



HAL
open science

Optimisation d'un procédé par CO₂ pressurisé pour la pasteurisation et la préservation de compléments alimentaires liquides

Christelle Fleury

► **To cite this version:**

Christelle Fleury. Optimisation d'un procédé par CO₂ pressurisé pour la pasteurisation et la préservation de compléments alimentaires liquides. Génie des procédés. Université de Bordeaux, 2017. Français. NNT : 2017BORD0595 . tel-01824027

HAL Id: tel-01824027

<https://theses.hal.science/tel-01824027v1>

Submitted on 26 Jun 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE PRÉSENTÉE

POUR OBTENIR LE GRADE DE

**DOCTEUR DE
L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX**

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUES

SPÉCIALITÉ : Génie des procédés

Par Christelle FLEURY

**Optimisation d'un procédé par CO₂ pressurisé pour la
pasteurisation et la préservation de compléments
alimentaires liquides**

Sous la direction de : Pascale SUBRA-PATERNAULT

Soutenue le 24 Mai 2017 devant le jury composé de :

Elisabeth BADENS	Professeur Université de Aix Marseille	Rapporteur
Didier MONTET	Directeur de Recherches CIRAD	Rapporteur
Pascale SUBRA-PATERNAULT	Directeur de Recherches Université de Bordeaux	Directeur de thèse
Jean-Louis LANOISELLÉ	Professeur Université de Bretagne Sud	Président du jury
Florence JUDE-LEMEILLEUR	Maître de conférences Université de Bordeaux	Examineur
Abdessattar HADJ-SASSI	Maître de conférences Bordeaux INP	Invité
Raphaëlle SAVOIRE	Maître de conférences Bordeaux INP	Invité

Remerciements

Je tiens à remercier **Thierry THOUPANCE** qui a su se montrer concerné par ma situation exceptionnelle. Je suis aussi reconnaissante à **Erick DUFROUC** de m'avoir accueillie au sein du CBMN et d'avoir fait le nécessaire pour que ma thèse puisse se poursuivre.

Je souhaite remercier **Elisabeth BADENS** (Université d'Aix-Marseille) ainsi que **Didier Montet** (CIRAD) pour avoir accepté la fonction de rapporteur. Mes remerciements vont également à **Jean-Louis LANOISELLE** (Université de Bretagne Sud) qui a accepté d'endosser la fonction de président du jury. Je remercie enfin **Florence JUDE-LEMEILLEUR** (Université de Bordeaux) d'avoir accepté d'examiner mon travail, mais qui n'a malheureusement pu être présente le jour de ma soutenance.

Quelques mots pour **Pascale SUBRA-PATERNAULT** qui a été une encadrante très forte, qui s'est démenée jusqu'au bout pour valoriser ma thèse et me permettre de la mener à bien. Je souhaite remercier très sincèrement **Raphaëlle SAVOIRE** pour son encadrement efficace et sa disponibilité. Je suis également contente d'avoir pu compter **Abdessattar HADJ-SASSI** parmi mes encadrants, notamment pour la partie microbiologie.

Je remercie **Alain BRISSON** ainsi que les membres de son équipe pour notre collaboration autour de la microscopie, de même qu'**Arnaud ERRIGUIBLE** pour les simulations numériques qu'il a menées pour ma thèse ainsi que **Serge LAUGIER** pour son expertise en thermodynamique.

J'ai énormément apprécié mon environnement de travail et mes collègues alors je leur adresse un grand merci : **Christelle, Claude, Julien, Etienne, Tiphaine, Emilie D., Clémence, Laurence, Arthur, Rafael ...** Et je ne peux pas faire l'impasse sur mes amis qui m'ont entourée de près ou de loin au cours de ces années passées : **Marie, Yoann, Damien, Emilie P., Audrey, Sokha, Julie, Dounia, Alexandre** et tous ceux de l'**ADoC** !

Pour terminer, j'adresse toute mon affection et ma tendresse à ma famille. Je ne remercierai jamais assez **ma mère** pour son soutien sans faille. Merci de m'avoir accueillie à bras ouverts en Normandie à chaque fois que j'en ai eu besoin pour me ressourcer. J'ai une petite pensée pour **mon père** et sa présence discrète. Enfin, merci à **Jérémy** de m'avoir épaulée et de s'être montré aussi patient et compréhensif pendant que je subissais les affres de la rédaction.

Tomber sept fois, se relever huit.

Proverbe japonais

A vaincre sans péril, on triomphe sans gloire.

Corneille, *Le Cid*

Sommaire

Remerciements	5
Sommaire	9
Liste des abréviations	15
Liste des Tableaux	19
Liste des figures	25
Introduction	35
Partie I : Etude bibliographique	45
1. Compléments alimentaires	51
1.1. <i>Marché des compléments alimentaires</i>	51
1.2. <i>Définition officielle et législation</i>	52
1.3. <i>Production des compléments alimentaires</i>	53
2. Pasteurisation	55
2.1. <i>Agents microbiens de la contamination alimentaire</i>	56
2.2. <i>Techniques d'assainissement, stabilisation et conservation</i>	60
2.3. <i>Grandeurs comparatives</i>	71
2.4. <i>Et pour les compléments alimentaires ?</i>	72
3. Molécules bioactives d'intérêt	73
3.1. <i>Vitamines</i>	73
3.2. <i>Minéraux et oligo-éléments</i>	75
3.3. <i>Polyphénols</i>	76
3.4. <i>Impact des traitements sur les composés d'intérêt</i>	78
4. Pasteurisation par fluides supercritiques	81
4.1. <i>Fluides supercritiques</i>	81
4.2. <i>CO₂ pressurisé et pasteurisation</i>	82
4.3. <i>Facteurs d'influence</i>	85
4.4. <i>Mécanismes et cinétique d'inactivation</i>	93
4.5. <i>Equipements et brevets</i>	96
5. Conclusion	98
Partie II : Matériel et méthodes	103

1. Matériel	107
1.1. Microbiologie	107
1.2. Matières premières	108
1.3. Molécules, réactifs et solutions pour les dosages	110
1.4. Autres produits.....	110
2. Préparation des matériels biologiques.....	110
2.1. Préparation des milieux de culture.....	110
2.2. Mise en culture.....	111
2.3. Préparation des milieux pour le dénombrement.....	113
3. Préparation des échantillons à traiter	114
4. Dispositifs expérimentaux utilisés	114
4.1. Dispositif dit batch	114
4.2. Dispositif batch de plus grand volume	116
4.3. Dispositif continu.....	118
5. Caractérisation	120
5.1. Aspect microbiologique	120
5.2. Méthodes analytiques.....	122

Partie III : Résultats et discussion..... 133

Chapitre 1 : Etude préliminaire de l'acidification d'un milieu aqueux en présence de CO₂ et de la résistance au pH des microorganismes 141

1. Equilibres de dissolution	145
2. Acidification des milieux aqueux.....	146
2.1. Protocole et conditions étudiées	146
2.2. Analyse des résultats.....	147
3. Comportement du complément alimentaire	151
4. Durée de retour au pH initial après traitement.....	152
5. Effet du pH sur les microorganismes.....	154
6. Conclusion	156

Chapitre 2 : Pasteurisation du complément alimentaire : facteurs influents, optimisation des conditions opératoires et analyse des modifications structurales des microorganismes

159

1. Recherche des facteurs influents	163
1.1. Stratégie expérimentale	163
1.2. Structuration du plan d'expériences.....	164
1.3. Choix des niveaux de facteurs	165

1.4.	<i>Méthode d'analyse des plans d'expériences</i>	166
1.5.	<i>Analyse du plan d'expériences</i>	167
1.6.	<i>Optimisation mathématique</i>	176
1.7.	<i>Conclusions du plan d'expériences</i>	179
2.	Optimisation des conditions opératoires	180
2.2.	<i>Optimisation par itérations</i>	180
2.3.	<i>Cycles de pression</i>	182
2.4.	<i>Conclusion sur la recherche de l'amélioration des conditions</i>	186
3.	Effet de la température et de la pression sans CO ₂	186
3.1.	<i>Essais sous N₂ et en Air</i>	187
4.	Impact du traitement sur la structure des microorganismes.....	190
4.1.	<i>Impact sur la membrane cellulaire</i>	190
4.2.	<i>Impact sur l'ultrastructure</i>	192
5.	Mise en évidence de l'effet conjoint T / pH	196
6.	Conclusion	198

Chapitre 3 : Analyse de la pasteurisation sous l'angle des temps caractéristiques et des transferts de matière **201**

1.	Relation entre les mécanismes d'inactivation et la diffusion du CO ₂ dans le milieu.....	205
2.	Grandeurs caractéristiques liées au transfert de masse du CO ₂	208
2.1.	<i>Flux à l'interface</i>	208
2.2.	<i>Nombres et grandeurs caractéristiques d'un réacteur agité</i>	210
2.3.	<i>Paramètres physico-chimiques invariants</i>	212
2.4.	<i>Influence du choix de la corrélation sur la cinétique de dissolution estimée</i>	214
2.5.	<i>Etude de sensibilité</i>	217
3.	Les dispositifs batch	224
3.1.	<i>Caractéristiques des deux dispositifs batch</i>	224
3.2.	<i>Dispositif de pasteurisation (petit batch de 50 mL)</i>	224
3.3.	<i>Dispositif GAS (grand batch)</i>	228
4.	Miniréacteur continu.....	234
4.1.	<i>Caractérisation du dispositif continu</i>	234
4.2.	<i>Simulation numérique</i>	235
4.3.	<i>Influence de la surface d'échange, comparaison avec les dispositifs batch</i>	236
4.4.	<i>Intérêt du ratio CO₂/échantillon</i>	238
5.	Conclusion	239

Chapitre 4 : Modification du milieu et impact sur l'inactivation des microorganismes	243
1. Influence de la contamination initiale	247
2. Influence de la composition de la matrice utilisée	251
2.1. Impact de la matrice	251
2.2. Impact de la concentration en vitamine C.....	253
3. Germination des spores de <i>Bacillus subtilis</i>	256
3.1. Activation de la germination des spores	256
3.2. Essais de stérilisations.....	257
4. Conclusion	258
Chapitre 5 : Effet des conditions expérimentales sur les principes actifs	261
1. Impact sur les polyphénols	265
2. Impact sur la vitamine C.....	268
3. Analyse de <i>Jambes Légères</i> par la HPLC	270
3.1. Tendances générales.....	270
3.2. Quantification des polyphénols.....	274
3.3. Quantification sur la vitamine C.....	274
3.4. Conclusion	275
4. Conclusion	275
Chapitre 6 : Intérêt du traitement au CO₂ et stabilité au stockage	277
1. Résistance au traitement	281
2. Stabilité au stockage.....	282
2.1. Evolution de la teneur en vitamine C au stockage	282
2.2. Evolution de la flore microbienne au stockage	283
3. Apport du traitement au CO ₂ pressurisé par rapport au traitement thermique.....	285
4. Conclusion	288
Conclusions et perspectives	293
Références bibliographiques.....	303
Annexe 1 : dosage acide-base de <i>Jambes Légères</i>	319
Annexe 2 : Détail de la régression linéaire et de l'ANOVA sur le pH des eaux	321
Annexe 3 : Détail de la régression linéaire et de l'ANOVA du plan composite centré.....	325

Liste des abréviations

a	m^2/m^3	Surface interfaciale d'échange
AA		Acide ascorbique
AAO		Acide ascorbique oxydase
AG		Acide gallique
ANC		Apports nutritionnels conseillés
ANOVA		Analyse de la variance
ANSES		Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail
BHI		Bouillon cœur cerveau
BSA		Albumine de sérum bovin
c_{CO_2}	mol/m^3	Concentration en CO_2 dissous
$C_{CO_2}^0$	mol/m^3	Concentration en CO_2 à l'instant $t=0$
$C_{CO_2}^*$	mol/m^3	Concentration en CO_2 à saturation
CO_2 -SC		CO_2 supercritique
D	min ou m	Durée ou diamètre du réacteur
d	m	Diamètre de l'agitateur
D_{CO_2}	m^2/s	Coefficient de diffusion du CO_2
DGCCRF		Direction générale de la concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes
DO	-	Densité optique
d_p	min	Durée de la phase de pressurisation
d_s	min	Durée de la phase de statique
e	m	Hauteur des pales de l'agitateur
EFSA		Autorité européenne de sécurité des aliments
FDA		Food and Drug Administration
Fr	-	Nombre de Froude
g	m/s^2	Accélération de la pesanteur
h	m	Hauteur de liquide
H	m	Hauteur du réacteur
HPLC		Chromatographie en phase liquide à haute performance
i	m	Diamètre de l'entrée d'admission en CO_2
INCA		Etude individuelle Nationale sur les Consommations Alimentaires
JL		<i>Jambes légères</i>
K	-	Constante d'équilibre
k_L	m/s	Coefficient de transfert massique côté liquide
l	m	Longueur des pales de l'agitateur
l_k	m	Longueur de Kolmogorov
M	kg/mol	Masse molaire
MTT		3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
N	s^{-1} ou UFC/mL	Vitesse de rotation ou population microbienne après traitement
n	mol	Nombre de mol d'une espèce
Na	-	Nombre d'aération

Na _{c/d}	-	Limite entre chargement et dispersion
Na _{e/c}	-	Limite entre engorgement et chargement
ND		Non déterminé
N ₀	UFC/mL	Population microbienne avant traitement
N _p	-	Nombre de puissance
P	bar	Pression
P	W	Puissance d'agitation
PBS		Tampon phosphate salin
PC		Point critique
Pc	bar	Pression critique
PCA		Gélose pour dénombrement
PEF		Champs électriques pulsés
PG	W	Puissance d'agitation sous gaz
PI		Iodure de propidium
PMS		5-methylphenazinium methylsulfate
PPO		Polyphénoloxydase
PPT		Polyphénols totaux
Q _G	m ³ /s	Débit volumique en gaz
Q _m	kg/s	Débit massique
qsp		Quantité suffisante pour
Re	-	Nombre de Reynolds
RMN		Résonance magnétique nucléaire
RSM		Méthodologie des surfaces de réponses
S	m ²	Section
SCF		Fluides supercritiques
T	°C	Température
TAB		Population totale des bactéries aérobies
Tc	°C	Température critique
t _c	s	Temps de circulation
t _{CO2}	s	Temps de contact avec le CO ₂
t _D	s	Temps de diffusion
t _{DT}	s	Temps de dissolution totale
TEM		Microscopie électronique à transmission
t _G	s	Temps de rétention gazeuse
t _m	s	Temps de micromélange
t _M	s	Temps de macromélange
TSB		Bouillon trypticase soja
t _{tr}	s	Temps de transfert de la phase gaz à la phase liquide
UFC		Unité formant colonie
u _G	m/s	Vitesse terminale d'une bulle de gaz
US		Ultrasons
u _s	m/s	Vitesse superficielle du gaz
v	m/s	Vitesse
VC	min	Valeur cuisatrice
V _d	bar/min	Vitesse de dépressurisation
V _L	m ³	Volume de liquide
VP	min	Valeur pasteurisatrice
V _r	m ³	Volume du réacteur

x	m ou -	Longueur caractéristique ou variable centrée réduite
X	-	Variable naturelle
x_{CO_2}	-	Solubilité du CO_2 dans l'eau
Y	m	Hauteur de positionnement de l'agitateur par rapport au fond de la cuve
$Y\&M$		Population totale en levures et moisissures
ϵ	m^3	Fraction volumique de gaz dispersé (rétention gazeuse)
ϵ_d	W/m^3	Energie dissipée
η	$Pa.s$	Viscosité
ν	m^2/s	Viscosité cinématique
ρ	kg/m^3	Masse volumique
σ	N/m	Tension interfaciale

Les indices suivants associés à certaines grandeurs correspondent à :

CO_2	au CO_2
G	au gaz
JL	au complément <i>Jambes Légères</i>
L	à la phase liquide

Liste des Tableaux

Tableau 1 : Les gammes de produits (Bimbenet, 1998)	61
Tableau 2 : Comparatif des méthodes de conservation par la chaleur	63
Tableau 3 : Comparatif des méthodes de conservation par le froid	64
Tableau 4 : Choix des techniques de séchages selon le type de matrice (Arlabosse, 2008) ...	65
Tableau 5 : Comparatif des procédés de conservation par séchage	66
Tableau 6 : Comparatif des techniques de conservation	68
Tableau 7 : Comparatif des procédés de conservation athermiques émergents.....	69
Tableau 8 : Récapitulatif des vitamines et de leurs propriétés	74
Tableau 9 : Récapitulatif des familles de polyphénols	77
Tableau 10 : Impact de différents traitements sur la teneur en vitamine C dans certains aliments	80
Tableau 11 : Caractéristiques du CO ₂ pressurisé et ses principaux avantages d'un point de vue industriel (Proctor and Royal Society of Chemistry (Great Britain), 2011)	85
Tableau 12 : Liste des microorganismes traités par CO ₂ pressurisé (Perrut, 2012), ND : non disponible	92
Tableau 13 : Brevets pertinents au matière de pasteurisation au CO ₂ pressurisé (tableau extrait de (2007)).....	97
Tableau 14 : Composition des bouillons de culture utilisés	108
Tableau 15 : Composition des milieux utilisés pour étalement.....	108
Tableau 16 : Caractéristiques des lots de <i>Jambes Légères</i> utilisés	109
Tableau 17 : Récapitulatif des produits utilisés associés à leur fournisseur.....	110
Tableau 18 : Récapitulatif des solvants et gaz utilisés, associés à leur fournisseur	110
Tableau 19 : Résumé des conditions de préparation pour les bactéries végétatives et la levure.....	112
Tableau 20 : Identification des molécules d'intérêt par HPLC à barette d'iode (t_R : temps de rétention, λ : longueur d'onde maximale	126
Tableau 21 : Protocole de dosage de la vitamine C pour les mélanges à 1 g/L.....	128
Tableau 22 : Niveau des facteurs.....	147

Tableau 23 : Résultat du plan d'expérience pour (a) l'eau osmosée et (b) l'eau du robinet en variables réelles. Les expériences en vert sont celles issues du plan d'expériences 2 ² initial.....	148
Tableau 24 : Résultats de la régression linéaire et de l'ANOVA en variables réelles sur le couplage des deux plans d'expériences ($R^2 = 0,91$).....	149
Tableau 25 : Récapitulatif des niveaux du plan composite centré avec $\alpha = 1,4$	165
Tableau 26 : Détails du plan composite centré en variables réelles. T : température, P : pression, D : durée et V_d : vitesse de dépressurisation, * : pasteurisation totale, ND : valeur non déterminée ; R : reproduction.....	168
Tableau 27 : Analyse statistique du plan d'expériences et coefficients de régression associés. Les paramètres ombrés en vert ne sont pas influents. Ils ont été rajoutés parce qu'ils interviennent dans l'interaction PD.....	170
Tableau 28 : Seconde régression linéaire uniquement sur les paramètres influents détectés au cours de la première régression. Les paramètres ombrés en vert ne sont pas influents.....	170
Tableau 29 : Récapitulatif des conditions de traitement au CO ₂ pressurisé aboutissant à une pasteurisation totale (T : température, P : pression, D : durée et V_d : vitesse de dépressurisation).....	180
Tableau 30 : Résultats des expériences d'optimisation menées à une vitesse de dépressurisation de 30 bar/min (T : température, P : pression, D : durée) Les expériences ombrées en vert ont été réalisées avec une concentration initiale en vitamine C de 4 g/L.....	181
Tableau 31 : Réductions décimales associées aux différents traitements par cycles de pression. Les expériences ombrées en vert ont été menées avec une concentration initiale en vitamine C de 4 g/L et de 1 g/L pour les autres essais. (T : température, P : pression, vitesse de dépressurisation fixée à 30 bar/min, n : nombre de cycles ; t : durée de chaque cycle, ΔP : différence de pression entre chaque cycle * : inactivation totale, ND : non déterminé).....	183
Tableau 32 : Réductions décimales pour les expériences conduites sous CO ₂ , N ₂ et air	188
Tableau 33 : Résultats des manipulations avec N ₂ en conditions extrêmes à une vitesse de dépressurisation de 30 bar/min avec une concentration initiale en vitamine C de 1 g/L	189

Tableau 34 : Valeurs à pression atmosphérique des solubilités dans l'eau de certains gaz (source : https://encyclopedia.airliquide.com)	190
Tableau 35 : Influence du couple température / pH sur l'inactivation dans le milieu <i>Jambes</i> <i>Légères</i> soit à son pH naturel de 4, soit avec son pH ajusté à 6	197
Tableau 36 : Apport du CO ₂ par rapport à l'air sur un traitement à 50°C dans du <i>Jambes</i> <i>Légères</i> à pH 4 selon la durée du traitement	198
Tableau 37 : Evolution des caractéristiques physico-chimiques en fonction de la pression à 38°C (D _{CO₂} : diffusivité du CO ₂ , ρ : masse volumique, η : viscosité, σ : tension interfaciale, x _{CO₂} : solubilité du CO ₂ , C _{CO₂} * : concentration à saturation, ν : viscosité cinématique). 213	213
Tableau 38 : Evolution du débit volumique (Q _G) de CO ₂ à 38°C en fonction de la pression pour le petit batch avec un volume de solution de 19 mL.....	214
Tableau 39 : Evolution des $k_L a$ et du temps de transfert (t _{tr}) avec la pression pour le petit batch (V _L = 19 mL), selon différents modèles de calculs	215
Tableau 40 : Comparaison des aires d'échanges liées aux bulles (calculés grâce à la formule (30)) et à l'interface ciel/liquide selon la pression	216
Tableau 41 : Influence de la masse volumique (ρ) sur les grandeurs du transfert, la dernière colonne représente les valeurs initialement calculées avec de l'eau pure (t _G : temps de séjour du gaz dans la phase liquide, t _{tr} : temps de transfert de CO ₂)	218
Tableau 42 : Influence de la viscosité (η) sur le temps de transfert (t _{tr}), la dernière colonne représente les valeurs initialement calculées avec de l'eau pure	218
Tableau 43 : Influence de la tension de surface (σ) sur les grandeurs du transfert, la dernière colonne représente les valeurs de référence initialement calculées avec la tension de surface entre <i>Jambes Légères</i> et le CO ₂ (a : surface interfaciale d'échange, t _{tr} : temps de transfert de CO ₂).....	219
Tableau 44 : Evolution du temps de transfert (t _{tr}) calculé à partir des équations de Calderbank selon les propriétés du fluide considéré à 38°C et 100 bar (ρ : masse volumique, η : viscosité, σ : tension interfaciale)	220
Tableau 45 : Influence du volume de solution traitée (V _L) sur les grandeurs du transfert à 100 bar, pour le petit batch avec un agitateur paddle, en utilisant les formules de Calderbank (t _G : temps de séjour du gaz dans la phase liquide, t _{tr} : temps de transfert de CO ₂).....	220

Tableau 46 : Variation de la solubilité du CO ₂ (x_{CO_2}) et impact sur la concentration à saturation ($C_{CO_2}^*$), les colonnes en bleu représentent les valeurs de référence initialement calculées avec la solubilité du CO ₂ dans l'eau	221
Tableau 47 : Impact du débit de CO ₂ (Q_G) sur le nombre d'aération (Na) et temps de transfert (t_{tr}), la dernière colonne représente les valeurs de référence initialement calculé avec le débit délivré par notre pompe avec $Na_{e/c} = 0,028$ et $Na_{c/d} = 0,022$	223
Tableau 48 : Bornes du temps de transfert (t_{tr}) en fonction de paramètres expérimentaux des propriétés physico-chimiques du fluide à 38°C et 100 bar, calculées à partir des formules de Calderbank (ρ : masse volumique, η : viscosité, σ : tension interfaciale)..	223
Tableau 49 : Valeurs des nombres adimensionnels pour le petit batch à 38°C avec un volume de solution de 19 mL et l'agitateur assimilé à un paddle	225
Tableau 50 : Temps caractéristiques du petit batch selon la modélisation d'agitateur choisie, à 38°C et 100 bar pour 19 mL de solution, dans le cadre des équations de Calderbank (l_k : longueur de Kolmogorov, P : puissance d'agitation, ε : rétention gazeuse, t_c : temps de circulation, t_M : temps de macromélange, t_m : temps de micromélange, t_G : temps de séjour du gaz dans la phase liquide, t_{tr} : temps de transfert de CO ₂)	226
Tableau 51 : Valeurs des nombres adimensionnels définissant le régime de fonctionnement et l'écoulement pour le grand batch (avec un volume de solution de 41 mL)	229
Tableau 52 : Temps caractéristiques du grand batch pour un volume traité de 41 mL en fonction des corrélations choisies à 100 bar (l_k : longueur de Kolmogorov, P : puissance d'agitation, ε : rétention gazeuse, t_c : temps de circulation, t_M : temps de macromélange, t_m : temps de micromélange, t_G : temps de séjour du gaz dans la phase liquide, t_{tr} : temps de transfert de CO ₂)	230
Tableau 53 : Résultat des expériences menées à 38°C et 100 bar sur les réacteurs batch. d_p : durée de la pressurisation, d_s : durée du statique, t_{CO_2} : le temps de contact total de la solution avec le CO ₂ et V_L/V_r : ratio entre le volume de liquide traité et le volume du réacteur	232
Tableau 54 : Résultat des expériences menées sur le dispositif continu	235
Tableau 55 : Comparaison de l'interface gaz-liquide par volume à traiter selon le dispositif et des réductions décimales associées à un traitement à 38°C-100 bar (V_L : volume de solution, t_{CO_2} : temps de contact avec le CO ₂ , Sc : surface de contact gaz-liquide, $a = Sc/V_L$)	237

Tableau 56 : Ordre de grandeur des temps caractéristiques des étapes de l'inactivation par CO ₂ pressurisé, les temps sont donnés à partir du début de l'injection du CO ₂ dans le milieu.....	240
Tableau 57 : Charge avant (N ₀) et après traitement (N) en chaque microorganisme par expérience (R : reproduction).....	247
Tableau 58 : Effet de différents traitements sur la réduction décimale de chaque espèce présente seule dans le milieu (* inactivation totale). Les lignes en vert correspondent aux réductions décimales observées sur les expériences avec les 3 microorganismes en même temps.....	249
Tableau 59 : Influence de la température sur l'inactivation pour un traitement de 45 min à 100 bar et une contamination initiale de 10 ⁶ UFC/mL pour <i>E. coli</i> et <i>L. innocua</i> et 10 ⁴ UFC/mL pour <i>S. cerevisiae</i> , * inactivation totale	251
Tableau 60 : Récapitulatif des réductions décimales après un traitement de 75 min à 38°C et 100 bar sur différentes matrices avec des concentrations initiales en vitamine C de 1 g/L et en acide gallique de 0,02g/L.....	252
Tableau 61 : Evolution du pH des bouillons de culture des microorganismes en présence d'une concentration variable en vitamine C, le pH final est mesuré après 48 h d'incubation.....	254
Tableau 62 : Dénombrements des spores et des cellules végétatives avec incubation dans 2 milieux différents (en UFC/mL)	256
Tableau 63 : Résultats des expériences de stérilisation avec une concentration initiale en vitamine C de 1 g/L.....	257
Tableau 64 : Récapitulatif de la littérature à propos du traitement des spores par CO ₂ pressurisé (*inactivation totale).....	259
Tableau 65 : Détails du plan composite centré en variables réelles sur les concentrations en polyphénols totaux et en vitamine C. La concentration initiale en vitamine C est de 19 mg/L.....	266
Tableau 66 : Comparaison de la valeur cuisatrice de certains traitements au CO ₂ pressurisé de la littérature.....	270
Tableau 67 : Taux de conservation de l'acide gallique et du composé inconnu (pic à 6, 7min) d'après HPLC.....	274

Tableau 68 : Effet d'un traitement répété (38°C-100 bar-75 min) sur la réduction décimale pour tester la résistance des microorganismes.....	281
Tableau 69 : Comparaison de la VP de certains traitements au CO ₂ pressurisé (* valeur calculée à partir du profil en température mesuré expérimentalement, les autres valeurs ont été calculées à partir de la formule) Les traitements donnés sans pression correspondent à des traitements thermiques uniquement.....	287

Liste des figures

Figure 1 : Diagramme de fabrication d'un complément alimentaire (source : http://www.synadiet.org/les-complements-alimentaires/fabrication-commercialisation)	54
Figure 2 : Principaux genres de bactéries impliqués dans les produits alimentaires (Leveau et al., 2001).....	57
Figure 3 : Comparaison des structures des bactéries à Gram (+) et (-) (Madigan et al., 2007)	58
Figure 4 : Représentation schématique de la structure d'une spore	59
Figure 5 : Représentation schématique de la structure d'une levure (source : http://www.viticulture-oenologie-formation.fr/vitioenoformluce/lexique/l/photos/schema-levure.jpg).....	60
Figure 6 : Structure chimique de l'acide gallique	78
Figure 7 : Structure chimique de la vitamine C.....	78
Figure 8 : Diagramme de phase du CO ₂ pur (Bouchet Bert-Manoz, 2014).....	82
Figure 9 : Evolution du volume des publications sur l'inactivation des microorganismes par CO ₂ pressurisé (données collectées avec ScienceDirect en utilisant les termes de recherche : « <i>high pressure carbon dioxide AND microbial inactivation</i> » couplés avec « <i>quality OR sensory properties</i> » ou « <i>mechanism</i> »)	83
Figure 10 : Cinétique d'inactivation de <i>L. plantarum</i> en fonction de la température lors d'un traitement au CO ₂ pressurisé mené à 68 bar (Hong and Pyun, 1999).....	86
Figure 11 : Cinétique d'inactivation de <i>L. plantarum</i> en fonction de la pression lors d'un traitement au CO ₂ pressurisé mené à 30°C (Hong and Pyun, 1999)	86
Figure 12 : Effet de la présence d'un filtre (10 µm) sur la réduction décimale de <i>S. cerevisiae</i> après un traitement de 30 min à (a) 25°C ou (b) 35°C (Ishikawa et al., 1995)	87
Figure 13 : Effet d'un traitement au CO ₂ pressurisé à 35°C et 60 bar sur <i>L. monocytogenes</i> selon la contamination initiale (Erkmen, 2000a).....	88
Figure 14 : Cinétique de l'inactivation de <i>L. plantarum</i> en fonction du pH au cours d'un traitement au CO ₂ pressurisé mené à 30°C et 68 bar (Hong and Pyun, 1999)	90

Figure 15 : Les différentes étapes du mécanisme d'inactivation lors d'un traitement au CO ₂ pressurisé (Garcia-Gonzalez et al., 2007)	94
Figure 16 : Protocole de préparation des spores de <i>B. subtilis</i>	112
Figure 17 : Aspect des souches étudiées : (a) <i>E. coli</i> sur gélose PCA, (b) <i>S. cerevisiae</i> sur gélose Sabouraud, (c) <i>L. innocua</i> sur gélose PALCAM et (d) <i>B. subtilis</i> sur du BHI gélosé	113
Figure 18 : Représentation du dispositif de pasteurisation, (a) montage réel, (b) schéma ..	115
Figure 19 : Schéma du procédé GAS (D : débitmètre), (a) montage réel, (b) schéma	117
Figure 20 : Représentation du dispositif continu, (a) montage réel, (b) schéma	119
Figure 21 : Dosage (a) de solutions de vitamine C et (b) de solutions de BSA (protéine) par la méthode de Folin à $\lambda = 750\text{nm}$	124
Figure 22 : Structure générale des flavonoïdes (Chehue et al., 2013).....	125
Figure 23 : Profil chromatographique de <i>Jambes Légères</i> et du jus de grenade à 280 nm ...	126
Figure 24 : Représentation des espèces majoritaires de l'acide carbonique selon le pH du milieu	146
Figure 25 : Représentation de (a) la fraction massique du CO ₂ dissous en fonction de la pression et (b) de l'évolution du pH en fonction de la pression (extrait de (Spilimbergo et al., 2005))	150
Figure 26 : Dosage acide-base du milieu <i>Jambes Légères</i> contaminé (pKa = 6,8)	152
Figure 27 : Evolution du pH (a) sur de l'eau osmosée au cours des premières heures et (b) sur plusieurs milieux au cours d'une semaine.....	153
Figure 28 : Effet du pH sur la population de (a) <i>E. coli</i> , (b) <i>S. cerevisiae</i> et (c) <i>L. innocua</i> dans du tampon phosphate-citrate de pH 4 et 6 et dans le milieu <i>Jambes Légères</i>	155
Figure 29 : Schéma d'un plan composite centré à 3 facteurs.....	164
Figure 30 : Diagramme en boîtes à moustache des points au centre du plan d'expériences pour les 3 souches étudiées ainsi que la flore totale	169
Figure 31 : Diagramme des effets de la température et de la pression pour (a) <i>E. coli</i> , (b) <i>S. cerevisiae</i> et (c) <i>L. innocua</i> . Inactivation totale à une réduction de -8 pour <i>E. coli</i> , -6 pour <i>S. cerevisiae</i> et -7 pour <i>L. innocua</i>	171
Figure 32 : Effet de la température et de la pression sur la réduction décimale d' <i>E. coli</i> après un traitement de 30 min : data de (Liao et al., 2007) pour les courbes en bleu foncé et (Liao et al., 2008) pour les courbes en bleu clair	172

Figure 33 : Effet (a) de la température à P = 100 bar et (b) de la pression à T = 36°C sur l'inactivation de <i>S. cerevisiae</i> pour un volume traité de 5 mL et une concentration en microorganismes de 10 ⁵ UFC/mL (Spilimbergo and Mantoan, 2006)	173
Figure 34 : Diagramme des effets de la durée du traitement et de la vitesse de dépressurisation pour (a) <i>E. coli</i> , (b) <i>S. cerevisiae</i> et (c) <i>L. innocua</i>	173
Figure 35 : Effet sur <i>L. monocytogenes</i> avec une charge initiale de 10 ¹⁰ UFC/mL (a) de la vitesse de dépressurisation suite à un traitement de 2 h à 33°C et 200 bar (Soares et al., 2013) et (b) de la durée d'un traitement à 200 bar et 33°C avec différentes vitesses de dépressurisation (Soares et al., 2013)	174
Figure 36 : Diagramme des interactions (a) pression-durée et (b) pression-température pour <i>E. coli</i>	175
Figure 37 : Graphiques des valeurs prédites pour (a) <i>E. coli</i> et (b) <i>S. cerevisiae</i>	177
Figure 38 : Graphiques des surfaces de réponse de la réduction décimale : (a) totale en fonction de la pression et de la température (75 min de traitement) (b) de <i>E. coli</i> en fonction de la pression et de la température (75 min de traitement) (c) de <i>S. cerevisiae</i> en fonction de la pression et de la température (75 min de traitement) (d) de <i>E. coli</i> à 38°C en fonction de la pression et de la durée du traitement	178
Figure 39 : Représentation schématique d'un traitement comprenant 2 cycles de pression	183
Figure 40 : Observation au microscope à fluorescence (dilution de l'échantillon préparé au 1/100 e et grossissement x60) de <i>S. cerevisiae</i> marquée au PI (a, b) avant traitement et (c, d) après un traitement de 75 minutes à 38°C et 100 bar	191
Figure 41 : Aspect global au TEM des échantillons traités (a) avant traitement, (b) après un traitement de 75 min à 38°C et 100 bar et (c) un traitement de 75 min à 50°C et 100bar	193
Figure 42 : Aspect au TEM avant traitement de <i>S. cerevisiae</i> (a) et <i>E. coli</i> et <i>L. innocua</i> (d), aspect après un traitement de 75 min à 38°C et 100 bar de <i>S. cerevisiae</i> (b) et <i>L. innocua</i> (e) et aspect après un traitement de 75 min à 50°C et 100 bar de <i>S. cerevisiae</i> (c) et <i>E. coli</i> et <i>L. innocua</i> (f)	193
Figure 43 : Clichés TEM de cellules type <i>E. coli</i> ou <i>L. innocua</i> traitées 75 min à 50°C et 100 bar. Les flèches représentent le cytoplasme fuyant à travers des pores dans la paroi cellulaire	194

Figure 44 : Aspect au TEM d'une solution de <i>Jambes Légères</i> après un traitement de 75 min à 50°C et 100 bar de N ₂	196
Figure 45 : Schéma des différentes étapes du mécanisme d'inactivation par CO ₂ pressurisé proposées par Garcia-Gonzalez et al. (2007).....	205
Figure 46 : Représentation schématique du chemin parcouru par l'oxygène afin de le transférer de la bulle à la cellule. Extrait de (2009).....	206
Figure 47 : Représentation des régimes de fonctionnement selon la vitesse de rotation (de gauche à droite : N ↗ pour un Q _G fixé et Q _G ↘ pour N fixé).....	210
Figure 48 : Evolution de la concentration en CO ₂ dissous dans le petit batch en fonction de la contribution considérée (bulle ou interface ciel-liquide)	217
Figure 49 : Influence de la solubilité du CO ₂ dans le milieu sur la cinétique de transfert de masse pour le petit batch avec 19 mL de solution traitée, à partir du modèle de Calderbank et un agitateur de type paddle. Les temps dans les encadrés correspondent aux temps nécessaires à la dissolution totale du CO ₂	222
Figure 50 : Représentation cotée de nos cuves batch agitées avec leurs dimensions caractéristiques	224
Figure 51 : Evolution de la pression au cours d'un traitement à 38°C et 100 bar avec le petit batch pour 19 mL de solution traitée, le statique dure 75 min.....	225
Figure 52 : Evolution de la concentration en CO ₂ dissous selon le type de mobile pris en compte pour le petit batch en considérant que la concentration maximale atteignable est celle à 38°C-100 bar, sur les bases du modèle de Calderbank, Les temps dans les encadrés correspondent aux temps nécessaires à la dissolution totale du CO ₂	227
Figure 53 : Evolution de la concentration en CO ₂ dissous à 38°C au cours de la phase de pressurisation pour le petit batch avec l'agitateur assimilé à un paddle en considérant que la concentration maximale atteignable évolue avec la pression, sur les bases du modèle de Calderbank. Les temps dans les encadrés correspondent aux temps nécessaires à la dissolution totale du CO ₂	228
Figure 54 : Evolution de la pression au cours d'un traitement à 38°C et 100 bar avec le grand batch pour 41 mL de solution traitée, la phase statique dure 75 min	229
Figure 55 : Evolution de la concentration en CO ₂ dissous au cours des différentes phases du procédé (① pressurisation, ② statique) (a) pour 41 mL traités avec le grand batch selon le modèle de Van't Riet et (b) pour 19 mL traités avec le petit batch selon le modèle de Calderbank.....	231

Figure 56 : Représentation de la répartition des flux de CO ₂ et de <i>Jambes Légères</i> pour les expériences C1, C2 et C3 avec une tension de surface de 18 mN/m	236
Figure 57 : Représentation de la dispersion du CO ₂ après son introduction dans le milieu..	237
Figure 58 : Récapitulatif des paramètres influents sur les temps de transfert et la cinétique d'inactivation	241
Figure 59 : Effet après un traitement de 75 min à 38°C et 100 bar de la (a) charge initiale totale sur la réduction décimale totale et selon (b) la charge initiale en chaque microorganisme (* pasteurisation totale)	248
Figure 60 : Influence de la durée de traitement à 38°C et 100 bar sur une solution inoculée avec 10 ⁶ UFC/mL de <i>E. coli</i> et <i>L. innocua</i> et 10 ⁴ UFC/mL de <i>S. cerevisiae</i> , Les points en couleurs transparentes représentent les réductions décimales obtenues dans les mêmes conditions de traitement mais avec une contamination initiale plus importante, dans ce cas, la réduction décimale totale est de $-3,2 \pm 1,1$	250
Figure 61 : Evolution de la densité optique de bouillons de microorganismes contenant des concentrations en vitamine C variées pour (a) <i>E. coli</i> (bouillon TSB), (b) <i>S. cerevisiae</i> (bouillon TSB) et (c) <i>L. innocua</i> (bouillon Fraser).....	255
Figure 62 : Représentation du protocole pour activer la germination des spores	256
Figure 63 : Suivi de l'évolution naturelle d'un bouillon de spores dans le milieu BHI riche ..	257
Figure 64 : Graphique des effets pour la concentration en polyphénols totaux après traitement	267
Figure 65 : Spectre UV-Vis du complément <i>Jambes Légères</i> (production du 18/11/2014) avant et après traitement de stérilisation	268
Figure 66 : Graphique des effets sur la concentration en vitamine C après traitement	269
Figure 67 : Profil chromatographique de <i>Jambes Légères</i> seul rapporté à la dilution du mélange additivé de vitamine C et d'acide gallique	271
Figure 68 : Profil chromatographique de <i>Jambes Légères</i> à 280 nm après différents traitements au CO ₂ pressurisé (a) dans sa globalité. (b), (c), (d) et (e) représentent des zooms du chromatogramme (a)	272
Figure 69 : Profil chromatographique à 280 nm après différents traitements au CO ₂ pressurisé du mélange à base de grenade (zoom sur la zone de 2 à 7 min)	274
Figure 70 : Evolution de la concentration en vitamine C au cours du temps après un stockage à température ambiante à l'abri de la lumière.....	282

Figure 71 : Evolution de la population résiduelle en (a) <i>E. coli</i> et (b) <i>S. cerevisiae</i> après différents traitements	284
Figure 72 : Profils en température du mélange <i>Jambes Légères</i> lors de deux traitements thermiques classiques	286
Figure 73 : Profils en température du mélange <i>Jambes Légères</i> au cours de trois traitements au CO ₂ pressurisé.①préchauffage, ② pressurisation, ③phase statique et ④dépressurisation	287
Figure 74 : Dosage acide-base de <i>Jambes Légères</i> seul avec un pH initial de 3,87, l'équivalence a été déterminée pour un volume de 0,5 mL de soude. Le pKa de ce milieu est de 6,2.	319
Figure 75 : Dosage acide-base de <i>Jambes Légères</i> avec les principes actifs et les microorganismes avec un pH initial de 4,44, l'équivalence a été déterminée pour un volume de 0,4 mL de soude. Le pKa de ce milieu est de 6,8.	319

Introduction

Les compléments alimentaires sont couramment utilisés par les consommateurs pour lutter contre les divers maux de leur quotidien (fatigue, alimentation désordonnée, stress...). Du fait de leur simplicité d'utilisation et leur disponibilité sans ordonnance, ils sont de plus en plus prisés pour améliorer la qualité de vie et la santé de tout un chacun. A l'heure actuelle, près de 25% de la population française consomme de façon régulière des compléments alimentaires. Cette proportion monte même jusqu'à 41%, si les consommateurs épisodiques sont pris en compte (Pouchieu et al., 2013). Présentés sous forme d'ampoules, de gélules, de comprimés voire de poudres, les compléments alimentaires peuvent contenir des nutriments (vitamines, minéraux, oligoéléments), des extraits de plantes (vigne rouge, camomille, radis noir...), des additifs et/ou des arômes. Ils constituent un apport concentré en nutriments, qui permet de compléter un régime alimentaire normal. Mais en dépit de leur effet nutritionnel ou physiologique, les compléments alimentaires ne sont pas considérés par la législation (directive 2002/46/CE du parlement européen) comme des médicaments. A ce titre, ils ne peuvent revendiquer d'effet thérapeutique. Par ailleurs, comme ils relèvent de la denrée alimentaire, ils doivent répondre à des normes de sécurité sanitaire strictes ainsi qu'à des propriétés nutritionnelles et organoleptiques en conformité avec la réglementation en vigueur. Par exemple, ils doivent garantir l'absence de pollution par les pesticides ou de contamination microbienne (salmonelles, listéria, staphylocoques, virus...). A cause de leur composition riche en eau et en sucre, les compléments alimentaires liquides constituent un milieu très favorable à la croissance microbienne. Ce risque est renforcé par l'utilisation de matières premières végétales qui sont d'une part périssables et qui, d'autre part, présentent déjà une contamination initiale. Les ingrédients issus de l'agriculture biologique, qui ont le vent en poupe, sont particulièrement concernés. En effet, les produits issus de l'agriculture biologique sont naturellement plus contaminés que ceux ayant été fréquemment exposés aux produits phytosanitaires (Metivier, 2015). La nécessité d'appliquer un traitement de conservation devient alors primordiale.

