. Edité par la **Société Française de Microbiologie, Paris**. P. 537-540.

L'intégralité de ce travail sera présenté au cours du colloque "Microbiologie Anaérobie" de la Société Française de Microbiologie organisé à Lille en les 20 et 21 mars 1997.

# **TABLE DES MATIERES**

# TABLE DES MATIERES

<b>INTRODUCTION</b>	1
<b>GENERALITES</b>	5
<b>1. HISTORIQUE</b>	5
<b>2. LA FABRICATION DE LA BIERE</b>	5
2.1. Le brassage	5
2.2. Le fermentation principale ou fermentation alcoolique	6
2.3. La fermentation de garde	7
2.4. La filtration	8
2.4.1. Soutirage et pasteurisation	8
<b>3. LES MICRO-ORGANISMES CONTAMINANTS DE LA BIERE</b>	10
3.1. Les contaminantes habituels	10
3.1.1. Contamination par d'autres levures	11
3.1.2. Contamination par les bactéries	12
3.1.2.1. Bactéries lactiques à Gram-négatif, anaérobies facultatives	12
3.1.2.1.1. <i>Lactobacillus</i>	12
3.1.2.1.2. <i>Pediococcus</i>	12
3.2. Autres bactéries à Gram négatif, anaérobies facultatives et strictes	13
3.2.1. <i>Entérobactéries</i>	13
3.2.2. Bactéries acétiques	14
3.2.3. <i>Zymomonas</i>	15
3.3. Nouveaux contaminants bactériens : <i>Pectinatus</i> et <i>Megasphaera</i>	15
<b>4. GENERALITES SUR <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i>:</b>	16
<b>5. GENERALITES SUR <i>PECTINATUS</i>:</b>	18
5.1. Historique	18
5.2. Taxonomie et Différentiation	19
5.3. Caractéristiques morphologiques	19

5.4. Propriétés biochimiques et physiologiques de <i>Pectinatus</i>	21
5.5. Conditions de croissance	23
5.6. Propriétés antigéniques	24
5.7. Caractéristiques sérologiques	24
<b>6. GENERALITES SUR MEGASPHAERA CEREVISIAE</b>	<b>25</b>
6.1. Historique	25
6.2. Taxonomie et différenciation	25
6.3. Caractéristiques morphologiques	25
6.4. Propriétés biochimiques et physiologiques de <i>Megasphaera</i>	26
6.5. Conditions de croissance	27
<b>7. GENERALITES SUR LES CULTURES MIXTES</b>	<b>28</b>
7.1. Les interactions microbiennes	28
7.1.1. Les différents types d'interactions	28
7.1.1.1. Neutralisme	29
7.1.1.2. Inhibition	29
7.1.1.2. (a). Compétition	29
7.1.1.2. (b). Amensalisme	30
7.1.1.2. (c). Parasitisme	30
7.1.1.2. (d). Prédation	30
7.1.1.3. Coopération	30
7.1.1.3. (a). Commensalisme	31
7.1.1.3. (b,c). Mutualisme et proto coopération	31
7.1.2. Exemples d'interactions entre levures et bactéries dans différents milieux	31
7.2. Méthode d'étude des interactions	32
7.2.1. Réponses mesurées	32
7.2.2. Facteurs de variations	33
<b>8. RESISTANCE BACTERIENNE A L'OXYGENE DE L'ENVIRONNEMENT</b>	<b>34</b>

# MATERIEL ET METHODES

<b>INTRODUCTION</b>	36
<b>1. SOUCHES UTILISEES</b>	36
1.1. L'origine des souches	36
1.2. Conservation des souches et remise en culture	36
<b>2. MILIEUX DE CULTURE</b>	37
2.1. Milieux synthétiques	38
2.1.1. Milieu Man-Rogosa-Sharpe (MRS) réduit	38
2.1.2. Milieu minimum	38
2.1.3 Préparation des milieux synthétiques	39
2.1.3.1 En fermenteur	39
2.1.3.2. En tube de Félix	39
2.1.3.3. En boîte de Pétri anaérobie	40
2.2. Milieux industriels	40
2.2.1. le moût de brasserie	40
2.2.2. la bière	41
<b>3. MATERIEL UTILISE POUR REALISER LES CULTURES</b>	43
3.1. Culture en tube	43
3.2. Culture en flacons	43
3.3. Culture en bioréacteurs	44
<b>4. LE DENOMBREMENT DES MICRO-ORGANISMES</b>	46
4.1. Détermination du nombre d'UFC	46
4.2. Comptage des organismes sur cellule de Thoma	46
4.3. Mesure de l'absorbance	47
<b>5. CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE</b>	47
5.1. Calibration de la colonne	47
5.2. Passage des échantillons	47

<b>6. L'ETUDE DE L'EVOLUTION DES POPULATIONS DE <i>PECTINATUS</i> ET DE <i>MEGASPHAERA</i> EN CO-CULTURE AVEC DES LEVURES LORS DE LA FABRICATION DE LA BIERE</b>	49
6.1. Préculture	49
6.2. Description de la fermentation	49
<b>7. ETUDE DES INTERACTIONS BACTERIES - LEVURES DURANT LA FERMENTATION PRINCIPALE</b>	50
7.1. Effet sur la croissance	50
7.1.1 Les différents types d'interactions	50
7.1.2 Détermination de la nature de l'interaction	51
7.2. Effet des levures sur la résistance à l'oxygène des bactéries anaérobies strictes	52
7.2.1. Mesure en culture pure	52
7.2.2. Mesure en culture mixte	53
7.2.3. Traitement des données	54
7.3. Techniques de microscopie électronique	54

## RESULTATS ET DISCUSSION

<b>1. ETUDE DE L'EVOLUTION DES POPULATIONS DE <i>PECTINATUS</i> ET <i>MEGASPHAERA</i> EN CO-CULTURE AVEC <i>SACCHAROMYCES</i> LORS DE LA FABRICATION DE LA BIERE</b>	56
1.1. Evolution des populations de levures et de bactéries lors d'une contamination expérimentale	58
1.1.1 Suivi de la cinétique de croissance de <i>Pectinatus</i> , lors de la fermentation d'un moût par <i>S. cerevisiae</i> à différentes températures (15°C et 22°C) en microbrasserie	58
1.1.2. Suivi de la cinétique de croissance de <i>Megasphaera</i> , lors de la fermentation d'un moût par <i>Saccharomyces</i> à différentes températures (15°C et 22°C) en microbrasserie	61
1.2. Etude de l'évolution d'une contamination du moût par <i>Pectinatus</i> et <i>Megasphaera</i> (durant la fermentation) lors de la réutilisation d'un fond de cuve.	64

## **2. INFLUENCE DES LEVURES SUR LA RESISTANCE DE *PECTINATUS* ET *MEGASPHAERA* A L'OXYGENE DISSOUS**

66

2.1. Resistance de <i>Pectinatus</i> et <i>Megasphaera</i> vis a vis de l'oxygène en culture pure et mixte	66
2.1.1. Résistance à l'oxygène en culture pure de <i>Pectinatus</i>	67
2.1.2. Résistance à l'oxygène en culture mixte de <i>Pectinatus</i> et <i>Saccharomyces</i>	71
2.1.3. Etude en microscopie électronique	72
2.1.4. Résistance à l'oxygène en culture pure de <i>Megasphaera</i>	74
2.1.5. Résistance à l'oxygène en culture mixte de <i>Megasphaera</i> et <i>Saccharomyces</i>	76
2.2. Discussion sur la résistance à l'oxygène	78

## **3. MISE EN EVIDENCE D'INTERACTIONS PAR L'ETUDE DES CINETIQUES DE CROISSANCE ET DE PRODUCTION DES DIFFERENTS METABOLITES LORS DES CULTURE PURE ET MIXTE DE *P. CEREVISIIPHILUS* ET *S. CEREVISIAE* SUR DIFFERENTS MILEUX A 30°C**

80

3.a. Dans un Milieu minimum	80
3.b. Dans le Milieu MRS	83
3.c. Dans le moût de bière	86
3.d. Dans le Milieu bière	89

3.1. Etude des interactions entre *Pectinatus* et *Saccharomyces* dans le milieu moût de bière en fonction de la température. 94

3.1.1. Suivi de la croissance et de la production de différents métabolites par <i>Saccharomyces</i> en culture pure	94
3.1.1.1. Croissance à 30°C	94
3.1.1.2. Croissance à 15°C	94
3.1.1.3. Croissance à 8°C	95

3.1.2. Suivi de la croissance et de la production de différents métabolites par trois souches de *Pectinatus* en culture pure 96

3.1.2.1. Croissance à 30°C	97
----------------------------	----

3.1.2.2. Croissance à 15°C	98
3.1.2.3. Croissance à 8°C	99
3.1.3. Suivi de la croissance et de la production de différents métabolites par des souches de <i>Pectinatus</i> en co-culture avec <i>Saccharomyces</i>	102
3.1.3.1. Croissance à 30°C	103
3.1.3.2. Croissance à 15°C	110
3.1.3.3. Croissance à 8°C	111
3.2. Définition caractérisation, et analyse des interactions de <i>Pectinatus</i> et <i>Saccharomyces</i> en culture mixte sur moût de brasserie	113
3.2.1. Détermination des types d'interaction observés en fonction de la température selon BIZEAU	113
3.2.2. Culture mixtes de <i>Saccharomyces</i> et <i>Pectinatus</i> : effet sur le maximum des population observé en fin de développement dans le moût à différents températures.	117
3.2.3. Effet des modifications chimiques du milieu lors de la croissance de <i>Pectinatus</i> sur la croissance de <i>Saccharomyces</i> en culture mixte	119
3.2.3.1. Mise en évidence de les effets	120
3.2.3.2. Influence relative du pH et du propionate sur la croissance des levures	120
3.2.3.3. Effet de la concentration et de la nature des acides organiques sur la croissance des levures	123
3.2.4. Culture mixte et production d'éthanol	124
3.3. Discussion	126
<b>4. ETUDE DES INTERACTIONS ENTRE <i>MEGASPHAERA CEREVISIAE</i> ET <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> DANS UN MOUT DE BRASSERIE</b>	130
4.1. Suivi de la croissance et de la production des différents métabolites par <i>M.cerevisiae</i> en culture pure	130
4.1.1. Croissance à 30°C	130
4.1.2. Croissance à 15°C	131

4.2. Suivi de la croissance et de la production des différents métabolites par <i>S. cerevisiae</i> en culture pure	132
4.3. Suivi de la croissance et de la production des différents métabolites par <i>M. cerevisiae</i> et <i>S. cerevisiae</i> en culture mixte	133
4.3.1. Croissance à 30°C	133
4.3.2. Croissance à 15°C	134
4.4. Mise en évidence des interactions	136
4.4.1. Détermination des types d'interaction observés en fonction de la température selon BIZEAU	136
4.4.2. Culture mixtes de <i>Saccharomyces</i> et <i>Megasphaera</i> : effet sur le maximum des population observé en fin de développement dans le moût à différents températures.	138
4.4.3. Effet des modifications chimiques du milieu lors de la croissance de <i>Megasphaera</i> sur la croissance de <i>Saccharomyces</i> en culture mixte	141
4.4.4. Influence relative du pH et du acide butyrique sur la croissance des levures	142
4.4.5. Effet de la concentration et de la nature des acide organique sur la croissance des levures	144
4.5. Discussion	145
<b>CONCLUSION GENERALE</b>	147
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>	149
<b>ANNEXES</b>	

## **LISTE DES ILLUSTRATIONS**

## Liste des Tableaux

- Tableau 1.** Relation entre l'absorbance et le nombre de cellules déterminé par comptage sur cellule de Thoma. 57
- Tableau 2.** Valeurs des temps de destruction décimale ( $D_{oxy}$ ) des souches *P. cerevisiiphilus* DSM 20466, *P. sp.* DSM 20465 et *P. frisingensis* ATCC 33332 (4,78 mg/l d'oxygène dissous, 32°C, pH 5,2); de *P. cerevisiiphilus* DSM 20466 pour différents taux d'oxygène dissous (32°C, pH 5,2), et dans le moût saturé en oxygène (air) à différentes températures. 68
- Tableau 3.** Valeurs des temps de destruction décimale ( $D_{oxy}$ ) de la souche *M. cerevisiae* DSM 20461, dans le moût, à différents températures (4,78 mg/l d'oxygène dissous, pH 5,2); pour différents taux d'oxygène dissous (à 32°C, pH 5,2) et en culture mixte avec *S. cerevisiae*. 76
- Tableau 4.** Paramètres de croissance et produits de fermentation en culture pure et mixte de *S. cerevisiae* et *P. cerevisiiphilus*, menées à 30°C dans le milieu minimum en condition anaérobie. 82
- Tableau 5.** Paramètres de croissance et produits de fermentation en culture pure et mixte de *S. cerevisiae* et *P. cerevisiiphilus*, menées à 30°C dans le milieu MRS en condition anaérobie. 85
- Tableau 6.** Paramètres de croissance et produits de fermentation en culture pure et mixte de *S. cerevisiae* et *P. cerevisiiphilus*, menées à 30°C dans le moût en condition anaérobie. 88
- Tableau 7.** Paramètres de croissance et produits de fermentation en culture pure et mixte de *S. cerevisiae* et *P. cerevisiiphilus*, menées à 30°C dans la bière en condition anaérobie. 92
- Tableau 8.** Paramètres de croissance et produits de fermentation en culture pure et mixte de *S. cerevisiae* et deux souches de *Pectinatus*, menées à 30°C dans le moût en condition anaérobie. 105
- Tableau 9.** Paramètres de croissance et produits de fermentation en culture pure et mixte de *S. cerevisiae* et *P. cerevisiiphilus*, menées à 15°C dans le moût en condition anaérobie. 106
- Tableau 10.** Paramètres de croissance et produits de fermentation en culture pure et mixte de *S. cerevisiae* et trois souches de *Pectinatus*, menées à 8°C dans le moût en condition anaérobie. 107
- Tableau 11.** Type de interactions entre *Pectinatus* et *Saccharomyces* à 30°C 114
- Tableau 12.** Recherche d'interactions entre *Pectinatus* et *Saccharomyces* 115
- Tableau 13.** Type de interactions entre *Pectinatus* et *Saccharomyces* à 8°C 116

<b><u>Tableau 14.</u></b> Interaction entre <i>P. cerevisiiphilus</i> et <i>S. cerevisiae</i> à différentes températures dans le moût.	<b>118</b>
<b><u>Tableau 15.</u></b> Comparaison des taux d'éthanol et d'acide propionique au début et en fin d'expérience.	<b>126</b>
<b><u>Tableau 16.</u></b> Paramètres de croissance et produits de fermentation en culture pure et mixte de <i>S. cerevisiae</i> et <i>M. cerevisiae</i> , menées à 30°C dans le moût en condition anaérobie.	<b>134</b>
<b><u>Tableau 17.</u></b> Paramètres de croissance et produits de fermentation en culture pure et mixte de <i>S. cerevisiae</i> et <i>M. cerevisiae</i> , menées à 15°C dans le moût en condition anaérobie.	<b>134</b>
<b><u>Tableau 18.</u></b> Type de interactions entre <i>Megasphaera</i> et <i>Saccharomyces</i> à 30°C	<b>136</b>
<b><u>Tableau 19.</u></b> Recherche d'interactions entre <i>Megasphaera</i> et <i>Saccharomyces</i>	<b>137</b>
<b><u>Tableau 20.</u></b> Interaction entre <i>M. cerevisiae</i> et <i>S. cerevisiae</i> à différentes températures dans le moût.	<b>139</b>

## Liste des Figures

**Figure 1.** Cinétique de développement de *P. cerevisiiphilus* DSM 20466 (■), lors de fermentation d'un moût par *S. cerevisiae* (▲) en microbrasserie à 15°C, pH (----), oxygène dissous (—). 59

**Figure 2.** Cinétique de développement de *P. cerevisiiphilus* DSM 20466 (■), lors de fermentation d'un moût par *S. cerevisiae* (▲) en microbrasserie à 22°C, pH (----), oxygène dissous (—). 60

**Figure 3.** Cinétique de développement de *M. cerevisiae* DSM 20461 (■), lors de fermentation d'un moût par *S. cerevisiae* (▲) en microbrasserie à 15°C, pH (----), oxygène dissous (—). 62

**Figure 4.** Cinétique de développement de *M. cerevisiae* DSM 20461 (■), lors de la fermentation d'un moût par *S. cerevisiae* (▲) en microbrasserie à 22°C, pH (----), oxygène dissous (—). 62

**Figure 5.** Utilisation d'un fond de cuve contaminé à différentes concentrations par *P. cerevisiiphilus* pour réensemencer une second fermentation et plus à 15°C. 65

**Figure 6.** Courbes de destruction de *P. cerevisiiphilus* (▲), *Pectinatus sp.* (●) et *P. frisingensis* (■) par l'oxygène à 32°C et à un taux d'oxygène dissous de 4,78 mg/l. 67

**Figure 7.** Courbes de destruction de *P. cerevisiiphilus* DSM 20466 par l'oxygène à 32°C en fonction du temps pour différents taux d'oxygène dissous, 5,74 mg/l (■) 4,78 mg/l (▲) 3,34 mg/l (●) et 0,96 mg/l (x). 69

**Figure 8.** Courbes de destruction de *P. cerevisiiphilus* DSM 20466 par l'oxygène (saturation par bullage d'air) en fonction du temps pour différentes températures, 32°C (▲), 15°C (□) et 8°C (△). 70

**Figure 9.** Courbes de destruction de *P. cerevisiiphilus* par l'oxygène (saturation par bullage d'air) en culture pure (■) et en culture mixte (□) à 32°C et un taux d'oxygène dissous de 4,78 mg/l. 71

**Figure 10.** Evolution de la population de *P. cerevisiiphilus* DSM 20466 (■ comptage en tube de Felix) et *S. cerevisiae* (▲ comptage par cellule de Thoma) en culture mixte sous bullage d'air sur moût à 32°C. 72

**Figure 11.** Courbes de destruction de *M. cerevisiae* DSM 20461 par l'oxygène à 32°C en fonction du temps pour différents taux d'oxygène dissous, 5,74 mg/l (■); 4,78 mg/l (▲); 3,34 mg/l (●) et 0,96 mg/l (x). 74

**Figure 12.** Courbes de destruction de *M. cerevisiae* DSM 20461 par l'oxygène (saturation par bullage d'air) en fonction du temps pour différentes températures, 32°C (▲), 15°C (□) et 8°C (△). 75

**Figure 13.** Courbes de destruction de *M. cerevisiae* DSM 20461 par l'oxygène (saturation par bullage d'air) en culture pure (■) et en culture mixte (□) à 32°C avec un taux d'oxygène dissous de 4,78 mg/l. 77

**Figure 14.** Evolution de la populations de *M. cerevisiae* DSM 20461 (■ comptage en tube de Felix) et *S. cerevisiae* (▲ comptage par cellule de Thoma) en culture mixte sous bullage d'air dans un moût à 32°C). 77

**Figure 15.** Cinétique de croissance en culture pure de *P. cerevisiiphilus* DSM20466 (■) en milieu minimum ( 30°C; à pH<sub>initial</sub>= 6 ) en fermenteur; et évolution de la composition du milieu en glucose (▲); ac. propionique (□); ac.acétique (Δ). 81

**Figure 16.** Cinétique de croissance en culture pure de *S. cerevisiiphilus* (●) en milieu minimum (30°C; à pH<sub>initial</sub>= 6) en fermenteur; et évolution de la composition du milieu en glucose (▲); éthanol (○). 81

**Figure 17.** Cinétique de croissance en culture mixte de *P. cerevisiiphilus* DSM20466 (■) et *S. cerevisiae* (●); en milieu minimum ( 30°C; pH<sub>initial</sub>= 6 ) en fermenteur et évolution de la composition du milieu en glucose (▲); ac. propionique (□); ac.acétique (Δ); éthanol (○). 82

**Figure 18.** Cinétique de croissance en culture pure de *P. cerevisiiphilus* (■) en milieu MRS (30°C; à pH<sub>initial</sub>= 6) en fermenteur; et évolution de la composition du milieu en glucose (▲); ac. propionique [ $\times 10^{-1}$ ] (□); ac. acétique [ $\times 10^{-1}$ ] (Δ). 83

**Figure 19.** Cinétique de croissance en culture pure de *S. cerevisiiphilus* (●) en milieu MRS (30°C; à pH<sub>initial</sub>= 6) en fermenteur; et évolution de la composition du milieu en glucose (▲); éthanol [ $\times 10^{-1}$ ] (○). 84

**Figure 20.** Cinétique de croissance en culture mixte de *P. cerevisiiphilus* (■) et *S. cerevisiae* (●) en milieu MRS ( 30°C; pH<sub>initial</sub>= 6 ) en fermenteur et évolution de la composition du milieu en glucose (▲); ac. propionique [ $\times 10^{-1}$ ] (□); ac. acétique [ $\times 10^{-1}$ ] (Δ); et éthanol (○). 84

**Figure 21.** Cinétique de croissance de *P. cerevisiiphilus* (■) en culture pure dans le moût ( 30°C; pH<sub>initial</sub> (+) = 5,2 ) et évolution de la composition du milieu en glucose(▲); fructose (◆); ac. propionique (□); ac. acétique (Δ); maltose (◇) et maltotriose (×). 87

**Figure 22.** Cinétique de croissance de *S. cerevisiae* (●) en culture pure dans le moût (30°C; pH<sub>initial</sub>(+) = 5,2) et évolution de la composition du milieu en glucose(▲); fructose (◆); éthanol [ $\times 10^{-1}$ ] (○); maltose (◇) et maltotriose (×). 87

**Figure 23.** Cinétique de croissance de *P. cerevisiiphilus* (■)et de *S. cerevisiae* (●) en culture mixte dans le moût ( 30°C; pH<sub>initial</sub> (+) =5,2 ) et évolution de la composition du milieu en glucose(▲); fructose (◆); ac. propionique (□); ac. acétique (Δ); éthanol (○); maltose (◇); maltotriose (×) 88

**Figure 24.** Cinétique de croissance en culture pure de *P. cerevisiophilus* (■) sur bière (30°C; à pH<sub>initial</sub>= 4,23 ) en fermenteur; et évolution de la composition du milieu en glucose(▲); ac. propionique (□), glycérol (Δ); éthanol [ $\times 10^{-1}$  (○)]. 90

**Figure 25.** Cinétiques de croissance en culture pure de *S. cerevisiae* (●) sur bière ( 30°C; pH<sub>initial</sub>= 4,23 ) en fermenteur et évolution de la composition du milieu en glucose (▲); éthanol [ $\times 10^{-1}$  (○)]. 91

**Figure 26.** Cinétiques de croissance en culture mixte de *P. cerevisiophilus* (■) et *S. cerevisiae* (●) sur bière ( 30°C; pH<sub>initial</sub>= 4,23 ) en fermenteur et évolution de la composition du milieu en glucose (▲); ac. propionique (□); éthanol [ $\times 10^{-1}$  (○)]. 91

**Figure 27.** Cinétique de croissance de *S. cerevisiae* (●) en culture pure dans le moût (15°C; pH<sub>initial</sub> = 5,2) et évolution de la composition du milieu en glucose (▲);fructose (◆); éthanol [ $\times 10^{-1}$  (○)]; maltose (◇) et maltotriose (×). 95

**Figure 28.** Cinétique de croissance de *S. cerevisiae* (●) en culture pure dans le moût (8°C; pH<sub>initial</sub> = 5,2) et évolution de la composition du milieu en glucose(▲); fructose (◆); éthanol [ $\times 10^{-1}$  (○)]; maltose (◇) et maltotriose (×). 96

**Figure 29.** Cinétique de croissance de *Pectinatus sp.* (■) en culture pure dans le moût ( 30°C; pH<sub>initial</sub> = 5,2 ) et évolution de la composition du milieu en glucose (▲); fructose (◆); ac. propionique (□); ac. acétique (Δ). 97

**Figure 30.** Cinétique de croissance de *P. frisingensis* (■) en culture pure dans le moût (30°C; pH<sub>initial</sub> = 5,2 ) et évolution de la composition du milieu en glucose (▲); fructose (◆); ac. propionique (□); ac. acétique (Δ). 98

**Figure 31.** Cinétique de croissance de *P. cerevisiophilus* (■) en culture pure dans le moût (15°C; pH<sub>initial</sub> = 5,2 ) et évolution de la composition du milieu en glucose (▲); fructose (◆); ac. propionique (□); ac. acétique (Δ). 99

**Figure 32.** Cinétique de croissance de *P. cerevisiophilus* (■) en culture pure dans le moût (8°C; pH<sub>initial</sub> = 5,2 ) et évolution de la composition du milieu en glucose (▲); fructose (◆); ac. propionique (□); ac. acétique (Δ). 100

**Figure 33.** Cinétique de croissance de *Pectinatus sp.* (■) en culture pure dans le moût (8°C; pH<sub>initial</sub> (+) = 5,2 ) et évolution de la composition du milieu en glucose(▲); fructose (◆); ac. propionique (□); ac. acétique (Δ). 100

**Figure 34.** Cinétique de croissance de *P. frisingensis* (■) en culture pure dans le moût (8°C; pH<sub>initial</sub> = 5,2 ) et évolution de la composition du milieu en glucose(▲); fructose (◆); ac. propionique (□); ac. acétique (Δ). 101

**Figure 35.** Cinétique de croissance de *Pectinatus sp.* (■) et de *S. cerevisiae* (●) en culture mixte dans le moût (30°C; pH<sub>initial</sub> = 5,2) et évolution de la composition du milieu en glucose(▲); fructose (◆); ac. propionique (□); ac. acétique (Δ); éthanol (○); maltose (◇), maltotriose(×). 104

**Figure 36.** Cinétique de croissance de *P. frisingensis* (■) et de *S. cerevisiae* (●) en culture mixte dans le moût (30°C; pH<sub>initial</sub> = 5,2) et évolution de la composition du milieu en glucose (▲); fructose (◆); ac. propionique (□); ac. acétique (△); éthanol (○); maltose (◇), maltotriose (×). 109

**Figure 37.** Cinétique de croissance de *P. cerevisiiphilus* (■) et de *S. cerevisiae* (●) en culture mixte dans le moût ( 15°C; pH<sub>initial</sub>=5,2. ) et évolution de la composition du milieu en glucose(▲); fructose (◆); ac. propionique (□); ac. acétique (△); éthanol [ $\times 10^{-1}$  (○)]; maltose (◇) et maltotriose (×). 110

**Figure 38.** Cinétique de croissance de *P. cerevisiiphilus* (■) et de *S. cerevisiae* (●) en culture mixte dans le moût ( 8°C; pH<sub>initial</sub>= 5,2 ) et évolution de la composition du milieu en glucose(▲); fructose (◆); ac. propionique (□); ac. acétique (△); éthanol [ $\times 10^{-1}$  (○)]; maltose (◇) et maltotriose (×). 111

**Figure 39.** Cinétique de croissance de *Pectinatus sp.* (■) et de *S. cerevisiae* (●) en culture mixte dans le moût ( 8°C; pH<sub>initial</sub>=5,2 ) et évolution de la composition du milieu en glucose(▲); fructose (◆); ac. propionique (□); ac. acétique (△); éthanol [ $\times 10^{-1}$  (○)]; maltose (◇) et maltotriose (×). 112

**Figure 40.** Cinétique de croissance de *P. frisingensis* (■) et de *S. cerevisiae* (●) en culture mixte dans le moût ( 8°C; pH<sub>initial</sub>= 5,2 ) et évolution de la composition du milieu en glucose (▲); fructose (◆); ac. propionique (□); ac. acétique (△); éthanol [ $\times 10^{-1}$  (○)]; maltose (◇) et maltotriose (×). 112

**Figure 41** Comparaison des populations finales de *S. cerevisiae* et *P. cerevisiiphilus* en culture pure (●)(■) et mixte (○)(□) dans le moût à différentes températures (°C). Valeur de rapport (▲) (Rp/Rm). 117

**Figure 42.** Comparaison des cinétiques de croissances et production d'éthanol de *S. cerevisiae* en culture pure(●)( $\times 10^{-1}$  ○), en culture pure sur moût dégradé par *P.cerevisiiphilus* pendant 5 jours (▲)(△), en culture mixte (■)(□) sur moût à 30°C, à pH<sub>initial</sub>= 5,2. 119

**Figure 43 a.** Cinétique de croissance de *S. cerevisiae* à pH fixe sans ajout d'acide propionique 120

**Figure 43 b.** Evolution de pH sans ajout d'acide propionique 120

**Figure 43 c.** ajout d'acide propionique avec pH fixe; 121

**Figure 43 d.** Ajout d'acide propionique avec évolution du pH. 121

**Figure 44.** Cinétique de croissance de *S. cerevisiae* en fonction de différentes pH sur moût à 30°C. 122

**Figure 45.** Taux de croissance maximum de *S. cerevisiae* en présence de différentes concentrations d'acide propionique (■); d'acide acétique (▲) dans du moût à 30°C et à pH 5,2. 123

**Figure 46.** Comparaison des cinétiques de croissance de *P. cerevisiophilus* en culture pure sur moût normal (▲), sur moût avec addition d'éthanol (○) et en culture mixte sur moût normal (□) à 30°C, à  $pH_{initial}=5,2$ . 124

**Figure 47.** Comparaison des taux d'éthanol ajoutés (pendant la cinétique de croissance de *P. cerevisiophilus* ■) dans le fermenteur (▲) et révélé par HPLC (□), éthanol consommé (×). 125

**Figure 48.** Cinétique de croissance de *M. cerevisiae* (■) en culture pure dans le moût (30°C;  $pH_{initial}(+)=5,2$ ) et évolution de la composition du milieu en glucose (▲); fructose (◆); maltose (◇); maltotriose (×); acide butyrique (□); acide acétique (△). 131

**Figure 49.** Cinétique de croissance de *M. cerevisiae* (■) en culture pure dans le moût à 15°C;  $pH_{initial}=5,2$ ) et évolution de la composition du milieu en glucose (▲); fructose (◆); maltose (◇); maltotriose (×); acide butyrique (□); acide acétique (△). 132

**Figure 50.** Cinétique de croissance de *M. cerevisiae* (■) et *S. cerevisiae* (●) en culture mixte dans le moût (30°C;  $pH_{initial}(+)=5,2$ ) et évolution de la composition du milieu en glucose (▲); fructose (◆); maltose (◇) et maltotriose (×); ac. butyrique (□); ac. acétique (△); éthanol (○). 133

**Figure 51.** Cinétique de croissance de *M. cerevisiae* (■) et *S. cerevisiae* (●) en culture mixte dans le moût (15°C;  $pH_{initial}=5,2$ ) et évolution de la composition du milieu en glucose (▲); fructose (◆); maltose (◇) et maltotriose (×); acide butyrique (□); acide acétique (△); éthanol [ $\times 10^{-1}$  (○)]. 135

**Figure 52.** Comparaison des populations finales de *S. cerevisiae* et *M. cerevisiae* en culture pure (●)(■) et mixte (○)(□) dans le moût à différentes températures (°C). Valeur de rapport (▲) (Rp/Rm). 139

**Figure 53.** Comparaison des cinétiques de croissances et production d'éthanol de *S. cerevisiae* en culture pure (●)( $\times 10^{-1}$  ○), en culture pure sur moût dégradé par *M. cerevisiae* DSM 20461 pendant 5 jours (▲)(△), en culture mixte (■)(□) sur moût à 30°C, à  $pH_{initial}=5,2$ . 141

**Figure 54 (a)** Cinétique de croissance de *S. cerevisiae* à pH (—) fixe sans ajout d'acide butyrique 142

**Figure 54 (b)** Evolution de pH (—) sans ajout d'acide butyrique 142

**Figure 54 (c)** Ajout d'acide butyrique (--) avec pH (—) fixe; 143

**Figure 54 (d)** Ajout d'acide butyrique (--) avec évolution du pH (—). 143

**Figure 55.** Taux de croissance maximum de *S. cerevisiae* en présence de différentes concentrations de butyrate (■) dans du moût à 30°C et à pH 5,2. 144

## LISTE DES ABREVIATIONS

<b>LPS</b>	Lipopolysaccharide
<b>PY</b>	Peptone-yeast extract
<b>PYG</b>	Peptone-yeast extract-glucose
<b>PYL</b>	Peptone-yeast extract-lactate
<b>ATCC</b>	American type culture collection
<b>DSM</b>	Deutsche Sammlung von Mikro-organismen und Zellkulturen
<b>MRS</b>	Man-Rogosa -Sharp
<b>D.O.</b>	Densité Optique
<b>UFC</b>	Unités Formant Colonies
<b>HPLC</b>	Haute Pression Liquide Chromatographie
<b>SGI</b>	Setric Genie Industriel

# **INTRODUCTION**

# INTRODUCTION

L'hygiène de la transformation des aliments prend une place toujours croissante dans les préoccupations des industriels du secteur agro-alimentaire. Les progrès des connaissances sur les contaminants alimentaires sont inégaux. Si les micro-organismes pathogènes font l'objet d'études approfondies concernant leur moyen de détection, de neutralisation, ou leurs effets cliniques sur l'homme, de très nombreux micro-organismes sont simplement classés comme flores de contamination des aliments et restent peu étudiés.

Notre recherche s'inscrit dans le domaine des flores de contamination dans les industries agro-alimentaires; notre étude portera en particulier sur un produit régional du Nord de la France, la bière.

La bière est une boisson obtenue après fermentation anaérobie et alcoolique par addition de levures à un moût préparé à partir de :

- matières premières amylacées et sucrées,
- de houblon ou de ses différentes formes transformées,
- d'eau potable.

La modification de la qualité organoleptique de la bière est souvent liée à la présence de micro-organismes susceptibles de se développer dans les moûts de fermentation et dans le produit fini. Ce développement microbien a pour conséquence l'apparition d'un trouble accompagné d'une synthèse de métabolites secondaires affectant la saveur de la bière tels que l'acide propionique, l'acide butyrique, les composés soufrés, etc...

Le moût de bière est un milieu très propice (☞ page 42) à la croissance de nombreux micro-organismes (bactéries et levures) en raison de sa richesse en acides aminés, en facteurs de croissance et en hydrates de carbone comme le maltose, le glucose et le maltotriose. Le nombre de micro-organismes pouvant se développer dans la bière est cependant peu élevé. En fin de fermentation, la baisse du pH, les températures relativement basses, l'élévation de la teneur en dioxyde de carbone et en alcool, ainsi que la disparition de l'oxygène dissous et des sucres fermentescibles, ainsi que la présence de houblon limitent les risques de prolifération bactérienne. L'ensemencement du moût par une grande quantité de levures contribue également à limiter le développement de contaminants.

Durant ces dernières années, la fabrication de bières à faible degré alcoolique et l'apparition de nouvelles techniques limitant l'oxygène dissous dans les bières ont favorisé le développement après embouteillage de bactéries anaérobies strictes et peu tolérantes à

l'éthanol. A la fin des années 70, deux nouveaux contaminants anaérobies stricts: *Pectinatus* avec deux espèces identifiées (*P. cerevisiophilus* et *P. frisingensis*) et *Megasphaera* avec l'espèce *M. cerevisiae*, ont été signalés dans différents pays (Allemagne, Finlande, France, Japon et Etats-Unis).

Ces micro-organismes produisent des composés qui modifient profondément la saveur de la bière et qui, dans certains cas, entraînent le rejet pur et simple du produit devenu inconsommable.

Des nouvelles techniques ont permis de diminuer le taux d'oxygène dissous dans les bières. Les progrès récents dans la technologie de remplissage permettent maintenant de diminuer le contenu en oxygène de la bière finie de 1mg/l à 0,4-0,8mg/l. Il est intéressant de remarquer que *Pectinatus* et *Megasphaera* furent d'abord isolés dans de grandes brasseries modernes utilisant couramment ces techniques. Un grand nombre de facteurs ont une influence directe ou indirecte sur la dissolution de l'oxygène dans la bière qui nuit par son caractère oxydant à la stabilité biochimique des bières.

Jusqu'à présent, les bactéries gram-négatif n'étaient pas considérées comme des contaminants importants dans la bière conditionnée. Les progrès récents cités précédemment et l'amélioration des méthodes d'analyse ont fait apparaître une augmentation des détections de contaminations par les bactéries *Pectinatus* et *Megasphaera*.

Les origines de ces contaminations sont encore mal connues. On suspecte que ces micro-organismes proviennent de l'eau des canalisations, de l'huile de lubrification mélangée avec de la bière, ou des systèmes de drainage.

Actuellement, pour produire une bière sans risque de contamination, les brasseurs doivent connaître dans chaque phase de la fabrication les risques microbiologiques.

Les principales phases où les risques de contamination sont importants sont au nombre de deux:

- lors de l'ensemencement par les levures;
- lors de l'embouteillage ( si la bière n'est pas pasteurisée dans les bouteilles).

Durant ces étapes de fabrication des bactéries anaérobies strictes comme *Pectinatus* et *Megasphaera* peuvent trouver un terrain propice à leur développement.

S'il y a contamination *Pectinatus* et *Megasphaera* se trouvent, durant de la fermentation du moût ou pendant le stockage de la bière, associés à *Saccharomyces cerevisiae*.

Une faible concentration de cellules de *Pectinatus* et *Megasphaera* dans la bière reste très difficile à détecter. Ces bactéries peuvent se développer et se multiplier surtout si leur croissance est favorisée par la présence d'autres micro-organismes.

Avec les nouvelles technologies brassicoles, les brasseurs doivent considérer ces organismes comme un sérieux problème qui risque de s'amplifier dans le futur.

Peu de travaux ont été réalisés sur *Pectinatus* et *Megasphaera*, en particulier sur leur comportement dans des milieux complexes comme la bière ou en co-cultures avec des levures.

Ces comportements sont difficiles à appréhender à cause de la large variété de facteurs incontrôlés, parmi lesquels les interactions entre les populations et les différents paramètres physico-chimiques de leur activité.

Notre laboratoire, depuis quelques années, s'intéresse à l'étude de ces nouveaux contaminants de la bière (*Pectinatus* et *Megasphaera*). Les travaux effectués jusqu'à présent ont porté sur la meilleure connaissance de la physiologie de ces bactéries et en particulier:

- aspect cinétique de leur développement, modélisation de leur croissance en fonction de paramètres physico-chimiques (température, pH, concentration d'éthanol);
- étude de leur thermorésistance.

Le travail que nous présentons complète ces premières recherches par la description des interactions possibles entre les levures et les bactéries au niveau de la croissance des micro-organismes et de la production de métabolites. Nous avons également abordé l'étude de la résistance à l'oxygène de ces bactéries anaérobies strictes.

Très peu de connaissances ont été rapportées jusqu'alors sur ces mêmes. Il est important d'étudier ces aspects afin d'aider à définir une stratégie de lutte contre ces contaminations.

En brasserie, l'anaérobiose est assurée pendant tout le procédé de fabrication et lors du stockage afin de protéger la bière contre les effets néfastes de l'oxygène. Cela peut favoriser un développement éventuel de bactéries anaérobies strictes comme *Pectinatus* et *Megasphaera*. Toutefois, le moût est oxygéné au début de la fermentation principale, avant l'ensemencement du levain, pour l'augmenter la biomasse des levures. Ceci devrait limiter les contaminations du moût par ces bactéries. Nous avons donc étudié la résistance à l'oxygène de *Pectinatus* et *Megasphaera* en culture pure et mixte avec *Saccharomyces* pour déterminer dans quelle mesure ces bactéries, susceptibles d'être présentes dans le levain, peuvent survivre à l'oxygénation du moût.

Par ailleurs, l'étude des cultures mixtes ou co-cultures entre *Saccharomyces cerevisiae* et soit *Pectinatus*, soit *Megasphaera* a pour objectif une meilleure connaissance du

comportement des deux partenaires en association, de déterminer s'il existe des interactions entre les deux micro-organismes et d'évaluer les conséquences de contaminations par ces bactéries durant les procédés de fabrication de la bière.

# **GENERALITES**

# GENERALITES

## 1. HISTORIQUE

La bière date d'avant l'ère chrétienne. En Mésopotamie, 7000 ans av JC, une boisson à base d'orge était déjà consommée. Les Egyptiens ont également élaboré une boisson alcoolisée à partir de l'orge, le "vin d'orge". La fabrication et la consommation de cette boisson s'étendit à la Grèce, la Germanie et la Gaule.

En France, c'est au Moyen-âge que fut introduit le houblon dans le processus de fabrication. Et ce n'est qu'au cours de la seconde moitié du XXe siècle que la brasserie connut de brusques mutations en raison de nombreuses découvertes scientifiques et technologiques.

## 2. LA FABRICATION:

La fabrication couvre l'élaboration de la bière depuis la réception des matières premières jusqu'à la filtration :

- brassage
- fermentation
- salle de garde
- filtration

### 2.1. le brassage

Son but est d'obtenir des matières premières un moût sucré et aromatisé qui subira sous l'action de la levure une fermentation alcoolique.

Pour cela, on chauffe à différents paliers de température un mélange constitué d'eau, de malt; c'est l'empatage qui sert à transformer par réactions enzymatiques l'amidon en sucres fermentescibles. Ensuite le moût est filtré. Enfin, le filtrat passe dans la chaudière d'houblonnage où il est mis en ébullition pendant 1 H 30. L'addition de houblon fin qui donne l'amertume à la bière. A la fin de cette étape le pH est ajusté et le moût est stérile.

## 2.2. - le fermentation principale ou fermentation alcoolique

Le moût estensemencé avec des levures en phase de croissance. Pour préparer l'inoculum les brasseurs effectuent une étape de propagation de levure. Traditionnellement, on applique le procédé de Hansen: une culture pure est propagée stérilement dans le moût par recharges successives jusqu'à avoir une biomasse suffisante pour effectuer l'ensemencement de la cuve de fermentation principale. En fin de fermentation le levain est récupéré et réutilisé pour ensemencer les fermentations ultérieures. En général, ces levains récupérés sont réutilisés de 5 à 7 fois. Pour le stockage, entre les fermentations, les levures se trouvent en phase stationnaire de croissance, dans un milieu à pH abaissé, en éthanol, plus ou moins limité en azote. La méthode la plus courante de stockage de la levure d'ensemencement consiste à garder la levure dans la bière ou dans l'eau et sans agitation. La perte de viabilité est réduite si la température de stockage est basse (2 à 4°C). (Alves Da Silva,1989; Bourgeois,1989; Moll,1991).

La fermentation alcoolique est classiquement définie comme un processus entièrement anaérobie dont l'objectif essentiel est de produire de l'éthanol et du dioxyde de carbone à partir d'un hydrate de carbone tel le maltose. Cette fermentation principale dure généralement de 5 à 10 jours à une température comprise entre 10 à 20°C. D'autre part, le pH du moût est d'environ 5,2-5,5. En fin de fermentation principale, il se stabilise à des valeurs proches de 4 à 4,3. Il diminue rapidement en début de fermentation puis plus lentement. D'après Coote et Kirsop (1976), l'abaissement du pH reflète l'activité de la levure. Il correspond à l'absorption d'acides aminés basiques, à l'excrétion d'acides organiques et à la production de CO<sub>2</sub> qui se dissout dans le milieu liquide (Andrew et Graef,1971). Cette réaction obtenue par l'intermédiaire de levures est connue depuis Gay-Lussac:



Cette transformation exothermique des sucres s'accompagne, d'une part, d'une production de levures et, d'autre part, d'une accumulation de molécules aromatiques.

La fermentation classique de la bière comporte une rapide étape aérobie suivie d'une longue phase anaérobie durant laquelle l'éthanol est produit. L'aération initiale du moût permet de dissoudre, en général, de 7 à 8 mg/l d'oxygène moléculaire.

Ainsi, grâce à l'apport initial d'oxygène, les levures consomment et transforment plus rapidement les sucres fermentescibles contenus dans le moût. Le maltose, le glucose, le fructose, le saccharose, et le maltotriose sont les principaux sucres consommés par les levures.

La dégradation des sucres apporte l'énergie nécessaire et les molécules indispensables à la synthèse des diverses macromolécules de structure servant à la multiplication cellulaire. La levure utilise dans le moût, les acides aminés et l'azote ammoniacal comme source d'azote les vitamines et les ions métalliques dont elle a besoin.

Dans une deuxième phase, l'oxygène étant consommé, les levures synthétisent de l'éthanol et du dioxyde de carbone en quantités élevées. Conjointement à ces métabolites principaux, la levure relargue dans le moût des composés biochimiques très diversifiés comme des alcools supérieurs, des acides organiques, des acides gras, des cétones, des aldéhydes, des esters, des acides nucléiques, des bases azotées et d'autres molécules plus complexes. Ces molécules sont synthétisées à de faibles concentrations, toujours inférieures à 100 mg/l, à l'exception du glycérol qui peut atteindre des concentrations supérieures. (Mark, 1988).

Au cours de la fermentation anaérobie, il y a transformation de 80 % des sucres en alcool et en gaz carbonique. Vers la fin de cette étape, les levures flocculent naturellement dans les cuves où elles pourront être récupérées pour ensemercer un autre brassin.

Suite à cette fermentation principale l'on effectue le traversage qui amène la bière dans les tanks de garde.

### 2.3. - la fermentation de garde

La fermentation secondaire ou garde a pour but la maturation de la bière, supprimer son « goût de jeune » dû à un ensemble de composés tels le diacétyl, des dicétones volatiles, des composés soufrés et l'acétaldéhyde. Ainsi, lors de la fermentation de garde, la bière subit des transformations biochimiques subtiles qui assurent son affinage et subit des traitements enzymatiques destinés à assurer sa stabilité colloïdale au froid.

Cette fermentation secondaire assure la saturation en dioxyde de carbone (4,5 à 5 g/l), la précipitation du trouble à froid, la réabsorption du diacétyl par la levure et la consommation des sucres résiduels. Contrairement à la fermentation principale pour laquelle il faut apporter de l'oxygène au moût, la fermentation secondaire doit se faire intégralement en conditions anaérobies pour éviter qu'une oxydation de la bière n'entraîne une modification désagréable de son goût.

La fermentation secondaire se fait à une température comprise entre 1 et 2 °C. Elle dure de deux semaines pour une bière bock à plus d'un mois pour une bière de luxe. L'atténuation (quantité d'extrait fermenté) finale doit être maximale, ce qui est une condition essentielle pour avoir une bonne stabilité biologique ultérieure de la bière.

#### 2.4. - la filtration

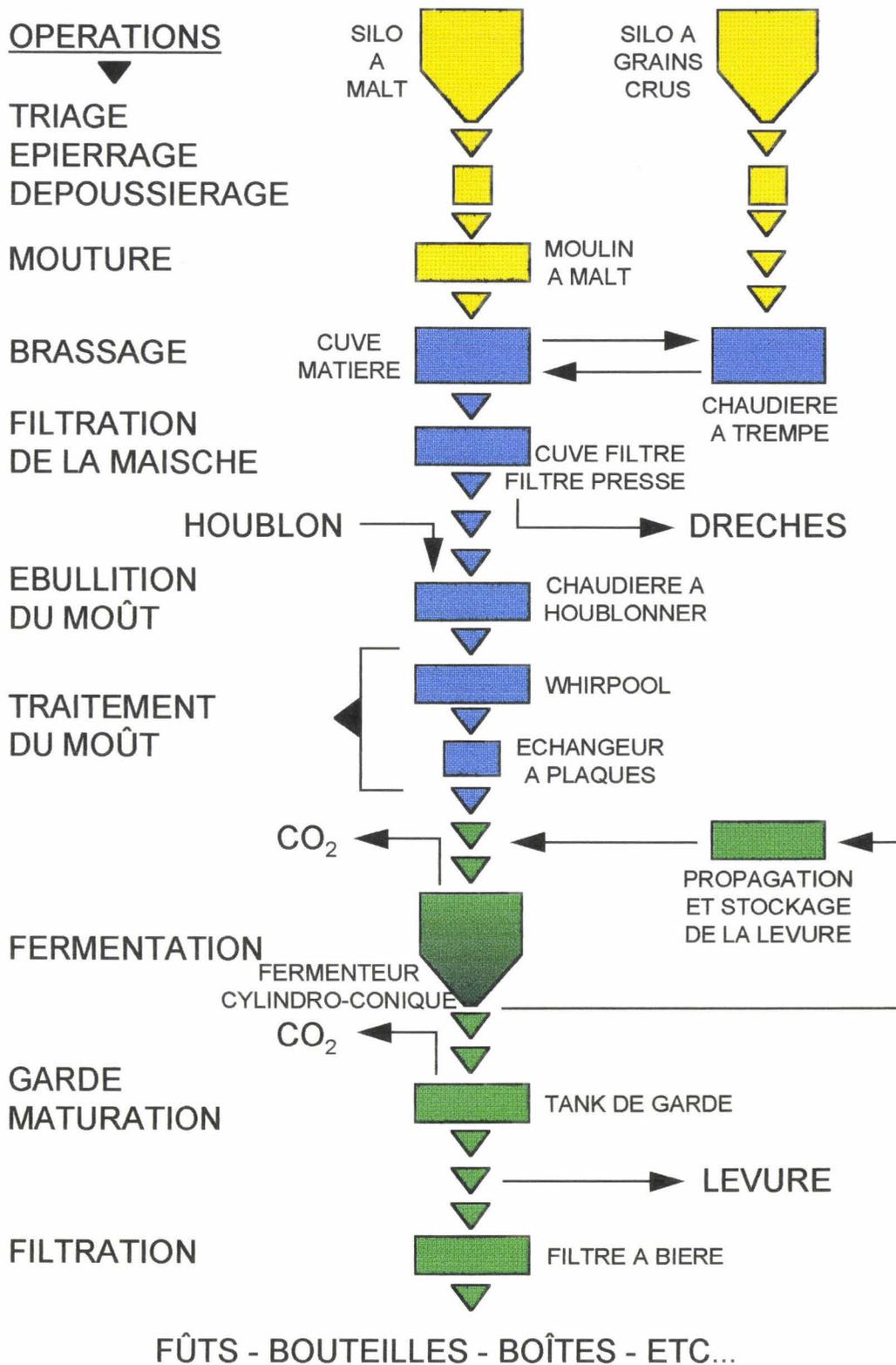
La filtration de la bière est réalisée par passage à travers une couche de Kieselguhr (adjuvant de filtration composé de diatomées calcinées). Elle permet d'éliminer les levures qui n'ont pas sédimenté et clarifie la bière en éliminant le trouble protéique et tanno-protéique. La bière est ensuite conditionnée.

##### *2.4.1 - Soutirage et pasteurisation.*

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

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

# FABRICATION DE LA BIÈRE



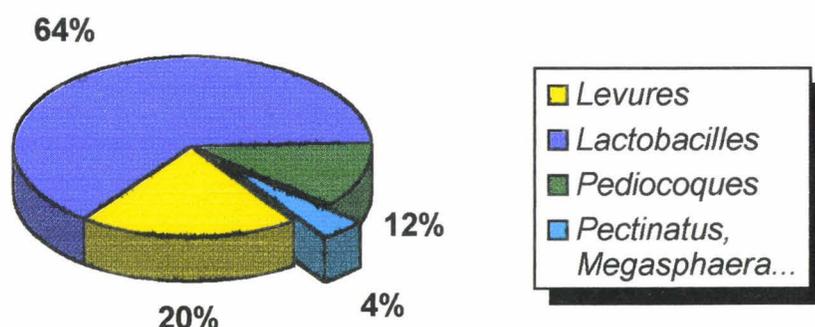
*Schéma de la fabrication de la bière (Moll 1991)*

### 3. LES MICRO-ORGANISMES CONTAMINANTS DE LA BIÈRE:

#### 3.1. Les contaminants habituels:

Les microbiologistes de brasserie admettent généralement que les micro-organismes contaminants de la bière appartiennent à un nombre restreint d'espèces aérobies et anaérobies facultatives. Les bactéries rencontrées appartiennent à différents genres ; bactéries lactiques du genre *Lactobacillus* (80%) et *Pediococcus* (15%), soit respectivement 64% et 12% du total des contaminations. Des bactéries des genres *Zymomonas*, *Megasphaera* et *Pectinatus*, les bactéries acétiques du genre *Acetobacter* et *Gluconobacter*, ainsi que des Entérobactéries représentent 5% des contaminations bactériennes et 4% du total (Soberka *et al.* 1988).

Les levures contaminantes le plus souvent rencontrées appartiennent au genre *Saccharomyces*, et représentent 20% des contaminations. En Angleterre, le genre *Zymomonas* a été décrit comme étant un organisme contaminant la bière, bien qu'aux Etats-Unis de tels problèmes n'aient pas été signalés (Schimwell, J.L; 1948).



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

### 3.1.1. Contamination par d'autres levures:

En brasserie on considère comme levure sauvage, toute levure différente de la souche de levureensemencée pour fermenter le moût de bière. Ainsi, dans les brasseries Anglaise et Allemande, *S. cerevisiae* et *S. uvarum* (*S. carlsbergensis*) sont soit des levures utilisées dans le procédé, soit des levures de contamination, selon le type de bière.

Les levures contaminantes sont classées d'après leur métabolisme énergétique soit en levures de fermentation soit en levures d'oxydation. Les espèces *Saccharomyces* sont les levures contaminantes les plus répandues et les plus nuisibles: Brenner *et al.* ont montré que 83% des levures sauvages isolées des fonds de cuve dans 63 brasseries appartenaient à ce genre. Les levures *Saccharomyces* sont très proches des levures de brasserie, ce qui rend leur différenciation difficile. Ensuite, les levures contaminantes les plus répandues sont *Candiola* (8%) et *Hansemula* (3%)( Brenner *et al.* 1971). Les levures sauvages sont responsables des mauvaises odeurs, de l'acidité (de type phénolique, fruité, diacetyl, amylicetate, isobutyrate et isovalérate,), de la turbidité, de la perte d'alcool et de l'atténuation excessive ( Brenner *et al.* 1971; Wiles A.E, 1954; 1961).

Actuellement les perturbations provoquées par les levures sauvages pendant la fermentation primaire sont peu fréquentes. Les risques de contaminations par les levures sauvages peuvent apparaître plus facilement durant la fermentation secondaire, quand la concentration en levures de brasserie est faible. C'est le cas en particulier quand les levures sauvages ont une température optimale de croissance plus faible ou quand elles sont capables d'utiliser les dextrines. Pour démarrer une culture, le nombre de levures sauvages est en général, de 1 à 10 cellules pour 1 million de levures de brasserie, ce qui correspond à environ 10 à 100 cellules/ml de bière en fermentation ( Brady B.L, 1958; Brenner *et al.* 1971; Richards M., 1968). Si le nombre de *Saccharomyces* sauvages excède 100 pour 10<sup>6</sup> cellules de levures de brasserie, les levures d'ensemencement doivent être jetées (Richards M., 1968).

*S. cerevisiae* (*S. cerevisiae* var *ellipsoideus*), *S. bayanus* (*S. pastorianus*) et *S. diastaticus* sont connues pour être les contaminants gênants de la bière (Ault *et al.*; 1971; Brenner *et al.*; 1971; Riemann *et al.*; 1969; Wiles A.E, 1954). *S. diastaticus* produit l'amyloglucosidase et hydrolyse l'amidon et les dextrines, causant ainsi une super-atténuation de la bière (Andrews *et al.*, 1952; Rainbow C, 1981). Une souche de *S. bayanus* produisant un goût phénolique a été isolée dans une bière finie.

### 3.1.2. Contamination par les bactéries:

#### 3.1.2.1. Bactéries lactiques à Gram-négatif, anaérobies facultatives

##### 3.1.2.1.1. *Lactobacillus*:

Les contaminants les plus fréquemment rencontrés dans la bière sont les bactéries lactiques. Elles apparaissent dans l'inoculum de levures et dans les étapes après filtration. Elles font parties de l'environnement des installations de la brasserie car elles sont apportées avec l'orge et le malt. De plus, lors du procédé de maltage, il a été observé une multiplication de *Lactobacillus* d'un facteur mille (Haikara 1984). Au cours du concassage, du brassage et de l'ébullition les lactobacilles sont détruits mais ils peuvent recontaminer le moût car ils restent présents dans la poussière de malt et dans l'air. Les bactéries lactiques ont une forte tendance à cosédimenter avec les levures. Elles sont donc transférées avec le fond de cuve servant d'inoculum pour la fermentation suivante (Kitahara 1974). Le pouvoir contaminant des lactobacilles est lié à leur température optimale de croissance relativement basse, leur tolérance aux effets bactériostatiques de certaines substances du houblon, leur résistance importante à la teneur en alcool et enfin leur capacité à utiliser les pentoses et les dextrines (Wackerbauer et Emeis 1968; Eschenbecher 1969; Wackerbauer et Emeis 1969; Eschenbecher et Ellenrieder 1975; Weiss *et al.* 1979). Les *Lactobacilles* acidifient la bière ce qui provoque des troubles et ils produisent du diacétyle et de l'acétoïne, ce qui amène un goût désagréable à la bière. Les *Lactobacilles* homofermentaires, comme les *Pediococci* homofermentaires, sont des contaminants particulièrement redoutés dans les brasseries. Les *Lactobacilles* les plus communs dans la bière sont *L. brevis* (87%) et *L. plantarum* (13%) (Wackerbauer et Emeis 1968; 1969; Weiss *et al.* 1979).

