

Modélisation de la croissance de la levure d'altération *Candida holmii* dans le jus d'ananas

Jean Tchango Tchango, Thomas Njiné, Jean-Pierre Hornez, Roger Tailliez

Les levures sont souvent mises en cause dans l'altération des aliments et des boissons à teneur en sucres élevée et à pH bas [1]. Des levures appartenant aux genres *Candida* et *Saccharomyces* ont été isolées des jus d'ananas et des nectars de goyave, de grenadille et de pomelo produits au Cameroun [2]. Des espèces appartenant aux genres *Candida*, *Pichia* et *Saccharomyces* sont fréquentes dans les jus d'orange produits au Nigeria [3]. Ces micro-organismes d'altération sont généralement responsables de la mauvaise qualité marchande et des pertes importantes de produits au cours du stockage.

Les progrès dans le domaine de la microbiologie prédictive ont permis de développer des modèles mathématiques décrivant le comportement des micro-organismes dans les aliments [4, 5], tout en prédisant la durée de vie et la salubrité des denrées alimentaires au cours du temps [6-8]. Le recours à la turbidimétrie ou à la conductimétrie [9] semble bien adapté à de telles études et des modèles prédictifs de crois-

sance ont été développés pour des levures d'altération dans le nectar de goyave [10, 11]. Ils ne sont cependant pas applicables aux jus d'ananas et aux autres nectars de fruits plus riches en sucres fermentescibles et en facteurs de croissance que le nectar de goyave [12].

Le présent travail développe un modèle mathématique permettant de prédire, en fonction du pH du produit et de la température de stockage, la croissance des levures d'altération dans le jus d'ananas ou autres jus et nectars de fruits riches en sucres fermentescibles.

Ce travail a été réalisé au Laboratoire de microbiologie de l'université des sciences et technologies de Lille 1 (France). Les levures ont été isolées de jus d'ananas, de nectars de goyave et de grenadille pasteurisés issus des stocks commerciaux de la Société agro-industrielle des fruits de l'Ouest (SAIFO) au Cameroun, et ayant subi une fermentation au cours de la conservation. Avec le concours du service d'aide au diagnostic de Biomérieux (France), elles ont été identifiées à l'aide des galeries ID 32 C comme *Candida holmii* ($p = 0,991$), *Candida pelliculosa* ($p = 0,999$) et *Kloeckera apis* ($p = 0,999$) [13].

Le milieu de culture était constitué du jus d'ananas commercial (pH = 3,95) débarrassé des particules solides par centrifugation à 10 000 t/min pendant 30 minutes, puis ajusté à différentes valeurs de pH à l'aide de solutions d'acide citrique à 20 % ou de soude 2N, suivi de la stérilisation à 110 °C pendant 30 minutes. Une pré-culture de *C. holmii* servant d'inoculum a été effectuée

dans le surnageant de jus d'ananas commercial stérilisé, avec incubation à 32 °C pendant 72 heures. La culture proprement dite a été réalisée dans des flacons en verre stérilisés contenant 50 ml de milieu de culture inoculé avec environ 5×10^6 UFC.ml⁻¹ de *C. holmii* issues de la pré-culture. Les flacons ont ensuite été hermétiquement fermés et incubés à différentes températures. La densité optique (DO) a été mesurée régulièrement à 630 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (Unikon 940, Kontron Instruments, États-Unis), en prélevant 1 ml du contenu de chaque flacon après homogénéisation par agitation manuelle.

Les cinétiques de croissance réalisées selon un plan factoriel (deux répétitions) à 2, 5, 10, 15, 25, 32, 35 et 37 °C pour des valeurs de pH de 2,00, 2,50, 3,15, 4,00, 5,00, 6,25 ont permis de construire un modèle mathématique donnant la densité optique maximale (DO max.) en fonction du pH initial du milieu (variable P) et de la température de stockage (variable T en °C).