La conservation concerne le maintien des propriétés chimiques et physiques de l'aliment dont découle la conservation de ses propriétés fonctionnelles, nutritionnelles et organoleptiques. Deux aspects sont primordiaux : rendre infime le risque d'intoxication alimentaire mais aussi proposer un produit attractif pour le marché de part ses propriétés nutritionnelles et organoleptiques. Historiquement, Nicolas Appert, fut le précurseur de la

technique de conservation des aliments par chauffage appelée « appertisation ». Mais cette technique est plus volontiers attribuée à Louis Pasteur, qui déposa un brevet en 1865. A l'échelle industrielle, les traitements thermiques (pasteurisation, appertisation) ou chimiques (peroxyde d'hydrogène, eau de Javel ...) (Wedzicha, 2003) sont les plus répandus. Ils sont particulièrement simple de mise en œuvre et son relativement peu coûteux. Mais ces techniques présentent l'inconvénient majeur de dégrader les aliments, notamment en terme de couleur, de goût, de texture voire de perte en nutriments.

Récemment, de nouvelles tendances alimentaires ont émergé, par exemple le veganisme (refus de consommer des produits issus d'animaux ou de leur exploitation) ou le fooding (volonté de désacraliser la gastronomie traditionnelle, s'écarter de son carcan pour laisser la place à la créativité et aux nouvelles associations de saveurs). Mais les modes de consommation ont également changé. Désormais le côté locavore (volonté de manger local) est privilégié face à la grande distribution. Les consommateurs sont de plus en plus concernés par le contenu de leur assiette ainsi que par la qualité de leur alimentation. Le mot d'ordre est maintenant de laisser la part belle aux produits issus de l'agriculture biologique, à une alimentation saine et respectueuse de l'environnement. Les procédés couramment utilisés par l'industrie agroalimentaire pour la pasteurisation/stérilisation des aliments sont donc remis en cause et de moins en moins tolérés par des consommateurs de plus en plus exigeants et regardants.

La société Cérébio était spécialisée dans la fabrication de compléments alimentaires, en particulier ceux à base de macération de plantes. Jusqu'à présent, elle avait recours à deux barèmes de pasteurisation selon la nature du produit à traiter : 30 min à 95°C ou 45 min à 89°C. Usuellement, la pasteurisation est menée à des températures inférieures à 100°C sur des durées variables. Cependant, quelque soit la procédure suivie, le traitement thermique entraîne de nombreuses altérations de la matière première (Rawson et al., 2011). Face aux perspectives d'un marché en pleine croissance mais de plus en plus exigeant quant à la qualité nutritive, organoleptique et sanitaire des produits, Cérébio a souhaité investir dans une technologie de traitement assainissant plus douce vis à vis des actifs et ne faisant pas appel à des entrants bactéricides tels que l'éthanol, le peroxyde d'hydrogène ou les sulfites. De nouvelles technologies émergent depuis quelques décennies : procédés ultra-haute pression (Oliveira et al., 2015), ultrasons (Morris et al., 2007), champs magnétiques (Ramesh, 2003) ou encore le CO₂ supercritique (CO₂-sc) (Garcia-Gonzalez et al., 2007).

Cette dernière technique a montré un potentiel intéressant au cours des vingt dernières années en particulier dans le domaine de l'inactivation des microorganismes. Son effet bactéricide a été démontré à de nombreuses reprises sur différents types de microorganismes (Perrut, 2012) : Gram (+) (*Lactobacillus*, *Listeria*, *Staphylococcus*...), Gram (-) (*Escherichia*, *Pseudomonas*, *Salmonella* ...), levures (*Saccharomyces* principalement), voire quelques virus. Ce procédé est mené dans des conditions globalement douces qui s'échelonnent entre 25 à 60°C et 40 à 600 bar.

Le cahier des charges de ce travail, réalisé dans le cadre d'un contrat avec une PME, est de développer un procédé par CO₂ pressurisé de pasteurisation de compléments alimentaires, principalement des macérâts aqueux de plantes, garantissant :

1. la qualité sanitaire en inactivant tout type de microorganisme (cellules végétatives et spores) présent, qui-plus-est, à un niveau de contamination élevé
2. la préservation des actifs, et ce sans ajout de molécules bactéricides.

Il s'agira d'évaluer l'impact des conditions de traitement sur ce double critère. A moyen terme, la mise en place du procédé à l'échelle industrielle est souhaitée. Dans cette perspective, nous nous intéresserons aux données nécessaires à un changement d'échelle, tels que les temps de contact CO₂/solution ou le ratio CO₂/solution. Idéalement, un procédé continu est préférable pour des raisons évidentes de productivité. Néanmoins le mode batch reste un outil privilégié pour la mise au point, d'autant que le complément alimentaire à traiter est une suspension. Des essais en mode continu, conçus à partir des conclusions des essais en batch, seront donc réalisés sur des échantillons centrifugés.

Différents objectifs scientifiques ont été dégagés de ce projet et ils s'articulent autour de plusieurs problématiques :

1. Quels sont les paramètres expérimentaux influençant l'inactivation et y a-t-il des interactions entre eux ?
2. Quelle est la contribution du CO₂ ?
3. Quelle est l'applicabilité du procédé ?

La première partie sera dédiée à l'étude bibliographique, qui synthétise l'état de l'art concernant l'inactivation des microorganismes par le CO₂ comprimé, et permettra de

dégager les principaux paramètres opératoires susceptibles d'impacter l'inactivation.

La seconde partie du manuscrit présentera les équipements et les protocoles de préparation, y compris ceux du matériel biologique utilisé.

La troisième partie présente les résultats expérimentaux, pour l'essentiel, obtenus en traitant le complément alimentaire sélectionné par l'entreprise Cérébio. Elle est structurée en plusieurs chapitres. Une étude préliminaire met en évidence certaines contraintes expérimentales concernant la matrice étudiée. Le chapitre suivant est consacré à l'étude de l'influence des paramètres opératoires souvent cités au cours de l'analyse bibliographique, au moyen d'un plan d'expériences et d'une analyse statistique. Le but est de hiérarchiser les effets et de détecter les interactions entre les facteurs. Des essais visant à adoucir les conditions opératoires ou en appliquant des cycles de pression sont présentés. Notre démarche s'appuie sur des expériences avec d'autres gaz et sur des observations au microscope pour mettre en évidence les modifications subies par les microorganismes et comprendre les mécanismes mis en oeuvre. Nous avons ensuite tenté d'analyser les résultats sous l'angle des temps caractéristiques et des transferts de matière à sortir de l'analyse phénoménologique. Le comportement des contaminants en fonction de la matrice et de ses caractéristiques propres est abordée dans un quatrième chapitre. La préservation des actifs nutritionnels étant un des objectifs de l'étude, l'incidence des conditions opératoires sur ces actifs est ensuite présentée. Le dernier volet de cette partie discute de l'intérêt du traitement au CO₂.

Le manuscrit se termine par les conclusions générales et les perspectives.

Partie I : Etude bibliographique

Sommaire de la partie I

1. Compléments alimentaires	51
1.1. Marché des compléments alimentaires	51
1.2. Définition officielle et législation.....	52
1.3. Production des compléments alimentaires.....	53
2. Pasteurisation.....	55
2.1. Agents microbiens de la contamination alimentaire.....	56
2.1.1. <i>Bactéries</i>	56
2.1.1.1. Forme végétative.....	57
2.1.1.2. Forme sporulée	58
2.1.2. <i>Levures et moisissures</i>	59
2.2. Techniques d'assainissement, stabilisation et conservation.....	60
2.2.1. <i>Traitements par la chaleur</i>	61
2.2.1.1. Pasteurisation.....	62
2.2.1.2. Stérilisation.....	62
2.2.1.3. Ultra Haute Température	63
2.2.1. <i>Traitements par le froid</i>	63
2.2.1.1. Réfrigération.....	63
2.2.1.2. Surgélation et congélation	64
2.2.2. <i>Traitements par réduction de l'activité de l'eau (a_w)</i>	64
2.2.2.1. Séchage	65
2.2.2.2. Lyophilisation	65
2.2.2.3. Traitements traditionnels et historiques.....	66
2.2.3. <i>Autres méthodes industrielles</i>	67
2.2.3.1. Conditionnement sous atmosphère protectrice	67
2.2.3.2. Filtration stérilisante	67
2.2.3.3. Fermentation.....	67
2.2.3.4. Ajout de conservateurs	68
2.2.4. <i>Méthodes émergentes et techniques d'intensification</i>	68
2.2.4.1. Rayonnements ionisants	69
2.2.4.2. Lumière visible pulsée	69
2.2.4.1. Champs électriques pulsés	70
2.2.4.1. Ultrasons	70
2.2.4.2. Micro-ondes	70

2.2.4.1.	Hautes pressions	71
2.2.4.2.	CO ₂ supercritique	71
2.3.	Grandeurs comparatives	71
2.3.1.	Taux de réduction décimale	72
2.3.2.	Barèmes de stérilisation	72
2.4.	Et pour les compléments alimentaires ?	72
3.	Molécules bioactives d'intérêt	73
3.1.	Vitamines.....	73
3.2.	Minéraux et oligo-éléments	75
3.3.	Polyphénols	76
3.4.	Impact des traitements sur les composés d'intérêt	78
3.4.1.	Sur la vitamine C	78
3.4.1.1.	Réactions de dégradations	78
3.4.1.2.	Application aux traitements industriels	79
3.4.2.	Sur les polyphénols.....	80
4.	Pasteurisation par fluides supercritiques	81
4.1.	Fluides supercritiques.....	81
4.1.1.	Définitions et propriétés associées.....	81
4.1.2.	Champ d'applications.....	82
4.2.	CO ₂ pressurisé et pasteurisation.....	82
4.3.	Facteurs d'influence	85
4.3.1.	Température	85
4.3.2.	Pression	86
4.3.3.	Effet de la configuration expérimentale.....	87
4.3.4.	Effet des microorganismes et résistance.....	88
4.3.5.	Effet de la matrice.....	89
4.3.5.1.	Présence de lipides.....	89
4.3.5.2.	Présence d'eau	89
4.3.5.3.	Influence du pH	90
4.3.6.	Effet de la vitesse de dépressurisation et des cycles de pression	90
4.3.7.	Conclusion	91
4.4.	Mécanismes et cinétique d'inactivation.....	93
4.4.1.	Rupture mécanique	93
4.4.2.	Inactivation physiologique	93
4.4.3.	Cinétique de désactivation et durée du traitement.....	95

4.5. Equipements et brevets	96
5. Conclusion	98

1. Compléments alimentaires

1.1. Marché des compléments alimentaires

Assez peu d'études de marché sont consacrées au domaine des compléments alimentaires. L'étude Individuelle Nationale sur les Consommations Alimentaires (INCA2) la première enquête publique, menée de 2005 à 2007, a permis d'établir le portrait et les habitudes des consommateurs français en matière de compléments alimentaires (Dubuisson et al., 2010).

Ainsi, 1 adulte sur 5, dont la majeure partie sont des femmes, et 1 enfant sur 10 prennent des compléments alimentaires au moins une fois par an. Pour la moitié des adultes audités, cette prise se fait à raison d'une cure de 4 mois et demi, principalement l'hiver. Cependant, un peu plus de 20% des adultes concernés ne décroche pas de l'année et consomme au quotidien ces compléments alimentaires. Les consommateurs y ont surtout recours pour des raisons de :

- Minceur et drainage
- Tonus et vitalité
- Bien-être (sommeil, stress, confort urinaire...)

C'est un marché en pleine croissance qui se chiffre à 1,54 milliard d'euros en France pour l'année 2015 ("Les compléments alimentaires : les chiffres," 2016). En 2015, ce secteur affichait une croissance de 3,9% par rapport à 2014 (contre 6,4% l'année précédente). La distribution des compléments alimentaires suit deux circuits distincts, qui ne s'adressent pas au même type de consommateur et qui sont gouvernés par des sociétés différentes. D'une part, Juva Santé ou Vitarmonyl ciblent plutôt le consommateur occasionnel, qui fait ses courses en grande distribution (7% du marché) et qui cherche à donner un petit coup de pouce à sa santé. D'autre part, des géants comme Arkopharma, Forté Pharma ou Oenobiol se sont implantés dans les pharmacies (54% des ventes) et véhiculent une image de qualité qui séduit les habitués de l'automédication. De plus en plus, des grands noms de l'agro-alimentaire, tels que Nestlé ou Danone, tentent de s'implanter dans ce secteur. Enfin, une part non négligeable (16%) des achats est réalisée dans les magasins spécialisés type bio ou diététique ("Les compléments alimentaires : les chiffres," 2016).

1.2. Définition officielle et législation

D'un point de vue législatif, un complément alimentaire est « une denrée alimentaire dont le but est de compléter le régime alimentaire normal et qui constitue une source concentrée de nutriments ou d'autres substances ayant un effet nutritionnel ou physiologique seuls ou combinés ». C'est la définition officielle enregistrée par la directive 2002/46/CE du Parlement européen, transposée par le décret du 20 mars 2006 puis modifiée par le Décret n°2011-329 du 25 mars 2011. En outre, cette directive précise que la commercialisation doit impérativement se faire « sous forme de doses , à savoir les formes de présentation telles que les gélules, les pastilles, les comprimés, les pilules et autres formes similaires, ainsi que les sachets de poudre, les ampoules de liquide, les flacons munis d'un compte-gouttes et les autres formes analogues de préparations liquides ou en poudre destinées à être prises en unités mesurées de faible quantité. » (“Que sont les compléments alimentaires ?,” 2016). Les compléments alimentaires répondent à trois réglementations principales :

- Celle sur les matières premières agricoles
- Celle sur les denrées alimentaires (obligation de sécurité et d'information)
- Celle propre aux compléments alimentaires (notification à la Direction générale de la concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes (DGCCRF), étiquetage spécifique, liste positive des ingrédients autorisés, doses maximales journalières)

Leur étiquetage est régi par le règlement (UE) n°1169/2011 du Parlement européen et du Conseil. Si les compléments alimentaires ne sont certes pas des médicaments (ils ne peuvent ni avoir, ni revendiquer des effets thérapeutiques). Ils peuvent en revanche afficher des allégations santé. Celles-ci sont codifiées par le règlement CE n°1924/2006 du Parlement européen et du Conseil. Enfin, la réglementation bio définie par le règlement CE n°834/2007 (complété par les règlements CE n°889/2008 et n°1235/2008) s'ajoute le cas échéant. Elle prend en compte la production biologique, l'étiquetage et les contrôles. Les compléments alimentaires sont soumis au code de la consommation et leur commercialisation est encadrée par des organismes officiels tels que la DGCCRF ou l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES) (“Les compléments alimentaire : réglementation,” 2014). Le premier reçoit les déclarations de commercialisation et analyse leur composition, à partir d'une liste positive, qui décrit

l'ensemble des ingrédients (plantes, vitamines et minéraux principalement) acceptés dans la formulation des compléments alimentaires. Tandis que le second assure une mission de nutrivigilance. Il s'agit concrètement d'un programme de veille sanitaire, mis en place en 2009, qui a pour but de mettre en évidence rapidement les effets indésirables et dangers générés par des aliments ou des molécules nouvelles introduites dans notre alimentation. Cette vigilance passe par les professionnels de la santé, les producteurs du secteur agroalimentaire mais aussi par les particuliers. Chacun faisant remonter les éventuelles réactions anormales constatées suite à l'absorption de nouveaux aliments ("Dispositif national de nutrivigilance," n.d.). Ainsi les compléments alimentaires sont entourés d'une multitude de lois visant à protéger les consommateurs et ils doivent répondre à des normes strictes tant sur les matières premières utilisées que sur la fabrication.

1.3. Production des compléments alimentaires

Différents ingrédients peuvent entrer dans la composition des compléments alimentaires. On trouve essentiellement les nutriments :

- vitamines (A, B, C, D, E ...)
- minéraux et oligo-éléments (magnésium, calcium, chrome, fer ...)
- substances à but nutritionnel ou physiologique, (par exemple, la caféine ou le lycopène ainsi que les substances innovantes comme les Oméga 3 ou les probiotiques)
- plantes ou des préparations de plantes tant qu'elles ne présentent pas de propriétés pharmacologiques

D'autre part, ces molécules bioactives peuvent être associées:

- à d'autres ingrédients communément admis dans l'alimentation humaine
- à des auxiliaires de formulation (additifs, arômes ...)

La fabrication peut nécessiter de nombreuses étapes comme l'illustre la Figure 1.

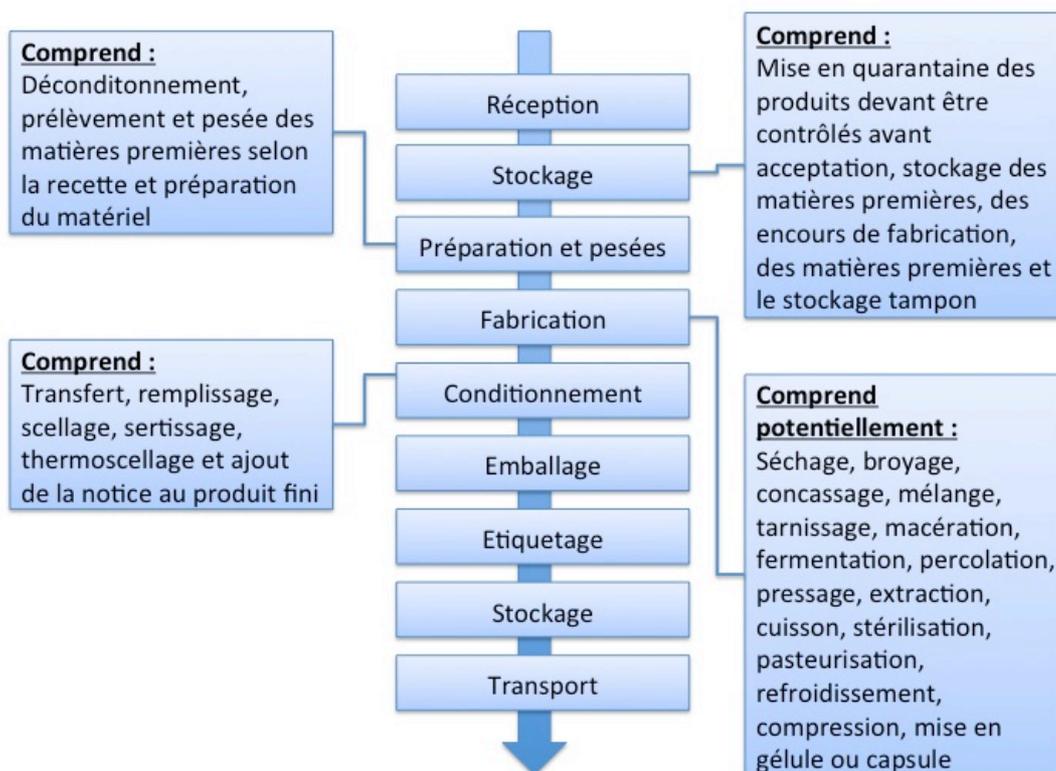


Figure 1 : Diagramme de fabrication d'un complément alimentaire (source : <http://www.synadiet.org/les-complements-alimentaires/fabrication-commercialisation>)

Une très grande variété de formes galéniques est disponible : gélules, comprimés, ampoules de liquide, flacon compte-goutte etc... Devant l'abondance de cette offre, les producteurs de compléments alimentaires se voient presque dans l'obligation de sous-traiter leur fabrication et leur conditionnement. C'est ici qu'intervient Cérébio, très petite entreprise française qui faisait de la sous-traitance à façon. Son activité était répartie à 90% dans les compléments alimentaires sous forme liquide. Les 10% restants étaient consacrés à la production de cosmétiques (toute forme galénique confondue sauf dentifrice). Leur branche des compléments alimentaires liquides se divise en deux types de productions :

- Les produits de la ruche qui contiennent du miel, de la propolis ou de la gelée royale
- Les macérations de plantes.

Cérébio revendiquait clairement une expertise dans ce dernier domaine. C'est pourquoi, nous nous sommes particulièrement attachés dans cette étude à traiter des matrices liquides.

Pour se démarquer, Cérébio désirait garantir l'origine, la qualité et le respect des ingrédients employés. Par le biais de cette thèse, Cérébio souhaitait proposer un procédé de traitement assainissant plus doux pour assurer la conservation des principes actifs, notamment les vitamines ou les polyphénols. Cette démarche devait permettre à terme d'utiliser moins de

matières premières. En effet, les industriels sont obligés à l'heure actuelle de surdoser en vitamines leurs préparations, de manière à garantir des teneurs suffisantes après stérilisation par autoclavage. Ce type de compensation est viable pour des sociétés importantes, qui ont les moyens financiers pour les mettre en place. Toutefois, cette démarche se fait en partie au détriment de la qualité proposée au consommateur. En effet, les nutriments présents dans le produit ne proviennent pas toujours uniquement des plantes utilisées. Parfois les compléments alimentaires sont enrichis par des molécules de synthèses de manière à garantir les teneurs affichées sur l'emballage. Cérébio désire donc rétablir une forme d'authenticité et mettre l'accent sur l'intérêt écologique et nutritionnel de ses méthodes de production, tout en garantissant les teneurs affichées, en opposition avec les procédés classiquement employés, notamment en terme de conservation des aliments.

2. Pasteurisation

Les microorganismes sont légions dans notre environnement. Ils sont bien souvent à l'origine d'altérations des aliments et d'intoxications alimentaires. La pasteurisation a donc pour but de détruire ces microorganismes pour prolonger la durée de vie de nos aliments tout en nous assurant une consommation sans danger pour notre santé. Dans l'idéal, la préservation des attributs gustatifs et nutritifs des aliments, comme le croquant, le goût ou les vitamines est également visée.

Bien souvent, les microorganismes proviennent des matières premières elles-mêmes. Ils sont présents à l'origine sur les plantes. Mais ils peuvent également être apportés par des facteurs extérieurs par le biais des installations industrielles ou de la manipulation par l'homme (par exemple au cours du conditionnement, de la pesée ou de la préparation des aliments) (Fernández-Segovia et al., 2014). L'eau courante qui entre dans la composition des produits peut également être une source de contamination. Pour donner un aperçu de l'importance de la sécurité sanitaire, les Etats-Unis dénombrent chaque année près de 5000 morts liées aux toxi-infections alimentaires et 76 millions de malades. Les trois quarts de ces maladies seraient causées par seulement 3 organismes pathogènes : *Salmonella*, *Listeria* et *Toxoplasma* (Mead, 1999).

Il faut distinguer la pasteurisation de la stérilisation. La pasteurisation assure l'élimination des champignons (levures et moisissures) et des bactéries sous leur forme

végétative tandis que la stérilisation est un procédé plus poussé, qui éradique également les bactéries sous forme sporulée. Selon la Food and Drug Administration (FDA), l'organisme américain en charge de la santé publique et qui régit la commercialisation des aliments et des médicaments, le traitement doit induire une réduction d'au moins 10^5 UFC/mL pour les jus de fruits soient acceptables sanitairelement parlant (U.S. Food & Drug Administration, 2001). Par ailleurs, il faut veiller à bel et bien détruire les microorganismes et non pas à les plonger dans un état de dormance, duquel ils peuvent sortir après s'être réparé ou une fois replacé dans des conditions de développement favorables.

2.1. Agents microbiens de la contamination alimentaire

2.1.1. Bactéries

Les agents pathogènes les plus fréquents dans l'agro-alimentaire sont (Figure 2): *Salmonella*, certaines espèces d'*Escherichia*, les *Staphylocoques*, *Listeria*, *Clostridium*, *Campylobacter*, *Vibrio* et *Aeromonas*. Les fruits et légumes sont particulièrement concernés par *Erwinia*, *Pseudomonas* et *Corynebacterium*, les deux derniers pouvant être pathogènes pour l'homme (Madigan et al., 2007). Le développement des microorganismes est conditionné par différents paramètres, comme la température, le pH ou l'activité de l'eau (a_w , qui correspond à la disponibilité de l'eau dans l'aliment et non à sa teneur dans l'aliment). Pour chaque genre, il existe des conditions optimales de croissance. Globalement, un milieu à 20°C avec un pH compris entre 6,5 et 7,5 et une disponibilité de l'eau comprise entre 0,99 et 0,995 est très satisfaisant pour le développement de la plupart des organismes.

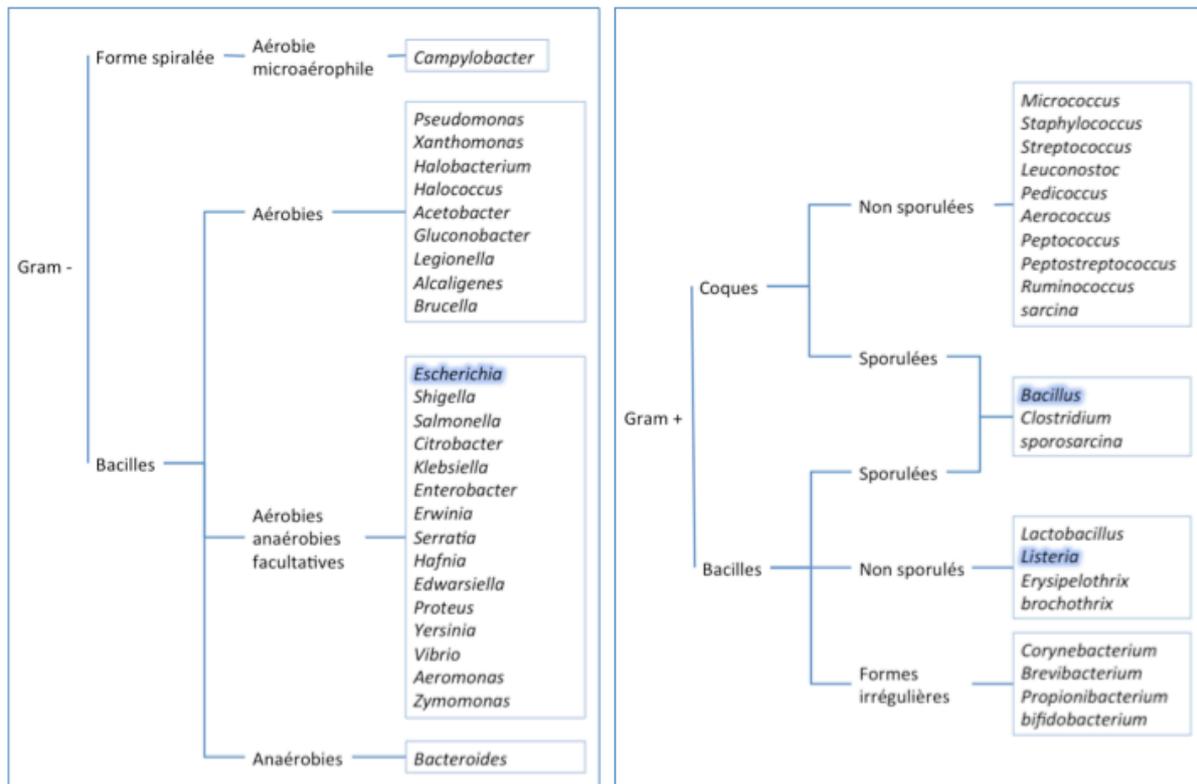


Figure 2 : Principaux genres de bactéries impliqués dans les produits alimentaires (Leveau et al., 2001)

2.1.1.1. Forme végétative

Les bactéries sont des microorganismes procaryotes (c'est à dire sans noyau) composés :

- D'une paroi bactérienne qui assure une certaine rigidité cellulaire et la maîtrise de la pression intracellulaire ; elle se compose principalement de polysaccharides (peptidoglycane). Elle peut être détruite par action enzymatique par exemple.
- D'une membrane cytoplasmique assez fine (de l'ordre de 8 nm) faite de bicouches de phospholipides et de protéines transmembranaires, elle constitue une barrière perméable, assurant le passage des nutriments, mais elle permet aussi une conservation de l'énergie protomotrice.

Les bactéries à Gram positif possèdent une paroi plus épaisse, composée à 90% de peptidoglycane. A contrario, la paroi des bactéries à Gram négatif n'en contient que 5 à 20%, le reste est constitué de lipoprotéines et d'une membrane externe, aussi nommée couche lipopolysaccharidique (Madigan et al., 2007). La différence entre les bactéries à Gram (+) ou (-) est schématisée sur la Figure 3. Outre cette distinction, les bactéries peuvent également adopter des morphologies différentes. Elles seront soit sphériques (les coques),

soit cylindriques (les bacilles). En revanche quelque soit leur forme, leur taille est généralement de l'ordre du micromètre.

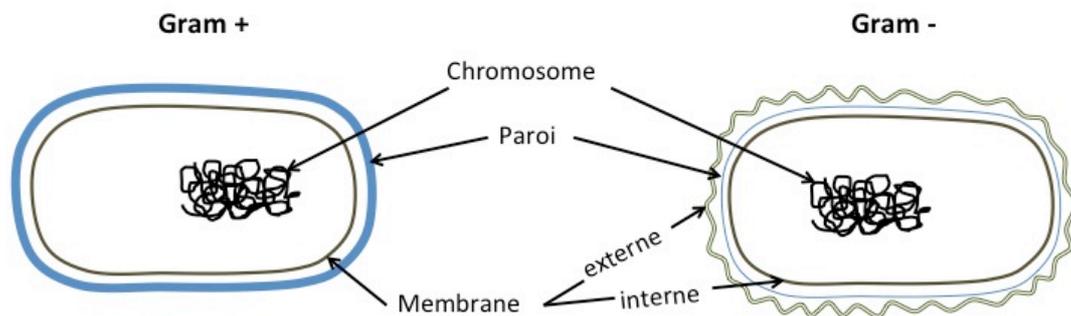


Figure 3 : Comparaison des structures des bactéries à Gram (+) et (-) (Madigan et al., 2007)

2.1.1.2. Forme sporulée

Les spores, aussi nommés endospores, sont des formes particulièrement résistantes, assurant la survie de la bactérie dans un environnement défavorable à son développement. De ce fait, la forme sporulée, est hautement résistante à la chaleur, aux radiations, aux pénuries de nutriments, etc... Une vingtaine de genres est capable de sporuler, les principaux étant les *Bacillus* et les *Clostridium* (Madigan et al., 2007). Ce sont ces formes résistantes, en état de dormance, qui représentent un réel enjeu pour la stérilisation.

La spore possède une structure particulière, représentée sur Figure 4, composée :

- D'une partie centrale (le cœur): fortement déshydraté (10 à 20% d'eau) donc très résistante à la chaleur et qui contient tout le matériel cellulaire ;
- D'un cortex très épais composé de couches de peptidoglycanes, empêchant l'hydratation du cœur ;
- Des tuniques sporales : dont la composition est spécifique à chaque spore ;
- D'exosporium : une fine couche de protéines.

C'est la présence d'acide dipicolinique, qui abaisse la disponibilité de l'eau, garantissant ainsi la déshydratation de la spore et donc sa résistance à la chaleur. Le processus de sporulation est réversible. A partir du moment où les spores sont replacées dans des conditions de croissance favorables, elles peuvent germer pour revenir au stade de cellule végétative et se multiplier à nouveau.

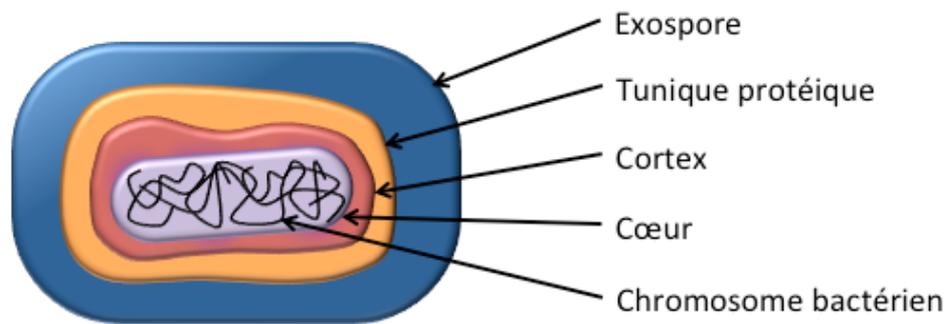


Figure 4 : Représentation schématique de la structure d'une spore

2.1.2. Levures et moisissures

Contrairement aux bactéries, les levures et les moisissures, appartiennent à la catégorie des micro-organismes eucaryotes, c'est à dire qu'ils possèdent un noyau entouré d'une membrane. De plus, ces organismes possèdent des parois composées de 80 à 90% de polysaccharides.

Les moisissures se développent quasi exclusivement dans des conditions d'aérobies, avec une humidité suffisante et au détriment d'un fond nourrissant riche. Elles jouent un rôle non négligeable dans la dégradation des fruits et légumes. Certaines souches peuvent produire des mycotoxines responsables de maladies (comme *Aspergillus flavus* source de maladies pulmonaires). A l'inverse, d'autres moisissures, comme les souches de *Penicillium*, sont très utiles en fromagerie ou pour la production d'antibiotiques (Leveau et al., 2001).

Les levures sont unicellulaires et se reproduisent par bourgeonnement. Elles sont beaucoup plus grosses que les bactéries (une dizaine de μm contre 1-3 μm pour les bactéries) et possèdent de nombreux organelles (Figure 5), comme les mitochondries, qui assurent leur fonctionnement. Pour leur développement, elles sont capables de métaboliser le sucre, que ce soit en aérobiose ou par fermentation (en l'absence d'air). Elles sont également acido-tolérantes (gamme de tolérance de pH de 1,5 à 8,5) (Leveau et al., 2001). Les levures métabolisant les sucres en anaérobiose sont très prisées dans l'industrie agro-alimentaire pour la fabrication du pain, de la bière ou du vin. C'est notamment le cas de *Saccharomyces cerevisiae*, la levure de boulangerie, qui a été particulièrement étudiée dans la littérature.

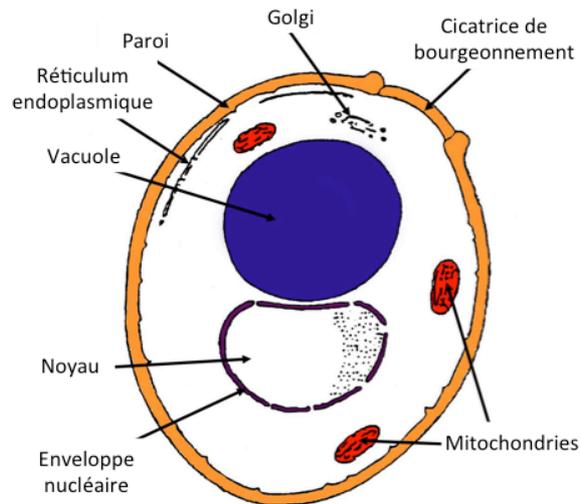


Figure 5 : Représentation schématique de la structure d'une levure (source : <http://www.viticulture-oenologie-formation.fr/vitienoformlycee/lexique/l/photos/schema-levure.jpg>)

2.2. Techniques d'assainissement, stabilisation et conservation

Historiquement, l'homme a eu recours au salage et au fumage pour conserver sa nourriture, privant ainsi les microorganismes d'un des éléments indispensables à leur survie et leur prolifération : l'eau. Depuis, de nombreuses autres méthodes ont été développées reposant sur différents principes. Le terme de stérilisation est employé de manière abusive et ne s'applique en réalité qu'à un cas particulier de traitement thermique.

Il n'existe pas de classification officielle particulière pour les techniques de conservations. D'une part, il est possible de classer les méthodes selon la nature de l'agent mis en œuvre :

- Traitement thermique : la température qu'elle soit très basse ou élevée, permet d'assurer la stabilité des aliments
- Traitement chimique : dès que l'on rajoute une molécule à l'aliment traité (conservateur, sel ...)
- Traitement physique : il s'agit là de tous les autres procédés qui n'ont pas ouvertement recours à la température ou qui relève de procédés mécaniques (Aubineau, 2014)

Mais si tous ces traitements assurent la maîtrise des risques biologiques, ils n'agissent pas de la même manière sur la population de microorganismes. Quatre modes d'action se distinguent alors :

- Inhibition de la croissance microbienne grâce à des conditions défavorables aux microorganismes visés : température, pH, faible disponibilité de l'eau, adjonction de molécules chimiques (les conservateurs)...
- Destruction des micro-organismes : soit par voie thermique (la plupart du temps) ou par désinfection à l'aide de produits chimiques pour les surfaces et ustensiles en contact avec les aliments
- Elimination des micro-organismes : on les retire donc des aliments bien souvent par filtration, cette méthode concerne également l'air environnant la fabrication des produits alimentaires
- Mise en compétition des microbes pathogènes avec de « bonnes bactéries ». On parle alors d'antagonisme (Leveau et al., 2001) (Biton, 1997)

Enfin, plutôt qu'un classement, un référencement des produits alimentaires a été défini en fonction de la technique de conservation utilisée (Tableau 1). Cette notion de gamme a été définie par divers acteurs tels que les agriculteurs pour la 4^{ème} gamme ou les restaurateurs pour la 5^{ème} gamme. Il s'agit uniquement de notions et cela ne possède aucune valeur juridique ou réglementaire.

Tableau 1 : Les gammes de produits (Bimbenet, 1998)

Gamme	Principe	Produits
1 ^{ère} gamme	Conservation à température ambiante ou froid positif	Produits crus : fruits, légumes, poissons, viandes
2 ^{ème} gamme	Pasteurisation, stérilisation	Tous produits (cuisinés ou non)
3 ^{ème} gamme	Surgélation (conservation au froid négatif)	Tous produits (cuisinés ou non)
4 ^{ème} gamme	Conservation au froid positif en atmosphère modifiée ou non	Produits végétaux crus (salades prêtes à l'emploi)
5 ^{ème} gamme	Conservation au froid positif	Produits carnés et végétaux cuisinés et cuits
6 ^{ème} gamme	Séchage	Soupes et plats cuisinés Aliments à humidité intermédiaire

2.2.1. Traitements par la chaleur

Le traitement thermique est aujourd'hui la technique de conservation de longue durée la plus répandue. Elle vise à la destruction des microorganismes et elle est considérée comme la technique la plus économique. Cependant si la qualité sanitaire est assurée par un traitement thermique intense, les qualités nutritionnelle (vitamines, acides aminés...) et organoleptique (couleur, goût et texture) sont altérées. L'application de la chaleur peut

entraîner la rupture des liaisons hydrogènes et donc la perte de la structure secondaire des protéines, causant ainsi la destruction des constituants d'intérêts biologiques.

L'avantage de cette méthode, est qu'elle peut s'appliquer soit aux aliments en vrac (à condition de les conditionner ensuite de manière stérile), soit directement sur les produits emballés. Les microorganismes sont détruits par l'application de chaleur. Les dégâts imposés sont irréversibles, aucune reprise de la croissance microbienne n'est envisageable. Moins un produit est contaminé initialement, plus il est facile et rapide d'atteindre la stérilité pratique, aussi nommée stérilité commerciale. Elle correspond à une contamination résiduelle tolérable (probabilité de tomber sur une spore de *Clostridium botulinum* réduite à 1 chance sur 10^9) tant du point de vue sanitaire qu'économique, organoleptique et nutritionnel (Leveau et al., 2001). Le risque de contamination est statistiquement improbable.

2.2.1.1. Pasteurisation

Lors d'une pasteurisation, une température comprise entre 70 et 100°C est imposée et suivie d'un refroidissement brutal. La température minimale pour la pasteurisation est de 55°C. Il s'agit d'un traitement thermique court à basse température. Seuls les bactéries, sous forme végétatives, les champignons et les virus seront affectés. Une flore résiduelle est donc présente, obligeant ainsi à stocker les produits pasteurisés au froid (autour de 4°C) sur une assez courte durée (de l'ordre de quelques jours à quelques semaines).

2.2.1.2. Stérilisation

La stérilisation quant à elle, correspond à un traitement beaucoup plus poussé qui éradique en plus les formes sporulées, beaucoup plus résistantes. Le produit est alors exempt de microorganismes viables. Pour atteindre de telles exigences, des conditions opératoires plus rudes allant au-delà des 100°C sont nécessaires. L'appertisation est une technique de stérilisation assez pérenne (les produits peuvent se conserver de 2 à 5 ans). Cette fois-ci, les aliments sont chauffés à une gamme de température comprise entre 115 et 140°C, la température de référence étant 121,1°C. Ce traitement thermique est complété par un conditionnement étanche qui préserve les aliments de l'air et bien souvent de la lumière. Cette technique évolue de plus en plus vers des traitements thermiques haute température/temps court, mais pour les produits liquides uniquement.

2.2.1.3. Ultra Haute Température

Le traitement à Ultra Haute Température est principalement connu pour son usage sur le lait. Il est chauffé à une température supérieure à 135°C grâce à un lit de vapeur surchauffée sur une très courte période (1 à 5 secondes) avant d'être refroidi brutalement sous vide. Cette méthode permet une conservation longue (de plusieurs mois) à température ambiante mais entraîne une altération du goût par rapport au produit frais (Biton, 1997).