##### 3.1.2.1.2. *Pediococcus*

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

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

### 3.2. Autres bactéries à Gram négatif, anaérobies facultatives et strictes

#### *3.2.1. Entérobactéries*

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

En raison de leur haute tolérance au houblon, elles se multiplient rapidement quand le moût n'est pas immédiatementensemencé par les levures. Les plus importantes concentrations se situent durant les deux premiers jours de la fermentation primaire (Prucha et Scheible 1970). Par la suite les conditions du milieu deviennent limitantes du fait du pH inférieur à 4,4 et de la concentration en éthanol supérieure à 2% v/v (Prucha et Scheible 1970; Dachs 1978).

Néanmoins, certaines espèces survivent à la fermentation en s'accumulant dans le sédiment de levures et sont transférées avec la fermentation suivante lors de la réutilisation du fond de cuve (Prucha et Scheible 1970; Dadds *et al.* 1971; Thomas *et al.* 1972; Van Huuren *et al.* 1980; Ingledew 1979).

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

Les Entérobactéries excrètent de nombreux composés qui altèrent le goût de la bière. Les composés soufrés volatils, en particulier le diméthyl-sulfure, donnent à la bière un goût de céleri, de choux cuit ou une odeur de légumes (Russel *et al.* 1954; Ault 1965; Anderson *et al.* 1971; Van Engel 1971; Kidney et White 1979). Des mauvais goûts phénolés, fruités ou médicinaux sont causés par l'augmentation des teneurs en acétaldehyde, en n-propanol, en iso-butanol, en iso-pentanol et en iso-amylalcool (Russel *et al.* 1954; Wood et Rainbow 1961; West *et al.* 1963; Prucha et Scheible 1970; Rainbow 1971; Niefind et Späth 1975; Dachs 1978). Certaines espèces retardent la fermentation et modifient le pH final de la bière (Prucha et Scheible 1970; Cowbourne *et al.* 1972; Thomas *et al.* 1972; Dachs 1978).

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

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

### 3.2.2. Bactéries acétiques

Elles appartiennent aux genres *Acetobacter* et *Gluconobacter* (*ex. Acetomonas*). En raison de leurs exigences simples en éléments nutritifs et leur tolérance à l'acidité et au houblon, le seul facteur limitant leur croissance est le manque en oxygène. Cependant, certaines espèces sont capables de croître avec un taux minimal en O<sub>2</sub> (Ault 1965; Priest *et al.* 1974).

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

### 3.2.3. *Zymomonas*

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

*Zymomonas* nécessite le glucose, le fructose ou le saccharose comme source d'hydrate de carbone. Il fermente ces sucres en alcool et en CO<sub>2</sub>. *Z. mobilis* croît très rapidement dans la bière, causant des troubles prononcés en peu de jours et des mauvais goûts dus à la production de l'acétaldéhyde et du sulfure d'hydrogène (Dadds et Martin 1973; Anderson et Howard 1974; Rainbow 1981).

### 3.3. nouveaux contaminants bactériens : *Pectinatus* et *Megasphaera*

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

Avec l'augmentation de la production de bières faiblement alcoolisées et la réduction de l'oxygène dissous après l'embouteillage les brasseurs doivent considérer ces organismes comme un problème qui risque de s'amplifier dans l'avenir. *Pectinatus* et *Megasphaera* sont deux contaminants anaérobies produisant, de part l'excrétion des composés finaux de leur métabolisme (sulfure d'hydrogène, acides gras), des arômes désagréables. Leur développement dans la bière, même avec une population inférieure à 10<sup>6</sup>/ml, rend la bière inbuvable.

La fréquence des contaminations provoquées par des micro-organismes anaérobies contaminants de la bière a augmenté de façon significative au cours de ces dernières années. D'après les résultats obtenus par Back *et al.* (1981). *Pectinatus* et *Megasphaera* étaient responsables de 1-2% du nombre total de contaminations de la bière en 1981. En 1986, 3% des contaminations enregistrées étaient dues à *Pectinatus* et 2% à *Megasphaera*, et en 1987 une fréquence de 7% a été calculée pour les deux types de contaminants. Depuis nous n'avons plus d'évaluation de la fréquence mais la présence de *Pectinatus* est régulièrement observée, celle de *Megasphaera* plus rarement.

La description de ces deux microorganismes vous est détaillée chapitres 5 et 6.

#### **4) GENERALITES SUR SACCHAROMYCES CEREVISIAE.**

Les levures de brasserie appartiennent au genre *Saccharomyces*. Ce sont des champignons unicellulaires, appartenant aux ascomycètes.

Selon Lodder (1970), il y a aurait 39 genres et environ 350 espèces de levures différentes. Les principales caractéristiques utilisées pour la classification des levures sont morphologiques, physiologiques et, dans une moindre mesure, génétiques.

Les cellules végétatives des levures sont sphériques, ovoïdes, allongées ou cylindriques; ces formes sont, en général, en rapport avec les modes de reproduction végétative. Certaines cellules peuvent avoir 2 à 3 µm de long alors que d'autres peuvent atteindre 20 à 50 µm. La largeur est moins variable et se situe entre 1 et 10 µm (Larpent et Larpent-Gourgaud, 1985).

Actuellement, la classification des levures a tendance à ne plus distinguer *S. carlsbergensis* de *S. uvarum*. Les *S. carlsbergensis* peuvent être considérées comme des *S. uvarum* de brasserie. Les caractères d'utilisation du mélibiose et du raffinose est une caractéristique générale des *S. uvarum*. En 1970, *S. carlsbergensis* est devenue *S. uvarum* (*carlsbergensis*).

*S. uvarum* (*carlsbergensis*) comme les *Saccharomyces cerevisiae* peuvent fermenter le glucose, le galactose, le saccharose, le maltose. Ils ne fermentent pas le cellobiose, le lactose et l'amidon soluble. L'utilisation du lactose est une acquisition récente des *S. cerevisiae* manipulées génétiquement. Les glucides dits « sucres fermentescibles » pour les *Saccharomyces*, dans le domaine brassicole, comprennent le glucose, le fructose, le maltose, le maltotriose et le saccharose. *S. uvarum* et *Saccharomyces cerevisiae* sont également différenciées par leur pouvoir respiratoire, leur capacité à fermenter le glycéraldéhyde et leur intense production de H<sub>2</sub>S (Rehm et Reed 1983).

Dans la filière brassicole, *S. uvarum* est considérée comme une levure de fermentation basse (bière type « lager ») d'une part parce que les cellules se déposent au fond des cuves de fermentation après floculation, et d'autre part du fait d'une plus faible température de conduite de la fermentation (10 à 12°C). Pour les brasseurs, *S. cerevisiae* est dite levure à fermentation haute (bière type « ale ») car elle monte à la surface du moût de fermentation après floculation. La température de conduite de fermentation avec *S. cerevisiae* est plus élevée (18 à 20°C). (Alves Da Silva, 1989- Moll, 1991).

A partir de 1984, sous la dénomination de *Saccharomyces cerevisiae* se retrouvent les anciennes dénominations telles que *Saccharomyces carlsbergensis* devenue *Saccharomyces*

*uvarum* en 1970. Depuis 1984, *Saccharomyces cerevisiae* englobe aussi bien les levures de fermentation haute que les levures de fermentation basse (Alves Da Silva, 1989).

L'oxygénation du moût en début de fermentation favorise le développement de la levure en activant la synthèse des stérols et des acides gras insaturés. Ainsi, l'oxygène dissous, très vite consommé durant les premières heures du procédé, permet d'augmenter indirectement la vitesse de fermentation (Jacobsen et Thorne, 1980). Les besoins en oxygène sont variables selon les souches utilisées. Toutefois, si l'oxygène a un rôle actif vis à vis de la croissance, il peut avoir une action négative en stimulant la synthèse d'esters d'acétates. Une aération du moût au cours de la fermentation peut permettre de contrôler la concentration de ces métabolites (Anderson *et al.*, 1974).

L'oxygène est un substrat essentiel pour la croissance. En l'absence totale d'oxygène moléculaire, la levure ne peut synthétiser les principales molécules structurales des membranes. Ces molécules sont diverses, ce sont des acides gras insaturés et des stérols. Elles assurent la rigidité de la membrane et confèrent à la cellule son intégrité. L'ergostérol est le principal stérol contenu dans les membranes des levures. Une oxygénation répétée du moût en cours de fermentation provoque à chaque reprise une élévation du taux de lipides et d'ergostérols (Ohino et Takahashi, 1983-Patel et Ingledew, 1973).

L'oxygène disponible sert aussi, mais en faible partie, à la synthèse d'acides organiques dont l'acide pyruvique qui est le précurseur de nombreuses molécules de flaveur. Il est connu depuis longtemps comme un élément indispensable à toute vie active et même à la survie des levures. (Leveau, 1987; Mark, 1988).

Les levures tolèrent de très larges gammes de pH: en théorie, les levures se développent bien à des pH compris entre 3 et 7. Dans cet intervalle limite de pH, le cytoplasme cellulaire ne varie que de 5,8 à 6,3, ce qui représente un écart très faible et montre qu'il est remarquablement tamponné.

Les enveloppes cellulaires sont imperméables aux ions H<sup>+</sup> et OH<sup>-</sup>. Il n'ont donc pas d'influence sur le pH du cytoplasme.

Plusieurs auteurs s'accordent à penser que le pH peut modifier la cinétique de disparition de certains métabolites secondaires; le rôle des protons sur la vitesse de fermentation est discuté (Leveau, 1987; Pajunen et Makinen, 1975).

La plupart des levures sont mésophiles, voire psychrotrophes. En règle générale, la température optimale de croissance est comprise entre 27 et 35°C. A partir de 40°C, la destruction thermique peut déjà avoir lieu (Mark, 1988; Nanba *et al.*, 1987).

## **5. GENERALITES SUR PECTINATUS:**

### **5.1. Historique**

Depuis 1978 la présence de *Pectinatus* a été détectée dans de nombreux pays: en Allemagne, en Suède, en Norvège, en Finlande, au Japon (Back *et al.*, 1979; Haikara *et al.*, 1981 (a); Haukeli, 1980; Kirchner *et al.*, 1980; Takahashi, 1983). En 1989 après avoir été trouvé en Pologne dans le circuit véhiculant le CO<sub>2</sub> et dans une eau de trempage, cette bactérie fait son apparition en France (Haikara, 1983; 1991; Helander *et al.*, 1984; Soberka *et al.*, 1989). *Pectinatus cerevisiiphilus*, une bactérie gram négative, anaérobie, contaminante de la bière, fût décrite en premier et nommée par Lee *et al.* en 1978 aux Etats-Unis, qui la classèrent dans la famille des Bacteroidaceae. Ils conclurent que l'isolat ne correspondait à aucun genre connu et proposèrent des genre et espèce nouveau: *Pectinatus cerevisiiphilus*. Cette souche a été déposée à l'American Type Culture Collection (ATCC) sous la référence 29359 (Lee *et al.*, 1978) et à en Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen sous la référence DSM 20467.

En Allemagne, en 1979, Sedel, Back et Weiss ont isolé deux nouvelles souches qui ont été déposées à la DSM (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen) sous les références DSM 20465 et DSM 20466. (Back *et al.*, 1979)

En Finlande, en 1981, Haikara *et al.* isolent une autre souche qui sera déposée à l'American Type Culture Collection sous la référence ATCC 33332. Comparée aux autres souches de *Pectinatus*, en se basant sur les caractéristiques morphologiques, physiologiques, biochimiques et immunologiques, cette souche ATCC 33332 apparaît différente. Donc un nouveau nom a été proposé *Pectinatus frisingensis*.

*Pectinatus* a été retrouvé de façon sporadique dans de l'huile de lubrification mélangée à de la bière, dans des systèmes de drainage et de canalisation d'eau, dans l'air des salles de remplissage et dans les machines de remplissage, sur le plancher des salles de remplissage, dans l'eau condensée au plafond, dans les lubrifiants des chaînes, et dans l'eau de trempage (Back *et al.*, 1988; Dürr, 1983; Haukeli, 1980; Lee *et al.*, 1980 Soberka and Warzecha, 1986). En Finlande, à l'exception de quelques cas d'isolement de *Pectinatus* à partir de levures et de fermentations secondaires, cette bactérie a été retrouvée principalement dans la salle de remplissage (bouteilles non remplies après passage à la machine à laver, planches, eau de rinçage dans le canal à CO<sub>2</sub> de la machine de remplissage, membrane à CO<sub>2</sub>, ligne CO<sub>2</sub>).

A partir de ces résultats de détection, l'eau semble être une des sources de contamination la plus probable. De plus, il est clair que *Pectinatus*, malgré sa nature anaérobie, peut survivre dans les aérosols et être transférée par l'air dans la bière. Par ailleurs, la détection de *Pectinatus* dans l'air autour des bouteilles non lavées dans les salles de remplissage montre que l'air de remplissage peut être contaminé par les bouteilles sales. (Dürr, 1983).

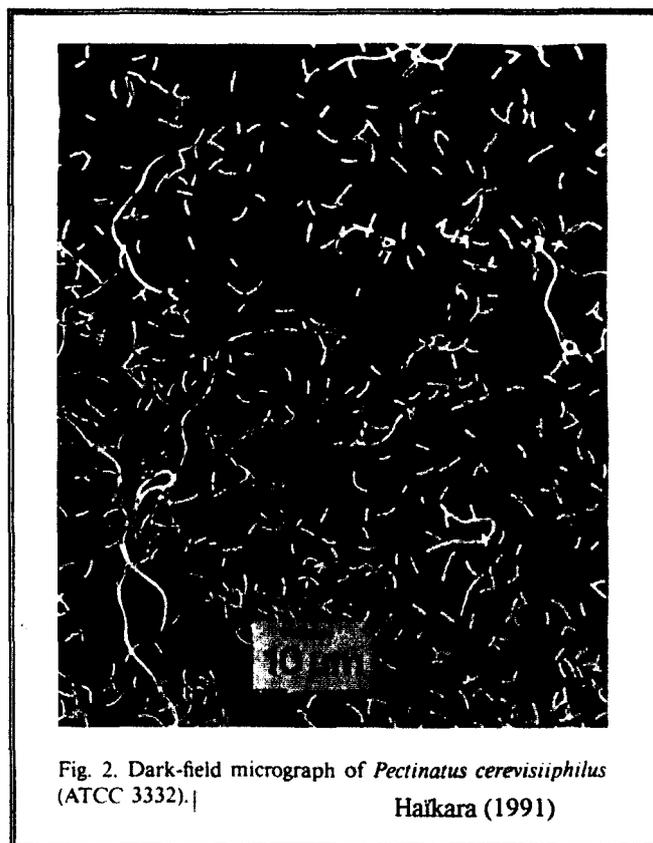
## 5.2. Taxonomie et Différentiation:

Le " Bergey's Manual of Determinative Bacteriology" classe les bâtonnets Gram-négatifs, anaérobies, non sporulants dans la famille des Bacteroidaceae (Holdeman and Moore, 1974). Quand la localisation des flagelles, des produits métaboliques et du contenu en GC de l'ADN du genre *Pectinatus* ont été comparés avec les caractéristiques des isolats des neuf genres appartenant à la famille des Bacteroidaceae, il fut observé que la plupart de ces genres possédaient plusieurs caractéristiques majeures les distinguant de *Pectinatus* (Lee *et al.*, 1978). Les espèces produisant de l'acide propionique étaient trouvées seulement parmi les genres *Bacteroides* et *Selenomonas*. Si on se base sur la flagellation latérale, l'espèce *Selenomonas* ressemble à l'espèce *Pectinatus*. Cependant, les *Selenomonas* ont des flagelles attachés en touffe au centre de la face concave de la cellule, alors que l'arrangement des flagelles ressemble à un peigne, le long du grand axe de la cellule de *Pectinatus* et *Bacteroides*. La différence entre ces espèces (*Bacteroides* et *Selenomonas*) et *Pectinatus* se situe aussi au niveau du mécanisme de formation de l'acide propionique (Haikara *et al.*, 1981a). Le nom de *P. cerevisiiphilus* fut approuvé, par Skerman *et al.*, 1980) et décrit par Lee (1984) dans le " Bergey's Manual of Systematic Bacteriology".

## 5.3. Caractéristiques morphologiques:

L'étude microscopique du genre *Pectinatus* montre que la morphologie et la structure cellulaire sont identiques pour les différentes souches rencontrées, *Pectinatus cerevisiiphilus*; *Pectinatus frisingensis*; *Pectinatus sp* (Haikara *et al.*, 1981(a); Seidel, 1989; Seidel, 1990; Schleifer *et al.*, 1990). *Pectinatus* est une bactérie anaérobie stricte, Gram négative, non sporulante et mésophile (Lee *et al.*, 1978). Cette bactérie est cylindrique, en forme de S, légèrement incurvée. La taille de *Pectinatus* est 0,7 à 0,8 µm de diamètre et 2 à 32 µm de longueur (Lee *et al.*, 1978; Lee *et al.*, 1980; Haikara, 1985(a)), mais d'autres auteurs ont

donné une taille différente 0,4 à 0,5  $\mu\text{m}$  de diamètre et 2 à 3  $\mu\text{m}$  de longueur (Haikara *et al.*, 1981(a et b)). La taille dépend de l'âge des bactéries et du milieu de culture. Elles se présentent normalement seules ou en paires, et rarement en chaînes courtes. Dans des cultures âgées, il est possible de trouver des cellules très allongées avec une forme hélicoïdale ainsi que des cellules ayant une forme ronde (Haikara, 1983; Haikara, 1986; Haikara, 1989; Soberka *et al.*, 1989).



Les cellules jeunes sont très actives dans leurs déplacements, donnant l'apparence d'une forme en "X" quand elles nagent. Les cellules plus âgées et plus longues ont un déplacement en ondulation (Lee *et al.*, 1978). Une souche (VTT-E-81132) possède des cellules en forme d'anneau qui ne se retrouve pas dans les cultures d'autre souches ( Haikara *et al.*, 1981a). Dans la bière, les cellules sont minces et ont une apparence hétérogène (Seidel *et al.*, 1979). Le déplacement du micro-organisme est assuré par des flagelles qui ont été mis en évidence par microscopie électronique. Ils sont présents sur la paroi en nombre variable. Lee *et al.*, 1978 en mentionnent 1 à 23 par cellule tandis que Haikara *et al.*, (1981, b) n'en signalent que 6. *Pectinatus* est une bactérie péritriche unilatéralement (Lee *et al.*, 1978). Contrairement à

*Selenomonas*, les flagelles ne se trouvent pas uniquement localisés au centre de la partie concave, mais répartis sur l'ensemble du côté concave de la cellule. Différents auteurs ont mis en évidence la présence chez certaines cellules d'un flagelle polaire unique (Helander *et al.*, 1984; Haikara, 1986; Soberka *et al.*, 1989).



Kuva 1. Elektronimikroskooppikuva *Pectinatus* -bakteerista (7).

Haikara (1982)

Les colonies de *P.cerevisiophilus* sont circulaires, presque blanches, luisantes et opaques, cependant Back *et al.*, 1979 ont observé une souche (DSM 20465) produisant des colonies rugueuses. La croissance de cette souche est également différente comparée aux autres souches, en ce qui concerne la phase exponentielle de croissance en milieu liquide, à cause du dépôt d'un précipité au fond de la bouteille ( Seidel *et al.*, 1979).

#### 5.4. Propriétés biochimiques et physiologiques de *Pectinatus*:

Il a été montré qu'il n'existe que de très petites différences physiologiques et biochimiques entre les différents isolats de *Pectinatus* (Back *et al.*, 1979; Haikara *et al.*, 1981a, 1981b; Kirchner *et al.*, 1980; Lee *et al.*, 1978). Le contenu en GC de l'ADN de la souche type est 39,8 mol%. Des différences de seulement 2-5 mol% dans la composition en base de l'ADN des autres souches de *Pectinatus* ont été décrites, indiquant que ces souches sont des espèces

voisines (Back *et al.*, 1979; Haikara *et al.*, 1981a, 1981b; Kirchner *et al.*, 1980; Lee *et al.*, 1978).

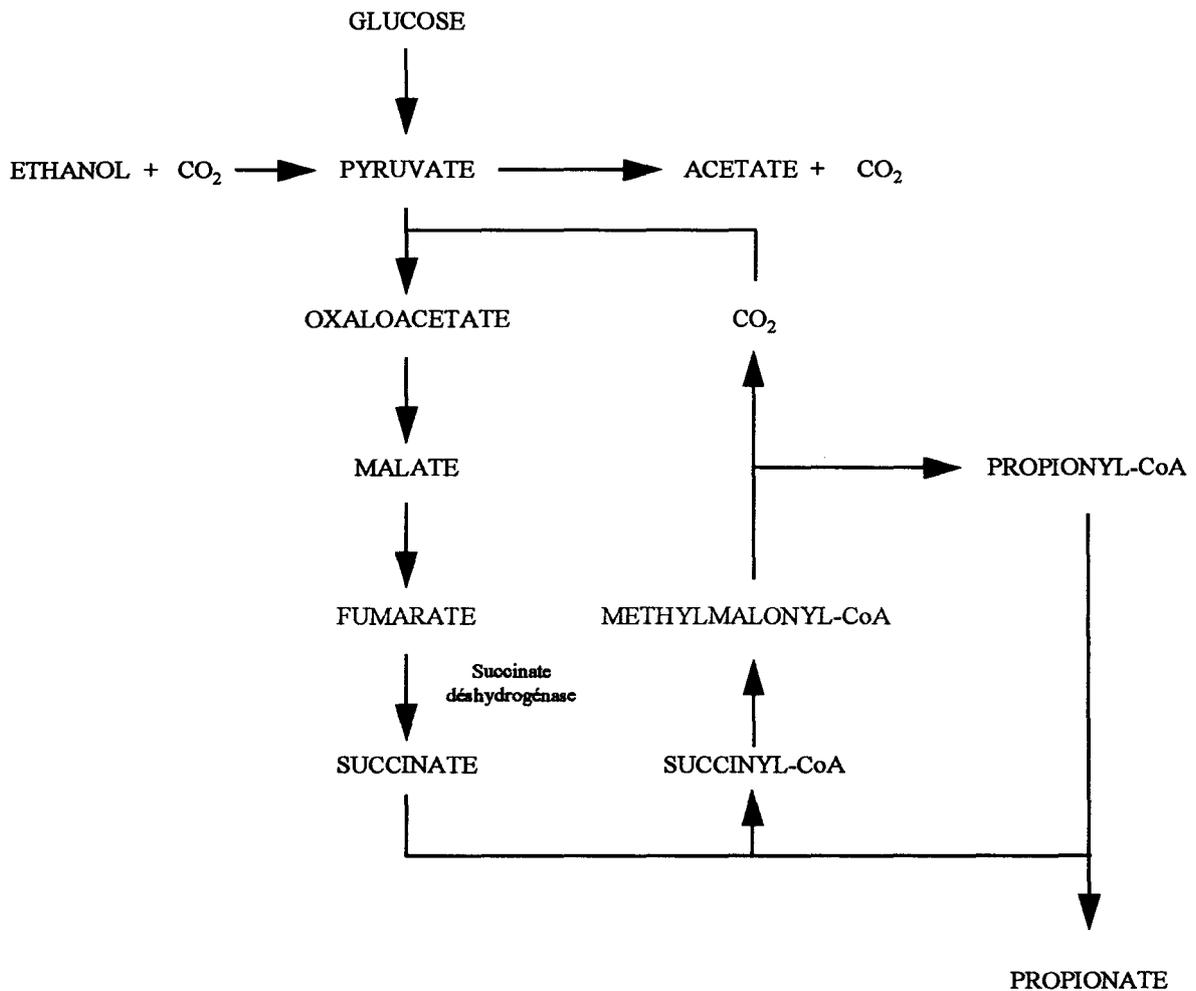
*P. cerevisiophilus* est catalase négative et cytochrome oxydase négative, et ne produit pas d'indole, ne liquéfie pas la gélatine, ne réduit pas le nitrate, n'hydrolyse pas l'arginine. Le test de Voges-Proskauer est positif pour les souches (DSM 20465, DSM 20466) (Back *et al.*, 1979; Haikara *et al.*, 1981b; Kirchner *et al.*, 1980; Lee *et al.*, 1978). Le test de l'uréase est le seul à avoir donné des résultats variables pour différentes souches (Back *et al.*, 1979; Haikara *et al.*, 1981b).

Des souches de *Pectinatus* produisent de l'acide à partir d'adonitol, d'arabinose, de glycérol, de lactate, de mannitol, de mannose, de glucose, de rhamnose et de ribose (Lee *et al.*, 1979).

Les bactéries du genre *Pectinatus* produisent de nombreux composés indésirables affectant la qualité organoleptique de la bière: composés soufrés et acide propionique.

Ces bières apparaissent troubles et dégagent une odeur d'oeufs pourris. Mais, principale caractéristique, *Pectinatus* est la seule bactérie contaminante de la bière à libérer de l'acide propionique. Les souches de *Pectinatus* produisent cet acide par une voie métabolique similaire à celle des bactéries propioniques.

D'autres composés sont excrétés par *Pectinatus* comme l'acétoïne, les acides acétique, succinique, fumarique et lactique (Lee *et al.*, 1978; Back *et al.*, 1979; Kirchner *et al.*, 1980) ainsi que l'acide oxalique détecté par Schisler *et al.*, 1979. Back *et al.*, 1979 et Kirchner *et al.*, 1980, qui n'ont cependant pas observé de production d'acide lactique par *Pectinatus*. Les quantités relatives de produits finis sont néanmoins dépendantes du substrat utilisé par cet organisme. En plus de ces acides organiques, *Pectinatus* produit du méthyl mercaptan, du diméthyl sulfure, et du sulfure d'hydrogène, dont des quantités significatives ont été retrouvées dans la bière contaminée, à savoir des quantités supérieures à 80, 13 et 290 µg/l (Haikara *et al.*, 1981 (a)). La production de taux élevés de sulfure d'hydrogène par *Pectinatus* peut aussi être utilisée à des fins d'identification. Dans les brasseries fabricant de la bière blonde allemande aucun autre agent contaminant n'est capable de produire du H<sub>2</sub>S. Dans la bière anglaise, le genre *Zymomonas* est connu comme un organisme contaminant produisant du H<sub>2</sub>S. Cependant, la production simultanée d'acétaldéhyde (et de H<sub>2</sub>S) par cette bactérie donne à cette bière une odeur de pommes pourries. Cela est facilement distinguable, même sans aucun instrument, de l'odeur d'oeufs pourris provoquée par la croissance de *Pectinatus* dans la bière.



Voies de biosynthèse du propionate chez *Propionibacterium* et *Pectinatus* (Chelak *et al.* 1987; Tholozan *et al.*, 1994)

### 5.5. Conditions de croissance:

Les bactéries du genre *Pectinatus* se développent à des températures comprises entre 15 et 40°C., avec une croissance optimum à 30 - 32°C (Back *et al.*, 1979; Haikara *et al.*, 1981b; Kirchner *et al.*, 1980; Lee *et al.*, 1978; Watier *et al.* 1993). *Pectinatus* est capable de croître dans un bouillon nutritif contenant une quantité d'éthanol supérieure à 10% v/v (Haukeli, 1980). Cependant, aucune croissance n'a été observée dans des bières ayant un contenu en alcool qui excède 5,2% w/v (Haikara *et al.*, 1981b; Haukeli, 1980; Kirchner *et al.*, 1980; Seidel *et al.*, 1979). La croissance est possible jusqu'à 1,9 mg/l en milieu MRS et jusqu'à 3 mg/l dans le moût, l'inhibition commençant à partir de 1,5 mg/l (Soberka *et al.* 1989).

Les souches de *Pectinatus* se développent bien dans une gamme de pH de 4,5 à 8,5 (Back *et al.*, 1979; Haikara *et al.*, 1981b), l'optimum se situant entre 6,0 et 7,0 (Kirchner *et al.*, 1980; Takahashi, 1983). Cependant, la croissance peut être assez bonne même si le pH est entre 4,0 et 4,5 (Kirchner *et al.*, 1980). Le pH normal de la bière finie, 4,4 en moyenne, n'empêche pas la croissance de l'espèce *Pectinatus*. Des retards de croissance ont été détectés à pH 4,1. Dans la bière allemande Alt (pH 4,0), la croissance de *Pectinatus* était considérablement réduite mais n'était pas encore totalement inhibée (Kirchner *et al.*, 1980; Seidel *et al.*, 1979). Dans la bière allemande de type Berliner Weisse, avec un pH de 3,1, aucune croissance ne se produit (Kirchner *et al.*, 1980).

Ces bactéries sont détruites par des infectants à base d'iodophores et de chlore (Haukeli 1980; Lee *et al.* 1980).

### 5.6. Propriétés antigéniques

La paroi de *Pectinatus* possède des propriétés antigéniques. Plusieurs injections de ces bactéries chez un lapin provoquent sa mort après 3 à 5 mois. Haikara *et al.* (1981a) mentionnent la présence d'antigènes spécifiques à la souche *P. frisingensis* que l'on ne retrouve pas sur les parois des autres souches. Il est donc possible de différencier *P. frisingensis* des autres souches. Une étude plus récente a confirmé que les souches *P. cerevisiophilus*, *P. frisingensis* et *P. sp.* faisaient partie de trois groupes distincts (Schleifer *et al.* 1990).

### 5.7. Caractéristiques sérologiques:

La technique de marquage par un anticorps fluorescent a mis en évidence que les sérums préparés contre différentes souches de *Pectinatus* ne donnent pas de réaction croisées avec d'autres contaminants de la bière (Haikara *et al.*, 1981a). D'après les tests d'immunodiffusion sur gel et d'immuno-électrophorèse, les souches de *Pectinatus* sont sérologiquement différentes et peuvent être réparties en 3 groupes différents (Haikara *et al.*, 1981b; Haikara, 1983). Deux groupes sont apparemment proches l'un de l'autre tandis que le troisième est plus distant. De plus, les résultats obtenus avec les préparations de LPS purifiés vont dans le sens de ce groupement immunologique des souches de *Pectinatus*. Les LPS des différentes souches réagissent seulement avec l'antisérum correspondant ou avec l'antisérum produit contre des souches appartenant au même groupe immunologique (Haikara, 1984).

## 6. GENERALITES SUR MEGASPHAERA CEREVISIAE

### 6.1. Historique

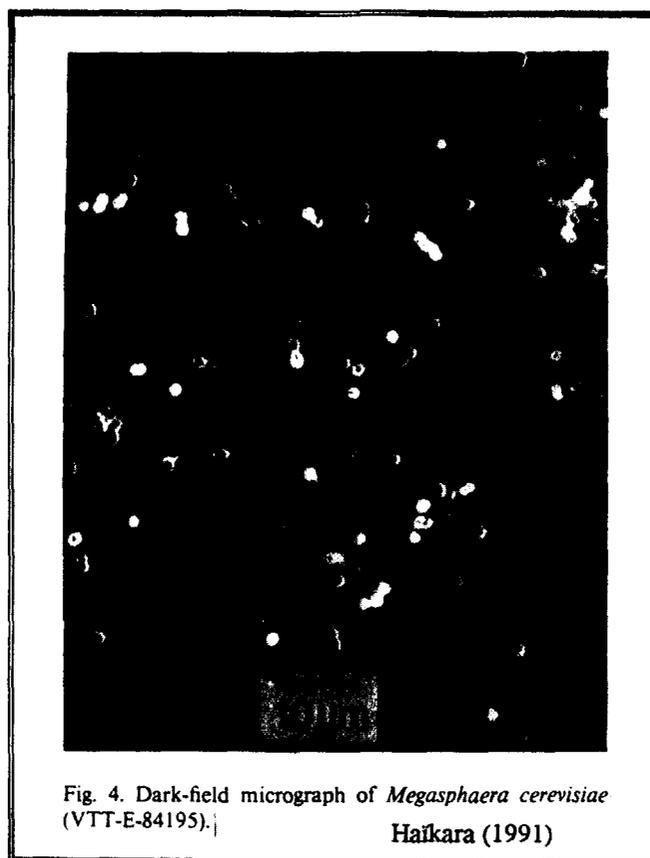
Une année seulement après la découverte de *Pectinatus cerevisiiphilus*, Weiss *et al.*, ont annoncé l'isolement d'une nouvelle bactérie anaérobie, coque, gram - négative , dans le moût de la bière , appelée *Megasphaera sp* ( Weiss, N. 1979 ) (☞ photo : page 26). Contrairement à *Pectinatus* , ce genre a déjà été décrit dans le manuel de Bergey comme appartenant à la famille des Veillonellaceae. La seule espèce de ce genre connue auparavant était *M. elsdenii*, qui a été isolée à partir du rumen de mouton. Les bactéries anaérobies strictes, gram-négative, responsables de la turbidité et de goûts désagréables dans les bières embouteillées ont été décrites pour la première fois par Weiss *et al.* ( 1979 ), et plus récemment par Haikara (1985 (a)). Englemann et Weiss ont proposé un nouveau nom d'espèce, *M. cerevisiae*, pour les souches isolées de la bière ( Engelmann & Weiss 1985 ) .

### 6.2. Taxonomie et différenciation:

Les cocci anaérobies gram-négatifs ont été placés dans le manuel de Bergey dans la famille des Veillonellaceae (Rogosa, 1974). Sur la base des caractéristiques différentielles des genres *Veillonella*, *Acidaminococcus* et *Megasphaera* de cette famille, les isolats issus de la bière peuvent être mis dans le genre *Megasphaera* (Weiss *et al.*, 1979). La capacité à fermenter des carbohydrates et à produire des acides gras volatiles contenant 5-6 atomes de carbone sont les caractéristiques qui distinguent le plus le genre *Megasphaera*. La seule espèce de ce genre connue antérieurement est un micro-organisme de mouton, *Megasphaera elsdenii* (Rogosa, 1984).

### 6.3. Caractéristiques morphologiques

*Megasphaera cerevisiae sp. nov.* est une bactérie gram-négatif. Les cellules, sphériques ou légèrement ovales , de 1,3 à 1,6  $\mu\text{m}$  de diamètre , se présentent seules ou forment des chaînes courtes ( Englemann et Weiss , 1985 ) . Dans des préparations fixées où colorées , le diamètre des cellules varie entre 1,0 et 1,2  $\mu\text{m}$  (Haikara et Lounatmaa , 1987 ) .



Les ultrastructures de la surface cellulaire des souches *M. cerevisiae* et *M. elsdenii* sont uniformes (Haikara et Lounatmaa, 1987).

#### 6.4. Propriétés biochimiques et physiologiques de *Megasphaera*:

La croissance de l'espèce *Megasphaera*, isolée à partir de la bière, se fait entre 15 et 37°C, avec un optimum compris entre 28° C à 30°C. Il se forme du sulfure d'hydrogène. Le nitrate n'est pas réduit en nitrite, et il n'y a pas de production d'indole. La croissance dans le PY (peptone-yeast extract) pré-réduit est faible, mais une croissance importante est obtenue dans les milieux PYL (peptone - yeast extract-lactate) et PYG (pepton-yeast extract-glucose). Des traces ou des quantités mineures d'acide acétique, d'acide propionique, d'acide iso et n-butyrrique, d'acide iso-et n-valérique, d'acide caproïque et de gaz, sont produites dans le bouillon PY.

L'espèce *Megasphaera* poussera dans du milieu PY, aussi bien que dans des milieux sans sucre contenant des produits d'hydrolyse de protéines (Haikara *et al.*, 1981(b)). Cependant, la croissance dans des milieux sans sucre est faible.

Back et ses collaborateurs ont montré que les espèces *Megasphaera* préfèrent le lactate et le pyruvate comme source de carbone et poussent moins bien quand elles sont obligées d'utiliser les sucres du moût de bière, tels que le glucose et le maltose . Cependant, le fructose est bien utilisé par ce micro-organisme (Back *et al.* 1981).

Les produits finaux du métabolisme de *Megasphaera* sont : les acides iso- et n-butyrique, iso et n-valérique, acétique, propionique et caproïque (Englemann et Weiss 1985 ; Weiss *et al.* 1979).

Les acides gras produits sont dépendants de la source de carbone disponible dans le milieu (Englemann et Weiss, 1985; Haikara, 1985 (a); Weiss *et al.*, 1979). Le produit final prédominant obtenu à partir du lactate est l'acide n-valérique.

Dans la bière, le produit métabolique principal est l'acide n- butyrique ( Haikara et Lounatmaa, 1987 ). La production de l ' acide caproïque est un caractère typique du genre *Megasphaera*. Toutes les espèces produisent de l'hydrogène sulfuré (Englemann et Weiss 1985; Weiss *et al.* 1979). A cause de la présence simultanée des différents acides gras et de d'H<sub>2</sub>S, le goût de la bière contaminée est particulièrement désagréable. Toutes les souches de *Megasphaera* isolées à partir de la bière sont catalase négative, benzadine négative et Voges-Proskauer négative, elles n'hydrolysent pas l'urée, l'arginine, la gélatine ou l'esculine, ne réduisent pas le nitrate et ne forment pas d'indole (Weiss.*et al.* 1979).

#### 6.5. Conditions de croissance:

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

*Megasphaera sp.* est plus sensible aux faibles pH que l'espèce *Pectinatus*, particulièrement dans la bière . Il a été montré qu'une augmentation du pH de la bière de 4,1 à 4,7 accélérât la croissance de l'espèce *Megasphaera* (Haikara et Lounatmaa, 1987; Watier *et al.* 1995). Aucun développement ne se produit à pH 4,1. Seidel *et al.* (1979) ont également décrit la croissance de l'espèce *Megasphaera* dans la bière ayant un pH à 4,38 à 4,57, mais il n'y a pas de croissance à pH 4,0. De même elle est moins tolérante à l'alcool. *Megasphaera* se développe jusqu'à des concentrations de 3,8% en milieu riche (Haikara et Lounatmaa 1987; Soberka *et al.* 1989) et de 2,25% (P/V) dans les bières (Haikara et Lounatmaa 1987).

*Megasphaera* peut être cultivée dans un milieu riche comme le milieu peptococcus ou PYG (Peptone, Yeast extract et Glucose). La croissance est alors plus rapide et se fait en une

trentaine d'heures. *Megasphaera* forme des colonies blanchâtres, lisses, opaques, larges et brillantes de 2 à 5 mm de diamètre (Englemann et Weiss 1979). Sur milieu riche elles se développent en 3 à 4 jours sous atmosphère N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>.

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

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

## **7) GENERALITES SUR LES CULTURES MIXTES**

La comportement de micro-organismes en culture mixtes dans un milieu complexe est difficile à appréhender.

Levures et bactéries lactiques sont souvent associées dans des écosystèmes naturels et peuvent être en compétition pour le même substrat. Leurs associations sont fréquentes lors de la fermentation spontanée de boissons tel que le vin ou le cidre.

Des cultures mixtes de bactéries sont souvent utilisées dans des industries agroalimentaires comme la fermentation du yaourt et des fromages.

Par exemple concernant de production de yaourt, un mélange de deux souches thermophiles, *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus*, est utilisé pour obtenir de l'acidité, la viscosité et l'arome du produit final. Pour ces deux microorganismes l'étude des mécanismes d'interaction peuvent faire référence pour notre étude.

### **7.1. Les interactions microbiennes**

#### *7.1.1. Les différents types d'interactions:*

Nous classerons les interactions microbiennes selon leurs effets, bien que la classification puisse aussi être effectuée sur les mécanismes biologiques (Bull et Slater, 1982). Dans chaque groupe, nous essayerons de donner des exemples pour illustrer les différents mécanismes rencontrés.

#### 7.1.1.1. Neutralisme

La croissance des deux organismes n'a aucun effet l'une sur l'autre.

Ce type d'interaction semble être très rare dans la nature sauf pour des populations de micro-organismes extrêmement diverses et pour lesquels les conditions de compétitions sont alors minimales (Brock, 1966).

#### 7.1.1.2. Inhibition

On parle d'inhibition lorsque l'association est néfaste pour au moins l'une des deux populations. On distingue quatre types d'inhibition:

##### 7.1.1.2.(a). Compétition

La taux de croissance ou la taille des deux populations sont limités par une dépendance commune pour le substrat ou pour l'environnement (Bull et Slater, 1982).

La compétition peut avoir lieu si un micro-organisme a un taux de croissance maximum plus élevé qu'un autre; celui-là devient dominant et élimine progressivement les autres au cours des repiquages (Deman et coll., 1960).

La constante d'affinité pour les substrats joue aussi un grand rôle dans les phénomènes de compétition. Hugenholtz et Veldkamp (1985) montrent, sur *Streptococcus cremoris* HP et *Streptococcus cremoris* HLI, que, si la concentration en lactose est faible, la souche dont la constante d'affinité est faible prédomine (forte affinité pour le substrat). Par contre pour de fortes concentrations en lactose, la souche dominante est celle dont le taux de croissance maximum est le plus important.

Enfin, le pourcentage initial des populations dans le milieu intervient aussi (Accolas *et al.* 1977).

#### 7.1.1.2.(b). Amensalisme

C'est une inhibition de la croissance d'un organisme par un autre à cause de la production de substances inhibitrices. La population antagoniste ne tire pas de bénéfice de l'interaction.

Les substances inhibitrices peuvent être des antibiotiques (incluant les bactériocines), des acides organiques (souvent l'acide lactique ou acétique), l'éthanol, etc...

Les bactériocines se définissent par une activité au spectre d'action généralement étroit (même espèce ou espèce apparentée), par la présence d'une partie peptidique, par une inactivation par les protéases et par une thermostabilité (Juillard *et al.*, 1987).

#### 7.1.1.2.(c). Parasitisme

Un organisme détourne le matériel biologique ou l'activité d'un autre en sa faveur. Cette interaction est bénéfique pour le parasite et néfaste pour l'hôte.

Une invasion phagique pendant une culture est un exemple courant de parasitisme entraînant la disparition de la population de bactéries sensibles.

#### 7.1.1.2.(d). Prédation

Un organisme engloutit totalement un autre.

Ce type d'interaction est très courant dans la nature mais il n'a pas été observé d'exemple de prédation entre des bactéries et des levures.

#### 7.1.1.3. Coopération

On parle de coopération lorsque l'association est bénéfique pour au moins l'une des deux populations. Les coopérations sont de trois sortes:

#### 7.1.1.3.(a). Commensalisme

Un organisme profite des propriétés d'un autre sans l'inhiber et sans rien lui apporter en échange.

Ces associations sont stables en culture continue et largement utilisées en industrie.

Le commensalisme peut être basé sur la production de substrats carbonés, de facteurs de croissance (vitamine, acide aminés..) ou d'activateurs (acides formique, pyruvique ..).

Dans le lait par exemple, les variants protéase négatif dépendent, pour leur nutrition azotée, des acides aminés libérés à partir des caséines par les variants protéase positif (Juillard et Richard, 1989).

Le commensalisme basé sur la production de vitamines est particulièrement bien connu entre deux populations de bactéries (Miura *et al.* 1978). Pour l'association bactéries levures, Megee *et al.*, (1972) rapportent que la croissance de *Lactobacillus casei* dépend de la riboflavine excrétée par *Saccharomyces cerevisiae*.

#### 7.1.1.3.(b,c). Mutualisme et proto coopération

Ces termes décrivent une interaction positive pour les deux organismes. Le mutualisme souligne le caractère impérial de l'association pour la survie des deux populations alors que cette notion n'existe pas pour la proto coopération.

La terme de symbiose se situe entre le mutualisme et la proto coopération. Il décrit une interaction positive pour les deux populations, non nécessaire à la survie des organismes mais qui permet la colonisation d'un milieu qui ne le serait jamais par l'un ou l'autre des organismes seuls (Bull et Slater, 1982).

#### 7.1.2. Exemples d'interactions entre levures et bactéries dans différents milieux:

Les travaux sur les interactions entre les bactéries et les levures sont peu importants. Les études sur les relations entre les bactéries lactiques entre elles, principalement dans les produits laitiers sont plus nombreuses (Moon et Reinbold, 1976; Driessen *et al.*, 1982; Liu et Moon, 1982; Juillard et Richard, 1989, 1990; Klaver et Kingma, 1989, Hegazi, 1990).

Pour les interactions entre bactéries et levures, les travaux qui existent restent souvent très descriptifs et on constate que les résultats varient énormément en fonction de la souche étudiée et des conditions d'expérimentation.

Les travaux de Lonvaud-Funel *et al.* (1988) montrent que dans le moût de raisin, les levures supplantent d'abord les bactéries jusqu'à la fin de la dégradation des sucres. Une compétition pour l'assimilation de certains substrats nutritifs expliquerait ce phénomène (Boidron, 1969a,b). D'autre part, des inhibiteurs, dont la nature n'est pas encore déterminée, seraient aussi impliqués (King et Beelman, 1986). L'inhibition fait intervenir des phénomènes autres que la production de SO<sub>2</sub>, d'alcool ou d'acidité (Lemaesquier, 1987). Les toxicité de acides gras (acétoïne, octanoïque acide, decanoïque acide) pourraient en être en partie responsables (Lonvaud-Funel, 1986).

Par la suite, un enrichissement en vitamines, en acides aminés et en peptides, libérés par les levures, stimule la multiplication des bactéries (Lafon-Lafourcade et Peynaud, 1961, Guilloux-Benatier *et al.*, 1985).

D'autre part, on note aussi un ralentissement de la fermentation alcoolique et de la population de levures en présence des bactéries dans le vin.

## 7.2. Méthode d'étude des interactions

### *7.2.1. Réponses mesurées*

Les réponses mesurées pour appréhender les phénomènes d'interaction peuvent être:

1) La croissance des micro-organismes: calcul du temps de latence, de la vitesse de croissance et de la population maximale atteinte.

Il faut être capable de discerner chaque population, ce qui n'est pas toujours évident lorsqu'on travaille en co-culture. Ainsi, l'utilisation d'un spectrophotomètre est impossible. Il faut plutôt utiliser des techniques de comptage de colonies sur des boîtes de pétri ou des méthodes de dénombrement microscopiques à l'aide d'hématimètres (cellule de Thoma).

2) La production de métabolites primaires: acide propionique, acide acétique et acide butyrique pour les bactéries et d'éthanol pour les levures.

Il faut bien vérifier, surtout en travaillant en culture mixte si ces métabolites peuvent être utilisés comme réponse car, par exemple, les levures produisent de l'éthanol et des bactéries peuvent le consommer.

3) Pour la production de métabolites secondaires comme l'acide acétique et les acides gras volatils des précautions similaires sont à prendre.

### 7.2.2 Facteurs de variations:

Les interactions peuvent varier en fonction:

#### Des souches étudiées:

Par exemple parmi toutes les levures isolées d'une pâte à pain par Spicher *et al.* (1982), certaines stimulent la production d'acide lactique des bactéries lactiques, d'autre l'inhibent. Il en est de même pour les micro-organismes isolés du vin (Fornachon 1968).

#### Du milieu de fermentation:

des phénomènes de compétition sur milieu riche peuvent faire place à un commensalisme sur milieu pauvre.

#### Des paramètres physico-chimiques de la fermentation (Lonvaud-Funel *et al.*, 1988):

D'après Nakamura et Hartman (1961), les relations entre *Saccharomyces carlbergensis* et *Lactobacillus plantarum* varient en fonction du pH, de la température et du milieu.

#### De l'inoculum (pourcentage des populations) :

Beelman *et al.* (1982) ont montré sur *Saccharomyces cerevisiae* et *Leuconostoc oenos* que si l'inoculum de levure est faible, sa phase de dégénérescence est très rapide, ce qui permet un démarrage rapide de la bactérie. Au contraire, lorsque l'inoculum est plus important, la phase de latence de *Leuconostoc oenos* est plus longue.

#### Du stade de la croissance d'un des germes:

En oenologie, il y a inhibition des bactéries par les levures en début de fermentation et activation en fin de fermentation.

#### De l'immobilisation des cellules.

Il est possible que le rapprochement géographique des souches dans le gel amplifie les phénomènes d'interaction (PIDOUX, communication personnelle).

## **8. RESISTANCE BACTERIENNE A L'OXYGENE DE L'ENVIRONNEMENT**

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

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

Les agents réducteurs sont répertoriés dans le tableau suivant : (Soberka *et al.* 1986).

<b>Faible pouvoir réducteur</b>	<b>Pouvoir réducteur puissant</b>
- dérivés sulfhydrylés	- composés polyphénoliques
- cystéine, glutathion	- mélanoidines réductones
- protéines associées à des polyphénols	- réducteurs artificiels
	- substances résultant de la caramélisation des hydrates de carbone.

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

En 1897, Kroning *et al.* (Cités par Schmid (1957)) ont été les premiers à s'intéresser à l'action des désinfectants sur la survie des micro-organismes. Leurs travaux ainsi que ceux de Madsen en 1907 (Cités par Schmid (1957)) montrent que la destruction d'une population homogène de micro-organismes soumise à l'action de désinfectants suit une loi exponentielle. Il est possible d'élargir cette loi à toute destruction de micro-organismes par traitement létal quel qu'il soit. Dans le cas d'une bactérie anaérobie stricte, l'oxygène a un effet létal. Nous sommes donc amenés à penser qu'il en est de même pour la résistance à l'oxygène.

## **MATERIELS ET METHODES**

# MATERIEL ET METHODES

## INTRODUCTION

L'étude des interactions entre les bactéries des genres *Pectinatus* ou *Megasphaera* et la levure de brasserie type *Saccharomyces cerevisiae* nous a amenés à étudier diverses souches de chaque espèce dans différents milieux de culture (milieux synthétiques, moût, bière) en tubes, en flacon ou en fermenteurs en conditions anaérobies. Le suivi des croissances microbiennes a nécessité l'utilisation de différentes techniques de mesure: densité optique, comptage sur hématimètre, dénombrement sur et dans des milieux gélosés. Les cinétiques métaboliques ont été déterminées par analyse HPLC d'échantillons régulièrement prélevés. Pour mettre en évidence et évaluer les interactions entre les bactéries et les levures, des cultures pures et mixtes ont été menées. Les effets sur le développement microbienne de différents paramètres: la température, le taux d'oxygène dissous ainsi que l'effet spécifique de l'éthanol et des acides organiques ont été étudiés. En complément, des fermentations en microbrasserie ont été menées après contamination par *Pectinatus* ou *Megasphaera*.

L'ensemble de ces points est détaillé dans ce chapitre matériel et méthodes.

## 1. SOUCHES UTILISEES

### 1.1. L'origine des souches

Les souches bactériennes utilisées *Pectinatus cerevisiophilus* (DSM 20466), *Pectinatus sp.*(DSM 20465) *Megasphaera cerevisiae* (DSM 20461) proviennent toutes de la collection Allemande internationale des souches (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen). *Pectinatus frisingensis* provient de la collection internationale Américaine: American Type Culture Collection (ATCC) sous la référence (ATCC 33332). Ces souches ont toutes été isolées de la bière.

La souche de *Saccharomyces cerevisiae* a été isolée à partir de fond de cuve de brasserie.

### 1.2. Conservation des souches et remise en culture

Les souches de levures sont conservées à 4°C dans des tubes stériles contenant de l'agar au malt, utilisé pour l'isolement et le stockage des souches. Il contient 20 g/l de malt et 20 g/l d'agar. La remise en culture des levures est faite dans du moût de brasserie filtré ou dans un milieu liquide riche : le milieu MRS (Man-Rogosa-Sharpe) à partir d'une colonie isolée.

Les bactéries *Pectinatus* et *Megasphaera* anaérobies strictes, nécessitent des conditions particulières pour leur bonne conservation. Deux modes de conservation sont utilisés selon le temps de stockage.

Pour des conservations de courte durée les bactéries sont conservées dans des flacons "pénicilline" contenant 20 ml de milieu MRS liquide modifié (pour éliminer toutes traces d'oxygène dissous) en présence de cystéine (acide aminé) ou de sulfure de sodium (Na<sub>2</sub>S), puis elles sont mises en atmosphère anaérobie, le mélange gazeux étant composé d'azote (85%) et de dioxyde de carbone (15%). Les flacons sont ensuite hermétiquement fermés. Il est possible de conserver les souches en milieu MRS anaérobie à 4°C pendant 5 mois pour le genre *Pectinatus* et 3 mois pour le genre *Megasphaera*.

Les conservations à long terme nécessitent une première étape d'isolement pour éviter d'éventuelles contaminations. L'isolement d'une colonie s'effectue sur milieu MRS en boîte de Pétri et est complété par une vérification de la pureté de la souche (coloration de Gram et galerie API); un flacon "pénicilline" contenant 20 ml de milieu MRS estensemencé et puis laisse à 30°C pour incubation. Lorsque les bactéries sont en fin de phase de croissance, on prélève 8 ml que l'on introduit dans un flacon contenant 2 ml de glycérol stérile sous atmosphère N<sub>2</sub> (85%) / CO<sub>2</sub> (15%). Après homogénéisation, on stocke les flacons à - 70°. Cette méthode de conservation des souches dans le glycérol permet de conserver un pourcentage de cellules vivantes important après plusieurs années de stockage (Barbour et Priest 1986).

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

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

## **2. MILIEUX DE CULTURE.**

Pour les différentes cultures réalisées (cultures pures de *Pectinatus*, *Megasphaera* et de *S. cerevisiae*, et cultures mixtes de bactéries avec la levure) nous avons utilisé quatre milieux : les milieux de laboratoire (milieu MRS, milieu minimum) et les milieux de brasserie (bière, moût de bière).

## 2.1. Milieux synthétiques:

### 2.1.1. Milieu Man-Rogosa-Sharpe (MRS) réduit :

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

Le pH est ajusté à 6.

Un agent réducteur (la cystéine ou  $\text{Na}_2\text{S}$ ) est ajouté à raison de 0,5 g/l pour éliminer toutes traces d'oxygène dissous et ainsi avoir une anaérobiose complète.

La résazurine (0,5ml d'une solution à 2g/l) est utilisée pour vérifier l'absence d'oxygène dissous dans le milieu.

### 2.1.2. Milieu minimum :

Le milieu minimum, préparé au laboratoire, est un milieu ne contenant que les composés essentiels à la culture des micro-organismes et qui est limité dans sa concentration en sucre (glucose 2 g/l).

Glucose	2	g/l
Phosphate de potassium	2	g/l
Chlorure de sodium	0,05	g/l
Sulfate de magnésium	0,10	g/l
Sulfate de manganèse	0,05	g/l
Nitrate d'ammonium	1	g/l
Bicarbonate	1	g/l

Extrait de levure traces

Agent réducteur : cystéine-HCl (0,5g/l) ou  $\text{Na}_2\text{S}$ , 9  $\text{H}_2\text{O}$  (0,5 g/l)

Indicateur : résazurine 0,5 ml (solution à 2 g/l).

Le pH est ajusté à 6.

Pour les conditions de cultures des bactéries *Pectinatus* et *Megasphaera*, anaérobies strictes, on élimine l'O<sub>2</sub> dissous des milieux par un barbotage du mélange gazeux N<sub>2</sub>(85%)/CO<sub>2</sub>(15%).

### 2.1.3. Préparation des milieux synthétiques

#### *2.1.3.1 En fermenteur*

Pour suivre la cinétique de croissance dans le fermenteur en présence de ces milieux, le fermenteur a été préparé par la méthode suivante

Les différents constituants du milieu sont dilués dans de l'eau distillée portée à ébullition pendant 5 minutes sous agitation. Le fermenteur rempli avec le milieu est autoclavé à 110°C pendant 20 minutes. Après autoclavage le milieu est maintenu sous barbotage d'un mélange d'azote et de dioxyde de carbone (N<sub>2</sub> : 85%; CO<sub>2</sub> : 15%) jusqu'à complet refroidissement. Après addition de l'agent réducteur (cystéine ou Na<sub>2</sub>S), le pH est ajusté à 6 avec H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ou NaOH.

#### *2.1.3.2. En tube de Félix*

Le milieu solide utilisé pour les dénombrements est un milieu MRS gélifié (4g/l d'agar agar). Parmi les composants de ce milieu, l'acétate de sodium, les sulfates de magnésium et de manganèse jouent le rôle de facteurs de croissance. Le barbotage du milieu par le mélange azote-dioxyde de carbone (N<sub>2</sub> 85%/ CO<sub>2</sub> 15%) permet un apport de dioxyde de carbone dissous, indispensable au développement de bactéries anaérobies; le sulfite de sodium ajouté en dernier, agit comme réducteur et la résazurine comme indicateur de réduction. La mise à ébullition permet d'éliminer l'oxygène dissous et de préparer la gélose.

En culture mixte levure-bactérie, pour dénombrer spécifiquement les bactéries de la cycloheximide est ajoutée dans le milieu (fongicide) à raison de 50 mg/l (Hayakawa et Nonomura 1987) de gélose.

La cycloheximide inhibe la biosynthèse protéique des cellules eucaryotes par sa fixation sur le ribosome 80 S; en l'occurrence, elle inhibe la croissance des levures.