L'analyse statistique des résultats a été réalisée à l'aide de la version 5,0 du logiciel Stat-Itcf (Institut technique des céréales et de fourrages, France). La validation du modèle a été effectuée avec les données issues de l'étude de la croissance à différentes températures de *C. holmii*, *C. pelliculosa* et *K. apis* dans le jus d'ananas (pH = 3,95) et le nectar de grenadille (pH = 3,03) commerciaux.

Une régression exponentielle a permis de définir la relation suivante entre le nombre de cellules viables (UFC.ml⁻¹) et la densité optique (DO) :

J. Tchango Tchango : Laboratoire de technologie post-récolte, Centre régional de recherches sur bananiers et plantains (CRBP) de Njombe, BP 832 Douala, Cameroun.

T. Njiné : Laboratoire de biologie générale, Faculté des sciences, Université de Yaoundé 1, BP 812, Yaoundé, Cameroun.

J.-P. Hornez, R. Tailliez : Laboratoire de microbiologie, Université des sciences et technologies de Lille 1, bâtiment SN2, 59655 Villeneuve-d'Ascq cedex, France.

Tirés à part : J. Tchango Tchango

$$\ln(\text{UFC.ml}^{-1} \text{ de } C. \text{ holmii}) = 15,1584 \cdot \exp[1,1829 \ln(\text{DO})]$$

$$(r^2 = 0,998, \text{ddl} = 8)$$

L'équation mathématique obtenue après modélisation de la croissance de la levure dans le jus d'ananas à différentes valeurs de pH et de température de stockage est la suivante :

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

$$(r^2 = 0,96, \text{ddl} = 96)$$

La représentation graphique de cette équation mathématique (figure 1) montre que la valeur la plus élevée de la densité de population de *C. holmii* prédite par le modèle (DO max. de 2,34) est d'environ $49 \times 10^6 \text{ UFC.ml}^{-1}$ à pH 5,00 et à la température de stockage de 30 °C. Un bon ajustement a été obtenu entre les valeurs expérimentales de densité optique maximale et celles prédites par le modèle (figure 2). D'autres cinétiques de croissance de *C. holmii* dans le jus d'ananas (pH = 3,95) et le nectar de grenadille (pH = 3,03) commerciaux stockés à 2, 5, 10, 15, 20, 25, 32, 35 et 37 °C (2 répétitions) ont permis de valider le modèle (tableau). Les cinétiques de croissance de *C. pelliculosa* et *K. apis* dans ces deux boissons stockées à 20, 25, 32, 35 et 37 °C (2 répétitions) permettent également de valider le modèle, quoique les valeurs de DO maximale obtenues avec *K. apis* dans le nectar de

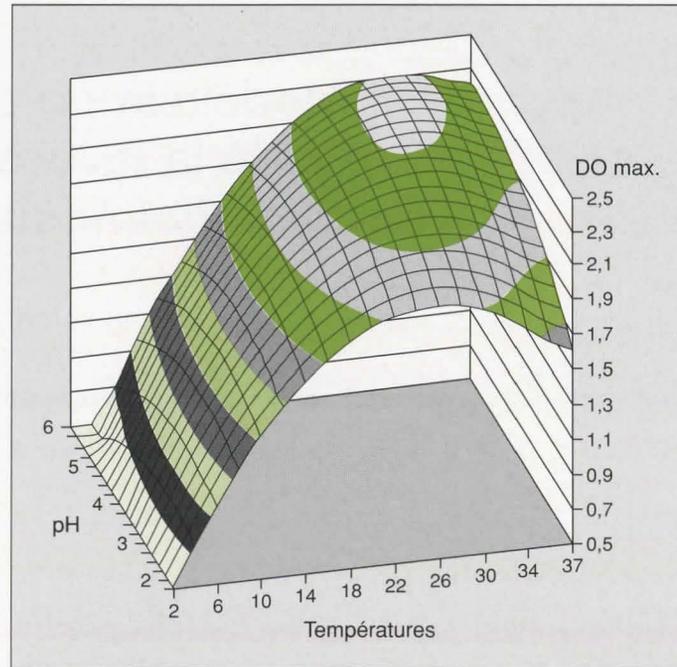


Figure 1. Courbes modélisées de la croissance de *Candida holmii* dans le jus d'ananas à différentes valeurs de pH et de température de stockage.