Les différentes techniques de conservation par la chaleur sont récapitulées et comparées dans le Tableau 2.

Tableau 2 : Comparatif des méthodes de conservation par la chaleur

Procédé	Type de traitement	Mode d'action	Avantages	Inconvénients	Exemple d'aliments
Pasteurisation	Thermique chaud	Destruction	Conservation macro-nutriments et vitamines	Durée de vie limitée Stockage au froid	Lait Charcuterie Plats cuisinés sous vide
Appertisation	Thermique chaud	Destruction	Praticité Très longue conservation à T_{amb}	Modification des saveurs, perte de couleurs	Conserves Bocaux Briques
UHT	Thermique chaud	Destruction	Longue conservation à T_{amb}	Modification saveur	Lait

2.2.1. Traitements par le froid

Contrairement aux traitements thermiques à chaud, ceux à froid n'assurent pas une destruction des microorganismes. Ils inhibent simplement leur croissance en imposant une température défavorable à leur développement. Comme cela a été évoqué précédemment, chaque microorganisme possède des conditions de développement préférentielles. Ainsi, si la température de stockage est inférieure à 3°C, la croissance se ralentit voire est totalement bloquée. Cependant comme la flore microbienne est simplement en dormance, une reprise de la prolifération est possible, si le produit est de nouveau placé à températures modérées (25 à 30°C).

2.2.1.1. Réfrigération

Dans le cadre de la réfrigération, la température imposée est comprise entre 2 et 8°C. Dans ces conditions, les aliments ne se conservent que quelques jours car on se contente de

ralentir le métabolisme des microorganismes. C'est un moyen de prolonger légèrement la durée de vie des produits conservés par d'autres méthodes après leur ouverture.

2.2.1.2. Surgélation et congélation

Lors de la surgélation, la température au sein de l'aliment est abaissée brutalement à -40°C , de manière à former de fins cristaux d'eau, avant d'être ramenée à -18°C . La présence d'eau sous forme cristallisée, la rend moins disponible pour les microorganismes. Leur développement s'en retrouve momentanément stoppé, jusqu'à la décongélation de l'aliment pour sa consommation. Pour ce faire, plusieurs dispositifs sont employés :

- des tunnels de congélation qui soufflent de l'air pulsé pour refroidir, procédé simple et modulable ;
- des plaques dans lesquelles circule le fluide calorifique, cette méthode ne permet pas la production en continu ;
- des liquides cryogéniques (N_2 ou CO_2 liquides) dans lesquels les aliments sont directement plongés, efficace mais très onéreux.

Bien souvent, les aliments sont blanchis avant d'être surgelés. Cette étape permet de détruire les enzymes et ainsi préserver la couleur et la saveur des produits. Malheureusement, cette étape engendre une perte en vitamines. Grâce à la surgélation, les aliments sont conservés à long terme, pouvant aller de plusieurs mois à 2 ans (Amrouche, 2010). La comparaison des techniques de conservation par le froid est donnée dans le Tableau 3.

Tableau 3 : Comparatif des méthodes de conservation par le froid

Procédé	Type de traitement	Mode d'action	Avantages	Inconvénients	Exemple d'aliments
Réfrigération	Thermique froid	Inhibition (basse T)	Prolonge durée de vie	Conservation courte Respect chaîne du froid	Aliments frais Toute denrée périssable
Congélation	Thermique froid	Inhibition (basse T, $\searrow a_w$)	Durée de conservation plus longue	Altération texture Respect chaîne du froid	Légumes, poisson, viande, plats préparés...
Surgélation	Thermique froid	Inhibition (basse T, $\searrow a_w$)	Préservation texture et saveur Praticité		Légumes, poisson, viande, plats préparés...

2.2.2. Traitements par réduction de l'activité de l'eau (a_w)

Les méthodes par séchage reposent sur une réduction de la disponibilité de l'eau pour les microorganismes. En les privant totalement ou partiellement de cet élément essentiel à

leur croissance, leur croissance est inhibée. Dans le cadre de la conservation d'aliments à température ambiante, l'Europe admet un seuil maximal d' a_w de 0,91. Il peut être augmenté à 0,95 s'il est associé à un pH inférieur ou égal à 5,2. Cependant, si la conservation est effective, le produit n'est pas aseptique pour autant et des microorganismes sont toujours présents (Leveau et al., 2001).

2.2.2.1. Séchage

Le séchage est une opération de séparation qui va permettre de retirer tout ou une partie de l'eau contenue dans la matrice alimentaire à conserver. Il existe plusieurs technologies disponibles pour les opérations de séchage. Le principal paramètre à prendre en compte est l'état initial du produit : est-il liquide, pâteux ou solide ? Le Tableau 4 résume les techniques de séchages adéquates selon l'état initial de la matrice.

Tableau 4 : Choix des techniques de séchages selon le type de matrice (Arlabosse, 2008)

Etat	Techniques de séchage
Liquide	<ul style="list-style-type: none"> • par pulvérisation (avec un atomiseur ou des lits fluidisés) • avec un sécheur cylindre
Humide Pâteux	<ul style="list-style-type: none"> • sécheur à palettes • sécheur à couche mince • sécheur pneumatique compact
Solide	<ul style="list-style-type: none"> • des tunnels qu'ils soient à claies, à balancelles ou à tapis. • des sécheurs à tambours ou à plateaux • des sécheurs à lit fluidisé : les particules solides sont mises en suspension par un flux d'air sec et chaud de manière à ce qu'elles se comportent comme un fluide • des sécheurs pneumatiques : la charge est transportée et séchée simultanément par un flux d'air chaud à co-courant • des sécheurs à disques ou vis : de préférence pour les poudres

2.2.2.2. Lyophilisation

La lyophilisation est une opération de déshydratation à basse température et sous vide qui permet de préserver l'aspect et la forme des produits tout en conservant une bonne partie des propriétés organoleptiques. Le produit est tout d'abord congelé avant d'être déshydraté par sublimation de l'eau cristallisée et désorption finale de la quantité d'eau résiduelle, non congelée (10 à 30% de l'eau du produit). L'inconvénient majeur de cette technique est son fonctionnement en discontinu. Les volumes de production sont donc plus faibles et son coût plus élevé. Par ailleurs, comme les produits obtenus sont très hygroscopiques, le conditionnement doit se faire dans un emballage étanche et sous atmosphère contrôlée. Selon les conditions opératoires (en particulier la température de chauffe lors de la dessiccation et la pression opératoire) le temps de lyophilisation sera plus

ou moins long. La zéodratation est une méthode dérivée, basée sur les mêmes principes mais ayant recours à des zéolithes (minéraux microporeux très adsorbants) pour capter l'eau (Marin and René, 2000).

2.2.2.3. Traitements traditionnels et historiques

Les techniques traditionnelles (Tableau 5) de salage, confisage et fumage, sont également basées sur la réduction de la disponibilité de l'eau. L'eau est alors remplacée ou associée à d'autres molécules (graisse, sucre...) possédant parfois des propriétés antiseptiques (alcool, vinaigre). Les microorganismes se retrouvent donc dans un milieu défavorable à leur développement. L'ajout de solutés comme les sucres ou le sel permet aussi de jouer sur la pression osmotique. Par exemple, les sirops affichent des croissances microbiennes très faibles car ils sont saturés en sucre. Les produits conservés au vinaigre offrent une double efficacité. Ils allient d'une part, une baisse de l'activité de l'eau et d'autre part, un pH très faible. En effet, le pH, couplé à l'action des acides faibles qui viennent perturber le bon fonctionnement de la cellule via une baisse du pH interne, entraîne également une diminution significative de la croissance bactérienne. Attention toutefois, les levures sont pour la plupart acido-résistantes. Les confitures sont un autre exemple judicieux de combinaison de facteurs inhibiteurs. Elles cumulent un pH bas, une concentration très élevée en sucre, une perte d'eau et un traitement thermique.

Tableau 5 : Comparatif des procédés de conservation par séchage

Procédé	Type de traitement	Mode d'action	Avantages	Inconvénients	Exemple d'aliments
Déshydratation Séchage	Physique	Inhibition de la croissance (Δa_w)	Longue conservation, texture particulière	Coûteux altération goût et vitamines	Pâtes, Fruits
Lyophilisation	Physique	Inhibition ($\emptyset O_2$, Δa_w)	Conservation forme, aspect, propriétés organoleptiques	Coûteux Faible productivité	Produits haute valeur ajoutée (champignons, café)
Salage Saumurage	Chimique	Inhibition (Δa_w)	Goût caractéristique	Altération protéine, glucide et lipide possible	Fromages, harengs
Confisage	Chimique	Inhibition (Δa_w)	Longue conservation		Confit d'oie confiture
Fumage	Chimique	Inhibition (Δa_w , molécule antiseptique)	Aromatisation, coloration		Charcuterie

2.2.3. Autres méthodes industrielles

2.2.3.1. Conditionnement sous atmosphère protectrice

Les procédés de conditionnement sous atmosphère protectrice privent les bactéries d'oxygène. Ainsi toutes les bactéries qui en ont besoin pour leur développement sont bloquées. Cette technique permet de limiter les réactions d'oxydations. On préserve ainsi une bonne part des lipides, des protéines et des polyphénols. En fonction des aliments concernés, différents gaz sont utilisés. Pour maintenir la teinte rouge de la viande, on opte pour une atmosphère majoritairement composée d'oxygène. Au contraire, ce type d'atmosphère fera moisir le pain plus facilement. Les produits de boulangerie sont donc conservés avec du CO₂ et de l'azote. Les légumes et les fruits sont isolés dans une atmosphère composée à 90% d'azote (source : <http://www.atmosphereprotectrice.fr/sitecore/content/MAP/Home/Applications.aspx>).

2.2.3.2. Filtration stérilisante

La filtration stérilisante agit par élimination physique des microorganismes dont la taille est supérieure ou égale à 0,22 µm. Le germe de référence est *Pseudomonas diminuta* qui fait une taille de 0,3 µm. La membrane utilisée sert de barrière matérielle permettant le passage sélectif de certains composés du milieu à traiter sous l'action d'une force motrice (différence de pression ou de concentration). Dans le cas de la filtration membranaire (microfiltration de 10 nm à 10 µm, ultrafiltration de 1 à 20 nm ou nanofiltration de 0,1 à 1 nm), la membrane est une structure poreuse avec des pores dont la taille varie en fonction des solutés ou particules à retenir. Cette technique, purement mécanique ne peut s'appliquer que dans le cas où le produit ne contient pas de substances colloïdales ou de matières insolubles. Par ailleurs, le colmatage est très fréquent voire inévitable, engendrant des coûts additionnels (immobilisation de la chaîne de production, nettoyage long et coûteux, perte de matières premières...) (Aimar and Daufin, 2004).

2.2.3.3. Fermentation

La fermentation fait intervenir un microorganisme identifié (levure ou bactérie), qui en se développant dans le milieu à conserver, va le modifier. A chaque fois, c'est soit la présence d'alcool ou un pH relativement faible qui inhibent le développement de la flore

microbienne. Ce type de technique concerne un champ d'applications assez restreint. Il se limite à la fermentation alcoolique (le vin), la fermentation lactique (qui intervient dans les choucroutes, les cornichons ou les fromages) et la fermentation acétique (pour le vinaigre).

2.2.3.4. Ajout de conservateurs

Enfin le moyen le plus simple consiste à ajouter des molécules bactéricides. C'est le rôle des conservateurs. Le sel, la graisse et la fumée sont des conservateurs « historiques ». Désormais, une large gamme de conservateurs alimentaires est disponible, qu'ils soient d'origine naturelle (acide acétique du vinaigre, acide ascorbique des citrons...) ou synthétique (sulfite de sodium, benzoate de sodium...). Comme ces derniers sont de plus en plus décriés, la tendance actuelle est aux molécules possédant naturellement des propriétés conservatrices, comme c'est le cas pour beaucoup d'huiles essentielles.

Tableau 6 : Comparatif des techniques de conservation

Procédé	Type de traitement	Mode d'action	Avantages	Inconvénients	Exemple d'aliments
Conditionnement sous vide ou atmosphère modifiée	Physique	Inhibition ($\emptyset O_2$)	Conservation aspect et propriétés produits frais	Maîtrise du processus de conditionnement	Viande fraîche Fruits et légumes Boissons
Filtration / Séparation par Membranes	Physique	Séparation	Préserve propriétés nutritionnelles	Limité aux produits sans particule Risque de colmatage	Produits pharmaceutiques Vin Lait
Fermentation	Chimique	Inhibition (\searrow pH)	Goût particulier	Modification matière première	Vin Choucroute Vinaigre Yaourt
Conservateur	Chimique	Inhibition	Limite réactions de dégradations	Mauvaise réputation	Plats préparés Boulangerie industrielle

2.2.4. Méthodes émergentes et techniques d'intensification

La préservation des principes actifs (nutriments, vitamines et minéraux) ainsi que des propriétés organoleptiques (goût, texture, couleur...) sont devenus des enjeux marketing important pour attirer un consommateur de plus en plus exigeant. C'est pourquoi les industriels se penchent de plus en plus sur les traitements athermiques pour la conservation longue durée par destruction ou élimination physique des agents biologiques pathogènes ou d'altération. La tendance actuelle est aux combinaisons de plusieurs techniques, en général douce. C'est ce que l'on appelle les « hurdle technologies ». Elles sont répertoriées dans le Tableau 7 avant d'être évoquées plus en détails dans les paragraphes suivants.

Tableau 7 : Comparatif des procédés de conservation athermiques émergents

Procédé	Type de traitement	Mode d'action	Avantages	Inconvénients	Exemple d'aliments
Ionisation	Physique	Destruction	Bonne conservation qualité nutritionnelle	Cher Action superficielle Modification couleur Arrière-goût	Epices
Lumière pulsée	Physique	Destruction		Action superficielle	Emballage
Champ Electrique Pulsé	Physique	Destruction		Pas applicable sur produits avec particules ou bulles d'air	Produits liquides (lait, yaourt, soupes, jus...)
Microondes	Physique	Destruction	Bonne préservation des actifs	Relativement cher	Aliments liquides (jus de fruits, lait...)
Ultrasons	Physique	Destruction	Adapté aux grands volumes	Limité aux produits sans particule	Jus de fruits Sauce, purée
Haute pression (pascalisation)	Physique	Destruction	Préserve vitamine Faible modification goût et couleur	Coûteux Batch	Jus de fruits Salades, entrées Huîtres
CO ₂ Supercritique	Physique	Inhibition Destruction		Investissement onéreux	Jus de fruits Viandes

2.2.4.1. Rayonnements ionisants

Au cours d'un procédé de pasteurisation par ionisation, les aliments sont exposés à des rayonnements électromagnétiques (rayons X, UV, γ) qui dégradent le matériel cellulaire essentiel (fragmentation de l'ADN, constituants des membranes et du cytoplasme...). Cette méthode éradique les contaminations de surface. Du fait de la peur du consommateur face à la radioactivité (on pense tous aux accidents nucléaires comme Tchernobyl ou Fukushima), cette technique a assez mauvaise presse. Elle est pourtant fortement encadrée. Seules certaines sources de rayonnement peuvent être utilisées et seuls certains produits particulièrement sensibles peuvent y être soumis. Par ailleurs, elle permet une bonne conservation des propriétés organoleptiques et nutritionnelles des denrées alimentaires tant qu'elle est utilisée à faibles doses. La stérilisation des emballages passe souvent par cette méthode (Morris et al., 2007).

2.2.4.2. Lumière visible pulsée

La lumière visible pulsée présente un inconvénient majeur : son faible taux de

pénétration. Seules les couches superficielles d'un produit peuvent être stérilisées par ce procédé. Ils agissent par dénaturation de l'ADN et des enzymes. En revanche, cette technique remplace avantageusement l'usage de produits chimiques (le peroxyde d'hydrogène ou l'acide peracétique) dans la stérilisation des emballages (Elmnasser et al., 2007; Gómez-López et al., 2007).

2.2.4.1. Champs électriques pulsés

Les champs électriques pulsés permettent une pasteurisation des aliments liquides pompables. Ils facilitent la formation et élargissent les pores des membranes cellulaires via des pulses électriques de très forte intensité (15000V/cm pour la nourriture et 35 000V/cm pour de la désinfection de surface). La perméabilité de la cellule s'en trouve affectée. Elle relargue alors son contenu cellulaire, provoquant la mort cellulaire. Cependant, cette technique présente de nombreux désavantages. Elle ne peut pas être utilisée sur les produits contenant des bulles d'air ou les suspensions de particules solides sous peine de causer un claquage diélectrique (Morris et al., 2007). Par ailleurs, le chauffage ohmique résultant des pulses peut entraîner une chauffe du milieu traité. Il faut donc un système de refroidissement pour maintenir la bonne température. De plus, les électrodes plongent dans le liquide alimentaire et se désagrègent au fil des utilisations. C'est une source de contamination du système. Enfin, l'investissement initial reste très coûteux (Doona et al., 2010).

2.2.4.1. Ultrasons

Les ultrasons (US) détruisent les bactéries grâce à la cavitation (formation de bulles de gaz dans un liquide soumis à une dépression). Cette technique qui permet de traiter de grand volume de liquide est plus efficace lorsqu'elle est couplée à d'autres technologies. Cependant elle n'est pas adaptée pour les aliments contenant des particules colloïdales (Morris et al., 2007).

2.2.4.2. Micro-ondes

Les micro-ondes peuvent être un procédé de stérilisation ou de pasteurisation. Les traceurs de qualité (comme de la conservation de la vitamine C, du goût ou encore de la couleur) dans cette méthode sont similaires à ceux d'un traitement thermique classique. Les composés thermolabiles, comme les anthocyanes ou d'autres molécules antioxydantes, sont quant à eux mieux préservés, du fait de la brièveté du traitement (Perino and Chemat, 70

2015).

2.2.4.1. Hautes pressions

Les hautes pressions représentent une technologie très onéreuse, qui ne permet que la destruction des formes végétatives. Les pressions appliquées, variant entre 1000 et 10000 bar, rompent les liaisons non-covalentes et endommagent les membranes cellulaires. Cette technique s'adapte aussi bien aux aliments liquides que solides, qu'ils soient déjà emballés ou non. Les hautes pressions constituent principalement un moyen de pasteurisation à froid. En utilisant les hautes pressions (5000 à 7000 bar) associée à une température de 90 à 110°C, on parvient à détruire les cellules végétatives de *Clostridium botulinum* (Doona et al., 2010; Morris et al., 2007; Oliveira et al., 2015; Shieh et al., 2009).

2.2.4.2. CO₂ supercritique

Le CO₂ supercritique (CO₂-sc) est développé comme moyen de stérilisation et de pasteurisation des solides (aliments, instruments chirurgicaux) ou des liquides (aliments et produits pharmaceutiques). Une pasteurisation efficace est possible sur une gamme de pression de 80 à 150 bar et pour des températures modérées comprises entre 35 et 60°C. Plusieurs publications font état d'une éradication satisfaisante d'endospores grâce au CO₂-sc (Enomoto et al., 1997a)(Ishikawa et al., 1997)(S. Spilimbergo et al., 2003) mais elle requiert des températures d'au moins 70°C. Devant la résistance accrue de ces formes, la technique la plus simple consiste à faire d'abord germer les spores pour détruire ensuite la forme végétative.

Le CO₂ cumule plusieurs avantages. Il est bon marché et disponible, sa température critique est faible, il est non toxique et relativement inerte. En revanche, le CO₂-sc nécessite un investissement (équipement) lourd et souvent l'utilisation de co-solvant, comme le peroxyde d'hydrogène, pour améliorer son efficacité notamment en terme de stérilisation (White et al., 2006; Zhang et al., 2006). Ce procédé sera abordé plus en détails dans la suite de ce manuscrit.

2.3. Grandeurs comparatives

Afin de comparer l'efficacité de traitements et la résistance des microorganismes entre eux, l'industrie à recours à des grandeurs particulières : réduction décimale, constante de

vitesse de réduction thermique, temps de destruction thermique. Seule la réduction décimale a été utilisée au cours de ces travaux.

2.3.1. Taux de réduction décimale

Le moyen le plus simple de déterminer l'efficacité d'un procédé, indépendamment des conditions opératoires, est de calculer la réduction logarithmique ou réduction décimale donnée par la relation suivante :

$$n = \log_{10} \frac{N}{N_0} \quad (1)$$

avec N : population microbienne après traitement et N_0 population microbienne avant traitement. Plus cette valeur est importante, plus le procédé est efficace. On peut aussi parler de taux de mortalité :

$$\frac{N_0 - N}{N_0} \quad (2)$$

2.3.2. Barèmes de stérilisation

La stérilité absolue n'existe pas. Une stérilité commerciale est définie et est considérée comme acceptable pourvu que le couple temps-température (barème) appliqué garantisse une probabilité de présence en bactéries pathogènes vivantes suffisamment faible pour que les risques de contamination soient négligeables (Gkogka et al., 2013; Leveau et al., 2001). A titre d'exemple, pour les fruits et légumes, la réglementation (Règlement (CE) n°2073/2005 du 15 novembre 2005) impose une absence totale de *Salmonella* et de *L. monocytogenes* dans 25 g de produit. La présence de *E. coli* est tolérée entre 100 UFC/g et 1000 UFC/g. Les microorganismes les plus résistants sont pris pour référence dans les calculs. En effet, les microbiologistes partent du principe que si le microorganisme le plus résistant est détruit, les autres, qui sont plus sensibles, le seront aussi. Pour la pasteurisation, *Enterococcus faecalis* sert de modèle, tandis que les spores de *Clostridium botulinum* seront considérés pour de la stérilisation.

2.4. Et pour les compléments alimentaires ?

Après avoir passé en revue une liste non exhaustive des méthodes de conservation, on est en droit de se demander ce qu'il en est pour les compléments alimentaires. Quelles techniques peuvent être utilisées dans ce cas précis ? En effet, il s'agit de produits particulièrement sensibles. D'une part, ils doivent garantir une haute teneur en vitamines et

nutriments mais d'autre part, ils doivent aussi assurer la sécurité sanitaire du consommateur.

Etonnamment, c'est l'autoclavage qui est la technique couramment admise pour les compléments alimentaires liquides. Il s'agit d'un traitement thermique poussé qui permet d'accomplir une stérilisation (destruction des cellules végétatives et sporulées). Les liquides à traiter sont placés dans des cuves puis chauffés et mis sous pression pour une durée définie. Selon la quantité et le type de produit on peut trouver :

- un chauffage de 2 à 3 h entre 60-70°C
- ou un chauffage de 30 à 45 minutes entre 89 et 95°C.

Cependant, de telles conditions engendrent des dénaturations du produit traité, un impact négatif sur les propriétés organoleptiques et nutritionnelles des aliments.

3. Molécules bioactives d'intérêt

Depuis longtemps déjà les populations sont conscientes des conséquences que peuvent avoir une carence en vitamines. Prenons l'exemple des marins aux XVII et XVIII^e siècle, qui embarquaient des quantités d'oranges et de citrons pour se prémunir du scorbut. Ils comblaient sans le savoir une carence en vitamine C. De nos jours, nous sommes particulièrement sensibilisés sur l'importance d'avoir une alimentation variée et équilibré pour apporter à notre corps tout dont il a besoin pour se développer et s'entretenir sainement. L'ANSES est là pour établir les apports nutritionnels conseillés et veiller à notre santé. Ainsi chacun sait ou peut savoir précisément ce dont il a besoin. Voilà pourquoi les compléments alimentaires suscitent un tel engouement. Grâce à leur richesse en micronutriments, ils offrent une forme de compensation à nos modes de vie ou nos habitudes alimentaires pas toujours idéaux. Ils permettent de réguler ou de combler nos lacunes et apportent un coup de pouce pour surmonter des situations passagères exigeantes, comme une grossesse ou la rémission après une longue maladie.

3.1. Vitamines

Les vitamines sont des substances organiques de faible poids moléculaire sans valeur énergétique propre. Cependant elles sont nécessaires à notre organisme, qui est incapable de les synthétiser lui-même (hormis la vitamine D). Il est donc indispensable d'avoir un

apport exogène de vitamines via notre alimentation. Les vitamines sont au nombre de 13. Leurs structures chimiques sont très hétérogènes et elles sont différenciées en fonction de leur solubilité. D'une part sont regroupées les vitamines hydrosolubles (le groupe B et la vitamine C) et d'autre part sont rassemblées les vitamines liposolubles (A, D, E et K) stockées dans le foie et les tissus adipeux. Le Tableau 8 liste les propriétés physico-chimiques particulières des vitamines ainsi que leurs principales sources dans notre alimentation.

Tableau 8 : Récapitulatif des vitamines et de leurs propriétés

Vitamine		Principales sources alimentaires	Propriété physico-chimique	Rôle physiologique
A (rétinol)		Foie Produits laitiers	Sensible à lumière, oxygène, acidité	Métabolisme cutané et rétinien
Groupe B	B ₁ (thiamine)	Viandes rouges	Sensible à l'irradiation (UV) fragile en milieu aqueux et alcalin	Rôle de transporteur
	B ₂ (riboflavine)		Instable en milieu basique Sensible à lumière et UV Stable à chaleur et oxygène	
	B ₃ = PP (nicotiamide)		Stable à la lumière, chaleur et oxygène	
	B ₅			
	B ₆			
	B ₈ = H (biotine)		Oxydable Sensible aux UV	
	B ₉ (folate)		Sensible à lumière + UV, acides, bases, oxydants et réducteurs Stable à chaleur et oxygène	
	B ₁₂	Sensible à lumière + UV Stable à air, chaleur		
C (acide ascorbique)		Fruits et légumes	Oxydable (accélééré par chaleur, milieu basique, métaux)	Métabolisme membranaire Rôle hormonal Rôle de protection
D		Produits laitiers Huiles de poissons	Sensible à lumière, oxygène, acidité Assez stable à la chaleur	Métabolisme osseux Rôle hormonal
E (tocophérol)		Céréales Légumes feuilles	Peu sensible à la chaleur et la lumière Très sensible à l'oxydation et aux bases	Métabolisme membranaire Rôle de protection
K		Légumes verts	Sensible à lumière et aux bases mais stable à la chaleur	Coagulation sanguine

En cas d'apports insuffisants en vitamines, des désordres anatomiques et des perturbations physiologiques ne tardent pas à se faire sentir. A long terme, le système immunitaire est affaibli et moins efficace. De manière générale, les enfants, les adolescents et les femmes enceintes ont des besoins plus importants en vitamines que le reste de la population. Toutefois, avec le vieillissement, l'absorption des vitamines se fait moins bien et il est souvent nécessaire de compléter les apports. Les ANC (Apports Nutritionnels

Conseillés) sont calculés par l'ANSES par groupe de population, en s'appuyant sur le sexe, l'âge et une estimation moyenne de la dépense physique associée à ce groupe. Par exemple, pour le cas de la vitamine C, la dose journalière recommandée est de 100 mg pour les hommes et de 95 mg pour les femmes. Le dernier catalogue de valeurs a été établi en 2001, avec une révision des barèmes pour les protéines en 2007 et en 2010 pour les apports en acides gras (Bresson and Mariotti, 2016).

Les vitamines contribuent à la prévention et au traitement des maladies comme le cancer, l'ostéoporose, le vieillissement cérébral ou les troubles digestifs... Elles nous assurent un état de bonne forme. Malheureusement, elles font partie des composés alimentaires les plus fragiles. Il est difficile de garantir la teneur en nutriments de nos aliments, que ce soit à cause de la longueur des circuits de production des aliments ou par la cuisson que nous faisons subir à nos aliments.

3.2. Minéraux et oligo-éléments

Une vingtaine de minéraux sont recensés comme essentiels pour notre organisme. Cette notion d'essentialité a été définie par Cotzias (Cotzias, 1967) qui établit qu'un oligoélément doit entre autre :

- être présent dans les tissus vivants à une concentration relativement constante
- provoquer, par son retrait de l'organisme, des anomalies structurelles et physiologiques analogues dans plusieurs espèces
- prévenir ou guérir ces troubles par l'apport du seul élément.

Bien qu'ils constituent moins de 0,01% de notre masse corporelle, ils jouent un rôle auprès des réactions enzymatiques, des hormones, du métabolisme des protéines structurales et des acides nucléiques. Toutefois ce rôle bioactivateur n'agit que lorsque ces éléments sont sous leur forme ionique. Ils sont répartis en deux catégories selon leur abondance dans le corps humain:

- les macroéléments : calcium, chlore, magnésium, phosphore, potassium et sodium
- les oligo-éléments : arsenic, bore, chrome, cobalt, cuivre, fer, fluor, iode, manganèse, molybdène, nickel, sélénium, silicium, vanadium et zinc.

Nous éliminons quotidiennement les macro- et oligo-éléments via nos urines et nos selles. La pratique d'une activité sportive régulière génère des besoins encore plus importants en oligo-éléments. En effet, la sudation entraîne une perte non négligeable de ces nutriments.

Des carences peuvent se traduire par des difficultés à cicatriser (manque de Zinc), des troubles du rythme cardiaque (baisse du taux de cuivre) ou encore une intolérance au glucose accompagnée de diabète (carence en chrome). Ils figurent régulièrement dans la composition des compléments alimentaires. Cependant ces éléments sont très sensibles et sont peu ou pas altérés par les procédés de transformation de l'industrie agro-alimentaire. Il ne paraît donc pas indispensable de se pencher sur leur suivi pour déterminer le caractère délétère d'un procédé de stérilisation (Alais et al., 2008).

3.3. Polyphénols

Les composés phénoliques occupent une place importante dans la perception sensorielle des aliments. En effet, ils contribuent souvent à la couleur, aux arômes et à la texture des produits. Par ailleurs, ils sont réputés sur le plan nutritionnel pour leurs propriétés antioxydantes. Bien que les polyphénols regroupent une très grande diversité de molécules, ils ont tous pour point commun : avoir au moins un groupe phénol (cycle benzénique portant une fonction hydroxyle). Quatre grandes familles (Tableau 9) peuvent être différenciées selon la structure de leur squelette et le nombre d'atomes constitutifs :

- les flavonoïdes qui englobent les flavonols, flavones, flavanols, flavanones, anthocyanes et isoflavones, c'est la famille la plus importante
- les polymères phénoliques qui regroupent les tanins hydrolysables et non hydrolysables
- les acides phénoliques qui comprennent les acides hydroxy-benzoïques et hydroxycinnamiques
- les autres non flavonoïdes : aldéhydes phénoliques, coumarines, stilbènes et lignanes (Amiot-Carlin et al., 2012)

Tableau 9 : Récapitulatif des familles de polyphénols

Famille	Sous-famille	Molécule représentative	Source	Fonctions physiologiques
Flavonoïdes	Flavonols	Quercétine Kaempferol Myricétine	Olives, oignons, chou	Anti-inflammatoire
	Flavones	Lutéoline	Céleri	
	Flavanols	Catéchine	Poire, vin rouge, thé	Antimicrobien
	Flavanones	Hespérétine	Agrumes	Anti-inflammatoire
	Anthocyanes	Cyanidine Malvidine		Antimicrobien
Acides phénoliques	Acides hydroxy-benzoïques	Acide gallique acide ellagique	Thé, chocolat, vin ...	Bactériostatique Antimicrobien
	Acides hydroxycinnamiques	Acide caféique Acide férulique		
Autres non flavonoïdes	Aldéhydes phénoliques et dérivés	Vanilline		
	Stilbènes	Resvératrol	Vin, arachide	Diminution facteur virulence

De manière générale, tous les végétaux sont riches en polyphénols. Dans notre alimentation, la pomme de terre et les pommes sont nos principales sources de polyphénols. Pourtant ce ne sont pas les plus riches en nutriments. En effet, la pomme possède une teneur de 179,1 mg/100 g en polyphénols contre 263,0 mg/100 g de fraises consommées. Les cœurs d'artichauts apportent également 321 mg de polyphénols pour 100 g consommés.

Afin d'évaluer correctement les apports en polyphénols, il faut également prendre en compte les différents mécanismes d'absorption au niveau de notre système digestif. A l'état naturel, la plupart des polyphénols sont présents sous formes de glycosides (liés à un sucre : lactose, fructose ou glucose par exemple), de polymères ou d'esters. Ces formes plus complexes doivent être hydrolysées pour être utilisées par l'organisme. Les anthocyanes par exemple, sont difficilement assimilables par l'organisme. A l'inverse, les polyphénols présents sous forme d'aglycones (forme réduite des glycosides) sont directement biodisponibles (Brat et al., 2006).

L'acide gallique (Figure 6) est un polyacide faible (pK_a de 4,5 et 10) peu onéreux. Il sert principalement d'étalon dans le cadre du dosage de Folin (Boussetta, 2010), qui permet de déterminer la teneur en polyphénols totaux. C'est une molécule bien connue, qui ne pose aucun problème de solubilité dans l'eau et fait partie de la famille des acides phénoliques.

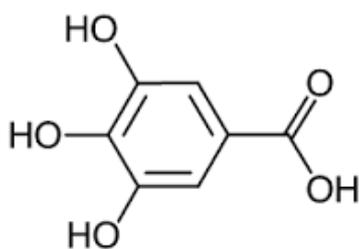


Figure 6 : Structure chimique de l'acide gallique

3.4. Impact des traitements sur les composés d'intérêt

De nombreux facteurs jouent un rôle dans la stabilité des molécules d'intérêt : la température, le pH, la présence d'air, d'eau ou de catalyseurs, la lumière, les enzymes etc... Selon leur nature, ces molécules seront plus ou moins sensibles aux facteurs évoqués précédemment. Le taux de conservation, défini comme le ratio entre la quantité de principe actif présent après et avant traitement, est utilisé pour quantifier l'impact des traitements sur les composés.

3.4.1. Sur la vitamine C

3.4.1.1. Réactions de dégradations

L'acide ascorbique (Figure 7) est un polyacide faible (pK_a de 4,1 et 11,8) qui se présente sous forme d'une poudre blanche cristalline. Elle se décompose à partir de 190°C mais des dégradations peuvent avoir lieu bien avant. En effet, si la poudre est relativement stable à l'air, les solutions aqueuses de vitamine C sont sujettes à l'oxydation. Il a d'ailleurs été prouvé que les solutions aqueuses de vitamines C sont plus stables, si elles ont été réalisées à partir d'eau purifiée que d'eau du robinet (Meucci et al., 1985) car la présence de bases ou d'ions métalliques accélère alors le processus de dégradation. Cette dernière peut avoir lieu selon deux voies : anaérobie et aérobie.

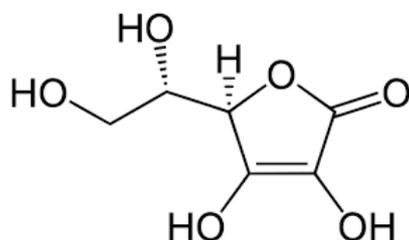


Figure 7 : Structure chimique de la vitamine C

La voie en aérobie, peut être catalysée par la présence de sels de fer ou de cuivre. Dans un cas comme dans l'autre, l'acide ascorbique est oxydé de manière réversible en acide déshydroascorbique qui est ensuite hydrolysé en acide 2,3-dicétogulonique. Par ailleurs, la

chaleur accélère de manière importante la cinétique de dégradation. De plus, certaines enzymes, comme les ascorbate-oxydases et peroxydases, sont aussi capables d'oxyder la vitamine C. Elles ont un pic d'activité autour de 40°C mais sont désactivées à partir de 65°C.

Dans des conditions anaérobies, à chaud et à pH bas, l'acide ascorbique est déshydraté puis subit une décarboxylation. Il se forme alors du gaz carbonique et du furfural. Ce dernier ainsi que l'acide déshydroascorbique, peut se coupler à des acides aminés et engendrer une coloration brune. La dégradation de la vitamine C intervient souvent dans les jus de fruits. La plupart du temps, la dégradation s'opère en deux temps :

- Une dégradation aérobie rapide jusqu'à épuisement de l'oxygène contenu dans l'emballage hermétique
- Une dégradation lente en l'absence d'air (Bourgeois, 2003)

3.4.1.2. Application aux traitements industriels

Quelques auteurs se sont penchés sur l'impact des traitements agroalimentaires sur la détérioration de la teneur en vitamine C. Cette dernière est particulièrement thermosensible et peut être considérée comme un bon indicateur de la sévérité d'un procédé (Bourgeois, 2003). Nous nous intéressons plus précisément à l'impact de la pasteurisation sur la vitamine C. Le Tableau 10 donne un aperçu des pertes en vitamine liées à certains procédés.

De manière générale, les plus grandes pertes en vitamines n'interviennent pas lors de la fabrication mais plutôt sur la période de stockage. Des pertes s'étalant de 15 à 90% de la teneur en vitamine C peuvent être enregistrées en fonction du type d'aliment concerné. Ces pertes sont principalement liées à la température et à la présence d'oxygène. Paradoxalement, de nombreux produits sont supplémentés en acide ascorbique (additif E300) afin de limiter la dégradation des autres vitamines par l'oxygène. Dans le cadre de la directive 95/2/CE du 20 Février 1995, l'incorporation peut aller jusqu'à 300 mg/kg. La carbonatation des boissons est considérée comme une bonne technique pour palier au problème de l'oxydation des vitamines. Les sucres, comme le fructose, contenus dans les formulations sont connus pour accélérer l'oxydation de la vitamine C. De plus, il est avéré qu'un pH basique est délétère pour les vitamines C et B₁ (Bourgeois, 2003).

Tableau 10 : Impact de différents traitements sur la teneur en vitamine C dans certains aliments

Denrée	Teneur initiale en vitamine C du produit	Traitement	Baisse de la teneur observée après traitement	Source
Légumes	De 6 à 10 mg/100g	Cuisson	42 à 76 %	(McErlain et al., 2001)
Lait	27 mg/L	Pasteurisation (16 sec à 75°C)	0 à 17%	(Andersson and Öste, 1994)
Gombo (fruit)	246 mg/100g	Blanchiment (100°C/3min) Déshydratation (0,8 bar / 80°C)	4,5 à 9% 30 à 56%	(Inyang and Ike, 1998)
Ampoules de complément alimentaire	2,5 à 10 mg/mL	Transformation Stockage (40°C/sans lumière/30 jours) Pasteurisation (85°C/1h/autoclave) Stérilisation (120°C/10min/autoclave)	11,7 à 18% 10,4 à 19,3% 1,4%	(Giménez et al., 2002)
Jus de mangue	8,91 mg/100mL	Pasteurisation (1min à 90°C)	34,8%	(Santhirasegaram et al., 2015)
Jus de melon hami	29 mg/100g	Pasteurisation (1 min à 90°C) CO ₂ pressurisé (55°C/350bar/1h)	51% 13,3%	(Chen et al., 2009)

3.4.2. Sur les polyphénols

Les polyphénols sont systématiquement affectés par les procédés de transformation agroalimentaires. Ils sont particulièrement sensibles aux réactions d'oxydation et enzymatique. En moyenne, ils accusent une diminution de 24%, tout procédé confondu, sans prendre en compte le stockage. Le stockage, qu'il soit réalisé à température ambiante, au froid positif ou négatif, semble préserver relativement bien les matrices et engendre des pertes modestes de l'ordre de 5 à 12%. Les données collectées sont néanmoins très variables, notamment à cause de l'influence de la matrice étudiée. Par ailleurs, selon leurs structures, les polyphénols sont affectés différemment. Une augmentation de la teneur en polyphénols totaux peut parfois être observée. Elle est le fruit de la décomposition de dérivés phénoliques plus complexes au cours du procédé, comme les esters ou les glycosides en aglycones. A titre d'exemple, le jus d'orange affiche un taux de conservation de 90% s'il a été traité par pasteurisation, 92% pour les champs électriques pulsés et 115% par haute pression (Rothwell et al., 2015).

Dans l'ensemble, les polyphénols, à l'exception des anthocyanes, sont des molécules relativement stables. Des pertes variables, touchant différentes classes de polyphénols sont observées en fonction du traitement imposé. En revanche, les UV et les enzymes entraînent de nombreuses altérations, d'où l'importance des étapes d'inactivation enzymatique dans

l'élaboration des jus de fruits par exemple. Si la congélation n'affecte pas les concentrations en polyphénols, une baisse des teneurs a été rapportée au cours du stockage ou lors de traitements thermiques comme la pasteurisation ou la stérilisation. De plus, la volatilité de chaque polyphénol conditionne sa sensibilité à la déshydratation.

Malgré la grande diversité de données collectées, il est difficile de dégager des tendances générales. Un travail au cas par cas est nécessaire. En effet, les travaux disponibles tendent à montrer la grande variabilité de la préservation des polyphénols. Elle dépend notamment du procédé mis en jeu, de la matrice alimentaire impliquée et du type de polyphénols observés. Ainsi, bien que la littérature donne des exemples de taux de conservation des polyphénols dans les fruits et les boissons après certaines opérations industrielles, il est difficile de prévoir à l'avance les concentrations que nous pourrions potentiellement obtenir avec un traitement au CO₂ pressurisé.

4. Pasteurisation par fluides supercritiques

4.1. Fluides supercritiques

4.1.1. Définitions et propriétés associées

Un corps pur existe sous trois états : solide, liquide et gazeux. Dans le diagramme température-pression (Figure 8), les régions correspondant à ces trois états sont séparées par les courbes de changement d'état qui sont concourantes au point triple. La courbe de vaporisation (liquide-gaz) présente un point terminal, dit point critique (PC) correspondant à un couple particulier de pression-température (P_c , T_c). Au-delà de ce point critique, les états liquide et gazeux ne sont plus discernables, on parle de domaine supercritique. Les fluides supercritiques (SCF) ont des caractéristiques physico-chimiques intermédiaires entre celles des gaz et des liquides. Par comparaison avec les solvants liquides, les fluides supercritiques présentent des propriétés flexibles et ajustables en modifiant la température et/ou la pression. En outre, les fluides supercritiques possèdent une tension superficielle très faible tout en ayant une diffusivité élevée et une viscosité faible. Ces facteurs favorisent ainsi la pénétration dans les matrices ainsi que dans les cellules par exemple.