La préparation des tubes se réalise sous la hotte anaérobie, chaque tube de Félix (15 cm de long et 6 mm de diamètre) (Annexe 1) est rempli de 4,5 ml de gélose. Les tubes fermés par un septum sont autoclavés à 105°C pendant 30 minutes.

### 2.1.3.3. En boîte de Pétri anaérobie

Comme pour le milieu liquide, les différents composants du milieu sont introduits dans de l'eau distillée avec 1,4 g de gélose. Après ébullition pendant 5 minutes sous agitation et addition de 0,5 g/l de Na<sub>2</sub>S, 9 H<sub>2</sub>O, le milieu est réparti en flacons de 100 ml. Après un barbotage rapide sous mélange d'azote et de dioxyde de carbone (N<sub>2</sub> 85%/CO<sub>2</sub> 15%) les flacons sont fermés et stérilisés par autoclave à 105°C pendant 30 minutes. Après fusion de la gélose et homogénéisation, les boîtes de Pétri sont coulées (environ 6 ml par boîte) et stockées en chambre anaérobie.

## 2.2. Milieux industriels

### 2.2.1. le moût de brasserie

Pour toutes les cinétiques de croissance, nous avons utilisé le milieu moût de bière à 8,7° Plato (densité du moût ou extrait apparent est exprimé en degrés plato; ex: nombre de g d'extrait dans 100 g de moût) provenant de Tarken, la Grande Brasserie Moderne de Roubaix, France, en filtré sur membrane de porosité 0,45 µm. Comme pour les milieux de culture MRS et minimum, un réducteur est ajouté ( 0,5 g/l de Na<sub>2</sub>S, 9 H<sub>2</sub>O.) pour éliminer les traces d'oxygène et rendre le milieu totalement anaérobie.

Le moût est un milieu complexe riche en sucres et en autres composés divers.

D'après les connaissances actuelles (Amri-Zahri,1980) le moût, constitué essentiellement d'un mélange d'eau, de malt hydrolysé et de houblon, est composé:

- de glucides fermentescibles dont les plus importants sont le maltose, le glucose, le saccharose, le fructose et le maltotriose.
- de glucides non fermentescibles représentés par deux groupes: les α- dextrines et les glucaes ( en particulier les β- glucaes et les pentosanes);
- d'une fraction azotée constituée d'acides aminés libres, de peptides et de dérivés d'acides nucléiques;
- d'acides gras dont le plus important est le stéarate;
- d'acides organiques (malate, citrate, α-cétoglutarate);
- de vitamines;
- d'éléments minéraux;
- de composés venant du houblon fournissant l'amertume: les humulones, les isocomposés, les α- acides (Alves Da Silva, 1989-Bourgeois, 1989- Moll, 1991)

### Composition générale du moût en sucres

Xylose, arabinose, ribose	0,03 g/l
Fructose	0,5-2 g/l
Glucose	7-15 g/l
Saccharose	2-6 g/l
Maltose	45-65 g/l
Maltulose	0,8-1-2 g/l
Isomaltose	0,5-1,0 g/l
Mélibiose + raffinose	0,6-1,1 g/l
Nigérose	traces
Maltotriose	10-20 g/l
Maltotriulose	0,5-0,9 g/l
Panose + isopanose	0,4-0,8 g/l
(0 à 40% fermentescibles)	

### Composition générale du moût en acides aminés

Acide aspartique, asparagine, glutamine, acide glutamique, thréonine, sérine, méthionine, isoleucine, valine, phénylalanine, glycine, alanine, tyrosine, lysine, histidine, arginine, leucine, proline

#### Autres composés

Amines, vitamines, acides nucléiques, composés lipidiques, polyphénols, éléments minéraux, composés soufrés.

Le pH est ajusté à 5,2.

### 2.2.2. La bière

La bière contient un grand nombre de constituants dont plus de 400 ont été caractérisés. L'origine de ces constituants est double: certains proviennent des matières premières (malt, houblon), d'autres sont produits au cours de la fermentation qui suit le brassage (Benard, 1970).

L'eau est le composant majeur de la bière. Les autres composants y sont dissous. Les principaux ions présents sont le potassium, le sodium, le magnésium, le calcium, les chlorures, les sulfates et les nitrates.

Le CO<sub>2</sub> produit par la fermentation se trouve à une concentration de l'ordre de 3,5 à 4,5 g/l de bière.

L'éthanol est présent à des concentrations de l'ordre de 2,5 à 5 % (v/v), bien que des concentrations proches de 10% puissent être atteintes dans des bières spéciales ("strong ale").

En général, les constituants de la bière sont classés en produits volatils et non volatils. Parmi les constituants volatils, on trouve des cétones, des acides, des esters, des lactones et des hydrates de carbone. Parmi les constituants non volatils, on trouve du glycérol, des glycérides,

des stérols, des acides organiques et des glucides résiduels. (Alves Da Silva, 1989, Moll, 1991).

La préparation de la bière est faite à partir du moût à 8,7° Plato en reproduisant à l'échelle du laboratoire le procédé de fabrication utilisé en brasserie. Un litre et demi de moût est introduit dans un erlenmeyer disposant d'une entrée d'air à la base et d'une sortie en tête munies de filtres. La stérilisation de l'ensemble se fait à l'autoclave à 105°C pendant 30 minutes. Après refroidissement à 8°C, le moût est saturé en oxygène (par barbotage d'air) etensemencé par une suspension de levures (*Saccharomyces cerevisiae*) pour obtenir une population initiale de  $2 \times 10^8$  cellules/ml. La fermentation dure 8 jours sans agitation. La bière est refroidie à 2°C pour favoriser la sédimentation des levures. Le surnageant est transvasé stérilement dans des flacons de 500 ml (bouchon à vis étanche aux gaz) qui sont stockés à 2°C pendant 15 jours.

En fermenteur la stérilité des milieux est effectuée par filtration ou par traitement thermique selon l'objectif de l'étude.

Pour mesurer les variations de la D.O. de la culture, on ne peut pas autoclaver le moût car les protéines qu'il contient précipitent et les petites paillettes formées troublent le milieu ce qui fausse les résultats de D.O.. Dans ce cas, pour éviter cet inconvénient la bière est stérilisée par filtration tangentielle sur un module "SARTORIUS" R à travers une membrane de porosité 0,45 µm. Puis le moût est injecté stérilement dans le fermenteur préalablement autoclavé.

Dans les autres cas de suivis de cultures (comptage visuel par cellule de Thoma) on peut autoclaver le moût car les protéines, même précipitées, sont dégradées par les micro-organismes (110°C pendant 20 minutes).

Dans ces deux cas l'anaérobiose est obtenue par barbotage dans la bière d'un mélange d'azote et de dioxyde de carbone (N<sub>2</sub> : 85%; CO<sub>2</sub> : 15%) jusqu'à complet refroidissement. Après addition de l'agent réducteur (cystéine ou Na<sub>2</sub>S), le pH est ajusté avec H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ou NaOH.

Pour les études en flacon la méthode de préparation est similaire à celle utilisée pour les fermenteurs. Le moût ou la bière sont maintenus sous barbotage d'un mélange d'azote et de dioxyde de carbone (N<sub>2</sub> : 85%; CO<sub>2</sub> : 15%) pendant 20 minutes. Des flacons "pénicilline" sont préalablement sertis vides sous atmosphère d'azote et de dioxyde de carbone (N<sub>2</sub>:85%; CO<sub>2</sub>:15%) puis ils sont stérilisés à l'autoclave à 110°C pendant 20 minutes. Après addition de 0,5 g/l de Na<sub>2</sub>S, 9H<sub>2</sub>O, les milieux sont introduits dans les flacons par l'intermédiaire d'une seringue et d'une unité de filtration 0,45 µm à travers le septum.

### **3. MATERIEL UTILISE POUR REALISER LES CULTURES**

#### **3.1. Culture en tubes**

Pour étudier l'influence de l'éthanol sur la croissance de *Pectinatus* les cinétiques de croissances sont suivies par l'évolution de la densité optique en biophotomètre en présence des différentes concentrations en éthanol. Les cultures sont réalisées dans des tubes standards anaérobies de 16 x 160 contenant 5 ml de milieu à 32°C et sous agitation.

Le biophotomètre S.L.E.L. O2V1 est un appareil qui permet de saisir automatiquement la densité optique à des intervalles de temps donnés en vue d'établir les courbes de croissance (Annexe 2).

Ce prototype contient un bain-marie à sec, constitué de deux blocks identiques, chaque bloc pouvant recevoir quatre tubes de cultures, agités par un seul moteur (l'agitation est de type rotatif). Chaque bloc dispose de sa propre régulation de température, ce qui permet de travailler à 2 températures différentes. Une source envoie une lumière monochromatique (630 nanomètres) à travers un tube contenant un milieu de culture. Derrière chaque tube, un photodétecteur et son amplificateur permettent de capter la lumière et de la convertir en densité optique. Les valeurs de densité optique sont stockées en mémoire à l'intérieur du biophotomètre et à la fin de la manipulation elles sont transférées sur disquette. L'exploitation des résultats sur tableur conventionnel (Lotus 123 ou Microsoft EXCEL) permet le tracé des courbes, la détermination des temps de latence selon Monod et le calcul des taux spécifiques de croissance. La densité optique est rapportée au nombre de cellules grâce à une droite d'étalonnage et permet de déterminer la population bactérienne maximale.

Des tubes standards de 16/160, anaérobies, sont remplis de 5 ml de moût avec différentes concentrations d'éthanol, stérilisés par autoclavage et placés dans ce biophotomètre prototype développé dans notre laboratoire. L'interfaçage avec un ordinateur PC-compatible permet le contrôle de l'agitation et de la température de 2 blocs de 4 tubes et le suivi simultané de 8 courbes de croissance avec une fréquence définie par l'expérimentateur.

L'ensemencement des milieux, dans tous les cas, se fait à la seringue stérilement à travers les septums de caoutchouc.

#### **3.2. Culture en flacons**

Des cultures ont été réalisées en flacons de 125 ml rendus anaérobies en les plaçant dans la station anaérobie (Annexe 3) où ils sont remplis de milieux anaérobies.

Ces flacons sont fermés hermétiquement par des septums en caoutchouc sertis par des bagues en aluminium, permettant des prélèvements stériles à la seringue.

Ces flacons sont ensuite stérilisés par autoclavage à 105°C pendant 30 minutes.

### 3.3. Culture en bioréacteurs

Nous avons utilisé des fermenteurs SETRIC set 2M (SGI) (Annexe 4) d'une contenance de 2 litres. Chaque fermenteur est commandé par un boîtier de régulation électronique MOD 7F permettant de contrôler et de suivre l'évolution des divers paramètres tels que le pH, la température, le taux d'oxygène dissous et la vitesse de rotation des pales d'agitation.

L'anaérobiose est réalisée par bullage de N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (85%/15%) du milieu.

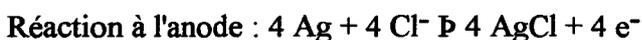
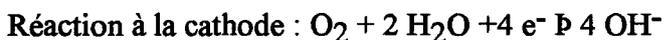
Le fermenteur est piloté par un module MRU relié à un ordinateur PC compatible. La mesure et le contrôle des variables se font par l'intermédiaire du logiciel B.I.O.A.C (SGI).

#### *Mesures et régulations des paramètres physico-chimiques sur les fermenteurs*

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

- Régulation du pH : elle se fait par une sonde de pH Ingold, stérilisable en place, de sensibilité 0,01 unité pH. En fonction de la consigne fixée le module de régulation actionne une pompe qui ajoute au milieu de culture de la soude 4 N.

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



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

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

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

### *Stérilisation des fermenteurs:*

Le fermenteur, équipé des différentes sondes est rempli (1,5l) du mout. La sortie d'air est raccordée à deux erlenmeyers montés en série. Le premier est vide et sert de piège à mousse. Le second contient de l'eau, il permet l'évacuation des gaz tout en évitant les entrées d'oxygène et les contaminations. L'ensemble du montage est stérilisé à autoclave à 105°C pendant 30 minutes.

### **Inoculation**

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

### *Prélèvements*

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

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

## 4. LE DENOMBREMENT DES MICRO-ORGANISMES

### 4.1. Détermination du nombre d'UFC

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

Après fusion de la gélose au bain marie à 100°C, les tubes sont maintenus à 45°C dans un bain-marie thermostaté. Un volume de 0,5 ml de suspension bactérienne est prélevé dans le flacon d'essai par l'intermédiaire d'une seringue et introduit dans un tube de gélose. Toujours à l'aide d'une seringue, après homogénéisation de la gélose et juste avant de plonger les tubes dans un bain d'eau froide, 0,5 ml de gélose est prélevé et introduit dans un autre tube. Huit dilutions sont ainsi réalisées de tube en tube, on s'arrête au maximum à huit dilutions car il a été démontré dans des études précédentes que la phase stationnaire de croissance des deux bactéries se situe à une concentration de  $10^9$  bactéries par millilitre. Après incubation des tubes à 32°C pendant 5 jours les colonies de bactéries sont dénombrées.

### 4.2. Comptage des organismes sur cellule de Thoma.

On ne peut pas se référer à la turbidimétrie pour suivre la croissance des bactéries et des levures en culture mixte car on ne peut pas établir de relation entre la D.O. et le nombre réel de levures et de bactéries en culture mixte. La D.O. donne un résultat global. C'est pourquoi on utilise uniquement la cellule de Thoma pour effectuer les dénombrements.

La cellule de Thoma ou hématimètre est utilisée aussi bien pour les comptages de levures que de bactéries.

Ces comptages se font visuellement, à l'aide d'un microscope. La cellule de Thoma est munie d'un quadrillage gravé dans le verre, permettant de délimiter la surface des comptages. Le volume de comptage est défini par la pose d'une lamelle, sur la lame, à une distance connue et constante.

Dès lors, on peut évaluer le nombre de cellules par volume de culture. Avant d'effectuer tout comptage, il convient de s'assurer de l'homogénéité de la répartition des microorganismes sur toute la cellule, pour affiner les comptages. Pour que la mesure soit précise, il convient de compter au moins dix carrés.

Il n'y a pas d'ambiguïté au niveau des comptages de cultures mixtes puisque une levure a environ dix fois la taille d'un *Pectinatus* et *Megasphaera*, et que les deux espèces ont des formes caractéristiques nettement différentes.

Mais *Pectinatus* étant mobile, il est nécessaire de stopper sa mobilité par l'ajout de 50  $\mu$ l d'une solution de formol dilué (5 ml de formol/15 ml d' $H_2O$ ), afin d'améliorer les conditions de comptage et la fiabilité de ce dernier.

Soit "X" le nombre de micro-organismes comptés sur la cellule de Thoma, par convention on admet :

- comptage sur un grand carré :

$X * 250\ 000$  micro-organismes/ml.

- comptage sur un petit carré :

$X * 4\ 000\ 000$  micro-organismes/ml.

(Annexe 6)

#### 4.3. Mesure de l'absorbance.

Les cinétiques de croissance des micro-organismes en culture pure sont déterminées par la mesure de la densité optique D.O. à 630 nm dans un spectrophotomètre (UVIKON 940 de KONTRON Instruments). Le zéro de la mesure s'effectue par rapport à une fraction du milieu de culture initial stérile.

Relation entre D.O. et nombre de micro-organismes.

La relation établie entre la D.O. et le nombre de micro-organismes nous permet de dénombrer rapidement les cellules en mesurant la densité optique.

Nous avons cherché la valeur de la densité optique (D.O.) maximale conservant la proportionnalité entre D.O. et nombre de cellules.

Des droites d'étalonnage ont été réalisées en suivant parallèlement la croissance en cultures pures de *S. cerevisiae* et de *Pectinatus* et *Megasphaera* sur moût à 30°C par la mesure de la turbidité des cultures à 630 nm et par comptages à l'aide de cellule de Thoma.

### **5. CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE**

Nous avons suivi disparition des sucres en apparition d'acide organique et d'alcool.

La Chromatographie Liquide Haute Performance (HPLC) est utilisée pour quantifier les métabolites synthétisés. L'ensemble de la chaîne HPLC, relié à un ordinateur PC, est piloté par le logiciel Kontron Data system 450 version 3.30. Le système utilisé est une chaîne HPLC Kontron 360 avec une colonne échangeuse d'ions H<sup>+</sup> OAKC Merck permettant ainsi la séparation des molécules chargées. L'échantillon est injecté automatiquement par un système Autosampler HPLC 360. La détection se fait par un spectrophotomètre UV Kontron 430 à 210 nm et par un réfractomètre LKB 2142 ou Kontron 475. (Annexe 5)

La colonne OAKC Merck permet de séparer les principaux acides organiques, carbohydrates et de quelques alcools présents dans le milieu MRS moût et bière.

La phase mobile est constituée de l'acide sulfurique de 0,001 N à 0,2 N. La normalité recommandée est 0,005 N (0,145 ml/l d' $\text{H}_2\text{SO}_4$ ).

La pureté de l'eau utilisée est très importante, on utilise de l'eau dé-ionisée.

La phase mobile est filtrée sur un filtre de 0,45  $\mu\text{m}$  de porosité. Les éluants sont dégazés avant utilisation, surtout si la température de travail est élevée. Le débit est de 0,5 ml/minute.

La température de travail est de 90°C. 20  $\mu\text{l}$  d'échantillon sont injectés.

### 5.1. Calibration de la colonne

Avant de passer les échantillons à analyser, une calibration de la colonne est effectuée par passage de mélanges dont les compositions et les concentrations en composés purs sont connues ( glucose, fructose, maltose, maltotriose, acide propionique, acide acétique, acide butyrique, acide succinique, acide pyruvique et éthanol) permettant l'étalonnage de l'appareil.

### 5.2. Passage des échantillons

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

## **6. L'ETUDE DE L'EVOLUTION DES POPULATIONS DE *PECTINATUS* ET DE *MEGASPHAERA* EN CO-CULTURE AVEC DES LEVURES LORS DE LA FABRICATION DE LA BIÈRE**

### **6.1. Préculture:**

Une souche pure de *S. cerevisiae* est mise en culture à 32°C dans du moût stérile et oxygéné. Pour connaître le volume de moût à préparer, nous reproduisons les techniques brassicoles qui consistent à préparer un volume de levain égale au septième du volume utile des fermenteurs. On prépare un flacon de 200 ml de levain par fermenteur en considérant un volume total de 1400 à 1600 ml pour chaque fermenteur.

Les cultures mères de *P. cerevisiophilus* et de *M. cerevisiae* sont réalisées dans du moût anaérobie à 32°C.

### **6.2. Description de la fermentation**

Le montage utilisé est présenté (☞ page 55). La fermentation est réalisée dans un fermenteur Sétric SGI de 2 litres (utiles sont remplis par 1200 ml de moût frais.) avec prélèvements réguliers pour permettre le dénombrement des levures sur cellule de Thoma et des bactéries en tubes de gélose (tubes de Félix). Le moût est saturé en oxygène par bullage d'air avant ensemencement. L'ensemencement se fait à  $2 \times 10^7$  levures/ml, soit 1/7<sup>ème</sup> du volume total du fermenteur d'après les techniques brassicoles. Les prélèvements sont réalisés après une agitation de 30 secondes à 400 tours/min permettant une remise en suspension des levures et des bactéries. La fermentation principale dure 8 jours sans agitation. En fin de fermentation la bière est refroidie à 2°C pour favoriser la sédimentation des levures. La tratraversage est réalisé vers le fût sous atmosphère de CO<sub>2</sub>. La garde dure 24 jours à 2°C.

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

## 7. ETUDE DES INTERACTIONS BACTERIES - LEVURES DURANT LA FERMENTATION PRINCIPALE

### 7.1. Effet sur la croissance:

#### *7.1.1. Les différents types d'interactions.*

Dans les cocultures microbiennes, on peut chercher à classer les actions d'un micro-organisme sur un autre en fonction des causes de ces actions (ex: sécrétion par l'un des partenaires d'une substance toxique pour l'autre)

Nous avons réalisé des cultures pures de *P. cerevisiophilus* et de *S. cerevisiae*.

Chacune des souches s'est développée avec un taux de croissance qui lui est propre.

Par ailleurs, nous avons réalisé des cultures mixtes de ces deux populations et suivit l'évolution de chacune d'entre elles.

Ainsi nous avons les relations suivantes :

$$X_p = X_{p0} * e^{\mu_{Xp}(T-T_0)}$$

$$\text{et } Y_p = Y_{p0} * e^{\mu_{Yp}(T-T_0)}$$

Avec :  $X_p$  : nombre de levures à T.

$X_{p0}$  : nombre de levures à T=0.

$Y_p$  : nombre de bactéries à T.

$Y_{p0}$  : nombre de bactéries à T=0.

$\mu_{Xp}$  : taux de croissance des levures.

$\mu_{Yp}$  : taux de croissance des bactéries.

D'après Bizeau (1992), (annexe 7) si on établit le rapport "R" suivant :

$$R_{\text{attendu}} = \frac{X_p}{Y_p}$$

les populations finales des cultures pures de levures et de bactéries donnent un rapport théorique attendu qui correspond à l'absence d'interactions entre les deux populations.

En comparant ce rapport avec celui calculé d'après les populations finales de levures et de bactéries en culture mixte la présence d'interactions peut être décelée.

Si les rapports sont égaux, il y a neutralité; si R dévie de sa valeur théorique, il y a interaction dont il faut chercher les causes.

Le système de classification des interactions microbiennes basées sur les causes est difficile à appréhender, car il est bien rare qu'une seule action s'exerce de façon univoque d'une

souche à l'autre. Odum (1953) propose un système de classification fondé sur les effets selon les définitions suivantes.(cf Tableau 1)

		Résultats de l'action de la population X sur la population Y		
		+	o	-
Résultats de l'action de la population Y sur la population X	+	++	o+	-+
	o	+o	oo	-o
	-	+-	o-	--

Tableau 1.

+ : action positive

- : action inhibitrice

o : pas d'action

oo : neutralisme      +- ou -+ : parasitisme, prédation      o+ ou +o : commensalisme

-o ou o- : amensalisme

++ : mutualisme

-- : compétition

### 7.1.2. Détermination de la nature de l'interaction.

Des interactions entre *Pectinatus* et les levures ont été observées, la nature de ces interactions a été recherchée en déterminant si la régression de la croissance des levures est due à un métabolite de *Pectinatus*.

Une population de  $10^6$  bactéries/ml a été mise en culture durant 5 jours dans 50 ml de moût de brasserie conditionné en flacons.

Les milieux de cultures ont été centrifugés, puis filtrés à travers une unité de filtration de porosité  $0,45 \mu\text{m}$ ; le milieu ainsi recueilli est dépourvu de bactéries mais contient toujours les métabolites sécrétés.

Pour rétablir les conditions expérimentales de la précroissance de *Pectinatus* le moût récupéré de la centrifugation a été désoxygéné par barbotage de  $\text{N}_2$ (85%),  $\text{CO}_2$ (15%) pendant 30 minutes, de la cystéine a été ajouté et le pH ajusté à 5,2.

La concentration en glucose de ce milieu a été ramenée à sa concentration initiale grâce à un témoin prélevé avant l'ensemencement de *Pectinatus* qui a été analysé par HPLC.

(les autres sucres : maltotriose et maltose, ne sont pas utilisés par *Pectinatus*)

[glucose] initiale = 6,4 g/l.

[glucose] après *Pectinatus* = 1,15 g/l.

Pour savoir si *Pectinatus* inhibe la production d'éthanol des levures ou s'il l'utilise pour produire de l'acide propionique une culture de *Pectinatus* a été réalisée sur 1,5 l de moût à 30°C en fermenteur SETRIC set 2M (SGI) de 2 l sous addition d'éthanol.

L'addition externe d'éthanol reproduit la production progressive d'éthanol par les levures. Cette cinétique de production a été initialement déterminée par l'analyse biochimique par HPLC de la culture pure de levures à 30°C.

Pour des contraintes de risques de contaminations, d'exactitude des petits volumes à injecter dans le fermenteur et de présence au laboratoire (injection toutes les 2 h pendant 4 jours), l'éthanol a été injecté automatiquement en utilisant les pompes de l'HPLC KONTRON 360. Ces pompes ont délivré les petits volumes précis d'éthanol absolu aux-temps voulus grâce à un programme réalisé sur l'ordinateur qui pilote le système HPLC.

Afin de déterminer si l'acide propionique ou l'acide butyrique est le métabolite responsable de l'inhibition des levures, des cultures pures de levures ont été réalisées dans du moût à 30°C à différentes concentrations d'acide propionique (de 0 à 55mmol/l) ou d'acide butyrique (0 à 22 mmol/l).

Ces mêmes cultures de levures ont été faites à différentes concentrations d'acide acétique (de 0 à 33 mmol/l), pour vérifier que l'acide propionique est bien le métabolite qui inhibe la croissance des levures.

## 7.2. Effet des levures sur la résistance à l'oxygène des bactéries anaérobies strictes:

### *7.2.1. Mesure en culture pure:*

La préculture a été réalisée dans le moût à pH 5,2, en ajoutant du Na<sub>2</sub>S: 2mmol/l<sup>-1</sup>. L'inoculation a été faite sous des conditions anaérobies à 32°C. Au début de la phase stationnaire, la préculture a été centrifugée et les bactéries ont été resuspendues dans le moût pour éliminer des traces de l'agent réducteur. La survie de *Pectinatus* sous différentes concentrations d'oxygène a été étudiée dans des fermenteur (SETRIC SET 2M, SGI, FRANCE) contenant 1,5l de moût stérile. Le taux d'oxygène dissous a été mesuré avec une sonde ampérométrique à oxygène, et ajusté par bullage d'air, d'O<sub>2</sub> ou d'N<sub>2</sub>. La température a été mesurée et contrôlée par une sonde de température. Après stabilisation du taux d'oxygène dissous et de la température, le moût a été inoculé. La numération des bactéries survivantes a été effectuée de façon anaérobie par des dilutions en série dans des tubes en verre blanc de 8x160mm (appelés tubes Félix), contenant de l'agar MRS. Pour l'expérience en co-culture, 50mg/l de cycloheximide (inhibiteur de la croissance des levures) ont été ajoutés à l'agar MRS. Des échantillons (0,5ml) ont été régulièrement prélevés du réacteur cultivé et immédiatement transférés dans 4,5ml d'agar MRS préréduit liquéfié (fondant) équilibré à 45°C. Après dilution,

les tubes ont été immédiatement refroidis dans l'eau et incubés à 32°C. Au bout de 5 jours, les colonies (cfu) sont dénombrées directement dans les tubes. Les levures ont été comptées avec une cellule de comptage de Thoma. La résistance à l'oxygène de *Pectinatus* a été étudiée dans différentes conditions d'oxygène et de températures avec l'air.

- Etude de l'influence de la concentration d'oxygène sur la survie de *Pectinatus* ou *Megasphaera*

Pour les expériences suivantes, la température de 32°C a été choisie. Dans un premier temps, la résistance de trois souches de *Pectinatus* a été déterminée dans des conditions de saturation en oxygène (air). La souche de *P. cerevisiophilus* a été choisie pour les expériences ultérieures. La résistance de *P. cerevisiophilus* à l'oxygène (air, O<sub>2</sub> et O<sub>2</sub>+N<sub>2</sub>) a été étudiée à cinq taux différents d'oxygène dissous: saturation à 5,74 mg/l (saturation à l'oxygène pur), 4,78 mg/l (saturation à l'air), 3,34 mg/l et 0,96 mg/l (mélange O<sub>2</sub>+N<sub>2</sub>). Pour l'expérience avec un taux d'oxygène dissous de 0 mg/l, un bullage de mélange N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> en présence de réducteur été effectué.

- Etude de l'interaction taux d'oxygène/température sur la survie de *Pectinatus* ou *Megasphaera*

A saturation la quantité d'oxygène varie avec différentes températures (4,78 mg/l pour 32°C; 8,35 mg/l pour 15°C; 9,82 mg/l pour 8°C). Pour les expériences à 15°C et 8°C, les fermenteurs ont été refroidis par thermocryostat.

#### 7.2.2. Mesure en culture mixte:

L'expérience a été effectuées pour étudier la résistance à l'oxygène de *Pectinatus* en co-culture avec *S. cerevisiae*.

La première a consisté à étudier la résistance à l'oxygène de *P. cerevisiophilus* à 32°C en co-culture avec *S. cerevisiae* avec le taux d'oxygène (4,78 mg/l) constant (milieu sous bullage d'air).

Le moût la température et le taux d'oxygène dissous ont été mesurés et enregistrés sur ordinateur à intervalles réguliers.

### 7.2.3. Traitement des données

La valeur de la réduction décimale ( $D_{oxy}$ ) caractérise le temps nécessaire pour réduire le nombre de bactéries survivantes d'un facteur 10 pour un taux d'oxygène dissous fixe. La valeur du temps de réduction décimale est indépendante du nombre d'organismes initiaux et est caractéristique de la résistance à l'oxygène. Nous avons choisi de le noter ( $D_{oxy}$ ) par analogie au  $D_T$  propre à la thermorésistance.

La destruction décimale est calculée par régression linéaire de la droite ( $t = D_{oxy} \cdot \log(N_0/N)$ ) de pente  $D_{oxy}$ . L'exactitude de cette valeur est estimée par le coefficient de corrélation  $r^2$  et par l'écart type  $\pm\delta$ .

### 7.3. Techniques de microscopie électronique

Quelques millilitres (10 ml) de cultures bactériennes (phase exponentielle) sont centrifugés, les cellules lavées avec de l'eau distillée. Le culot est traité selon LUFT 1971. Il est remis en suspension dans le fixateur constitué, à parts égales, de:

- tampon cacodylate : 0,2 M- pH 7,4
- glutaraldéhyde : 3,6 %
- rouge de ruthénium : 0,15 %

Après 5-6 h à +4°C, le matériel est lavé par le liquide de rinçage : tampon cacodylate - rouge de ruthénium - eau (1:1:1). On effectue ensuite une post-fixation de une nuit à + 4°C dans un mélange à parts égales de :

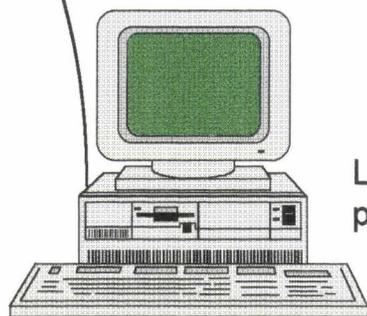
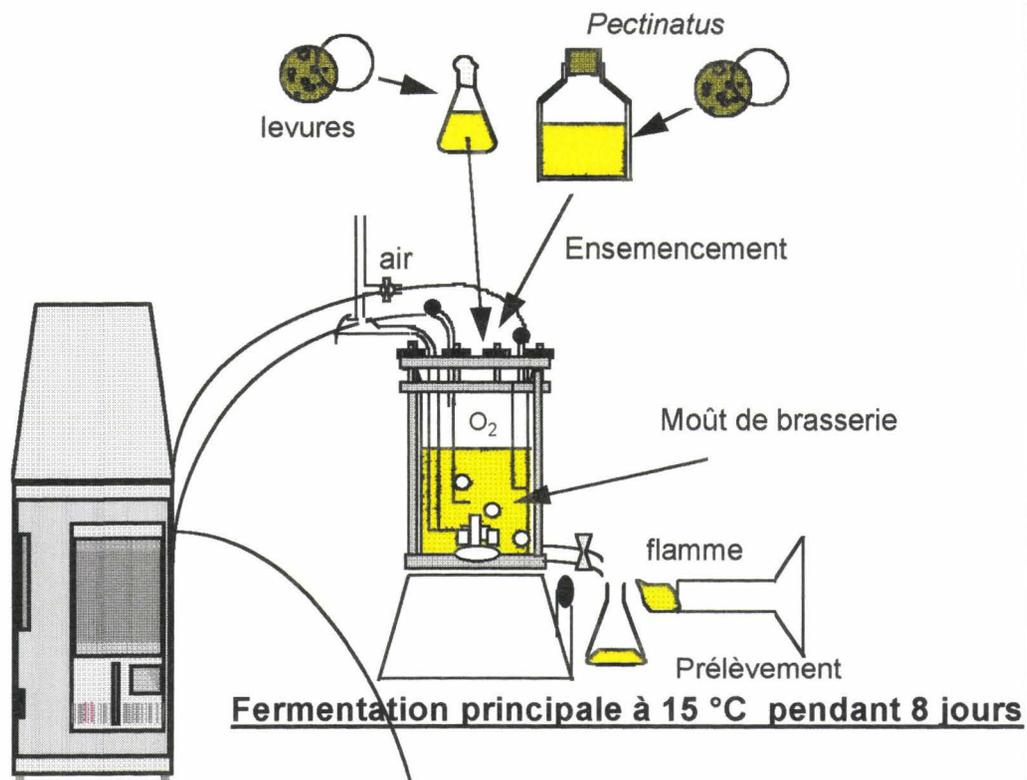
- tampon cacodylate : 0,2 M- pH 7,4
- rouge de ruthénium : 0,15 %
- tétroxyde d'osmium : 4,0 %

La déshydratation se fait dans l'éthanol puis l'oxyde de propylène et l'inclusion dans l'épon (LUFT, 1961).

Si la friabilité des culots gêne les opérations, il est possible de procéder à une inclusion préalable des cellules dans une gélose à 2% d'agar. On traite ensuite des portions de 1 à 2 mm<sup>3</sup> découpées après solidification de la gélose sur une lame de verre.

Les coupes sont observées au microscope électronique JEOL 120CX, 80 kv.

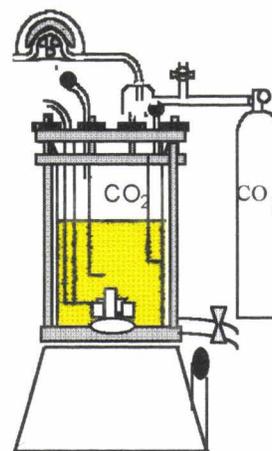
## Culture mère



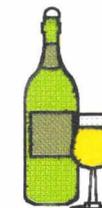
La mesure et le contrôle des variables se font par l'intermédiaire du logiciel B.I.O.A.C (SGI)

2°C 24 jours

garde



**Fermentation  
secondaire**



**Stockage et  
consommation**

**Montage de la micro-brasserie utilisée pour la fermentation de la bière.**

## **RESULTATS ET DISCUSSION**

# RESULTATS ET DISCUSSION

## 1. ETUDE DE L'EVOLUTION DES POPULATIONS DE *PECTINATUS* ET DE *MEGASPHAERA* EN CO-CULTURE AVEC *SACCHAROMYCES* LORS DE LA FABRICATION DE LA BIÈRE.

Le premier stade où la contamination est possible correspond à l'ensemencement par les levures, du moût stérile et oxygéné, dans la cuve de fermentation principale. Les risques de contamination lors de cette étape sont très élevés d'autant plus que les levures sont recyclées jusqu'à 7 fois. A l'échelle industrielle les levures ayant effectué une fermentation principale sont récupérées en fond de cuve, centrifugées puis réensemencées pour une nouvelle fermentation primaire. Une faible contamination accidentelle du levain durant ce cycle, trouvant des conditions de développement favorables, pourra se développer entraînant des contaminations importantes en particulier lors des derniers recyclages. Cette contamination persistera également durant la fermentation secondaire. Une faible contamination indécélable peut donc s'amplifier jusqu'à amener d'importantes dégradations dans la bière.

La détection des contaminants anaérobies stricts est rarement effectuée en brasserie. Les industriels ne voyant pas actuellement la nécessité d'effectuer ces analyses, peu de laboratoires sont équipés pour faire ces détections.

Cependant il apparaît clairement que *Pectinatus* et *Megasphaera* présentent d'importants risques de développement dans la bière. L'isolement d'une souche de *Pectinatus sp.* et d'une souche de *M. cerevisiae* par Haïkara (1985a) dans le levain, conforte cette hypothèse. Il est donc possible que ces deux contaminants puissent se développer dans le moût lors de la fermentation.

Pour observer et confirmer ces risques des fermentations ont été menées pour étudier l'évolution des populations au cours de fabrication de la bière, lors des fermentations principales et du recyclage.

**RELATION ENTRE L'ABSORBANCE ET LE NOMBRE DE CELLULES  
DETERMINE PAR COMPTAGE.**

La mesure de la densité optique et la détermination de la nombre de cellules par comptage sur cellule de Thoma nous ont permis de déduire les relations suivantes tableau-1.

<i>S. cerevisiae</i>		<i>P. cerevisiiphilus</i>		<i>M. cerevisiae</i>	
D.O. 630 nm	cellules/ml x 10 <sup>4</sup>	D.O. 630 nm	cellules/ml x 10 <sup>4</sup>	D.O. 630 nm	cellules/ml x 10 <sup>4</sup>
0,009	25	0,001	25	0,001	25
0,01	35	0,043	325	0,029	300
0,03	45	0,22	3600	0,045	800
0,05	65	0,31	5200	0,062	1400
0,13	150	0,4	6400	0,121	2000
0,27	300	0,52	8000	0,209	3600
0,42	475	0,64	10000	0,349	6000
0,54	600	0,74	12000	0,694	12400
0,71	775	1	16400	1	22000
0,89	975				
1	11000000				

Tableau. 1

Pour *Saccharomyces cerevisiae*:

$$\text{D.O. 630 nm} = \ll == \gg N_{\text{hématicimètre}} = 1,1 \times 10^7 \text{ cellules/ml}$$

Pour *Pectinatus cerevisiiphilus*:

$$\text{D.O. 630 nm} = \ll == \gg N_{\text{hématicimètre}} = 1,6 \times 10^8 \text{ cellules/ml}$$

Pour *Megasphaera cerevisiae*:

$$\text{D.O. 630 nm} = \ll == \gg N_{\text{hématicimètre}} = 2,2 \times 10^8 \text{ cellules/ml}$$

Pour les bactéries, le comptage a présenté quelques difficultés dues à leur mobilité. Dans un premier temps, nous les avons comptées sans les fixer. Par la suite, pour améliorer la reproductibilité des résultats, nous les avons immobilisées par l'ajout d'un fixateur (☞ page 46).

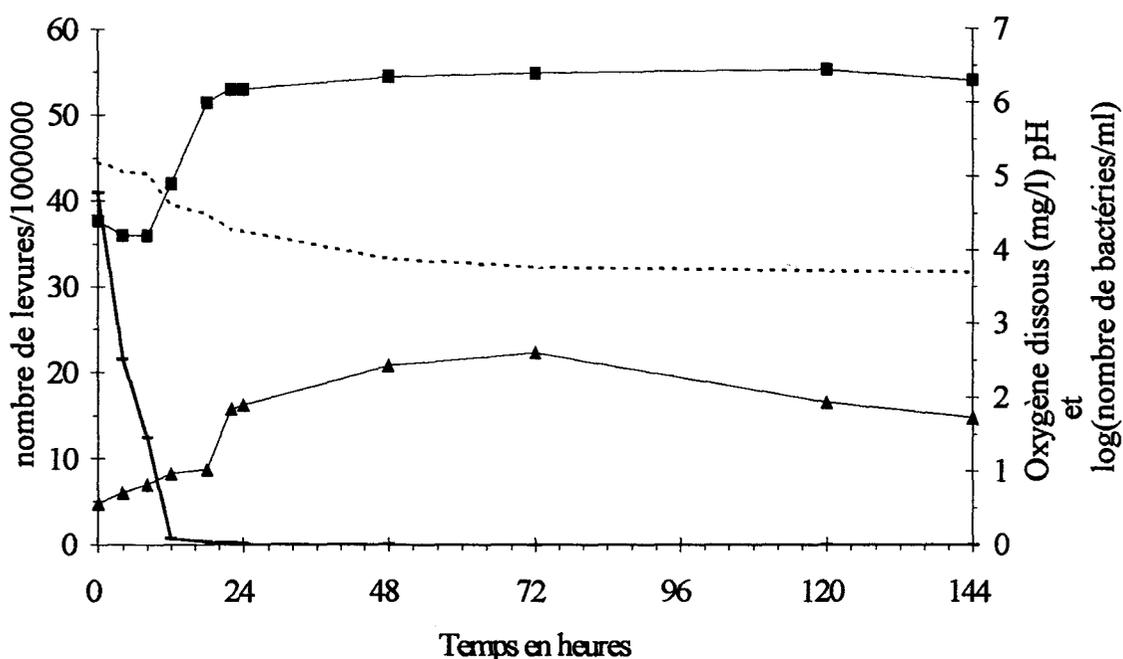
## **1.1 Evolution des populations de levures et de bactéries lors d'une contamination expérimentale:**

Pour mieux appréhender les risques et les conséquences d'une contamination par *Pectinatus* ou *Megasphaera*, des contaminations expérimentales ont été réalisées dans des conditions proches de cellules rencontrées en industrie. L'installation utilisée peut être assimilable à une microbrasserie (De Clerck et De Clerck 1966; Harrison et al.1987). Cependant quelques améliorations ont été apportées. L'ensemble des procédés d'ensemencement, de fermentation, de traversage et de mise en fût y sont effectués en circuit fermé en conservant l'anaérobiose.

La stérilité parfaite du moût et de l'ensemble du montage avant fermentation est assurée par une stérilisation de 30 minutes et à 105°C. Ces précautions ainsi que l'utilisation d'une souche pure de levure permettent d'éviter les contaminations lors de la fermentation et lors du traversage par d'autres micro-organismes que ceux étudiés. Le chauffage du moût peut provoquer un développement de goûts de caramel, mais les considérations d'ordre microbiologique ont prévalu. En effet la moindre contamination par un micro-organisme étranger, pas toujours détectable d'ailleurs, peut perturber les résultats biochimiques et organoleptiques. Afin d'éviter les mauvais goûts engendrés par l'oxydation (peroxydes) et la photodégradation de la bière (Kuroiwa et Hashimoto 1961, Gunst et Verzele 1978, Kattein et al.1988), l'ensemble du procédé de fabrication de la bière et du stockage à basse température a été réalisé à l'abri de la lumière et de l'oxygène.

### **1.1.1. Suivi de la cinétique de croissance de *Pectinatus*, lors de la fermentation d'un moût par *S. cerevisiae* à différentes températures (15°C et 22°C) en microbrasserie:**

La figure 1 montre l'évolution des populations microbiennes, bactéries et levures, ainsi que l'évolution du pH et de la concentration de l'oxygène lors d'une contamination de *P. cerevisiophilus* DSM20466.



**Figure. 1.** Cinétique de développement de *P. cerevisiophilus* DSM 20466 (■), lors de fermentation d'un moût par *S. cerevisiae* (▲) en microbrasserie à 15°C, pH (---), oxygène dissous (—).

Dans les premières heures de fermentation l'oxygène dissous décroît, le milieu est parfaitement anaérobie après 15 heures de fermentation. Après ensemencement du moût ( $2,1 \times 10^6$  levures/ml), les levures se développent. La cinétique de croissance ne présente pas de phase de latence. En phase exponentielle le taux de croissance est de  $0,007 \text{ h}^{-1}$ . La phase stationnaire est atteinte après 72 heures de croissance, la population finale étant de  $1,4 \times 10^7$  levures/ml. Cette population est inférieure à celle généralement obtenue en brasserie industrielle qui est proche de  $9 \times 10^7$  levures/ml. Cela pourrait s'expliquer par la présence de *Pectinatus* DSM20466.

En effet des études en culture mixte, des observations, détaillées plus loin, ont montré qu'un développement de *Pectinatus* pouvait limiter la croissance de levures à 32°C. Après inoculation du moût par *Pectinatus*, on observe dans un premier temps une diminution des bactéries survivantes. Avant la fermentation principale, le moût est oxygéné afin de fournir l'oxygène nécessaire à la multiplication des levures. 16 heures plus tard, la totalité de l'oxygène dissous est consommée par les levures et le milieu devient anaérobie. La croissance des bactéries reprend dès que le taux d'oxygène dissous est inférieur à 2mg/l. Ces observations

correspondent aux résultats obtenus dans l'étude de la résistance à l'oxygène et à ceux de Soberka *et al.* (1989).

*Pectinatus* commence à se multiplier et à se développer jusqu'à 72 heures pour atteindre une concentration cellulaire finale de  $2,6 \cdot 10^6$  ufc/ml pour 15°C et de  $10^7$  ufc/ml pour 22°C (fig-1, 2). Ainsi, comme dans le cas de l'étude de l'interaction entre *Pectinatus* et la levure à différentes températures, la contamination est d'autant plus importante que la température augmente. L'oxygène dissous est consommé plus rapidement par les levures quand la température augmente. Ce qui permet à *Pectinatus* de trouver rapidement des conditions idéales d'anaérobiose et de se développer plus vite. L'oxygénation du moût n'élimine pas totalement le risque de contamination de la bière par *Pectinatus*. Chelack et ses collaborateurs (1987) ont remarqué que par la croissance ( $10^6$  cellules/ml) et par les produits finaux du métabolisme de ce micro-organisme la bière devient impropre à la consommation.

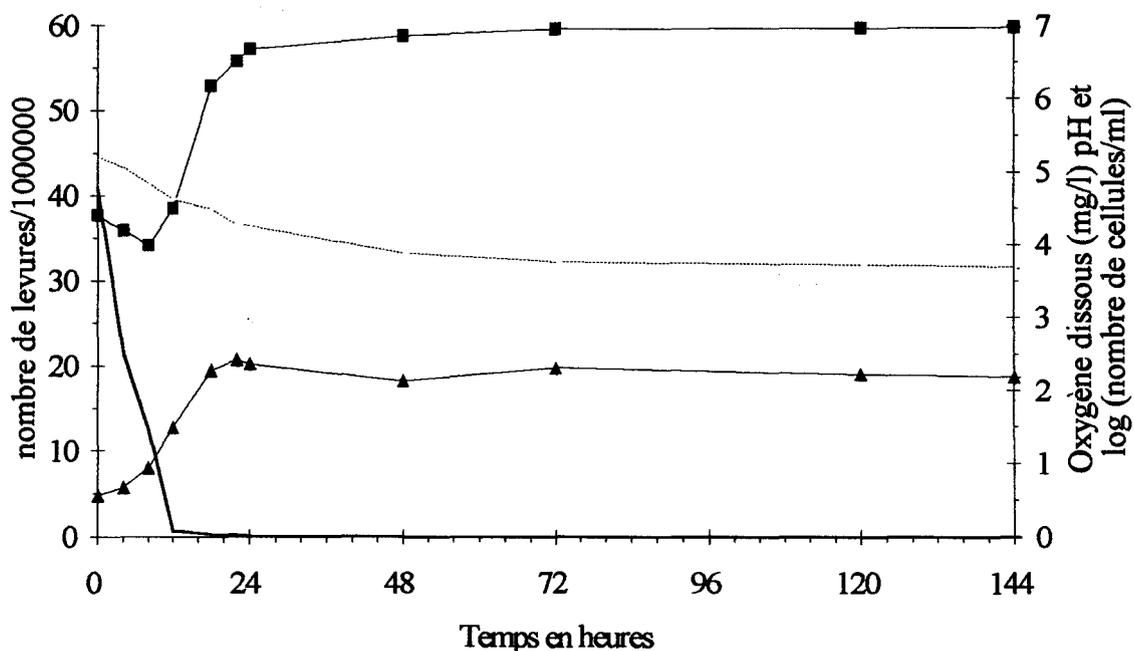


Figure. 2. Cinétique de développement de *P. cerevisiophilus* DSM 20466 (■), lors de fermentation d'un moût par *S. cerevisiae* (▲) en microbrasserie à 22°C, pH (----), oxygène dissous (—).

### **1.1.2. Suivi de cinétique de croissance de *M. cerevisiae*, lors de la fermentation d'un moût par *S. cerevisiae* à différentes températures (15°C et 22°C) en microbrasserie:**

Une expérimentation similaire a été réalisée avec *Megasphaera* DSM 20461. La courbe de l'évolution de la population de *M. cerevisiae* et de *S. cerevisiae* sont reportées sur la figure 3. Pour *Megasphaera*, un plus grand nombre de cellules a dû être inoculé pour permettre d'en suivre l'évolution de la population. Le nombre d'unités formant des colonies (ufc) diminue dans les premières heures de fermentation. Entre 2 et 4 heures de fermentation une chute du nombre d'ufc est observée. Il paraît fort improbable que cela soit dû exclusivement à la mort des cellules. En effet ceci voudrait dire que la mort des cellules serait plus rapide lorsque le taux d'oxygène dissous est plus faible. Pour expliquer cette chute du nombre d'unités formant des colonies (ufc), on peut émettre l'hypothèse que les bactéries, sous l'effet de l'oxygène dissous se regroupent par deux ou par trois, ce qui divise le nombre d'unités formant des colonies (ufc) d'autant. Ce mécanisme a d'ailleurs été proposé pour d'autres bactéries dans le cas d'agents létaux comme la température (Tsang et Ingledew 1982). Dans ces conditions, le nombre d'unités formant des colonies (ufc) déterminé ne correspondrait plus au nombre de bactéries réellement présentes ce qui expliquerait la chute du nombre d'unités formant des colonies (ufc) au début de la croissance. La croissance de *M. cerevisiae* diminue en début de culture, par contre elle reprend plus vite (au bout de 4 heures). La phase stationnaire est atteinte au bout de 12 heures, la concentration des bactéries est alors de  $6 \times 10^6$  cellules/ml. La concentration d'oxygène est moins importante lorsque la température est plus élevée. L'oxygène présent dans le milieu est consommé par les levures plus rapidement, en 16 heures, donc l'influence de l'oxygène sur la croissance de *M. cerevisiae* est moins importante. Le pH est stable autour de 3,6 après 96 heures.

A 22°C, (figure 4) les résultats sont similaires à ceux observés à 15°C. La croissance des levures est stable après 20 heures de culture ( $8 \cdot 10^7$  cellules / ml).

Après 8 heures de culture, l'oxygène n'est plus présent dans le milieu, le nombre de cellules de *M. cerevisiae* en début de fermentation n'a pas diminué. Sa croissance est lente, et la population maximum atteint  $7 \cdot 10^6$  cellules / ml. Le pH baisse puis se stabilise à 3,8 au bout de 45 heures.

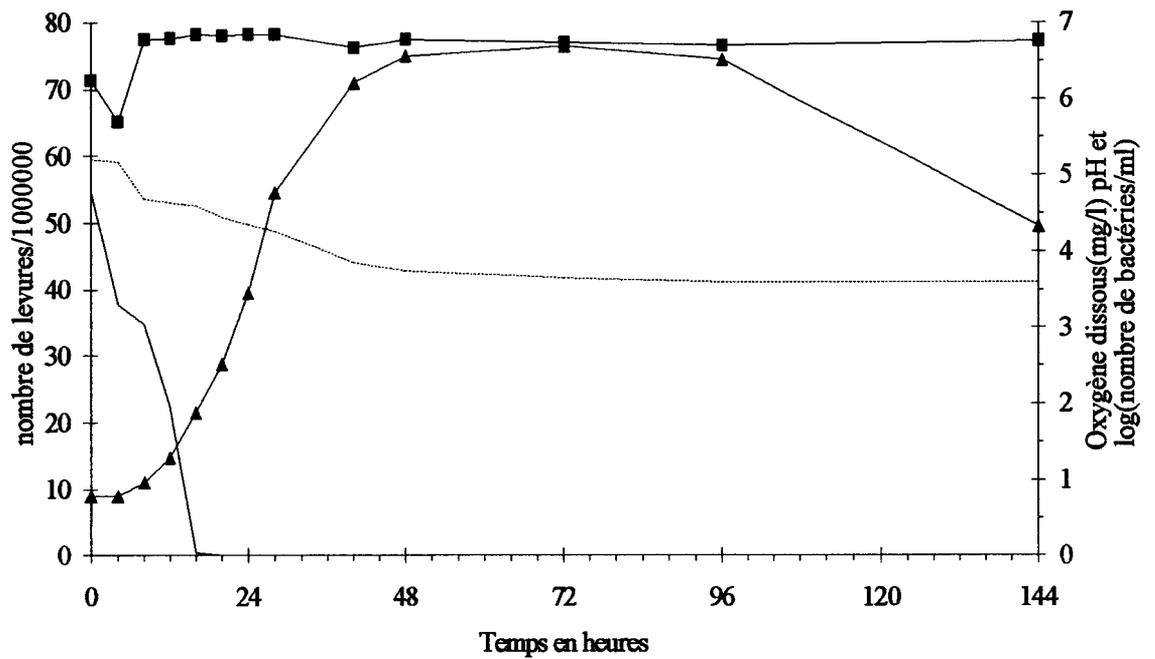


Figure. 3. Cinétique de développement de *M. cerevisiae* DSM 20461 (■), lors de fermentation d'un moût par *S. cerevisiae* (▲) en microbrasserie à 15°C, pH (----), oxygène dissous (—).

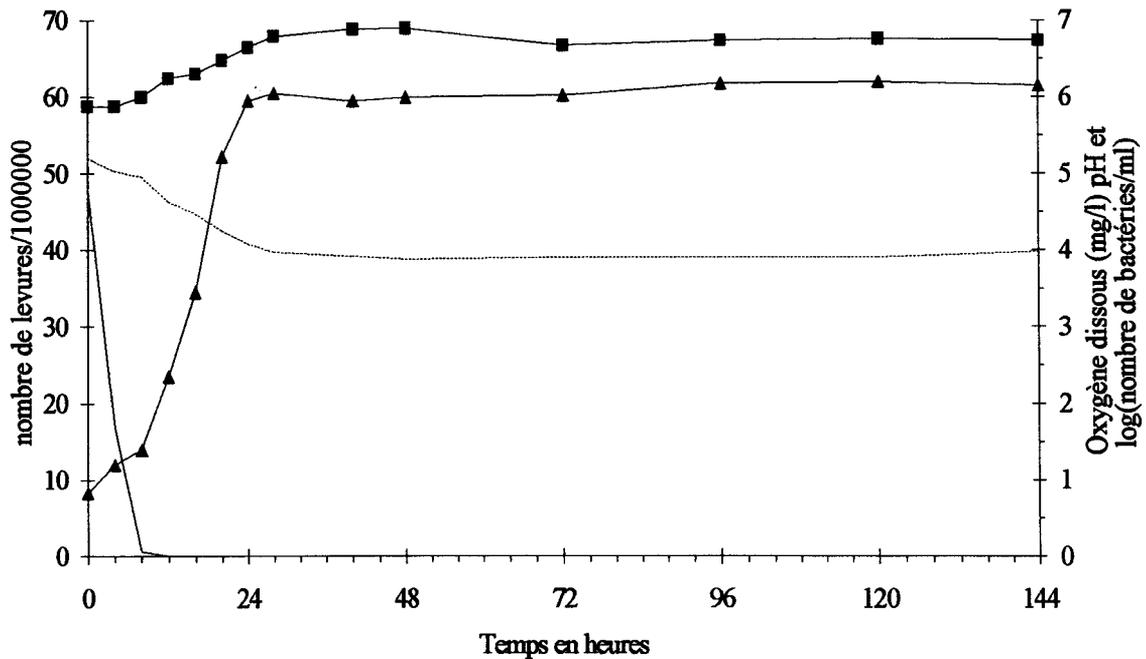


Figure. 4. Cinétique de développement de *M. cerevisiae* DSM 20461 (■), lors de la fermentation d'un moût par *S. cerevisiae* (▲) en microbrasserie à 22°C, pH (----), oxygène dissous (—).

Plusieurs conclusions peuvent être effectuées à la suite des fermentations effectuées aux différentes températures :

La température influence la croissance de *M. cerevisiae* directement, et indirectement en agissant sur la consommation d'oxygène par les levures : Plus la température est élevée plus le taux de croissance de *M. cerevisiae* va être élevé, plus l'oxygène va être consommé rapidement par les levures ce qui favorisera le développement des bactéries

La croissance des levures est influencée par la température, la quantité d'oxygène, par le pH modifié par *M. cerevisiae* et par les composés excrétés.

La température du moût influence principalement le taux de croissance des levures et faiblement la population maximale. En conditions d'aérobiose le métabolisme des levures est orienté vers la production de biomasse. Lorsque le milieu devient aérobie la population n'augmente plus.

A 15°C et plus particulièrement à 22°C, le développement de la souche de *Megasphaera* est plus important ce qui amène une excrétion, par les bactéries, de métabolites dans le milieu ce qui diminue le pH.

Les effets conjoints des levures et des bactéries amènent le pH à une valeur où la croissance de *Megasphaera* est bloquée.

Cependant comme dans le cas de *Pectinatus*, cette étude montre que la croissance de *Megasphaera* est relativement élevée malgré des conditions défavorables de température, de pH, et de substances inhibitrices comme l'éthanol ou la présence d'oxygène dissous en début de fermentation.

#### *Fermentation secondaire:*

Il n'a malheureusement pas été possible de compter de façon fiable le nombre de bactéries durant la fermentation secondaire en raison de l'agglutination et de la sédimentation de cellules. Mais des travaux antérieurs ont montré que *Pectinatus* et *Megasphaera* ne se développent pas à 2°C, il y a donc peu de risque d'évolution du nombre pendant la garde. A basse températures les levures ont tendance à sédimenter et à adhérer aux parois emprisonnant par la même occasion les bactéries.