Figure 1. Predicted growth curves for *Candida holmii* in pineapple juice under different pH and storage temperature conditions.

grenadille soient inférieures à celles prédites par le modèle (tableau).

Discussion et conclusion

Le choix de la densité optique maximale (et non du taux maximal de croissance) comme paramètre de modélisation rend possible la comparaison avec les normes

microbiologiques des jus et nectars de fruits. Le facteur temps n'a pas été pris en compte dans le modèle, dans la mesure où les densités maximales de populations de levures sont atteintes en moins d'une semaine, période plus courte que la durée moyenne de stockage observée dans l'industrie avant la commercialisation des produits. La très forte croissance des levures avec production de gaz dans le jus d'ananas et le nectar de grenadille, plus riches en sucres fermentescibles que le nectar de goyave [12], a rendu impossible une culture

Tableau

Validation du modèle mathématique de croissance de *Candida holmii* dans le jus d'ananas, appliqué à la croissance de *Candida holmii*, *Candida pelliculosa* et *Kloeckera apis* dans le jus d'ananas (pH = 3,95) et le nectar de grenadille (pH = 3,03) commerciaux stockés à différentes températures

Température de stockage (°C)	DO max. prédite par le modèle de croissance de <i>C. holmii</i> dans le jus d'ananas	DO max. expérimentale dans le jus d'ananas			DO max. expérimentale dans le nectar de grenadille		
		<i>C. holmii</i>	<i>C. pelliculosa</i>	<i>K. apis</i>	<i>C. holmii</i>	<i>C. pelliculosa</i>	<i>K. apis</i>
2	0,5131	0,5008	–	–	0,5791	–	–
5	0,8949	0,8897	–	–	0,8697	–	–
10	1,4272	1,4194	–	–	1,3886	–	–
15	1,7594	1,7589	–	–	1,7089	–	–
20	2,1018	2,1109	2,0081	–	2,0299	2,0543	–
25	2,2442	2,5356	2,5027	2,4010	2,2219	2,2775	1,8656
32	2,2250	2,4085	2,3434	2,4226	2,2030	2,2292	1,6561
35	2,1388	2,3547	2,2896	2,0547	1,9392	2,2088	1,3144
37	2,0220	2,2356	2,2440	2,1891	2,0096	2,1258	1,5137

Validation of the mathematical model for *Candida holmii* growth in pineapple juice, as applied to *Candida holmii*, *Candida pelliculosa* and *Kloeckera apis* growth in commercial pineapple juice (pH 3.95) and passion fruit nectar (pH 3.03) at different storage temperatures

Summary

Modelling growth of the spoilage yeast *Candida holmii* in pineapple juice

J. Tchango Tchango, T. Njiné, J.-P. Hornez, R. Tailliez

Yeasts and mould are the most important spoilage microorganisms in beverages with high levels of sugar and low pH. The use of turbidity or other rapid microbiology methods such as indirect conductimetry seems to be convenient for monitoring yeast activity and generating data to be used in predictive models for the growth of food and beverage spoilage yeasts as a function of different environmental conditions. Our study established a mathematical model for predicting the growth of *Candida holmii* in pineapple juice, as a function of pH and storage temperature. The spoilage yeasts used for the study were isolated from pasteurized pineapple juice, guava and passion fruit nectars produced at the industrial level in Cameroon, and identified as *Candida holmii* ($p = 0.991$), *Candida pelliculosa* ($p = 0.999$) and *Kloeckera apis* ($p = 0.999$) using Biomérieux ID 32 strips.