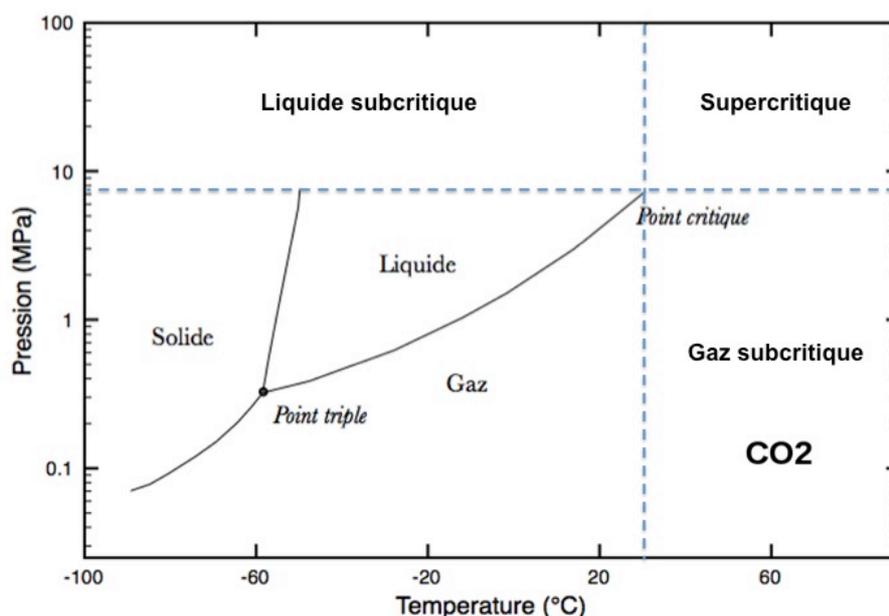


Figure 8 : Diagramme de phase du CO₂ pur (Bouchet Bert-Manoz, 2014)

4.1.2. Champ d'applications

Depuis les années 80, les fluides supercritiques voient leur champ d'applications croître et se diversifier. Cette évolution a été stimulée par un intérêt et une sensibilisation croissante pour les solvants « verts », par opposition aux solvants organiques et halogénés particulièrement polluants qui étaient utilisés jusqu'à présent. Plusieurs solvants supercritiques ou subcritiques ont été testés dans le cadre d'applications agroalimentaires : l'eau, l'éthanol, N₂, N₂O, Ar... Mais le plus prisé est sans conteste le dioxyde de carbone. La production de café décaféiné est un exemple phare, où le CO₂ pressurisé remplace avantageusement le dichlorométhane pour extraire la caféine. Désormais, cette technologie s'est étendue à d'autres procédés, comme l'extraction, l'isolation et la purification de composés, la catalyse de réactions de polymérisation et la pasteurisation.

4.2. CO₂ pressurisé et pasteurisation

Le CO₂ pressurisé suscite un intérêt croissant dans le domaine de la pasteurisation, notamment depuis le milieu des années 1990 (Garcia-Gonzalez et al., 2007). La Figure 9 permet d'avoir un aperçu de l'évolution des recherches sur le CO₂ pressurisé appliqué à la pasteurisation des microorganismes à la fois en terme de volume et de thématique. Ce graphique a été construit en utilisant des mots clés les plus fréquemment associés aux articles cités dans ce manuscrit. Les publications concernant l'inactivation des microorganismes ont été recensées en cherchant les termes *microbial inactivation*. Les mots

clés *quality* et *sensory properties* permettent de couvrir l'aspect préservation des traitements au CO₂ pressurisé, correspondant à l'émergence de l'intérêt pour les matrices alimentaires réelles.

Après une première décennie consacrée à l'étude de la sensibilité des microorganismes au CO₂ pressurisé, des efforts ont été fait pour comprendre les mécanismes impliqués dans l'inactivation des microorganismes par le CO₂ pressurisé. Ce n'est que depuis les années 2010 que les chercheurs se penchent sur les conséquences d'un traitement au CO₂ sur les matrices alimentaires, orientant leurs recherches sur les propriétés organoleptiques et des molécules bioactives comme les polyphénols ou la vitamine C. Au fur et à mesure, la composition des milieux étudiés s'est complexifiée. Au départ, les travaux étaient principalement menés dans des matrices très simples, comme les bouillons de culture. Les premiers travaux sur les jus de fruits ont fait leur apparition au début des années 2000 et les cas d'aliments solides sont de plus en plus explorés.

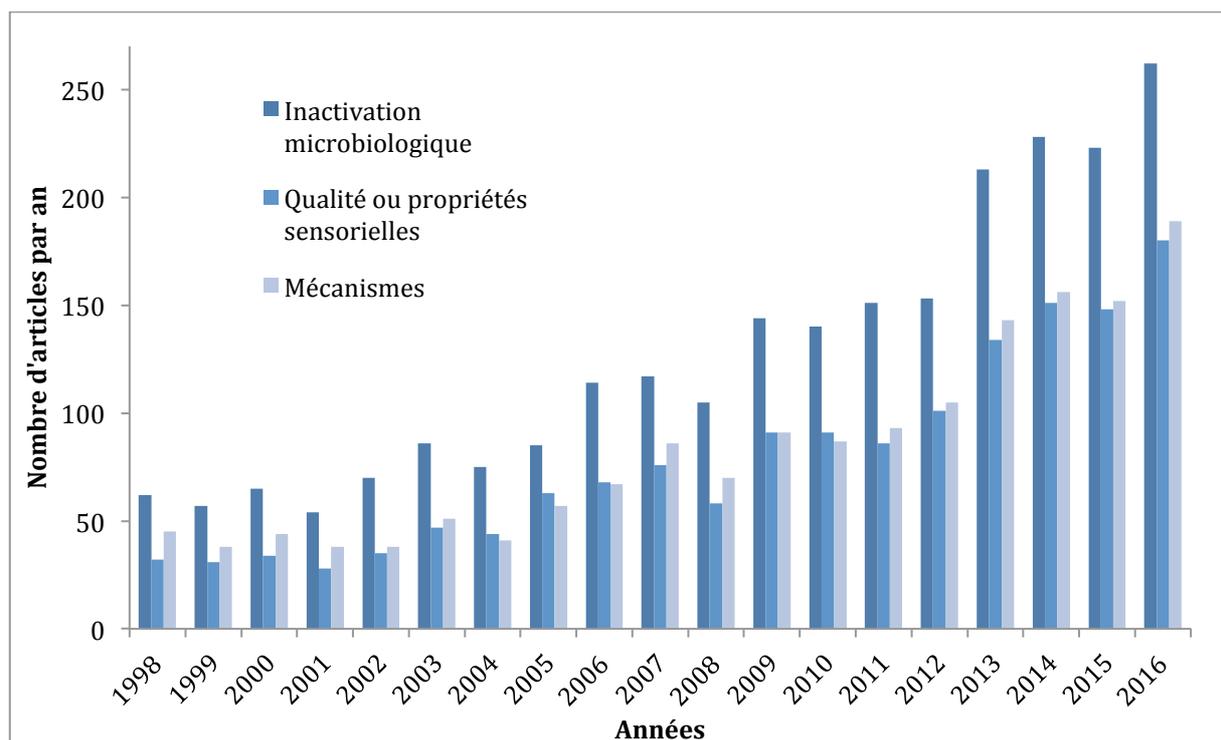


Figure 9 : Evolution du volume des publications sur l'inactivation des microorganismes par CO₂ pressurisé (données collectées avec ScienceDirect en utilisant les termes de recherche : « *high pressure carbon dioxide AND microbial inactivation* » couplés avec « *quality OR sensory properties* » ou « *mechanism* »)

Le choix du CO₂ pressurisé ne s'est pas fait par hasard. Ce dernier cumule différents avantages (Tableau 11). Il est largement utilisé en raison de son point critique facilement accessible (T_c = 31°C et P_c = 74 bar), de sa faible toxicité et réactivité, de son

inflammabilité, de sa disponibilité y compris à haute pureté, son faible coût et son absence dans le produit à l'issue du traitement. C'est un solvant de choix pour l'industrie agroalimentaire pour laquelle les opérations doivent être conduites à des températures aussi faibles que possible de manière à éviter la dégradation des molécules et qui exige l'élimination de toute trace de solvant organique dont l'innocuité est discutable.

En terme de décontamination, d'autres gaz ont été étudiés : le protoxyde d'azote (N_2O) et le diazote (N_2) notamment. N_2 est unanimement reconnu comme inefficace (Dillow et al., 1999; Enomoto et al., 1997b; Nakamura et al., 1994; Wei et al., 1991). Cette constatation est attribuée à son manque de solubilité dans l'eau. En revanche, concernant N_2O la littérature est plus contradictoire. Au cours d'un traitement de 3 min mené à 38°C et 52 bar, le pionnier Fraser (1951) n'a obtenu qu'une réduction de -0,2 sur *E. coli* contre -1,4 avec du CO_2 . Cependant, toutes les publications ultérieures s'accordent sur le fait que le N_2O possède un effet bactéricide presque similaire à celui du CO_2 . Des réductions décimales très satisfaisantes ont été obtenues dans des conditions relativement douces. Après 4 h de traitement à 40°C et 40 bar, une population de *S. cerevisiae* a été réduite de 5 log (Enomoto et al., 1997b). Un traitement de 5 min à 100 bar et 36°C a été suffisant pour parvenir à une réduction des 5 log de la flore des levures naturellement présentes dans du jus de pomme (Sara Spilimbergo et al., 2007). De même, une réduction décimale totale de 8 a été observée sur *E. coli* après un traitement de 7 min à 37°C et 100 bar (Mun et al., 2012). Cette similarité d'efficacité s'expliquerait notamment sur la proximité des points critiques du CO_2 et de N_2O , situés respectivement à 72 bar, 31°C et 72 bar, 36°C. et la nature relativement apolaires de ces deux gaz. Toutefois, deux différences significatives apparaissent. D'une part, pour des pressions de l'ordre de 100 bar, N_2O favorise une inactivation qui est plutôt pression-dépendante tandis qu'un procédé au CO_2 pressurisé sera plus température-dépendante. D'autre part, contrairement au CO_2 , N_2O n'entraîne pas d'acidification du milieu ("Non-thermal pasteurization of tomato puree by supercritical CO_2 and N_2O ," 2009). Si des études commencent à s'intéresser aux modes d'actions du CO_2 , la littérature est très peu fournie pour N_2O et les connaissances sur ce gaz mériteraient d'être approfondies.

Tableau 11 : Caractéristiques du CO₂ pressurisé et ses principaux avantages d'un point de vue industriel (Proctor and Royal Society of Chemistry (Great Britain), 2011)

Caractéristique	Avantages associés
Sans odeur, ni couleur, non toxique	Pas de contamination (environnement, produit traité)
Température critique proche de l'ambiante	Possibilité de traiter des composés thermolabiles
Pression critique relativement faible	Coût allégé
Diffusivité élevée	Temps procédé court
Gaz peu cher et non inflammable	Facilité de manutention
Recyclage possible	Coût allégé
Variabilité élevée des propriétés physico-chimiques autour du point critique	Grand rendement d'extraction, pureté accrue → application dans ≠ domaines : extraction, fractionnement, polymérisation, micronisation...
Propriétés bactéricides	Utilisation en pasteurisation basse température

L'inconvénient majeur d'un procédé de pasteurisation par CO₂ pressurisé concerne l'aspect économique. En effet, cette technologie est beaucoup plus coûteuse en investissement que les procédés traditionnels. Ce type d'installation exige une consommation d'énergie non négligeable pour établir les pressions et les températures requises pour aboutir à une pasteurisation efficace. Quelques estimations sont disponibles concernant des procédés d'extraction (Brunner, 2005; Comim et al., 2010) mais aucune étude sur la rentabilité économique d'une telle installation dans le cadre de la pasteurisation n'a été menée. Il est estimé que la production d'1 L de produit liquide stérile reviendrait entre 10 à 20 centimes contre 2 à 4 centimes avec un procédé thermique classique (Hendrickx et al., 2001).

4.3. Facteurs d'influence

De nombreux paramètres conditionnent l'inactivation des microorganismes au cours d'un procédé par CO₂ pressurisé. Parmi tous les facteurs influents, les plus marquants sont sans conteste la température et la pression. Ils agissent notamment sur les propriétés du CO₂. L'optimisation de ces deux paramètres permet de réduire de manière conséquente les durées de traitement.

4.3.1. Température

La température agit de manière positive sur le traitement. Elle agit notamment sur la diffusivité du CO₂ et elle permet de fluidifier les membranes cellulaires. Ainsi le CO₂ pénètre plus rapidement dans les cellules pour perturber leur fonctionnement. De manière générale, une hausse de la température à pression constante permet d'accélérer l'inactivation pour une réduction logarithmique donnée (Figure 10).

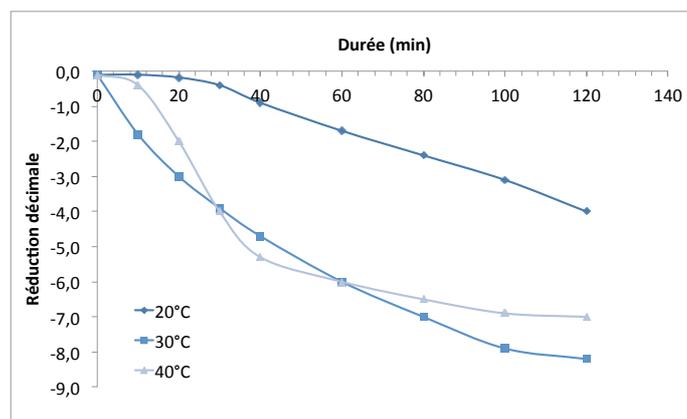


Figure 10 : Cinétique d'inactivation de *L. plantarum* en fonction de la température lors d'un traitement au CO₂ pressurisé mené à 68 bar (Hong and Pyun, 1999)

Les températures de travail répertoriées dans la littérature sont généralement comprises entre 25 et 60°C et plus fréquemment entre 35 et 40°C. Des températures supérieures sont rarement appliquées (Garcia-Gonzalez et al., 2007; Perrut, 2012). En effet, elles sont déconseillées pour plusieurs raisons. D'une part la densité du CO₂ décroît, abaissant d'autant sa capacité à se dissoudre dans l'eau et donc son efficacité. D'autre part, cela revient à se rapprocher des barèmes de pasteurisation classiques, dont les effets sont délétères sur la matière première et les principes actifs. Par exemple, pour des jus de fruits acides (pH < 4,5) les traitements de pasteurisation appliqués pourront être de [65 °C, 30 min], [77 °C, 1 min] ou encore [88 °C, 15 s].

4.3.2. Pression

La pression agit également de manière positive sur l'efficacité du traitement. Elle permettrait d'accélérer l'inactivation en contrôlant la vitesse de solubilisation du CO₂ dans la phase aqueuse et sa solubilité. Comme le montre la Figure 11, à niveau d'inactivation équivalent, une augmentation de la pression permet de réduire les temps de traitement.

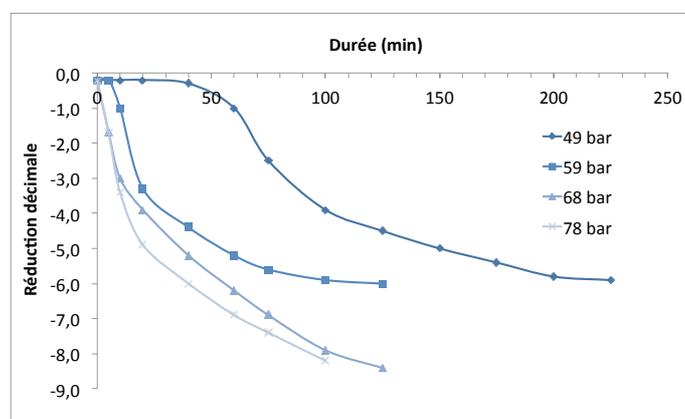


Figure 11 : Cinétique d'inactivation de *L. plantarum* en fonction de la pression lors d'un traitement au CO₂ pressurisé mené à 30°C (Hong and Pyun, 1999)

En effet, plus la pression est élevée plus la quantité de CO₂ solubilisable sera importante et plus vite la concentration de saturation en CO₂ dans la matrice sera atteinte. La plupart des études ont été menées dans des gammes de pression allant de 50 à 200 bar, voire 300 bar dans le cas du traitement des endospores. Les auteurs s'accordent à dire que la gamme de pression la plus efficace se situe entre 75 bar (juste au dessus de la pression critique) et 150 bar (Perrut, 2012).

4.3.3. Effet de la configuration expérimentale

Le dispositif expérimental et en particulier le mode de mise en contact du CO₂ avec la matrice sont aussi des facteurs importants. L'absence d'agitation induit une importante baisse de la réduction décimale. Lin et al. (1992) l'ont constaté et le mentionne dans son article, sans toutefois citer de données chiffrées. Plusieurs auteurs ont observé l'action bénéfique d'un micro-bullage (Md Sikin and S.H. Rizvi, 2011) et du mode d'agitation du milieu. Selon le dispositif assurant l'agitation (barreau aimanté ou turbine dans l'exemple), le temps nécessaire pour atteindre une concentration en CO₂ dissous donnée peut être multipliée par 25 (2 min pour le bras mécanique contre 50 pour le barreau aimanté) (Ferrentino et al., 2016).

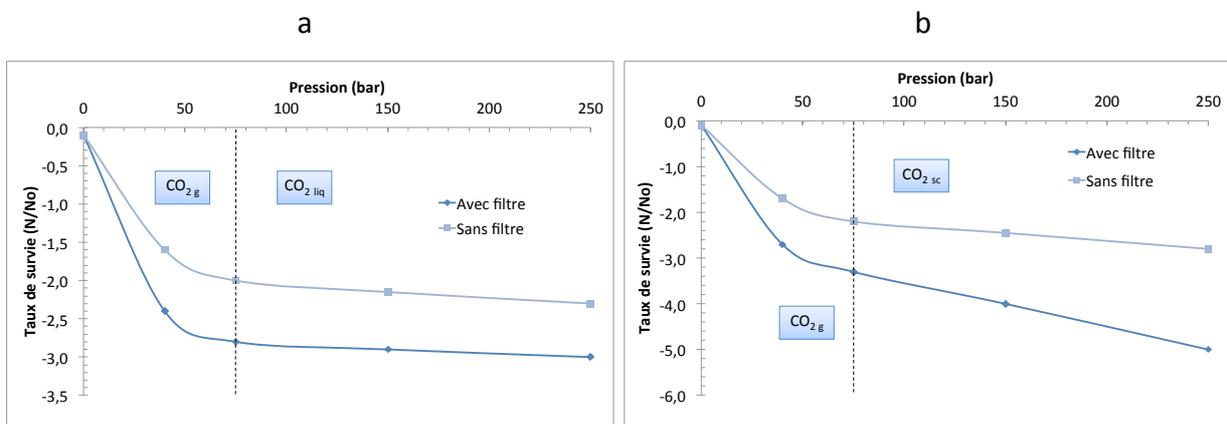


Figure 12 : Effet de la présence d'un filtre (10 µm) sur la réduction décimale de *S. cerevisiae* après un traitement de 30 min à (a) 25°C ou (b) 35°C (Ishikawa et al., 1995)

La Figure 12 montre que la présence d'un filtre, assurant le microbullage du CO₂ dans la solution, permet d'obtenir une amélioration de 1 à 3 unités (selon la pression considérée) de la réduction décimale lors d'un traitement sous CO₂ pressurisé. Dans le cadre des travaux de Ishikawa et al. (1995), à 35°C et 250 bar, la concentration en CO₂ passe de 0,4 à 0,92 mol/L en présence du filtre. Ce type d'améliorations est particulièrement bénéfique pour la désactivation des spores.

Par ailleurs, les procédés en continu semblent plus efficaces que les batchs et fonctionnent avec des temps de séjour moins longs, comme démontré par Spilimbergo et al. (2003) sur une grande variété de microorganismes. A réduction décimale équivalente, 40 à 60 min de traitement sont nécessaires avec un dispositif batch contre moins de 10 min avec un dispositif semi-continu. Ainsi il est préférable de tendre rapidement vers des installations continues tant sur le plan de l'efficacité que du rendement.

4.3.4. Effet des microorganismes et résistance

Des tendances sont observables selon la réactivité des microorganismes étudiés. Les bactéries Gram (-) et Gram (+) possède une sensibilité au traitement plus ou moins similaire. Les levures, en revanche, sont plus résistantes. Les spores, quant à eux, sont exceptionnellement résistants et survivent à presque n'importe quel traitement. (Garcia-Gonzalez et al., 2009a).

Du fait de leur structure particulière, les spores sont excessivement résistantes. Les traitements appliqués pour l'inactivation des cellules végétatives ne sont absolument pas efficaces pour traiter les spores (réductions inférieures à 1). Des conditions beaucoup plus drastiques température supérieure à 70°C, une pression de 300 bar et ajout d'additif comme de l'éthanol ou de l'acide acétique, aboutissent éventuellement à des réductions modestes, entre 3 et 6 (Perrut, 2012).

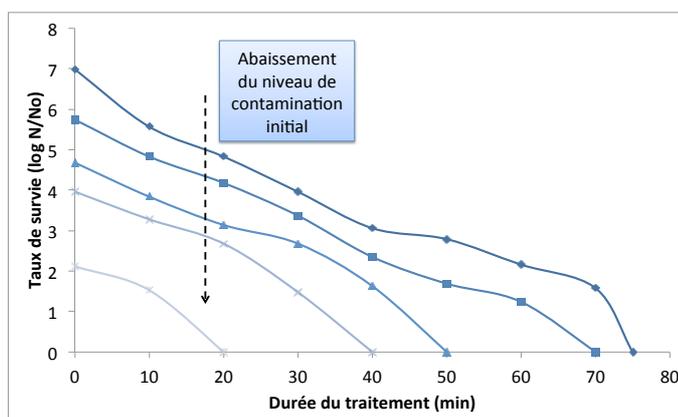


Figure 13 : Effet d'un traitement au CO₂ pressurisé à 35°C et 60 bar sur *L. monocytogenes* selon la contamination initiale (Erkmen, 2000a)

Par ailleurs, plus un milieu sera contaminé, plus il est difficile de le pasteuriser (Figure 13). Ainsi, à conditions constantes, des milieux particulièrement contaminés auront besoin d'un temps de séjour plus long pour parvenir à des niveaux de réduction décimale équivalents (Erkmen, 2000a).

4.3.5. Effet de la matrice

Selon la composition de la matrice (Erkmen, 2000b), le procédé sera plus ou moins efficace. Nous évoquons par la suite, les principaux composants ayant une influence sur la performance du traitement.

4.3.5.1. Présence de lipides

A plusieurs reprises, il a été constaté qu'un milieu riche en lipides était moins affecté par le CO₂ pressurisé. Des échantillons de bouillon de culture, de lait écrémé et de lait entier contaminés avec une suspension de *E. coli* affichent des réductions respectives de -7,5, -2,2 et -1,2, suite à un traitement au CO₂ à 100 bar et 30°C de 50 min pour le bouillon de culture et 360 min pour les laits (Erkmen, 2001). Cette chute de l'efficacité du traitement est directement liée à la quantité de matières grasses présente dans les matrices. Dans la mesure, où une partie du CO₂ va se dissoudre dans la phase grasse du milieu, le procédé perd en efficacité. Les lipides forment ainsi une barrière protectrice. Qui plus est, la présence de matières grasses va entraîner une modification de la structure membranaire des cellules. Les cellules seront moins perméables et donc moins sensibles au CO₂ (Garcia-Gonzalez et al., 2009a; Kim et al., 2008; Lin et al., 1994). En outre, les lipides étant de mauvais conducteurs de la chaleur, un aliment gras va protéger les microorganismes de l'action de la chaleur.

4.3.5.2. Présence d'eau

Un milieu fortement hydraté est la plupart du temps plus efficacement stérilisé par le CO₂ pressurisé. La présence d'eau facilite la diffusion du CO₂. A l'inverse, un milieu visqueux sera moins sensible car la diffusion du CO₂ s'effectuera moins bien au sein de la matrice (Garcia-Gonzalez et al., 2009a). Toutefois, il n'est pas impossible par le biais de cette technologie de pasteuriser des matières sèches (telles que les épices (Calvo and Torres, 2010) ou le cacao (Calvo et al., 2007)) ou des aliments solides, dans lesquels l'eau est moins disponible. Plusieurs exemples sont disponibles dans la littérature : le jambon, les crevettes, les huîtres, les plantes aromatiques ou encore les morceaux de fruits (Balaban and Duong, 2014).

4.3.5.3. Influence du pH

Les milieux particulièrement acides vont agir de manière synergique avec le CO₂ pressurisé et aboutir à une pasteurisation plus rapide et efficace (Figure 14). Plus le pH d'un milieu est acide, plus les microorganismes seront sensibles au traitement et en particulier à la température. En effet, les microorganismes sont alors hors de leur zone de croissance optimale. A défaut de réellement fragiliser leur structure, cela ralentit leur développement.

L'industrie agroalimentaire classifie les aliments selon leur pH :

- aliments acides : pH < 4,5
- aliments modérément acides : 4,5 < pH < 5,3
- aliments peu acides : pH > 5,3

Les barèmes de stérilisation appliqués aux aliments acides seront donc moins sévères que ceux des aliments peu acides.

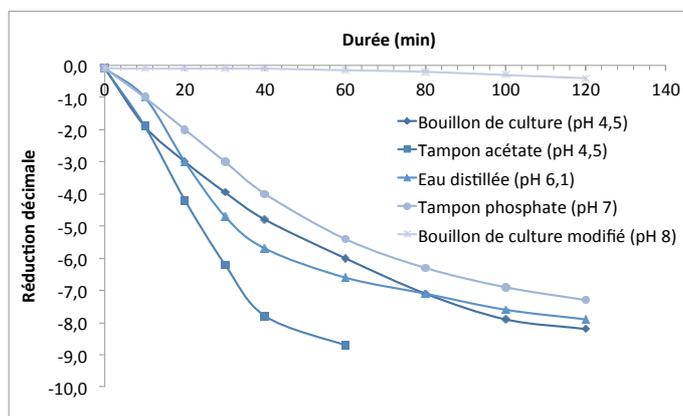


Figure 14 : Cinétique de l'inactivation de *L. plantarum* en fonction du pH au cours d'un traitement au CO₂ pressurisé mené à 30°C et 68 bar (Hong and Pyun, 1999)

Toutefois, la nature du milieu intervient dans l'efficacité du traitement, comme le montre la Figure 14, la comparaison du bouillon de culture de pH 4,5 au tampon acétate de même pH). Un bouillon de culture est un milieu nutritif adapté à la croissance des cellules, qui assure ainsi une meilleure survie aux cellules. Par ailleurs, le milieu utilisé dans l'article cité était du MRS. Ce dernier est riche en lipides, qui ont potentiellement pu protéger les cellules. On retiendra qu'un pH acide augmente la perméabilité des cellules, puisqu'il favorise la présence de la forme non dissociée de l'acide carbonique. Or c'est cette espèce qui est capable de traverser les membranes cellulaires (Giulitti et al., 2011; Kim et al., 2008).

4.3.6. Effet de la vitesse de dépressurisation et des cycles de pression

La vitesse de dépressurisation semble aussi être un paramètre d'importance. Elle contribuerait à la lyse des cellules via une rupture mécanique. En effet, le CO₂ en revenant à 90

pression atmosphérique s'expande, générant une surpression à laquelle la paroi de la bactérie ne peut résister (Nakamura et al., 1994). Dans l'ensemble, les dépressurisations effectuées lors de l'inactivation des microorganismes par CO₂ pressurisé sont très rapides (de l'ordre de la minute)¹. Lorsque le retour à la pression atmosphérique se fait en moins d'une minute, on parle de dépressurisation explosive ou flash. Celle-ci s'accompagne d'une forte chute de température (environ 15°C) liée à l'effet Joule-Thomson (Nakamura et al., 1994). Fortes de ces observations, plusieurs équipes ont tenté d'appliquer des cycles de pression afin d'augmenter:

- la rupture mécanique
- le transfert du matériel cellulaire
- la germination des endospores (Dillow et al., 1999; Spilimbergo et al., 2002)

Les résultats sont assez peu concluants et cette piste semble avoir perdu de son intérêt sauf dans le cas des spores où cela reste une alternative intéressante (S. Spilimbergo et al., 2003).

4.3.7. Conclusion

De nombreux paramètres interviennent pour expliquer l'efficacité d'un traitement au CO₂ pressurisé. Qui plus est, ces facteurs agissent de manière imbriquée et dépendent souvent les uns des autres. Cet état de fait rend la comparaison des résultats reportés dans la littérature complexe. En outre, d'autres éléments, comme l'état physique du CO₂ ou encore le stade de développement des microorganismes, sont à prendre en compte. Le Tableau 12 propose un récapitulatif des conditions de traitement et des réductions décimales associées à certains microorganismes. Il donne également un bon aperçu de la variabilité de l'efficacité des traitements expérimentés

¹ En comparaison avec d'autres types de procédés, comme la Détente Instantanée Contrôlée, ces vitesses peuvent paraître lentes.

Tableau 12 : Liste des microorganismes traités par CO₂ pressurisé (Perrut, 2012), ND : non disponible

Microorganisme	Particularités	Pression bar	Température °c	Durée min	N ₀ UFC/mL	Réduction	Référence
	Milieu						
<i>B. subtilis</i> sporulé	Poudre de plasma sanguin	200	35	120	10 ⁷	0,32	(Taniguchi et al., 1987)
	Tampon phosphate	74 à 200 70	40 à 54 75	30 à 90 1440	10 ⁷	0,9 à 1,1 > 7	(Spilimbergo et al., 2002)
	Cycle de P	150	3 à 54	1 à 20		0,8 à 3,5	
	Solution saline	70 à 150	60	360	10 ⁷	Totale	(S. Spilimbergo et al., 2003)
	Eau distillée	300	35	30 à 120	10 ⁶	0,5	(Watanabe et al., 2003)
	CO ₂ + acide	207	60	240	10 ⁶	Totale	(Christensen et al., 2006)
<i>E. coli</i>	Eau distillée	40 à 200	20 à 35	0 à 120	≥ 10 ⁶	3,9 à 5,1	(Kamihira et al., 1987)
	Micro bullage du CO ₂ (filtre ≤ 20 µm) Continu	250	35	30	ND	Totale	(Osajima et al., 2004)
	Tampon phosphate	310	42,5	15	10 ⁹	7	(Sirisee et al., 1998)
	Cycle de P TSB	140 à 205	25 à 42	30 à 60	10 ⁷ à 10 ⁹	8	(Dillow et al., 2000)
	ND	75 à 150	25	2 à 9	ND	1,7 à 8,6	(Sims and Estigarribia, 2002)
	Eau distillée	7	21	25	10 ⁵ à 10 ⁶	5	(Vo et al., 2013)
	Jus de carotte	80	37	40	10 ⁷ à 10 ⁸	7,5	(Bi et al., 2014)
<i>L. monocytogenes</i>	Lait Bouillon de culture	210	35	14	10 ⁹	Totale	(Lin et al., 1994)
	Cycle de P	200	33	120	10 ¹⁰	6,1	(Soares et al., 2013)
<i>L. innocua</i>	Cycle de P TSB	205	34	36	10 ⁷ à 10 ⁹	3 à 9	(Dillow et al., 2000)
<i>S. cerevisiae</i>	Solution saline	70 à 250	25 à 35	5 à 30	10 ⁶	2 à 6	(Ishikawa et al., 1995)
	Bouillon de culture	200	35	120	10 ⁷	6,3	(Kamihira et al., 1987)
	Bouillon de culture	75 à 100	33	5	ND	< Totale	(Isenschmid et al., 1994)
	ND	75	40	30	ND	> 4,6	(Venturi et al., 1999)
	Eau peptonée	100	36	30	10 ⁸	3	(Spilimbergo et al., 2009)
	Jus de pomme	100 à 200	36	50	10 ⁷	4,7	(S. Spilimbergo et al., 2007)
	Bouillon de culture	350	35	130	10 ⁷	6	(Ortuño et al., 2012)

4.4. Mécanismes et cinétique d'inactivation

Deux mécanismes d'actions ont été avancés pour expliquer l'effet bactéricide du CO₂ pressurisé : un mécanisme de rupture cellulaire et un mécanisme de désactivation physiologique. Cette désactivation s'opère la plupart du temps en suivant une cinétique en deux phases.

4.4.1. Rupture mécanique

La première hypothèse proposée pour expliquer l'effet du CO₂ pressurisé reposait sur l'explosion des cellules au moment de la dépressurisation du réacteur. L'application d'une dépressurisation brutale, génère une expansion brutale du CO₂ dissous dans les cellules, conduisant ainsi à l'éclatement de la cellule. Cependant, l'efficacité moindre d'un traitement court assorti de nombreuses dépressurisations comparé à un traitement plus long avec un nombre restreint de dépressurisations tend à remettre en cause cette hypothèse (Enomoto et al., 1997b). Des clichés de microscopie montrant une majorité de cellules intactes (au sens de non éclatées) mais non viables viennent corroborer cette hypothèse. D'autres mécanismes doivent donc intervenir pour expliquer l'action du CO₂ sur les microorganismes

4.4.2. Inactivation physiologique

La deuxième hypothèse qui fait l'objet de nombreuses recherches (Ferrentino et al., 2016; Garcia-Gonzalez et al., 2010a; Giulitti et al., 2011; Spilimbergo et al., 2010, 2009; Tamburini et al., 2014; Wu et al., 2007) tend à montrer l'action du CO₂ sur la structure et le métabolisme des cellules. La Figure 15 résume les différents modes d'action du CO₂ sur les milieux extra et intracellulaire, ces actions intervenant quasi simultanément.

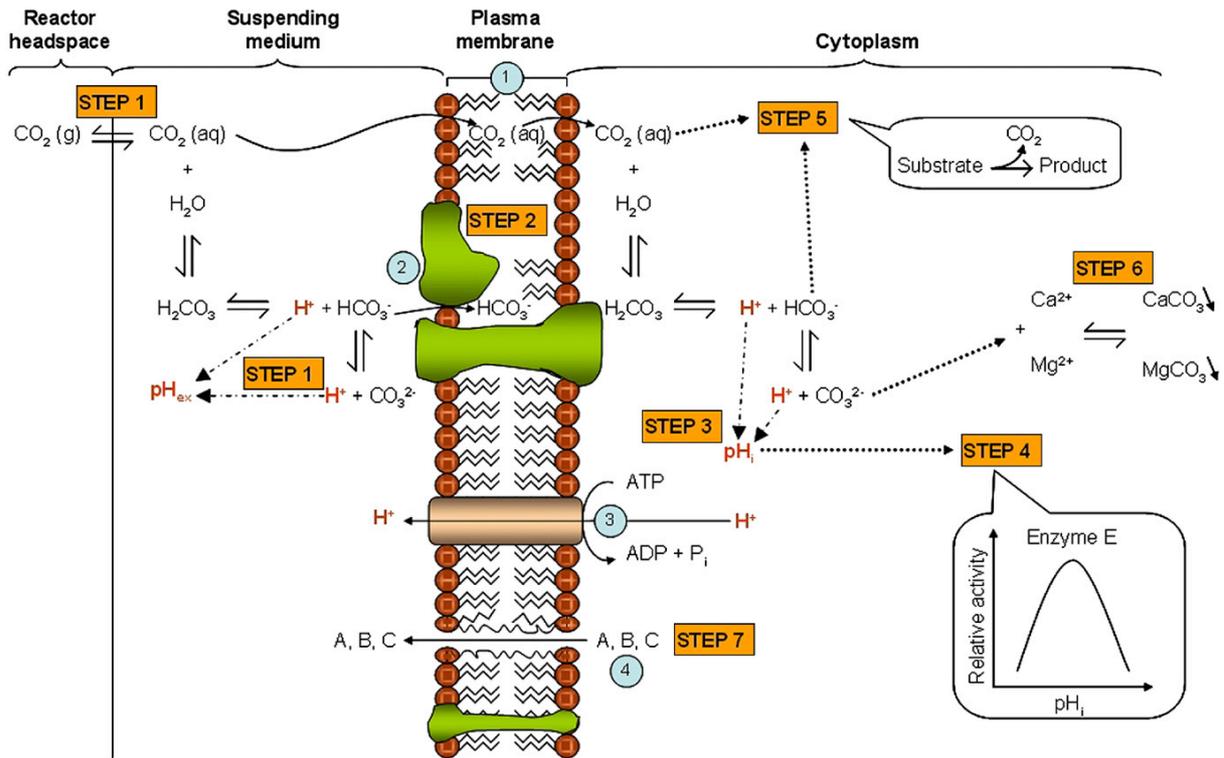


Figure 15 : Les différentes étapes du mécanisme d'inactivation lors d'un traitement au CO₂ pressurisé (Garcia-Gonzalez et al., 2007)

Le CO₂ pressurisé se dissout dans milieu extracellulaire se dissocie en ions HCO₃⁻ et CO₃²⁻ qui vont acidifier le milieu (STEP 1). Une partie du CO₂ va diffuser à travers la membrane des cellules. Du fait de son affinité avec les phospholipides, le CO₂ va s'accumuler dans les bicouches lipidiques de la membrane et entraîner leur modification. Cette altération conduit à une augmentation de la fluidité et de la perméabilité de la membrane (STEP 2). Une fois dans le milieu intracellulaire, le CO₂ pourra une fois de plus se dissocier et ainsi acidifier le pH intracellulaire (STEP 3). Il est cependant important de préciser que les cellules ont un pouvoir tampon assez important et qu'elles sont capables, dans des conditions normales de fonctionnement, de réguler leur pH interne, en évacuant les protons excédentaires via des pompes gouvernées par des enzymes (ATPase). Si une trop grande quantité de protons est présente, les pompes ne parviennent pas à expulser les protons suffisamment rapidement et le pH commence à baisser. Au fur et à mesure de cette baisse, le pH optimum de fonctionnement des enzymes est dépassé et leur activité chute progressivement, ralentissant d'autant le fonctionnement de la cellule (STEP 4). Par ailleurs, les réactions enzymatiques sont certes contrôlées par le pH, mais elles dépendent également de la concentration en substrats, produits et cofacteurs dans le milieu intracellulaire. Comme le CO₂ et les ions HCO₃⁻ interviennent dans de nombreuses réactions

du métabolisme, leur présence en excès va directement inhiber le fonctionnement global de la cellule (STEP 5). En parallèle, la présence d'ions CO_3^{2-} au sein de la cellule peut entraîner la précipitation d'électrolytes (comme les ions Ca^{2+} ou Mg^{2+}) qui interviennent dans la régulation des activités cellulaires et de la pression osmotique vis à vis du milieu extérieur (STEP 6). Enfin, le CO_2 peut potentiellement mettre à profit son pouvoir de solvatation pour extraire les composés vitaux (comme les enzymes, les phospholipides membranaires ...) de la cellule (STEP 7). L'ensemble de ces actions agit de manière synergique, amenant progressivement la cellule dans un état de stress et conduisant à sa lyse.

4.4.3. Cinétique de désactivation et durée du traitement

De nombreux auteurs se sont attachés à la modélisation des cinétiques de désactivation (Ferrentino et al., 2016; Liao et al., 2008; Parton et al., 2007; Spilimbergo and Mantoan, 2006; Vo et al., 2013). Le modèle cinétique en deux phases est le plus récurrent. Il est constitué d'une première phase de latence gouvernée par la diffusion lente du CO_2 (*lag phase*), suivie d'une phase plus rapide et linéaire correspondant à l'inactivation des microorganismes. Ces deux étapes sont parfois suivies d'une phase de stabilisation (traîne ou queue) pouvant traduire soit l'inactivation de tous les microorganismes, soit un phénomène de résistance. Dans l'ensemble, ces courbes sont très similaires aux comportements habituellement décrits pour de l'inactivation de microorganismes lors de traitements thermiques classiques (Peleg, 2003; Xiong et al., 1999). Quel que soit le procédé envisagé, les cinétiques en deux voire trois étapes sont récurrentes. La différence majeure entre les procédés de pasteurisation réside dans la vitesse d'inactivation. Elle peut tendre à faire disparaître la *lag phase* et la queue et s'accompagner d'une pente plus importante pour la phase linéaire. De manière générale, toutes conditions étant égales par ailleurs, augmenter la durée du traitement conduit à une augmentation de la réduction logarithmique (Ballestra et al., 1996; Hong and Pyun, 2001; Ishikawa et al., 1995; Karaman and Erkmen, 2001; Lin et al., 1992). D'un point de vue cinétique, cette prolongation intervient au niveau de la phase linéaire. Celle-ci se prolonge jusqu'à permettre d'atteindre la phase de stabilisation de la mortalité.

4.5. Equipements et brevets

A l'heure actuelle, la pasteurisation supercritique a été développée de manière effective à l'échelle laboratoire sur plusieurs types d'installations. Différentes configurations ont été mises au point pour répondre à des besoins différents. Les systèmes batch ont été les premiers utilisés mais du fait de leur capacité de traitement limitée, l'industrie cherche à privilégier des installations semi-continues voire continues. Ce sont celles qui assurent la meilleure productivité. La protection de l'idée dans le domaine du CO₂ pressurisé concerne principalement des innovations technologiques permettant améliorer la dispersion du CO₂ au sein du milieu.

Des installations continues sont commercialisées sous la marque « Better Than Fresh » (Doona et al., 2010), fleuron de la technologie Praxair. Cette technologie mise à profit par plusieurs équipes scientifiques (Ferrentino et al., 2009; Kincal et al., 2006), propose une configuration similaire à un écoulement piston. Le mélange du milieu à traiter au CO₂ est opéré en amont, avant de passer par une pompe à pistons pour atteindre la pression désirée et d'être envoyé dans le réacteur. Dans cette configuration le temps de séjour est d'une dizaine de minutes. Le débit peut atteindre 130 mL/min.

D'autres firmes proposent ce type d'appareillage comme Mitsubishi Kakoki Co qui exploite le brevet détenu par Shimadzu Co (Osajima et al., 2004). Le Tableau 13 fait un tour d'horizon des brevets existant en matière de système de pasteurisation par CO₂ pressurisé.