Le développement de *Pectinatus* ou *Megasphaera* pourrait être amplifié après chaque réutilisation du levain. Le caractère strictement anaérobie de ce micro-organisme n'arrête pas son développement pendant la fermentation de la bière. *Pectinatus* et *Megasphaera* sont des microorganismes bien adaptés aux conditions rencontrées en brasserie.

## **1.2. Etude de l'évolution d'une contamination du moût par *Pectinatus* et *Megasphaera* (durant la fermentation) lors de la réutilisation d'un fond de cuve.**

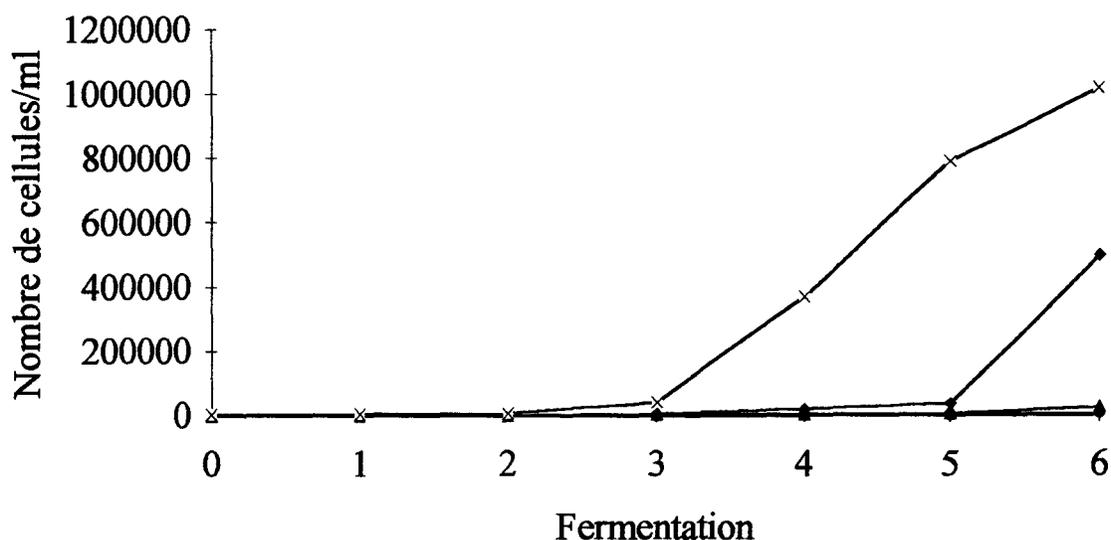
Certains brasseries utilisent leurs fonds de cuve pour ensemer une nouvelle fermentation et ainsi jusqu'à 6 voir 7 fermentations (Alves da Silva,1989). Il est apparu intéressant d'étudier en conditions pilotes l'évolution des populations de *P.cerevisiophilus* et *M. cerevisiae* lors de la réutilisation répétée de fonds de cuve et d'évaluer la population bactérienne après 6 réutilisations.

Pour la première fermentation des flacons contenant 50 ml de moût stérile et oxygéné sontensemencés avec 52, 108, 180 ou 4800 bactéries. La quantité de levureensemencée dans chaque flacon est de  $2,5 \times 10^7$  cellules/l. Les températures de fermentation seront maintenues à 15°C.

Après chaque fermentation, un comptage par cellule de Thoma est effectué pour le dénombrement des levures et des bactéries. Un comptage en tube de gélose est pratiqué pour les bactéries. La durée pour une fermentation à 15°C sera respectivement de 8 à 9 jours.

Par la suite les flacons sont laissés en garde à 2°C pendant une semaine. On récupère le levain et on réensemence la même concentration en levure pour la deuxième fermentation.

Le recyclage des levures est répété 5 fois ce qui aboutit à 6 fermentations. Un échantillon est prélevé à la fin de chaque fermentation pour effectuer des analyses chimiques.



**Figure 5.** Utilisation d'un fond de cuve contaminé à différentes concentrations par *P. cerevisiiphilus* pour réensemencer une second fermentation et plus à 15°C.

La figure 5 montre une augmentation de la croissance de *P. cerevisiiphilus* après plusieurs cycles de fermentation. La qualité de la bière est significativement altérée à partir du troisième recyclage pour un ensemencement de 4800 cellules/ml et à partir du cinquième recyclage pour un ensemencement de 180 cellules/ml. L'analyse chimique du milieu après le sixième recyclage montre, pour un ensemencement de 4800 cellules/ml, une faible quantité d'acide propionique synthétisée par *P. cerevisiiphilus*. Cela explique qu'à la sixième fermentation le goût obtenu soit modifié.

Une expérience identique a été menée avec *M. cerevisiae*, et il n'a été décelé aucune croissance de *M. cerevisiae* pendant la réutilisation d'un fond de cuve.

Donc le risque d'altération du goût de la bière semble plus grand lors de contaminations par *Pectinatus* que par *Megasphaera* en particulier lors des derniers recyclages.

Les developpement des bactéries lors de la fabrication de la bière ayant été démontrée, il est apparu important d'étudier la résistance de *P. cerevisiiphilus* et *M. cerevisiae* à l'oxygène.

Dans le cas d'une contamination par *Pectinatus* ou *Megasphaera*, la fabrication de la bière avec un faible taux d'alcool peut être problématique entraînant l'apparition de mauvaises odeurs provenant de la synthèse d'acide propionique, d'acide acétique et d'acide butyrique par *Pectinatus* ou *Megasphaera*.

## 2. Influence des levures sur la résistance de *Pectinatus* et *Megasphaera* à l'oxygène dissous :

### 2.1. Résistance de *Pectinatus* et *Megasphaera* vis-à-vis de l'oxygène en culture pure et mixte

En brasserie, l'anaérobiose est assurée pendant tout le procédé de fabrication et lors du stockage afin de protéger la bière contre les effets néfastes de l'oxygène (Chelak et Ingledew 1987). Cela permet un développement éventuel de bactéries anaérobies strictes comme *Pectinatus* et *Megasphaera*. Toutefois, le moût est oxygéné au début de la fermentation principale, avant l'ensemencement du levain pour favoriser l'augmentation de biomasse des levures. Cette étape pourrait donc limiter les contaminations du moût par *Pectinatus*. Dans ce cadre il est intéressant d'étudier la résistance de *Pectinatus* et *Megasphaera* à l'oxygène pour déterminer dans quelle mesure ces bactéries, susceptibles d'être présentes dans le levain (Haikara 1985 (a)), peuvent survivre à l'oxygénation du moût.

Les températures et les pH choisis pour l'expérimentation correspondent aux conditions rencontrées en brasserie. Le pH 5,2 est celui du moût. Les températures de 8 et 15°C sont des températures usuellement rencontrées en fermentation principale. La température de 32°C correspond à la température optimale de croissance de la souche (Watier *et al.* 1993).

Les courbes de survie des souches de *Pectinatus cerevisiophilus*, *Pectinatus* sp. et *Pectinatus frisingensis* sont rassemblées sur la figure 6. Pour les trois souches, la destruction par l'oxygène en fonction du temps est une fonction exponentielle, la représentation du log (% d'ufc) en fonction du temps permet de visualiser la résistance de la bactérie à l'oxygène. La première loi de la thermorésistance (Chowdhury *et al.* 1995) semble applicable à la destruction des micro-organismes par l'oxygène dissous. Les pentes des droites rendent compte des valeurs du temps de destruction décimale ( $D_{Oxy}$ ) de *Pectinatus*. La destruction décimale est calculée par régression linéaire de la droite ( $t = D_{Oxy} \cdot \log(N_0/N)$ ) de pente  $D_{Oxy}$ . L'exactitude de cette valeur est estimée par le coefficient de corrélation  $r^2$  et par l'écart type.

### 2.1.1. Résistance à l'oxygène en culture pure de *P. cerevisiiphilus*

La destruction de *P. cerevisiiphilus* par l'oxygène en fonction du temps est une fonction exponentielle, la représentation du logarithme (% de cfu/ml) en fonction du temps permettant la visualisation de la résistance de la bactérie à l'oxygène. Le temps de réduction décimale ( $D_{Oxy}$ ) peut être calculé pour les trois souches figure 6. Ces valeurs sont rassemblées dans le tableau 2. Il est à noter que la résistance à l'oxygène de *P. frisingensis* est 16 fois plus élevée que celle de *Pectinatus sp.* et 12 fois plus élevée que celle de *P. cerevisiiphilus*. Une population initiale de *P. frisingensis* de  $1,6 \times 10^7$  bactéries/ml n'est pas complètement détruite après 24 heures d'inoculation (exposition à 4,78 mg/l d'oxygène dissous). Par conséquent, pour toutes les autres expériences, la souche de *P. cerevisiiphilus* a été utilisée car elle est plus sensible que les autres à la présence d'oxygène dissous.

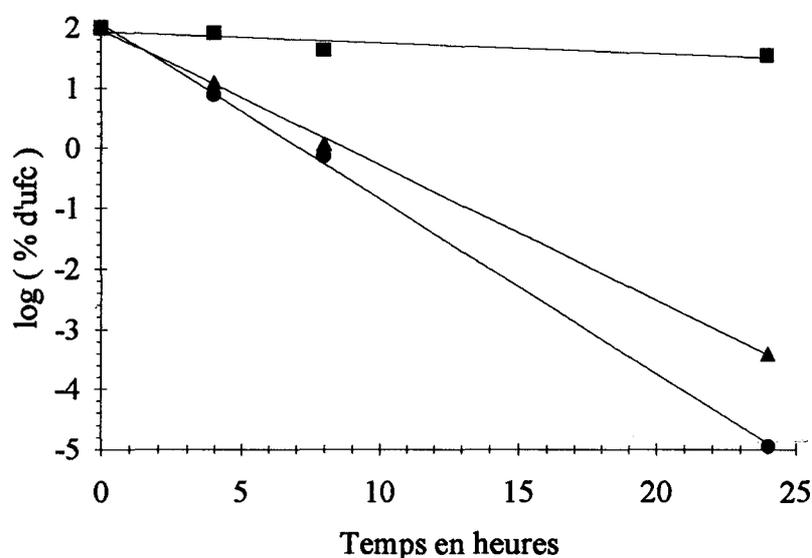


Figure 6 : Courbes de destruction de *P. cerevisiiphilus* (▲), *Pectinatus sp.* (●) et *P. frisingensis* (■) par l'oxygène à 32°C et à un taux d'oxygène dissous de 4,78 mg/l.

Souche	Oxygène (mg/l)	Température (°C)	D <sub>oxy</sub> (min)	r <sup>2</sup>	Ecart-type
<i>P. frisingensis</i> ATCC 33332	4,78	32	3310	0,99	1000
<i>Pectinatus sp.</i> DSM 20465	4,78	32	206	0,99	4
<i>P. cerevisiiphilus</i> DSM 20466	0,96	32	survie des cellules	0,99	
	3,34	32	319	0,99	24
	4,78	32	198	0,99	15
	5,74	32	115	0,99	4
	8,35	15	1200	0,99	22
	9,82	8	1323	0,99	54

**Tableau 2** : Valeurs des temps de destruction décimale ( $D_{oxy}$ ) des souches *P. cerevisiiphilus* DSM 20466, *P. sp.* DSM 20465 et *P. frisingensis* ATCC 33332 (4,78 mg/l d'oxygène dissous, 32°C, pH 5,2); de *P. cerevisiiphilus* DSM 20466 pour différents taux d'oxygène dissous (32°C, pH 5,2), et dans le moût saturé en oxygène (air) à différentes températures.

Les courbes de survie pour les différents taux d'oxygène dissous (figure-7) sont également représentées par une fonction exponentielle. Les valeurs  $D_{oxy}$  de *P. cerevisiiphilus*, calculées en fonction des taux d'oxygène, montrent que ces bactéries sont capables de survivre à des taux d'oxygène importants. Les valeurs de  $D_{oxy}$  sont rassemblées dans le tableau 2. *P. cerevisiiphilus* est une bactérie anaérobie stricte, cependant elle parvient à résister plusieurs heures à l'oxygène dissous dans le moût. Si à 5,74 mg/l d'oxygène dissous, 115 minutes suffisent pour réduire d'un facteur 10 le nombre de bactéries, il faut 2,8 fois plus de temps à 3,34 mg/l pour obtenir la même destruction.

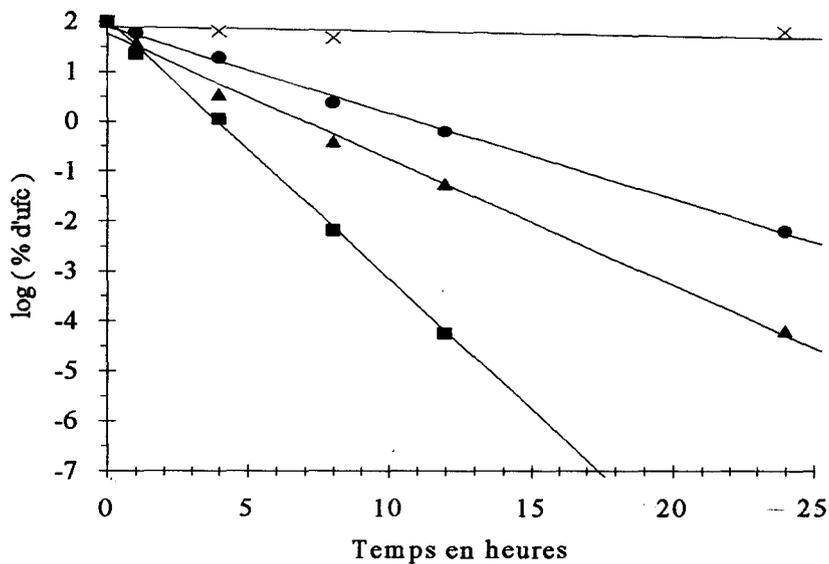
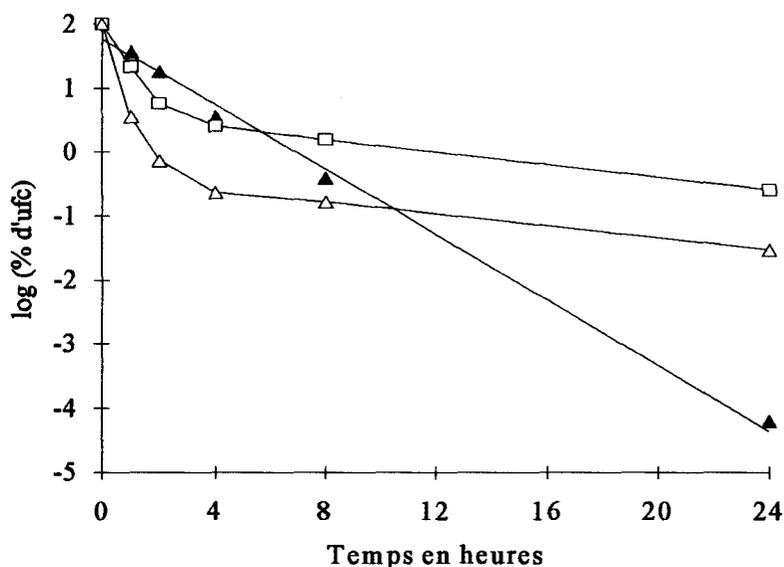


Figure 7 : Courbes de destruction de *P. cerevisiiphilus* DSM 20466 par l'oxygène à 32°C en fonction du temps pour différents taux d'oxygène dissous, 5,74 mg/l (■) 4,78 mg/l (▲) 3,34 mg/l (●) et 0,96 mg/l (x).

La résistance à l'oxygène de *P. cerevisiiphilus* a aussi été étudiée à différentes températures, 32°C (4,78 mg/l l'air); 15°C (8,35 mg/l l'air) et 8°C (9,82 mg/l l'air), à pH 5,2 dans le moût saturé par bullage d'air (Figure 8).



**Figure 8 :** Courbes de destruction de *P. cerevisiiphilus* DSM 20466 par l'oxygène (saturation par bullage d'air) en fonction du temps pour différentes températures, 32°C (▲), 15°C (□) et 8°C (△).

La destruction de *Pectinatus* à 15 et 8°C est beaucoup plus importante dans les premières heures de la croissance. Par contre, à 32°C, la courbe de survie est toujours exponentielle. Les précultures ayant été réalisées à 32°C, on peut penser que le métabolisme cellulaire reste encore actif durant quelques heures avant de s'adapter aux nouvelles conditions de température. Dans ce cas, on peut émettre l'hypothèse que la toxicité proviendrait de la formation d'  $H_2O_2$  qui n'est pas réduit par la catalase absente chez *Pectinatus* (Haikara *et al.* 1981b). Pour le calcul de  $D_{Oxy}$ , n'a été prise en considération que la partie linéaire des courbes. La destruction décimale a été calculée par régression linéaire sur la partie exponentielle de la courbe. Les résultats sont rassemblés dans le tableau 2. La résistance à l'oxygène est fortement influencée par la température, elle est beaucoup plus faible à 32°C qu'à 15°C et 8°C. A 8°C la résistance est 6,7 fois plus élevée qu'à 32°C. Quand la température d'un moût saturé en air diminue, la teneur en oxygène dissous augmente ce qui devrait réduire la résistance de *Pectinatus*. Or un comportement contraire est observé: le temps de réduction décimale est multiplié par 6,7 quand la température passe de 32°C à 8°C. Cette évolution peut s'expliquer par le ralentissement du métabolisme quand la température baisse.

### 2.1.2. Résistance à l'oxygène dans les cultures mixtes de *P. cerevisiiphilus* et *S. cerevisiae*:

La figure 9 juxtapose les courbes de destruction en culture pure et mixte de *P. cerevisiiphilus*. Il apparaît que la bactérie est plus résistante en co-culture avec *S. cerevisiae* qu'en culture pure.

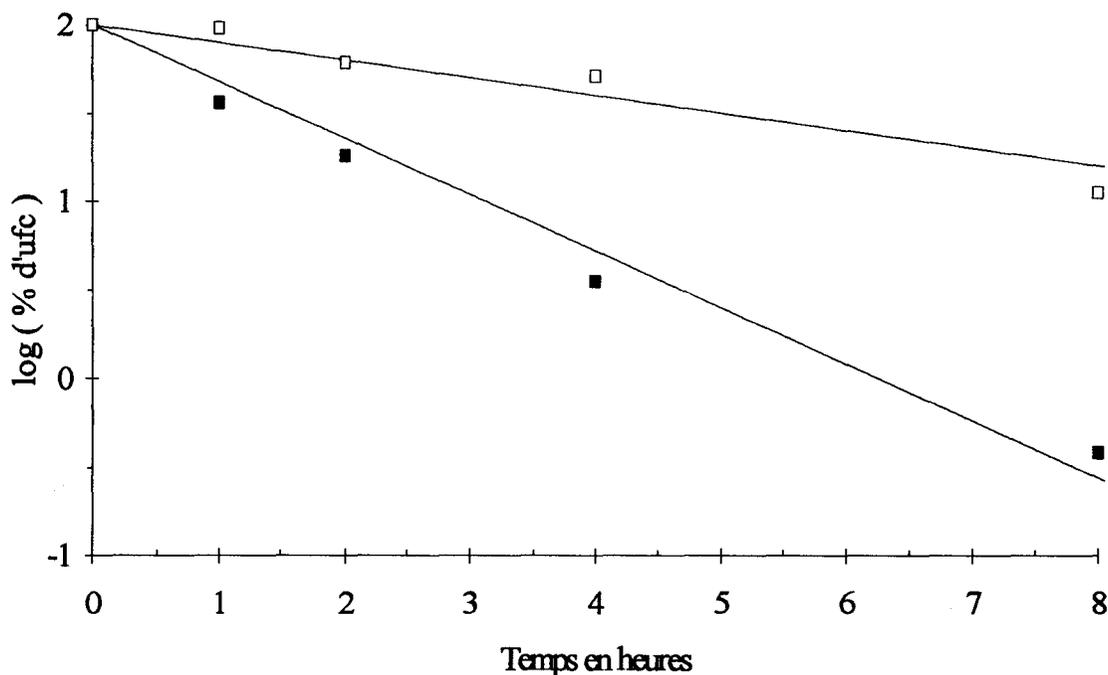
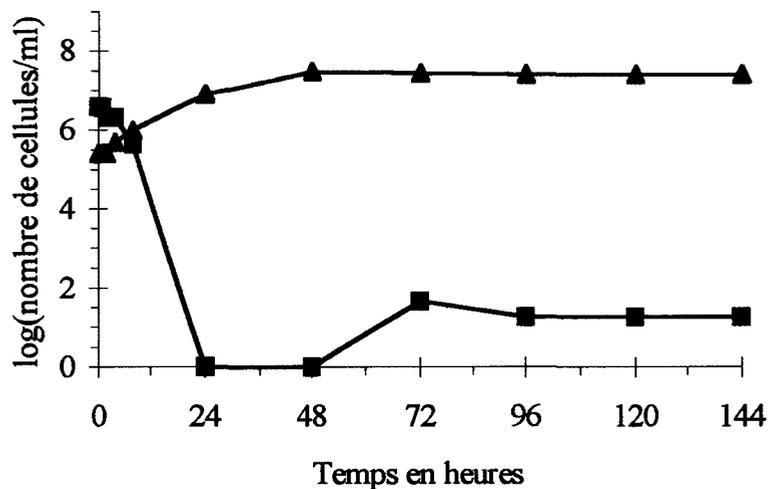


Figure 9 : Courbes de destruction de *P. cerevisiiphilus* par l'oxygène (saturation par bullage d'air) en culture pure (■) et en culture mixte (□) à 32°C et un taux d'oxygène dissous de 4,78 mg/l.

Les cinétiques de croissance d'une co-culture *Pectinatus/Saccharomyces* dans un moût maintenu saturé en air par bullage sont présentées figure 10. Dans les conditions de cette expérience il apparaît que les levures se multiplient rapidement tandis que les bactéries dépérissent à cause des conditions aérobies. Entre 24 et 48 heures, les bactéries survivantes ne peuvent plus être comptées. De 72 à 144 heures il est à nouveau possible de compter les unités formant des colonies (ufc) de *P. cerevisiiphilus* dans des tubes Félix. En utilisant le test API 20A, il a été confirmé que ce micro-organisme survivant était *Pectinatus*.



**Figure 10 :** Evolution de la population de *P. cerevisiiphilus* DSM 20466 (■ comptage en tube de Felix) et *S. cerevisiae* (▲ comptage par cellule de Thoma) en culture mixte sous bullage d'air sur mout à 32°C.

### 2.1.3. Etude en microscopie électronique:

L'effet protecteur des levures sur *Pectinatus* nous a amené à observer par microscopie électronique l'association de *Pectinatus* avec *Saccharomyces*.

En présence d'oxygène la survie de *Pectinatus* est plus importante en co-culture avec les levures. La photo ci-dessous montre à la fois des bactéries collées à la paroi des levures. Ce qui laisse supposer un rôle protecteur des levures qui créent autour d'elles une zone anaérobie par absorption d'oxygène et excrétion du CO<sub>2</sub>. Cet environnement favorable au développement des bactéries anaérobies explique que leur survie à l'oxygène dissous est plus importante en culture mixte avec des levures qu'en culture pure.

Cependant la présence d'autres bactéries non collés ne permet pas de confirmer cette hypothèse.

Cette étude ne fait pas apparaître de changement de morphologie significatif des cellules de levures en présence d'acide acétique contrairement à ce qu'a montré Maiorella *et al.* 1983. Cela peut s'expliquer par la relative faible concentration d'acide acétique synthétisé par *Pectinatus*.

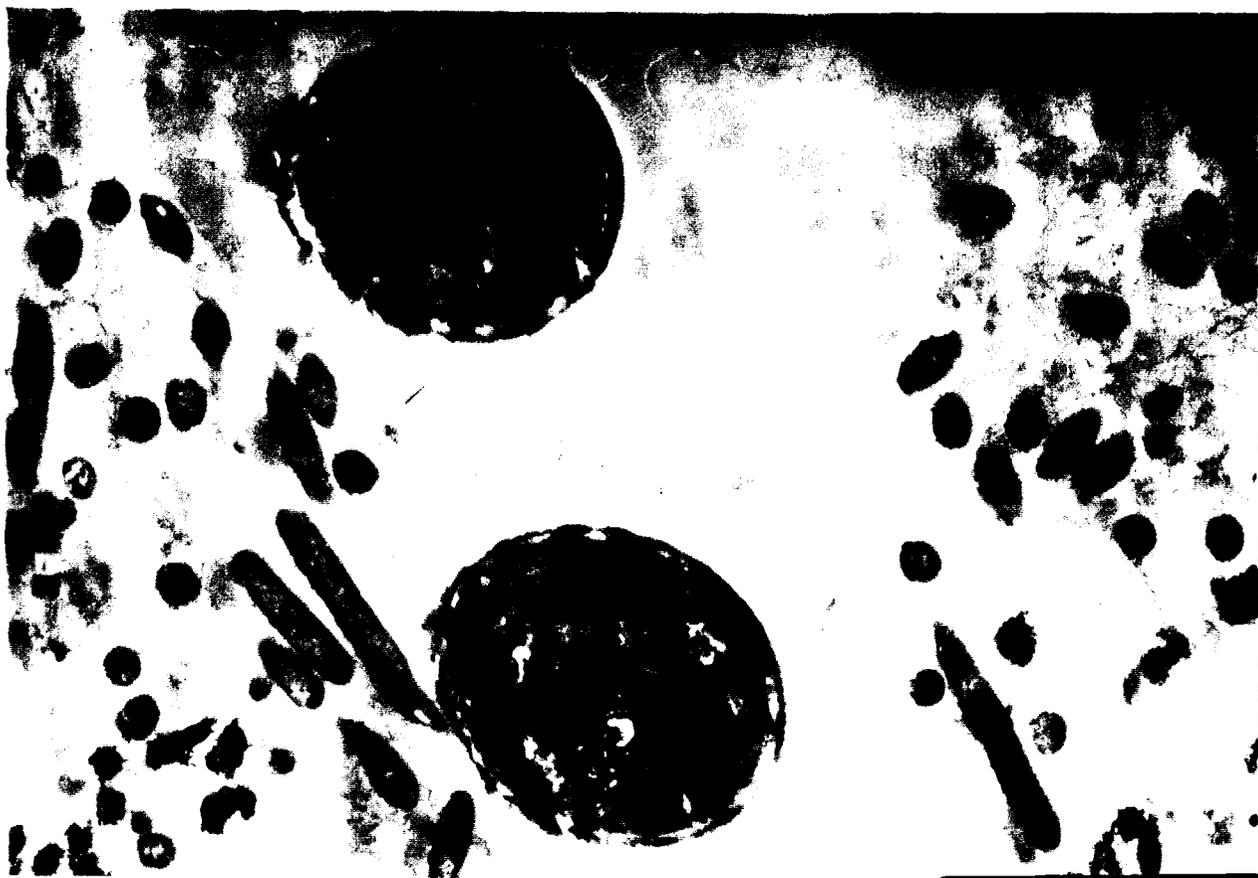
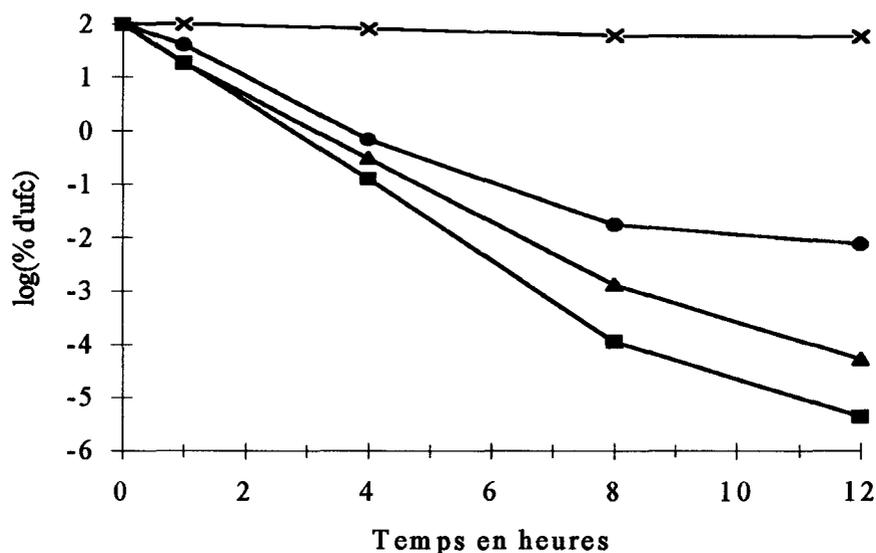


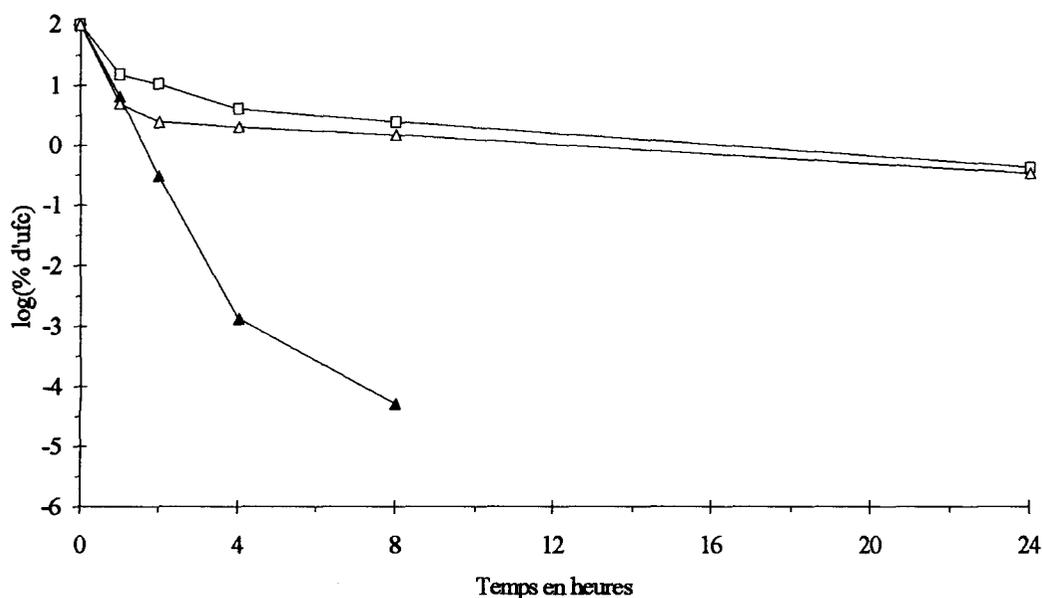
Photo microscopique électronique grossissement x 10000

#### 2.1.4. Résistance à l'oxygène en culture pure de *M. cerevisiae* :



**Figure. 11:** Courbes de destruction de *M. cerevisiae* DSM 20461 par l'oxygène à 32°C en fonction du temps pour différents taux d'oxygène dissous, 5,74 mg/l (■); 4,78 mg/l (▲); 3,34 mg/l (●) et 0,96 mg/l (x).

Les valeurs des temps de destruction décimale de *M. cerevisiae*, calculées en fonction de l'oxygène dissous, montrent que cette bactérie survit d'autant moins longtemps que la quantité d'oxygène dissous est importante (Figure 11). Les valeurs de  $D_{\text{Oxy}}$  sont rassemblées dans le tableau 3. *M. cerevisiae* est une bactérie anaérobie stricte, cependant elle parvient à résister plusieurs heures à l'oxygène dissous dans le moût. Si à 5,74 mg/l d'oxygène dissous, 81 minutes suffisent pour réduire d'un facteur 10 le nombre de bactéries, il faut 1,3 fois plus de temps à 3,34 mg/l pour obtenir la même destruction.



**Figure 12 :** Courbes de destruction de *M. cerevisiae* DSM 20461 par l'oxygène (saturation par bullage d'air) en fonction du temps pour différentes températures, 32°C (▲), 15°C (□) et 8°C (△).

La résistance à l'oxygène de *M.cerevisiae* a également été étudiée en fonction de la température (32°C,15°C et 8°C) à pH 5,2 dans un moût saturé en oxygène par bullage d'air (Figure 12). Pour les températures 15°C et 8°C, la ligne (courbe) de survie de *M. cerevisiae* était exponentielle seulement après les 4 premières heures. La destruction décimale a été calculée par régression linéaire sur la partie exponentielle de la courbe. Les résultats sont rassemblés dans le tableau 3. On remarque que la résistance à l'oxygène était fortement influencée par la température, elle était beaucoup plus faible à 32°C qu'à 15°C et 8°C. A 8°C la résistance est 16,8 fois plus élevée qu'à 32°C.

Souche	Oxygène (mg.l <sup>-1</sup> )	Température (°C)	D <sub>Oxy</sub> (min)	r <sup>2</sup>	Ecart-type
<i>M. cerevisiae</i> <i>DSM20461</i>	0,96	32	survie des cellules	0,99	
	3,34	32	108	0,94	22
	4,78	32	99	0,99	15
<i>avec S. cerevisiae</i>	4,78	32	120	0,99	15
	5,74	32	81	0,99	4
	8,35	15	1132	0,99	18
	9,82	8	1666	0,99	56

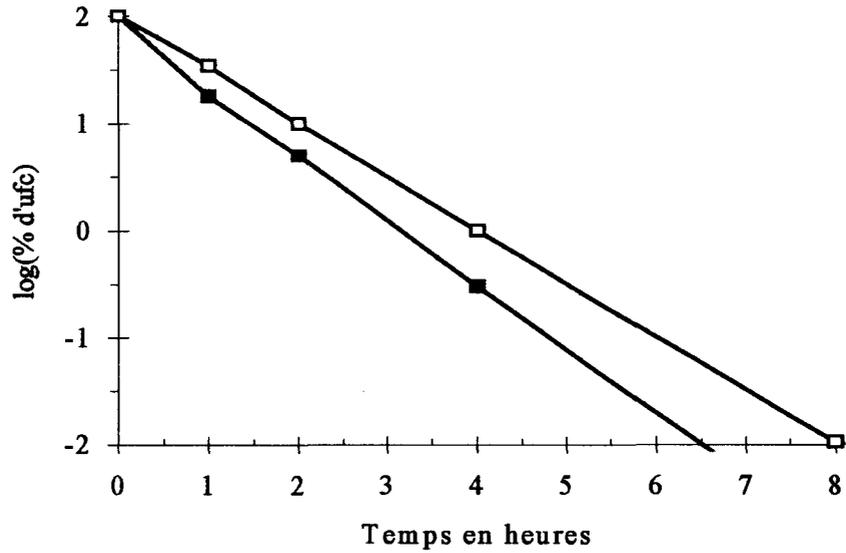
**Tableau 3 :** Valeurs des temps de destruction décimale ( $D_{Oxy}$ ) de la souche *M. cerevisiae* DSM 20461, dans le moût, à différents températures (4,78 mg/l d'oxygène dissous, pH 5,2); pour différents taux d'oxygène dissous (à 32°C, pH 5,2) et en culture mixte avec *S. cerevisiae*.

#### 2.1.5. Résistance à l'oxygène dans les cultures mixtes de *M. cerevisiae* et *S. cerevisiae* :

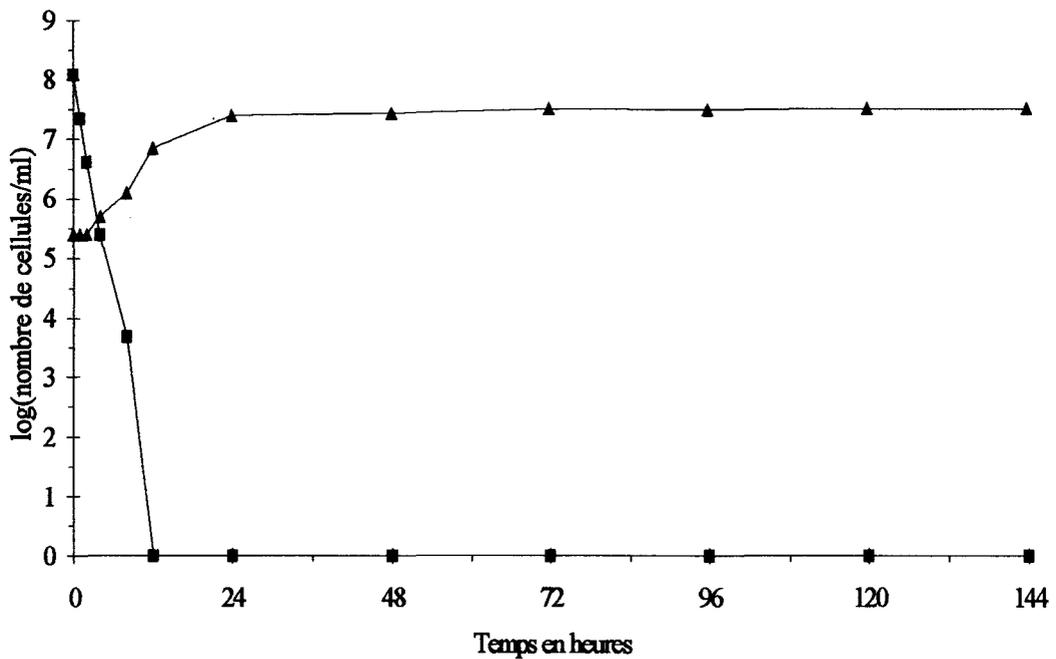
La figure 13 montre que la résistance de *M. cerevisiae* est plus importante en présence de *S. cerevisiae*. Elle est 1,2 fois plus élevée en culture mixte qu'en culture pure. Les résultats sont rassemblés dans le tableau 3.

Les résultats de co-cultures sous bullage constant saturées en oxygène pendant l'expérience complète sont présentés figure 14. Les levures se multiplient rapidement et les bactéries dépérissent à cause des conditions aérobies. Après 12 heures, les bactéries survivantes ne pouvaient plus être dénombrées.

Aucune trace de survie de *M. cerevisiae* n'est apparue ensuite.



**Figure 13 :** Courbes de destruction de *M. cerevisiae* DSM 20461 par l'oxygène (saturation par bullage d'air) en culture pure (■) et en culture mixte (□) à 32°C avec un taux d'oxygène dissous de 4,78 mg/l.



**Figure 14:** Evolution de la populations de *M. cerevisiae* DSM 20461 (■ comptage en tube de Felix) et *S. cerevisiae* (▲ comptage par cellule de Thoma) en culture mixte sous bullage d'air dans un moût à 32°C).

## **2.2. Discussion sur la résistance à l'oxygène:**

La résistance à l'oxygène a été étudiée dans des conditions proches de celles rencontrées en brasserie. Les fermentations ont été menées à pH 5,2 (pH du moût), et à 8°C et 15°C températures habituellement utilisées pour la fermentation principale. L'étude a également été menée à 32°C, température de croissance optimale des souches de *Pectinatus* et de *Megasphaera* (Watier *et al.* 1993).

L'effet létal de l'oxygène sur *Pectinatus* et *Megasphaera*, bactéries strictement anaérobies, est évident. La survie à un agent létal est particulièrement étudiée dans le cas de la résistance à la chaleur. Les lois de la thermorésistance montrent que les courbes de survie sont généralement exponentielles comme les courbes de survie en présence d'oxygène; cela laisse supposer que les lois de résistance à la chaleur semblent applicables à la résistance à l'oxygène. Comme pour la thermorésistance la population de bactéries survivantes est facteur de l'intensité de l'agent létal et du temps d'exposition. La tolérance vis à vis de l'oxygène a également observée par Haikara (1985 (b)).

Par rapport à *Megasphaera* la résistance à l'oxygène de *Pectinatus* est plus importante. Dans le genre *Pectinatus* il n'y a pas d'homogénéité. La résistance de la souche de *P. frisingensis* ATCC 33332 est très supérieure aux souches *P. cerevisiophilus* et *Pectinatus sp.* Cette différence entre les trois souches a également été remarquée lors de travaux précédents sur la résistance à la chaleur (Chowdhury *et al.* 1995; Watier *et al.* 1995). Ces observations peuvent être mises en parallèle avec celles effectuées sur des bases immunologiques par Haikara (1983) qui distinguait trois groupes différents dans le genre *Pectinatus*.

La résistance à l'oxygène augmente quand le taux d'oxygène diminue. Pour un taux d'oxygène dissous de 5,74 mg/l, 115 mn sont suffisantes pour réduire le nombre de bactéries d'un facteur 10, pour obtenir la même réduction avec 1,91 mg/l d'oxygène dissous le temps d'exposition nécessaire est 2,8 fois plus long. A 0,96 mg/l d'oxygène dissous aucune destruction n'est observée pour *P. cerevisiophilus*, la souche la moins 'oxy résistante'.

L'oxygène dissous contenu dans la bière ainsi que le volume d'air restant ont considérablement été réduits ces dernières années. Les progrès dans la technologie du remplissage ont permis de limiter l'oxygène dissous à 0,4 - 0,8 mg/l (Seidel *et al.*, 1979), ce qui rend possible la croissance de *Pectinatus* dans la bière.

La température influence grandement la résistance de *Pectinatus* et *Megasphaera* à l'oxygène, l'oxyrésistance augmente quand la température diminue. Dans un moût saturé en air

le temps de réduction décimal est multiplié par 6,7 (pour *Pectinatus* ) et 16,8 (pour *Megasphaera* ) quand la température passe de 32°C à 8°C bien qu'à saturation en air le taux d'oxygène dissous augmente quand la température diminue (Krauss *et al.* 1967). Pour ces bactéries, le métabolisme, plus actif à 32°C, pourrait expliquer l'augmentation de la létalité.

A 32°C, la courbe de survie est exponentielle, la représentation est linéaire sur une l'échelle semi-logarithmique. A 8°C et 15°C la courbe de survie présente deux phases: une première dans les premières heures où le taux de létalité est plus élevé (courbe non-exponentielle) comparée à une deuxième phase où l'on retrouve une courbe similaire à celle observée à 32°C( courbe exponentielle). Puisque les précultures sont toutes préparées à 32°C, on peut supposer que le métabolisme cellulaire reste encore actif pendant les quelques heures précédant l'adaptation aux nouvelles conditions de température. Il est possible que la toxicité puisse provenir de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> non réduit par *Pectinatus* qui est catalase négative (Haikara *et al.* 1981 a,b). Il est nécessaire de prendre en compte l'effet possible d'un choc thermique dû à une transition rapide de 32°C à 15°C ou 8°C. Pour les températures 15°C et 8°C a été prise en considération la partie linéaire de la courbe pour le calcul de D<sub>oxy</sub>.

*P.cerevisiphilus* et *M.cerevisiae*, dans le cas d'un taux constant d'oxygène dissous dans le moût, sont plus résistants en co-culture qu'en culture pure. On peut expliquer cette observation par le fait que chaque cellule de *S. cerevisiae* consommant l'oxygène moléculaire et relargant du dioxyde de carbone, il se forme autour des levures une zone pauvre en oxygène. La co-sédimentation des levures et des bactéries *Pectinatus* et *Megasphaera* favoriserait donc la résistance de ces bactéries à l'oxygène dissous.

### 3. MISE EN EVIDENCE D'INTERACTIONS PAR L'ETUDE DES CINETIQUES DE CROISSANCE ET DE PRODUCTION DES DIFFERENTS METABOLITES LORS DES CULTURE PURE ET MIXTE DE *P. CEREVISIIPHILUS* ET *S. CEREVISIAE* SUR DIFFERENTS MILEUX A 30°C

L'étude de la croissance et du métabolisme de *Pectinatus cerevisiophilus* DSM 20466 et de *Saccharomyces cerevisiae* a consisté dans un premier temps, à suivre l'évolution des paramètres mesurables: populations et concentrations des principaux composés présents au cours des différentes phases de la croissance, de les comparer et d'évaluer l'influence du substrat.

Nous avons réalisé des cultures pures de *P. cerevisiophilus* et de *S. cerevisiae*, ainsi que des cultures mixtes de ces deux micro-organismes sur différents milieux, à 30°C qui est la température optimale de développement de *P. cerevisiophilus* (Watier *et al.* 1993), à pH 6 (pH optimal de croissance de *Pectinatus*) pour le milieu minimum et milieu MRS, à pH 5,2 (pH de la fabrication de la bière) pour le moût, et à pH 4,13 pour la bière.

#### 3.a. Dans un milieu minimum

Les figures (15 et 16) représentent les cinétiques de croissance et de production de différents métabolites de *P. cerevisiophilus* DSM 20466 et de *S. cerevisiae* en cultures pures sur milieu minimum.

En fin de fermentation, la population finale de *P. cerevisiophilus* est de  $8.10^7$  cellules/ml, en 120 h (tableau 4).

Les principaux métabolites produits par *P. cerevisiophilus* sont l'acide propionique (synthétisé dès 24 h avec 16,20 mmol/l à 120h). On peut remarquer que la totalité du glucose est consommé en fin de fermentation (11,10 mmol/l à 120h). 48 heures après ensemencement la moitié du glucose a déjà utilisé parallèlement à l'augmentation de la biomasse des cellules. Après 48 heures, celle-ci atteint une phase stationnaire alors que la synthèse d'acide propionique se poursuit jusqu'à la disparition du glucose après 96 heures. Lors de la croissance de *Pectinatus*, on n'a observé aucune synthèse de acétate sur milieu minimum.

La figure 16 représente, pour une culture pure de *Saccharomyces* à 30°C dans le milieu minimum durant 120 heures, les courbes de l'évolution de la population de levures, des concentrations en éthanol et du glucose. La population finale de *S. cerevisiae* est de  $5,7.10^6$

cellules/ml, en 120 h. Très faible quantité d'éthanol produits par *Saccharomyces* (synthétisé dès 48 h avec 29,30 mmol/l à 120h) durant la fermentation.

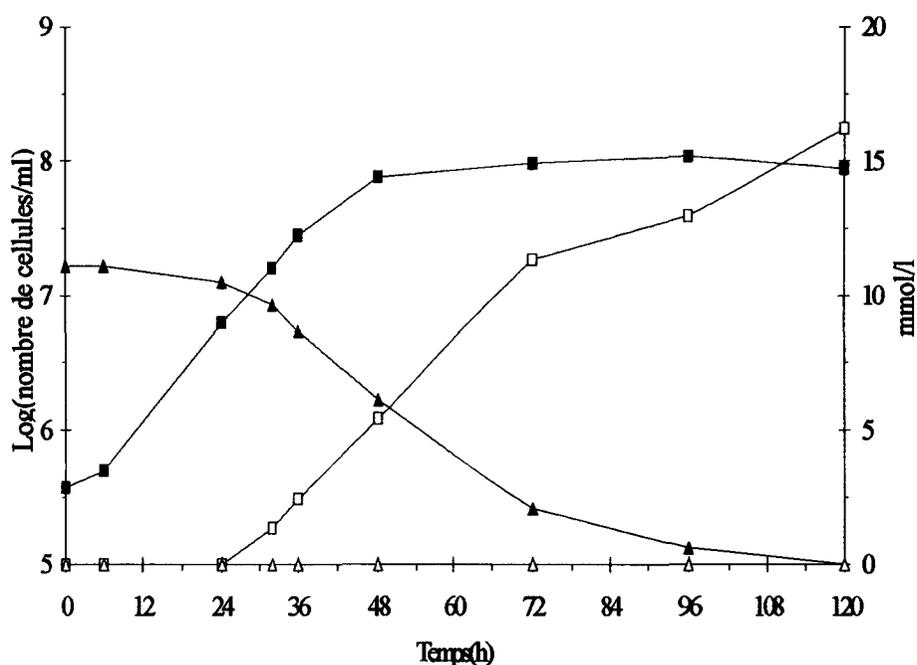


Figure. 15. Cinétique de croissance en culture pure de *P. cerevisiophilus* DSM20466 (■) en milieu minimum (30°C; à  $pH_{initial}=6$ ) en fermenteur; et évolution de la composition du milieu en glucose (▲); ac. propionique (□); ac. acétique (△).

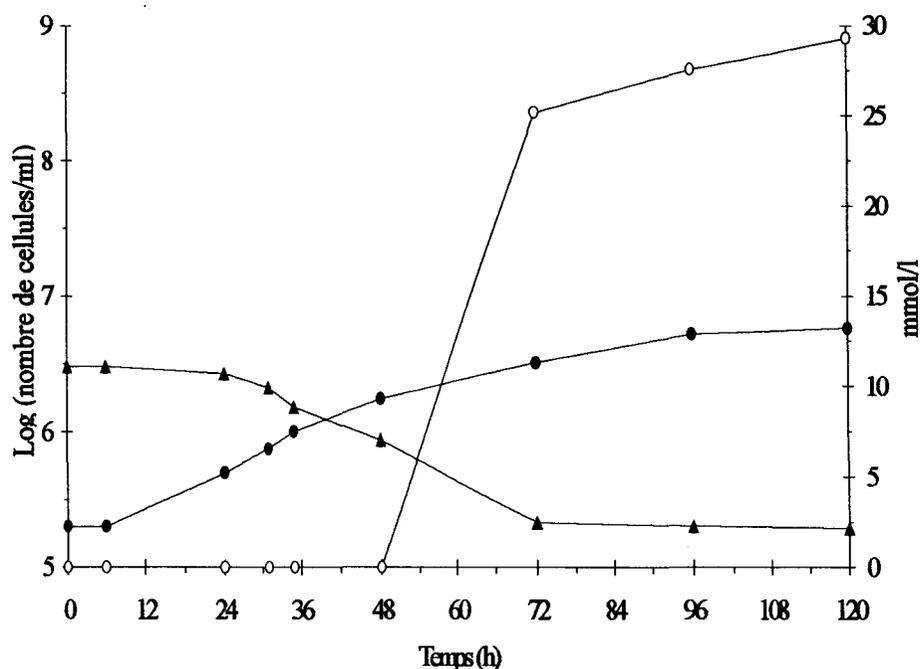


Figure. 16. Cinétique de croissance en culture pure de *S. cerevisiophilus* (●) en milieu minimum (30°C; à  $pH_{initial}=6$ ) en fermenteur; et évolution de la composition du milieu en glucose (▲); éthanol (○).

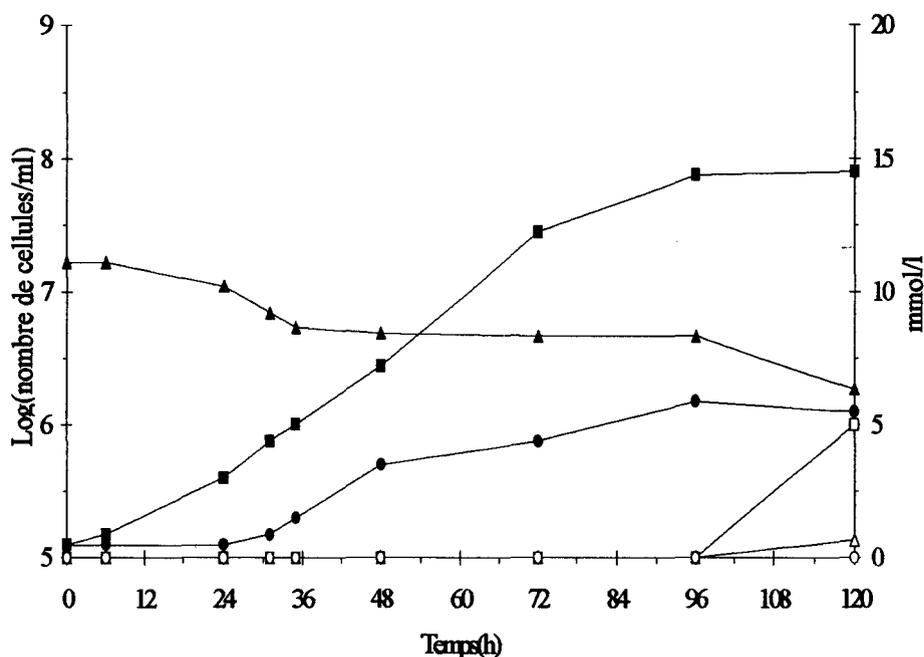


Figure. 17. Cinétique de croissance en culture mixte de *P. cerevisiophilus* DSM20466 (■) et *S. cerevisiae* (●); en milieu minimum (30°C; pH<sub>initial</sub>= 6) en fermenteur et évolution de la composition du milieu en glucose (▲); ac. propionique (□); ac.acétique (△); éthanol (○).

	Cultures pures		Culture mixte	
	Levure	<i>Pectinatus</i> DSM 20466	levure	<i>Pectinatus</i> DSM 20466
Nb cells/ml (120 h)	5,7x10 <sup>6</sup>	8x10 <sup>7</sup>	1,2x10 <sup>6</sup>	8x10 <sup>7</sup>
μ <sub>max</sub> (h <sup>-1</sup> )	0,05	0,13	0,07	0,06
r <sup>2</sup> =	0,996	0,998	1	0,999
Acide propionique (mmol/l) (120 h)	0	16,20	0	4,90
Acide acétique (mmol/l) (120 h)	0	0	0	0
Ethanol (mmol/l) (120 h)	29,30	0	0	0
pH <sub>initial</sub>	6	6	6	6

Tableau 4. Paramètres de croissance et produits de fermentation en culture pure et mixte de *S. cerevisiae* et *P. cerevisiophilus*, menées à 30°C dans le milieu minimum en condition anaérobie.

La figure 17 montre les cinétiques de croissance et de production des différents métabolites en culture mixte. En fin de fermentation, la population finale de *P. cerevisiiphilus* est de  $8 \cdot 10^7$  cellules/ml, en 120 h, et de  $1,2 \cdot 10^6$  cellules/ml, en 120 h pour *S. cerevisiae*.

En culture mixte (fig 17, tab 4), bien que la croissance de *S. cerevisiae* commence dès 24 h, aucune synthèse d'éthanol n'est observée. La synthèse d'acide propionique par *P. cerevisiiphilus* n'apparaît qu'à 96h (4,90 mmol/l).

### 3.b. Dans le Milieu MRS

Les figures (18 et 19) montrent les cinétiques de croissances et de production des différents métabolites de *P. cerevisiiphilus* et de *S. cerevisiae* en cultures pures en milieu MRS.

Les populations sont passées de  $2,5 \cdot 10^5$  à  $2,9 \cdot 10^8$  cellules/ml en 48 h pour *Pectinatus* et de  $2,5 \cdot 10^5$  à  $1,8 \cdot 10^7$  cellules/ml, en 72 h pour les levures.

On peut observer, figure 4, qu'en 48 h *Pectinatus* a consommé 3,72 mmol/l de glucose et synthétisé 41,85 mmol/l d'acide propionique. En fin de fermentation, à 120 h, *Pectinatus* a consommé la totalité du glucose (soit 11,10 mmol/l) et synthétisé 137,28 mmol/l d'acide propionique et 29,97 mmol/l d'acide acétique ( voir tableau 5), alors que dans le milieu minimum il n'y avait pas.