A factorial design was used to determine the effects and interactions of pH and storage temperature on *Candida holmii* growth in pineapple juice. The growth kinetics were established in duplicate, in pineapple juice adjusted to different pH levels (2.00, 2.50, 3.15, 4.00, 5.00 and 6.25) with 20% citric acid or 2 N NaOH, and stored at different temperatures (2, 5, 10, 15, 25, 32, 35 and 37°C). Growth was estimated by measuring the optical density at 630 nm using a spectrophotometer. A quadratic polynomial model was constructed to predict the effects and interactions of pH and temperature on maximal optical density ($r^2 = 0.96$; Figure 1). The relationship between optical density and *Candida holmii* population density (CFU.ml⁻¹) was also established using an exponential regression ($r^2 = 0.998$). According to the model maximal growth conditions were 30°C and pH 5 for a maximum optical density of 2.34 (about 49.10⁶ CFU.ml⁻¹). The model provided a close fit between predicted and observed maximum optical density values (figure 2). The model was validated (Table 1) with experimental maximum optical density values obtained with *C. holmii*, *C. pelliculosa* and *K. apis* in commercial pineapple juice (pH 3.95) and passion fruit nectar (pH 3.03).

This type of model could be useful in industries for predicting storage periods for foods and beverages, along with expiry dates for these products.

Cahiers Agricultures 2000 ; 9 : 55-8.

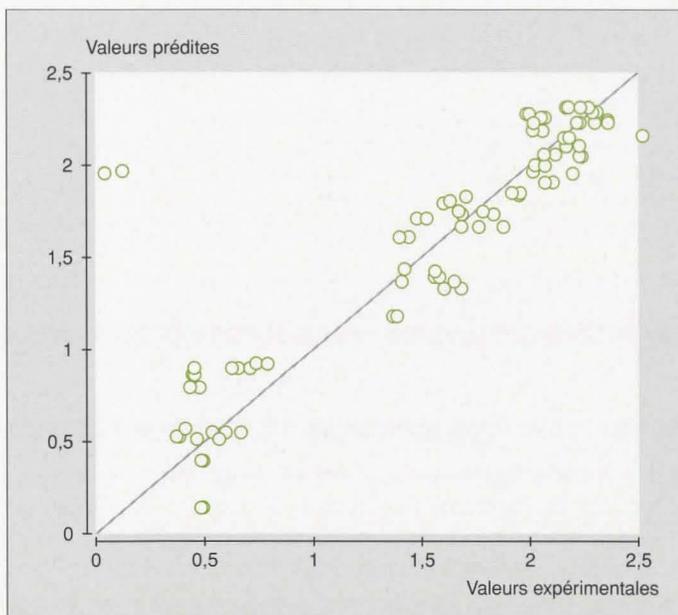


Figure 2. Ajustement entre les valeurs expérimentales et les valeurs de densité optique maximale prédites par le modèle de croissance de *Candida holmii* dans le jus d'ananas à différentes valeurs de pH et de température de stockage.

Figure 2. Adjustment between observed and predicted maximum optical density values obtained for *Candida holmii* growth in pineapple juice under different pH and storage temperature conditions.

directe de ces levures dans les cuves pour spectrophotomètre, comme pour l'étude de la croissance de *C. pelliculosa* et *K. apis* dans le nectar de goyave [10, 11]. Le modèle construit prévoit des interactions entre la température de stockage et le pH initial de la boisson comme dans le cas du modèle de croissance de *C. pelliculosa* dans le nectar de goyave [11]. Les modèles multifactoriels donnent généralement un bon ajustement entre les valeurs prédites et les valeurs expérimentales, mais deviennent très complexes et fragiles lorsque le nombre de facteurs étudiés est très élevé [14]. D'après le modèle construit, il y a toujours croissance de la levure dans la boisson en cas de contamination, et il est dès lors fortement déconseillé aux producteurs de jus et nectars de fruits qui ne pasteurisent pas leurs produits de les conserver plus de 12 heures après la fabrication, même aux températures habituelles de réfrigération. Le seul moyen de conserver les bonnes qualités microbiologiques et marchandes des jus et nectars de fruits serait une pasteurisation efficace associée à un conditionnement rigoureusement aseptique, qui limiterait tout risque de recontamination des produits.