Tableau 13 : Brevets pertinents au matière de pasteurisation au CO₂ pressurisé (tableau extrait de (2007))

Cessionnaire	Numéro	Détails	Sources
Franz Juchem GmbH (DE)	DE 3734025 A1	Method to increase the storage life of liquid foods (liquid egg and milk products)	(Lehmann and Juchem, 1989)
	EP 0 488 012 B1	Method for germ reduction in semi-prepared products containing flour	(Garcia-Gonzalez et al., 2007)
University of Florida (US)	US 5 393 547 WO 90/02799	Method for inactivating enzymes in foods	(Balaban et al., 1995)
	US 6 723 365 B2	Continuous method and apparatus for reducing microbial and/or enzymatic activity in liquids	(Garcia-Gonzalez et al., 2007)
	US 2004/0131739 A1		
Shimadzu Corporation and Nippon Tansan Company, Ltd. (JP)	US 5 520 943	Different methods and apparatus to inactivate enzymes and microorganisms in liquids, or to deodorize liquid materials (foods or medicines) using microbubbles CO ₂ in batch or continuous implementation	(Garcia-Gonzalez et al., 2007)
	US 5 667 835		
	US 5 704 276		
	US 5 869 123		
	EP 0 786 513 B1		
	US 6 616 849 B1		
Massachusetts Institute of Technology (US)	US 6 149 864	Batch method for sterilizing materials for medical applications, particularly polymers for drug delivery and implantation	(Garcia-Gonzalez et al., 2007)
	WO 99/066960		
Praxair Technology, Inc. (US)	US 2002/0122860	Continuous method and apparatus for reducing microbial and/or enzymatic activity in liquids	(Garcia-Gonzalez et al., 2007)
	EP 0 979 657 A1		
	WO 02/03816 A1		
Porocrit, LLC (US)	US 6 331 272 B1	Continuous method and apparatus (membrane contactor) for preserving liquids	(Garcia-Gonzalez et al., 2007)
	WO 00/41805		
Kyushu TLO Company, Ltd. (JP)	WO 2004/045316 A1	Continuous method and apparatus for enzyme deactivation, microbial reduction and removing CO ₂ dissolved in the liquid to minimize the loss of scent of components	(Garcia-Gonzalez et al., 2007)
Kyushu TLO Company, Ltd. (JP)	WO 2004/000434 A1	Continuous method for efficiently separating the dissolved CO ₂ gas from the treated liquid	(Garcia-Gonzalez et al., 2007)
Safe-Fresh Technologies, LLC (US)	WO 03/101210 A1	Method for pressurized decontamination of meat using carbonic acid	(Garcia-Gonzalez et al., 2007)
LBG Invest and Consulting nv (BE)	WO 2004/039180 A1	Batch method for inactivating biological contaminants in liquid high fat and/or protein food or feed products	(Garcia-Gonzalez et al., 2007)
University of Florida (US)	US 2004/0234661 A1	Continuous method and apparatus for reducing microbial and/or enzymatic activity in a liquid beer or wine product	(Garcia-Gonzalez et al., 2007)
	WO 2005/034655 A1		
	US 2005/0084581 A1	Method and apparatus (not requiring any large-size pressure tanks) to inactivate enzymes and microorganisms in liquids	(Garcia-Gonzalez et al., 2007)

NovaSterilis Inc. (US)	US 2005/0025667	Method and apparatus for achieving 6D microbial reduction in (bio)materials using chemical-containing pressurized CO ₂	(Garcia-Gonzalez et al., 2007)
	US 7108832 B2	Sterilization methods and apparatus which employ additive-containing supercritical carbon dioxide sterilant	(Garcia-Gonzalez et al., 2007)
	US8012414 B2	Sterilization of drugs using supercritical carbon dioxide sterilant	(Burns et al., 2011)
Yoshiyuki Sato	US 20050084581 A1	Apparatus for liquid food sterilization or enzyme deactivation with supercritical carbon dioxide, and method of liquid food sterilization or enzyme deactivation, and liquid food obtained by the use of the apparatus and the method	(Sato, 2005)
中国农业科学院农产品加工研究所 (CN)	CN 101327034 A	Supercritical CO ₂ sterilizing method of fluid food	(刘思□ et al., 2008)
Safefresh Technologies, Llc (US)	US 20090226586 A1	Decontamination methods for meat using carbonic acid at high pressures	(Garwood, 2009)
University of South Carolina	US 20100080790 A1	Sterilization using high-pressure carbon dioxide	(Michael and Jian, 2010)
中国农业大学 (CN)	CN101536807 B	Continuous dynamic high-pressure carbon dioxide sterilising and enzyme inactivating method and device thereof	(刘璇 et al., 2011)

5. Conclusion

Les compléments alimentaires représentent un marché porteur, en pleine croissance et particulièrement stimulant. Il bénéficie notamment de l'engouement actuel pour des modes d'alimentations plus sains (la mode de l'alimentation biologique ou locavore par exemple) et de la sensibilisation par les pouvoirs publics de l'importance d'avoir une alimentation variée et équilibrée pour être en bonne santé. Les compléments alimentaires surfent habilement sur leurs allégations santé. Cependant, comme ils relèvent de la législation de l'industrie agro-alimentaire, ils doivent se plier à des contraintes strictes, en particulier concernant la sécurité sanitaire. Il est également avantageux pour eux de garantir une grande qualité de produit pour séduire le consommateur.

Ainsi, les nutriments représentent un enjeu majeur pour les compléments alimentaires. En effet, ce sont eux qui vont contribuer à l'intérêt nutritionnel de ces produits. Malheureusement, ces molécules sont particulièrement fragiles. Leur grande majorité est soluble dans l'eau, sensible à la température et l'oxydation. Du fait de cette grande sensibilité, ces molécules servent de marqueur pour estimer le caractère délétère d'un procédé industriel. De nombreuses études ont été menées et ont permis de restituer des taux de conservation. Cependant ces valeurs dépendent par trop du type de procédé mis en

jeu, du type de matrice envisagée et de la nature des molécules considérées. Il est donc nécessaire d'étudier l'impact de chaque procédé au cas par cas.

La pasteurisation est une étape indispensable dans la chaîne de production d'un aliment. Elle vise à assurer la sécurité sanitaire et la pérennité du produit. Mais du fait des tendances nutritionnelles actuelles et de la prise de conscience écologique, l'industrie agroalimentaire doit s'adapter à ces nouvelles exigences du consommateur en développant des procédés alternatifs qui tout en devant assurer la sécurité sanitaire du produit doit également préserver ses qualités organoleptiques et nutritionnelles. Cependant ces techniques sont encore assez peu développées à l'échelle industrielle.

Le CO₂ pressurisé est une technique prometteuse en terme de pasteurisation. Elle permet notamment d'abaisser les niveaux de contamination, de désactiver les enzymes ainsi que de préserver les nutriments. Cette technologie est d'autant plus prometteuse dans le cadre des « hurdles technologies » où l'efficacité du CO₂ est complétée par des ultrasons (US) ou des champs électriques pulsés (PEF) par exemple. Toutefois, imputable en partie à son coût de mise en œuvre élevé, il ne semble pas y avoir d'application commerciale. La littérature s'intéresse de plus en plus aux matrices alimentaires réelles comme des jus de fruits, voire des matrices solides (viande, fruits de mer...). La préservation des qualités nutritionnelles et organoleptiques fait désormais l'objet d'un intérêt certain.

L'étude bibliographique montre qu'il est possible d'inactiver des microorganismes via le CO₂ comprimé, et permet de dégager les principaux paramètres opératoires susceptibles d'impacter l'inactivation. L'inactivation totale n'est pas toujours un objectif et les études porteront souvent sur la mise en évidence de tendances, quitte parfois même à discuter de réduction décimale $\log(N/N_0)$ variant entre -1 et -3, ce qui sur un critère de pasteurisation reste un faible niveau de décontamination. Par ailleurs, il est difficile de rationaliser des niveaux de décontamination en fonction des conditions opératoires tant les dispositifs, les milieux à traiter et les niveaux de contamination sont différents.

Partie II : Matériel et méthodes

Sommaire de la partie II

1. Matériel.....	107
1.1. Microbiologie	107
1.1.1. Souches	107
1.1.2. Milieux de culture.....	107
1.2. Matières premières	108
1.2.1. Complément alimentaire principal : Jambes légères.....	108
1.2.2. Autres matières premières.....	109
1.2.2.1. Complément alimentaire Détox	109
1.2.2.2. Jus de grenade.....	109
1.2.2.3. Lait de soja.....	110
1.3. Molécules, réactifs et solutions pour les dosages	110
1.4. Autres produits.....	110
2. Préparation des matériels biologiques	110
2.1. Préparation des milieux de culture	110
2.2. Mise en culture.....	111
2.2.1. Bactéries végétatives	111
2.2.1. Levure : <i>S. cerevisiae</i>	111
2.2.2. Préparation des spores de <i>B. subtilis</i>	112
2.3. Préparation des milieux pour le dénombrement	113
3. Préparation des échantillons à traiter	114
4. Dispositifs expérimentaux utilisés.....	114
4.1. Dispositif dit batch.....	114
4.1.1. Dispositif	114
4.1.2. Protocole	115
4.2. Dispositif batch de plus grand volume	116
4.2.1. Dispositif	117
4.2.2. Protocole	118
4.3. Dispositif continu.....	118
4.3.1. Dispositif	118
4.3.2. Protocole	119
5. Caractérisation.....	120
5.1. Aspect microbiologique.....	120

5.1.1.	<i>Suivi de la croissance microbienne</i>	120
5.1.2.	<i>Mesure de la réduction décimale par étalement</i>	120
5.1.3.	<i>Evaluation de l'impact du traitement sur les cellules</i>	121
5.1.3.4.	Marquage à l'iodure de propidium et microscopie à fluorescence.....	121
5.1.3.5.	Microscopie à transmission d'électrons	121
5.2.	Méthodes analytiques	122
5.2.1.	<i>Quantification des polyphénols totaux</i>	122
5.2.2.	<i>Identification des polyphénols par HPLC</i>	124
5.2.2.6.	Méthode.....	124
5.2.2.7.	Identification	125
5.2.3.	<i>Teneur en protéines</i>	126
5.2.4.	<i>Teneur en vitamine C</i>	127

Pour parer les variabilités de contamination et de concentration en nutriments entre les lots, les solutions réelles à base de compléments alimentaires stériles ont été inoculées par un pool de 3 microorganismes représentatifs de la contamination et enrichies avec 2 molécules témoins : la vitamine C et l'acide gallique. Les essais ont principalement eu lieu dans un dispositif batch, avec un réacteur de 50 mL. Un réacteur de plus grand volume muni d'un mobile d'agitation différent et un dispositif continu ont été utilisés de façon plus ponctuelle.

1. Matériel

1.1. Microbiologie

Pour suivre le critère « pasteurisation », des microorganismes témoins, représentatifs de la diversité des populations microbiennes ou présentant des sensibilités différentes aux traitements, ont été sélectionnés. Le mélange à traiter sera inoculé simultanément par 3 souches :

- une bactérie Gram (+) (*Listeria innocua*)
- une bactérie Gram (-) (*Escherichia coli* K-12)
- une souche de levure (*Saccharomyces cerevisiae*).

Quelques expériences ont également été menées sur une bactérie capable de sporuler (*Bacillus subtilis*) pour évaluer le potentiel stérilisateur de notre procédé.

1.1.1. Souches

La souche d'*Escherichia coli* K-12 a été gracieusement fournie par l'Institut Pasteur (Paris, France). La souche *Listeria innocua* provient de la collection des souches microbienne de l'Ecole Nationale Supérieure de Chimie, Biologie et Physique de Bordeaux (Pessac, France). La levure *Saccharomyces cerevisiae* a été purifiée à partir d'un cube de levure de boulangerie acheté dans un supermarché local. Enfin, un *Bacillus subtilis* 168 Marburg provenant de la collection personnelle de l'institut CBMN (Pessac, France) a été utilisé.

1.1.2. Milieux de culture

Des bouillons de trypto-caséine soja (TSB), de Fraser et cœur-cervelle (BHI pour Brain Heart Infusion) ont été utilisés pour la culture des microorganismes. Les étalements pour le dénombrement des microorganismes ont été fait sur les milieux gélosés à l'extrait de levure

(PCA pour Plate Count Agar), Sabouraud au chloramphénicol, PALCAM et cœur-cerveille. L'ensemble de ces produits est fourni par Biokar Diagnostics (Beauvais, France). La composition de ces milieux est détaillée dans le Tableau 14 et le Tableau 15.

Tableau 14 : Composition des bouillons de culture utilisés

TSB (en grammes pour 1 L)		Fraser (en grammes pour 1 L)		BHI (en grammes pour 1 L)	
Tryptone	17	Polypeptone	10	Extrait de cœur-cerveille	17,5
Peptone papainique de soja	3	Extrait autolytique de levure	5	Peptone pancréatique de gélatine	10
Glucose	2,5	Extrait de viande	5	Chlorure de sodium	5
Phosphate dipotassique	2,5	Chlorure de sodium	20	Phosphate disodique	2,5
Chlorure de sodium	5	Phosphate disodique anhydre	9,6	Glucose	2
		Phosphate monopotassique	1,35		
		Esculine	1		
		Chlorure de lithium	3		
		Acide nalidixique	0,02		
		acriflavine	25 mg		

Tableau 15 : Composition des milieux utilisés pour étalement

PCA (en grammes pour 1 L)		Sabouraud chloramphénicol (en grammes pour 1 L)		PALCAM (en grammes pour 1 L)	
Tryptone	5	Peptone pepsique de viande	10	Peptones	23
Extrait autolytique de levure	2,5	Glucose	20	Extrait autolytique de levure	3
Glucose	1	Chloramphénicol	0,5	Glucose	0,5
Agar-agar bactériologique	12	Agar-agar bactériologique	15	D-mannitol	1
				Esculine	10
				Citrate ferrique ammoniacal	0,8
				Chlorure de sodium	0,5
				Chlorure de lithium	5
				Polymyxine B	15
				Ceftazidime	10 mg
				Acriflavine	20 mg
				Rouge de phénol	5 mg
				Agar-agar bactériologique	10

1.2. Matières premières

1.2.1. Complément alimentaire principal : *Jambes légères*

Le complément alimentaire commercial *Jambes légères* a été produit et fourni par la société Cérébio (Coutras, France). Il s'agit d'un mélange aqueux d'extraits végétaux (hamamélis, fragon, vigne rouge et marronnier d'Inde) et de jus de fruits concentrés (raisin et pomme). Il est livré sous forme d'ampoules stériles en verre de 15 mL, stockées à 4°C. Chaque nouveau lot (Tableau 16) est caractérisé à sa réception afin d'évaluer sa teneur en polyphénols et en protéines. Au besoin des boîtes de compléments alimentaires ont été achetées en pharmacie.

Tableau 16 : Caractéristiques des lots de *Jambes Légères* utilisés

Lot	Fournisseur	pH	Teneur en PPT (g/L)	Teneur en protéines (g/L)
BCB 127H	Pharmacie	3,70	non dosé	non dosé
Production non stérile du 18/11/2014	Cérébio (flacon)	4,06	1,19 ± 0,20	0,89 ± 0,11
Production stérile du 18/11/2014	Cérébio (flacon)	4,06	1,16 ± 0,09	0,79 ± 0,08
ECB 025	Cérébio	-	1,10	0,83
ECB 054	Cérébio	3,85	1,14 ± 0,08	0,48 ± 0,02
ECB 088	Cérébio	3,89	0,75 ± 0,35	0,49 ± 0,02

1.2.2. Autres matières premières

Pour valider ou extrapoler le procédé proposé, d'autres matières premières ont été traitées.

1.2.2.1. Complément alimentaire Détox

Le complément alimentaire commercial *Détox* a été acheté en pharmacie. Il se présente sous la forme d'un mélange aqueux d'extrait de plantes (racine de pissenlit, baie de sureau) et de jus (pomme, radis noir, citron), conditionné sous ampoule de verre stérile. Son pH est de 3,8.

1.2.2.2. Jus de grenade

Des grenades, de la variété *Punica granatum L.*, issues de la région de Gabes en Tunisie ont été utilisées afin de réaliser des expériences sur des jus de fruits frais. Les fruits entiers ont préalablement été lavés à l'éthanol 70% avant d'être épluchés. Les arilles ont été prélevées puis pressées manuellement à l'aide d'un presse-purée afin d'en extraire le jus. Les expériences ont ensuite été conduites sur le jus débarrassé de sa pulpe par une centrifugation de 5 min à 4716 g. En moyenne, la caractérisation du jus de grenade donne des teneurs de 0,48 ± 0,11 g/L en polyphénols totaux, 54 ± 0,01 mg/L en vitamine. Le dosage des sucres n'a pas été effectué au laboratoire. D'après la littérature, la teneur en sucre varie entre 130 et 170g/kg dans le jus (Al-Maiman and Ahmad, 2002; Mphahlele et al., 2016; Peña-Estévez et al., 2016). Son pH a été mesuré à 3,8. Sa contamination naturelle a également été évaluée. La population en levures et moisissure (Y&M) est de l'ordre de 10⁵ UFC/mL. La population en bactéries aérobies (TAB) est de 10⁵ UFC/mL.

1.2.2.3. Lait de soja

Du lait de soja, issu de l'agriculture biologique, de la marque Bio Village de Leclerc a été utilisé en guise de matière première. Cette matrice a été retenue pour sa richesse en protéines et sa popularité croissante en terme de laits végétaux. Cette matrice a été caractérisée au sein du laboratoire dès sa réception. Sa teneur en protéines a été dosée à $30,1 \pm 1,5$ g/L. L'étiquetage faisait état d'une valeur de 36 g/L. Son pH est de 6.

1.3. Molécules, réactifs et solutions pour les dosages

Pour suivre le critère « préservation », nous avons choisi de prendre la vitamine C et l'acide gallique comme molécules témoins. La vitamine C est intéressante de part sa thermosensibilité et sa forte sensibilité dans l'eau. Elle est stockée sous forme de poudre à 4°C. L'acide gallique est conservé sous forme de poudre à l'abri de la lumière sous ventilation. Il a également servi d'étalon dans la mise en place du dosage de Folin pour les polyphénols totaux. L'albumine de sérum bovin, qui a servi d'étalon pour le dosage de Bradford, est stockée sous forme de poudre à 4°C.

Tableau 17 : Récapitulatif des produits utilisés associés à leur fournisseur

Molécules	Fournisseur
Acide L-ascorbique (AA)	Sigma-Aldrich
Acide gallique (AG)	Sigma-Aldrich
Albumine de sérum bovin (BSA)	Sigma-Aldrich
Iodure de propidium	Sigma-Aldrich
Glycérol	Sigma-Aldrich
Réactif de Folin	Sigma-Aldrich
Réactif de Bradford	Sigma-Aldrich
Tampon de phosphate salin (PBS)	Sigma-Aldrich

1.4. Autres produits

Les différents solvants et produits utilisés sont répertoriés dans le tableau suivant :

Tableau 18 : Récapitulatif des solvants et gaz utilisés, associés à leur fournisseur

Produits	Pureté	Fournisseur
Ethanol	96%	ICS Atlantic
CO ₂	99,99%	Air liquide
Azote	99,999%	Air liquide

2. Préparation des matériels biologiques

2.1. Préparation des milieux de culture

Différentes solutions sont nécessaires pour la culture des souches microbiologiques représentatives. Chaque bouillon est préparé dans un flacon Schott de 250 mL selon les

recommandations du fabricant, soit 6 g de TSB, 11g de Fraser et 7 g de BHI pour la version riche et 2 g de BHI pour sa variante pauvre. Chaque milieu est complété par 200 mL d'eau distillée avant d'être stérilisé par autoclavage 20 min à 121°C. Après refroidissement, 2 mL de solution stérile de citrate ferrique ammoniacal à 5% sont ajoutés en conditions stériles au bouillon de Fraser. Les solutions sont stockées à 4°C entre chaque utilisation.

Une solution de glycérol diluée à 50% est préparée par mélange de 100 mL de glycérol avec 100 mL d'eau distillée. Ce mélange est également autoclavé 20 min à 121°C puis stocké à 4°C entre chaque utilisation.

2.2. Mise en culture

2.2.1. Bactéries végétatives

Les bactéries végétatives *E. coli* et *L. innocua* sont préparées de manière similaires. Les souches stockées à -80°C dans des cryotubes sont laissées à décongeler à la simple chaleur de la main. La culture se prépare en conditions stériles sous une hotte à flux laminaire. Dans un flacon de 15 mL sont versés à l'aide de pipettes jetables : 5mL de bouillon adapté et le contenu du cryotube. Chaque bouillon enrichi est ensuite placé dans un incubateur à 37°C sur un plateau rotatif à 200 rpm pour 24 h.

Entre deux manipulations, cette culture est stockée à 4°C dans son tube de culture. Afin de constituer des stocks, une partie du bouillon est aliquotée à raison de 1 mL de bouillon et 0,5 mL de glycérol à 50% en vue d'être congelée à -80°C en cryotubes. Le glycérol agit comme un cryoprotecteur et préserve les cellules d'une destruction trop importante liée à la congélation.

2.2.1. Levure : *S. cerevisiae*

Un échantillon aliquote d'un cube de levure de boulangerie est ajouté dans 9 mL d'eau physiologique (8,5‰ en NaCl) stérile. Ce mélange est agité fortement au vortex afin d'homogénéiser la suspension. 0,1 mL est ensuite étalé via la méthode des cadrans sur une boîte de gélose Sabouraud, puis incubés pendant 24h dans une étuve à 30°C. Cette étape permet d'isoler des unités formant colonies (UFC) « pures » de levure et de s'affranchir d'une éventuelle contamination endogène. Le jour suivant, 4 UFC sont sélectionnées et de nouveau étalées sur une boîte de Sabouraud à raison de 1 UFC par quart de boîte. La boîte de Pétri est mise à l'étuve pendant une nuit. Cette nouvelle boîte sert de vivier.

A l'aide d'une anse (ou öse), 5mL de bouillon TSB sont ensemencés par des prélèvement provenant des colonies de levures déjà préparées puis incubées pendant 24 h à 30°C. La prolifération des cellules est ensuite activée avec une incubation de 24 h à 31°C sous agitation à 200 rpm. Après croissance, le bouillon de levure est stocké à 4°C entre deux utilisations.

Le détail des conditions de culture des bactéries et de la levure est résumé dans le Tableau 19.

Tableau 19 : Résumé des conditions de préparation pour les bactéries végétatives et la levure

Souche	<i>E. coli</i>	<i>L. innocua</i>	<i>S. cerevisiae</i>
Milieu de culture	TSB	Fraser	TSB
Condition de culture	24 h à 37°C	24 h à 37°C	24 h à 31°C
	200 rpm	200 rpm	200 rpm
Milieu d'étalement	PCA	PALCAM	Sabouraud chloramphénicol
Dénombrement	Après 24 h à 37°C	Après 24 h à 37°C	Après 48 h à 31°C

2.2.2. Préparation des spores de *B. subtilis*

La souche *B. subtilis* nécessite un protocole particulier schématisé sur la Figure 16. Le stock initial est décongelé et mis à incuber 24 h à 37°C dans du BHI riche sous une agitation à 200 rpm. C'est l'étape de revivification. 1 mL de ce milieu est ensuite prélevé et dispersé dans 5 mL de milieu BHI pauvre, puis placé 48h sous agitation à 200 rpm dans une étuve à 37°C. C'est l'étape de sporulation. Ce bouillon est ensuite passé 10 min dans un bain-marie à 80°C afin d'éliminer les cellules végétatives puis stocké à 4°C entre chaque utilisation.

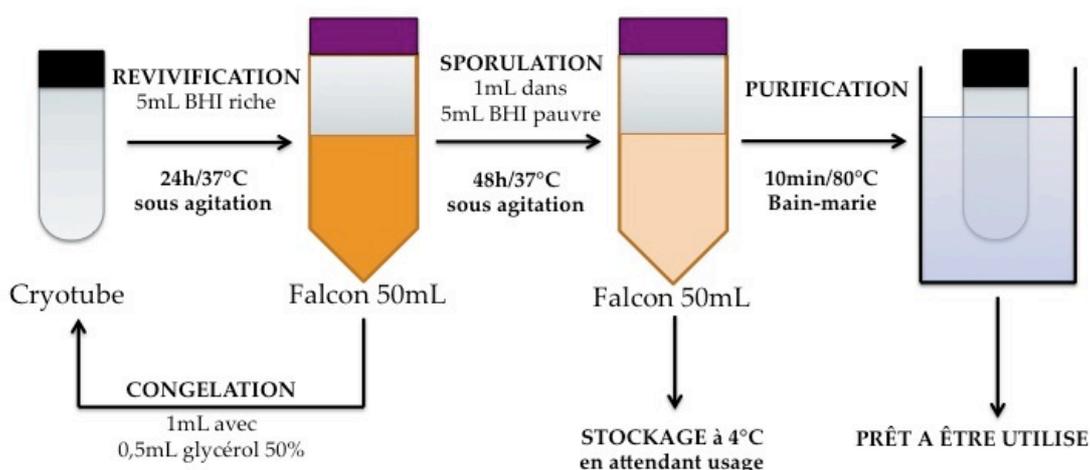


Figure 16 : Protocole de préparation des spores de *B. subtilis*

2.3. Préparation des milieux pour le dénombrement

Les différents milieux pour le dénombrement sont préparés selon les indications du fabricant. 18 g de PCA, 40,5 g de Sabouraud chloramphénicol et 62 g de PALCAM sont pesés dans des flacons Schott d'1 L et dissous dans 900 mL d'eau distillé (qsp). Pour la souche sporulante, le milieu a été préparé en additionnant 13 g de gélose à 33 g de BHI dans 900 mL d'eau distillée (qsp). Les milieux sont stérilisés, après homogénéisation, par autoclavage 20 min à 121°C.

Une fois la température des milieux redescendue aux alentours de 50°C, le milieu PALCAM est complété avec 9 mL de supplément sélectif. Ce supplément se présente sous la forme d'un lyophilisat à reconstituer dans 25 mL d'eau distillée stérile. Il s'agit d'un mélange de deux antibiotiques (25 mg de polymyxine et 50 mg de ceftazidime) et d'un colorant antiseptique (12,5 mg d'acriflavine). Les milieux sont alors coulés en boîte de Pétri en conditions stériles à raison d'environ 15 mL par boîte. Après solidification de la gélose, les boîtes sont stockées à 4°C retournée (couvercle en dessous) pour éviter la formation de condensation sur la gélose. Chaque souche forme des colonies d'aspect différent (Figure 17). *E. coli* pousse sur PCA en formant des colonies blanches. *S. cerevisiae* se matérialise par des colonies crémeuses beiges circulaires sur la gélose Sabouraud. Après incubation *L. innocua* apparaît de couleur verte entourée d'un halo noir. Ce halo traduit la présence d'esculétine, conséquence de l'hydrolyse de l'esculine du milieu par *L. innocua*. Les spores poussent en formant des colonies très larges à l'aspect étoilé.

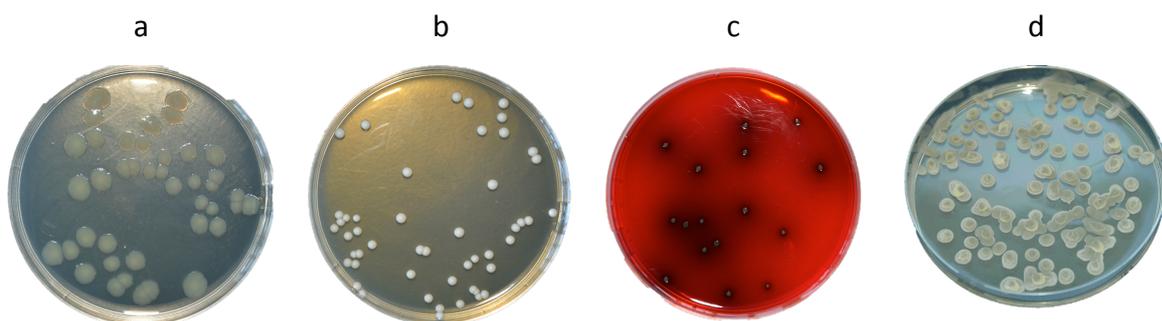


Figure 17 : Aspect des souches étudiées : (a) *E. coli* sur gélose PCA, (b) *S. cerevisiae* sur gélose Sabouraud, (c) *L. innocua* sur gélose PALCAM et (d) *B. subtilis* sur du BHI gélosé

3. Préparation des échantillons à traiter

Afin de faciliter l'exploitation des résultats, toutes les matrices testées ont été préparées de la même manière. Sauf indications contraires, les échantillons traités par CO₂ pressurisé sont composés de :

- 10 mL de matrice à tester
- 4 mL de solution d'acide ascorbique à 5,25 g/L
- 4 mL de solution d'acide gallique à 0,1 g/L
- 1 mL de chaque bouillon de microorganismes (*E. coli*, *S. cerevisiae* et *L. innocua*)

La concentration finale moyenne en microorganismes est de l'ordre de 10⁸ UFC/mL pour *E. coli* et *L. innocua* et d'environ 10⁶ UFC/mL pour *S. cerevisiae*.

La préparation se fait en conditions stériles sous une hotte à flux laminaire. 2 mL sont conservés pour déterminer les concentrations initiales en cellules (UFC/mL) et en vitamine C (g/L). Les 19 mL restants sont utilisés pour le traitement de pasteurisation sous CO₂.

Le même protocole de préparation a été utilisé pour les matrices suivantes : les compléments alimentaires *Jambes Légères* et *Détox*, le jus de grenade, le lait de soja, l'eau du robinet, l'eau physiologique et l'eau osmosée, ainsi que les tampons phosphate-citrate et le bouillon TSB.

Au besoin, ces proportions ont été multipliées pour faire varier le volume réactionnel tout en conservant la même contamination volumique.

4. Dispositifs expérimentaux utilisés

4.1. Dispositif dit batch

4.1.1. Dispositif

Les essais de pasteurisation sont réalisés grâce à un dispositif spécialement mis en place au laboratoire, représenté sur la Figure 18. L'enceinte réactionnelle est constituée d'un réacteur à ouverture rapide en inox d'une capacité de 50 mL (Autoclave, France) positionné dans une étuve (Binder GmbH, Tuttlingen, Allemagne) qui assure le maintien d'une température constante.

Le CO₂ liquéfié à -0,3°C (Lauda Eco RE420, France) est introduit dans le réacteur via une pompe seringue (Teledyne ISCO 260D, Serlabo, France) à un débit de 14 mL/min. Le CO₂ est introduit directement dans la solution grâce à un tube plongeur de 1 mm de diamètre

intérieur. La solution n'est pas en contact direct avec les parois du réacteur, mais elle est contenue dans un flacon en verre de dimensions 80 mm de haut pour un diamètre interne de 30 mm. Les 19 mL de solution occupent un peu plus de la moitié de la hauteur et représente 38% du volume total. Un barreau magnétique de longueur 1 cm assure l'agitation de la solution à une vitesse d'environ 350 rpm. La pression et la température au sein du réacteur sont mesurées par un capteur de pression (400 bar, ASCO) et un thermocouple de type K (précision 1°C, Watlow, France) inséré dans un tube plongeur. La température enregistrée est celle de la solution. Une vanne de laminage (20SC4082, Autoclave Engineers, Etats-Unis) permet de réguler la vitesse de dépressurisation. Le dispositif est équipé d'une seconde pompe (LDC Analytical 3200, ConstaMetric) qui assure le rinçage et la décontamination du dispositif avec de l'éthanol à 70%. La ligne de sortie est chauffée à l'aide d'un ruban chauffant pour éviter la formation de carboglace lors de la dépressurisation. En sortie de vanne, le flux bulle dans un bidon d'eau de Javel relié à une hotte aspirante. Cette précaution permet d'éradiquer toute contamination résiduelle de l'air.

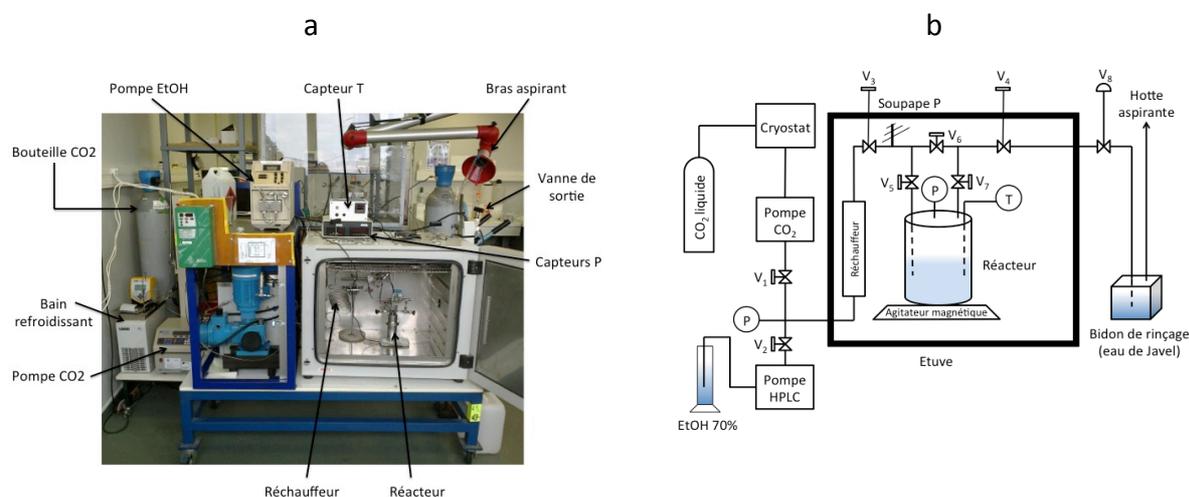


Figure 18 : Représentation du dispositif de pasteurisation, (a) montage réel, (b) schéma

4.1.2. Protocole

Trois heures avant le début de l'expérience, l'étuve contenant le réacteur et le flacon en verre est mise en chauffe 2°C au dessus de la température voulue. Après 2 heures de préchauffage, la consigne de l'étuve est baissée à la température souhaitée pour l'expérience et le flacon en verre est emmené sous une hotte à flux laminaire pour être chargé avec le milieu à traiter. La préparation du milieu et l'étalement des boîtes de Pétri prennent une quinzaine de minutes. Le flacon en verre est ensuite introduit dans le réacteur,

qui est ensuite scellé et connecté au reste du circuit. Le réacteur est pressurisé lorsque la température de la solution a atteint la température voulue moins 2°C. Ceci dans le but de compenser la hausse de température liée à la mise sous pression du réacteur. Une fois la pression désirée atteinte, le réacteur est isolé grâce aux vannes V₃ et V₇ et la durée du traitement correspond à cette phase statique. Quelques minutes avant l'arrêt du traitement, la partie du circuit en aval du réacteur est mise à la même pression en fermant V₅ et en ouvrant V₆. V₆ est ensuite refermée et le réacteur dépressurisé en l'espace de quelques minutes selon la vitesse de dépressurisation souhaitée. Cette dépressurisation entraîne une chute de la température du milieu d'une dizaine de degré selon la température initiale et la vitesse de dépressurisation. Plus celle-ci est brutale, plus la chute de température qui l'accompagne est importante. Une fois le réacteur revenu à pression atmosphérique, il est isolé via les vannes V₅ et V₇ et le dispositif est décontaminé en faisant passer 40 mL d'éthanol 70%_v à un débit de 5 mL/min. Puis le dispositif est séché grâce à un flux de 30 min de CO₂ à 100 bar à raison d'un débit de 5 mL/min. Le réacteur est extrait de l'étuve et son ouverture se déroule sous une hotte à flux laminaire, de manière à manipuler en condition stériles et éviter des contaminations croisées. La solution traitée est alors collectée dans un tube stérile pour ensuite procéder aux différentes analyses de l'échantillon. Elles sont menées systématiquement dans les 3 heures suivant le traitement au CO₂.

4.2. Dispositif batch de plus grand volume

Ces essais sont menés sur un dispositif, noté GAS, généralement dédié à la cristallisation (Neurohr, 2015). Par rapport au dispositif précédent, il offre un plus grand volume de cuve, une agitation par turbine par laquelle peut être dispersé le CO₂ et la possibilité d'observer le milieu via des fenêtres en saphir.

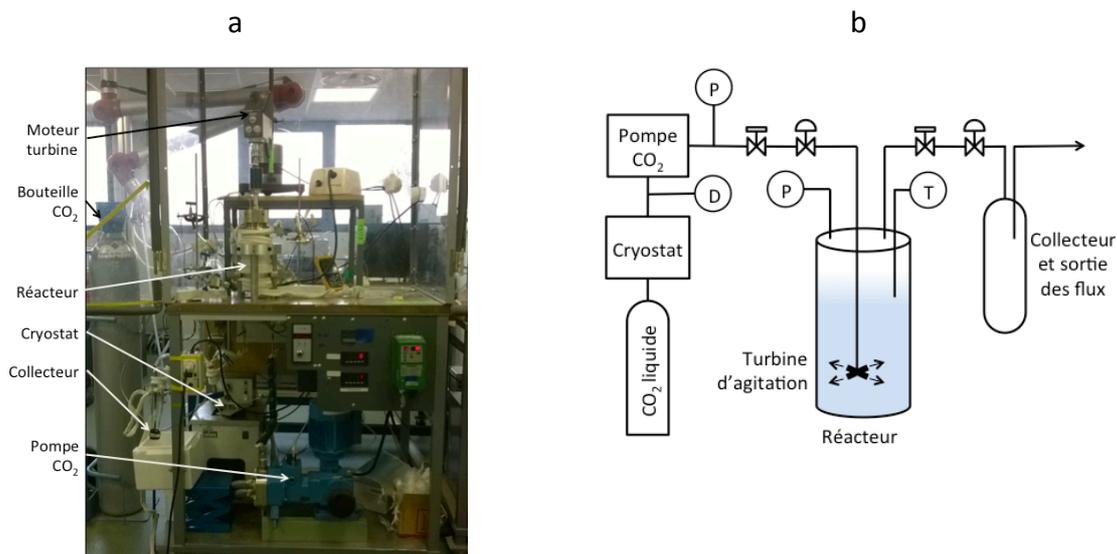


Figure 19 : Schéma du procédé GAS (D : débitmètre), (a) montage réel, (b) schéma

4.2.1. Dispositif

Le montage, présenté sur la Figure 19, est composé d'un réacteur haute pression en inox (Top Industrie) de hauteur $H = 250$ mm et de diamètre interne $d = 42$ mm, percé de trois fenêtres en saphir en partie basse. Un capteur de pression (Asco, type PR711F 40 MPa, précision 0.1 MPa) et un thermocouple (Watlow, type K, précision 1°C) plongeant dans la solution mesurent les conditions du réacteur. Ces mesures sont enregistrées par le logiciel Labview. Un système de régulation thermique (Watlow) couplé à un ruban chauffant (Horst) enroulé autour de l'enceinte du réacteur permet d'en contrôler la température. Le CO_2 est refroidi par un cryostat (Colora Messtechnik) à 0°C avant d'être envoyé dans le réacteur. Une pompe à membrane Lewa (EM1, Lewa) assure l'introduction du CO_2 . Un débitmètre massique (Bronkhorst, M53-AAD-22-0B, 5 MPa) mesure la quantité de CO_2 passée pendant la phase de montée en pression. Une vanne de micro-laminage en entrée du réacteur permet de contrôler le flux de CO_2 jusqu'à ce que la pression du réacteur soit égale à la pression de la bouteille de CO_2 (5 MPa), après quoi la vanne est complètement ouverte et c'est la pompe Lewa qui contrôle le débit de CO_2 injecté. Une autre vanne en pied de réacteur permet de contrôler le flux de CO_2 de sortie et maintient la pression voulue dans le réacteur pendant la phase de dépressurisation. Cette vanne est chauffée à l'aide d'un ruban (Horst) afin de prévenir la formation de carboglace lorsque le CO_2 se détend. Après la vanne, le CO_2 est évacué dans un bras aspirant. L'agitation est assurée par une tige motorisée (RZR 2021, Heidolph) couplée à une turbine de type Rushton à 8 pales droites de diamètre 25 mm

et de hauteur 9 mm, qui se situe à 10 mm du fond du réacteur. Le CO₂ est introduit directement au sein de la solution à travers des trous positionnés entre les pales de la turbine.

4.2.2. Protocole

L'enceinte du réacteur est mise en chauffe environ 1 heure avant le lancement de l'expérience. Un flacon en verre dont les dimensions s'adaptent au réacteur est emmené sous une hotte à flux laminaire pour être chargé avec le milieu à traiter. Le contenu du flacon est préchauffé au préalable 15 min dans un bain marie réglé à la température voulue avant d'être inséré dans le corps du réacteur. Le réacteur est scellé puis mis sous agitation à 154 rpm. Il est progressivement mis sous pression bouteille, puis la pompe CO₂ (course de 10 mm) est actionnée pour monter à la pression désirée. La fréquence de la pompe est ajustée pour atteindre un débit d'environ 4,4 bar/min. L'étape de pressurisation prend environ 23 min. Une fois la pression voulue atteinte, le réacteur est isolé et la durée du traitement est décomptée. Une fois cette durée écoulée, l'agitation est stoppée et le réacteur dépressurisé progressivement en l'espace d'approximativement une heure. Le réacteur est alors ouvert et l'échantillon récolté pour analyse. L'installation est démontée et le réacteur rincé à l'eau et décontaminé à l'éthanol 70%.

4.3. Dispositif continu

4.3.1. Dispositif

Le réacteur du dispositif continu (Figure 20) est un tube de 1/8" de diamètre extérieur d'une longueur $L = 4,7$ m et de diamètre interne $d = 1,5$ mm (volume total de 8,3 mL) cintré en spires de 10 cm de diamètre. La mise en température du réacteur est assurée via un bain régulé par un thermostat (Polystat 36, Fisher Scientific). Le dispositif compte deux lignes d'admission, d'une part la ligne CO₂ et d'autre part la ligne liquide.