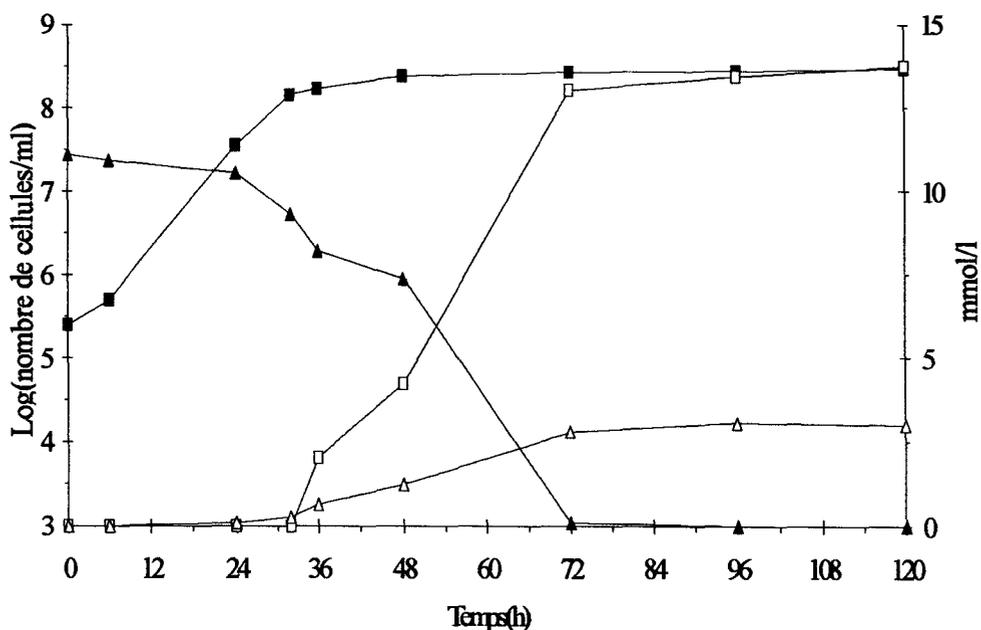
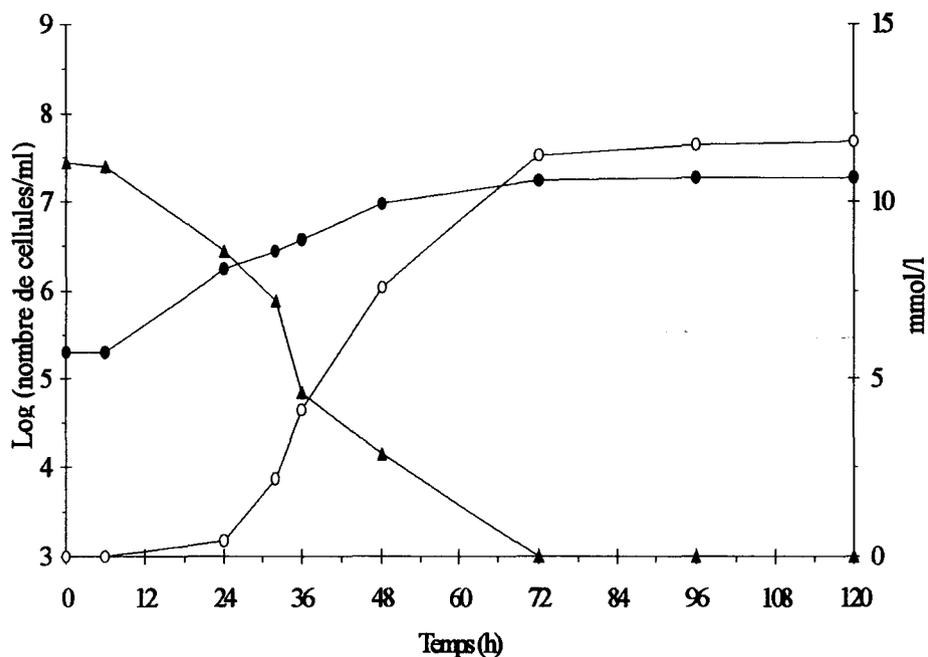
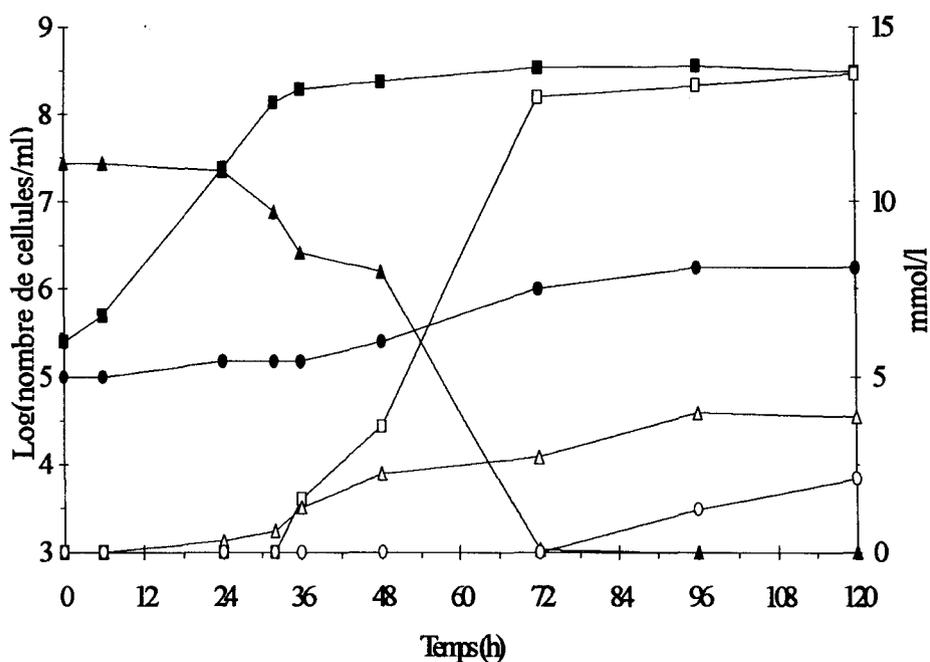


Figure. 18. Cinétique de croissance en culture pure de *P. cerevisiiphilus* (■) en milieu MRS (30°C; à pH<sub>initial</sub>= 6) en fermenteur; et évolution de la composition du milieu en glucose (▲); ac. propionique [x10<sup>-1</sup>] (□); ac. acétique [x10<sup>-1</sup>] (△).



**Figure. 19.** Cinétique de croissance en culture pure de *S. cerevisiophilus* (●) en milieu MRS (30°C; à  $pH_{initial}=6$ ) en fermenteur; et évolution de la composition du milieu en glucose (▲); éthanol [ $\times 10^{-1}$  (○)].



**Figure. 20.** Cinétique de croissance en culture mixte de *P. cerevisiophilus* (■) et *S. cerevisiae* (●) en milieu MRS (30°C;  $pH_{initial}=6$ ) en fermenteur et évolution de la composition du milieu en glucose (▲); ac. propionique [ $\times 10^{-1}$  (□)]; ac. acétique [ $\times 10^{-1}$  (△)]; et éthanol (○).

	Cultures pures		Culture mixte	
	Levure	<i>Pectinatus</i> DSM 20466	levure	<i>Pectinatus</i> DSM 20466
Nb cells/ml (120 h)	1,80x10 <sup>7</sup>	2,90x10 <sup>8</sup>	1,7x10 <sup>6</sup>	5,2x10 <sup>8</sup>
$\mu_{\max}$ (h <sup>-1</sup> )	0,07	0,22	0,01	0,21
r <sup>2</sup> =	0,992	0,994	0,850	1
Acide propionique (mmol/l) (120 h)	0	137,28	0	136,61
Acide acetique (mmol/l) (120 h)	0	29,97	0	38,46
Ethanol (mmol/l) (120 h)	117,21	0	2,39	0
pH <sub>initial</sub>	6	6	6	6

**Tableau. 5.** Paramètres de croissance et produits de fermentation en culture pure et mixte de *S. cerevisiae* et *P. cerevisiophilus*, menées à 30°C dans le milieu MRS en condition anaérobie après 120 h d'inoculation.

Les populations finales et la quantité d'acide propionique synthétisée sont supérieures dans le milieu MRS comparé à celles présentes dans le milieu minimum. Les concentrations en glucose dans les deux milieux, milieu minimum et MRS étant identiques, ce sont donc d'autres sources de carbone ou d'acides aminés qui sont utilisées par *Pectinatus* dans le milieu MRS. D'autres travaux réalisés au laboratoire (Watier 1994) ont montré que l'acétate et le succinate synthétisés par *Pectinatus* peuvent être réutilisés par ce dernier comme source de carbone pour sa croissance.

En culture pure la levure utilise le glucose dès 6 h, et commence aussi à synthétiser l'éthanol (117,21 mmol/l à 120 h). Le glucose est épuisé dès 72 h. La cinétique de croissance est conforme au modèle classique de la fermentation de l'éthanol par *S. cerevisiae* (Scriban 1995)

En culture mixte, les populations ont atteint 5,2.10<sup>8</sup> bactéries/ml pour *Pectinatus* et 1,7.10<sup>6</sup> levures/ml pour *Saccharomyces*, en 120 h (tableau 5)

D'après la figure 20, le glucose est très vite consommé par les deux micro-organismes (11,02 mmol/l à 72 h). A partir de 6 h le glucose est consommé principalement par *Pectinatus* (3,11 mmol/l à 48 h et 11,10 mmol/l à 120 h), et il y a très peu de synthèse d'éthanol.

Les populations de *P. cerevisiiphilus* est approximative double en culture mixte par rapport en culture pure, mais la production d'acide propionique semblent identiques. Par contre, pour les levures, la population et la production d'éthanol sont beaucoup plus faibles en culture mixte qu'en culture pure.

### 3.c. Dans le moût de bière

La figure 21 représente les courbes de l'évolution de la population de *Pectinatus*, du pH, des concentrations en glucose, fructose, maltose, maltotriose lors d'une culture pure de *Pectinatus cerevisiiphilus* DSM 20466 à 30°C dans le moût de bière pendant 96 heures. La fréquence des mesures est d'une toutes les 4 heures jusqu'à 48 heures puis toutes les 8 heures jusqu'à 96 heures.

Dans le but de mesurer l'activité acidifiante de la souche, l'évolution de l'acide propionique produit ainsi que la variation du pH ont été suivies.

La figure 21 montre que *Pectinatus* n'utilise pas le maltose; par contre il utilise le glucose et le fructose comme sources de carbone. Dans le moût, *Pectinatus* commence à utiliser le glucose pour sa croissance à partir de 4h.

*P. cerevisiiphilus* synthétise de l'acide propionique (45,90 mmol/l) et de l'acide acétique (17 mmol/l) à partir du glucose et du fructose. Lors de la fermentation, la population de *P. cerevisiiphilus* varie de  $2,5 \times 10^5$  cellules/ml à  $1,5 \times 10^8$  cellules/ml, le temps de latence est de 2 heures, le taux de croissance est de 0,54 et le pH final est égal à 4,46 (tableau 6). *P. cerevisiiphilus* utilise la totalité du fructose (1,95mmol/l) présent dans le moût.

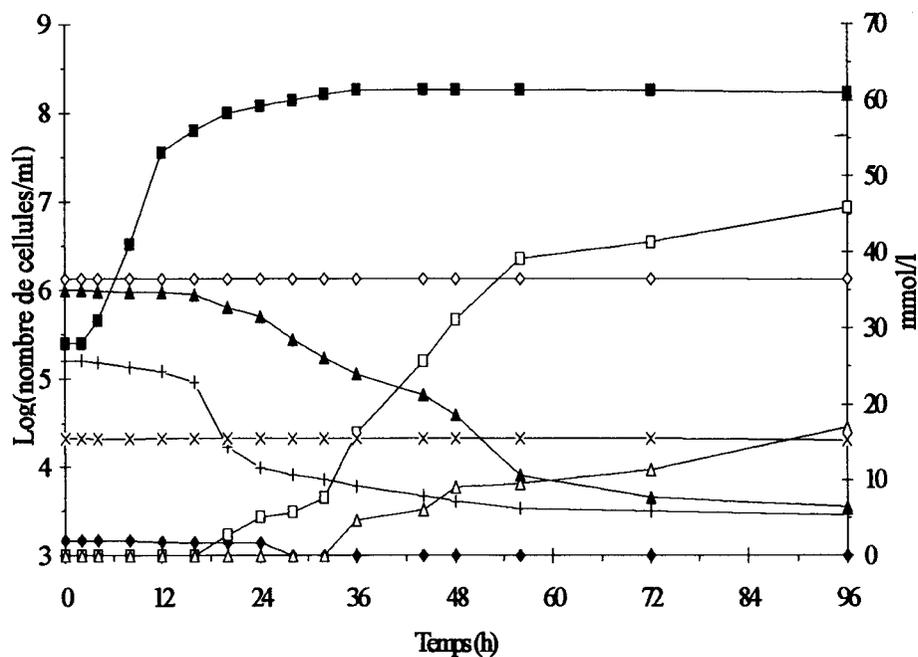


Figure. 21. Cinétique de croissance de *P. cerevisiophilus* (■) en culture pure dans le moût de bière (30°C; pH<sub>initial</sub>(+) = 5,2) et évolution de la composition du milieu en glucose(▲); fructose (◆); ac. propionique (□); ac. acétique (△); maltose (◇) et maltotriose (×).

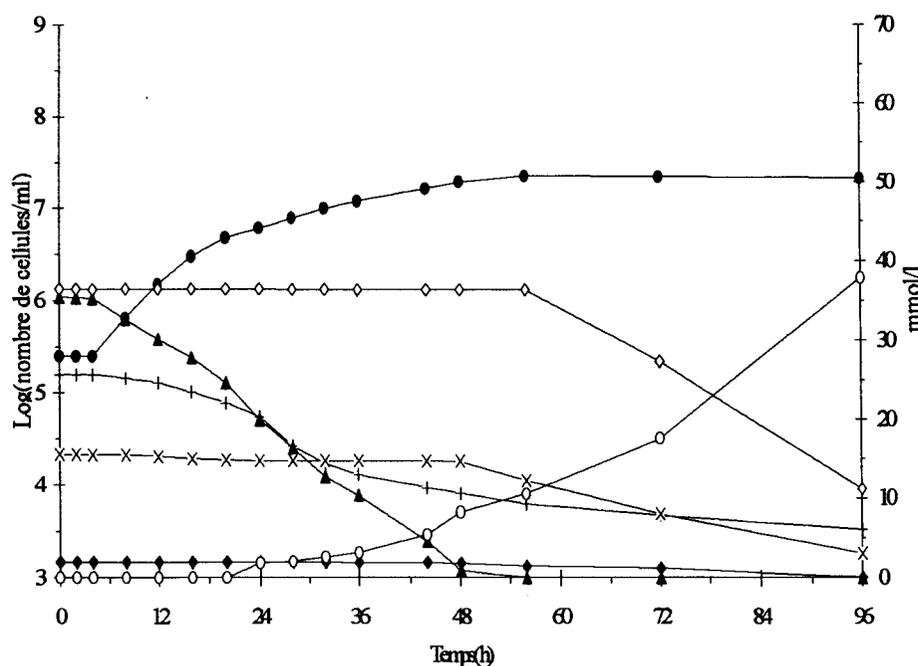


Figure. 22. Cinétique de croissance de *S. cerevisiae* (●) en culture pure dans le moût de bière (30°C; pH<sub>initial</sub>(+) = 5,2) et évolution de la composition du milieu en glucose(▲); fructose (◆); éthanol [ $\times 10^{-1}$  (○)]; maltose (◇) et maltotriose (×).

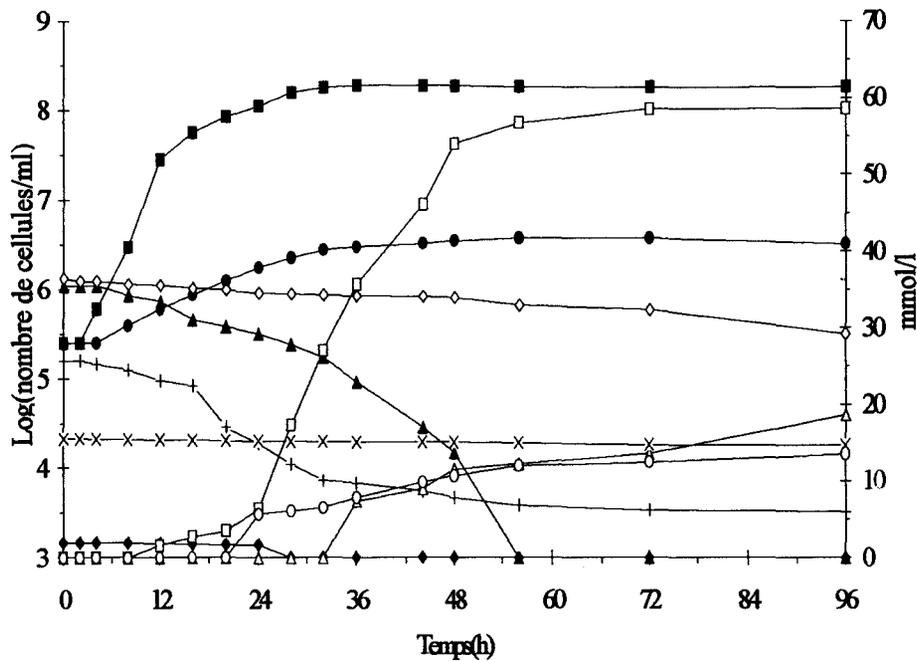


Figure. 23. Cinétique de croissance de *P. cerevisiophilus* (■) et de *S. cerevisiae* (●) en culture mixte dans le moût de bière (30°C; pH<sub>initial</sub> (+) = 5,2) et évolution de la composition du milieu en glucose (▲); fructose (◆); ac. propionique (□); ac. acétique (△); éthanol (○); maltose (◇); maltotriose (×)

	Cultures pures		Culture mixte	
	Levure	<i>Pectinatus</i> DSM 20466	levure	<i>Pectinatus</i> DSM 20466
Nb cells/ml (96 h)	1,9x10 <sup>7</sup>	1,5x10 <sup>8</sup>	3,6x10 <sup>6</sup>	1,8x10 <sup>8</sup>
μ <sub>max</sub> (h <sup>-1</sup> )	0,19	0,54	0,11	0,48
r <sup>2</sup> =	0,998	0,996	0,998	0,991
Acide propionique (mmol/l) (96 h)	0	45,90	0	58,58
Acide acétique (mmol/l) (96 h)	0	17	0	18,65
Ethanol (mmol/l) (96 h)	378,50	0	13,46	0
pH <sub>initial</sub>	5,20	5,20	5,20	5,20
pH <sub>final</sub>	3.52	4.46	3.51	3.51

Tableau 6. Paramètres de croissance et produits de fermentation en culture pure et mixte de *S. cerevisiae* et *P. cerevisiophilus*, menées à 30°C dans le moût en condition anaérobie.

La figure 22 représente, pour une culture pure de *Saccharomyces* à 30°C dans le moût de bière durant 96 heures, les courbes de l'évolution de la population de levures, du pH, des concentrations en éthanol, glucose, maltose, maltotriose et fructose. La fréquence des mesures est d'une toutes les 4 heures jusqu'à 48 heures puis d'une toutes les 8 heures jusqu'à 96 heures. La population augmente de  $2,5 \cdot 10^5$  à  $2,5 \cdot 10^7$  cellules/ml, le taux de croissance est de  $0,19 \text{ h}^{-1}$ ;  $r^2 = 0,9986$ . Les levures utilisent en premier le glucose comme source de carbone mais elles utilisent également le maltose quand le glucose est épuisé (à 56 h). Les principaux métabolites produits par *S. cerevisiae* sont l'éthanol (synthétisé dès 24 h avec 378,50 mmol/l à 96h) et le CO<sub>2</sub>. On peut remarquer qu'il n'y a plus de croissance à pH 3,52.

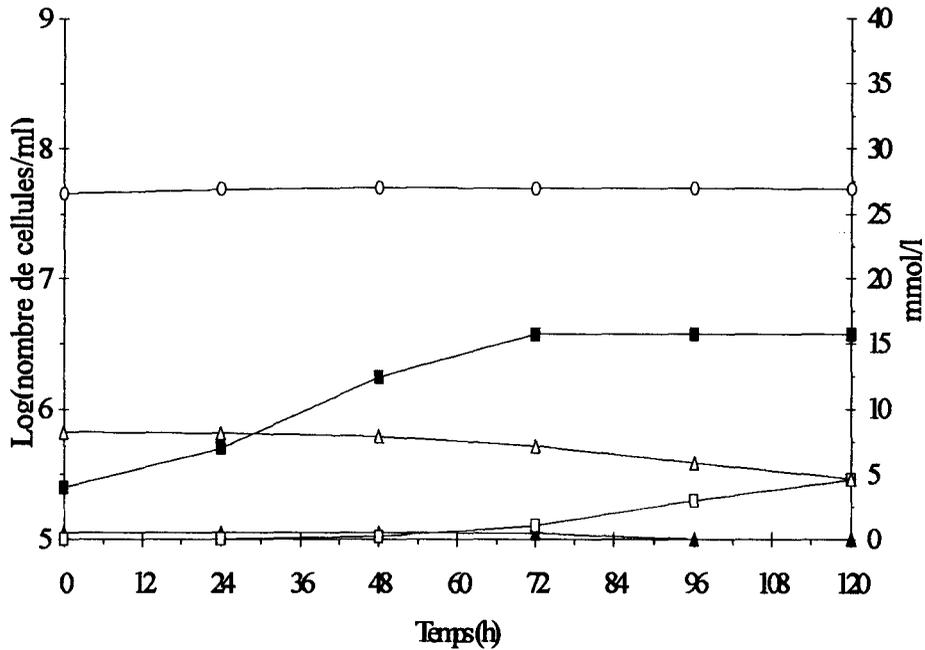
En culture mixte, *Pectinatus* se développe plus vite que *Saccharomyces*. Les résultats sont représentés dans la figure 23. La concentration bactérienne obtenue en fin de croissance est de  $1,8 \times 10^8$  cellules/ml pour *P. cerevisiiphilus*. Le taux de croissance pour *Pectinatus* en culture mixte est 0,48;  $r^2 = 0,9913$

Le glucose est utilisé immédiatement et prioritairement. On constate que le maltose est légèrement utilisé dès le début de la culture. Tout au long de la culture *Saccharomyces* se développe moins bien en culture mixte qu'en culture pure. La population augmente de  $2,5 \cdot 10^5$  à  $3,6 \times 10^6$  cellules/ml, le taux de croissance est de 0,10;  $r^2 = 0,9982$ . La production d'éthanol (13,46 mmol/l) est beaucoup moins importante en culture mixte qu'en culture pure (378,50 mmol/l). Les quantités d'acides finaux (acide propionique : 58,58 mmol/l; acide acétique: 18,65mmol/l) légèrement supérieures en culture mixte qu'en culture pure (45,90 mmol/l d'acide propionique et 16,98mmol/l d'acide acétique). De plus la synthèse de ces acides est plus rapide ( 24,30 mmol/l à 36 h en culture mixte pour 15,39 mmol/l à 36 h en culture pure). *Saccharomyces* utilise de faibles quantités de maltose et de maltotriose en culture mixte.

### 3.d. Dans le Milieu bière

La figure 24 montre les cinétiques de croissance et de production des différents métabolites de *P. cerevisiiphilus* en culture pure sur bière. La croissance est moins rapide et les populations maximale atteinte faible ( taux de croissance  $0,04 \text{ h}^{-1}$ ;  $r^2 = 0,98$ ) que de les autres milieux. Le nombre de cellules est de  $3,5 \cdot 10^6$  bactéries/ml, en 120 h

On remarque sur la figure 24 que le glucose restant dans la bière a été consommé au bout de 96 h. La synthèse d'acide propionique commence dès 48 h et sa concentration à 120 h est de 4,59 mmol/l. Le glycérol est consommé à partir de 48 h par *Pectinatus* (3,58 mmol/l à 120 h).



**Figure. 24.** Cinétique de croissance en culture pure de *P. cerevisiiphilus* (■) sur bière (30°C; à  $\text{pH}_{\text{initial}} = 4,23$ ) en fermenteur; et évolution de la composition du milieu en glucose(▲); glycérol (△); ac. propionique (□), éthanol [ $\times 10^{-1}$  (○)].

La croissance de *S. cerevisiae* est moins rapide et les populations maximale atteint faible (taux de croissance  $0,02 \text{ h}^{-1}$ ;  $r^2 = 0,99$ ) que de les autres milieux. Le nombre cellules est de  $1,5 \cdot 10^6$  levures/ml, en fin de fermentation (figure 25). La totalité du glucose et faible quantité de glycérol restant dans la bière a été consommée, la synthèse d'alcool augmente dès 24 h et à 120 h, on obtient 425,51 mmol/l d'éthanol (il y a 325 mmol/l d'éthanol avant ensemencement).

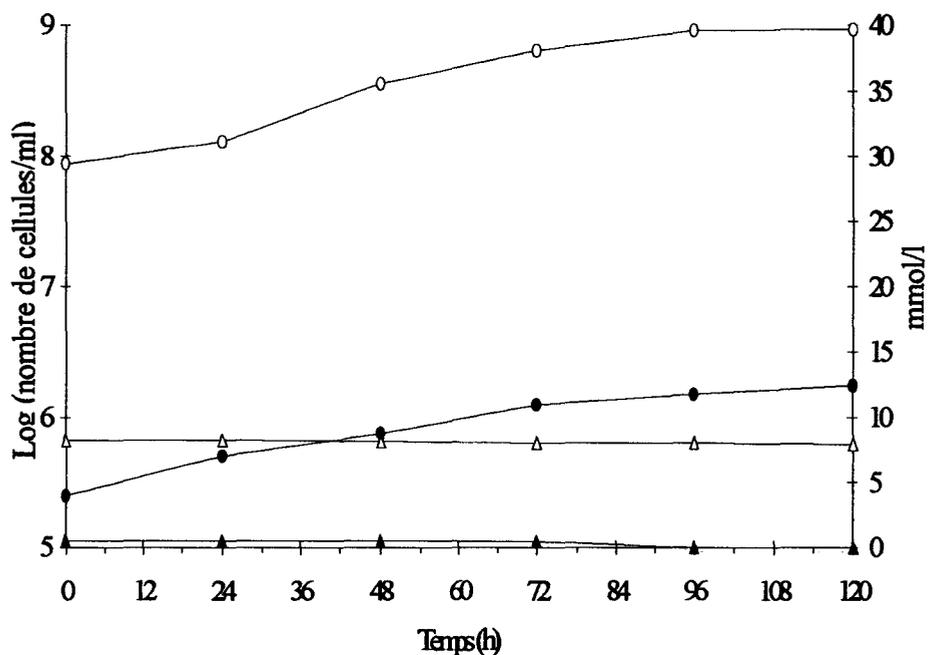


Figure. 25. Cinétiques de croissance en culture pure de *S. cerevisiae* (●) sur bière ( 30°C;  $\text{pH}_{\text{initial}}= 4,23$  ) en fermenteur et évolution de la composition du milieu en glucose (▲); glycérol (△); éthanol [ $\times 10^{-1}$ ] (○).

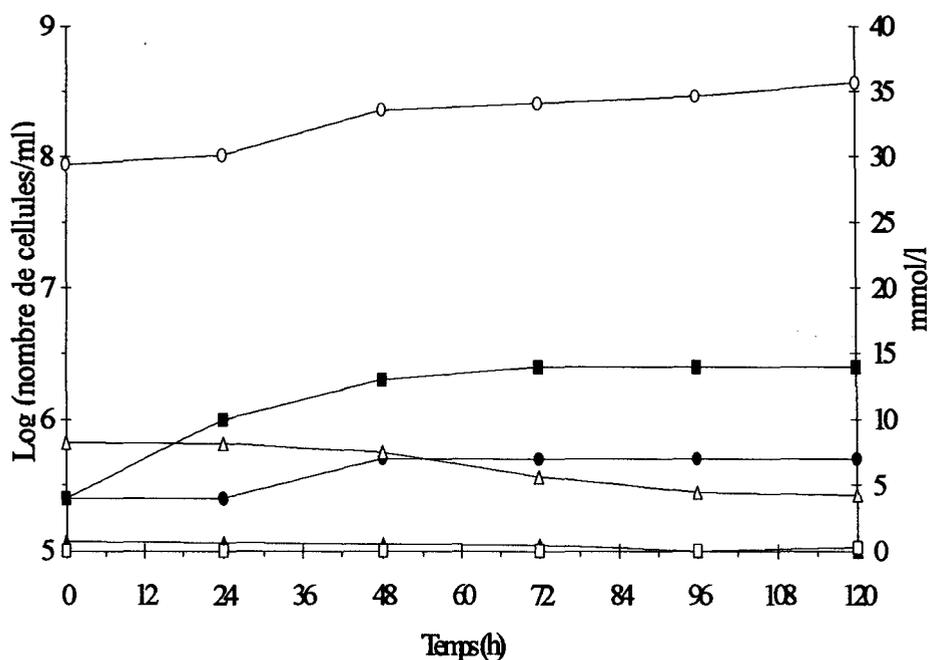


Figure. 26. Cinétiques de croissance en culture mixte de *P. cerevisiophilus* (■) et *S. cerevisiae* (●) sur bière ( 30°C;  $\text{pH}_{\text{initial}}= 4,23$  ) en fermenteur et évolution de la composition du milieu en glucose (▲); glycérol (△); ac. propionique (□); éthanol [ $\times 10^{-1}$ ] (○).

La figure 26 montre les cinétiques de croissance et de production des différents métabolites en culture mixte. En fin de fermentation, le nombre cellules (tableau 7) pour *P. cerevisiophilus*  $2,25 \cdot 10^6$  cellules/ml, en 120 h (taux de croissance  $0,04 \text{ h}^{-1}$ ;  $r^2 = 0,96$ ) et pour *S. cerevisiae*  $2,5 \cdot 10^5$  cellules/ml, en 120 h (taux de croissance  $0,01 \text{ h}^{-1}$ ;  $r^2 = 0,75$ ).

	Cultures pures		Culture mixte	
	Levure	<i>Pectinatus</i> DSM 20466	Levure	<i>Pectinatus</i> DSM 20466
Nb cells/ml (120 h)	$1,5 \times 10^6$	$3,5 \times 10^6$	$2,5 \times 10^5$	$2,25 \times 10^6$
$\mu_{\max} (\text{h}^{-1})$	0,02	0,04	0,01	0,04
$r^2 =$	0,99	0,98	0,75	0,96
Acide propionique (mmol/l) (120 h)	0	4,59	0	0,26
Acide acétique (mmol/l) (120 h)	0	0	0	0
Ethanol (mmol/l) (120 h)	100,51	0	62,52	0
pH <sub>initial</sub>	4,46	4,46	4,46	4,46

**Tableau 7.** Paramètres de croissance et produits de fermentation en culture pure et mixte de *S. cerevisiae* et *P. cerevisiophilus*, menées à 30°C dans la bière en condition anaérobie.

D'après la figure 26, à 96 h la totalité du glucose restant dans la bière a été consommée, la synthèse d'alcool augmente dès 48 h et à 120 h, on obtient 356,63mmol/l d'éthanol (il y a 325 mmol/l d'éthanol avant l'ensemencement), alors que l'acide propionique n'est synthétisé qu'à partir de 120 h en très faible quantité (0,27mmol/l).

#### CONCLUSION POUR DES DIFFERENTS MILIEUX:

On a observé sur les 4 milieux étudiés à 30°C une forte diminution de populations de *S. cerevisiae* en culture mixte, alors que celle de *Pectinatus* est légèrement plus élevée dans les mêmes conditions. De plus, on a remarqué une croissance de *Pectinatus* assez importante dans le milieu minimum ( $8 \cdot 10^7$  bactéries/ml). Dans d'autres milieux, MRS et moût la population maximale observée est respectivement de  $2,9 \cdot 10^8$  bactéries/ml et  $1,5 \cdot 10^8$  bactéries/ml. *Pectinatus* se développe d'autant mieux que le milieu est riche. Par contre, dans le milieu bière,

où il reste peu de sucres fermentescible, la croissance ( $3 \cdot 10^6$  bactéries/ml) est beaucoup moins importante.

On peut donc penser qu'il y a une interaction de *Pectinatus* sur la croissance de *S.cerevisiae*, qui engendre une absence ou une forte diminution de la synthèse d'éthanol. Cette inhibition peut être due à certains métabolites synthétisés par *Pectinatus*, plus particulièrement à l'acide propionique et l'acide acétique.

### **3.1. ETUDE DES INTERACTIONS ENTRA *PECTINATUS* ET *SACCHAROMYCES* DANS LE MILIEU MOUT DE BIÈRE EN FONCTION DE LA TEMPERATURE.**

L'étude des interactions est réalisée en utilisant le moût de brasserie comme milieu de culture. Trois souches de collection ont été étudiées : *Pectinatus* DSM20466, DSM20465 et ATCC33332.

Des cultures pures de *Pectinatus* et *Saccharomyces* ont été réalisées ainsi que des cultures mixtes de ces deux micro-organismes à 3 températures : 30°C ,15°C et 8°C. La température optimale de développement de *P. cerevisiophilus* est de 30°C.

15°C et 8°C sont les températures utilisées lors de la fermentation principale en brasserie.

Dans un premier temps, les cinétiques seront décrites et comparées, dans un second temps on cherchera à caractériser les interactions.

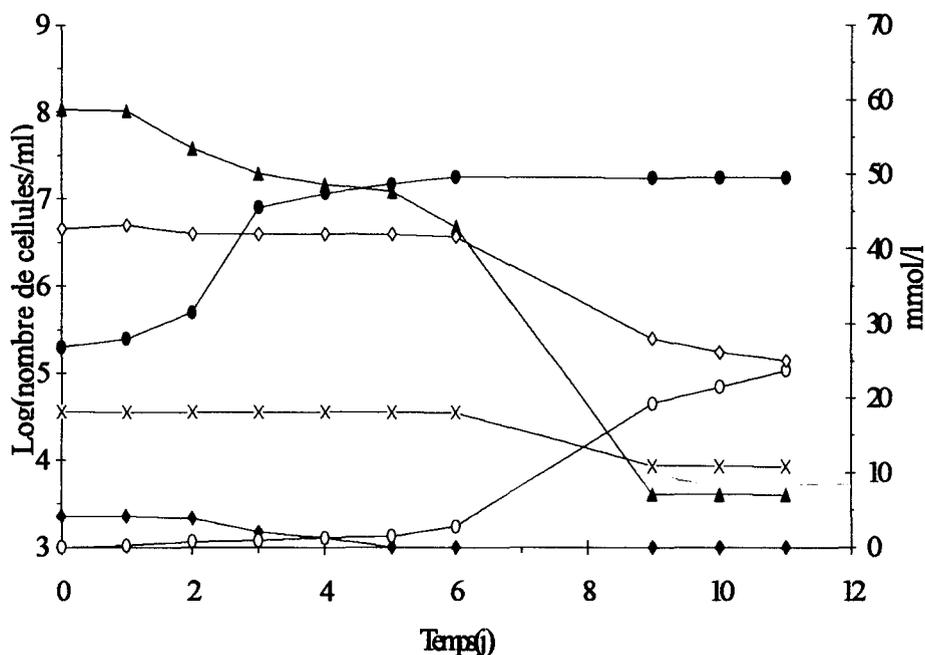
#### 3.1.1. Suivi de la croissance et de la production des différents métabolites par *Saccharomyces* en culture pure:

##### 3.1.1.1. Croissance à 30°C

Les résultats concernant de *S. cerevisiae* sont présentés dans le paragraphe 1 de la page 89. On peut toutefois rappeler que la figure 22 représente, pour une culture pure de *Saccharomyces* à 30°C dans le moût de bière durant 96 heures. La population augmente de  $2,5 \times 10^5$  à  $2,5 \times 10^7$  cellules/ml. Les levures utilisent en premier le glucose comme source de carbone mais elles utilisent également le maltose quand le glucose est épuisé (à 72 h). Le principal métabolite de *S. cerevisiae* est l'éthanol et le CO<sub>2</sub> (synthétisé dès 24 h avec 378,50mmol/l à 96h), mais toute fois elle produit du glycérol, un autre alcool, à un taux nettement inférieur (17,59 mmol/l à 96 h). A pH 3,52, la croissance est arrêtée.

##### 3.1.1.2. Croissance à 15°C

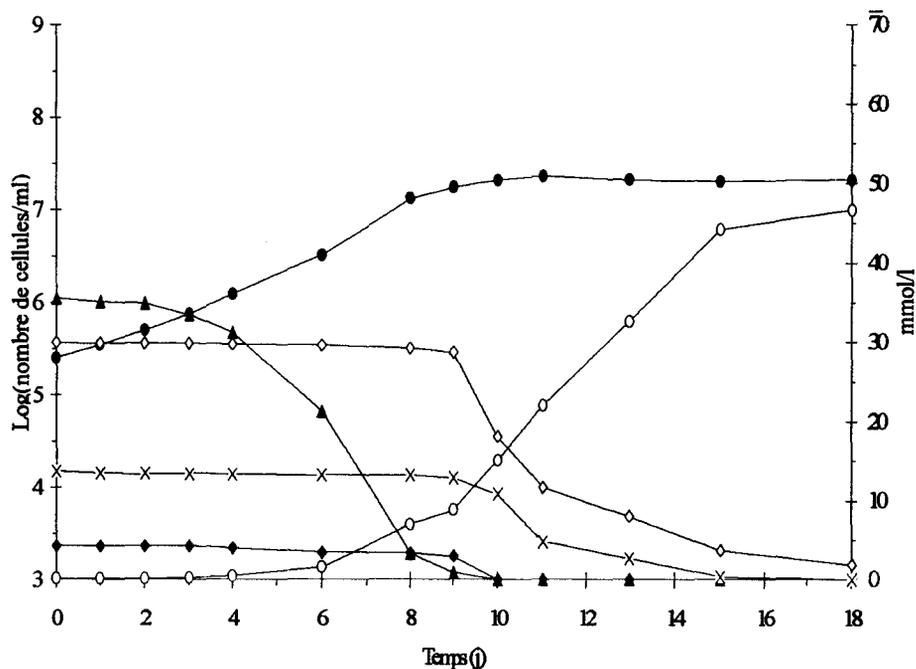
Pour la culture pure de levure (figure 27) à 15°C, on remarque que le taux d'éthanol augmente au cours du temps conjointement à l'utilisation du glucose. Cependant, à partir du 7<sup>ème</sup> jour, lorsqu'en fin de fermentation la concentration de glucose devient faible, les autres sources de carbone comme le maltose et le maltotriose sont utilisées. La population finale de levures est de  $1,7 \cdot 10^7$  cellules/ml. Le temps de latence est de 12 heures, le taux de croissance est de  $0,04 \text{ h}^{-1}$  ;  $r^2 = 0,997$  et la concentration en éthanol est 237,68 mmol/l.



**Figure. 27.** Cinétique de croissance de *S. cerevisiae* (●) en culture pure dans le moût (15°C;  $\text{pH}_{\text{initial}} = 5,2$ ) et évolution de la composition du milieu en glucose (▲); fructose (◆); éthanol [ $\times 10^{-1}$  (○)]; maltose (◇) et maltotriose (×).

### 3.1.1.3. Croissance à 8°C:

La figure 28 représente la cinétique de croissance de *Saccharomyces* et de la production d'éthanol observées en culture pure à 8°C. Le temps de latence est nul, le taux de croissance est de  $0,01 \text{ h}^{-1}$ ;  $r^2 = 0,998$ . La population finale dans le cas de la levure est de  $2,1 \times 10^7$  cellules/ml. Le métabolisme de la levure ne semble pas affecté par la basse température. Dans un premier temps, la levure utilise le glucose-puis le maltose (à partir de 9 jours) et produit de l'éthanol dès le quatrième jour (466,68 mmol/l en 18 jours).



**Figure. 28.** Cinétique de croissance de *S. cerevisiae* (●) en culture pure dans le moût (8°C; pH<sub>initial</sub> = 5,2) et évolution de la composition du milieu en glucose(▲); fructose (◆); éthanol [ $\times 10^{-1}$  (○)]; maltose (◇) et maltotriose (×).

### 3.1.2. Suivi de la croissance et de la production des différents métabolites par trois souches de *Pectinatus* en culture pure:

L'exploitation des courbes de croissance est effectuée dans du moût de brasserie aux températures suivantes : 30°C, 15°C (uniquement pour la souche DSM20466) et 8°C . Le pH initial est de 5,2 (pH du moût de bière), les résultats sont regroupés dans le tableau 8. La concentration bactérienne initiale est de  $10^5$  cellules/ml. Les courbes de croissance nous permettent de déterminer, le temps de latence (exprimé en heure ou en jours), le taux maximal de croissance:  $\mu_{max}$  en heure-1, et la concentration bactérienne en fin d'expérience.

Evolution des paramètres de la croissance:

### 3.1.2.1. Croissance A 30°C

Les figures (21,29,30) représentent l'évolution de la concentration d'acide propionique, d'acide acétique, du glucose, du fructose, du pH, et de la population bactérienne lors d'une culture pure des trois souches de *Pectinatus* étudiées.

Les résultats concernant de *P. cerevisiophilus* ont déjà été présentés dans le paragraphe 2 de la page 86. On peut toutefois rappeler que pendant la fermentation la population de *P. cerevisiophilus* varie de  $2,5 \times 10^5$  cellules/ml à  $1,55 \times 10^8$  cellules/ml. Le temps de latence est 2 heures, le taux de croissance est de  $0,64 \text{ h}^{-1}$  et le pH final est égal à 4,46. *P. cerevisiophilus* synthétise de l'acide propionique (45,90mmol/l) et de l'acide acétique (16,98mmol/l) à partir du glucose et fructose.(tableau 6).

Pour *Pectinatus sp.* (figure 29) le temps de latence est nul, le taux de croissance est égal à  $0,31 \text{ h}^{-1}$ ;  $r^2 = 0,999$ . La population finale est  $1,59 \times 10^8$  cellules/ml. Le pH final est de 4,36. *Pectinatus sp.* utilise la totalité du glucose ( 35,52 mmol/l) et du fructose (1,95mmol/l) présent dans le moût, et synthétise de l'acide propionique (60,88mmol/l) et de l'acide acétique (10,16mmol/l) (tableau 8).

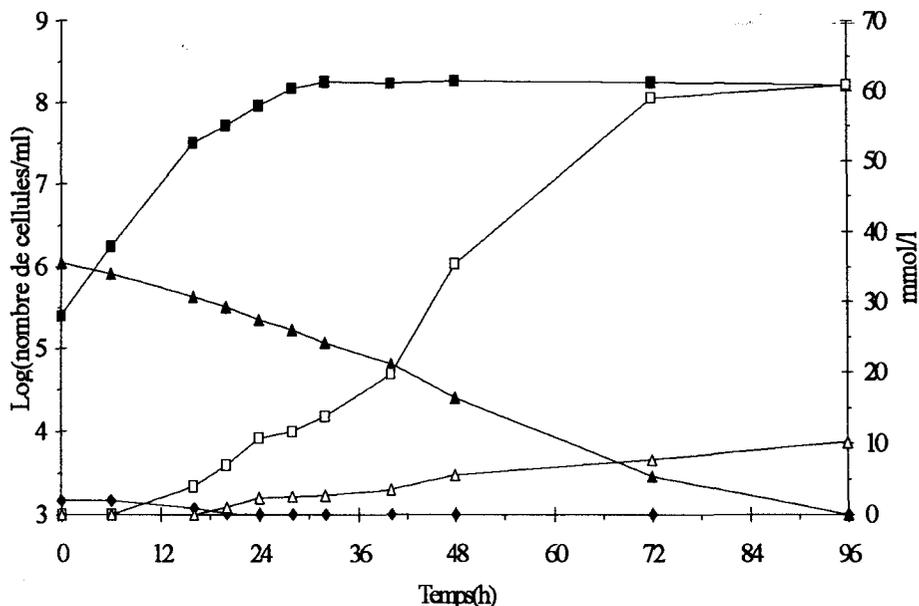
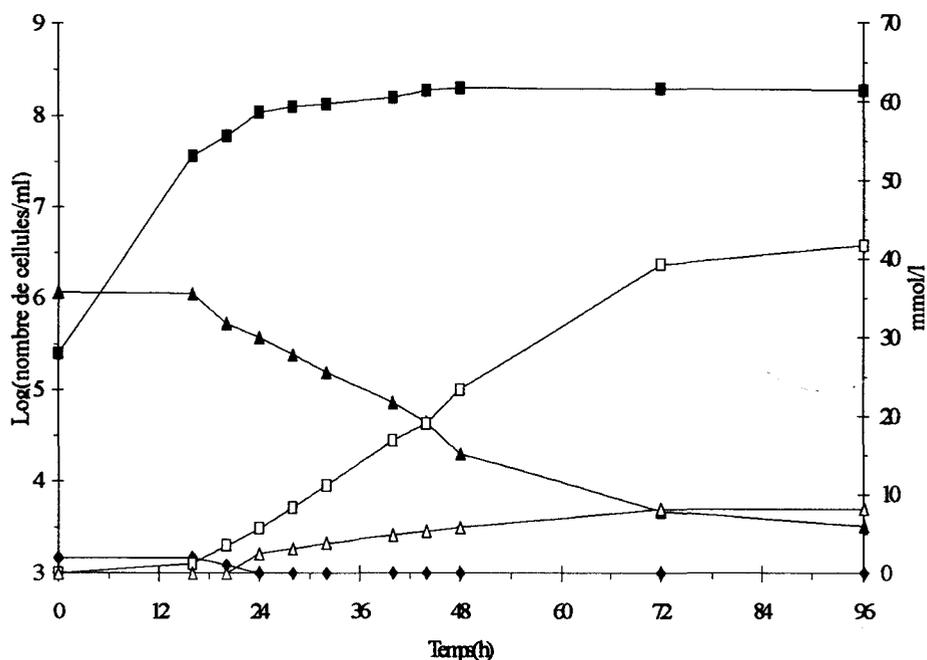


Figure. 29. Cinétique de croissance de *Pectinatus sp.* (■) en culture pure dans le moût ( 30°C; pH<sub>initial</sub> = 5,2 ) et évolution de la composition du milieu en glucose (▲); fructose (◆); ac. propionique (□); ac. acétique (△).



**Figure. 30.** Cinétique de croissance de *P. frisingensis* (■) en culture pure dans le moût (30°C; pH<sub>initial</sub> = 5,2 ) et évolution de la composition du milieu en glucose (▲); fructose (◆); ac. propionique (□); ac. acétique (△).

Pour *P. frisingensis* ATCC33332 (fig. 30), le taux de croissance est de 0,14 h<sup>-1</sup>; r<sup>2</sup> = 0,998, la concentration bactérienne finale est de 1,64x10<sup>8</sup> cellules/ml, le temps de latence est nul, le pH final est égal à 4,32. La production d'acide propionique est de 41,71 mmol/l et de 8,15 mmol/l pour l'acide acétique. En fin de fermentation les bactéries n'ont pas consommé la totalité du glucose tandis qu'elles ont consommé la totalité du fructose.

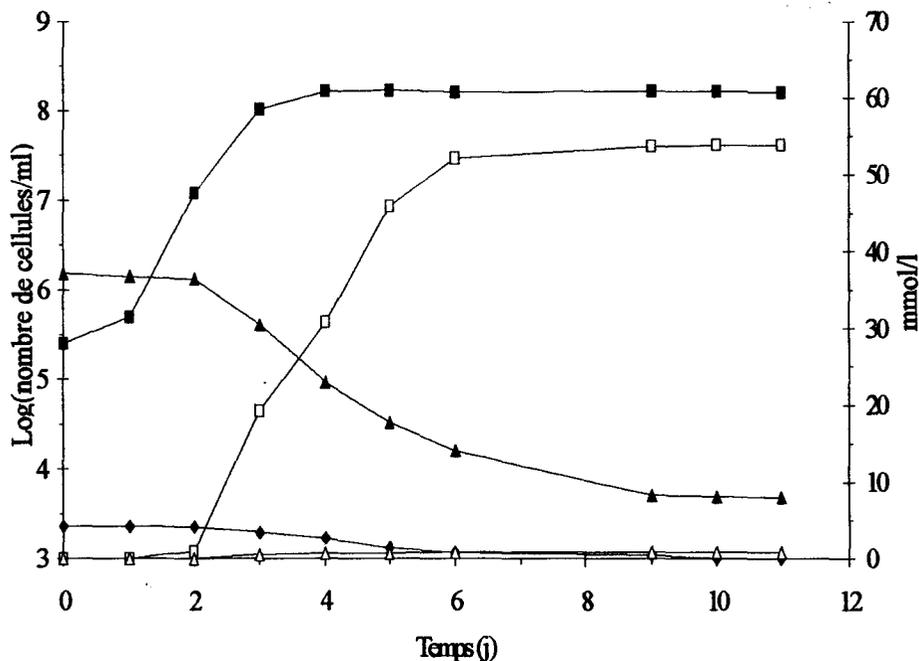
D'après ces résultats nous pouvons remarquer lors d'une fermentation en culture pure que la souche DSM20466 produit une quantité moins importante d'acide propionique que les souches ATCC33332 et DSM20465. Ces résultats sont en accord avec les observations décrites par Haikara (1981 (a)).

### 3.1.2.2. Croissance à 15°C:

Comme le montre la figure 31 et le tableau 9, la population maximale de *P. cerevisiophilus* est atteinte au bout 4 jours, le taux maximal de croissance est de 0,03 h<sup>-1</sup> ;

$r^2 = 0,99$  et la population bactérienne finale est de  $1,6 \cdot 10^8$  bactéries/ml. Le glucose est fermenté principalement en acide propionique.

La concentration finale pour l'acide propionique est de 53,86 mmol/l et de 0,66 mmol/l pour l'acide acétique. Même scénario a observée par Watier *et al.* 1995. Le pH final est de 4,68. En fin de fermentation en culture pure, le glucose n'a pas été entièrement consommé par les bactéries contrairement au fructose.



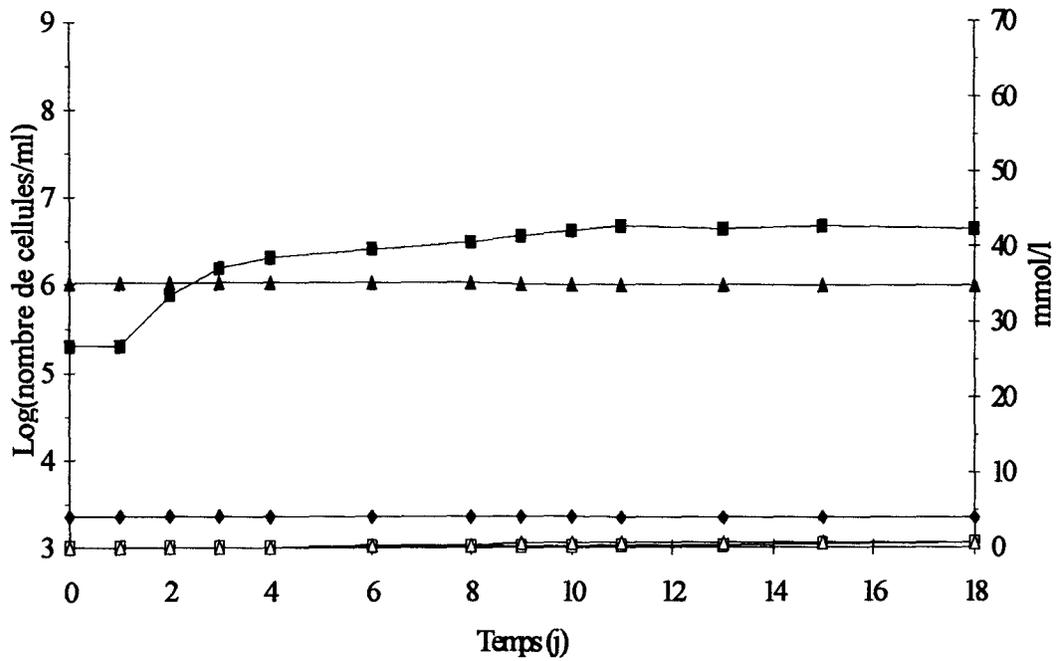
**Figure. 31.** Cinétique de croissance de *P. cerevisiiphilus* (■) en culture pure dans le moût (15°C;  $pH_{initial} = 5,2$ ) et évolution de la composition du milieu en glucose (▲); fructose (◆); ac. propionique (□); ac. acétique (△).

### 3.1.2.3. Croissance à 8°C:

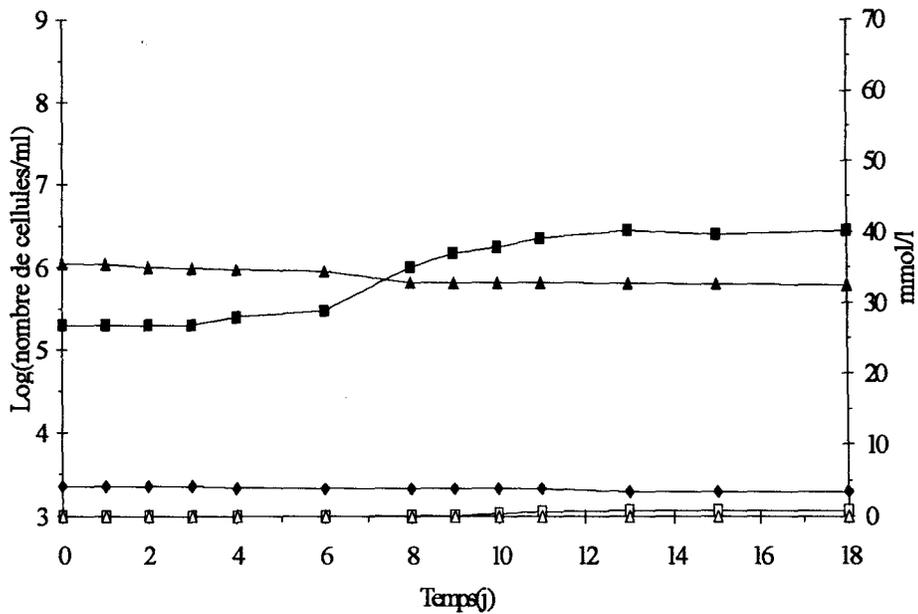
A 8°C, les trois souches de *Pectinatus* se développent très lentement. Les différentes phases de croissance sont plus longues que celles observées précédemment à des températures plus élevées.

Pour *P. cerevisiiphilus*, (figure 32) la population finale est de  $4,25 \times 10^6$  cellules/ml, le temps de latence est de 1 jour et le taux de croissance est plus rapid pour *P. cerevisiiphilus*  $0,03 \text{ h}^{-1}$ ;  $r^2 = 0,999$ .

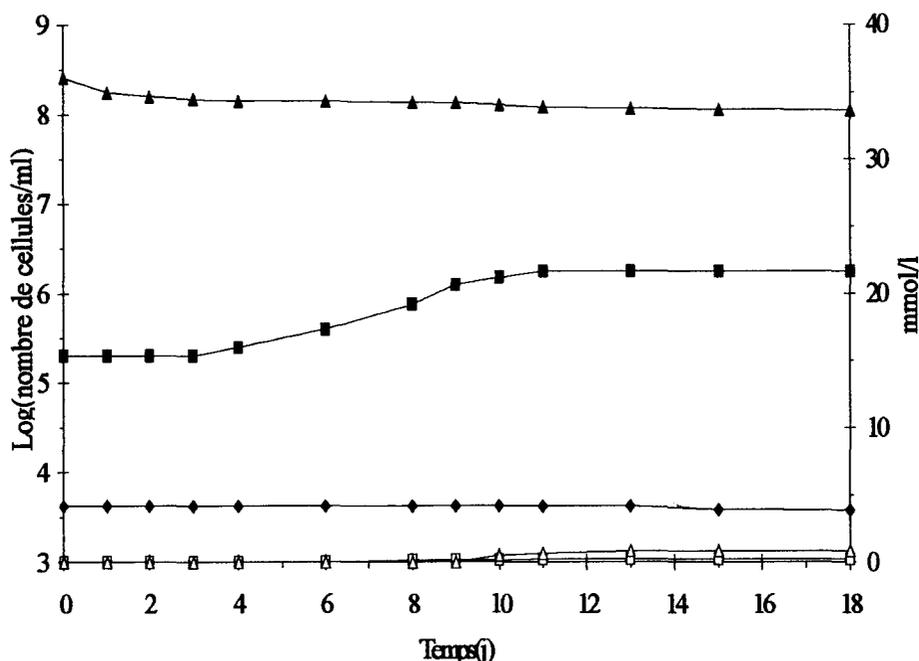
Pour *Pectinatus sp.* (figure 33), la population finale est de  $2,61 \cdot 10^6$  cellules/ml; le temps de latence est de 3 jours et le taux de croissance est égal à  $0,02 \text{ h}^{-1}$ ;  $r^2 = 0,992$ .



**Figure.32.** Cinétique de croissance de *P. cerevisiophilus* (■) en culture pure dans le moût (8°C;  $pH_{initial} = 5,2$ ) et évolution de la composition du milieu en glucose (▲); fructose (◆); ac. propionique (□); ac. acétique (△).



**Figure.33.** Cinétique de croissance de *Pectinatus sp.* (■) en culture pure dans le moût (8°C;  $pH_{initial} (+) = 5,2$ ) et évolution de la composition du milieu en glucose(▲); fructose (◆); ac. propionique (□); ac. acétique (△).



**Figure.34.** Cinétique de croissance de *P. frisingensis* (■) en culture pure dans le moût (8°C; pH<sub>initial</sub> = 5,2) et évolution de la composition du milieu en glucose(▲); fructose (◆); ac. propionique (□); ac. acétique (△).

Pour *P. frisingensis* (figure 34), le taux de croissance est de 0,01 h<sup>-1</sup>; r<sub>2</sub> = 0,999, le temps de latence est de 3 jours et la population finale est de 1,81x10<sup>6</sup> cellules/ml. Le pH final est égal à 5,04.

Le suivi des cinétiques de consommation du glucose et d'accumulation d'acide propionique permet de compléter l'observation du métabolisme des souches étudiées. En ce qui concerne la souche ATCC 33332 cultivée à 8°C, la consommation de glucose et la production d'acides sont très faibles.

D'après les figures 32,33,34 on observe une faible croissance pour les trois souches de *Pectinatus*, les concentrations de substrats et de produits ( 0,26 mmol/l pour ATCC 33332; 0,81 mmol/l pour DSM 20465; et 0,67 mmol/l d'acide propionique à 18 jours pour DSM 20466.) ne semblent pas évoluer. Cependant la croissance bactérienne, l'utilisation des sources de carbone et la synthèse des métabolites est faible à 8°C.

### 3.1.3. Suivi de la croissance et de la production de différents métabolites par des souches de *Pectinatus* en co-culture avec *Saccharomyces*

Dans un milieu complexe la croissance d'une souche microbienne dépend de nombreux facteurs. S'il est facile de prévoir les différentes phases de croissance en culture pure, il est par contre très délicat de les prévoir pour une culture mixte.