Ces types de modèles pourraient être conseillés pour la détermination des durées prévisibles de conservation des boissons ou d'autres denrées alimentaires, ainsi que leur date limite de consommation (DLC) ■

Remerciements

Ce travail a été réalisé grâce à une bourse d'excellence post-doctorale de l'Agence francophone pour l'Enseignement supérieur et la Recherche (AUF-UREF), ainsi qu'à l'appui financier de l'Institut de la recherche agricole pour le développement (IRAD) et du ministère de la Recherche scientifique et technique (MINREST) du Cameroun. Les auteurs remercient également Madame Catherine Bissuel du service d'aide au diagnostic de Biomérieux à la Balme-les-Grottes (France) pour sa contribution à l'identification des souches de levures.

Références

1. Deak T. Foodborne yeasts. *Adv Appl Microbiol* 1991 ; 36 : 179-278.
2. Tchango Tchango J, Njiné T, Tailliez R. Qualité microbiologique de jus et nectars de fruits exotiques. *Microbiol Alim Nutr* 1992 ; 10 : 199-206.
3. Efiuvwevwere BJO, Oyelade JA. Biodeteriorative and physico-chemical changes in modified atmosphere packaged oranges and the microbial quality of preserved and unpreserved juices. *Trop Sci* 1991 ; 31 : 325-33.

4. Buchanan RL. Predictive food microbiology. *Trends Food Sci Technol* 1993 ; 4 : 6-11.
5. Dodds KL. An introduction to predictive microbiology and the development and use of probability models with *Clostridium botulinum*. *J Ind Microbiol* 1993 ; 12 : 139-43.
6. Labuza TP, Fu B. Growth kinetics for shelf-life prediction : theory and practice. *J Ind Microbiol* 1993 ; 12 : 309-23.
7. McMeekin T, Ross T, Olley J. Application of predictive microbiology to assure the quality and safety of fish and fish products. *Int J Food Microbiol* 1993 ; 15 : 13-32.
8. Rowe MT. Predictive microbiology : uses for assessing quality and safety of dairy products. *J Ind Microbiol* 1993 ; 12 : 330-6.
9. Deak T, Beuchat LR. Use of indirect conductivity for predicting growth of food spoilage yeasts under various environmental conditions. *J Ind Microbiol* 1993 ; 12 : 301-8.
10. Tchango Tchango J, Watier D, Eb P, Tailliez R, Njiné T, Hornez JP. Prédiction des risques de développement des levures d'altération dans les jus et nectars de fruits exotiques : cas de *Kloeckera apis* dans le nectar de goyave. *Sci Alim* 1996 ; 16 : 653-8.
11. Tchango-Tchango J, Watier D, Eb P, Tailliez R, Njiné T, Hornez JP. Modeling growth for predicting the contamination level of guava nectar by *Candida pelliculosa* under different conditions of pH and storage temperature. *J Ind Microbiol Biotechnol* 1997 ; 18 : 26-9.
12. Favier JC, Ireland-Ripert J, Laussucq C, Feinberg M. *Répertoire général des aliments – Tome 3 – Table de composition des fruits exotiques, fruits de cueillettes d'Afrique*. Paris : Technique et Documentation Lavoisier, 1993 : 3-38.
13. Tchango Tchango J, Njiné T, Eb P, Tailliez R, Hornez JP. Identification et croissance de certaines levures d'altération dans les jus et nectars de fruits tropicaux. *Fruits* 1998 ; 53 : 119-26.
14. Bratchell N, Gibson AM, Truman M, Kelly TM, Roberts TA. Predicting microbial growth : the consequences of quantity of data. *Int J Food Microbiol* 1989 ; 8 : 47-58.