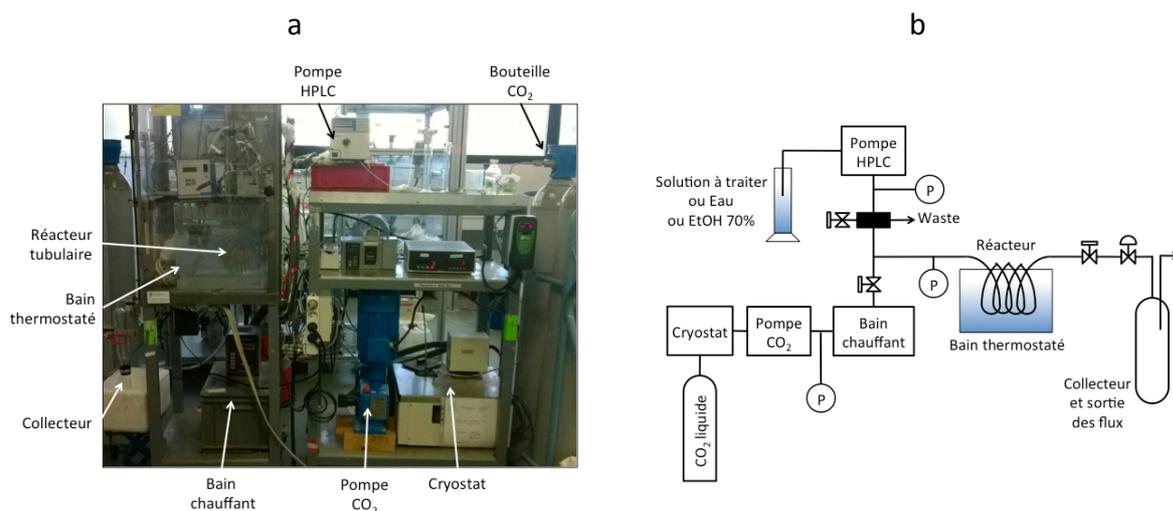


Figure 20 : Représentation du dispositif continu, (a) montage réel, (b) schéma

Un cryostat permet de refroidir le CO₂ (DC 10, ThermoScientific Haake) qui est ensuite transporté par une pompe à membrane Lewa (LDB1, Lewa) à débit massique constant. Deux capteurs de pression (Asco, type PR711F 40 MPa, précision 0.1 MPa) sont situés en sortie de la pompe Lewa et en tête de réacteur. À la sortie de la pompe, le CO₂ est chauffé à la température voulue par un bain chauffant (Stabitherm 200 S, Prolabo). La solution à traiter est injectée via une pompe HPLC (2086 PLUS, Jasco, Lisses, France). Son capteur intégré permet de connaître la pression de la ligne liquide. Les deux flux se réunissent en amont via un T (SS-200-3, Swagelok, Lyon, France) avant d'entrer dans le réacteur. Une vanne de micro-laminage est utilisée pour réguler la pression dans le réacteur. Celle-ci ainsi que toute la ligne de sortie du réacteur sont chauffées pour éviter la formation de carboglace lors de la détente du CO₂. La solution traitée est collectée en sortie de réacteur dans un collecteur plongeant dans un bain de glace à pression atmosphérique et température ambiante.

4.3.2. Protocole

Le dispositif est mis en régime en actionnant la pompe CO₂ (course de 7 mm) pour atteindre la pression requise. Une fois la pression voulue atteinte, la fréquence de la pompe est ajustée pour atteindre le débit souhaité, débit mesuré à l'aide d'un compteur à gaz placé en sortie de montage après le cyclone. Un collecteur propre, stérilisé aux UV, est mis en place en pied de cyclone, une fois la mise en régime opérationnelle.

La solution à traiter (à base de *Jambes Légères*) est injectée au débit souhaité (en général 2 mL/min) via la pompe HPLC. La solution est d'abord envoyée dans le « waste » afin de

conditionner la ligne et de limiter la dilution. Après avoir pompé 5 mL de la solution dans le « waste », un jeu de vannes permet de faire basculer le flux de liquide dans le réacteur. Une dizaine de mL de solution de *Jambes Légères* est alors injectée dans le dispositif. C'est ce volume qui subira effectivement le traitement et qui sera analysé en sortie de réacteur. Une fois ce volume écoulé, la solution de *Jambes Légères* est remplacée par de l'eau distillée. Un peu moins d'un volume mort (± 12 mL) d'eau est envoyé dans le circuit afin de pousser le reste de solution présente dans la ligne liquide vers le réacteur (± 12 mL d'eau). Le collecteur est retiré. L'échantillon récolté est étalé sur boîte de Pétri pour dénombrement.

L'installation est ensuite rincée en injectant toujours sous flux de CO₂ à 100 bar, 30 mL d'eau puis 50 mL d'éthanol 70%_v à un débit respectif de 2 et 4 mL/min. En dernier lieu, un flux de CO₂ à 100 bar pendant 30 min est utilisé pour évacuer l'éthanol.

5. Caractérisation

5.1. Aspect microbiologique

5.1.1. Suivi de la croissance microbienne

Dans le cadre de ces travaux, cette technique n'a été utilisée qu'afin de s'assurer de la croissance des microorganismes dans certains milieux et non en vue d'une quantification.

Le suivi de l'enrichissement des bouillons de culture en bactéries peut se faire par mesure de la densité optique du milieu. Cette technique obéit à une loi de proportionnalité de type Beer-Lambert reliant l'absorbance du milieu et la quantité de microorganismes (Koch, 1970; Monod, 1941). L'augmentation de la turbidité des milieux de culture va refléter une augmentation du nombre de microorganismes présents.

Une petite quantité de bouillon de culture est versé dans une microcuve en PMMA de longueur optique 1 cm. La lecture de l'absorbance est réalisée à 600 nm à l'aide d'un spectromètre Hitachi UH5300 (Velizy, France).

5.1.2. Mesure de la réduction décimale par étalement

La contamination (c'est-à-dire la concentration en microorganisme en UFC/mL) est évaluée avant chaque traitement au CO₂ pressurisé de manière à avoir le niveau de départ et après chaque traitement pour en évaluer l'efficacité. Le réacteur scellé est emporté sous la hotte à flux laminaire. Il est ensuite ouvert et le milieu est transvasé dans un tube de 50 mL. Cette solution est prélevée puis diluée par dilutions successives dans des tubes de 9 mL

d'eau physiologique à 8,5%. Trois dilutions successives sont étalées à raison de 50 µL par boîte de pétri à l'aide d'un râteau en verre stérile. Ces dilutions sont choisies selon l'intensité présumée du traitement. Deux répliques par concentration sont réalisés. Enfin les boîtes sont mises à incuber pour 48 h dans les conditions qui sont favorables à la croissance des microorganismes concernés (37°C pour *E. coli* et *L. innocua* et 30°C pour *S. cerevisiae*). Le dénombrement des colonies se fait manuellement une fois ce laps de temps écoulé.

5.1.3. Evaluation de l'impact du traitement sur les cellules

5.1.3.4. Marquage à l'iodure de propidium et microscopie à fluorescence

Le marquage à l'iodure de propidium (PI) permet de matérialiser la perméabilisation des membranes et la viabilité des cellules. En effet, ce marqueur ne peut se fixer sur les acides nucléiques contenus dans les cellules que si les membranes de celles-ci ont été fragilisées, c'est-à-dire, si les cellules sont mortes ou endommagées de manière irréversible (Garcia-Gonzalez et al., 2010a; Spilimbergo et al., 2009).

1 mL du milieu traité est centrifugé à 1000 g pendant 5 min. Le culot est ensuite lavé avec 1 mL de PBS puis à nouveau centrifugé. Le culot récupéré est alors marqué avec 0,5 µL de PI dilué dans 1 mL de PBS. Cette solution est incubée 5 min à température ambiante avant d'être centrifugée. Le culot est à nouveau rincé au PBS avant d'être centrifugé et finalement solubilisé dans 100 µL de PBS. Cette solution est observée au microscope à fluorescence avec un objectif x 60 à une longueur d'onde d'excitation de 480 nm.

5.1.3.5. Microscopie à transmission d'électrons

La microscopie électronique à transmission d'électrons (TEM) utilise un faisceau d'électrons pour obtenir une image d'objets ayant des tailles nano à micrométrique. L'emploi d'un faisceau d'électrons permet de diminuer la longueur d'onde des radiations interagissant avec l'échantillon et ainsi d'avoir une meilleure résolution. Cette technique permet d'obtenir des clichés haute définition de l'ultrastructure cellulaire, sur lesquels l'impact du traitement sur la morphologie des souches étudiées peut être observé (Garcia-Gonzalez et al., 2010a; Oulé et al., 2006). La préparation des échantillons et la réalisation des clichés ont été sous traitées au sein de l'équipe *Vésicules Extracellulaires et Réparation Membranaire* de l'institut CBMN, selon un protocole développé par leurs soins.

Les échantillons ont été déshydratés par des bains successifs dans de l'éthanol de plus en plus concentré, avant d'être inclus dans une résine Epon-Araldite (Agar, Standsted,

Royaume-Uni). Après durcissement de la résine, les échantillons sont coupés en fines tranches de 75 nm grâce à un microtome (Leica) et déposés sur une grille de cuivre (Teambar Agar, Stansted, Royaume-Uni). Les observations sont menées à l'aide d'un microscope TECNAI CM120 (FEI) à 120 kV (Hong et al., 2009).

Pour la cryomicroscopie, les échantillons sont déposés sur une grille en cuivre recouverte de d'un film de carbone percé de trous (Lacey-fromar, Tedpella, Eloise SARL, Roissy, France). La grille maintenue par une pince est fixée au bras de la « guillotine » (EM CPC, Leica) et l'excès de solution est éliminé par absorption à l'aide d'un papier filtre. La grille est alors rapidement plongée dans de l'éthane liquide à -173°C. L'échantillon est enfin observé à l'aide d'un microscope TECNAI F20 (FEI) de 200kV. Les images sont enregistrées grâce à une camera USC1000-SSCCD (Gatan).

5.2. Méthodes analytiques

5.2.1. Quantification des polyphénols totaux

La concentration en polyphénols totaux est évaluée grâce au dosage colorimétrique de Folin-Ciocalteu (Boussetta, 2010). Cette méthode est basée sur une réaction d'oxydo-réduction. Le réactif de Folin est composé d'un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$). Il est réduit lors de l'oxydation des phénols en un mélange d'oxydes bleus de tungstène (W_8O_{23}) et de molybdène (Mo_8O_{23}). La coloration produite présente un maximum d'absorption aux alentours de 760 nm et son intensité est proportionnelle à la concentration de polyphénols présente dans l'échantillon.

Un tampon phosphate-citrate est préparé à partir de 4,66 g de Na_2HPO_4 , 4,49 g de KH_2PO_4 et de 4,38 g de NaCl pour 500 mL d'eau distillée. Le pH de cette solution est ajusté à 4 par ajout de solution concentrée d'acide chlorhydrique. Le réactif de Folin est dilué au dixième avec de l'eau distillée avant utilisation. Une solution de carbonate de sodium à 75 g/L est également préparée.

Le dosage de référence avant traitement est effectué sur une ampoule stérile de *Jambes Légères*. La concentration en polyphénols est considérée comme homogène sur l'ensemble d'un lot de production. Un nouveau dosage est donc réalisé à la réception de chaque nouveau lot. Le complément pur est dilué au 1/5^e avant d'être utilisé pour le dosage. Le dosage après traitement se fait à partir de 10, 20 et 30 μ L d'échantillon, qui sont prélevés puis dilués dans 190, 180 et 170 μ L du tampon phosphate-citrate. Chaque dilution est

préparée en double, afin de s'assurer de la répétabilité et de la reproductibilité des mesures. A chaque tube est ajouté 1 mL de réactif de Folin, puis le contenu est homogénéisé à l'aide d'un vortex. Après l'ajout de 0,8 mL de carbonate de sodium, l'échantillon est de nouveau homogénéisé puis incubé 10 min à 60°C dans une étuve. L'absorbance est lue à 750 nm grâce à un spectrophotomètre Hitachi UH5300.

La courbe d'étalonnage est obtenue à partir de solutions d'acide gallique avec des concentrations variant de 0 à 100 mg/L. La régression a donné l'équation suivante :

$$Abs = 0,01 cc(PPT) - 0,03 \text{ avec } R^2 = 0,999 \quad (3)$$

La teneur en polyphénols totaux (PPT) est exprimée en équivalent d'acide gallique par la formule : $C = \frac{V}{v.a} (Abs - b)$ avec

V : volume final de l'échantillon (200 µL)

v : volume prélevé de l'échantillon

a : pente de l'équation de la courbe de calibration

b : ordonnée à l'origine de la courbe de calibration

Ce dosage des polyphénols présente des interférences avec des substances non phénoliques telles que les sucres, les protéines, la vitamine C, les acides organiques... (Everette et al., 2010). La concentration en polyphénols doit donc être corrigée par un dosage de la vitamine C. Dans l'hypothèse de l'additivité des absorbances, le dosage de Folin nous donne :

$$Abs \text{ Folin} = Abs \text{ liée au PPT} + Abs \text{ liée à la vit C} + Abs \text{ liée aux protéines} \quad (4)$$

La contribution de chaque type de molécule a donc été évaluée. Des solutions de concentrations variées en vitamine C et en protéines ont été dosées par la méthode de Folin. La lecture des absorbances a permis d'établir les courbes reproduites ci-après.

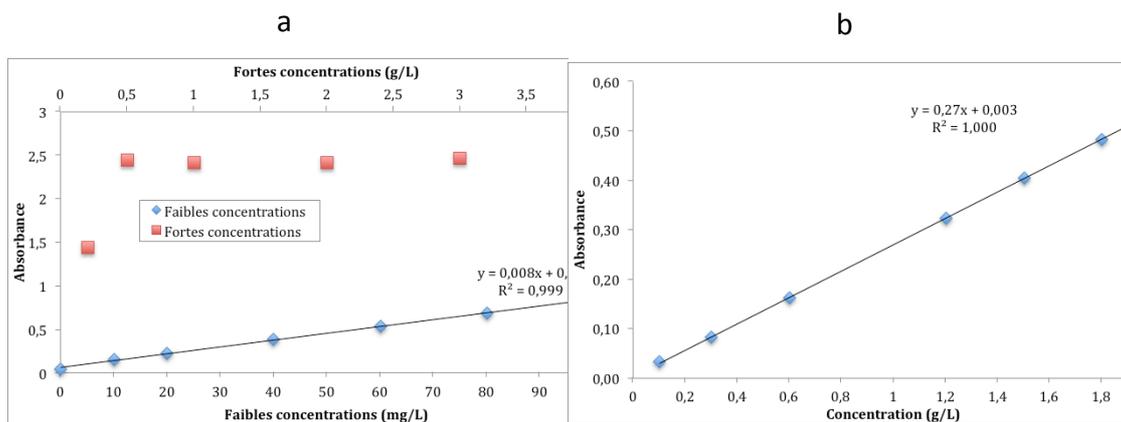


Figure 21 : Dosage (a) de solutions de vitamine C et (b) de solutions de BSA (protéine) par la méthode de Folin à $\lambda = 750\text{nm}$

Le spectrophotomètre sature lorsqu'une concentration supérieure à 0,5 g/L en vitamine C est dosée par Folin. Par mesure de précautions, la concentration dans notre échantillon a été maintenue bien inférieure à ce seuil, pour ne pas altérer la qualité et à la précision du dosage des polyphénols. Selon la Figure 21, les protéines contribuent modestement à l'absorbance du dosage de Folin. Dans la mesure où nos échantillons sont par ailleurs assez peu concentrés en protéines, sa contribution a été négligée dans la correction.

5.2.2. Identification des polyphénols par HPLC

5.2.2.6. Méthode

La méthode de dosage la plus largement utilisée pour séparer les composés phénoliques est la séparation par HPLC (High Pressure Liquid Chromatographie) souvent en phase inverse (principalement l'octadécylsilice ou C18). Les gradients d'élution comportent des proportions croissantes de méthanol ou d'acétonitrile, dans de l'eau acidifiée. Les composés sont élués par ordre de polarité décroissante : les acides hydroxycinnamiques le sont avant les flavonoïdes. Pour ces derniers les aglycones sortent généralement après leurs dérivés glycosilés.

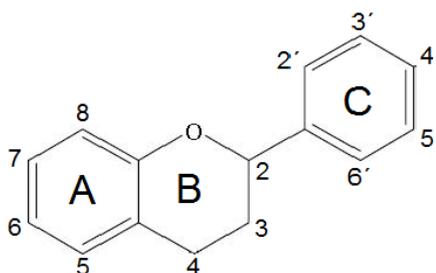


Figure 22 : Structure générale des flavonoïdes (Chehue et al., 2013)

La détection est basée sur l'absorption caractéristique des polyphénols dans l'UV. La plupart des flavonoïdes ont en effet deux bandes d'absorption majeures : une à 320-385 nm, caractéristique de l'absorption du cycle C et une à 280-285 nm, caractéristique de l'absorption du cycle A. Ces bandes varient cependant en fonction des substitutions possibles sur les cycles. Les flavonols présentent un maximum d'absorption dans le jaune (350 à 360 nm) et les anthocyanes dans le rouge (520 à 530 nm). Pour les acides hydroxycinnamiques, ce maximum est à 320 nm. La détection UV par barrette de diode, à longueurs d'ondes multiples, permet ainsi de distinguer les classes de composés.

5.2.2.7. Identification

Les analyses HPLC ont été exécutées sur un module de séparation Agilent 1260 Infinity (Agilent Technologies, Etats-Unis) équipé d'un détecteur à barrettes de diode. La séparation a été réalisée sur une colonne Spherisorb ODS2 (250 x 4,6 mm, 5 µm) (Hichrom, Royaume-Uni) protégée par une pré-colonne (C18, 4 x 3 mm) à 25°C. La phase mobile consiste en 5 % d'acide formique dans de l'eau milli-Q (éluant A) et du méthanol (éluant B), selon le gradient suivant : 10-15 % B (0-5 min), 15-30% B (5-20 min), 30-50% B (20-35 min), 50-90% B (35-40 min) , 90-10%B (40-44 min) puis 10 min d'isocratique à 10% B, à un débit de 1 ml/min. Le volume d'injection est de 5 µL et la détection UV se fait à 280, 320 et 520 nm.

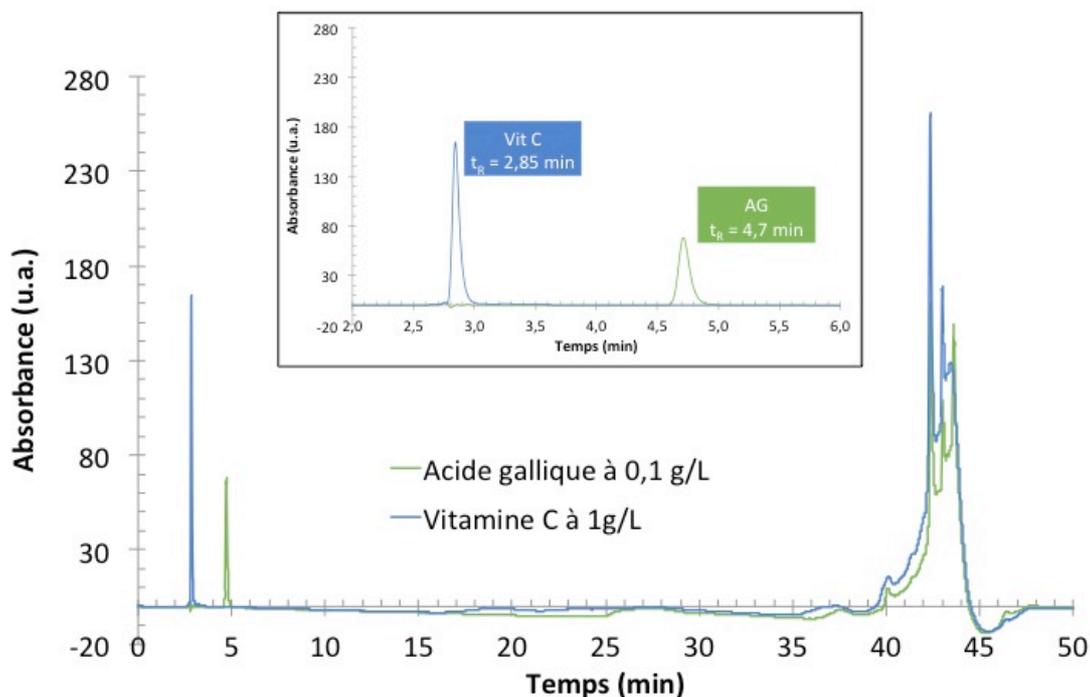


Figure 23 : Profil chromatographique de *Jambes Légères* et du jus de grenade à 280 nm

Les pics observés sur le chromatogramme HPLC sont identifiés par corrélation avec les données de la littérature et par utilisation de standards purs. L'identification de plusieurs pics a été possible par l'injection de composés standards commerciaux et comparaison des temps de rétention et des spectres UV-visibles avec ceux des étalons. Les caractéristiques des pics sont présentées dans le Tableau 20. Le profil chromatographique à 280 nm (Figure 23), met en évidence plusieurs pics détectés. Les pics de la vitamine C et de l'acide gallique ont été identifiés. Le chromatogramme est uniquement interprété de manière qualitative et sert principalement à observer l'effet du traitement au CO₂ pressurisé sur les matrices alimentaires étudiées (diminution de la surface des pics d'origine ou apparition de nouveaux pics, signes de dégradations).

Tableau 20 : Identification des molécules d'intérêt par HPLC à barette d'iode (t_R : temps de rétention, λ : longueur d'onde maximale)

Composé	t_R (min)	λ_{max} (nm)
Acide ascorbique	2,8	256
Acide gallique	4,8	274

5.2.3. Teneur en protéines

La teneur en protéines est quantifiée par le dosage colorimétrique de Bradford. (Bradford, 1976). Il repose sur la formation d'un complexe bleuté entre les

protéines et le colorant Brilliant Blue G. La coloration résultante est proportionnelle à la concentration de protéines présentes dans l'échantillon. Le réactif de Bradford est acheté prêt à l'emploi auprès de Sigma-Aldrich.

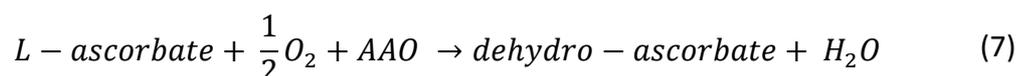
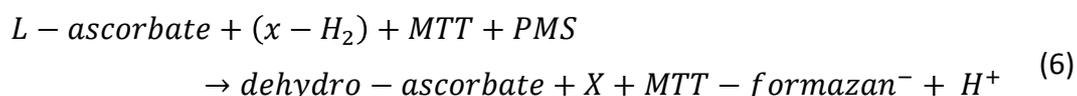
Le dosage de référence avant traitement est effectué sur une ampoule stérile de *Jambes Légères*. La concentration en protéines est considérée comme homogène sur l'ensemble d'un lot de production. Un nouveau dosage est donc réalisé à chaque nouveau lot utilisé. Le dosage après traitement se fait à partir de 3 dilutions. 60, 80 et 100 µL d'échantillon sont prélevés et complétés jusqu'à 100 µL avec de l'eau distillée. Ces 100 µL sont répartis dans 2 tubes contenant 1,5 mL de réactif de Bradford à raison de 50 µL par tube. Les tubes sont agités puis l'absorbance est lue directement à 595 nm.

Une gamme étalon est réalisée avec des solutions d'albumine de sérum bovin (BSA), dont les concentrations varient de 0 à 1,4 g/L. La régression a donné l'équation suivante :

$$Abs = 0,67 cc(protéines) + 0,61 \text{ avec } R^2 = 0,999 \quad (5)$$

5.2.4. Teneur en vitamine C

L'acide ascorbique est dosé via le kit enzymatique ENZYTEC™ L-ascorbic Acid de r-Biopharm (Darmstadt, Allemagne). Ce dosage colorimétrique repose sur la réaction entre le L-ascorbate, l'ascorbate oxydase (AAO) et le 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium bromide (MTT) en présence de 5-méthylphénazinium méthylsulfate (PMS) selon les réactions suivantes :



Un dosage préalable de *Jambes Légères* a permis de confirmer l'absence de vitamine C dans ce complément alimentaire. Selon la concentration en vitamine C ajoutée au mélange dosé, les dilutions appliquées pour le dosage varient. Pour une concentration de 19 mg/L en vitamine C, les échantillons sont directement dosés

sans dilution. Pour une concentration à 4 g/L, des dilutions au 1/25^e sont réalisées. Enfin, les échantillons ayant une concentration de 1 g/L sont dilués au 1/5^e. La préparation des échantillons se déroule selon le protocole exposé dans le Tableau 21.

Tableau 21 : Protocole de dosage de la vitamine C pour les mélanges à 1 g/L

			Référence avant traitement	Echantillon Dilution 1	Echantillon Dilution 2	
			Blanc	Blanc	Blanc	
Préparation des échantillon pour le dosage						
Etape 1	Echantillon	mL	1	0,5	1	
	Eau osmosée	mL	4	4,5	4	
Agitation des dilutions. Passage au dosage en lui-même						
Etape 2	MTT	mL	1	1	1	
	Eau distillée	mL	1,48	1,5	1,48	1,5
	Echantillon	μL	100	100	100	
	AAO	μL	20	-	20	-
Incubation de 6 min à l'étuve à 37°C. Mesure absorbance A₁ contre air.						
Etape 3	PMS	μL	100	100	100	
Emballage dans de l'aluminium puis incubation de 15 min à l'étuve à 37°C. Mesure absorbance A₂ contre air.						

Les cuves ne contenant pas d'enzyme noircissent proportionnellement à la concentration de MTT-formazan formé. Son absorbance est mesurée à 578 nm. La concentration en vitamine C est donnée par la formule suivante :

$$C = F \cdot \frac{V \cdot M_w \cdot \Delta A}{\epsilon \cdot d \cdot v \cdot 1000} = 0,28 \cdot \Delta A \quad (8)$$

$$\text{avec } \Delta A = (A_2 - A_1)_{\text{échantillon}} - (A_2 - A_1)_{\text{blanc}} \quad (9)$$

et F : facteur de dilution

V : volume final de l'échantillon (2,7 mL)

v : volume de l'échantillon (100 μL)

M_w : masse molaire de l'acide ascorbique (176 g.mol⁻¹)

ε : coefficient d'extinction molaire de l'acide L-ascorbique (16,9 L.mmol⁻¹.cm⁻¹)

1)

d : chemin optique (1cm)

Partie III : Résultats et discussion

Sommaire de la partie III

Chapitre 1 : Etude préliminaire de l'acidification d'un milieu aqueux en présence de CO₂ et de la résistance au pH des microorganismes	147
1. Equilibres de dissolution	145
2. Acidification des milieux aqueux	146
2.1. Protocole et conditions étudiées.....	146
2.2. Analyse des résultats.....	147
3. Comportement du complément alimentaire	151
4. Durée de retour au pH initial après traitement.....	152
5. Effet du pH sur les microorganismes	154
6. Conclusion	156
Chapitre 2 : Pasteurisation du complément alimentaire : facteurs influents, optimisation des conditions opératoires et analyse des modifications structurales des microorganismes.....	159
1. Recherche des facteurs influents.....	163
1.1. Stratégie expérimentale	163
1.2. Structuration du plan d'expériences	164
1.3. Choix des niveaux de facteurs	165
1.4. Méthode d'analyse des plans d'expériences.....	166
1.5. Analyse du plan d'expériences	167
1.5.1. <i>Tendances générales, reproductibilité et fiabilité</i>	167
1.5.1. <i>Identification des facteurs influents</i>	169
1.5.2. <i>Effet des interactions</i>	175
1.6. Optimisation mathématique	176
1.7. Conclusions du plan d'expériences	179
2. Optimisation des conditions opératoires.....	180
2.2. Optimisation par itérations	180
2.3. Cycles de pression	182
2.3.2. <i>Impact des paramètres du cycle (nombre, durée et ΔP) à 38°C et 100 bar</i>	184
2.3.3. <i>Impact des cycles de pression à 50°C</i>	185

2.4.	Conclusion sur la recherche de l'amélioration des conditions	186
3.	Effet de la température et de la pression sans CO₂	186
3.1.	Essais sous N ₂ et en Air	187
4.	Impact du traitement sur la structure des microorganismes.....	190
4.1.	Impact sur la membrane cellulaire.....	190
4.2.	Impact sur l'ultrastructure.....	192
4.2.1.	<i>Echantillons traités sous CO₂</i>	192
4.2.2.	<i>Echantillon traité sous N₂</i>	195
5.	Mise en évidence de l'effet conjoint T / pH	196
6.	Conclusion	198
Chapitre 3 : Analyse de la pasteurisation sous l'angle des temps caractéristiques et des transferts de matière.....		201
1.	Relation entre les mécanismes d'inactivation et la diffusion du CO₂ dans le milieu	205
2.	Grandeurs caractéristiques liées au transfert de masse du CO₂	208
2.1.	Flux à l'interface	208
2.2.	Nombres et grandeurs caractéristiques d'un réacteur agité.....	210
2.3.	Paramètres physico-chimiques invariants.....	212
2.4.	Influence du choix de la corrélation sur la cinétique de dissolution estimée	214
2.5.	Etude de sensibilité	217
2.5.1.	<i>Effet des caractéristiques du liquide</i>	217
2.5.1.8.	Masse volumique.....	217
2.5.1.9.	Viscosité.....	218
2.5.1.10.	Tension interfaciale	219
2.5.2.	<i>Volume de liquide traité</i>	220
2.5.3.	<i>Concentration à saturation</i>	221
2.5.1.	<i>Débit de CO₂</i>	222
2.5.2.	<i>Cas extrêmes</i>	223
3.	Les dispositifs batch	224
3.1.	Caractéristiques des deux dispositifs batch	224
3.2.	Dispositif de pasteurisation (petit batch de 50 mL)	224

3.3.	Dispositif GAS (grand batch).....	228
3.3.1.	Caractérisation du grand batch.....	228
3.3.2.	Choix du modèle et impact sur les temps caractéristiques.....	230
3.3.3.	Effet du dispositif sur la pasteurisation.....	232
4.	Miniréacteur continu	234
4.1.	Caractérisation du dispositif continu.....	234
4.2.	Simulation numérique.....	235
4.3.	Influence de la surface d'échange, comparaison avec les dispositifs batch.....	236
4.4.	Intérêt du ratio CO ₂ /échantillon.....	238
5.	Conclusion	239
Chapitre 4 : Modification du milieu et impact sur l'inactivation des		
microorganismes		
1.	Influence de la contamination initiale	247
2.	Influence de la composition de la matrice utilisée.....	251
2.1.	Impact de la matrice.....	251
2.2.	Impact de la concentration en vitamine C.....	253
3.	Germination des spores de <i>Bacillus subtilis</i>.....	256
3.1.	Activation de la germination des spores	256
3.2.	Essais de stérilisations	257
4.	Conclusion	258
Chapitre 5 : Effet des conditions expérimentales sur les principes actifs		
1.	Impact sur les polyphénols.....	265
2.	Impact sur la vitamine C	268
3.	Analyse de <i>Jambes Légères</i> par la HPLC.....	270
3.1.	Tendances générales	270
3.1.1.	Complètement <i>Jambes Légères</i>	270
3.1.2.	<i>Jus de grenade</i>	273
3.2.	Quantification des polyphénols.....	274
3.3.	Quantification sur la vitamine C	274
3.4.	Conclusion	275

4. Conclusion	275
Chapitre 6 : Intérêt du traitement au CO₂ et stabilité au stockage	277
1. Résistance au traitement	281
2. Stabilité au stockage	282
2.1. Evolution de la teneur en vitamine C au stockage	282
2.2. Evolution de la flore microbienne au stockage	283
3. Apport du traitement au CO₂ pressurisé par rapport au traitement thermique	285
4. Conclusion	288

Chapitre 1 : Etude préliminaire de l'acidification d'un milieu aqueux en présence de CO₂ et de la résistance au pH des microorganismes

La diminution du pH extracellulaire suite à la dissolution du CO₂ dans la phase aqueuse est une des hypothèses généralement admise pour expliquer l'action bactéricide du CO₂. Nous avons entrepris une étude préliminaire visant à :

- l'acidification d'un milieu aqueux sous diverses conditions de température et de pression fréquemment appliquées pour la pasteurisation sous CO₂;
- évaluer la durée de survie des microorganismes en fonction du pH de façon à déterminer l'intervalle de temps acceptable entre la dépressurisation et le dénombrement ;
- identifier le milieu d'étude le plus adapté pour étudier l'influence et l'optimisation des paramètres opératoires.

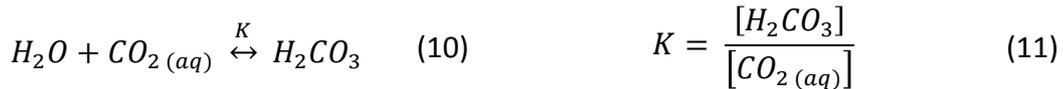
Sommaire du chapitre 1

1. Equilibres de dissolution	145
2. Acidification des milieux aqueux.....	146
2.1. Protocole et conditions étudiées.....	146
2.2. Analyse des résultats.....	147
3. Comportement du complément alimentaire	151
4. Durée de retour au pH initial après traitement.....	152
5. Effet du pH sur les microorganismes	154
6. Conclusion	156

1. Equilibres de dissolution

Comme nous l'avons précisé dans l'introduction bibliographique, plusieurs hypothèses expliquant l'action bactéricide du CO₂ ont été avancées. Actuellement les interactions CO₂-microorganismes ne sont pas totalement élucidées (Ferrentino et al., 2016) mais l'inactivation semble passer par : la diminution du pH du milieu suite à la dissolution du CO₂, l'augmentation de la fluidité membranaire des cellules et de leur perméabilité, la diffusion du CO₂ dans le compartiment intracellulaire entraînant déséquilibres physico-chimiques et perturbations enzymatiques.

La dissolution du CO₂ dans le milieu aqueux entraîne une diminution du pH extracellulaire suite aux équilibres suivants, décrits par les constantes d'équilibre et de dissociation associées :



Le CO₂ aqueux est en équilibre avec l'acide carbonique H₂CO₃. Il est donc possible de regrouper les équilibres (10) et (12). En compilant les équations (11) et (13), on obtient alors pour constante d'équilibre associée :

$$K_{a1} = \frac{[H^+][HCO_3^-]}{[CO_{2(aq)}} \quad (16)$$

L'équilibre des charges nous donne une relation du type :

$$[H^+] = [HCO_3^-] + 2 [CO_3^{2-}] + [OH^-] \quad (17)$$

Le terme [CO₃²⁻] peut être négligé pour des pH < 9 en raison du pKa du couple HCO₃⁻/CO₃²⁻ de 10,3 (Figure 24). L'expression des constantes de dissociation et de l'électroneutralité (Hofland et al., 2003; Spilimbergo et al., 2005) conduit à la relation suivante :

$$pH = -\frac{1}{2} \log (K_{a1} \cdot [CO_{2,aq}] + K_w) \quad (18)$$

K_w correspond à la constante d'autoprotolyse de l'eau. Cette relation montre que le pH est directement lié à la concentration de CO_2 dissous, qui varie en fonction des conditions de température et de pression.

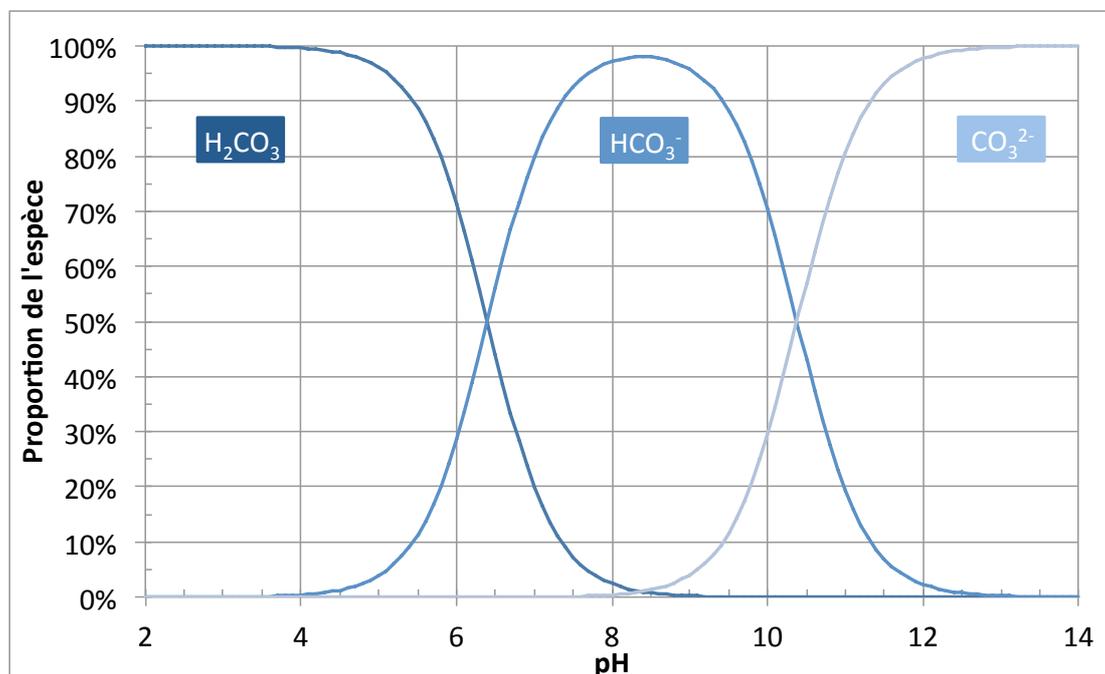


Figure 24 : Représentation des espèces majoritaires de l'acide carbonique selon le pH du milieu

La diminution du pH extracellulaire suite à la dissolution du CO_2 dans la phase aqueuse étant une des hypothèses de l'inactivation de la population microbienne, nous avons entrepris une étude préliminaire pour établir son influence sur l'inactivation. En l'absence de sonde de pH adaptée aux hautes pressions, nous faisons l'hypothèse que le pH mesuré dès l'ouverture du réacteur est représentatif du pH de la solution pendant le traitement au CO_2 .

2. Acidification des milieux aqueux

2.1. Protocole et conditions étudiées

L'étude de l'acidification d'eau pure (sans microorganisme) a été menée avec le réacteur de 50 mL en construisant un plan d'expériences de type factoriel complet 2^2 . Ce plan a été mis en place à l'aide du logiciel Modde pour étudier l'influence des différents facteurs (température et pression dans un premier temps) sur le pH après traitement (sous la forme d'un ΔpH) sur de l'eau osmosée de pH initial $5,6 \pm 0,2$.

L'analyse effectuée sur ce plan s'est montrée peu concluante. La température et la pression ne semblaient pas avoir d'influence. Afin d'affiner les résultats, ce plan a été complété par d'autres expériences autour du point critique et autour du point au centre. En outre, certaines expériences ont été reproduites sur de l'eau du robinet pour évaluer l'effet du type d'eau via un pH initial différent ($8,1 \pm 0,04$). L'analyse des résultats a donc été menée sur la totalité des expériences, soit 12 expériences sur l'eau osmosée dont 4 points au centre, complétées par 3 expérimentations autour du point critique du CO₂ (31°C et 74 bar) et 10 expériences sur l'eau du robinet. Le détail des facteurs et de leurs niveaux est reporté dans le Tableau 22.

Tableau 22 : Niveau des facteurs

Facteurs	Niveau +1	Niveau 0	Niveau -1
Température (°C)	50	38	25
Pression (bar)	150	100	50

Les niveaux en température ont été fixés à 25 et 50°C eu égard aux principes actifs sensibles à préserver dans la suite des travaux. En ce qui concerne la pression, la gamme de 50 à 150 bar est celle que l'on rencontre le plus fréquemment dans la littérature pour le traitement des microorganismes (Perrut, 2012).

L'équivalent de 400 mL d'eau (osmosée ou du robinet) sont laissés à s'écouler avant de réaliser un prélèvement de 60 mL. Le pH de cette eau est mesuré avec un pH-mètre (Mettler-Toledo MP 230), dont la calibration est vérifiée avant chaque expérience. Le pH est mesuré à $\pm 0,01$ unités près. Sur les 60 mL prélevés, 18 mL sont introduits dans le réacteur muni d'un barreau aimanté. Le réacteur est raccordé au dispositif et le CO₂ est introduit jusqu'à ce que la pression atteigne le niveau voulu. Le réacteur est laissé à cette pression et sous agitation pendant 30 min. Après ces 30 minutes, la dépressurisation est amorcée et dure entre 1 et 2 minutes. Le pH de la solution est mesuré immédiatement après l'ouverture du réacteur.

2.2. Analyse des résultats

Les données collectées lors du plan d'expériences sont reportées dans le Tableau 23 avec $\Delta\text{pH} = \text{pH}_i - \text{pH}$.

Tableau 23 : Résultat du plan d'expérience pour (a) l'eau osmosée et (b) l'eau du robinet en variables réelles. Les expériences en vert sont celles issues du plan d'expériences 2² initial

a					b				
Exp n°	Facteurs			Réponses	Exp n°	Facteurs			Réponses
	P bar	T °C	pH _{init}	ΔpH		P bar	T °C	pH _{init}	ΔpH
E1	50	25	5,6	1,2	ER1	50	25	8,1	3,2
E2	50	38	5,5	1,8	ER2	51	38	8,2	2,9
E3	50	50	5,8	1,4	ER3	50	50	8,2	2,7
E4	100	25	5,5	1,9	ER4	100	25	8,1	3,2
E5	100	50	5,7	2,0	ER5	100	49	8,1	2,8
E6	150	25	5,7	1,5	ER6	150	25	8,2	3,1
E7	150	38	5,3	1,8	ER7	150	37	8,2	3,1
E8	150	51	5,8	1,7	ER8	150	50	8,2	2,8
Point au centre					Point au centre				
E9	100	38	5,7	1,7	ER9	100	38	8,1	3,3
E10	100	38	5,7	1,7	Point critique				
E11	100	38	5,6	1,5	ER10	72	31	8,2	2,9
E12	100	38	5,7	1,6	Point critique				
Point critique					Point critique				
E13	72	31	5,3	1,8	Point critique				
E14	72	31	5,6	1,9	Point critique				
E15	72	32	5,5	1,4	Point critique				

Le pH de l'eau osmosée s'abaisse de 1,2 à 2 unités après traitement, ce qui correspond à un pH final d'environ 3,9. Pour l'eau du robinet, le pH diminue de 2,7 à 3,3 unités, donnant un pH final aux alentours de 5,2. Dans le domaine des conditions opératoires explorées, à savoir 50-150 bar pour la pression et 25-50°C pour la température, les variations du pH final sont de faible amplitude. La réponse varie sur un intervalle de 0,8 unité pH pour l'eau osmosée et de 0,6 pour l'eau du robinet. Devant la faiblesse de ces variations on pourrait penser que la température et la pression n'ont pas d'influence sur le pH en sortie de réacteur. Le faible écart-type associé à la moyenne des résultats des points au centre ($\Delta\text{pH} = 1,63 \pm 0,08$ pour l'eau osmosée) est gage de bonne reproductibilité et assure la fiabilité du plan d'expériences.

L'eau du robinet atteint un pH moins bas que l'eau osmosée. L'eau osmosée contiendrait donc après traitement une quantité plus importante de CO₂ dissous.

Cette constatation peut s'expliquer par la solubilité du CO₂ en fonction de la composition des eaux. La solubilité du CO₂ augmente avec la pression et pour des pressions inférieures à 300 bar, elle décroît avec une hausse de température (Diamond and Akinfiyev, 2003; Dodds et al., 1956). De base, l'eau osmosée contient déjà une certaine quantité de CO₂ dissous, ce qui explique son pH initial plus bas que celui de l'eau du robinet. De plus, l'eau osmosée est exempte de minéraux comme le magnésium ou le calcium, contrairement à l'eau du robinet. Or, les sels et les minéraux modifient la solubilité du CO₂ (Calix et al., 2008; Carvalho et al., 2015; Tang et al., 2015). Moins de CO₂ pourra donc se dissoudre dans l'eau du robinet et son pH en sera d'autant moins abaissé.