Les plus grandes difficultés concernent les prévisions:

- de la durée de la phase de latence;
- du taux de croissance dans un milieu complexe comme le moût;
- des facteurs limitants;
- des interactions synergiques (stimulation) ou éventuellement antagonistes (inhibition);
- de l'initialisation de la phase de ralentissement;
- des sécrétions qui en résultent (produits responsables de la saveur).

La démarche expérimentale suivie dans cette partie de travail consiste à étudier, les cinétiques de croissance des souches *Pectinatus* et *Saccharomyces*, en culture mixte conjointement aux consommations et aux productions de métabolites.

Pour estimer le développement bactérien des cultures mixtes au cours de l'incubation, des méthodes de dénombrements directes par microscopie préconisées pour l'examen du moût, ainsi que des dénombrements sur milieu gélosé ont été utilisées.

Les substrats consommés (glucose, fructose, maltose et maltotriose) et les métabolites synthétisés (propionate, acétate et éthanol) ont été quantifiés par analyse d'échantillons prélevés régulièrement dans le milieu de culture. La méthode utilisée est la chromatographie liquide haute performance (H.P.L.C.) décrite précédemment dans le chapitre matériels et méthodes.

Nous présentons dans les paragraphes suivants et à travers les figures 20 à 26 l'évolution des cinétiques :

- des population microbiennes;
- de la synthèse des produits de fermentation (propionate, acétate, éthanol);
- de la consommation des substrats (glucose, fructose, maltose et maltotriose);
- de l'acidification (évolution du pH).

### 3.1.3.1. Croissance à 30°C:

En culture mixte, *Pectinatus* se développe plus vite que *Saccharomyces*. Les résultats sont représentés dans les figures 23,35,36. Les taux de croissance et nombre des cellules en phase stationnaire diffèrent une souche à l'autre en culture mixte qu'en culture pure (Tableaux 6; 8).

Les photos (☞ page 108) prises en fin de fermentation (96 h) en culture pure de *S. cerevisiae* et en culture mixte avec *Pectinatus* ou *Megasphaera* montrent qu'il y a moins de *S. cerevisiae* en culture mixte.

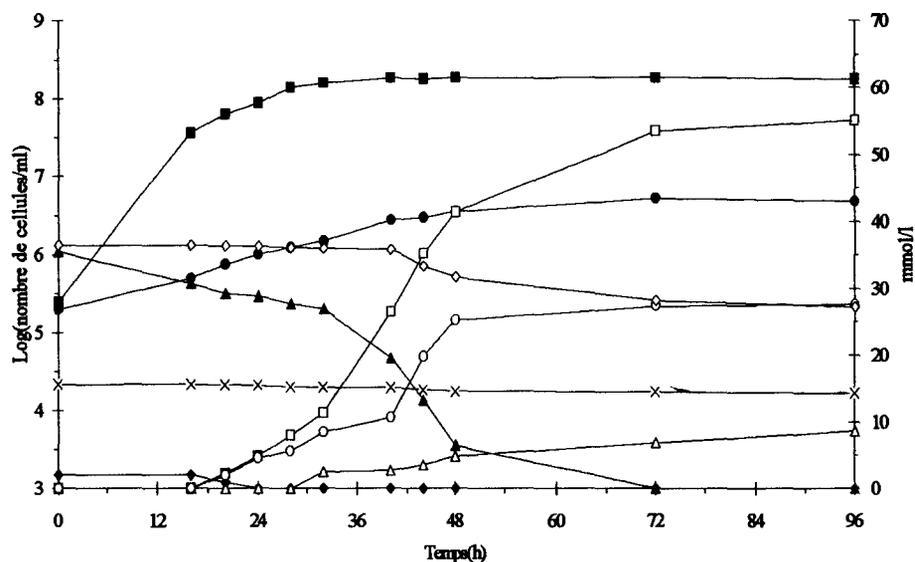
Les populations sont sensiblement identiques en culture mixte et en culture pure pour *Pectinatus sp.* et *P. cerevisiiphilus*. Par contre la population de *P. frisingensis* est légèrement plus faible en culture mixte qu'en culture pure.

Les résultats concernant les cultures mixtes de *P. cerevisiiphilus* et *S. cerevisiae* sont présentés dans le paragraphe 2 de la page 89. On peut toutefois rappeler que tout au long de la culture *Saccharomyces* se développe moins bien ( $3,6 \times 10^6$  cellules/ml, 96h) en culture mixte qu'en culture pure ( $1,9 \times 10^7$  cellules/ml, 96h). La production d'éthanol (13,46 mmol/l) est beaucoup moins importante en culture mixte qu'en culture pure (378,53mmol/l) puisque la biomasse est moins importante. Le phénomène de symbiose est clairement mis en évidence par des quantités d'acides finales (acide propionique : 58,58 mmol/l; acide acétique: 18,65mmol/l ) légèrement supérieures en culture mixte qu'en culture pure (45,90 mmol/l d'acide propionique et 16,98mmol/l d'acide acétique). La synthèse de ces acides est plus rapide en culture mixte qu'en culture pure( 24,30 mmol/l contre 15,39 mmol/l en 36 h).

*Saccharomyces* utilise de faibles quantités de maltose et de maltotriose en culture mixte.

Peu de différences apparaissent entre les deux autres souches, *Pectinatus sp.* DSM 20465 et *P. frisingensis* ATCC33332 .

Pour *Pectinatus sp.* (figure 35) la production d'acide propionique (55,07 mmol/l) et d'acide acétique (8,65 mmol/l) est légèrement inférieure en culture mixte. La production d'éthanol est de 27,56 mmol/l.



**Figure. 35.** Cinétique de croissance de *Pectinatus sp.* (■) et de *S. cerevisiae* (●) en culture mixte dans le moût (30°C; pH<sub>initial</sub> = 5,2) et évolution de la composition du milieu en glucose(▲); fructose (◆); ac. propionique (□); ac. acétique (△); éthanol (○); maltose (◇), maltotriose(×).

	Cul. pures		Culture mixte		Cul. pures		Culture mixte	
	Levure	<i>P. sp</i> DSM 20465	Levure	<i>P. sp</i> DSM 20465	<i>P.</i> <i>frisingensis</i> ATCC 33332	levure	<i>P.</i> <i>frisingensis</i> ATCC 33332	
Nombre de cellules/ml (96 h)	1,9x10 <sup>7</sup>	1,59x10 <sup>8</sup>	1,1x10 <sup>6</sup>	1,31x10 <sup>8</sup>	1,64x10 <sup>8</sup>	5,19x10 <sup>6</sup>	6,14x10 <sup>7</sup>	
$\mu_{\max}$ (h <sup>-1</sup> )	0,19	0,31	0,08	0,11	0,14	0,02	0,25	
$r^2 =$	0,998	0,999	0,991	0,988	0,998	0,984	0,948	
Acide propionique (mmol/l) (96 h)	0	60,88	0	55,07	41,71	0	49,27	
Acide acétique (mmol/l) (96 h)	0	10,16	0	8,65	8,16	0	3,99	
Ethanol (mmol/l) (96 h)	378,55	0	27,56	0	0	15,62	0	
pH <sub>initial</sub>	5,20	5,20	5,20	5,20	5,20	5,20	5,20	

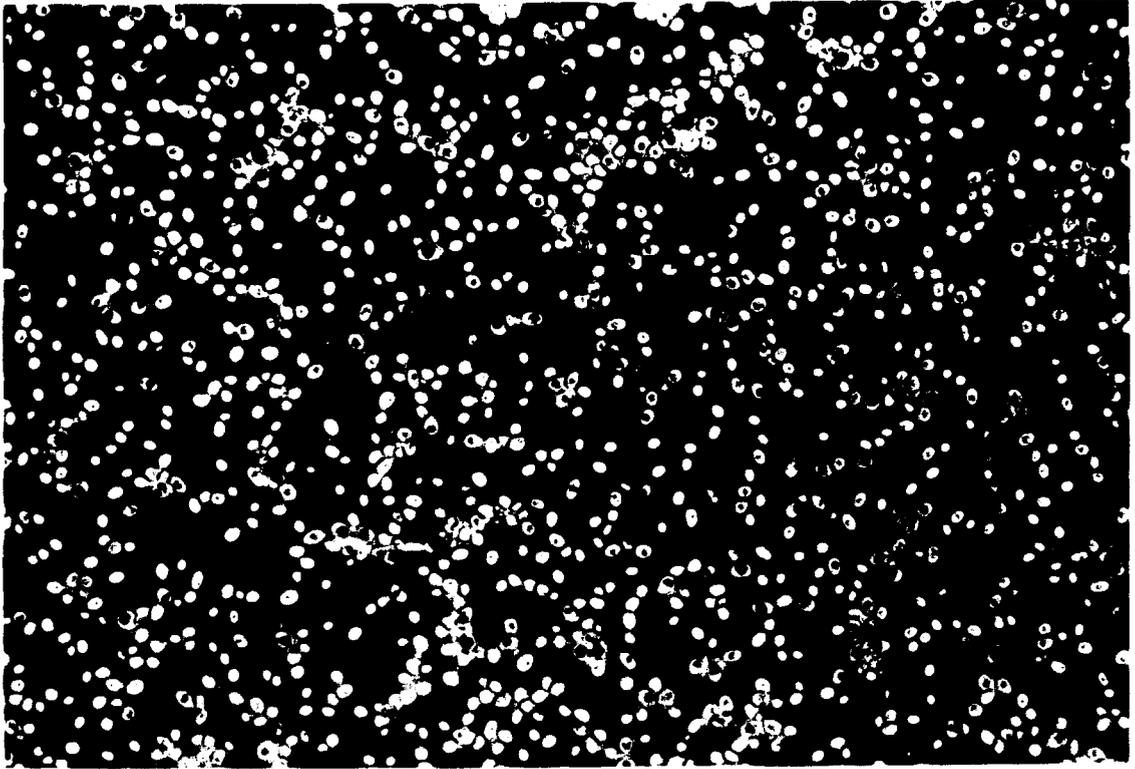
Tableau 8. Paramètres de croissance et produits de fermentation en culture pure et mixte de *S. cerevisiae* et deux souches de *Pectinatus*, menées à 30°C dans le moût en condition anaérobie.

	<b>Cultures pures</b>		<b>Culture mixte</b>	
	<b>Levure</b>	<b><i>Pectinatus</i> DSM 20466</b>	<b>Levure</b>	<b><i>Pectinatus</i> DSM 20465</b>
Nombre de cellules/ml (11 j)	1,7x10 <sup>7</sup>	1,64x10 <sup>8</sup>	1,02x10 <sup>7</sup>	9,6x10 <sup>7</sup>
$\mu_{\max}$ (h <sup>-1</sup> )	0,04	0,03	0,06	0,09
$r^2 =$	0,997	0,992	0,981	0,932
Acide propionique (mmol/l) (11 j)	0	53,86	0	38,07
Acide acétique (mmol/l) (11 j)	0	0,66	0	0,83
Ethanol (mmol/l) (11 j)	237,68	0	194,96	0
pH <sub>initial</sub>	5,2	5,2	5,20	5,20

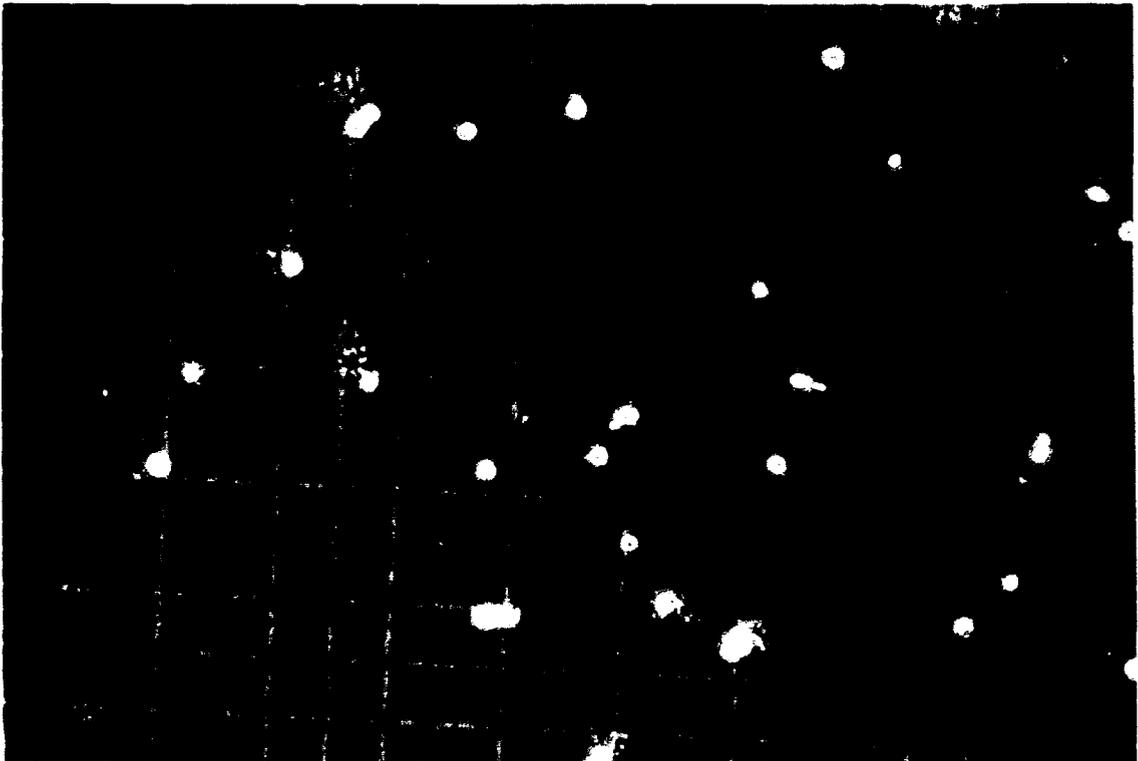
**Tableau 9.** Paramètres de croissance et produits de fermentation en culture pure et mixte de *S. cerevisiae* et *P. cerevisiophilus*, menées à 15°C dans le moût en condition anaérobie.

	Cul. pures		Cul.mixte	Cul. pure	Cul.mixte	Cul. pure	Cul.mixte
	Levure	DSM 20466	DSM 20466	DSM 20465	DSM 20465	DSM 20465	ATCC 33332
			Levure		Levure		Levure
Nombre de cellules/ml (18 j)	$2,1 \times 10^7$	$4,25 \times 10^6$	$\frac{3,75 \times 10^6}{2 \times 10^7}$	$2,61 \times 10^6$	$\frac{2,95 \times 10^6}{3,27 \times 10^7}$	$1,81 \times 10^6$	$\frac{1,81 \times 10^6}{2,51 \times 10^7}$
$\mu_{\max}$ (h <sup>-1</sup> )	0,01	0,03	0,04; r <sup>2</sup> =0,97	0,02	0,04; r <sup>2</sup> =0,96	0,01	0,01; r <sup>2</sup> = 0,99
r <sup>2</sup> =	0,998	0,999	0,02; r <sup>2</sup> =0,99	0,992	0,03; r <sup>2</sup> =0,99	0,999	0,02; r <sup>2</sup> = 0,99
Acide propionique (mmol/l) (18 j)	0	0,67	0,94	0,81	0,94	0,26	1,21
Acide acétique (mmol/l) (18 j)	0	0,33	0,33	0	0	0	0,49
Ethanol (mmol/l) (18 j)	466,68	0	441,98	0	457,56	0	403,95
pH <sub>initial</sub>	5,20	5,20	5,20	5,20	5,20	5,20	5,20

Tableau 10. Paramètres de croissance et produits de fermentation en culture pure et mixte de *S. cerevisiae* et trois souches de *Pectinatus*, menées à 8°C dans le moût en condition anaérobie.



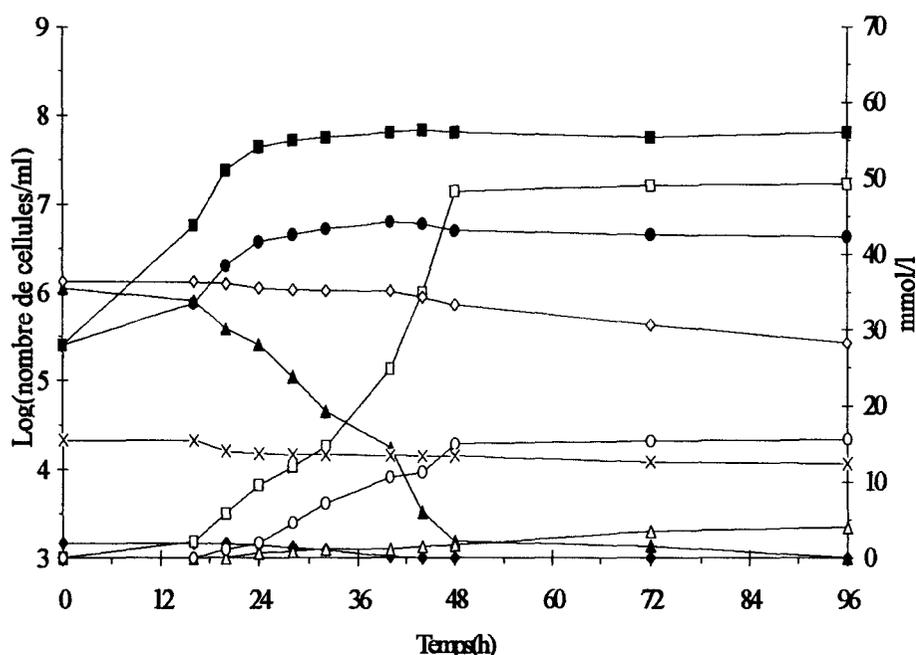
***S. cerevisiae* en culture pure après 96 heures**



***S. cerevisiae* en culture mixte avec *P. cerevisiophilus* après 96h.**

Photos de *S. cerevisiae* en culture pure et mixte avec *Pectinatus* dans le moût (pH 5,2) après incubation à 30°C pendant 96 heures, grossissement x 800.

Pour *P. frisingensis* la production d'acide propionique (49,27 mmol/l) est légèrement supérieure en culture mixte (figure 36) mais la production d'acide acétique (3,99 mmol/l) est inférieure. Comme les deux autres souches la production d'éthanol (15,62 mmol/l) est moins importante en culture mixte puisque la biomasse de *S. cerevisiae* est moins importante.



**Figure. 36.** Cinétique de croissance de *P. frisingensis* (■) et de *S. cerevisiae* (●) en culture mixte dans le moût (30°C;  $pH_{initial} = 5,2$ ) et évolution de la composition du milieu en glucose (▲); fructose (◆); ac. propionique (□); ac. acétique (△); éthanol (○); maltose (◇), maltotriose (×).

L'effet stimulant d'une souche sur une autre a été évalué en comparant la quantité d'acide produite en culture mixte à la somme des quantités produites en culture pures.

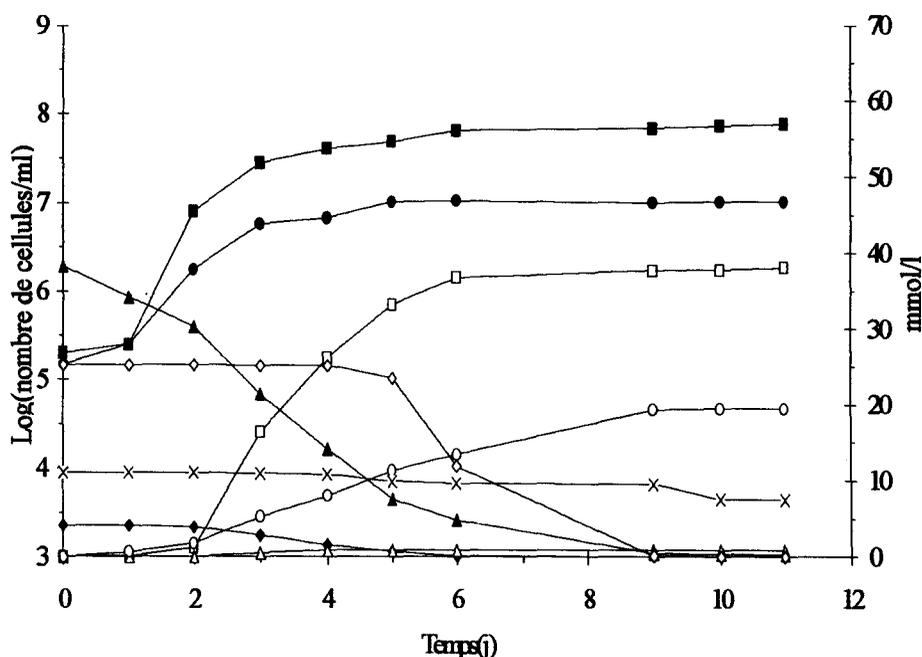
La production d'acide propionique en culture mixte par *Pectinatus* est supérieure à la production d'acide propionique obtenue dans des cultures pures. Par contre pour tous les trois souches, la production d'éthanol est beaucoup moins importante en culture mixte qu'en culture pure puisque la biomasse de *S. cerevisiae* est moins importante. (Tableau 6;8).

La production d'acide propionique dans les cultures mixtes permet donc de mettre en évidence la synergie existant entre les deux micro-organismes associés. Elle constitue donc un critère important dans la contamination de la bière.

### 3.1.3.2. Croissance à 15°C:

La figure 37 et le tableau 9 montrent que les bactéries et les levures commencent leur développement simultanément. Les bactéries se développent plus rapidement que les levures en culture mixte à 15°C et à 30°C. Les populations maximales de levures et de bactéries sont atteintes au bout de 6 jours. La population finale est de  $1,02 \times 10^7$  cellules/ml pour levure et  $9,6 \times 10^7$  cellules/ml pour *Pectinatus*. Le taux de croissance est de  $0,06 \text{ h}^{-1}$ ;  $r_2 = 0,93$  pour levure et  $0,09 \text{ h}^{-1}$ ;  $r_2 = 0,98$  pour *Pectinatus*. La concentration finale d'acide propionique produit par les bactéries est de 38,07 mmol/l et pour les levures la concentration d'éthanol est de 194,92 mmol/l.

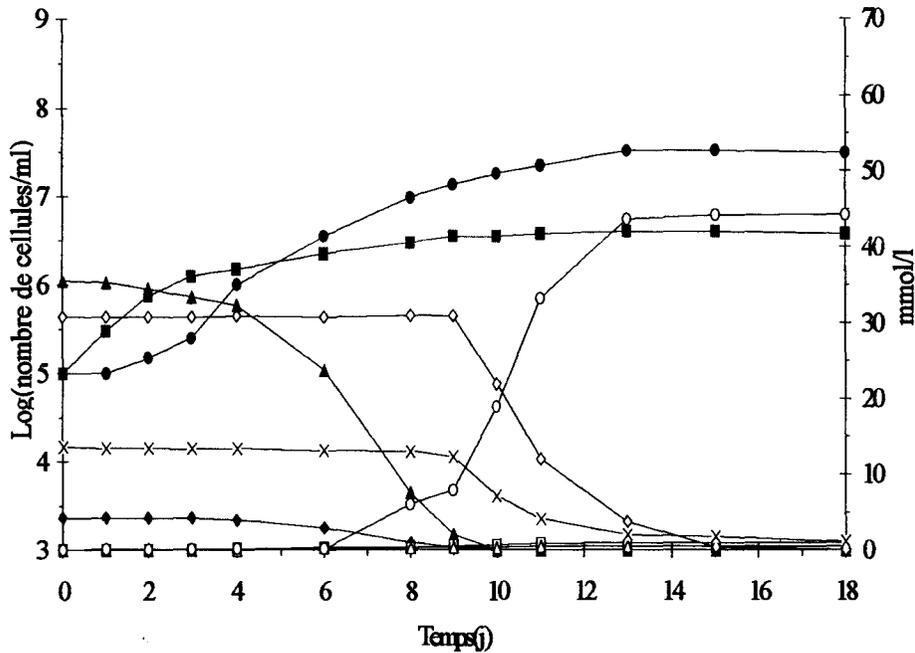
Les 6 premiers jours, le glucose a été consommé par les deux micro-organismes, ensuite le maltose et le maltotriose commencent à être consommés.



**Figure.37.** Cinétique de croissance de *P. cerevisiiphilus* (■) et de *S. cerevisiae* (●) en culture mixte dans le moût ( 15°C;  $\text{pH}_{\text{initial}}=5,2$ . ) et évolution de la composition du milieu en glucose(▲); fructose (◆); ac. propionique (□); ac. acétique (△); éthanol [ $\times 10^{-1}$ ] (○); maltose (◇) et maltotriose (×).

### 3.1.3.3. Croissance à 8°C :

Les figures 38, 39, 40 représentent les cinétiques de croissance en culture mixte à 8°C dans le moût pour *P. cerevisiiphilus* DSM 20466. En fin de fermentation les populations sont de  $3,75 \times 10^6$  cellules/ml pour *P. cerevisiiphilus*, et pour *S. cerevisiae* de  $2 \times 10^7$  cellules/ml.



**Figure. 38.** Cinétique de croissance de *P. cerevisiiphilus* (■) et de *S. cerevisiae* (●) en culture mixte dans le moût ( 8°C;  $pH_{initial} = 5,2$  ) et évolution de la composition du milieu en glucose(▲); fructose (◆); ac. propionique (□); ac. acétique (△); éthanol [ $\times 10^{-1}$  (○)]; maltose (◇) et maltotriose (×).

Les concentrations de substrats et de produits en culture mixte sont identiques à celles trouvées lors d'une culture pure de levure (411,98 mmol/l d'éthanol à 18 j). Il n'y a quasiment pas de synthèse d'acide propionique (0,94 mmol/l à 18 j).

Le tableau (10) montre que les résultats obtenus avec les autres souches de *Pectinatus* (DSM 20465 et ATCC 33332) à 8°C sont très proches.

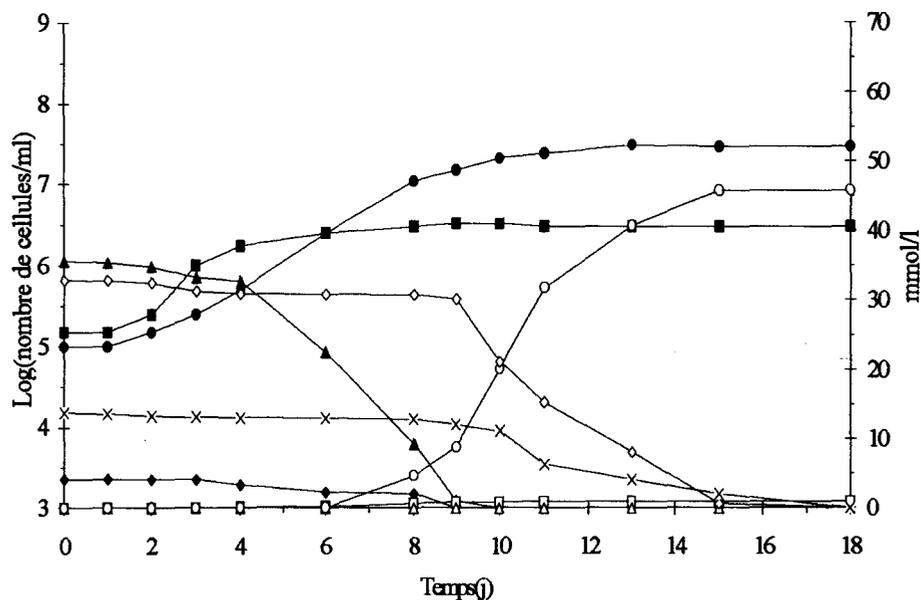


Figure. 39. Cinétique de croissance de *Pectinatus sp.* (■) et de *S. cerevisiae* (●) en culture mixte dans le moût ( 8°C;  $pH_{initial}=5,2$  ) et évolution de la composition du milieu en glucose(▲); fructose (◆); ac. propionique (□); ac. acétique (△); éthanol [ $\times 10^{-1}$  (○)]; maltose (◇) et maltotriose (×).

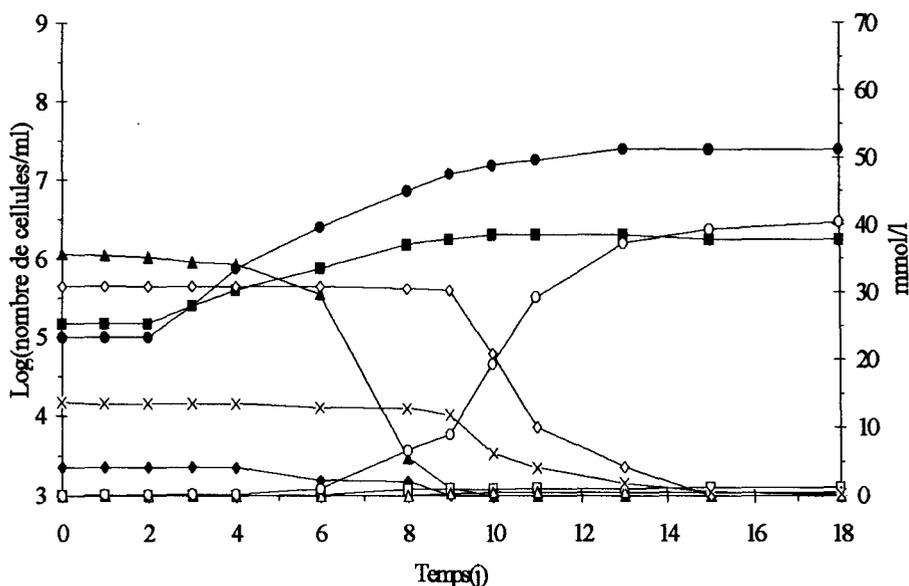


Figure. 40. Cinétique de croissance de *P. frisingensis* (■) et de *S. cerevisiae* (●) en culture mixte dans le moût ( 8°C;  $pH_{initial}= 5,2$  ) et évolution de la composition du milieu en glucose (▲); fructose (◆); ac. propionique (□); ac. acétique (△); éthanol [ $\times 10^{-1}$  (○)]; maltose (◇) et maltotriose (×).

### 3.2. DEFINITION CARACTERISATION, ET ANALYSE DES INTERACTIONS DE PECTINATUS ET SACCHAROMYCES EN CULTURE MIXTE SUR MOUT DE BRASSERIE

Dans un premier temps il est important de déterminer le type d'interaction existant entre *Pectinatus* et *Saccharomyces*. Ces interactions peuvent agir sur les cinétiques de croissance et sur les populations maximales atteintes. Cette étude est effectuée à différentes températures.

Ces interactions définies nous avons cherché à les caractériser.

#### 3.2.1. Détermination des types d'interaction observés en fonction de la température selon BIZEAU

##### A 30°C :

Dans les écosystèmes microbiens, on peut chercher à classer en différents types les actions d'un micro-organisme sur un autre.

Selon BIZEAU (1992) (Annexe 7), pour définir ces interactions il est nécessaire d'établir le rapport suivant :

R attendu ( $R_p$ ) =  $X_p/Y_p$  (en culture pure)

R réel ( $R_m$ ) =  $X_m/Y_m$  (en culture mixte)

Pour déterminer l'interaction entre *S.cerevisiiphilus* et *Pectinatus* pendant la croissance en culture mixte , le rapport  $R_p/R_m$  a été utilisé.

$$=(X_p/Y_p)/X_m/Y_m)$$

avec -  $X_p$  et  $X_m$ : nombre de levures (finale) .ml<sup>-1</sup>, relativement en culture pure et mixte.

-  $Y_p$  et  $Y_m$  : nombre de bactéries (finale). ml<sup>-1</sup>, relativement en culture pure et mixte.

L'interaction est évidente quand le rapport est différent de 1. Si ce rapport est supérieur à 1, l'interaction évolue en faveur de la croissance de *Pectinatus* par rapport à la croissance de *Saccharomyces*. Dans le cas contraire l'interaction favorise la croissance de *Saccharomyces*.

Ce rapport est appliqué aux cultures pures de levures et de bactéries effectuées à 30°C :

$$R_p \text{ (attendu)} = \frac{X_p \text{ final}}{Y_p \text{ final}} = \frac{19000000}{1,55 \cdot 10^8} = 0,1225$$

Appliquons-le maintenant pour la culture mixte :

$$R_m \text{ (réel)} = \frac{X_m \text{ final}}{Y_m \text{ final}} = \frac{3600000}{1,8 \cdot 10^8} = 0,02$$

$$Y_m \text{ final} = 1,8 \cdot 10^8$$

Le rapport final que l'on trouve lors d'une interaction à 30°C est :

$$R_m/R_p = 6,12$$

On remarque que ce rapport est supérieur à 1 donc il y a interaction entre les levures et les bactéries en culture mixte.

Le dénominateur (nombre de bactéries) étant sensiblement identique en culture pure et culture mixte:

$$Y_p \text{ (en culture pure)} = 1,55 \cdot 10^8 \text{ bact./ml.}$$

$$Y_m \text{ (en culture mixte)} = 1,8 \cdot 10^8 \text{ bact./ml.}$$

c'est au niveau du numérateur ( nombre de levure) qu'il y a eu une modification :

$$X_p \text{ (en culture pure)} = 19000000 \text{ lev./ml.}$$

$$X_m \text{ (en culture mixte)} = 3600000 \text{ lev./ml.}$$

On peut conclure que la population bactérienne (*P. cerevisiophilus*) influence la prolifération de levures (*S. cerevisiae*).

D'après ODUM (1953) (☞ page -51) on peut construire ce tableau 11:

		Résultats de l'action de <i>Pectinatus</i> sur les levures		
		+	o	-
Résultats de l'action des levures sur <i>Pectinatus</i>	+			-
	o	o	o	- o
	-			-

Tableau 11.

- Données :
- *Pectinatus* freine la croissance des levures (-),
  - les levures n'ont pas d'action sur la croissance de *Pectinatus* (o)
  - action positive (+)

Nous sommes donc, ici, devant un cas d'AMENSALISME (cas où une population freine le développement d'une autre population coexistante sans voir son propre développement affecté) au niveau de l'interaction entre *P. cerevisiophilus* et *S. cerevisiae*.

Le Tableau 12 montre que l'effet inhibiteur de *P. cerevisiophilus* sur *S. cerevisiae* est présent durant toute la croissance:

Rapport de la population de <i>S.cerevisiae</i> sur la population de <i>P. cerevisiophilus</i> à 30°C				
après	Rp=Xp/Yp	Rm= Xm/Ym	Rp/Rm	interaction
12 h	0,042	0,022	1,91	oui
24 h	0,05	0,016	3,12	oui
48 h	0,106	0,018	5,89	oui
72 h	0,125	0,018	6,94	oui
96 h	0,122	0,02	6,12	oui

Tableau 12.

**A 15°C:**

Les rapports R pour les cultures effectuées à 15°C donnent les résultats suivants :

$$R_p \text{ (attendu)} = \frac{X_p \text{ final}}{Y_p} = \frac{17750000}{164000000} = 0,11.$$

$$Y_p \text{ final} = 1,64 \times 10^8$$

$$\text{et } R_m \text{ (réel)} = \frac{X_m \text{ final}}{Y_m} = \frac{10250000}{96000000} = 0,10$$

$$Y_m \text{ final} = 96000000$$

$$\text{Le rapport final est: } R_p/R_m = 0,11/0,10$$

$$= 1,1$$

(Le rapport est égal à 1,1) donc il n'y a quasiment pas d'interaction entre les levures et les bactéries à 15°C.

**A 8°C:**

Les rapports R pour les cultures effectuées à 8°C donnent les résultats suivants :

$$R_p \text{ (attendu)} = \frac{X_p \text{ final}}{Y_p} = \frac{21250000}{4250000} = 5.$$

$$Y_p \text{ final} = 4250000$$

$$\text{et } R_m \text{ (réel)} = \frac{X_m \text{ final}}{Y_m} = \frac{20000000}{3750000} = 5,33.$$

$$Y_m \text{ final} = 3750000$$

Le rapport final pour trouver l'interaction à 8°C est:

$$R_p/R_m = 0,93$$

(Le rapport étant égal à 0,93), il n'y a pas d'interaction entre les levures et les bactéries à 8°C.

D'après ODUM (1953) on peut réaliser ce tableau 13 (à 8°C):

		Résultats de l'action de <i>Pectinatus</i> sur les levures		
		+	o	-
Résultats de l'action des levures sur <i>Pectinatus</i>	+		o	
	o	o	oo	o
	-		o	

Tableau 13.

Données : - *Pectinatus* n'a pas d'action sur la croissance des levures (o)  
 - les levures n'ont pas d'action sur la croissance de *Pectinatus* (o).

Nous sommes donc, ici, devant un cas neutralisme à 15°C et 8°C.

Les interactions observées dans les cultures effectuées à 8°C, 15°C et à 30°C ne sont pas de même intensité.

Une interaction importante est observée entre *Pectinatus* et *Saccharomyces* à 30°C alors qu'à 15°C, cette interaction est très faible. Il est donc intéressant de déterminer plus précisément la température à partir de laquelle l'interaction devient importante. Pour cela, les interactions entre ces deux populations ont été étudiées à différentes températures.

3.2.2. Culture mixtes de *Saccharomyces* et *Pectinatus*: effet sur le maximum des population observé en fin de développement dans le moût à différents températures.

La figure 41 et le tableau (14) montrent les populations maximales obtenues pour *Pectinatus* et *Saccharomyces* en culture pure et mixte à différentes températures (3°C, 8°C, 15°C, 22°C, 32°C et 37°C).

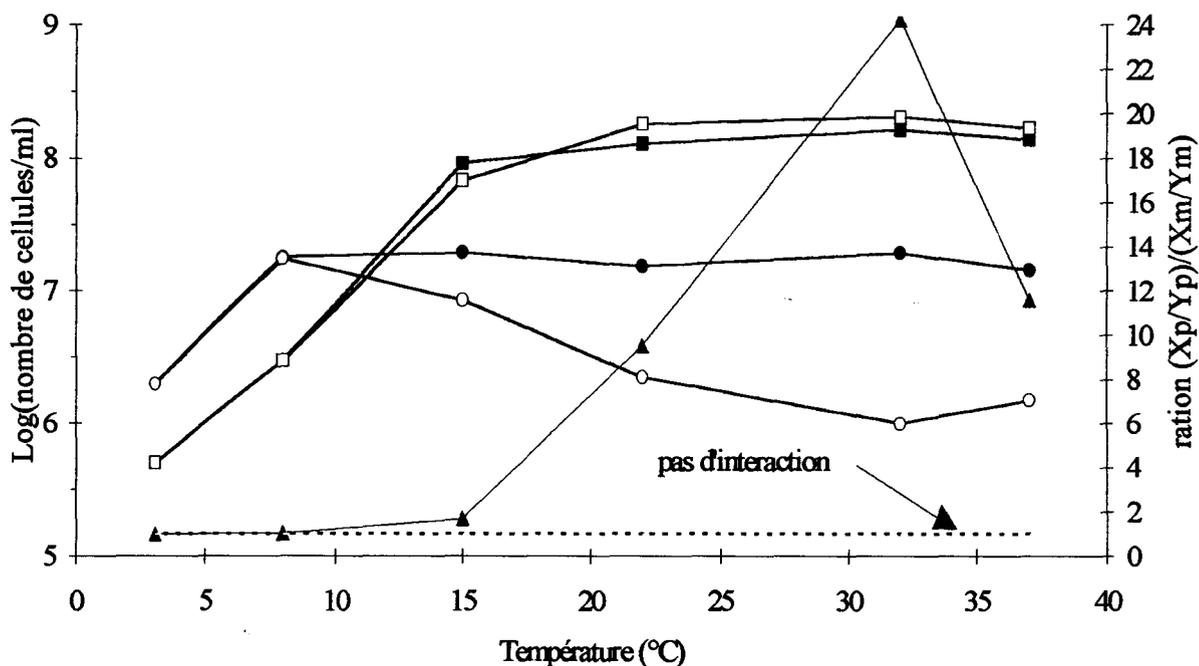


Figure 41: Comparaison des populations finales de *S. cerevisiae* et *P. cerevisiophilus* en culture pure (●)(■) et mixte (○)(□) dans le moût à différentes températures (°C). Valeur de rapport (▲) ( $R_p/R_m$ ).

température (°C)	rapport (Rp/Rm)	interaction
37	11,56	oui
32	24,24	oui
22	9,53	oui
15	1,69	très faible
8	1,02	non
3	1	non

**Tableau 14 :** Interaction entre *P. cerevisiophilus* et *S. cerevisiae* à différents températures dans le moût.

La croissance de la levure est faible en culture mixte. Pour les températures inférieures à 15°C, les valeurs  $X_p/Y_p$  et  $X_m/Y_m$  sont égales donc il n'y a pas d'interaction décelable d'une ou de l'autre des populations sur la seconde pour les températures inférieures à 15°C. Pour de telles températures, la croissance de *Pectinatus* est faible. Entre les températures 15 à 37°C, les rapports  $(X_p/Y_p)/(X_m/Y_m)$  sont supérieurs à 1. Cela montre l'existence d'une interaction importante entre *Pectinatus* et *Saccharomyces*. A ces températures, la croissance de *Saccharomyces* paraît réduite par la croissance de *Pectinatus*. D'un autre coté il apparaît que *Saccharomyces* favorise la croissance de *Pectinatus*.

A 32°C la température optimale pour la croissance de *Pectinatus* correspond une interaction maximale entre *Pectinatus* et *Saccharomyces*.

Lors de nos expériences ce phénomène peut être observé, la cinétique de croissance de *Saccharomyces cerevisiae* en culture mixte est fortement inhibée lorsque la température est supérieure à 15°C.

### 3.2.3. Effet des modifications chimiques du milieu lors de la croissance de *Pectinatus* sur la croissance de *Saccharomyces* en culture mixte

L'existence d'interactions entre *Pectinatus* et les levures démontrée, la caractérisation et la nature des interactions ont été recherchées.

Pour évaluer dans quelle mesure la diminution de la croissance chez les levures était due à la production d'un métabolite par *Pectinatus* la croissance en cultures pures et mixtes des levures a été comparée dans un moût frais et en culture pure dans un moût préfermenté par *Pectinatus* puis stérilisé par filtration (figure 42). Nous avons ramené la concentration en glucose de ce milieu et le pH à sa concentration initiale avant ensemencement de *S. cerevisiae*.

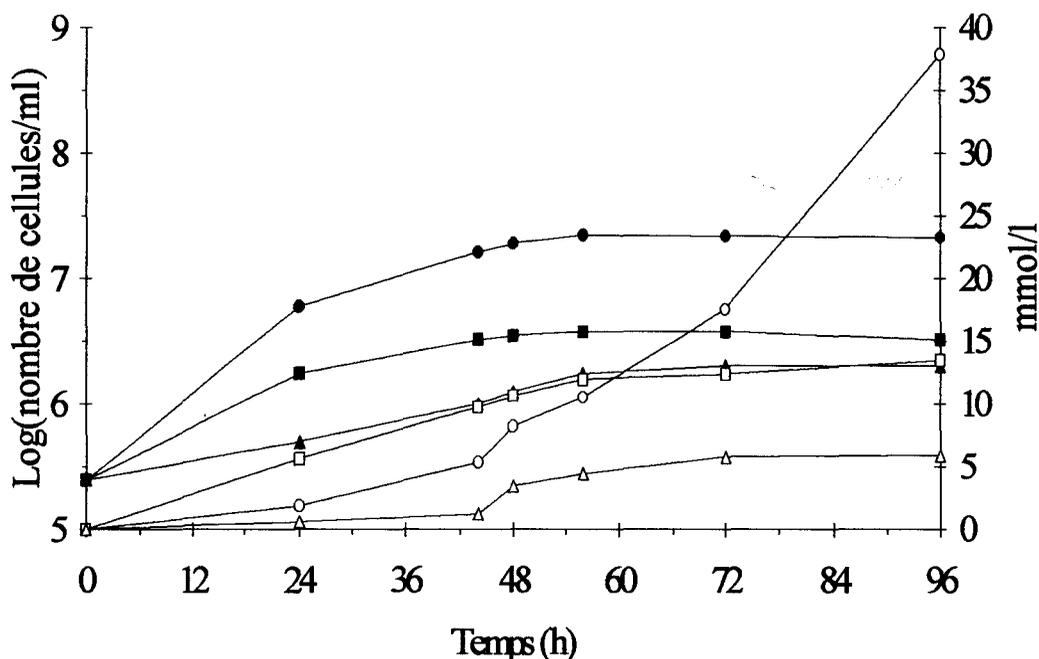


Figure.42. Comparaison des cinétiques de croissances et production d'éthanol de *S. cerevisiae* en culture pure (●)( $\times 10^{-1}$  ○), en culture pure sur moût dégradé par *P. cerevisiophilus* pendant 5 jours (▲)(△), en culture mixte (■)(□) sur moût à 30°C, à  $\text{pH}_{\text{initial}} = 5,2$ .

La cinétique de croissance des levures dans ce dernier milieu se rapproche de la cinétique de croissance des levures en culture mixte donc il est possible que *Pectinatus* excrète dans le milieu un métabolite qui inhiberait la croissance des levures ainsi que la synthèse d'éthanol. Donc il n'y a pas de compétition pour la source de carbone.

D'après ces résultats quatre hypothèses peuvent être émises

En ce qui concerne la croissance:

- *Pectinatus* inhiberait la croissance des levures par sa production d'acide propionique ou d'acide acétique;
- La diminution du pH provoqué par la production d'acide entraînerait l'arrêt de la croissance des levures

En ce qui concerne la production d'éthanol:

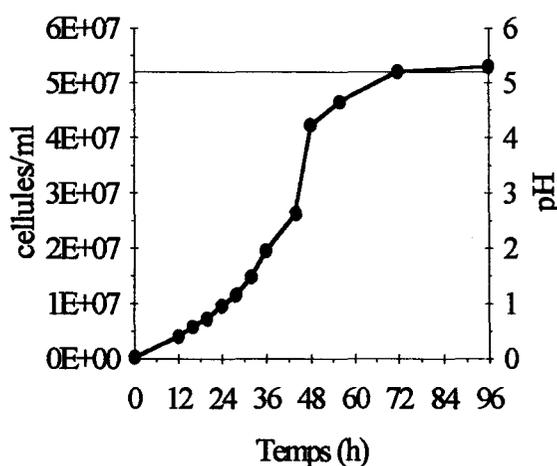
- *Pectinatus* consommerait l'éthanol produit par les levures;
- L'acide propionique et l'acide acétique synthétisés par *Pectinatus* stopperaient la production d'éthanol par les levures

### 3.2.3.1. Mise en évidence de les effets

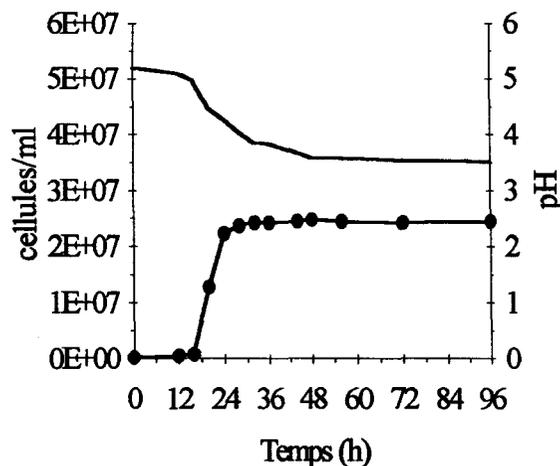
### 3.2.3.2. Influence relative du pH et d'acide propionique sur la croissance des levures

En culture pure et mixte une formation d'acide propionique apparaît lors de la croissance de *Pectinatus* sur le moût associé à une baisse de pH.

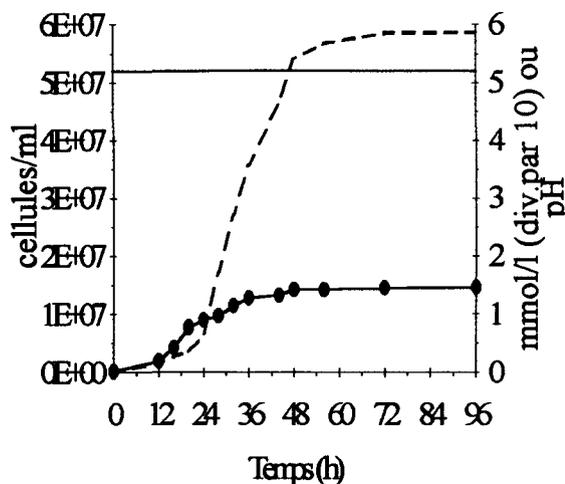
Pour répondre aux hypothèses émises précédemment, la croissance de *S. cerevisiae* dans un moût de bière a été étudiée en fixant ou en reproduisant les évolutions de pH et de concentration en acide propionique.



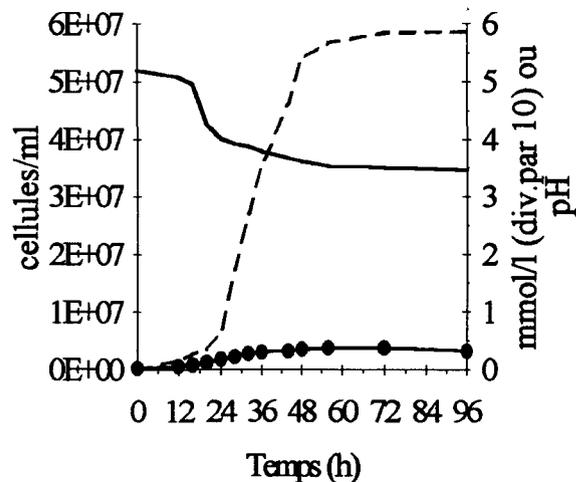
pH fixe sans ajout d'acide propionique  
Figure 43 a



Evolution de pH sans ajout  
d'acide propionique  
Figure 43 b



ajout d'acide propionique avec pH fixe  
Figure 43 c



Ajout d'acide propionique avec  
évolution du pH  
Figure 43 d

Dans un premier temps, la croissance de la population de *S. cerevisiae* a été suivie en maintenant le pH constant (5,2) en absence d'acide propionique dans le milieu. La population obtenue en fin de croissance est de  $5 \times 10^7$  cellules/ml (fig-43 a).

Dans un second temps, la cinétique de croissance de *S. cerevisiae*, cultivée sans contrôle du pH et en absence d'acide propionique dans le milieu (fig-43 b) a été étudiée. Dans ce cas, la population atteint  $2,5 \times 10^7$  cellules/ml.

Ensuite la croissance *S. cerevisiae* a été suivie dans un milieu à pH constant (5,2) et en ajoutant des quantités d'acide propionique reproduisant sa synthèse par *Pectinatus* en culture mixte (fig- 43 c). La population finale obtenue est de  $1,5 \times 10^7$  cellules/ml.

Enfin, l'influence conjointe de ces deux facteurs pH et acide propionique a été étudié en observant une culture dans laquelle le pH n'est pas stabilisé et où il a été ajouté des quantités variables d'acide propionique comme précédemment (fig- 43 d). La population finale atteint  $10^6$  cellules/ml.

Il apparaît que les deux facteurs, pH et acide propionique, agissent sur la croissance de *Saccharomyces*. L'influence d'acide propionique sur la croissance de la levure (population maximale et taux maximal de croissance) est plus importante que celle du pH. Une additivité des effets du pH et d'acide propionique a également été observée, la croissance des levures est plus faible quand les deux effets sont conjugués. La même observation se fait en culture mixte quand le pH diminue avec la synthèse d'acide propionique, la croissance de la levure diminue pour atteindre une population finale de  $10^6$  cellules/ml.

Dans l'expérience (Figure 44) de la cinétique de croissance de *S. cerevisiae* en fonction du pH, on remarque que la croissance est nulle au dessous de pH 3,90.

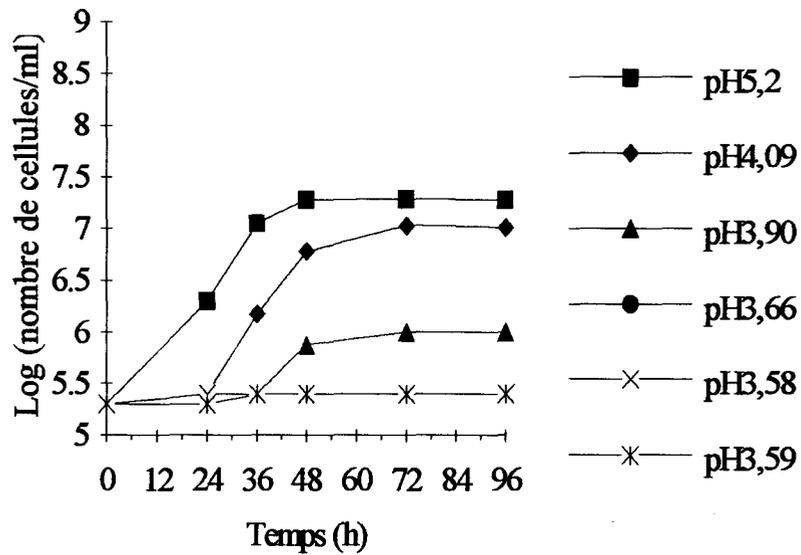


Figure 44. Cinétique de croissance de *S. cerevisiae* en fonction de différents pH sur moût à 30°C.

### 3.2.3.3. Effet de la concentration et de la nature des acides organiques sur la croissance des levures

Les acides propionique et acétique sont les principaux métabolites excrétés par *Pectinatus*. Dans un premier temps l'influence de ces deux composés sur la croissance des levures dans du moût à 30°C a été étudiée, l'effet du pH étant limité par l'ajout d'une base.

Pour cela, différentes concentrations d'acide propionique ont été ajoutées (de 0 à 52 mmol/l). Le pH du moût, après ajout de l'acide propionique, est ramené à pH=5,2 avec de la soude.

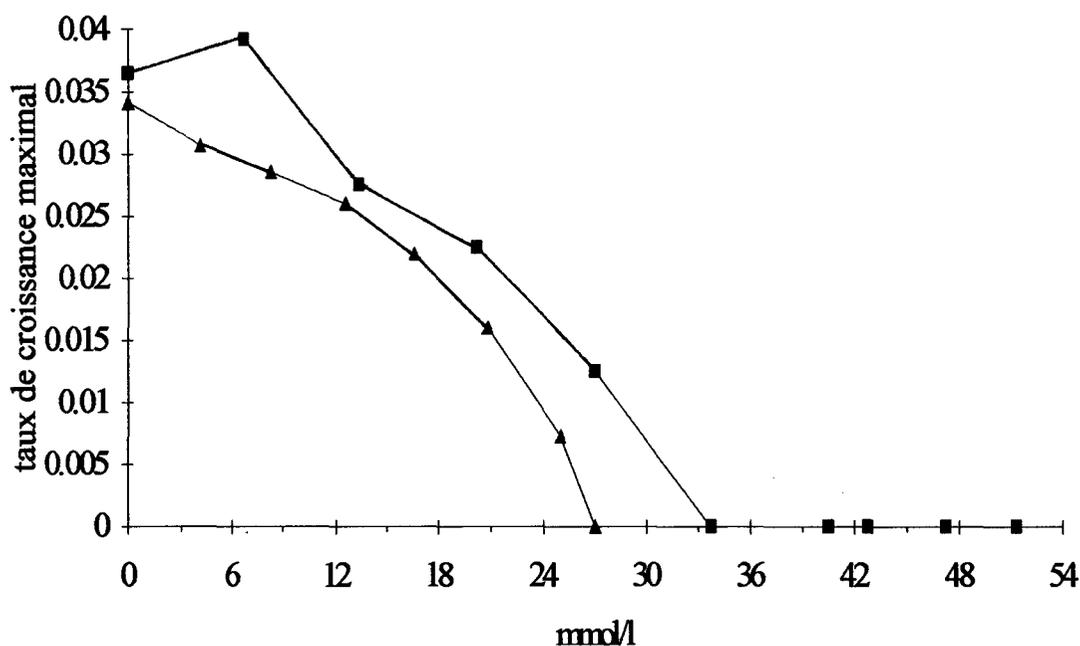


Figure. 45 : Taux de croissance maximum de *S. cerevisiae* en présence de différentes concentrations d'acide propionique (■); d'acide acétique (▲) dans du moût à 30°C et à pH 5,2.

La figure 45 montre que l'inhibition par l'acide propionique est proportionnelle à l'augmentation de sa concentration. Toutefois dans ce cas, on constate qu'au dessus de 36 mmol/l de l'acide propionique, les levures ne se développent plus. D'après ces résultats, l'acide propionique semblerait être responsable de l'inhibition de la croissance des levures.

De même, l'acide acétique également synthétisé par *Pectinatus* semble inhiber la croissance des levures, au dessus de 25 mmol/l d'acide acétique, les levures ne se développent plus.

### 3.2.4. Culture mixte et production d'éthanol

Lors des fermentations à 30°C des cultures mixtes de *S. cerevisiae* et de *P. cerevisiophilus*, il n'apparaît pas d'éthanol. Le développement plus limité des levures en cultures mixtes peut expliquer une légère diminution des concentrations mais cette explication est insuffisante.

L'hypothèse que l'éthanol puisse être consommé par *Pectinatus* au fur et à mesure de sa production par la levure a été émise. Pour vérifier cette hypothèse, *Pectinatus* a été cultivé dans du moût en additionnant régulièrement de l'éthanol. Les ajouts d'éthanol correspondent à la production préalablement déterminée de cet alcool par *S. cerevisiae*.

Dans un premier temps les cinétiques de croissance ont été comparées dans un moût normal dans un moût en co-culture avec des levures et dans un moût avec une addition d'éthanol reproduisant la synthèse d'éthanol par les levures en culture pure. La figure 46 montre que la cinétique de croissance de *Pectinatus* dans un moût avec addition d'éthanol est identique à celle de la culture pure sur moût normal.

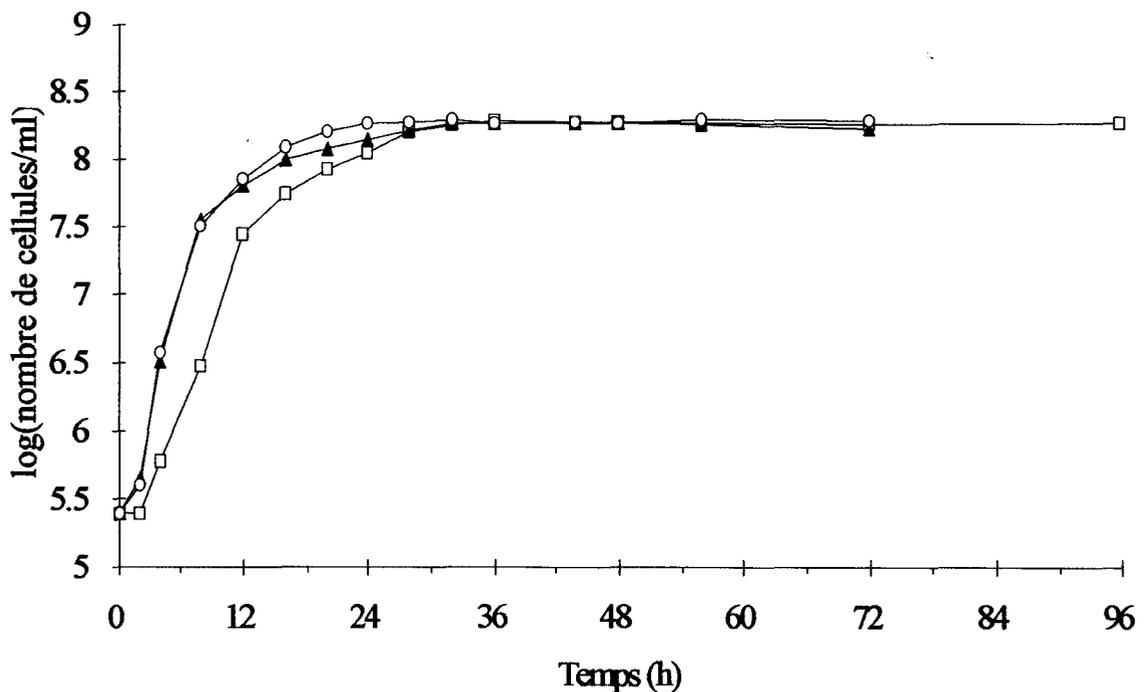
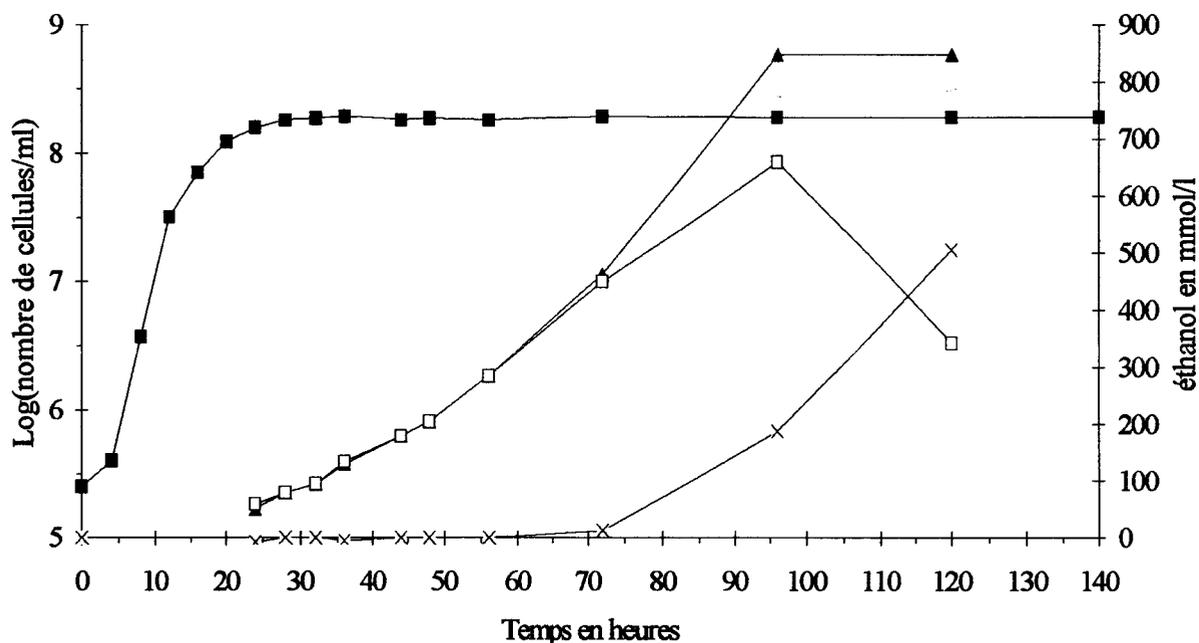


Figure. 46. Comparaison des cinétiques des croissance de *P. cerevisiophilus* en culture pure sur moût normal (▲), sur moût avec addition d'éthanol (○) et en culture mixte sur moût normal (□) à 30°C, à  $pH_{initial}=5,2$ .

Dans un second temps, durant la fermentation en culture pure de *Pectinatus*, les concentrations en éthanol ont été mesurées dans le fermenteur. Ces résultats sont confrontés (figure 47) aux concentrations d'éthanol injecté dans le fermenteur



**Figure. 47.** Comparaison des taux d'éthanol ajoutés (pendant la cinétique de croissance de *P. cerevisiophilus* ■) dans le fermenteur (▲) et révélé par HPLC (□), éthanol consommé (×).

La figure 47 montre l'éthanol ajouté pendant la culture de *P. cerevisiophilus* dans le fermenteur et l'éthanol présent mesuré par HPLC. La différence entre ces deux concentrations par tranches horaires représente la fraction d'éthanol consommée. On constate que l'éthanol n'est pas consommé au début de la culture, mais seulement à partir de 72 h quand toutes les autres sources de carbone sont épuisées.

L'expérience effectuée à l'aide du biophotomètre nous confirme le résultat précédent. Le tableau ( 15) montre la comparaison des taux d'éthanol (0 à 5% d'éthanol) au début et en fin de la phase de croissance de *Pectinatus*. Les échantillons sont analysés par HPLC. Nous avons observé qu'une faible quantité d'éthanol est consommée par *Pectinatus*.

Temps (h)	0j	6j	0j	6j	0j	6j	0j	6j
%	0	0	1	1	2	2	3	3
Ethanol (mmol/l)	0	0	23,0	21,0	51,9	50,50	74,80	72,70
Propionate (mmol/l)	0	80,72	0	79,51	0	80,85	0	78,16

Temps (h)	0j	6j	0j	6j
%	4	4	5	5
Ethanol (mmol/l)	87,90	87,73	98,00	91,99
Propionate (mmol/l)	0	78,83	0	79,91

Tableau 15. Comparaison des taux d'éthanol et d'acide propionique au début et en fin d'expérience.

### 3.3. Discussion:

Dans un premier temps nous nous sommes intéressés à l'influence de la température sur les interactions Levures-Bactéries. A partir des résultats obtenus nous avons pu remarquer que les souches de *Pectinatus* produisent une quantité plus importante d'acide propionique et d'acide acétique lors de leur croissance en culture pure comparée à celle des cultures mixtes, observation également rapportée dans les travaux de Haikara et *al.* 1981 (a) Halender 1992. Il s'est avéré en culture mixte à 30°C que la croissance de *Pectinatus* n'est pas affectée par la présence de *S. cerevisiae*. Par contre cette bactérie ralentit la croissance de *S. cerevisiae* en culture mixte. Boidron 1969 a montré un phénomène similaire lors de co-cultures levures bactéries lactiques.

L'inhibition de la croissance des levures est d'autant plus importante que la température est élevée. Pour les levures on constate des différences entre les cultures pures et les cultures mixtes à 30°C alors qu'à 8°C elles sont identiques. Ces résultats sont confirmés par le rapport

R établi par Bizeau 1992 et par le tableau établi par ODUM (1953) qui nous montrent qu'à 30°C la culture mixte présente un cas d'amensalisme pour un cas de neutralisme à 15°C et 8°C.

Le fait qu'il ne soit pas observé d'action inhibitrice de *Pectinatus* sur les levures à 15°C et à 8°C peut être du à deux raisons:

\* soit *Pectinatus* ne se développe pas suffisamment à basse température pour inhiber la croissance des levures.

\* soit la température a un effet sur les bactéries ce qui fait qu'elles ne synthétisent plus d'acide propionique et acétique à 8°C. Donc elles n'inhibent plus la croissance des levures.

C'est dans l'orientation du second cas que ces travaux ont été entrepris. En effet, nous avons pensé que l'action de *Pectinatus* était de nature enzymatique et que la température de 8°C ne convenait pas aux enzymes donc elles ne pouvaient pas travailler comme à 30°C.

Il est probable que l'inhibition de *Saccharomyces* dépende de la croissance de *Pectinatus* ainsi que des produits synthétisés. A faible température, la croissance de *Pectinatus* est très faible (à 8°C:  $3 \cdot 10^6$  cellules/ml après 18 jours de fermentation et à 3°C:  $5 \cdot 10^5$  cellules/ml après 30 jours de fermentation). Il est donc normal qu'à une telle température le développement de *Pectinatus* ne soit pas suffisant pour influencer la croissance de *Saccharomyces*. Par contre nous avons observé un effet sur la croissance au dessus de 15°C. A cette température, la population de *Pectinatus* est plus importante (à 15°C:  $7 \cdot 10^7$  cellules/ml après 12 jour de fermentation et à 22°C :  $2 \cdot 10^8$  cellules/ml après 9 jours de fermentation) qu'à 8°C. Donc lorsque la température augmente, la croissance et les produits synthétisés par *Pectinatus* sont suffisamment important pour inhiber la croissance de *Saccharomyces*.

Contrairement aux études d'Haikara *et al.* 1981b et de Soberka *et al.* 1989 montrant qu'il n'y avait plus de développement de *Pectinatus* pour des températures inférieures à 15°C il a été observé des croissances détectables dans le moût à des températures inférieures à 15°C. Ces résultats prouvent que ces bactéries sont bien adaptées au milieu bière et peuvent se développer lors de l'étape de fermentation en brasserie. Des résultats similaires ont été observés par Watier (1995)

L'interaction entre *S. cerevisiae* et deux souches (DSM 20466 et ATCC 33332) est moins importante que celle observée avec la souche DSM 20465. Les différences entre ces trois souches ont été observées en immunologie par Haikara 1983 et au niveau de la thermorésistance par Watier *et al.* 1995.

Les produits synthétisés par *Pectinatus* jouent un rôle au niveau de l'inhibition de la croissance de *S. cerevisiae*. Donc dans un second temps nous avons étudié l'influence des

acides synthétisés par *Pectinatus* sur la croissance des levures à 30°C. Des levures ont été cultivées sur un moût qui, a été préfermenté par *Pectinatus*, filtré et ramené sa la composition en sucre et a son pH initial. Il apparaît que la cinétique de croissance des levures cultivées dans ces conditions est proche de celle des levures cultivées en culture mixte à 30°C. Ces observations nous ont amené à supposer que des métabolites synthétisés par *Pectinatus* inhiberaient la croissance des levures. Nakamura *et al.* (1961) Young *et al* (1958) ont rapporté que l'inhibition de la croissance des levures en culture mixte pouvait être dû aux métabolites produits par la bactéries.

Le pH et la présence d'acide à chaîne courte dans le milieu peuvent être responsables de l'inhibition sélective sur la population de micro-organismes. (Nannen *et al.* 1991; Moon 1983; Verduyn *et al.* 1990). La production d'acide propionique (46.03 mmol.l<sup>-1</sup>) et acétique (8.99 mmol.l<sup>-1</sup>) dans le milieu par *Pectinatus* en culture mixte après 44 h de fermentation diminue le pH jusqu'à 3,6. A ce pH il n'y a pas de croissance de *Saccharomyces* possible (fig-44).

Nous avons étudié l'effet toxique du propionate et de l'acétate produits, majeurs synthétisés par *Pectinatus*, sur la croissance de *Saccharomyces*. L'acide propionique, et l'acide acétique sont ajouté séparément dans les milieux de cultures, à des concentrations correspondant aux productions de *Pectinatus*.

En présence de 36 mmol/l de propionate, ou de 26 mmol/l d'acétate la croissance de *Saccharomyces* est arrêtée. Ce phénomène est également observé en culture mixte, où après 48 h de fermentation *Pectinatus* synthétise 54 mmol/l de propionate et 11,32 mmol/l d'acétate quantités suffisantes pour stopper la croissance de *S.cerevisiae*. Ces effets toxiques des acides gras volatils sur la croissance des levures a déjà été décrit par Moon en 1983.

Notre étude a montré que les effets du pH et du propionate sur la croissance de *Pectinatus* sont additifs.

Il est bien connu que l'acide acétique est un inhibiteur de la croissance de *Saccharomyces* (Phaff *et al.* 1978). Grossman *et al.* en 1984, ont montré qu'au delà de 16,65 mmol/l d'acide acétique, la croissance de *Saccharomyces* s'arrête. D'autres auteurs (Maiorella *et al.* 1983) ont montré que cette inhibition se faisait entre 8,3 mmol/l d'acide acétique.

Pampula *et al.* 1989 a noté que l'effet de l'acide acétique était plus important lorsque le pH du milieu était faible. Nous remarquons qu'en culture mixte, après 48 h de fermentation le pH a atteint 3,6 et la concentration d'acide acétique est de 11,32 mmol/l, ce qui explique la forte inhibition de croissance de *Saccharomyces* en culture mixte.

Par contre *Pectinatus* est capable de se développer à des pH faibles-(3,5) (Watier *et al.* 1995).

Dans un troisième temps nous avons cherché à savoir si la disparition de l'éthanol en culture mixte à 30°C était due à une consommation par *Pectinatus*, l'éthanol pourrait être métabolisé en acide propionique. L'inhibition de la croissance des levures à 30°C s'accompagne d'une disparition de l'éthanol dans la culture mixte avec en parallèle une augmentation de la synthèse d'acide propionique. Lors de la culture de *Pectinatus* dans un moût avec addition d'éthanol reproduisant la production d'éthanol par les levures il n'a pas été retrouvé en fin de culture la quantité d'éthanol injectée. Une petite fraction de l'éthanol a été consommée par *Pectinatus*.

La confrontation entre les quantités d'éthanol injectées et les quantités mesurées dans le milieu au cours de la fermentation a montré que la différence apparaissait à partir de 72 h de culture.

Cette observation laisse penser que l'éthanol est utilisé par *Pectinatus* en fin de culture, quand toutes les autres sources de carbone utilisables sont épuisées.

D'après Haikara l'éthanol n'est pas une source de carbone utilisable par *Pectinatus*, mais des travaux effectués au laboratoire ont prouvé que *Pectinatus* montre une légère croissance sur un milieu minimum avec de l'éthanol comme seule source de carbone.

Cependant en culture mixte la faible concentration d'éthanol en fin de fermentation ne peut être seulement expliquée par la consommation d'éthanol par *Pectinatus* la faible biomasse de levure obtenue en fin de fermentation explique également cette observation.

D'après toutes ces observations nous pouvons dire que le propionate, et l'acétate ont une influence importante sur la croissance des levures. De plus, un pH faible intervient également sur l'inhibition de la croissance. La synergie de ces paramètres peut expliquer l'inhibition de la croissance de *Saccharomyces* dans le moût de bière.

#### **4. ETUDE DES INTERACTIONS ENTRE MEGASPHAERA CEREVISIAE ET SACCHAROMYCES CEREVISIAE DANS UN MOÛT DE BRASSERIE**

Parallèlement à l'étude des interactions entre *Pectinatus* et *Saccharomyces* l'étude des comportements en co-culture de *Saccharomyces* en présence de *Megasphaera cerevisiae*, autre contaminant anaérobie strict présent en brasserie a été menée.

Les cinétiques microbiennes et métaboliques de cultures pures et mixtes à différentes températures ont été confrontées puis les interactions ont été caractérisées comme *Pectinatus*.

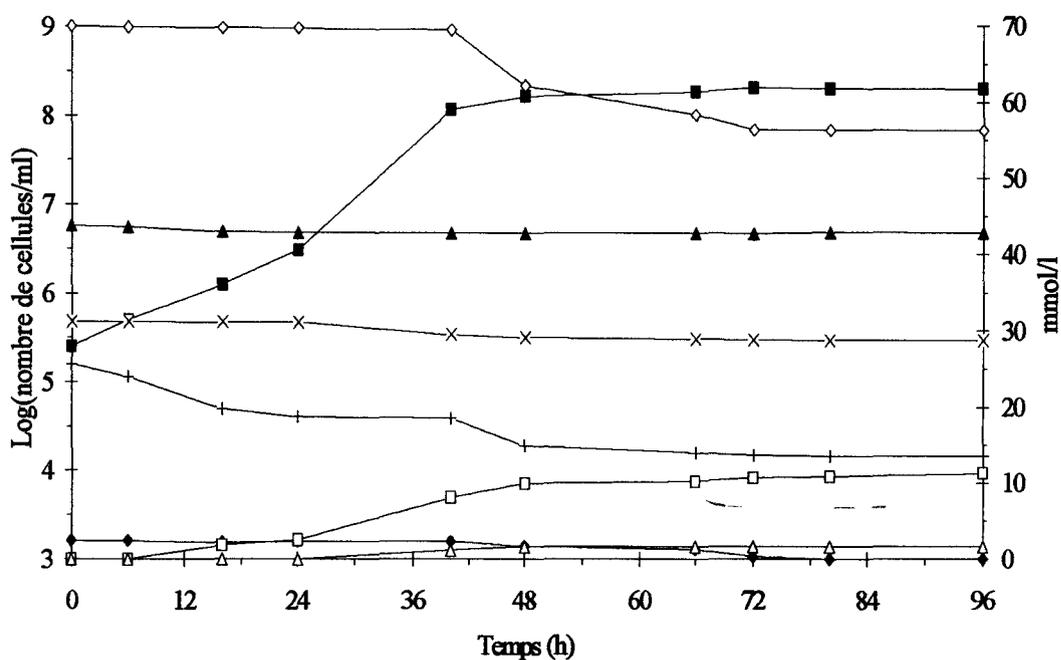
##### **4.1. Suivi de la croissance et de la production des différents métabolites par *M. cerevisiae* en culture pure.**

La souche de *Megasphaera cerevisiae* DSM 20461 a été cultivée dans un moût de brasserie aux températures suivantes : 30°C et 15°C . Le pH initial est de 5,2 (pH du moût de bière).

##### **4.1.1.. Croissance A 30°C**

La figure 48 représente la cinétique de croissance de *M. cerevisiae* et l'évolution de l'acide butyrique, de l'acide acétique, des sucres et du pH à 30°C dans le moût de bière pendant 96 heures.

La figure 48 et tableau 16 montre que *Megasphaera* n'utilise pas le glucose, par contre il utilise le maltose (13,69 mmol/l), et le fructose (2,44 mmol/l) et le maltotriose (2,52 mmol/l) comme sources de carbone. Il synthétise de l'acide butyrique (11,23 mmol/l) et de l'acide acétique (0,49 mmol/l) à la fin de l'expérimentation à 96 h. Pendant la fermentation la population de *M. cerevisiae* varie de  $2,5 \cdot 10^5$  cellules/ml à  $2 \cdot 10^8$  cellules/ml, le temps de latence est nul, le taux de croissance est de  $0,11 \text{ h}^{-1}$ ;  $r^2 = 0,999$  et le pH final est égal à 4,16.



**Figure. 48.** Cinétique de croissance de *M. cerevisiae* (■) en culture pure dans le moût ( 30°C;  $\text{pH}_{\text{initial}}$  (+)= 5,2 ) et évolution de la composition du milieu en glucose (▲); fructose (◆); maltose (◇); maltotriose (×); acide butyrique (□); acide acétique (△).

#### 4.1.2. Croissance à 15°C:

La figure 49 et tableau 17 montre qu'à 15°C les bactéries consomment le fructose (2,49 mmol/l) et une faible quantité de maltose (2,77 mmol/l). *Megasphaera* excrète dans le milieu, comme principaux métabolites, de l'acide butyrique (2,38 mmol/l en 96h) et de l'acide acétique (18,65 mmol/l en 96h). Le temps de latence est de 24 heures, le taux de croissance est de 0,03 h<sup>-1</sup>;  $r^2 = 0,99$  et la population bactérienne finale est de  $1,2 \times 10^7$  bactéries/ml.

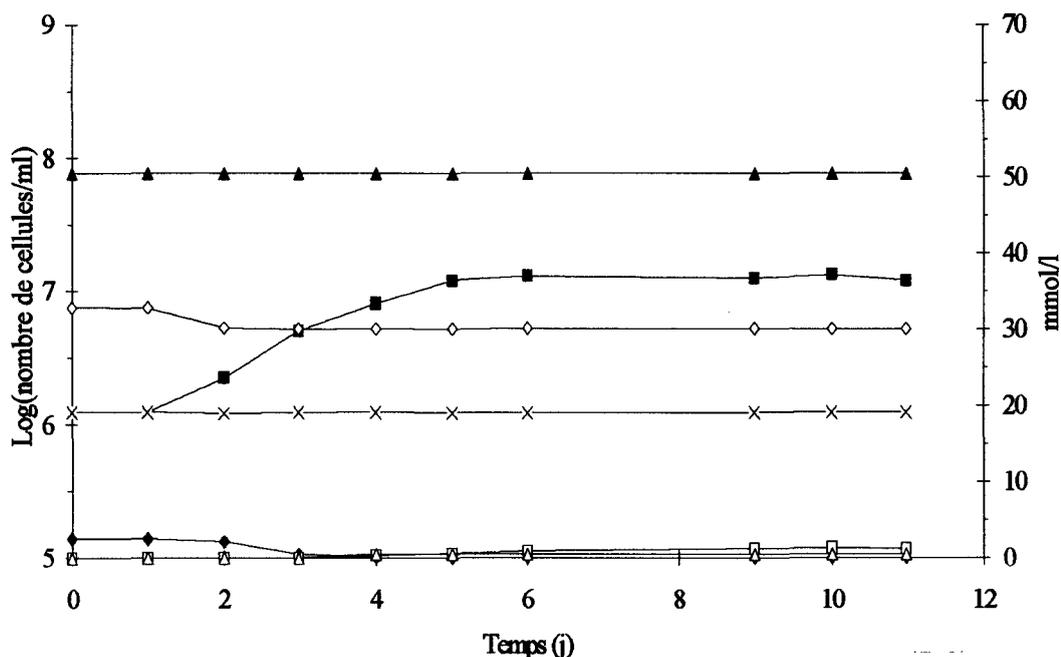


Figure. 49. Cinétique de croissance de *M. cerevisiae* (■) en culture pure dans le moût à 15°C;  $\text{pH}_{\text{initial}} = 5,2$ ) et évolution de la composition du milieu en glucose (▲); fructose (◆); maltose (◇); maltotriose (×); acide butyrique (□); acide acétique (△).

#### 4.2. Suivi de la croissance et de la production des différents métabolites par *S. cerevisiae* en culture pure

##### Croissance à 30 °C

Les résultats concernant de *S. cerevisiae* sont présentés dans le paragraphe 1 de la page 89. On peut toutefois rappeler que la population augmente de  $2,5 \times 10^5$  à  $2,5 \times 10^7$  cellules/ml à 96h. Le principal métabolite de *S. cerevisiae* est l'éthanol et le  $\text{CO}_2$  (synthétisé dès 24 h avec 378,50 mmol/l à 96h).

##### Croissance à 15°C:

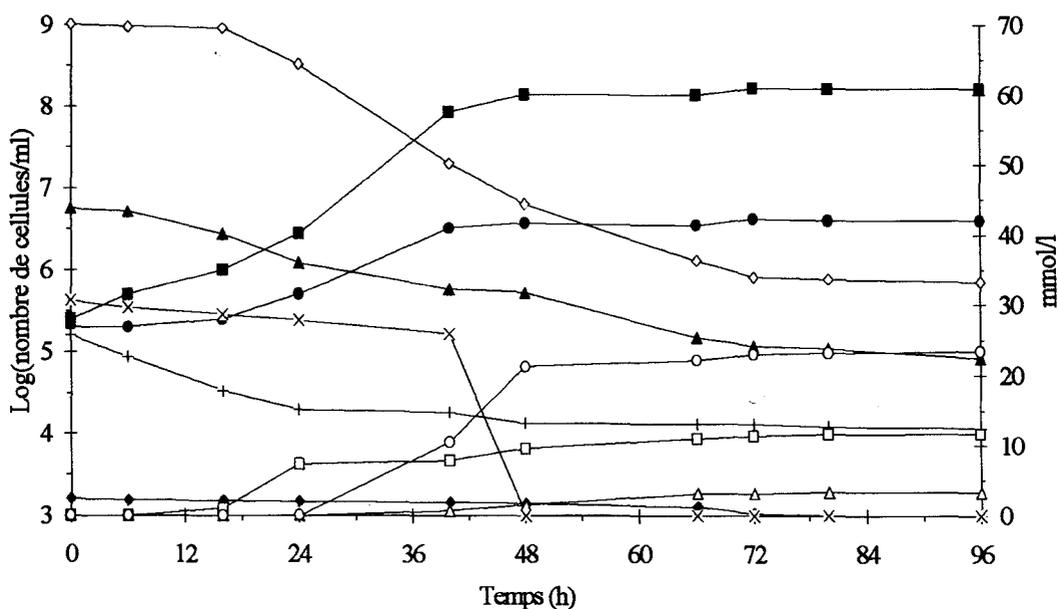
Les résultats concernant de *S. cerevisiae* sont présentés dans le dernière paragraphe de la page 94. On peut toutefois rappeler que à 15°C, on remarque que la population finale de levures est de  $1,7 \cdot 10^7$  cellules/ml. Le temps de latence est de 12 heures, le taux de croissance est de  $0,04 \text{ h}^{-1}$ ;  $r^2 = 0,997$  et la concentration en éthanol est 237,68 mmol/l.

### 4.3. Suivi de la croissance et de la production des différents métabolites par *M. cerevisiae* et *S. cerevisiae* en culture mixte:

#### 4.3.1. Croissance à 30°C:

En culture mixte, *Megasphaera cerevisiae* se développe plus vite que *Saccharomyces*. Les résultats sont représentés figure 50. La concentration bactérienne obtenue en fin de croissance est de  $1,68 \times 10^8$  cellules/ml. Pour *M. cerevisiae* les populations sont sensiblement identiques en culture mixte et en culture pure. Par contre *Saccharomyces* se développe moins bien en culture mixte en présence de *M. cerevisiae* ( $4,25 \times 10^6$  cellules/ml) qu'en culture pure. Le taux de croissance est de  $0,18 \text{ h}^{-1}$ ;  $r^2 = 0,999$  pour *Megasphaera* et de  $0,10 \text{ h}^{-1}$ ;  $r^2 = 0,99$  pour *S. cerevisiae*.

La quantité d'acide butyrique produite en culture mixte a été comparée à la somme de celles produites en culture pures correspondantes. Il apparaît que les sucres sont utilisés dès le début de la culture. La production d'acide butyrique (11,68mmol/l) est sensiblement identique en culture mixte et en culture pure. Par contre la production d'acide acétique (3,33 mmol/l) est supérieure en culture mixte. La production d'éthanol (23,44 mmol/l) est beaucoup moins importante en culture mixte qu'en culture pure (378,53mmol/l).



**Figure. 50.** Cinétique de croissance de *M. cerevisiae* (■) et *S. cerevisiae* (●) en culture mixte dans le moût (30°C;  $\text{pH}_{\text{initial}(+)} = 5,2$ . ) et évolution de la composition du milieu en glucose (▲); fructose (◆); maltose (◇) et maltotriose (×); ac. butyrique (□); ac. acétique (Δ); éthanol (○).

	Cultures pures		Culture mixte	
	<i>S. cerevisiae</i>	<i>M. cerevisiae</i> DSM 20461	<i>S. cerevisiae</i>	<i>M. cerevisiae</i> DSM 20461
Nb cells/ml (96 h)	1,9x10 <sup>7</sup>	2x10 <sup>8</sup>	4,25x10 <sup>6</sup>	1,68x10 <sup>8</sup>
$\mu_{\max}$ (h-1)	0,19	0,11	0,10	0,18
$r^2 =$	0,998	0,999	0,997	0,99
Acide butyrique (mmol/l) (96 h)	0	11,23	0	11,68
Acide acétique (mmol/l) (96 h)	0	0,49	0	3,33
Ethanol (mmol/l) (96 h)	378,55	0	23,44	0
pH <sub>initial</sub>	5,20	5,20	5,20	5,20

Tableau 16. Paramètres de croissance et produits de fermentation en culture pure et mixte de *S. cerevisiae* et *M. cerevisiae*, menées à 30°C dans le moût en condition anaérobie.

	Cultures pures		Culture mixte	
	<i>S. cerevisiae</i>	<i>M. cerevisiae</i> DSM 20461	<i>S. cerevisiae</i>	<i>M. cerevisiae</i> DSM 20461
Nb cells/ml (96 h)	1,7x10 <sup>7</sup>	1,2x10 <sup>7</sup>	4,02x10 <sup>7</sup>	4,25x10 <sup>6</sup>
$\mu_{\max}$ (h-1)	0,04	0,03	0,05	0,01
$r^2 =$	0,997	0,99	1	0,99
Acide butyrique (mmol/l) (96 h)	0	2,38	0	2,38
Acide acétique (mmol/l) (96 h)	0	18,65	0	18,73
Ethanol (mmol/l) (96 h)	237,68	0	432,30	0
pH <sub>initial</sub>	5,20	5,20	5,20	5,20

Tableau 17. Paramètres de croissance et produits de fermentation en culture pure et mixte de *S. cerevisiae* et *M. cerevisiae*, menées à 15°C dans le moût en condition anaérobie.

#### 4.3.2. Croissance A 15°C:

La figure 51 montre que les bactéries et les levures commencent leur développement simultanément. Le début de la phase stationnaire commence au 4<sup>ème</sup> jour pour les bactéries avec une population finale de 4,25x10<sup>6</sup> cellules/ml (tableau 17). Pour les levures la phase

stationnaire commence également au 4<sup>ème</sup> jour et la population finale est de  $4,02 \times 10^7$  cellules/ml. La totalité du glucose (50,51 mmol/l), du fructose (2,49 mmol/l) et du maltose (32,80 mmol/l) ont été consommée ainsi qu'une faible quantité de maltotriose (1,25 mmol/l). Les concentrations finales en acide butyrique et en acide acétique produits par les bactéries sont respectivement de 2,38 mmol/l et de 18,65 mmol/l. La concentration d'éthanol produite par les levures est de 432,30 mmol/l.

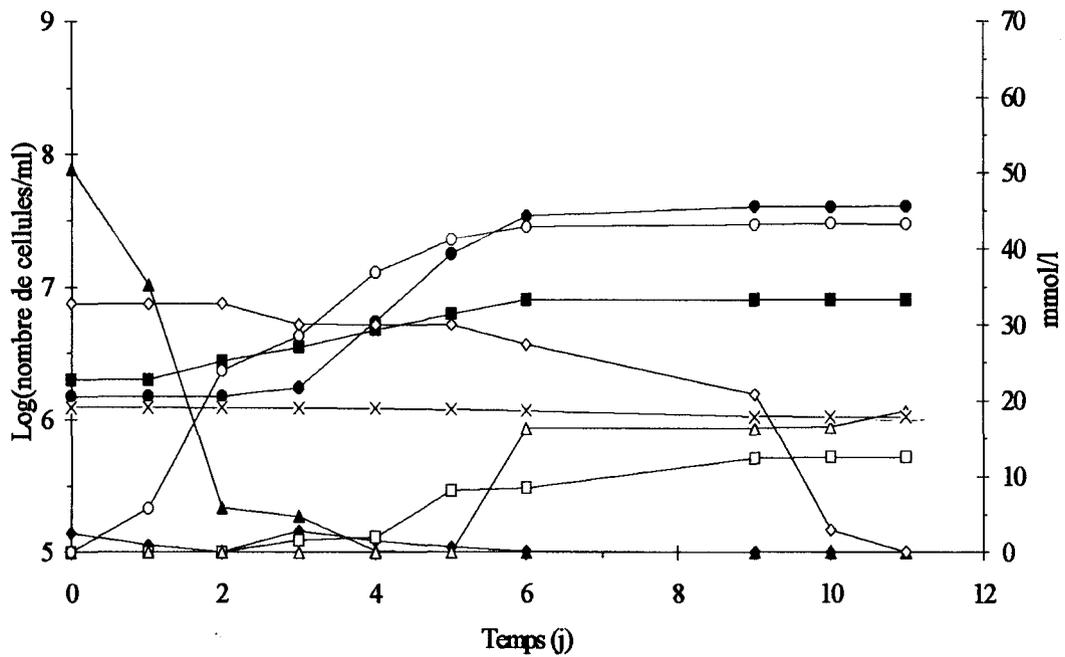


Figure. 51. Cinétique de croissance de *M. cerevisiae* (■) et *S. cerevisiae* (●) en culture mixte dans le moût ( 15°C; pH<sub>initial</sub>= 5,2. ) et évolution de la composition du milieu en glucose (▲); fructose (◆); maltose (◇) et maltotriose (×); acide butyrique (□); acide acétique (△); éthanol [x10<sup>-1</sup>] (○).

#### 4.4. MISE EN EVIDENCE DES INTERACTIONS.

##### 4.4.1. Détermination des types d'interaction observés en fonction de la température selon BIZEAU

Pour déterminer la nature des interactions les rapports ont été traités similairement à ceux pour *Pectinatus* (☞ page 113, paragraph 3).

Le rapport est appliqué aux cultures pures de levures et de bactéries effectuées à 30°C :

$$Rp \text{ (attendu)} = \frac{Xp \text{ final}}{Yp \text{ final}} = \frac{21250000}{1,96 \times 10^8} = 0,10841837$$

et à la culture mixte :

$$Rm \text{ (réel)} = \frac{Xm \text{ final}}{Ym \text{ final}} = \frac{4000000}{1,64 \cdot 10^8} = 0,02439024$$

Le rapport final que l'on trouve lors d'une interaction à 30°C est  $Rp/Rm = 4,44$

Le rapport est supérieur à 1 donc il y a interaction entre les levures et les bactéries en culture mixte.

Le dénominateur (nombre de bactéries) ayant une valeur proche en culture pure et culture mixte:  $Yp$  (en culture pure) =  $2,25 \times 10^8$  bactéries/ml. et  $Ym$  (en culture mixte) =  $1,64 \times 10^8$  bactéries/ml.

c'est au niveau du numérateur ( nombre de levure) qu'il y a eu une différence :  $Xp$  (en culture pure) = 21250000 levures/ml et  $Xm$  (en culture mixte) = 4000000 levures/ml.

On peut conclure que la population bactérienne (*M. cerevisiae*) influence la prolifération de levures (*S. cerevisiae*).

D'après ODUM (1953) le tableau 18 est construit:

		Résultats de l'action de <i>Megasphaera</i> sur les levures		
		+	o	-
Résultats de l'action des levures sur <i>Megasphaera</i>	+			-
	o	o	o	- o
	-			-

Tableau 18.

- Données :
- *Megasphaera* freine la croissance des levures (-),
  - les levures n'ont pas d'action sur la croissance de *Megasphaera* (o)

Comme pour *Pectinatus* nous sommes donc, ici, devant un cas d'AMENSALISME au niveau de l'interaction entre *M. cerevisiae* et *S. cerevisiae*.

Le Tableau 19 montre que l'effet inhibiteur de *M. cerevisiae* sur *S. cerevisiae* est présent à chaque moment de la culture mixte :

Rapport de la population de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> sur la population de <i>Megasphaera cerevisiae</i> à 30°C				
après	$R_p = X_p/Y_p$	$R_m = X_m/Y_m$	$R_p/R_m$	interaction
6 h	1,3	0,40	3,25	oui
16 h	2,4	0,25	9,6	oui
24 h	2	0,182	11	oui
48 h	0,116	0,027	4,32	oui
72 h	0,107	0,025	4,21	oui
96 h	0,108	0,024	4,44	oui

Tableau 19.

### A 15°C:

Les rapports R pour les cultures effectuées à 15°C donnent les résultats suivants :

$$R_p \text{ (attendu)} = \frac{X_p \text{ final}}{Y_p \text{ final}} = \frac{19500000}{7250000} = 2.69$$

$$Y_p \text{ final} = 7250000$$

$$\text{et } R_m \text{ (réel)} = \frac{X_m \text{ final}}{Y_m \text{ final}} = \frac{22500000}{5500000} = 4.09$$

$$Y_m \text{ final} = 5500000$$

$$\text{Le rapport final est: } R_p/R_m = 2.69 / 4.09 = 0.657$$

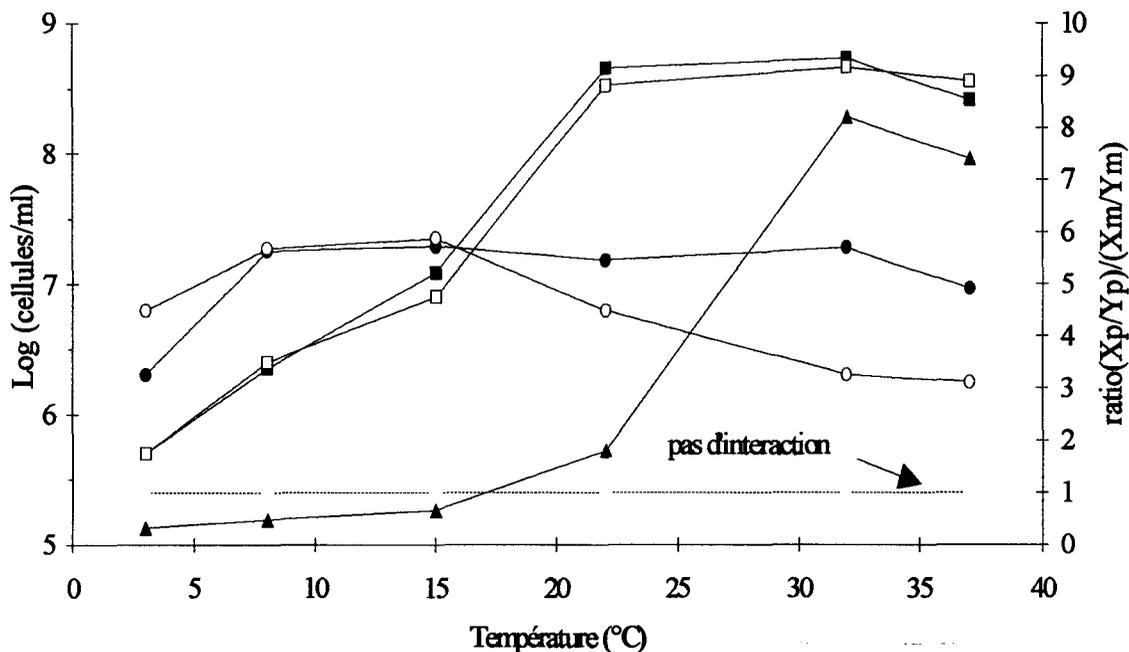
Le rapport étant égal à 0,657 donc à cette température *M cerevisiae* n'affecte pas la croissance des levures, il apparaît qu'il n'y a pas d'interaction entre les levures et les bactéries à 15°C.

#### 4.4.2. Culture mixtes de *Saccharomyces* et *Megasphaera*: effet sur le maximum des population observé en fin de développement dans le moût à différentes températures.

Une interaction entre *Megasphaera* et *Saccharomyces* à 30°C a été observée. Il est donc intéressant, comme pour *Pectinatus*, de connaître la température à partir de laquelle l'interaction devient importante. Pour cela, les interactions entre ces deux populations, cultivées à différentes températures, ont été étudiées.

Les interactions entre *Megasphaera* et *Saccharomyces* lors de cultures dans le moût ont été étudiées aux températures suivantes à 3°C, 8°C, 15°C, 22°C, 32°C et 37°C

La figure 52 et le tableau 20 montrent les populations obtenues en fin de phase exponentielle pour *Megasphaera* et *Saccharomyces* en culture pure et mixte à différentes températures (3°C, 8°C, 15°C, 22°C, 32°C et 37°C).



**Figure 52:** Comparaison des populations finales de *S. cerevisiae* et *M. cerevisiae* en culture pure (●)(■) et mixte (○)(□) dans le moût à différentes températures (°C). Valeur de rapport (▲) ( $R_p/R_m$ ).

température (°C)	$R_p = X_p/Y_p$	$R_m = X_m/Y_m$	rappor t = ( $R_p/R_m$ )	interaction
37	0,035	0,005	7,10	oui
32	0,035	0,004	8,22	oui
22	0,033	0,018	1,79	oui
15	2,689	4,091	0,65	non
8	36	75	0,48	non
3	8	25	0,32	non

**Tableau 20 :** Interaction entre *M. cerevisiae* et *S. cerevisiae* à différents températures dans le moût.

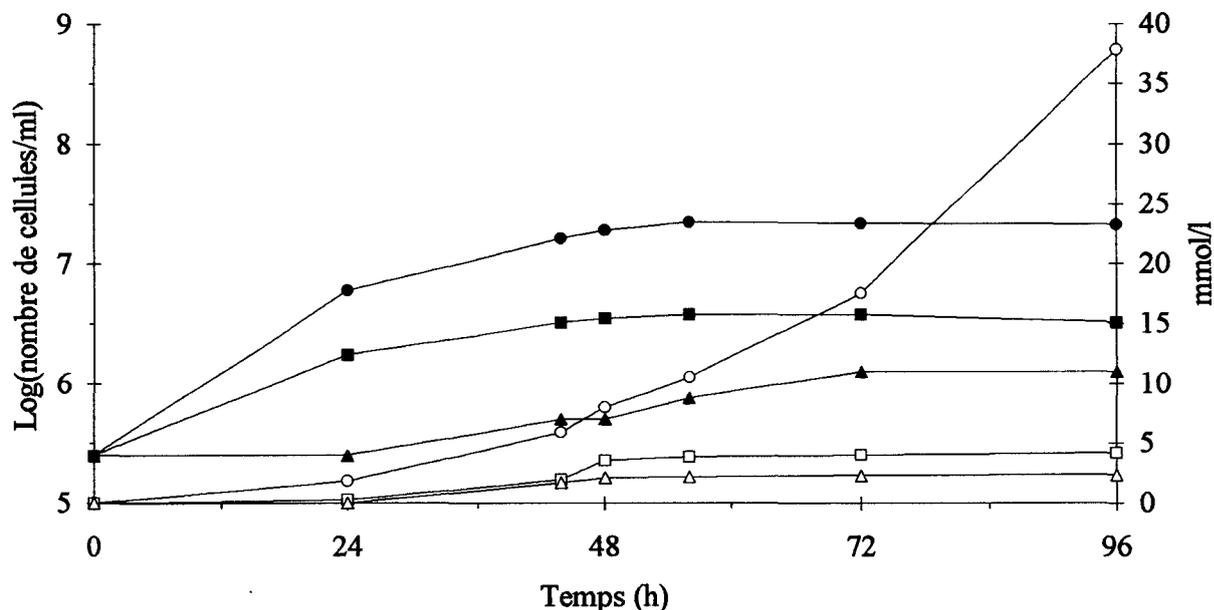
La population maximale de levures est de l'ordre de  $10^7$  en culture pure pour les fermentations effectuées entre 8°C et 32°C. En culture mixte la population maximale atteinte est inférieure à cette valeur pour les températures supérieures à 15°C. Pour ces températures comprises entre 15°C et 37°C les rapports  $(X_p/Y_p)/(X_m/Y_m)$  deviennent supérieurs à 1. Cela met en évidence l'existence d'une d'interaction importante entre *Megasphaera* et *Saccharomyces*. A ces températures, la croissance de *Saccharomyces* paraît réduite par la croissance de *Megasphaera*. Pour les températures inférieures à 15°C, les valeurs  $X_p/Y_p$  et  $X_m/Y_m$  sont inférieures ou égales à 1.

L'effet de *Megasphaera* sur la croissance et les produits de synthèse chez *Saccharomyces* est plus faible que celui de *Pectinatus*.

On a pu observer une interaction maximale à 32°C, température optimale de croissance de *Megasphaera*.

#### 4.4.3. Effet des modifications chimiques du milieu lors de la croissance de *Megasphaera* sur la croissance de *Saccharomyces* en culture mixte

Les interactions entre *Megasphaera* et *Saccharomyces* mises en évidence, la nature de ces interactions a été recherchée en déterminant si la baisse de la croissance des levures était due à la production d'un métabolite par *Megasphaera*.



**Figure 53.** Comparaison des cinétiques de croissances et production d'éthanol de *S. cerevisiae* en culture pure (●) ( $\times 10^{-1}$  ○), en culture pure sur moût dégradé par *M. cerevisiae* DSM 20461 pendant 5 jours (▲) (△), en culture mixte (■) (□) sur moût à 30°C, à  $pH_{initial}=5,2$ .

La figure 53 permet de comparer les croissances en cultures pures et mixtes des levures dans un moût frais et la croissance en culture pure dans un moût préfermenté par *Megasphaera* puis stérilisé.

Ce graphique met en évidence une similitude entre la cinétique de croissance des levures en co-culture avec *Megasphaera* dans un moût frais et la cinétique de croissance des levures en culture pure dans un moût préfermenté par *Megasphaera* puis stérilisé par filtration.

La population de *S. cerevisiae* augmente en 96 heures de  $2,5 \times 10^5$  à  $2,5 \times 10^7$  cellules/ml en culture pure, de  $2,5 \times 10^5$  à  $3,25 \times 10^6$  cellules/ml en culture mixte et de  $2,5 \times 10^5$  à  $1,25 \times 10^6$  cellules/ml en culture pure dans un moût dégradé par *M. cerevisiae*.

En 96 heures la synthèse d'éthanol par *S. cerevisiae* représente en culture pure 378,55mmol/l, en culture mixte 41,45mmol/l et dans un moût dégradé par *M. cerevisiae* 23,44 mmol/l.

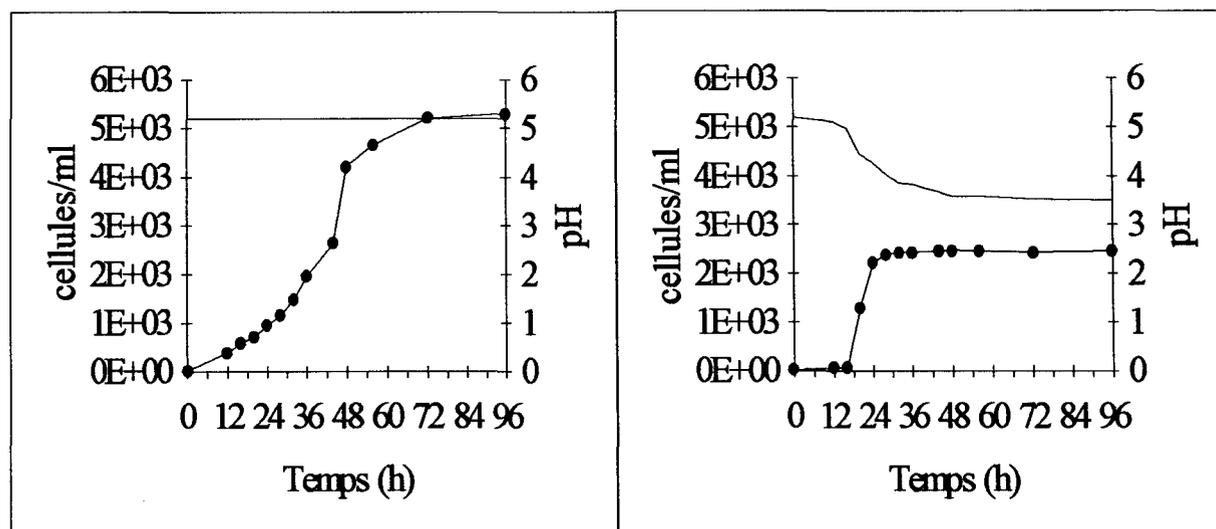
On peut donc supposer que *Megasphaera* excréter dans le milieu un métabolite qui inhiberait la croissance des levures et limiterait la synthèse d'éthanol.

Les acides butyrique et acétique étant les principaux métabolites excrétés par *Megasphaera*, dans un premier temps l'influence d'acide butyrique sur la croissance des levures dans du moût à 30°C a été étudiée. L'influence de l'acide acétique sur la croissance des levures a été présentée précédemment dans l'étude de l'influence de *Pectinatus*.

#### 4.4.4. Influence relative du pH et d'acide butyrique sur la croissance des levures

La variation du pH et la cinétique de formation d'acide butyrique ont été observées lors de la croissance de *Megasphaera* sur le moût, en culture pure.

Les influences que peuvent avoir ces deux facteurs sur la croissance de *S. cerevisiae* sont étudiées indépendamment et conjointement (figure 54 a,b,c,d).



pH (—) fixe sans ajout d'acide butyrique

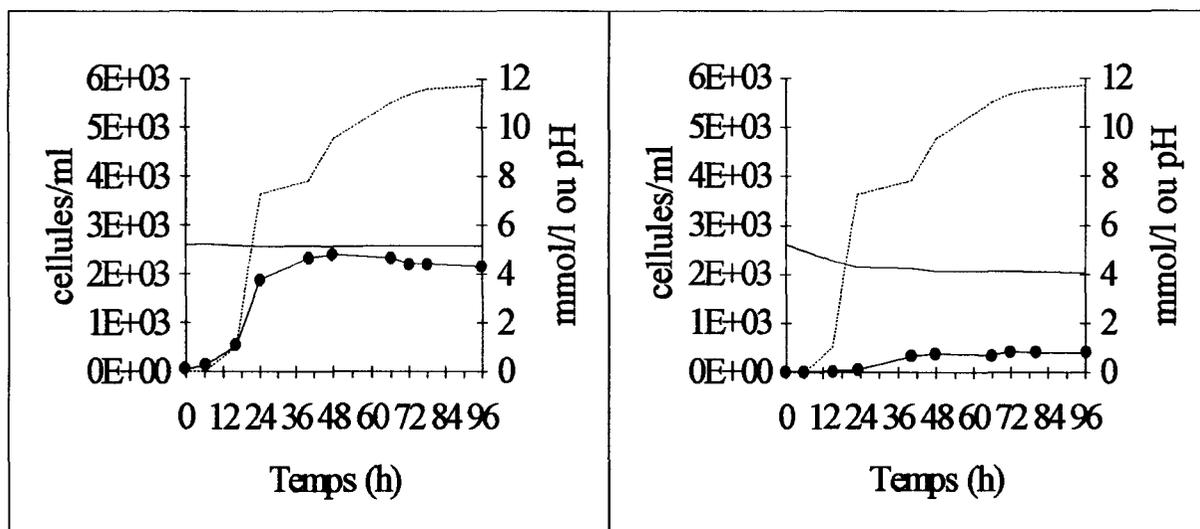
Figure 54 (a)

Evolution de pH (—) sans ajout

d'acide butyrique. (Figure 54 (b))

Dans un premier temps, la croissance de la population de *S. cerevisiae* a été étudiée en maintenant le pH constant (5,2) et en absence d'acide butyrique dans le milieu. La population obtenue en fin de croissance est de  $5,3 \times 10^7$  cellules/ml (fig-54 a).

Dans un second temps, la cinétique de croissance de *S. cerevisiae*, cultivé en faisant évoluer le pH en absence d'acide butyrique dans le milieu (fig-54 b), a été observée. La population atteint  $2,5 \times 10^7$  cellules/ml.



Ajout d'acide butyrique (---) avec pH (—) fixe.

Figure 54 (c)

Ajout d'acide butyrique (---) avec évolution du pH(—)

Figure 54 (d)

Ensuite cette croissance a été étudiée dans un milieu à pH constant (5,2) et en ajoutant des concentrations d'acide butyrique variables au cours du temps (fig- 54 c). Ces concentrations d'acide butyrique correspondent aux concentrations d'acide butyrique produites par *Megasphaera* en culture mixte. La population finale obtenue est de  $2,15 \times 10^7$  cellules/ml.

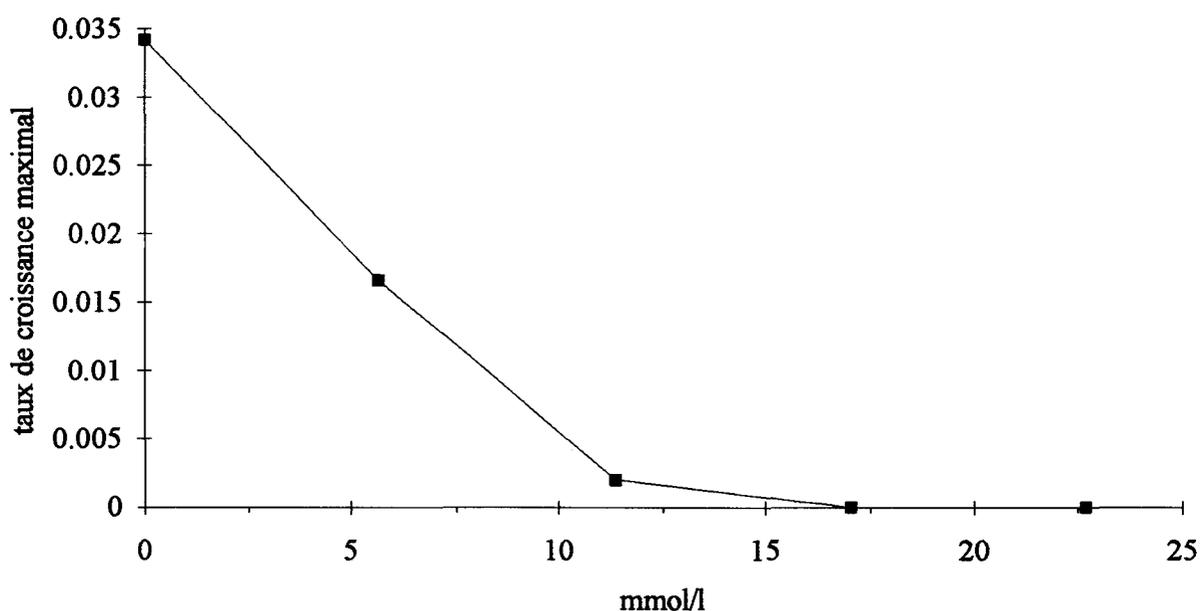
Enfin, l'influence conjointe de ces deux facteurs a été étudiée en menant une culture dans un milieu où le pH n'est pas stabilisé et où des concentrations variables de butyrate ont été injectées (figure- 54 d). Dans cette fermentation la population finale est de  $4 \times 10^6$  cellules/ml.

Quand les facteurs évoluent conjointement la population finale est plus faible que lorsqu'un seul intervient. Les deux facteurs, pH et acide butyrique, seraient responsables de la diminution de la croissance de *Saccharomyces*. De plus leurs effets seraient additifs.

#### 4.4.5. Effet de la concentration et de la nature des acide organique sur la croissance des levures

L'acide butyrique étant le principal métabolite excrété par *Megasphaera*, l'influence de la concentration de cet acide sur la croissance des levures dans du moût à 30°C a été vérifiée.

Pour cela, différentes concentrations d'acide butyrique ont été ajoutées dans le moût (de 0 à 22,70 mmol/l). Le pH du moût, après ajout de l'acide butyrique, est ramené à pH=5,2 avec de la soude.



**Figure. 55 :** Taux de croissance maximum de *S. cerevisiae* en présence de différentes concentrations de butyrate (■) dans du moût à 30°C et à pH 5,2.

La figure 55 montre que l'inhibition par l'acide butyrique est proportionnelle à l'augmentation de sa concentration. Toutefois dans ce cas, il apparaît qu'au dessus de 10 mmol/l d'acide butyrique, les levures ne se développent plus.

Ces résultats confirment de l'inhibition complète de la croissance des levures par l'acide butyrique pour de fortes concentrations.

## 4.5. Discussion

Les résultats obtenus à 30°C en batch fermentation montrent que la concentration maximale de cellules et de production alcoolique par la levure est beaucoup moins importante en culture mixte qu'en culture pure. A l'inverse, la population de *Megasphaera* et la production des acides était légèrement supérieur en culture mixte qu'en culture pure.