Les données du Tableau 23 ont été exploitées à l'aide du logiciel R et soumises à une régression linéaire. La significativité de chacun des facteurs a été déterminée grâce à la méthode d'analyse de la variance (ANOVA) avec un seuil de confiance à 95%. Un facteur sera donc significatif si sa probabilité (p-value) est inférieure à 0,05. Les facteurs pris en compte lors de cette analyse sont : la pression (P), la température (T) et le pH initial (pH_i) ainsi que les interactions du second ordre (P-T, P-pH_i, T-pH_i). Les résultats sont reportés dans le Tableau 24.

Tableau 24 : Résultats de la régression linéaire et de l'ANOVA en variables réelles sur le couplage des deux plans d'expériences (R² = 0,91)

Facteurs	Coefficients	p-value
Constante	-2,69	0,402
P	2,04.10 ⁻³	0,957
T	3,34.10 ⁻²	0,696
pH _i	0,79	0,096
P.T	1,9.10 ⁻⁵	0,981
P. pH _i	-5,3.10 ⁻⁴	0,903
T. pH _i	-6,99.10 ⁻³	0,568
P. T. pH _i	7,79.10 ⁻⁶	0,946

Si on refait la régression seulement avec les termes significatifs, c'est à dire le pH_i, l'équation décrivant l'évolution du ΔpH se limite à (R² = 0,88):

$$\Delta pH = -1,21 + 0,51 pH_i \quad (19)$$

L'analyse de ces expériences montre que la variation de pH dépend uniquement du pH initial de la solution, donc de la nature de l'eau utilisée.

Si l'on se réfère aux tendances calculées par Spilimbergo et al. (2005) de l'évolution de la composition en CO₂ de la solution saline (Figure 25.a) il apparaît que pour notre domaine exploré, la composition en CO₂ varie entre 3,1 et 6,3% en masse. Dans ce domaine expérimental, le pH varie d'après Spilimbergo et al. (2005) entre 3,11 et 3,23 (soit un ΔpH de 0,1) en fonction de la pression et de la température. Dans nos essais, une variation de 0,9 unités pour l'eau osmosée a été mesurée en fonction des conditions opératoires. Le pH final d'environ 4 est plus élevé que celui prédit par Spilimbergo et al. (2005). Ces écarts peuvent d'une part s'expliquer du fait que nous avons fait la mesure du pH après la dépressurisation du réacteur et non pas in-situ et d'autre part, bien que nous utilisions de l'eau osmosée, elle n'est pas forcément totalement pure, ce qui joue sur la solubilité du CO₂.

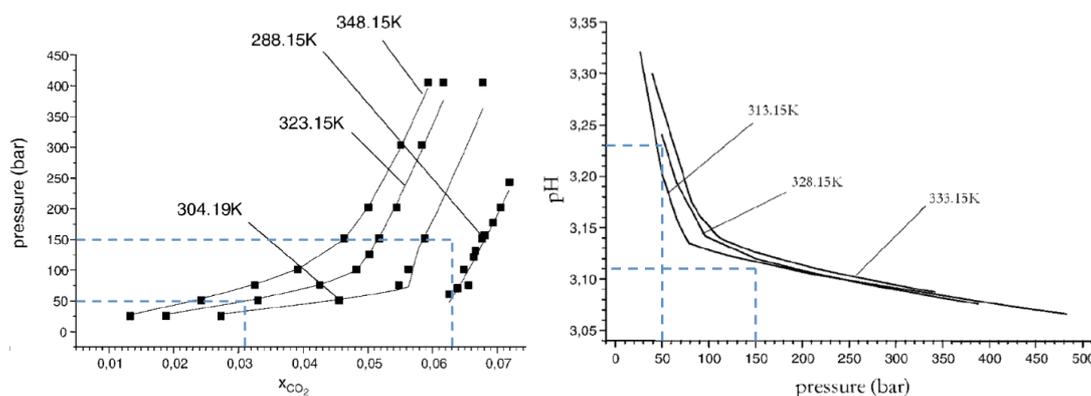


Figure 25 : Représentation de (a) la fraction massique du CO₂ dissous en fonction de la pression et (b) de l'évolution du pH en fonction de la pression (extrait de (Spilimbergo et al., 2005))

Il est important de noter que les deux figures issues de Spilimbergo et al. (2005) relèvent de calculs thermodynamiques. Plusieurs modèles mathématiques ont été mis au point pour calculer le pH au cours d'un traitement sous pression de CO₂ (Garcia-Gonzalez et al., 2010b). Assez peu d'études sur la mesure du pH in-situ sont disponibles (Haas et al., 1989; Hofland et al., 2000). Dans la majorité des articles de la littérature, le pH a été mesuré après la dépressurisation et le retour à pression atmosphérique. Cependant, cette méthode ne donne pas forcément une idée représentative de la valeur du pH au cours du traitement. En effet, le CO₂ retourne rapidement à son état de vapeur, permettant ainsi au pH de retrouver sa valeur initiale. Les travaux de Garcia-Gonzales et al. (2009b) portant sur de l'œuf entier liquide traité par CO₂ pressurisé ont montré que le pH retournait à sa valeur initiale

de 7,4 après une semaine de stockage. On peut donc supposer que la mesure du pH juste après dépressurisation est fiable.

Plusieurs auteurs ont mesuré l'écart entre le pH initial et le pH final de différents milieux après un traitement au CO₂ pressurisé (Hofland et al., 2003; Liu et al., 2013; Peng et al., 2013). L'évolution du pH d'une eau distillée inoculée en *E. coli* lors d'un traitement à 21°C et 70 bar a été suivie par Vo et al. (2013). Le pH chute de manière significative de 8,4 à 4,9 au cours de la première minute d'exposition au CO₂ avant de se stabiliser. On s'aperçoit que la solubilité du CO₂ et donc l'abaissement du pH, dépendent étroitement de la nature du milieu.

3. Comportement du complément alimentaire

Le complément alimentaire *Jambes Légères* possède un pH de $3,91 \pm 0,19$. Le détail de sa composition complexe nous est inconnu. Etant donné que ce milieu est particulièrement acide, nous nous sommes questionnés sur son comportement vis à vis du CO₂. A quel point le CO₂ est-il soluble dans ce milieu ? Le pH va-t-il varier ? De quel ordre de grandeur ?

La question est donc de savoir si les tendances déduites du plan d'expériences sur les deux eaux sont extrapolables au complément alimentaire *Jambes Légères*. Afin de déterminer son comportement en présence de CO₂, le complément pur a été soumis à deux traitements au CO₂ pressurisé de 30 et 120 min à 50°C et 150 bar. Le pH mesuré avant et après traitement est constant (variations entre 3,70 et 3,78). Cette absence d'acidification n'est pas due à une absence de dissolution du CO₂. En effet, à l'ouverture du réacteur, la solution récoltée est effervescente. Ces constatations laissent entendre que *Jambes Légères* serait naturellement tamponné². Le CO₂ étant un acide faible, avec une solubilité relativement limitée en milieu aqueux, sa simple dissolution dans le milieu est insuffisante pour faire varier le pH de *Jambes Légères*. Nous avons réalisé un dosage acido-basique (Figure 26) du milieu *Jambes légères* ainsi que du milieu additionné

² Par définition, une solution tampon est un milieu dont le pH varie peu lorsque l'on lui ajoute de faibles quantités d'acides ou de bases.

des principes actifs et des microorganismes. Nous avons utilisé une solution de NaOH à 1 mol/L et une solution de HCl à 1 mol/L. L'allure des deux courbes (disponibles en Annexe 1) est similaire. Le pKa du mélange contaminé de *Jambes Légères* a été évalué à environ 6,2.

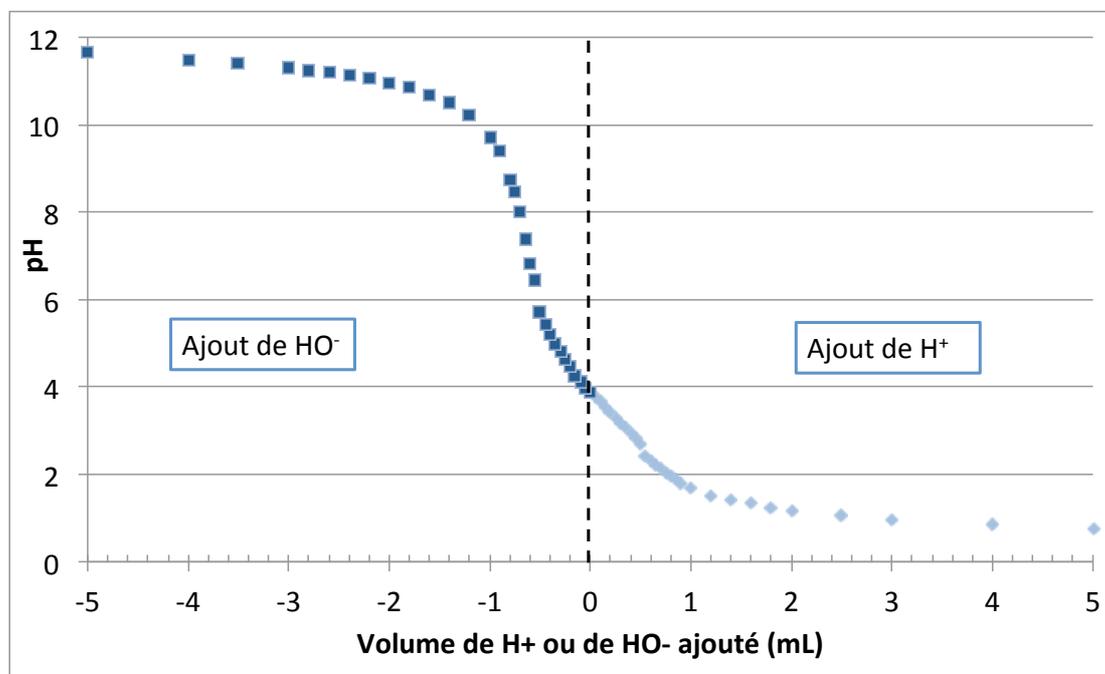


Figure 26 : Dosage acide-base du milieu *Jambes Légères* contaminé (pKa = 6,8)

D'autres auteurs (Arreola et al., 1991; Kincal et al., 2006) ont également rapporté l'absence de réduction significative du pH suite à un traitement CO₂ sur du jus d'orange (pH 3,71). Bien que le pH ne varie pas, plusieurs études (Damar et al., 2009; Kincal et al., 2006; Lim et al., 2006) montrent que les milieux traités par CO₂ pressurisé présentent une acidité titrable plus importante. Elle est attribuée à la présence résiduelle de CO₂ dissous dans le milieu.

4. Durée de retour au pH initial après traitement

Le pH est un paramètre important en microbiologie. Il peut posséder un effet bactériostatique, c'est à dire bloquer la croissance des microorganismes, voire un effet bactéricide, c'est à dire les tuer. Au cours des traitements, les milieux se saturent en CO₂. Lorsque le réacteur est ramené à pression atmosphérique, le CO₂ s'expande et provoque l'effervescence du milieu. Ce dégazage s'accompagne d'une hausse de pH très lente et progressive jusqu'au pH initial. En effet, le pH gagne 0,12

unité pour l'eau osmosée (Figure 27.a) et de 0,30 unité pour l'eau du robinet dans les 4 premières heures suivant l'ouverture du réacteur. La remontée continue de façon quasi linéaire jusqu'à 72 h, date de fin du suivi, avec un pH mesuré à 7 jours qui revient à sa valeur de départ (Figure 27.b). Dans le cas de l'eau osmosée, on s'aperçoit qu'elle atteint un pH final supérieur à son pH initial. C'est du au fait qu'au bout des 7 jours, nous avons forcé le dégazage par sonication des solutions. Or l'eau osmosée contient initialement une certaine quantité de CO₂ dissous, qui a été relargué par la sonication. Cette durée de retour à pH initial est cohérente avec les observations de Garcia-Gonzalez et al. (2009b)

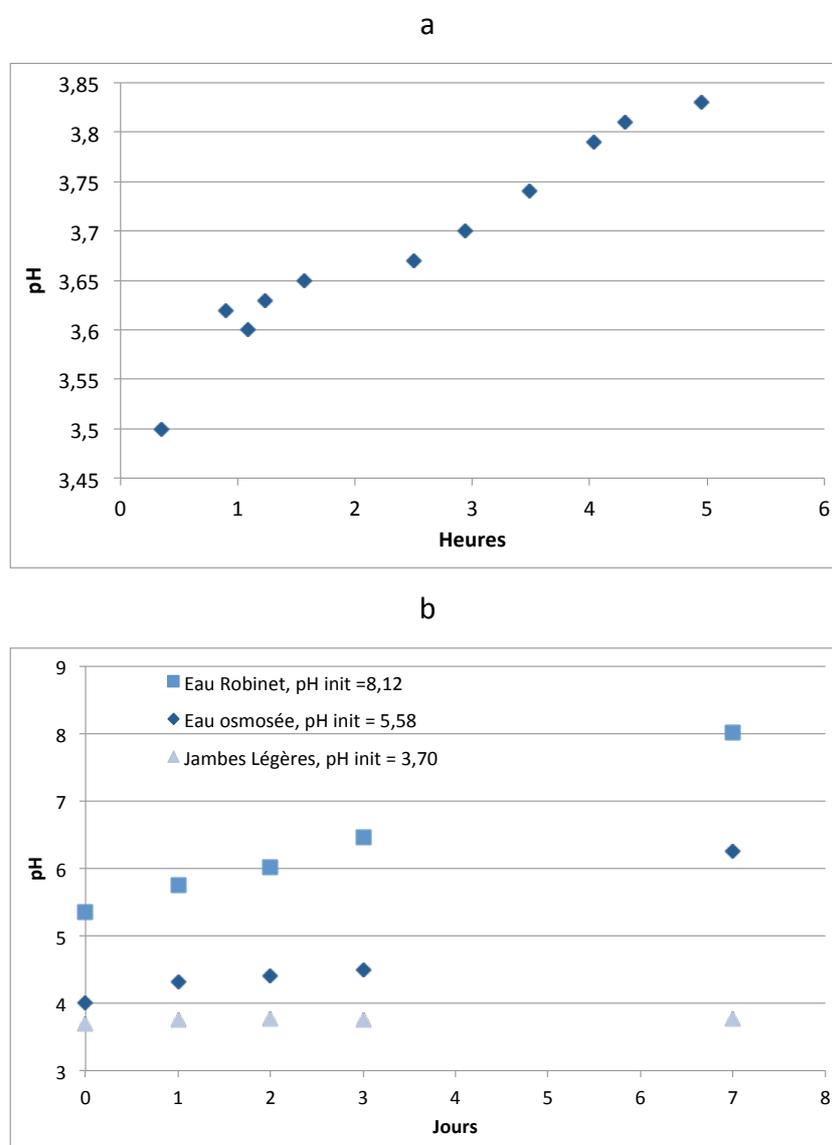


Figure 27 : Evolution du pH (a) sur de l'eau osmosée au cours des premières heures et (b) sur plusieurs milieux au cours d'une semaine

La constance du pH de *Jambes Légères* en sortie de traitement sur une semaine confirme bien que nous avons affaire à un milieu tamponné. Afin de caractériser l'influence du CO₂ et non pas l'influence du CO₂ couplée au vieillissement de la solution, les étalements et comptages seront réalisés dans les heures suivant la dépressurisation.

5. Effet du pH sur les microorganismes

Chaque microorganisme possède des conditions de culture spécifiques. En fonction de la température, de la présence de certains nutriments ou d'oxygène, la croissance sera plus ou moins rapide et pourra même être inhibée. Les microorganismes sont par ailleurs capables de préserver et maintenir un pH intracellulaire qui leur est favorable sur des gammes de pH définies. Les microorganismes d'altération et/ou pathogènes présentent le plus souvent un pH optimal de développement compris entre 6,5 à 7,5. Cependant certaines espèces peuvent croître à des pH de 4,3, comme c'est le cas pour *E. coli* et *L. monocytogenes*. Les levures sont beaucoup plus tolérantes et peuvent se développer jusqu'à des pH très bas de 1,5 (Leveau et al., 2001).

Afin d'évaluer l'impact du pH sur nos 3 souches, l'ensemencement de trois milieux de pH différents : tampon phosphate-citrate de pH 4, tampon phosphate-citrate de pH 6 et milieu *Jambes Légères* de pH 3,7 à des concentrations initiales de 10⁹ CFU/mL pour *E. coli* et *L. innocua* et de 10⁶ UFC/mL pour *S. cerevisiae* a été étudié. Le milieu est additionné de vitamine C et d'acide gallique comme décrit dans la partie II. Des étalements sont réalisés à intervalles réguliers pour suivre l'évolution de la flore microbienne dans le milieu. Les milieux sont stockés à 22°C pendant toute la durée de l'étude. Les suivis des 3 microorganismes sont représentés sur la Figure 28.

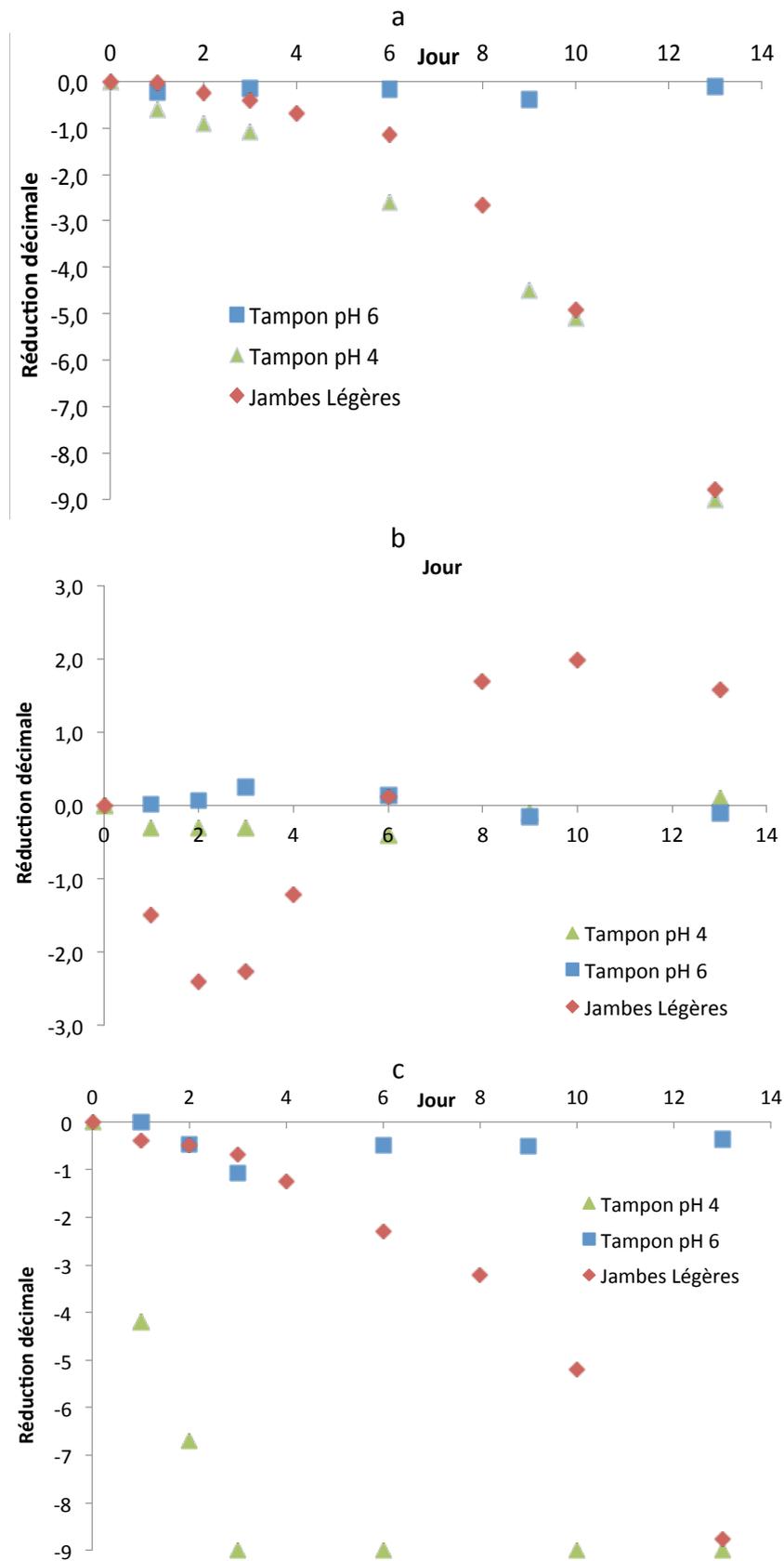


Figure 28 : Effet du pH sur la population de (a) *E. coli*, (b) *S. cerevisiae* et (c) *L. innocua* dans du tampon phosphate-citrate de pH 4 et 6 et dans le milieu *Jambes Légères*

Dans le tampon à pH 6, la population de *E. coli* stagne. En revanche dans un milieu tampon de pH 4, la population décroît progressivement, dès les premiers jours. Dans le *Jambes Légères*, la population en *E. coli* décroît également mais à partir du 3^{ème} jour. *Jambes Légères* exercerait donc un léger effet protecteur sur cette bactérie en dépit de son pH défavorable. L'espèce *L. innocua* suit une tendance similaire à celle de *E. coli* et semble bien tolérer un pH de 6. En revanche le pH 4 lui est bactéricide en l'espace d'à peine 3 jours dans le cas du milieu tampon. On peut constater que le milieu *Jambes Légères* exerce un effet protecteur sur cette espèce et ralentit sa mortalité.

Pour *S. cerevisiae*, la population est stable dans les deux milieux tampon. Ces milieux étant dépourvus d'éléments nutritifs, la population n'a pas pu se développer. Dans le gamme de pH étudiée, la survie des levures n'est donc pas affectée. Dans le milieu *Jambes Légères*, la population de levures commence par décroître. On parle d'un pseudo temps de latence (temps nécessaire pour les cellules de s'habituer à un nouveau milieu complexe). Une partie des cellules initialement dispersées dans le milieu est dans un état physiologique qui ne leur permet pas de survivre dans ce nouveau milieu. Cela justifie la chute de la population. Puis dans la mesure où *Jambes Légères* constitue un vivier nutritif, les cellules qui ont pu s'adapter au milieu se remettent à croître au bout de quelques jours. Après une dizaine de jours, la tendance est de nouveau à la baisse signe de la présence d'un facteur limitant qui entraîne l'arrêt de la croissance, probablement l'appauvrissement du milieu en éléments nutritifs.

De manière générale un pH de 6 n'entraîne aucune inactivation des microorganismes. A pH 4, une survie de plusieurs jours est observée pour les bactéries. L'étude dans le milieu *Jambes Légères* est possible puisque nos microorganismes passent moins de 6 heures dans ce milieu avant d'être analysés.

6. Conclusion

Le plan d'expérience a montré l'absence d'influence de la température et de la pression pour les gammes étudiées (25 à 50°C et 50 à 150 bar) sur le pH après traitement au CO₂ pressurisé. L'acidification par le CO₂ est gouvernée par la solubilité du CO₂ dans le milieu, qui dépend de sa composition. Ainsi l'eau osmosée, dépourvue de minéraux, favorise la dissolution d'une plus grande quantité de CO₂ que l'eau du robinet bien plus riche en minéraux.

Au cours de cette étude, nous avons pu montrer que le retour au pH initial suite à un traitement CO₂ est relativement lent. Mais du fait de la sensibilité de *E. coli* et de *L. innocua* face au pH acide, il est préférable de réaliser les analyses bactériologiques moins de 4 h après la dépressurisation.

Le complément alimentaire *Jambes Légères*, sélectionné par Cérébio, possède un pouvoir tampon. Il ne subit pas d'acidification supplémentaire lors du traitement sous CO₂ bien qu'une certaine quantité se dissolvent dans le milieu. En dépit de son pH acide (3,7), il agit de manière légèrement protectrice vis à vis des bactéries.

Dès lors, l'étude de l'optimisation de la pasteurisation avec le CO₂ pressurisé sera effectuée directement avec *Jambes Légères* plutôt que dans un milieu tamponné pour tenir compte de la composition complexe de ce milieu, qui non seulement apporte les éléments nutritifs nécessaires à la croissance, notamment dans le cas des levures, mais aussi assure une protection de *E. coli* et *L. innocua* pendant quelques jours à température ambiante et à pH acide.

Chapitre 2 : Pasteurisation du complément alimentaire : facteurs influents, optimisation des conditions opératoires et analyse des modifications structurales des microorganismes

Les nombreuses études rapportent l'effet de la température, de la pression et de la durée d'exposition sur l'inactivation des microorganismes, et dans une moindre mesure l'effet de la dépressurisation. Mais ces effets sont en général étudiés séparément. Nous avons entrepris une étude sous la forme d'un plan d'expériences pour identifier et optimiser les facteurs influençant la réduction décimale. Puis nous avons cherché à :

- améliorer ces conditions pasteurisatrices ;
- distinguer le rôle spécifique du CO₂ et d'autres effets éventuels ;
- visualiser l'impact du traitement sur la structure des microorganismes.

Sommaire du chapitre 2

1. Recherche des facteurs influents.....	163
1.1. Stratégie expérimentale	163
1.2. Structuration du plan d'expériences	164
1.3. Choix des niveaux de facteurs	165
1.4. Méthode d'analyse des plans d'expériences.....	166
1.5. Analyse du plan d'expériences	167
1.5.1. <i>Tendances générales, reproductibilité et fiabilité</i>	167
1.5.1. <i>Identification des facteurs influents</i>	169
1.5.2. <i>Effet des interactions</i>	175
1.6. Optimisation mathématique	176
1.7. Conclusions du plan d'expériences	179
2. Optimisation des conditions opératoires.....	180
2.2. Optimisation par itérations	180
2.3. Cycles de pression	182
2.3.2. <i>Impact des paramètres du cycle (nombre, durée et ΔP) à 38°C et 100 bar</i>	184
2.3.3. <i>Impact des cycles de pression à 50°C</i>	185
2.4. Conclusion sur la recherche de l'amélioration des conditions.....	186
3. Effet de la température et de la pression sans CO₂	186
3.1. Essais sous N ₂ et en Air.....	187
4. Impact du traitement sur la structure des microorganismes.....	190
4.1. Impact sur la membrane cellulaire.....	190
4.2. Impact sur l'ultrastructure	192
4.2.1. <i>Echantillons traités sous CO₂</i>	192
4.2.2. <i>Echantillon traité sous N₂</i>	195
5. Mise en évidence de l'effet conjoint T / pH	196
6. Conclusion	198

1. Recherche des facteurs influents

L'objectif de cette partie est d'évaluer les facteurs qui influencent la pasteurisation. Dans un premier temps, l'idée est de hiérarchiser leur importance pour ensuite déterminer les conditions idéales de pasteurisation par CO₂ pressurisé. Dans l'absolu, les conditions retenues doivent permettre une pasteurisation totale (inactivation de l'intégralité des microorganismes présents) dans les conditions les plus douces possibles, d'une part pour limiter le coût du procédé et d'autre part pour préserver la matière première. L'influence de 4 paramètres (température, pression de CO₂, durée du traitement et vitesse de dépressurisation) a été étudié sur 6 réponses : la réduction logarithmique totale et celle de chacun des 3 microorganismes (*E. coli*, *S. cerevisiae* et *L. innocua*), la concentration en polyphénols totaux et la teneur en vitamine C. Les résultats sur les principes actifs ne seront pas évoqués dans cette partie mais feront l'objet d'une étude plus détaillée ultérieurement.

1.1. Stratégie expérimentale

La démarche expérimentale classique serait d'étudier chacun de ces facteurs indépendamment les uns des autres. Toutefois outre le fait qu'il faut réaliser un grand nombre d'expériences, cette méthode a l'inconvénient majeur de ne pas détecter les interactions entre les différents facteurs.

L'utilisation d'un plan d'expériences permet de parer à ces désavantages. En effet, cette méthode apporte une hiérarchisation de l'influence des facteurs et permet de mettre en évidence les interactions éventuelles entre les facteurs, y compris, du deuxième et troisième ordre avec un nombre limité d'expériences.

1.2. Structuration du plan d'expériences

Le type de plan d'expériences retenu pour étudier l'influence des différents facteurs et de leurs interactions sur les réponses est un plan composite centré. Ce type de plan permet de tracer des surfaces de réponses et d'ajuster une équation empirique entre les facteurs et les réponses. Un plan composite centré à 3 facteurs peut être représenté sous la forme d'un cube (Figure 29).

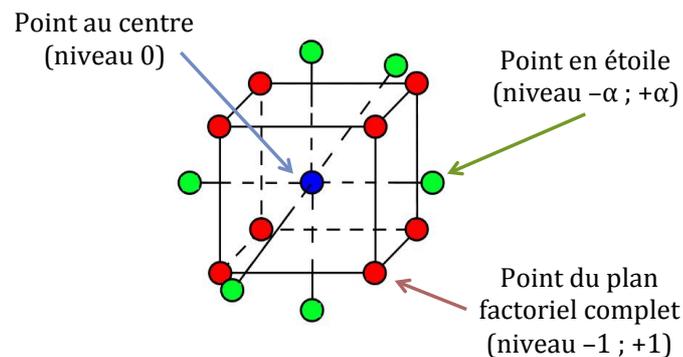


Figure 29 : Schéma d'un plan composite centré à 3 facteurs

Un plan composite centré peut être décomposé en trois parties :

- Un plan factoriel complet correspondant à l'étude des points du cube. Il s'agit d'effectuer toutes les permutations possibles entre les niveaux +1 et -1 de tous les facteurs. Cela représente ici $2^4 = 16$ expériences.
- Des répétitions du point central (niveau 0) permettant d'évaluer la reproductibilité des expériences.
- Des points étoiles qui permettent d'ajuster le modèle en prenant en compte la tendance des paramètres en dehors du domaine d'étude. Pour chaque paramètres deux essais sont réalisés (soit 8 expériences).

Chaque paramètre est ainsi associé à cinq niveaux $(-\alpha, -1, 0, +1, +\alpha)$. Le nombre total d'expériences à réaliser est donné par la formule suivante (Schimmerling et al., 1998):

$$N = 2^k + n_0 + 2k \quad (20)$$

où k est le nombre de paramètres étudiés (4) et n_0 le nombre de répétitions du point central.

Le plan a été construit à l'aide du logiciel Modde (Sigma PLUS, Dynacentrix) et exploité grâce au logiciel R. Il comporte 32 expériences et s'articule autour d'un plan factoriel complet à 16 expériences (dont 4 ont été reproduites une fois) complété par 7 points au centre et 8 points axiaux. Le plan 2^4 n'était pas interprétable ($R^2 \leq 0,57$). Nous l'avons donc

transformé en plan composite centré. Les contraintes expérimentales ont imposé un α de 1,4.

1.3. Choix des niveaux de facteurs

Les cinq niveaux de facteurs sont donnés dans le Tableau 25. L'utilisation des variables centrées réduites présente l'intérêt de pouvoir généraliser la théorie des plans d'expériences quels que soient les facteurs ou les domaines d'études retenus. Remplacer les variables naturelles par les variables codées va permettre d'avoir pour chaque facteur le même domaine de variation (entre -1 et +1) et de pouvoir ainsi comparer entre eux l'effet des facteurs

Tableau 25 : Récapitulatif des niveaux du plan composite centré avec $\alpha = 1,4$

Facteurs	Niveau				
	$-\alpha$	-1	0	1	α
Température (°C)	20	25	38	50	55
Pression (bar)	30	50	100	150	170
Durée (min)	10	30	75	120	140
Vitesse de Dépressurisation (bar/min)	5	10	30	50	55

Les variables centrées réduites sont calculées selon la formule suivante :

$$x = \frac{X - X_0}{\Delta X} \quad (21)$$

où x est la variable centrée réduite, X la variable naturelle, X_0 est le milieu de l'intervalle du domaine d'étude et ΔX la moitié de la largeur du domaine d'étude.

Température

La température varie de 20 à 55°C de manière à ne pas dépasser la température de dégradation de la vitamine C (aux alentours de 60°C) tout en restant dans la limite basse des températures de pasteurisation (à partir de 50°C). Le dispositif expérimental étant dépourvu d'un système de refroidissement, il est impossible de travailler en dessous de la température ambiante, soit 20°C.

Pression

La pression est comprise entre 30 et 170 bar. Cette gamme modérée couvre le domaine généralement étudié dans la littérature et reste compatible avec notre équipement.

Durée du traitement

La durée du traitement statique, sans tenir compte des étapes de pressurisation et de dépressurisation, est comprise entre 10 et 140 min, de façon à pouvoir réaliser l'expérience et son exploitation au cours d'une même journée.

Vitesse de dépressurisation

La vitesse de dépressurisation (de 5 à 55 bar/min) a été conditionnée par la capacité de la vanne de laminage. Dans la mesure où la régulation se fait manuellement. Cette valeur a été calculée pour chaque expérience à partir de la pression imposée et du temps nécessaire à la dépressurisation

Concentration en actifs

Pour cette série d'expérience les concentrations en vitamine C et en acide gallique ont respectivement été fixées à 19 mg/L et 0,1 g/L dans le mélange final.

1.4. Méthode d'analyse des plans d'expériences

Le plan d'expériences est exploité via une régression multilinéaire complétée par une analyse de variance sur les facteurs étudiés pour évaluer leur significativité.

La significativité d'un essai est déterminée grâce à un test d'hypothèse. L'hypothèse H_0 désignant un effet nul est caractérisée par une « p-value » qui est la probabilité d'accepter cette hypothèse. Le risque limite de rejeter l'hypothèse H_0 alors qu'elle est vraie est fixé à 5%. Si la p-value est inférieure à 5%, l'hypothèse H_0 est rejetée et l'effet est donc significatif. Par contre si cette probabilité est supérieure à 5%, l'hypothèse est acceptée et l'effet est non significatif. Dans le cas d'interactions non significatives, il est possible de les éliminer du modèle dans un but de simplification sans perte de précision. Cela permet en outre de rendre significatif des facteurs dont les effets étaient dispersés dans les interactions. Toutefois, dans la construction du modèle, il est important de conserver les facteurs et interactions non significatifs lorsqu'ils apparaissent dans des interactions significatives. Par exemple, si l'interaction AB est significative, il convient de garder dans le modèle les facteurs A et B. Le modèle issu du plan d'expériences s'écrit sous la forme d'un polynome mettant en jeu les facteurs et les interactions influentes pondérés par des coefficients, appelés effets moyens.

Différents outils permettent de mesurer la qualité du modèle obtenu : le coefficient de corrélation (R^2) indique l'ajustement du modèle. Plus ce coefficient est proche de 1 meilleur est le modèle. La comparaison entre les valeurs prédites et les valeurs expérimentales est également riche d'informations. Sur un graphique représentant les valeurs prédites en

fonction des valeurs expérimentales, plus les points sont proches de la première bissectrice, plus la modélisation est adéquate.

1.5. Analyse du plan d'expériences

Les résultats du traitement au CO₂ comprimé sur la charge microbienne totale et sur les 3 souches dans le milieu *Jambes Légères* sont donnés dans le Tableau 26. Les températures données sont les valeurs moyennes enregistrées dans la solution pendant la phase statique de traitement. L'identification des paramètres ainsi que des interactions influentes a été réalisée à partir d'une ANOVA sur les effets mis au jour par la régression multilinéaire à un seuil de confiance de 95% (soit $p < 0,05$).

1.5.1. Tendances générales, reproductibilité et fiabilité

On s'aperçoit que la réduction décimale totale, qui décrit la mortalité de la flore dans son ensemble, correspond la plupart du temps à la mortalité de *E. coli*. En effet, cette souche était majoritaire dans notre milieu, comme l'illustre la composition en microorganismes rapportée en pourcentages. Les pourcentages nuls ne signifient pas que la souche était absente, simplement que sa population était écrasée en terme de nombre par celle de *E. coli*. En moyenne nous avons 84% de *E. coli*, 2% de *S. cerevisiae* et 15% de *L. innocua*. La réduction décimale varie de manière importante quelle que soit la souche. Par exemple, pour *E. coli*, elle passe de +0,3 (croissance de la bactérie) à -8 (inactivation totale). De même, pour *S. cerevisiae*, les résultats s'échelonnent de 0,1 à -6 (inactivation totale). Cette variation suggère qu'au moins un des facteurs agit sur l'inactivation. Le degré d'inactivation semble beaucoup plus important pour *L. innocua* mais la faible reproductibilité, illustrée par la boîte à moustache très large de la Figure 30, rend l'interprétation des données plus délicate pour cette souche. De ce fait, les résultats du plan d'expériences concernant *L. innocua* seront peu, voire pas, exploités. Globalement, la réduction décimale de la population totale suit les évolutions que *E.coli*. C'est cohérent avec le fait que *E. coli* est l'organisme majoritairement présent dans notre échantillon.

Tableau 26 : Détails du plan composite centré en variables réelles. T : température, P: pression, D : durée et V_d : vitesse de dépressurisation, * : pasteurisation totale, ND : valeur non déterminée ; R : reproduction

	Facteurs				Réponses			Réduction décimale totale	Composition de la population initiale		
	T	P	D	V_d	log (N/N ₀)				<i>E. coli</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>L. innocua</i>
	°C	bar	min	bar/min	<i>E. coli</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>L. innocua</i>				
Points factoriels											
1	26	51	30	10	-0,8	-0,1	-5*	-0,8	100%	0%	0%
2	49	54	30	8	-4,8	-3,7	ND	-5,0	65%	1%	35%
2 R	49	50	30	9	-5	-2,7	-9*	-4,3	98%	2%	0%
3	30	149	30	10	-2,7	-2,5	-2,6	-2,7	97%	1%	2%
4	49	149	30	9	-5,4	-3,2	-7*	-4,9	83%	1%	16%
5	28	53	120	8	-2,3	-0,8	-2,2	-1,8	92%	8%	0%
6	49	50	120	9	-8*	-5*	-5*	-8,7	100%	0%	0%
7	28	147	120	10	-3,8	-1,6	-3,6	-3,6	95%	0%	5%
8	50	151	120	10	-8*	-6*	-7*	-8,9	95%	1%	4%
9	26	51	30	61	-0,3	-0,2	-0,2	-0,3	86%	1%	13%
9 R	27	50	30	41	-0,1	-0,1	-2,8	-0,7	28%	0%	72%
10	48	51	30	38	-3,9	-2,6	-7*	-3,9	97%	0%	3%
11	28	149	30	35	-5,8	-3,8	-8*	-5,9	62%	0%	38%
11 R	28	150	30	38	-2,4	-0,7	-4,5	-2,6	58%	0%	42%
12	49	149	30	37	-8*	-5*	-7*	-8,4	94%	0%	6%
13	28	50	120	39	-1,4	-1,3	-0,2	-1,4	100%	0%	0%
14	49	51	120	61	-8*	-6*	-7*	-8,7	98%	0%	2%
15	28	148	120	42	ND	-1,5	-0,4	-2,3	100%	0%	0%
15 R	25	148	120	38	-2,1	-1,5	-4,1	-2,3	58%	0%	42%
16	50	148	120	49	-8*	-6*	-7*	-8,6	88%	0%	11%
Points au centre											
17	39	99	75	28	-2,3	-1,9	-3,3	-2,5	71%	2%	26%
18	39	103	75	34	-2,4	-2	-4,4	-2,6	58%	2%	41%
19	38	101	75	28	-2,1	-2	-3,1	-2,1	99%	1%	0%
20	38	102	75	31	-2,1	-1,6	-1,9	-2,0	75%	0%	25%
21	39	100	75	33	-2	-1,5	-3,8	-2,1	84%	3%	13%
22	40	100	75	26	-3,4	-3	-5,9	-3,6	10%	21%	69%
23	38	100	75	29	-2,6	-3,8	-6*	-2,6	98%	1%	1%
Points en étoile											
E1	54	105	75	29	-8*	-6*	-6*	-8,8	98%	1%	1%
E2	19	100	75	18	-2,3	-0,5	-1,1	-1,9	95%	2%	4%
E3	38	29	75	20	0,3	0,1	ND	0,3	99%	1%	0%
E4	39	170	75	29	-2,1	-1,7	-7*	-2,2	88%	0%	12%
E5	39	101	140	28	-2,3	-2	-3	-2,3	97%	2%	1%
E6	39	100	10	21	-1	-0,6	-4,3	-1,1	89%	0%	11%
E7	39	101	75	51	-2	-1,4	-4,3	-2,1	84%	1%	15%
E8	39	100	75	5	-2,1	-1,8	-7*	-2,1	95%	1%	3%

Les points au centre (expériences 17 à 23) permettent d'évaluer la reproductibilité des expériences et ainsi de vérifier la validité du plan d'expériences. Le diagramme à moustache

ramassé d'*E. coli* indique une très bonne reproductibilité. Celui de *S. cerevisiae* est un peu plus dispersé mais reste signe d'une reproductibilité satisfaisante et acceptable. Dans les conditions du point au centre (75 min à $39 \pm 1^\circ\text{C}$ et 101 ± 1 bar avec une dépressurisation à 30 ± 3 bar/min) les souches *E. coli* et *S. cerevisiae* affichent des réductions décimales modérées respectivement de $-2,4 \pm 0,5$ et $-2,3 \pm 0,8$. *L. innocua* est caractérisée par une réduction décimale moyenne de $-4,1 \pm 1,5$. Cette valeur plus élevée que pour les deux autres souches témoigne d'une plus grande sensibilité au traitement. Par ailleurs, l'écart type plus important prend en compte les difficultés expérimentales rencontrées lors du plan d'expériences pour quantifier cette bactérie.