A partir de nos résultats il n'a pas été observé d'effet de *Megasphaera* sur la croissance de *Saccharomyces* en dessous de 15°C. Il est probable que l'inhibition de *Saccharomyces* dépende de la croissance de *Megasphaera* ainsi que des produits synthétisés. A faible température, la croissance de *Megasphaera* est très faible (à 15°C  $7 \cdot 10^6$  cellules/ml, à 8°C  $5 \cdot 10^5$  cellules/ml pour *Megasphaera*) il est donc normal qu'à une telle température il n'y ait pas d'inhibition sur la croissance de *Saccharomyces*. A 22°C la population de *Megasphaera* est plus importante ( à 15°C  $7 \cdot 10^7$  cellules/ml et à 22°C  $2 \cdot 10^8$  cellules/ml ) qu'à 8°C. Donc lorsque la température augmente, la croissance et les produits synthétisés par *Megasphaera* inhibent la croissance de *Saccharomyces*.

Des études d'autres auteurs (Haikara *et al.* 1981b; Soberka *et al.* 1989) ont montré qu'il n'y avait plus de développement de *Megasphaera* pour des températures inférieures à 15°C. Pourtant nous avons comparé dans le moût une évolution certes faible mais mesurables. Ces résultats indiquent donc que ces bactéries sont bien adaptées au milieu bière et peuvent se développer lors de la fermentation . Des résultats similaires ont été observés par Watier (1995).

Les produits synthétisés par *Megasphaera* semblent jouer un rôle dans l'inhibition de la croissance de *S.cerevisiae*. Verachtert *et al.* 1989 a remarqué que l'inhibition de la croissance de la levure en culture mixte pourrait provenir de la nature des produits de fermentation de *Enterobacteriaceae*. Une étude a été menée afin d'évaluer les influences des acides synthétisés par *Megasphaera* sur la croissance des levures à 30°C. Des levures ont été cultivées sur un moût préfermenté par *Megasphaera* puis filtré et ramené à la composition en sucre et au pH initial. Il apparaît que la cinétique de croissance des levures cultivées dans ces conditions est comparable à celle des levures cultivées en culture mixte à 30°C. Ainsi, la nature des produits de fermentation de *Megasphaera* pourrait inhiber la croissance des levures.

L'effet toxique des produits majeurs synthétisés par *Megasphaera*, acide butyrique et acide acétique sur la croissance de *Saccharomyces* a été étudié. L'acide butyrique a été ajouté séparément dans des milieux de cultures, à des concentrations correspondant aux productions

de *Megasphaera*. En présence de, 13 mmol/l d'acide butyrique la croissance de *Saccharomyces* est arrêtée, ce phénomène est également observé en culture mixte, où après 48 h de fermentation 11,32 mmol/l d'acides butyrique sont excrétés dans le milieu par *Megasphaera*. Ces concentrations sont suffisantes pour stopper la croissance de *S. cerevisiae*, au dessus de 10 mmol/l d'acide butyrique, les levures ne se développent plus. Les effets toxiques des acides produits sur la levure ont été déjà observés (Moon, 1983). Quelques auteurs ( Corner 1981; Cole *et al.* 1987; Cristina *et al.* 1989) ont suggéré que l'effet inhibiteur peut résulter de l'effet des acides gras à courtes chaînes sur la croissance de *S. cerevisiae*.

A l'effet de l'acide butyrique il faut ajouter l'effet additif de pH. Il est rappelé également l'effet inhibiteur, décrit précédemment, de l'acide acétique sur la croissance des levures.

D'après toutes ces observations nous pouvons dire que l'acide butyrique et l'acide acétique ont une influence importante sur la croissance des levures. De plus, un pH faible intervient également sur l'inhibition de la croissance. La synergie de ces paramètres peut expliquer l'inhibition de la croissance de *Saccharomyces* dans le moût de bière.

**CONCLUSION GENERALE**

## CONCLUSION GENERALE

Le comportement de deux genres bactériens, contaminants de la bière, *Pectinatus* et *Megasphaera*, a été étudié en culture mixte avec *Saccharomyces cerevisiae*, levure traditionnelle de brasserie. La croissance de ces bactéries pendant la fabrication de la bière, leur résistance à l'oxygène dissous, ainsi que les effets mutuels entre les levures et les bactéries ont été abordés. Les résultats acquis permettent de comprendre les conséquences de ces contaminations en brasserie.

L'étude de l'évolution des populations de *Pectinatus* et *Megasphaera* a été suivie lors de la fabrication de la bière en microbrasserie, reproduisant les étapes de fermentation et de garde. Les populations finales de ces micro-organismes en fin de fermentation peuvent atteindre  $2,6 \cdot 10^6$  ufc/ml pour *P. cerevisiiphilus* et  $6 \cdot 10^6$  ufc/ml pour *M. cerevisiae* à 15°C. Dans le cas de *Pectinatus*, comme dans le cas de *Megasphaera*, cette étude montre que la croissance est relativement élevée malgré des conditions défavorables de température, de pH, et de substances inhibitrices comme l'éthanol et les humulones ainsi que la présence d'oxygène dissous en début de fermentation. Ces résultats mettent en évidence les risques bactériologiques encourus lors d'une contamination par l'une ou l'autre de ces deux bactéries. Nous avons constaté que le développement de ces bactéries en microbrasserie est plus important à 22°C, mais ce n'est pas une température habituelle de fabrication de la bière. Par ailleurs, pendant la garde, il n'a malheureusement pas été possible de compter de façon fiable l'évolution du nombre de bactéries durant la fermentation secondaire en raison de l'agglutination et de la sédimentation des cellules. Mais des travaux antérieurs ont montré que *Pectinatus* et *Megasphaera* ne se développent pas à 2°C, il y a donc peu de risque d'évolution du nombre pendant la garde.

Une contamination bactérienne à l'ensemencement des cuves par les levures en début de fermentation peut entraîner des risques importants de prolifération de *Pectinatus* et *Megasphaera* malgré la saturation des milieux en oxygène dès les premières minutes.

Nous avons de plus étudié l'évolution des populations de *P. cerevisiiphilus* et *M. cerevisiae* lors de la réutilisation répétée de fonds de cuve, et évalué l'évolution de la population bactérienne lors de 6 recyclages. En effet, certaines brasseries utilisent leurs fonds de cuve pour ensemer une nouvelle fermentation pendant 6 à 7 cycles.

Les expériences menées ont montré que la qualité de la bière est significativement altérée à partir du troisième recyclage pour un ensemencement de 4800 cellules/ml et à partir du

cinquième recyclage pour un ensemencement de 180 cellules/ml pour *Pectinatus*. L'analyse chimique du milieu après le sixième recyclage a montré une accumulation de 12 mmol/l d'acide propionique synthétisée par *P. cerevisiiphilus*, quantité suffisante pour être décelable au palais. Par contre, dans nos conditions expérimentales il n'a été décelé aucune croissance de *M. cerevisiae* lors de la réutilisation de fond de cuve. Par conséquent, le risque d'altération du goût de la bière semble plus grand lors de contaminations par *Pectinatus* que par *Megasphaera*, en particulier lors des derniers recyclages.

Le développement des bactéries anaérobies strict lors de la fabrication de la bière n'est donc pas négligeable, il est apparu important d'étudier la résistance de *P. cerevisiiphilus* et *M. cerevisiae* à l'oxygène.

Ainsi, l'étude de la survie en culture pure sur milieu oxygéné a montré que *Pectinatus* et *Megasphaera* sont capables de résister plusieurs heures dans du moût saturé en oxygène. La résistance à l'oxygène est fortement influencée par la température; elle est beaucoup plus faible à 32°C qu'à 15°C et 8°C. Cependant, la résistance est nettement plus élevée en culture mixte avec *S. cerevisiae*. L'observation de populations mixtes en microscopie électronique montre l'association de *Pectinatus* avec *Saccharomyces* : des bactéries semblent collées à la paroi des levures. Ce qui laisse supposer un rôle protecteur des levures qui créent autour d'elles une zone anaérobie par absorption d'oxygène, et excrétion de CO<sub>2</sub>. Cet environnement favorable au développement des bactéries anaérobies explique le fait que leur survie à l'oxygène dissous est plus importante en culture mixte qu'en culture pure.

A la suite de cela, nous avons étudié les interactions entre les bactéries et la levure en culture mixte sous différentes conditions. Dans un premier temps, nous avons comparé les cinétiques de croissance de ces micro-organismes en culture pure et mixte en fonction de la nature du milieu de culture et de la température. Ainsi, on a observé sur les 4 milieux étudiés à 30°C une forte diminution de populations de *S. cerevisiae* en culture mixte, alors que celle de *Pectinatus* est légèrement plus élevée dans les mêmes conditions. De plus, on a remarqué une croissance de *Pectinatus* assez importante dans le milieu minimum ( $8 \cdot 10^7$  bactéries/ml). Dans d'autres milieux, MRS et moût la population maximale observée est respectivement de  $2.9 \cdot 10^8$  bactéries/ml et  $1.5 \cdot 10^8$  bactéries/ml. *Pectinatus* se développe d'autant mieux que le milieu est riche. Par contre, dans le milieu bière, où il reste peu de sucres fermentescible, la croissance ( $3 \cdot 10^6$  bactéries/ml) est beaucoup moins importante.

Par la suite, nous nous sommes intéressés exclusivement à l'étude de ces micro-organismes dans le milieu moût de bière. Ainsi, nous avons pu mettre en évidence pour les

différentes températures (8°C, 15°C et 32°C) étudiées et pour chacune des espèces en présence ses effets sur la croissance et sur l'accumulation des produits de fermentation. On a observé en culture mixte peu de modifications de la croissance de la levure en dessous de 15°C. De plus, il n'existe pas entre les deux espèces d'interactions détectables. Cela semble être dû à un trop faible développement des bactéries (*Pectinatus* ou *Megasphaera*). Au delà, et avec un maximum à 32°C (température optimale de développement des bactéries), les interactions entre levures et bactéries sont nettement plus marquées. La croissance de la levure est régulièrement ralentie, de même que la synthèse d'éthanol; alors que la croissance des bactéries s'accélère parallèlement à l'augmentation de la production d'acide propionique et d'acide acétique pour *Pectinatus*, ou d'acide butyrique et d'acide acétique pour *Megasphaera*.

Ainsi, à 30°C, il y'a une forte inhibition de la croissance de *Saccharomyces* en culture mixte. Cela pourrait être du à la fois à la production des acides organiques excrétés dans le milieu par *Pectinatus* ou *Megasphaera*, et à la diminution du pH provoqué par la production d'acide, entraînant l'arrêt de la croissance des levures.

Pour vérifier cela, nous avons étudié l'effet toxique des acides propionique, butyrique, et acétique, produits majeurs synthétisés par *Pectinatus* ou *Megasphaera*, sur la croissance de *Saccharomyces* à pH régulé. En présence de 36 mmol/l d'acide propionique, ou de 26 mmol/l d'acide acétique, ou de 10 mmol/l d'acide butyrique, la croissance de *Saccharomyces* est arrêtée. Ce phénomène est également observé en culture mixte, où après 48 h de fermentation, *Pectinatus* ou *Megasphaera* synthétise 54 mmol/l d'acide propionique, 11,32 mmol/l d'acide acétique, et 10,32 mmol/l d'acide butyrique; quantités suffisantes pour stopper la croissance de *S. cerevisiae*.

Ensuite, on a étudié la croissance de *S. cerevisiae* dans un moût de bière en fixant ou en reproduisant les évolutions de pH par H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> de concentration en acide propionique ou acide butyrique. Dans un premier temps, la croissance de *Saccharomyces* a été suivi en mainte le pH constant (5,2) en absence d'acide propionique ou butyrique. Dans un second temps, la cinétique de croissance de *S. cerevisiae*, cultivée sans contrôle du pH et en absence d'acide propionique ou butyrique dans le milieu. Ensuite la croissance *S. cerevisiae* a été suivie dans un milieu à pH constant (5,2) et en ajoutant des quantités d'acide propionique ou butyrique reproduisant sa synthèse par *Pectinatus* ou *Megasphaera*. Enfin, l'influence conjointe de ces deux facteurs pH et acide propionique ou butyrique a été étudié en observant une culture dans laquelle le pH n'est pas stabilisé et où il a été ajouté des quantités variables d'acide propionique comme précédemment. A partir des résultats de cette étude, il apparaît que les deux facteurs,

pH et acide propionique ou acide butyrique, agissent sur la croissance de *Saccharomyces*. L'influence d'acide propionique sur la croissance de la levure (population maximale et taux maximal de croissance) est plus importante que celle du pH. Une additivité des effets du pH et d'acide propionique ou acide butyrique a été également observée; la croissance des levures est plus faible quand les deux effets sont conjugués.

Lorsque ces bactéries contaminent la bière en fin de fermentation, la présence de l'alcool n'empêche pas ces dernières de se développer. Des travaux récents menés au laboratoire ont abouti à la même conclusion [ Watier et al. 1994 ]. Nous avons pu constater que *Pectinatus* est capable en absence de toute autre source de substrat carboné de consommer l'éthanol produit par les levures, par contre *Megasphaera* en est incapable.

Finalement, on peut affirmer qu'à basse température (moins de 15°C ), il y a moins de risques industriels, car à cette température, il n'y a pas d'interaction entre les levures et les bactéries. Traditionnellement, la fermentation de la bière se fait toujours à une température comprise entre 8°C et 15°C. Les risques d'altération de la bière par les bactéries anaérobies strict *Pectinatus* ou *Megasphaera* concernant donc essentiellement les brassins de fermentation haute. S'il s'agit de contaminations avant la fermentation. Par contre, en cas de contamination bactérienne lors du conditionnement, toutes les bières peuvent s'altérer lors de leur stockage.

## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

## Références bibliographiques

---

ASSOCIATION FRANÇAISE DE NORMALISATION., 1988. Contrôle de la qualité des produits alimentaires : analyse sensorielle, 3<sup>e</sup> édition, Paris-la-Défense, AFNOR.

ACCOLAS J.P., BLOQUEL R., DIDIENNE R., REGNIER J., 1977. Propriétés acidifiantes des bactéries lactiques thermophiles en relation avec la fabrication du yoghurt. *Le lait* **57**: 1-23.

ALVES DA SILVA P. H., 1989. Etude cinétique et enzymatique au cours de la fermentation primaire en brasserie: influence des récoltes, de la concentration cellulaire, de la densité du moût, Thèse Doct. Institute National Polytechnique de Lorraine, Lorraine, p 231.

AMRI-ZAHRI M., 1980. Incidence des facteurs nutritionnels sur la composition chimique et la structure de la paroi dans le phénomène de floculation de *Saccharomyces uvarum*. Thèse Doct. D'Etat es Sciences Pharmaceutiques. Université Nancy I. p199.

ANDERSON R. J., HOWARD G. A., HOUGH J. S., 1971. The sulphur metabolism of brewing yeasts and spoilage bacteria. *Eur. Brew. Conv. Proc.* 13th Congr. Salzburg. 253-264.

ANDERSON R. J., HOWARD G. A., 1974. The production of hydrogen sulphide by yeast and by *Zymonas anaerobia*. *J. Inst. Brew.* **80**: 245-251.

ANDREW J.F., GREAF SP., 1971. Anaerobic biological treatment processes. In: Gould R.F., *Advances in Chemistry series*, **105**: 126-162.

ANDREWS J., GILLILAND R.B., 1952. Super-attenuation of beer: a study of three organisms capable of causing abnormal attenuations. *J. Inst. Brew.* **58**: 189-196.

AULT R. G., 1965. Spoilage bacteria in brewing-a review. *J. Inst. Brew.* **71**: 376-391.

AULT R. G., NEWTON R., 1971. Spoilage organisms in brewing. Modern brewing technology. 1st ed. W. P. K. Findlay (ed.) Macmillan Press, London et Basingstoke pp. 164-197.

BACK W., 1978. Zur Taxonomie der Gattung *Pediococcus*. Phänotypische und genotypische Abgrenzung der bisher bekannten Arten sowie Beschreibung einer neuen bierschädlichen Art: *Pediococcus inopinatus*. *Monatsschrift für Brauwissenschaft* **31**: 237-250.

BACK W., WEISS N., SEIDEL H., 1979. Isolierung und systematische Zuordnung bierschädlicher gramnegativer Bakterien. II: Gramnegative anaerobe Stäbchen/Anhang: Aus Bier isolierte gramnegative fakultativ Stäbchen. *Monatsschrift für Brauwissenschaft* **32**: 233-238.

BACK W., 1981. Nachweis und Identifizierung gramnegativer bierschädlicher Bakterien. *Monatsschrift für Brauwissenschaft* **34**: 197-204.

BACK W., BREU S., WEIGET C., 1988. Infektionsursachen im Jahre 1987. *Monatsschrift für Brauwissenschaft* **128**: 1358-1362.

BALLEY J.E., OLLIS D.F., 1986. Biochemical Engineering Fundamentals. Mc Graw Hill Int. Ed., Singapore. p. 984.

BARBOUR E. A., PRIEST F. G., 1986. The preservation of *Lactobacilli* : a comparison of three methods. *Lett. Appl. Microbiol.* **2**: 69.

BELLMAN R.B., KEEN R.M., BANNER M.J., KING S.W., 1982. Interactions between wine yeast and malolactic bacteria under wine conditions. *Dev. Ind. Microbiol.* **23**: 107-121.

BENARD M., 1970. L'arôme de la bière. La France et ses parfums, **69**: 231-233.

BENARD M., LEVEAU J. Y., SCRIBAN R., 1975. La pasteurisation de la bière. Extraits de la revue de l'embouteillage et des industries du conditionnement. **153**:25 et **154**:27

BIZEAU C., LEQUERE J.M., MICHEL A., DRILLEAU J.F., 1992. Possibilité de modéliser la fermentation du cidre. I.A.A. Jan-Fév. vol n°9, pp. 15-21.

BOIDRON A.M., 1969a. Contribution à l'étude de l'antagonisme entre les levures et les bactéries lactiques du vin. Thèse de 3ème cycle, Université de Bordeaux, France.

BOIDRON A.M., 1969b. Etude de l'antagonisme entre les levures et bactéries lactiques du vin. *Connaissance Vigne Vin* **3**: 315-378.

BOIDRON A.M., 1969. Sur deux causes d'inhibition des levures par les bactéries lactiques. C.R.Acad. Sci. Paris. 922-924.

BOURGEOIS C. M., LARPENT J.P., 1989. Microbiologie alimentaire: les fermentations alimentaires, Ed. Lavoisier Tec. & Doc, Paris, **2**: 358.

BRADY B.L., 1958. Wild yeasts in pitching yeast. *J.Inst.Brew.* **64**: 304-307.

BRENNER M.W., HSU W.P., 1971. A study of wild yeast and lactic acid bacteria in the brewery. *MBAA Techn. Quart.* **8**: 45-51.

BROCK T.D., 1966. In Principles of microbial ecology, pp. 114-145. Prentice-Hall, Scarborough, Ontario.

BULL A.T., SLATER J.H., 1982. Microbial interactions and community structure. In Microbial Interactions and Communities, Bull A.T. ed., vol. **1**: pp. 13-43. Academic Press, London.

CHELACK B. J., INGLEDEW W. M., 1987. Anaerobic Gram-negative bacteria in brewing - a review. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **45**: 123-127.

CHOWDHURY I., WATIER D., HORNEZ J.P., 1995. Variability in survival of *Pectinatus cerevisiiphilus*, strictly anaerobic bacteria, under different oxygen conditions. *Anaerobe* **1**: 151-156.

- COLE M.B., KEENAN J.M.H., 1987. Effects of weak acids and external pH on the intracellular pH of *Zygosaccharomyces bailii* and its implications in weak acid resistance. *Yeast* **3**: 23-32.
- CORNER T. R., 1981. Synergism in the inhibition of *Bacillus subtilis* by combinations of lipophilic weak acids and fatty alcohols. *Antimicrob. Agents Chemother.* **19**: 1082-1085.
- COOTE N., KIRSOP B.H., 1976. Factors responsible for the decrease in pH during beer fermentation. *J. Inst. Brew.* **82**: 149-153.
- COWBOURNE M. A., PRIEST F. G., HOUGH J. S., 1972. Gram-negative wort bacteria. *Brew. Dig.* **10**:76-84.
- CRISTINA A. V., FERNANDA R., SA-CORREIA I. NOVAIS J. M., 1989. Inhibition of yeast growth by octanoic and decanoic acids produced during ethanolic fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**: 21-28.
- DACHS E., 1978. Innovation im Bereich der biologischen Betriebskontrolle. *Monatsschrift für Brauwissenschaft* **118**: 1519-1523.
- DADDS M. J. S., MACPHERSON A. L., SINCLAIR A., 1971. *Zymomonas* and acetaldehyde levels in beer. *J. Inst. Brew.* **77**:453-455.
- DADDS M. J. S., MARTIN P. A., 1973. The genus *Zymomonas*-a review. *J. Inst. Brew.* **79**:386-391.
- DE CLERCK J., VAN CAUWENBERGE H., 1956. Bulletin de l'association des Anciens Etudiants en Brasserie de l'Université de Louvain. **52**: 1 et 61.
- DE CLERCK J., DE CLERCK E., 1966. Microbrewery, Technical Quarterly, Master Brewers Association of the Americas. **2**: 183.
- DE MAN J.C., ROGOSA M., SHARPE M.E., 1960. A medium for the cultivation of *Lactobacilli*. *J. Appl. Bacteriol.* **23**: 130-135.

DÜRR P., 1983. Luftkeimindikation bierschädlicher bakterien, neue methode mittels luftkeimsammelgerät und luftkeimindikator. *Monatsschrift für Brauwissenschaft* **123**: 1652-1655.

ENGELMANN U., WEISS N., 1985. *Megasphaera cerevisiae* sp. nov.: A new gram-negative obligately anaerobic coccus isolated from spoiled beer. *System. Appl. Microbiol.* **6**:287-290.

ESCHENBECHER F., 1968. Zur Kenntnis der biersäuernden Laktobazillen. *Monatsschrift für Brauwissenschaft* **21**:424.

ESCHENBECHER F., 1969. Zur Kenntnis der biersäuernden Laktobazillen. *Monatsschrift für Brauwissenschaft* **22**:14-18.

ESCHENBECHER F., ELLENRIEDER M., 1975. Eine Artenanalyse der Würzebakterien. *Eur. Brew. Conv. Proc. 15th Congr. Nice*, pp. 497-510

ETO M., NAKAGAWA A., 1975. Identification of a growth factor in tomato juice for a newly isolated strain of *Pediococcus cerevisiae*. *J. Inst. Brew.* **81**: 232-236.

FORNACHON J.C., 1968. Influence of different yeasts on the growth of lactic acid bacteria in wine. *J. Sci. Food Agric.* **19**: 374-378.

GROSSMAN M. K., BECKER R., 1984. Investigations on bacterial inhibition of wine fermentation. *Keller-wirtschaft.* **10**: 272-275.

GUILLOUX-BENATIER M., FEUILLAT M., CIOLFI B., 1985. Contribution à l'étude de la dégradation de l'acide L-malique par les bactéries isolées du vin. Effet stimulant des autolysats de levure. *Vitis* **24**: 59-74.

GUNST F., VERZELE M., 1978. On the sunstroke flavour of beer, *J. Inst. Brew.* **84**: 291-292.

HAIKARA A., MÄKINEN V., HAKULINEN R., 1977. On the microflora of barley after harvesting, during storage and in malting. *Eur. Brew. Conv. Proc. 16th Congr. Amsterdam* 35-46.

- HAIKARA A., ENARI T-M., LOUNATMAA K., 1981a. The genus *Pectinatus*, a new group of anaerobic beer spoilage bacteria. *EBC Congress*. **24**: 229-240.
- HAIKARA A., PENTTILÄ L., ENARI T. M., LOUNATMAA K., 1981b. Microbiological, Biochemical, and electron microscopic characterization of a *Pectinatus* strain. *Appl. Environ. Microbiol.* **2**:511-517.
- HAIKARA A., 1983. Immunological characterization of *Pectinatus cerevisiophilus* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **46**: 1054-1058.
- HAIKARA A., 1984. Beer spoilage organisms. Occurrence and detection with particular reference to a new genus *Pectinatus*. *Tech. Res. Cent. Finlet.* **14**: 07.
- HAIKARA A., 1985a Detection of anaerobic, gram-negative bacteria in beer. *Monatsschrift für Brauwissenschaft* **6**:239-243.
- HAIKARA A., 1985b. Detection of *Pectinatus* contaminants in beer. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **43**: 43-46.
- HAIKARA A., 1986. Uudet panimokontaminantit. Mallas ja Olut pp. 69-77.
- HAIKARA A., LOUNATMAA K., 1987. Characterisation of *Megasphaera* sp., a new anaerobic beer spoilage coccus. *EBC Congress*. 21st Congress, pp. 473-480.
- HAIKARA A., 1989. Invasion of anaerobic bacteria into pitching yeast. Proc 22nd Congr. *Eur. Brew. Conv.*, pp. 537-544.
- HAIKARA A., 1991. The genera *Pectinatus* and *Megasphaera*. In : The Prokaryotes, second ed. (ed.) Albert Balows *et al.*, pp. 1994-2003.
- HARRISON J. C., APSEY N., BADGER T., MOON D., 1987. Small-scale (non-industrial) Brewing. Dans : *Brew. Sci.* vol. **3**, (ed.) Pollock J. R. A., London, Academic Press. p. 573.

HAUKELI A. D., 1980 En ny ølskadelig bakterie i tappet øl. Referat från det 18. Skandinaviska Bryggeritekniska Mötet, Stockholm., pp. 112-122.

HAYAKAWA M., NONOMURA H., 1987. Humic acid-vitamin agar, a new medium for the selective isolation of soil actinomycetes. *J. Ferment. Technol.* **5**: 501-509.

HEGAZI F.Z., 1990. Interactions involved in the associative growth of *Enterococcus faecalis* and lactobacilli in fresh skim milk cultures. *Archiv für Lebensmittelhygiene* **41**: 77-96.

HELANDER I., SAUKKONEN K., HAKALEHTO E., VAARA M., 1984. Biological activities of lipopolysaccharides from *Pectinatus cerevisiophilus*. *FEMS Microbiol. Lett.* **24**: 39-42.

HELANDER I., HAIKARA A., MORAN A. P., 1992. Separation and characterization of two chemically distinct lipopolysaccharides in two *Pectinatus* species. *J. Bacteriol.* **10**: 3348-3354.

HOLDEMAN L. V., MOORE., 1974. Gram-negative anaerobic rods: Family I. *Bacteroidaceae*. Dans : R. E. Buchanan et N. E. Gibbons (ed.), *Bergey's Manual of determinative Bacteriology*, 8th ed. Williams et Wilkins Co., Baltimore, pp. 384-426.

HUGENHOLTZ J., VELDKAMP H., 1985. Competition between different strains of *Streptococcus cremoris*. *FEMS Microbiol. Ecol.*, **31**: 57-62.

INGLEDEW W. M., 1979. Effect of bacterial contaminants on beer. A review. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **37**:145-150.

JACOBSEN M. THORNE R.S.W., 1980. *J. Inst.Brew.* **86**: 284.

JUILLARD V., SPINLER H.E., DESMAZEAUD M.J., BOQUIEN C.Y., 1987. Phénomènes de coopération et d'inhibition entre les bactéries lactiques utilisées en industrie laitière. *Le lait* **67**: 149-172.

JUILLARD V., RICHARD J., 1989. Etude de l'interaction entre souches protéolytiques de streptocoques lactiques mésophiles et leurs variants non protéolytiques, au cours de leur croissance dans le lait. *Le lait* **69**: 291-304.

JUILLARD V., RICHARD J., 1990. Indirect interaction in milk between proteolytic and isogenic non-proteolytic strain of *Lactobacillus lactis*. I. Effect of pre-culturing by a non-proteolytic variant. *Le lait* **70**: 425-438.

KATTEIN U., MIEDANER H., NARZISS L., 1988. Zur Problematik des Lichtgeschmackes im Bier. *Monatsschrift für Brauwissenschaft* **21**:205-208.

KEEVIL W. J., HOUGH J. S., COLE J. A., 1979. The influence of a coliform bacterium on fermentation by yeast. *J. Brew.* **85**: 99-102.

KIDNEY E., WHITE F. H., 1979. The influence of yeast strains on beer spoilage bacteria. *Eur. Brew. Conv. Proc.* 18th Congr. Berlin, pp. 801-815.

KING S.W., BEELMAN R.B., 1986. Metabolic interactions between *Saccharomyces* and *Leuconostoc oenos* in a model grape juice/wine system. *Am. J. Enol.Viticul.* **37**: 53-60.

KIRCHNER G., LURZ R., MATSUZAWA K., 1980. Biertrübungen durch Bakterien der Gattung *Bacteroides*. *Monatsschrift für Brauwissenschaft* **33**:461-467.

KITAHARA K., 1974. Gram-positive cocci, Genus III. *Pediococcus*. Bergey's manual of determinative bacteriology. R. E. Buchanan et N. E. Gibbons. 8ème édition (ed.) The Williams and Wilkins Co., Baltimore, pp. 513-515.

KLAVER F.A.M., KINGMA F., 1989. De bereiding van yoghurt door membraan dialyse fermentatie. *VMT*, **19**: 23-26.

KRAUSS G., 1967. Würzebehandlung. *Eur. brew. conv. proc.* 11th congress, Madrid, pp. 35-54.

KUROIWA Y., HASHIMOTO H., 1961. The role of flavine compounds in the evolution of hydrogen sulfide in beer on the exposure of sunlight, Report of the Research Laboratories of the Kiirin Brewery Co., Ltd., Yokohama. **4**:29-34.

LAFON-LAFOURCADE S., PEYNAUD E., 1961. Composition azotée des vins en fonction des conditions de vinification. *Annales de Technologie Agricole*. **10**: 143-160.

LARPENT ET LARPENT-GOURGAUD, 1985. *Elements de microbiologie*. Ed.Herman.

LAWRENCE D. R., PRIEST F. G., 1981. Identification of brewery cocci. *Eur. Brew. Conv. Proc.* 18th Congr. Copenhagen, pp. 217-227.

LEE S. Y., MABEE M. S., JANGAARD N. O., 1978. *Pectinatus*, a new genus of the family Bacteroidaceae. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **28**: 582-594.

LEE S. Y., MABEE M. S., JANGAARD N. O., HORIUCHI E. K., 1980. *Pectinatus*, a new genus of bacteria capable of growth in hopped beer. *J. Inst. Brew.* **86**:28-30.

LEE S. Y., 1984. Genus XI *Pectinatus*. In : N. R. Krieg, et J. G. Holt (ed.) *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol. 1. Williams et Wilkins, Baltimore, pp. 655-658.

LEVEAU J.Y., 1987. *Physiologie cellulaire appliquée à la fermentation alcoolique par les levures*, Annu. Col., APRIA, Paris, 1-20.

LIU J.A.P., MOON N.J., 1982. Commensalistic interaction between *Lactobacillus acidophilus* and *Propionibacterium shermanii*. *Appl. Env. Microbiol.* **44**: 715-722.

LODDER J., 1970. *The yeasts: a taxonomic study*. 2ed. North-Holland Publish. Company, p. 1385 .

LONVAUD-FUNEL A., 1986. *Recherches sur les bactéries lactiques du vin: fonctions métaboliques, croissance, génétique plasmidique*. Thèse de Doctorat ès Sciences, Université de Bordeaux II, France.

- LONVAUD-FUNEL A., MASCLER J.P., JOYEUX A., PARASKEVOPOULOS Y., 1988. Etude des interactions entre levure et bactéries lactiques dans le moût de raisin. *Connaissance Vigne Vin*. **22**: 11-24.
- LUFT J., 1961. Improvements in epoxy resins embedding methods. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **9**: 408-414.
- LUFT J., 1971. Ruthenium red and violet I. Chemistry, purification, methods of use for electron microscopy and mechanisms of action. *Anat. Rec.* **172**: 347-368.
- MAIORELLA B., BLANCH H.W., WIKE C.R., 1983. *Biotechnol. Bioeng.*, **25** :103.
- MARK I., 1988. Contrôle de la fermentation de la bière: Cinétique, modélisation, mise au point de capteurs directs et logiciels par la méthode de Kalman, suivi en ligne. Thèse Docteur es Science INPL, Nancy. p243 .
- MEGEE R.D., DRAKE J.F., FREDERICKSON A.G., TSUCHIYA H.M., 1972. Studies in intermicrobial symbiosis. *Saccharomyces cerevisiae* and *Lactobacillus casei*. *Can. J. Microbiol.* **18**: 1733-1742.
- MIDDLEKAUFF J. E., SONDAG R., 1972. Studies on quality and quantity of end products during *Pediococcus* growth and metabolism. *Proc. Am. Soc. Brew.* 17-19.
- MIURA Y., SUGIURA K., YOH M., OKAZAKI M., KOMEMUSHI S., 1978. Mixed culture of *Mycotorula japonia* and *Pseudomonas oleoverans* on two hydrocarbons. *J. Ferment. Technol.* **56**: 339-344.
- MOLL M. 1991. Bières et coolers. (ed.) Tec et Doc-Lavoisier Apria, Paris.
- MOON N.J., REINBOLD G.W., 1976. Commensalism and competition in mixed cultures of *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus*. *J. Milk Food Tec.* **39**: 337-341.
- MOON N. J., 1983. Inhibition of the growth of acid tolerant yeast by acetate, lactate, propionate and their synergetic mixture. *J. Appl. Bacteriol.* **55**: 453-460.

- MOORE W. B., RAINBOW C., 1955. Nutritional requirements and biochemical activities of brewery *lactobacilli*. *J. Gen. Microbiol.* 190-197.
- NAKAMURA L.K., HARTMAN P.A., 1961. *Lactobacillus*: yeast interrelationships. *J. Bacteriol.* **81**: 519-523.
- NANBA A., NISHIZAWA Y., TSUCHIYA Y., NAGAI S., 1987. *J. Ferment. Technol.*, **65**: 277.
- NANNEN N. L., HUTKINS R. W., 1991. Intracellular pH effects in lactic acid bacteria. *J. Dairy Sci.* **74**: 741-746.
- NIEFIND H. J., SPÄTH G., 1971. Die Bildung flüchtiger Aromastoffe durch Mikroorganismen. *Eur. Brew. Conv. Proc.* 13th Congr. Estoril, pp. 459-468.
- NIEFIND H. J., SPÄTH G., 1975. Some aspects of the formation of dimethyl sulfide through brewer's yeast and beer spoilage microorganisms. *Proc. Am. Soc. Brew. Chem.* **33**: 54.
- ODUM E.P., 1953. *Fundamental ecology*. Saunders Ed. Philadelphia.
- OGG J. E., LEE S. Y., OGG B. J., 1979. A modified tube method for the cultivation and enumeration of anaerobic bacteria. *Can. J. Microbiol.* **25**:987-990.
- OHINO T., TAKAHASHI R., 1983, Rep. Res. Lab. Kirin Brew. Co. Ctd., 25.
- OLIVEIRO I., RUIZ-MACIAS C., CHORDI A., PEINADO J.M., 1982. *Biotechnol. Bioeng.* **24**: 2725.
- PAJUNEN E., MAKINEN V., 1975. *Proc. Eur. Brew. Conv.* p. 525.
- PAMPULHA M. E., LOUREIRO V., 1989. Interaction of the effects of acetic acid and ethanol on inhibition of fermentation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Lett.* **4**: 269-274.

- PATEL G.B., INGELDEW W.M., 1973. Internal carbohydrates of *Saccharomyces carlsbergensis* during commercial lager brewing. *J.Inst. Brew.* **79**: 392 - 396.
- PHAFF H. J., MILLER M. W., MRAK E. M., 1978. The life of Yeasts, 2nd edn. Cambridge, USA: Harvard University Press, p. 154.
- PLOSS M., ERBER J., ESCHENBECHER F., 1979. Die Essigsäurebakterien in der Brauerei *Eur. Brew. Conv. Proc.* 17th Congr. Berlin (West), pp. 521-532.
- PRIEST F. G., COWBOURNE M. A., HOUGH J. S., 1974. Wort enterobacteria - a review *J. Inst. Brew.* **80**:342-356.
- PRUCHA J., SCHEIBLE E., 1970. Der Einfluss von Infektionen der Würze bzw. des Bieres auf den Geschmack des Bieres. *Brauwelt* **110**:1233-1239.
- RAINBOW G., 1971. Spoilage organisms in breweries. *Proc. Biochem.* **6**:15-31.
- RAINBOW G., 1981. Beer spoilage microorganisms. *Brewing Science*. Vol. 2. (ed.) J. R. A. Pollack and Pool Limited Reading, England, Academic Press, London, pp. 491-550.
- REHM H.J., REED G., 1983. Biotechnology: a comprehensive treatise; Microbial transformations. Ed. Verlag Chemie, Weinheim. 6a.
- RIEMANN J., SCHEIBLE E., 1969. Der Einfluss von Infektionen der Würze bzw. des Bieres auf den Geruch und Geschmack des Bieres. *Brauwelt* **109**: 1074-1080.
- RICHARDS M., 1968. The incidence and significance of wild *Saccharomyces* contaminants in the brewery. *J. Inst. Brew.* **73**: 433-435.
- ROGOSA M., 1974. Gram-negative anaerobic cocci. Genus III *Megasphaera*. In : R. E. Buchanan, et N. E. Gibbons (ed.), *Bergey's manual of determinative bacteriology*, pp. 448-449.

ROGOSA M., 1984. Anaerobic Gram-negative cocci. Genus III *Megasphaera*, In : N. R. Holt (ed.), Bergey's manual of systematic bacteriology, vol. 1., Williams et Wilkins, Baltimore, p.685.

RUSSEL C., HETARI R. R., WALKER T. K., 1954. Vitamin requirements of thirty-four lactic acid bacteria associated with brewery products. *J. Gen. Microbiol.* **10**: 371-376.

SCHIMWELL J.L., 1948. A study of ropiness in beer. Part II. Ropiness due to tetrad forming cocci. *J. Inst. Brew.* **54**: 237-244.

SCHLEIFER K. H., CENTERITZ M., WEISS N., LUDWIG W., KIRCHOF G., SEIDEL-RÜFER H., 1990. Taxonomic study of anaerobic, gram-negative, rod shaped bacteria from breweries : emended description of *Pectinatus cerevisiophilus* and description of *Pectinatus frisingensis* sp. nov., *Selenomonas lacticifex* sp. nov., *Zymophilus raffinovorans* gen. nov., sp. nov. and *Zymophilus paucivorans* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **40**: 19-27.

SCHMID C. F., 1957. Thermal resistance of micro-organisms. In Antiseptics, Disinfectants, Fungicides and Sterilization. (2nd edition). (ed.) Reddish, G. F. Philadelphia : Lea and Febiger.

SCRIBAN., 1995. Biotechnologie, 4ème édition. Tec. et Doc. Lavosier. 293-295.

SEIDEL H., BACK W., WEISS N., 1979. Isolierung und systematische Zuordnung bierschädlicher gramnegativer Bakterien III: Welche Gefahr stellen die in den beiden vorausgegangenen Mitteilungen vorgestellten gramnegativen Kokken und Stäbchen für das Bier dar. *Monatsschrift für Brauwissenschaft* **32**: 262-270.

SEIDEL H., 1989. *Pectinatus* und etere morphologisch ähnliche gram-negative, anaerobe Stäbchen aus dem Brauereibereich. *Monatsschrift für Brauwissenschaft* **11**: 428-429.

SEIDEL H., 1990. *Pectinatus* und etere morphologisch ähnliche gram-negative, anaerobe Stäbchen aus dem Brauereibereich. *Monatsschrift für Brauwissenschaft* **3**: 101-105.

SKERMAN V. R., MC GOWAN D. V., SNEATH P. H. A., 1980. Approved lists of bacterial names. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **30**: 341.

- SOBERKA R., WARZECHA A., 1986. Influence de certains facteurs sur le taux d'oxygène dissous au cours de la fabrication de la bière. *Bioscience* **17**: 31-40.
- SOBERKA R., SCIAZKO D., WARZECHA A., 1988. *Pectinatus*: nouvelle bactérie pouvant affecter la stabilité biologique du moût et de la bière. *Bioscience* **19**: 31.
- SOBERKA R., SCIAZKO D., WARZECHA A., 1989. *Pectinatus*: nouvelle bactérie pouvant affecter la stabilité biologique du moût et de la bière. *Bioscience* **20**: 51-59.
- SOLBERG O., CLAUSEN O. G., 1973. Classification of certain *Pediococci* isolated from brewery products *J. Ind. Brew.* **79**:227-230.
- SPICHER G., RABE E., SOMMER R., STEPHAN H., 1982. Die Mikroflora des Sauerteiges. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung* **174**: 222-227.
- STRANDSKOV F. B., BAKER H. W., BOCKELMANN J. B., 1953 A study of the Gramnegative bacterial rod infection of brewery yeast and brewery fermentation. *Wallerstein Lab. Commun.* **16**:261-270.
- TAKAHASHI N., 1983. Presumed *Pectinatus* strain isolated from Japanese beer. *Bulletin of Brew. Sci.* **28**:11-14.
- THOLOZAN J.L., GRIVET J.P. VALLET C., 1994. Metabolic pathway to propionate of *Pectinatus frisingensis*, a strictly anaerobic beer-spoilage bacterium. *Arch. Microbiol.* **921**: 1-8.
- THOMAS M., COLE J. A., HOUGH J. S., 1972. Biochemical physiology of *Obesumbacterium proteus*, a common brewery contaminant *J. Inst. Brew.* **78**: 332-339.
- TSANG E. W. T., INGLEDEW W. M., 1982. Studies on the heat resistance of wild yeasts and bacteria in beer. *Am. Soc. Brew. Chem.* **40**: 1-8.
- VAN ENGEL E. L., 1971. *Pediococcus cerevisiae* in fermentation *Proc. Am. Soc. Brew. Chem.* 89-95.

VAN VUUREN H. J. J., KERSTERS K., DE LEY K., TOERIEN D. F., MEISEL R., 1978. *Enterobacter agglomerans* - a new contaminant isolated from lager beer breweries. *J. Inst. Brew.* **84**: 315-317.

VAN VUUREN H. J. J., COSSER K., PRIOR B. A., 1980. The influence of *Enterobacter agglomerans* on beer flavour. *J. Inst. Brew.* **86**:31-33.

VERACHTERT H., DAWOUD E., SHANTA KUMARA H.M.C., 1989. Interaction between *Enterobacteriaceae* and *Saccharomyces cerevisiae* during wort fermentation. Seventh international symposium on yeasts, pp. 67-72.

VERDUYN C., POSTMA E., SCHEFFERS W. A., VAN DIJKEN J. P., 1990. Physiology of *Saccharomyces cerevisiae* in anaerobic glucose-limited chemostat cultures. *J. Gen. Microbiol.* **136**: 395-403.

WACKERBAUER K., EMEIS C. C., 1968 Über die bierschädlichen Bakterien der Gattung *Lactobacillus* (Biermilchsäurestäbchen). II. Physiologische Untersuchungen an Laaktobazillen. *Monatsschrift für Brauwissenschaft.* **21**:328-333.

WACKERBAUER K., EMEIS C. C., 1969 Über die bierschädlichen Bakterien der Gattung *Lactobacillus* (Biermilchsäurestäbchen). III. Der Nachweis der bierschädlichen Laktobazillen in der Brauereibetriebskontrolle. *Monatsschrift für Brauwissenschaft* **22**: 3-8.

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

WATIER D., 1994. Etude de la croissance de la résistance de *Pectinatus* et *Megasphaera*, bactéries anaérobies strictes, contaminants de la bière, p. 146.

WATIER D., LEGUERINEL I., HORNEZ J. P., CHOWDHURY I., DUBOURGUIER H. C., 1995. Heat resistance of *Pectinatus* sp, a beer spoilage anaerobic bacterium. *J. Appl. Bacteriol.* **78**: 164-168.

WATIER D., CHOWDHURY I., LEGUERINEL I., HORNEZ J. P., 1996. Survival of *Megasphaera cerevisiae* heated in laboratory media, wort and beer. *Food Microbiol.* **13**: 205-212.

WEISS N., SEIDEL H., BACK W., 1979. Isolierung und systematische Zuordnung bierschädlicher gramnegativer Bakterien. I: Gramnegative strikt anaerobe Kokken. *Monatsschrift für Brauwissenschaft* **32**: 189-194.

WEST D.B., LAUTENBACH A.F., BRUMSTED D.D., 1963. Phenolic characteristics in brewing. *Proc. Am. Soc. Brew.Chem.* 194-199.

WILES A.E., 1954. The wild yeast problem as a fact of brewing technology. Wellerstein Lab.. *Commun.* **17**: 259-281.

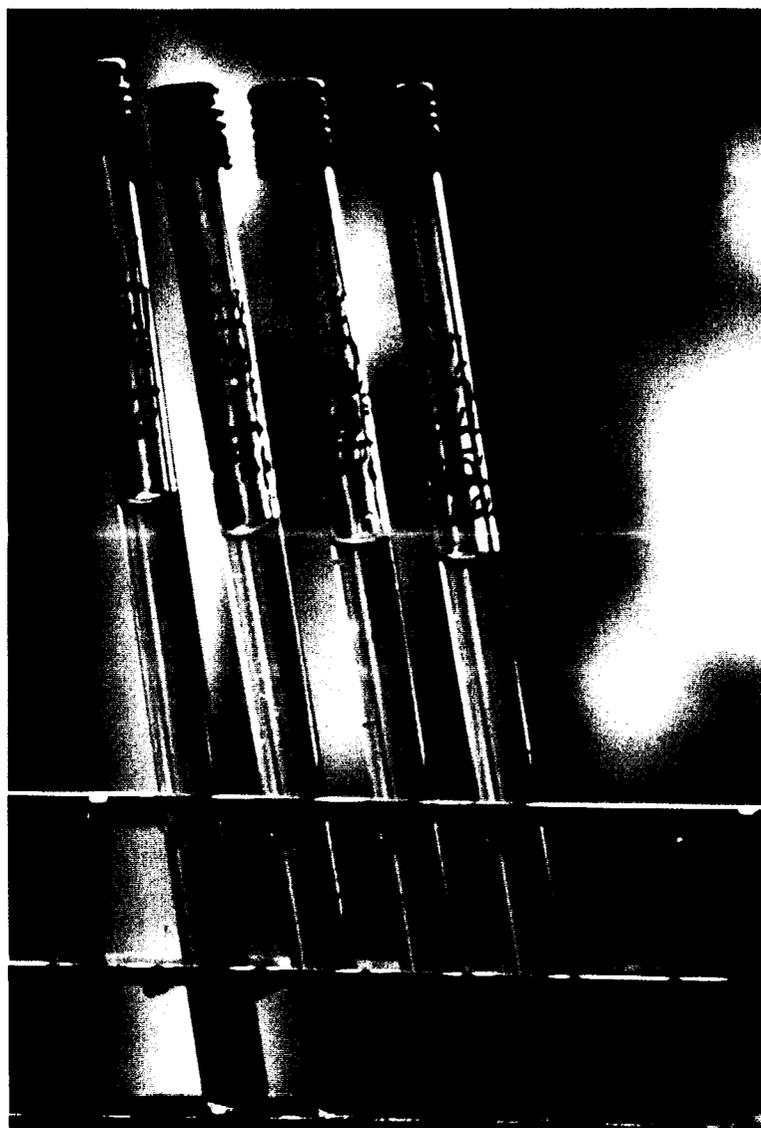
WILES A.E., 1961. The wild yeasts. *Brew. Dig.* **36**: 40-46.

WOOD B. J. B., RAINBOW C., 1961. The maltophosphorylase of beer *Lactobacilli*. *Biochem. J.* **78**:204-209.

YOUNG G., KRASNER R. I., YUDKOFISKY P.L., 1958. Interactions of oral strain of *Candida albicans* and *Lactobacilli*. *J. Bacteriol.* **75**: 525-529.

**ANNEXES**

Annexe 1



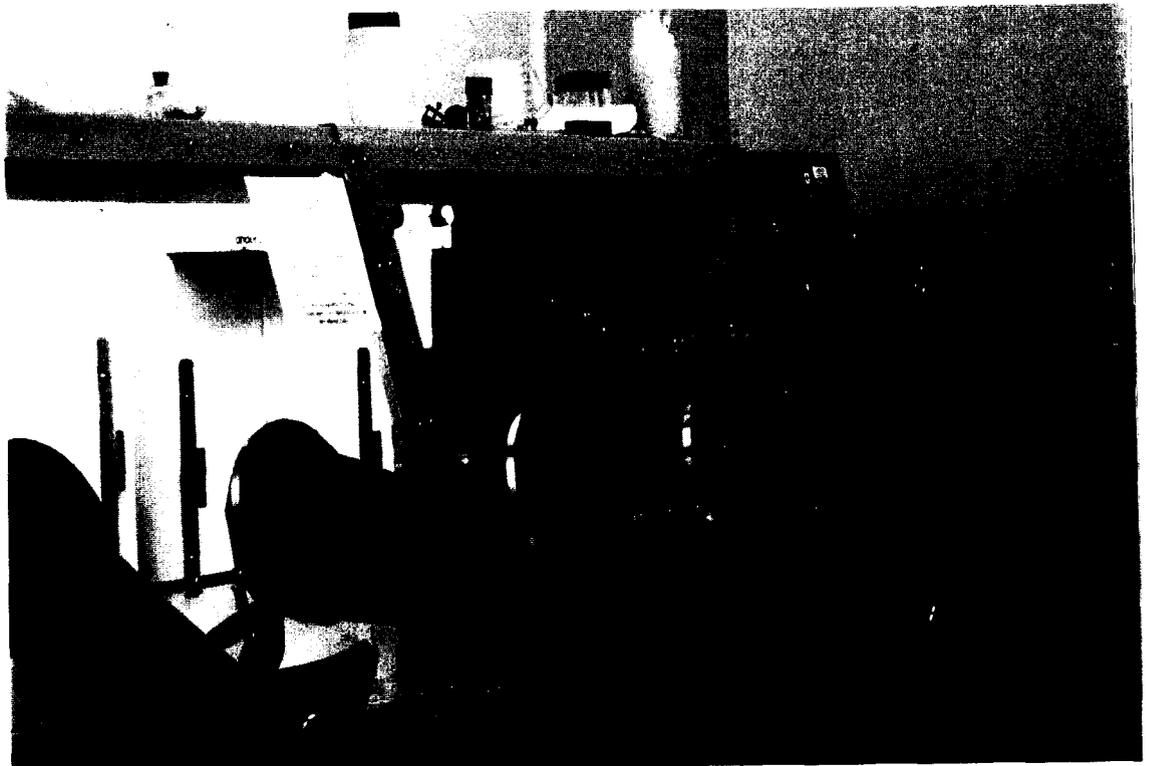
Tube de Félix utilisé pour dénombrement des bactéries survivantes.

Annexe 2



Biophotomètre S.L.E.L O1V. (Société Lilloise d'Equipement de Laboratoire)

Annexe 3



Station Anaérobie (Forma Scientifique)

Annexe 4



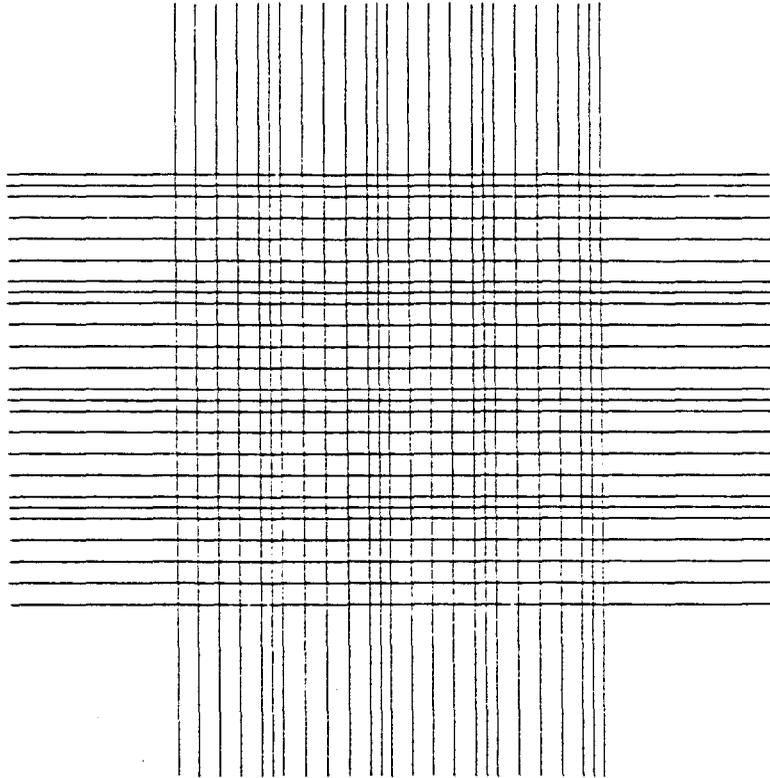
Fermenteurs avec échantillonneur automatique Samplor-F, SGI

Annexe 5



Chaîne H.P.L.C. Kontron 360

Annexe 6



Répresentation du quadrillage d'une cellule de Thoma. Surface  $1\text{mm}^2$ .  
Profondeur de hématimètre: 0,1 mm

Annexe 7

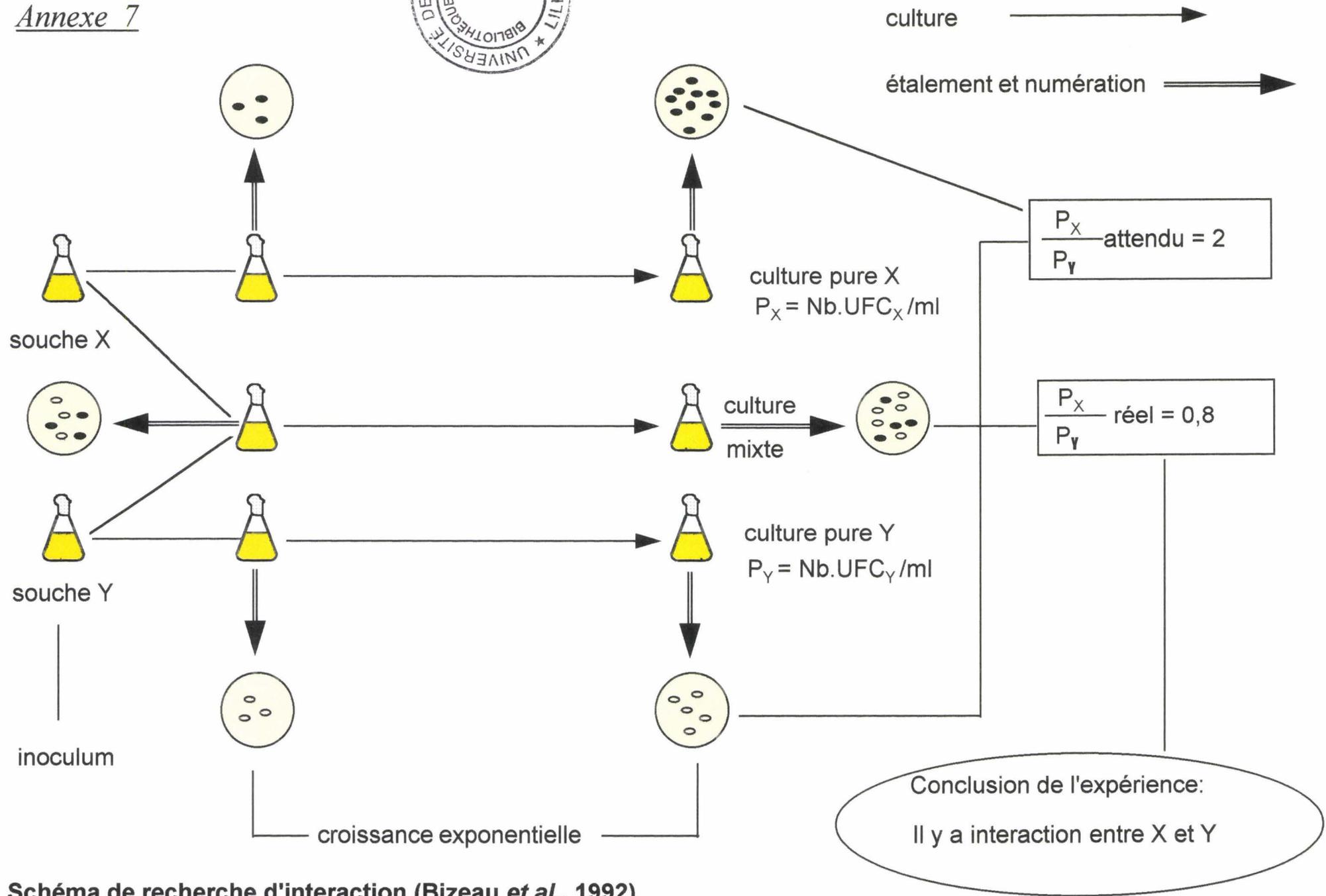


Schéma de recherche d'interaction (Bizeau et al., 1992)