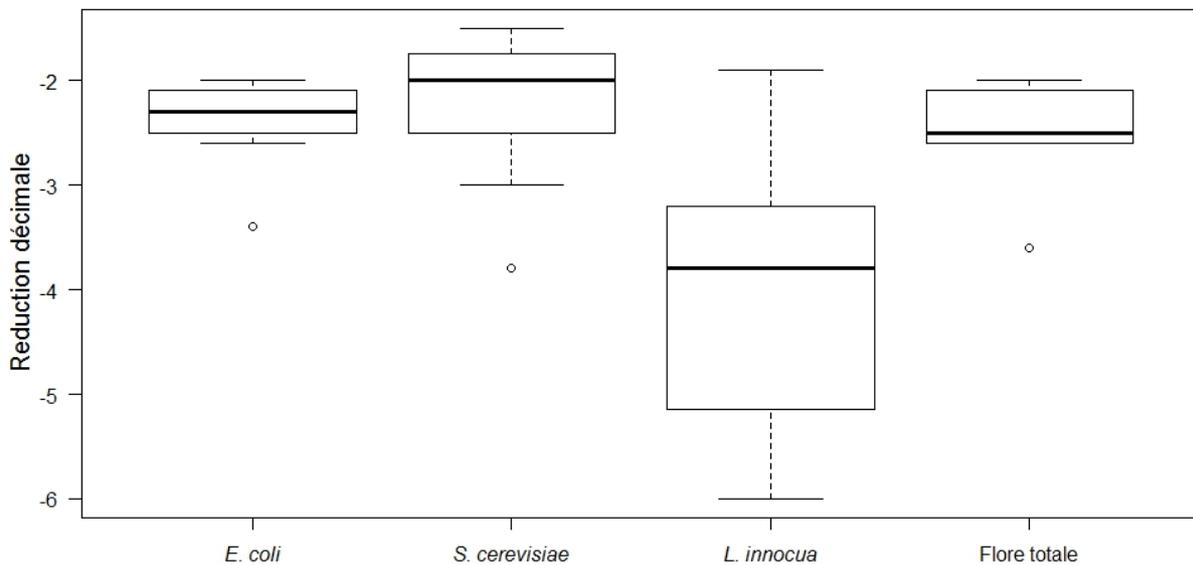


Figure 30 : Diagramme en boîtes à moustache des points au centre du plan d'expériences pour les 3 souches étudiées ainsi que la flore totale

1.5.1. Identification des facteurs influents

Dans la mesure où le plan d'expériences apparaît comme fiable dans son ensemble, l'influence de chaque facteur sur la réduction décimale a pu être évaluée. La significativité statistique de chaque effet (comprenant les interactions du premier ordre ainsi que les termes quadratiques) a été déterminée à l'aide d'une ANOVA. Les résultats de cette étude sont listés dans le Tableau 27. Seuls les facteurs et les interactions significatifs ($p < 0,05$) sont rapportés.

Tableau 27 : Analyse statistique du plan d'expériences et coefficients de régression associés. Les paramètres ombrés en vert ne sont pas influents. Ils ont été rajoutés parce qu'ils interviennent dans l'interaction PD.

Facteurs	<i>E. coli</i> R ² = 0,822		<i>S. cerevisiae</i> R ² = 0,732		<i>L. innocua</i> R ² = 0,496		Réduction totale R ² = 0,826	
	coefficient	p-value	coefficient	p-value	coefficient	p-value	coefficient	p-value
Constante	-1,82	< 10 ⁻⁴	-1,77	< 10 ⁻⁴	-4,08	< 10 ⁻⁴	-1,94	< 10 ⁻⁴
T	-2,78	< 10 ⁻⁴	-1,88	< 10 ⁻⁴	-2,20	< 10 ⁻⁴	-2,65	< 10 ⁻⁴
P	-0,79	0,0050	-0,56	0,0196	/	/	-0,92	0,0011
T ²	-2,19	< 10 ⁻⁴	-1,12	0,0030	/	/	-2,05	< 10 ⁻⁴
PD	0,73	0,0134	/	/	/	/	0,60	0,1442
D	-0,24	0,3389	/	/	0,81	0,0482	-0,36	0,1653

La qualité du modèle est évaluée grâce au coefficient de régression R². Il est de 0,83 pour la réduction décimale totale et respectivement de 0,82, 0,73 et 0,50 pour *E. coli*, *S. cerevisiae* et *L. innocua*. Dans l'ensemble, la variabilité de la réduction décimale peut donc s'expliquer par des variations des niveaux des facteurs. Seul le coefficient de régression associé à *L. innocua* est insuffisant et ne permet pas d'aboutir à une exploitation correcte et fiable des résultats. Parmi les 4 paramètres étudiés, la température est le plus influent. Il intervient d'une part de manière linéaire (T) et d'autre part sous la forme d'un terme quadratique (T²). La pression (P) est également influente sauf dans le cas de *L. innocua*. La vitesse de dépressurisation n'est absolument pas significative. La durée du traitement (D) n'apparaît que pour *L. innocua* et dans l'interaction pression-durée (PD) dans le cas de la réduction décimale totale et pour *E. coli*.

Tableau 28 : Seconde régression linéaire uniquement sur les paramètres influents détectés au cours de la première régression. Les paramètres ombrés en vert ne sont pas influents

Facteurs	<i>E. coli</i> R ² = 0,803		<i>S. cerevisiae</i> R ² = 0,703		Réduction totale R ² = 0,797	
	coefficient	p-value	coefficient	p-value	coefficient	p-value
Constante	-2,16	< 10 ⁻⁴	-1,77	< 10 ⁻⁴	-2,30	< 10 ⁻⁴
T	-2,62	< 10 ⁻⁴	-1,86	< 10 ⁻⁴	-2,52	< 10 ⁻⁴
P	-0,66	0,0100	-0,59	0,0075	-0,79	0,0023
D	-0,40	0,1073	/	/	-0,49	0,0455
T ²	-2,37	< 10 ⁻⁴	-1,08	0,0024	-2,21	< 10 ⁻⁴
PD	0,82	0,0055	/	/	0,66	0,0205

De manière à affiner les résultats, une nouvelle régression a été menée (Tableau 28) en ne gardant que ses paramètres influents ainsi que le facteur D intervenant dans l'interaction PD qui est significative dans les cas de la réduction totale et de *E. coli*. Les coefficients de régression linéaire sont légèrement plus faibles. Cela s'explique par le fait que nous avons négligés certains paramètres. Ces coefficients témoignent cependant de la bonne qualité des modèles. La durée apparaît désormais comme influente dans le cas de la

réduction totale. Les autres facteurs masquaient initialement son impact, qui est à la limite de l'influence. Pour *E. coli*, la durée reste un facteur non influent.

Les diagrammes des effets (Figure 31) représentent les moyennes des réponses de toutes les expériences menées à un certain niveau du facteur considéré, indépendamment du niveau des autres facteurs. Bien que tous les autres paramètres ne soient pas égaux par ailleurs, on considère que leurs effets se compensent étant donné que l'on balaye une large gamme de conditions. Ces graphiques permettent de mettre en évidence les tendances relatives à l'effet des facteurs. La réduction décimale totale évolue de la même manière que *E. coli*.

Pour *E. coli* quelle que soit la température étudiée, le traitement par CO₂ induit une réduction minimale de 2 log. A partir de 38-40°C, une réduction décimale supplémentaire (de l'ordre de 4 à 6 unités) intervient jusqu'à aboutir à une inactivation totale à 54°C. Pour *S. cerevisiae*, presque aucune inactivation n'est observée à 20°C mais l'augmentation de la température provoque la mort progressive des levures. Cette mortalité est quasiment linéaire avec la température (-0,5 par tranche de 5°C) jusqu'à atteindre l'inactivation totale à 54°C. Cette influence prépondérante de la température se retrouve tout au long de la littérature, où il est souvent montré qu'à pression constante, une hausse de la température entraîne une amélioration linéaire de la réduction décimale (Figure 32).

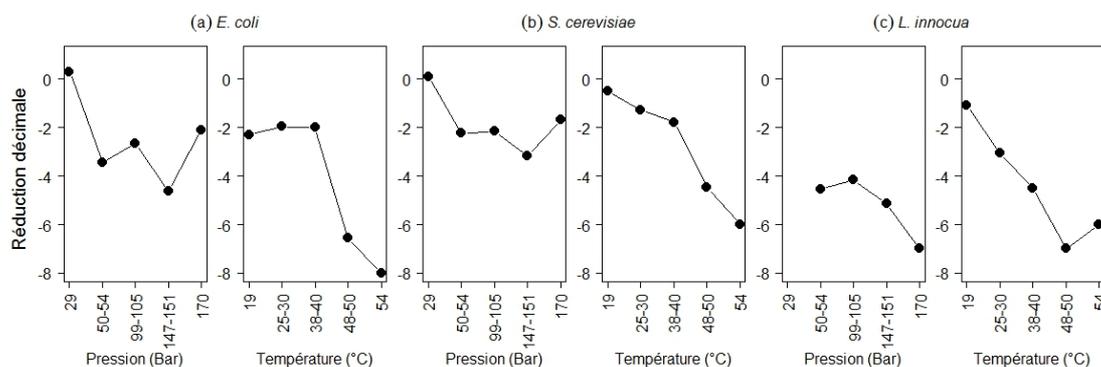


Figure 31 : Diagramme des effets de la température et de la pression pour (a) *E. coli*, (b) *S. cerevisiae* et (c) *L. innocua*. Inactivation totale à une réduction de -8 pour *E. coli*, -6 pour *S. cerevisiae* et -7 pour *L. innocua*.

Ainsi sur *E. coli* (concentration initiale de 10⁸ UFC/mL), (2007) ont montré qu'un traitement de 30 min à 200 bar conduit à une réduction décimale supplémentaire de 2 unités, quand il est fait à 52°C plutôt qu'à 32°C. Selon l'étude considérée, cet effet peut être plus marqué à basse pression (Liao et al., 2008) ou haute pression (Liao et al., 2007). Une réduction de -0,8 log/5°C est observée pour une pression de 100 ou 400 bar contre -0,4 log/5°C pour une

pression de 200 à 300 bar. L'effet de la température semble plus prononcé dans notre étude, notamment parce que nous prenons en compte une gamme de température plus large et une durée de traitement beaucoup plus longue. Si on se focalise sur la gamme de température inférieure à 38°C, une amélioration de la réduction décimale de l'ordre de 1 à 2 unités, similaire à celles de la littérature, est observée.

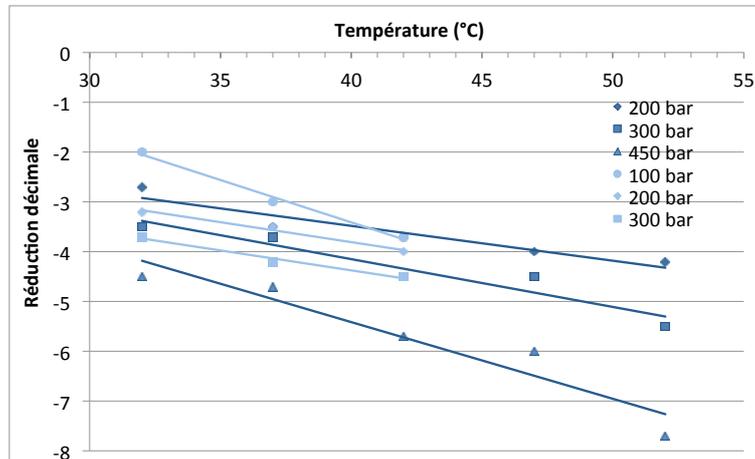


Figure 32 : Effet de la température et de la pression sur la réduction décimale d'*E. coli* après un traitement de 30 min : data de (Liao et al., 2007) pour les courbes en bleu foncé et (Liao et al., 2008) pour les courbes en bleu clair

Pour la pression, les courbes données en Figure 31 montre un effet légèrement positif de la pression sur l'inactivation des microorganismes, bien que cela soit moins flagrant que dans le cas de la température. Des diminutions de l'ordre de 2 unités sont observées. Cette tendance est confirmée par la Figure 32, où une hausse de la pression à température constante, permet d'améliorer l'inactivation des microorganismes. En moyenne, l'inactivation des microorganismes peut progresser de 2 et 3 unités pour une hausse de pression de 100 à 450 bar. Moins d'une unité est gagnée si le gap de pression est de 100 bar (Liao et al., 2008). Dans notre cas, la réduction décimale progresse dès le seuil de pression de 50 bar et non à partir de la pression critique (72 bar). Pourtant d'après (2006), une durée de traitement double est nécessaire à 62 bar pour obtenir une réduction similaire à celle obtenue à 100 bar. Cela peut s'expliquer par le fait que nos durées de traitement sont nettement supérieures et tendent avec un temps suffisant, à toujours aboutir à une réduction totale de la flore. *L. innocua* semble beaucoup plus affectée par la pression que les deux autres souches.

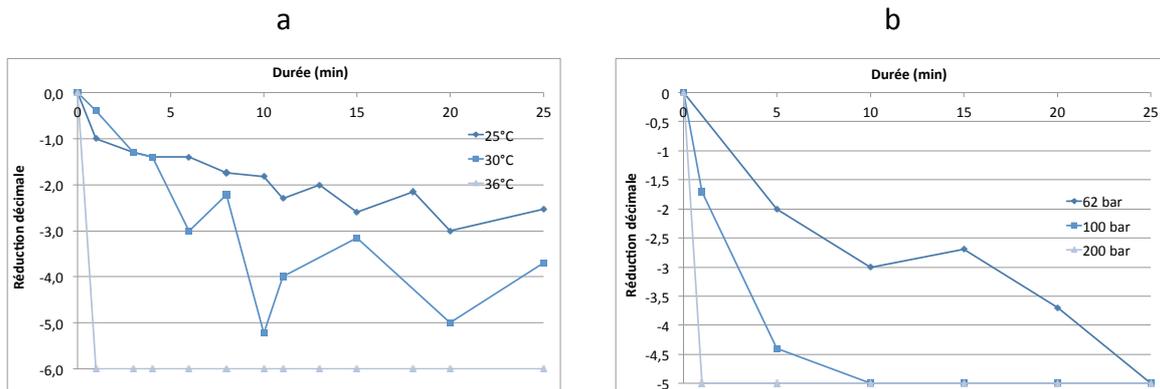


Figure 33 : Effet (a) de la température à P = 100 bar et (b) de la pression à T = 36°C sur l'inactivation de *S. cerevisiae* pour un volume traité de 5 mL et une concentration en microorganismes de 10^5 UFC/mL (Spilimbergo and Mantoan, 2006)

L'analyse de la littérature fait apparaître un lien intime entre la température ou la pression et la durée du traitement. Cependant, le diagramme des effets (Figure 34) indique une influence peu marquée de la durée sur l'inactivation de nos microorganismes. La hausse de la mortalité suite à une prolongation de la durée du traitement est moins évidente que pour la température ou de la pression. Cependant, une amélioration de -1,5 unités est accessible avec un traitement de 2 h 20 par rapport à un traitement de 10 min. Au mieux, il est possible d'obtenir des réductions de l'ordre de -3 à -4 sur une plage de temps de 2 h. Si on considère un traitement de 30 min, des réductions respectives de -3 et -2 sont obtenues pour *E. coli* et *S. cerevisiae*. C'est cohérent avec le -2 expérimenté par Liao et al. (2008) sur la Figure 32 pour une pression de 100 bar. Ces résultats sont confirmés par Spilimbergo et Mantoan (2006).

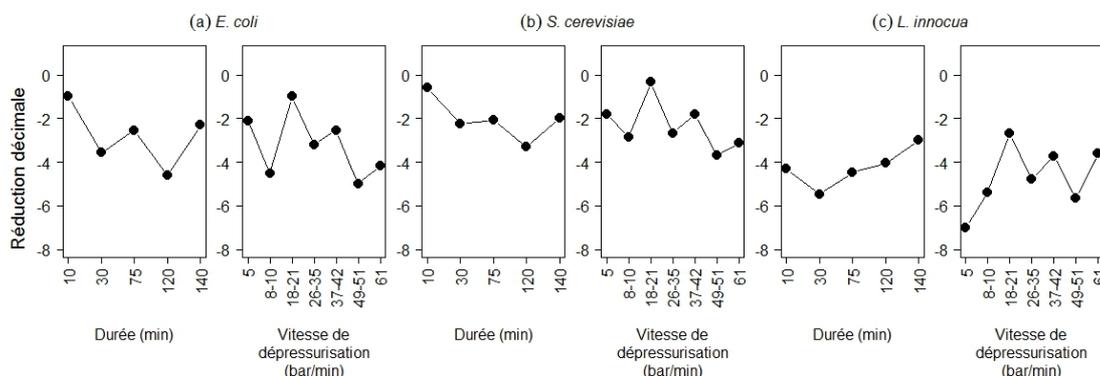


Figure 34 : Diagramme des effets de la durée du traitement et de la vitesse de dépressurisation pour (a) *E. coli*, (b) *S. cerevisiae* et (c) *L. innocua*

L'impact de la vitesse de dépressurisation est moins marqué. De manière générale, une augmentation de la vitesse de dépressurisation tend vers une inactivation plus forte des

microorganismes. Cependant cette contribution semble minime comparé à la température ou à la pression. Sur une évolution de 5 à 55 bar/min de la vitesse de dépressurisation le gain en terme d'inactivation est compris entre -1 et -2 unités. Etonnamment, une vitesse de l'ordre de 20 bar/min semble être la moins intéressante quel que soit le microorganisme envisagé. Assez peu d'articles sont consacrés à l'étude de l'influence de la vitesse de dépressurisation. A partir d'un plan d'expériences, Soares et al. (2013) a déterminé que la vitesse de dépressurisation avait une influence significative sur l'inactivation (Figure 35.a), avec une réduction décimale qui décroît de manière linéaire sur la gamme de 60 à 120 bar/min à raison de -1,2 log par tranche de 20 bar/min. Au-delà de ces vitesses, l'effet est moins prononcé. Melo Silva et al. (2013) ont également constaté un fort impact de la vitesse de dépressurisation sur *E. coli*. Il est possible que cet effet ne soit pas ressorti au cours de notre étude, écrasé face à la prépondérance de l'impact de la température et de la pression. Toutefois, d'après la Figure 35.b, l'influence d'une variation de la vitesse de dépressurisation sur l'inactivation ne se fait réellement sentir que sur des temps de traitement particulièrement longs (à partir de 60 min). Il est donc possible que le manque de significativité de ce paramètre dans notre étude soit lié à nos durées de traitement qui dans l'ensemble sont inférieures ou égales à 75 min.

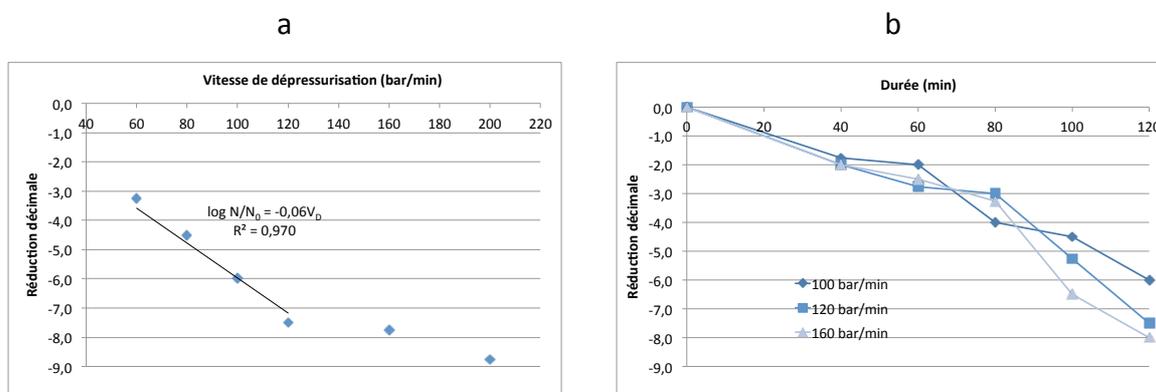


Figure 35 : Effet sur *L. monocytogenes* avec une charge initiale de 10^{10} UFC/mL (a) de la vitesse de dépressurisation suite à un traitement de 2 h à 33°C et 200 bar (Soares et al., 2013) et (b) de la durée d'un traitement à 200 bar et 33°C avec différentes vitesses de dépressurisation (Soares et al., 2013)

Par ailleurs, nous n'avons pas expérimenté, du fait de contraintes matérielles, des vitesses de dépressurisation aussi élevées. La Figure 35.a ne débute qu'à partir de 60 bar/min, or nous avons travaillé dans une gamme inférieure comprise entre 5 et 55 bar/min. Si on extrapole la partie linéaire de la courbe, sur notre gamme, une réduction allant de -0,3 à -4 est prévisible. Plus particulièrement, si notre pression moyenne est prise en compte, la

réduction prédite serait de -2. Ces résultats sont cependant à utiliser avec précaution dans la mesure où ils sont basés sur un traitement de 120 min à 33°C.

1.5.2. Effet des interactions

D'après l'analyse ANOVA, le couple pression-durée possède une influence significative sur la réduction décimale associée à *E. coli*. Afin d'évaluer cet effet, un diagramme d'interaction (Figure 36) a été construit. Il représente la réduction décimale en fonction de la durée selon le niveau de pression. Si les droites associées à deux gammes de pression différentes sont parallèles, il n'existe aucune interaction particulière. A l'inverse, si les droites sont concourantes, c'est le signe d'une interaction.

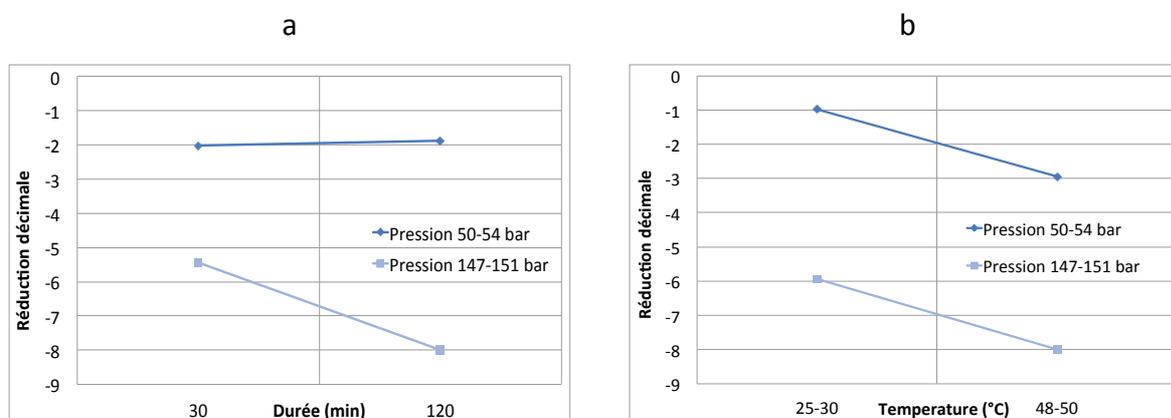


Figure 36 : Diagramme des interactions (a) pression-durée et (b) pression-température pour *E. coli*

Le graphique de la Figure 36.a affiche deux droites divergentes. Il y a donc une interaction pression-durée, qui agit sur la réduction décimale de *E. coli*. Augmenter la durée permet, dans le cas de hautes pressions (± 150 bar) d'augmenter la réduction décimale. On constate d'ailleurs que la réduction décimale maximale de -8 est obtenue pour une pression de ± 150 bar associée à un traitement de 120 min. A l'inverse, le diagramme qui met en regard la pression et la température (Figure 36.b), exhibe des droites parallèles. Il n'y a pas d'interaction entre la pression et la température. La réduction maximale de -8 est cependant obtenue avec la température et la pression la plus élevée (± 150 bar et 50°C). Bien que peu évoquées dans la littérature, ces interactions sont cohérentes et relativement intuitives. Un seul auteur s'est attaché à étudier la relation entre la pression et la durée du traitement en utilisant un plan composite centré et la méthodologie des surfaces de réponses (Debs-Louka et al., 1999). D'après ces travaux, augmenter le temps de contact quand les pressions sont faibles (± 30 bar) n'a que peu d'effet sur l'inactivation. Cette efficacité limitée peut sans doute être attribué à l'état physique du CO₂. En effet, ces expériences ont été menées à

température ambiante sur une gamme de pressions relativement faibles (de 23 à 57 bar). Le CO₂ était donc à l'état gazeux,, or dans cet état, son action bactéricide est nettement moins importante que dans le domaine supercritique (Oulé et al., 2006).

1.6. Optimisation mathématique

Les données du plan composite centré et les résultats de la régression linéaire et de l'ANOVA (Tableau 28) permettent d'écrire une relation mathématique polynomiale (Equations 22, 23 et 24) en variables centrées réduites entre les facteurs influents ($p < 0,05$) et les réductions décimales de chaque microorganisme (exception faite de la durée pour *E. coli* qui a été rajoutée dans la mesure où elle apparaît dans l'interaction significative pression-durée).

$$\log \frac{N}{N_0} (\text{pop. totale}) = -2,30 - 2,21 T^2 - 2,52 T - 0,79 P - 0,49 D + 0,66 PD \quad (22)$$

$$\log \frac{N}{N_0} (\text{E. coli}) = -2,17 - 2,37 T^2 - 2,62 T - 0,66 P - 0,40 D + 0,82 PD \quad (23)$$

$$\log \frac{N}{N_0} (\text{S. cerevisiae}) = -1,77 - 1,08 T^2 - 1,86 T - 0,59 P \quad (24)$$

Dans la mesure où ces équations sont établies en variables centrées réduites, la comparaison entre l'importance des facteurs est immédiate. En effet, cette notation permet de s'affranchir des différences d'ordre de grandeurs entre les variables étudiées. Pour chaque microorganisme, les coefficients associés à la pression sont moindre comparé à ceux de la température. La température sera donc le facteur prépondérant pour expliquer l'inactivation de nos microorganismes. Cette influence est d'autant plus importante que la température intervient également sous la forme d'un terme quadratique.

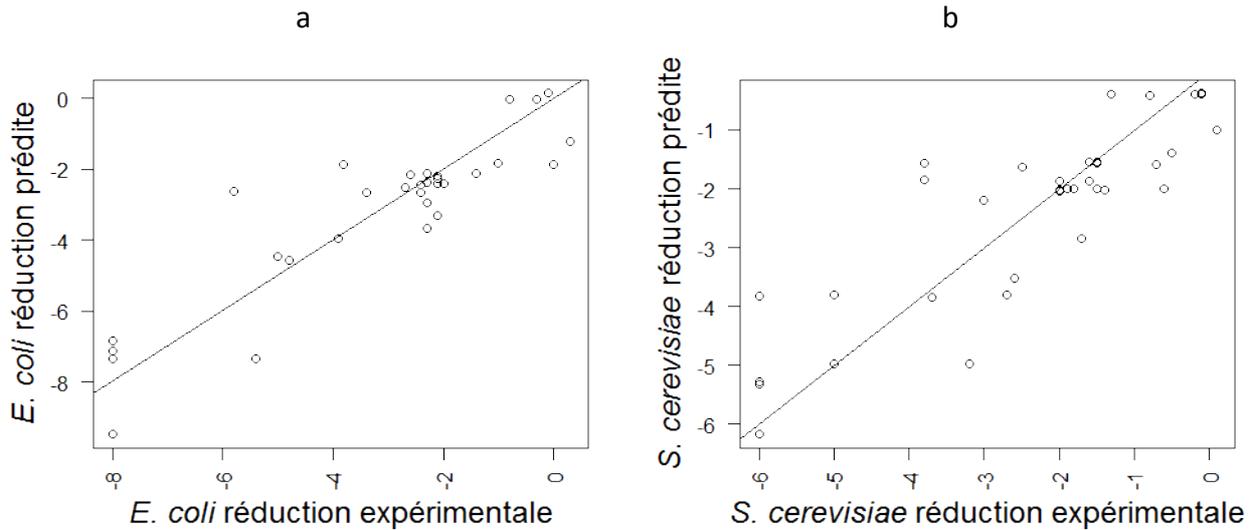


Figure 37 : Graphiques des valeurs prédites pour (a) *E. coli* et (b) *S. cerevisiae*

Pour considérer la fiabilité du modèle mathématique, il est possible d’avoir recours au graphique des valeurs prédites. La qualité du modèle est établie par la bonne corrélation entre les valeurs prédites (calculées à l’aide du modèle) et les valeurs expérimentales (mesurées lors du plan d’expériences). Les points des graphiques des valeurs prédites (Figure 37), bien répartis le long de la première bissectrice, suggèrent que le modèle proposé est pertinent et ce dans la plage expérimentale du domaine d’étude. Les points sont mieux répartis sur la bissectrice dans le cas de *E. coli* par rapport à *S. cerevisiae*. Cela signifie que le modèle est plus adapté pour cette souche. C’est cohérent avec la valeur du R^2 qui est supérieur dans la régression de *E. coli* (0,82 contre 0,73 pour *S. cerevisiae*). On peut remarquer que la qualité de la prédiction est moins bonne pour les réductions décimales importantes. Les valeurs prédites s’échelonnent entre -6 et -10 pour une réduction expérimentale de -8 pour *E. coli*. Ce phénomène traduit simplement une des limites de notre modèle. En effet, ce dernier ne peut pas prendre en compte le caractère fini de l’ensemencement initial. Le niveau de contamination initial en *S. cerevisiae* n’excède pas les 10^6 UFC/mL. Il est donc impossible d’obtenir expérimentalement des réductions décimales dépassant les -6. Mais le modèle mathématique n’est quant à lui pas limité. Il peut donc prédire des valeurs inférieures. Il est donc normal que des points expérimentaux s’alignent au niveau -6.

L’optimisation des conditions de traitement peut alors être obtenue en utilisant la méthodologie des surfaces de réponses (RSM) à partir des équations établies précédemment. Les nappes RSM sont reproduites sur la Figure 38.

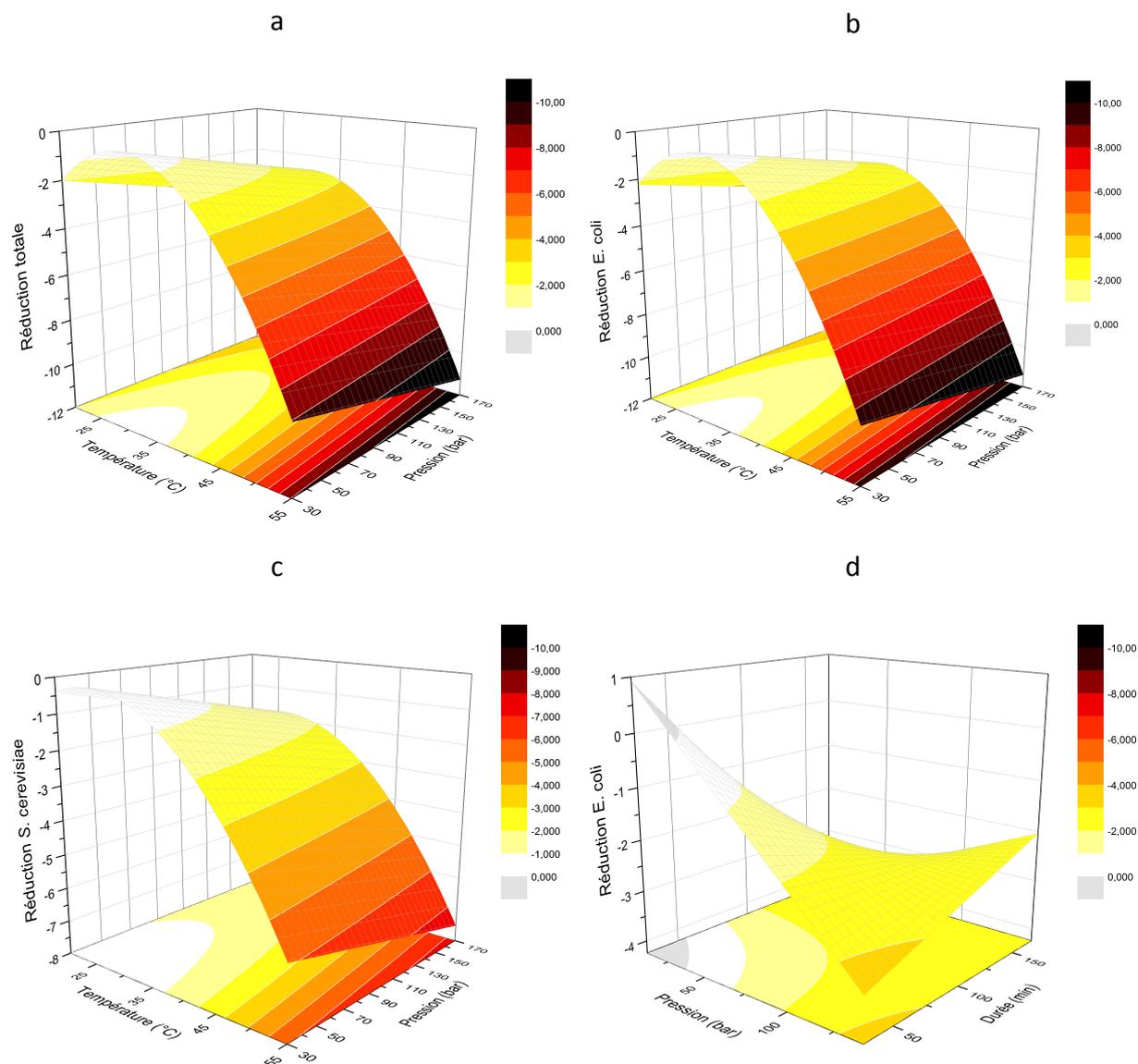


Figure 38 : Graphiques des surfaces de réponse de la réduction décimale :
(a) totale en fonction de la pression et de la température (75 min de traitement)
(b) de *E. coli* en fonction de la pression et de la température (75 min de traitement)
(c) de *S. cerevisiae* en fonction de la pression et de la température (75 min de traitement)
(d) de *E. coli* à 38°C en fonction de la pression et de la durée du traitement

Le choix de représenter la pression et la température se justifie de part l'influence prépondérante de ces deux facteurs sur la réduction décimale totale ainsi que celle de *E. coli* et *S. cerevisiae*. Etant donné que l'interaction pression-durée intervient aussi dans le cas de la réduction décimale totale et de *E. coli*, il était également intéressant de tracer ce graphique RSM (non représenté ici pour la réduction décimale totale). Pour ces deux souches, plus la température est importante, plus la réduction l'est aussi. Il en va de même avec la pression. A 38°C pour *E. coli* (Figure 38.d), en travaillant à pression constante, une augmentation de la durée permet d'obtenir une inactivation plus importante des

microorganismes. Toutefois les traitements les plus longs ne sont pas forcément gages d'une meilleure efficacité. En effet, un traitement de 50 min (voire moins) à 150 bar assure 1 log de mieux qu'un traitement d'une durée supérieure à 75 min.

1.7. Conclusions du plan d'expériences

La méthodologie proposée, basée sur un plan d'expériences de type composite centré a permis :

- d'évaluer les facteurs influents
- de hiérarchiser leur importance
- de trouver des conditions de pasteurisation efficaces.

Nous avons mis en évidence l'importance prépondérante de la température, ainsi que celle de la pression sur l'inactivation des microorganismes. L'influence moindre mais existante de l'interaction entre la pression et la durée du traitement a également été démontrée. De plus, les équations (22), (23) et (24), permettent de prédire les conditions assurant une pasteurisation optimale. Comme la température et la pression interviennent avec un signe négatif sur la réduction de *S. cerevisiae*, il faut augmenter ces paramètres, pour obtenir les meilleurs résultats, soit 55°C et 170 bar. Le raisonnement est moins évident et immédiat pour *E. coli*. En effet, l'interaction pression-durée intervient positivement sur la réduction de *E. coli* d'après l'équation (23). Une résolution mathématique de cette équation est nécessaire pour déterminer la pression et la durée optimales. Les conditions optimales sont donc un traitement de 10 min à 55°C et 170 bar et cela aboutirait à une réduction théorique de -11,6 pour *E. coli* et -7,2 pour *S. cerevisiae*. Un essai mené dans ces conditions a conduit à une pasteurisation totale, avec des niveaux de réduction décimale respectifs de -10 et -7 pour *E. coli* et *S. cerevisiae*.³

Nous avons pu constater au cours de ce plan composite centré, que certaines conditions, (listées dans le Tableau 29) permettent de pasteuriser avec succès. Ces conditions font appel à une température d'au moins 50°C. Une faible pression peut alors être compensée par une durée de traitement longue ou inversement. De manière générale,

³ La solution initiale était plus enrichie pour cet essai : 1.10^{10} UFC/mL pour *E. coli*; 4.10^7 UFC/mL pour *S. cerevisiae* et 3.10^8 UFC/mL pour *L. innocua*

seuls nos temps de contact longs (2 h minimum) ont permis d’aboutir à une pasteurisation efficace, à l’exception d’un traitement court à haute pression et haute température.

Tableau 29 : Récapitulatif des conditions de traitement au CO₂ pressurisé aboutissant à une pasteurisation totale (T : température, P : pression, D : durée et V_d : vitesse de dépressurisation)

	T	P	D	V _d
	°C	bar	min	bar/min
FC	≥ 50°C	50 150	120 30	∇
E1	55	100	75	30
MM	55	170	10	30

2. Optimisation des conditions opératoires

Le plan composite centré a permis de définir à partir des équations modèles un optimum mathématique, correspondant à un traitement de 10 min à 55°C et 170 bar. Cependant on peut aussi obtenir des inactivations totales avec des combinaisons de facteurs différentes de cette optimisation. On se propose de revenir dans un premier temps sur les conditions opératoires initiales ayant pasteurisé (Tableau 29) pour tenter d’en tirer le meilleur parti. Par ailleurs, la littérature montre que provoquer des cycles de pression et dépressurisation permet d’améliorer le niveau d’activation, notamment dans le cas des spores. Ce principe a donc été appliqué à nos microorganismes.

Dans ce chapitre, des solutions avec des teneurs en vitamine C différentes (19 mg/L à 4 g/L) ont été traitées. En effet, au cours du plan d’expériences, nous avons rencontré des difficultés pour doser la concentration en vitamine C. Nous avons donc abandonné la teneur finale de 19 mg/L pour des concentrations plus importantes. Après plusieurs essais nous avons sélectionné une valeur finale de 1 g/L. Ce choix a été fait en prenant en compte l’effet pasteurisateur complémentaire pouvant être induit par la présence de vitamine C. Le détail de cette démarche est exposé dans le chapitre 4.

2.2. Optimisation par itérations

Dans l’idée de minimiser les coûts d’un procédé industriel, il est intéressant d’abaisser la température et la pression le plus possible pour diminuer le coût énergétique. Diminuer la durée du traitement est également intéressant en terme de productivité annuelle car cela permet d’augmenter les volumes traités. Des expériences complémentaires ont donc été réalisées pour déterminer les conditions les plus basses possibles aboutissant à une

inactivation totale des microorganismes. Les résultats de ces expériences sont rassemblés dans le Tableau 30.

Tableau 30 : Résultats des expériences d'optimisation menées à une vitesse de dépressurisation de 30 bar/min (T : température, P : pression, D : durée) Les expériences ombrées en vert ont été réalisées avec une concentration initiale en vitamine C de 4 g/L.

	T	P	D	Log (N/N0)			Réduction décimale totale	Vit. C	Taux de conservation
	°C	bar	min	<i>E. coli</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>L. innocua</i>		g/L	
O1	50	80	50	-4,8	-7*	-8*	-5	0,86 ± 0,05	87%
O2 (n=2)	50	80	75	-7,2 ± 2,6	-6,5 ± 0,7	-8,0 ± 1,4	-7,6 ± 3,0	0,79 ± 0,06	87%
O3 (n=2)	50	100	50	-6,4 ± 0,4	-5,4 ± 3,2	-8,0* ± 1,4	-6,5 ± 0,5	0,79 ± 0,06	96%
O4 (n=2)	50	100	75	-8,2* ± 1,1	-6,1* ± 1,3	-7,5* ± 0,7	-7,4* ± 0,1	0,72 ± 0,02	82%
O5 (n=10)	38	100	75	-3,2 ± 0,6	-2,2 ± 1,0	-7,0 ± 1,7	-3,2 ± 1,1	0,83 ± 0,1	89%
O6	38	180	75	-2,6	-1,9	-3,9	-2,7	0,63 ± 0,02	66%
O7 (n=2)	38	100	75	-2,9 ± 1,0	-1,6 ± 1,0	-7,5* ± 0,7	-2,8 ± 0,8	3,05 ± 0,2	ND
O8	50	100	30	-5	-3,8	-9*	-5,4	2,91 ± 0,1	ND
O9	50	100	75	-8*	-5*	-8*	-8,9*	2,98 ± 0,2	ND
* Inactivation totale ND : Non Déterminé									

Il ressort de ces essais que la température est véritablement le facteur clé. Le traitement O4 (50°C) affiche une efficacité bien meilleure au traitement O5 (38°C) bien qu'ils aient la même durée (75 min) et la même pression (100 bar). Les expériences O7 et O9 (75 min - 100 bar) mènent à la même conclusion. Une température de 38°C conduit à des niveaux de réduction décimale modérés de l'ordre de -2 log, alors qu'une température de 50°C associée à une pression et une durée appropriée permet d'atteindre une inactivation totale. Même une pression forte de 180 bar (O6) ne permet pas de contrebalancer une faible température (38°C). La comparaison des couples d'expériences (O2, O4) et (O5, O6) menées respectivement à (80 et 100 bar à 50°C) et (100 et 180 bar à 38°C) montre qu'une hausse de la pression est avantageuse seulement dans la gamme 80 à 100 bar. Au-delà, les résultats sont mitigés. Cette conclusion est toutefois à tempérer dans la mesure où les deux séries d'expériences n'ont pas été menées à la même température. L'impact de la durée est particulièrement marqué. Une augmentation de 25 min de la durée du traitement conduit à une amélioration d'au moins 1 log à la réduction décimale selon la comparaison des expériences (O1, O2), (O3, O4) et (O8, O9) menées à 50°C et de durées respectives de (50 et 75 min à 80 bar), (50 et 75 min à 100 bar) et (30 et 75 min à 100 bar). Il est donc important

de veiller à traiter les échantillons suffisamment longtemps pour obtenir des niveaux d'inactivation satisfaisants.

Les conditions optimales de traitement pour une pasteurisation totale peuvent donc être abaissées à 75 voire à 50 min à 50°C et 100 bar au lieu de 10 min à 55°C et 170 bar. La différence de durée est conséquente mais le gain sur la température et la pression est non négligeable. D'un autre côté, on peut penser que ce n'est pas la durée du palier statique qui est le seul temps limitant de l'opération globale du traitement batch mais que le temps de charge, de pressurisation, de dépressurisation et d'évacuation de la solution vont aussi contribuer.

2.3. Cycles de pression

Dans la mesure où l'efficacité du CO₂ pressurisé en terme de pasteurisation est partiellement attribuée à l'expansion brutale du gaz lors de l'étape de dépressurisation, imposer des cycles de pression pour multiplier les dépressurisations, semble être un moyen possible pour améliorer l'efficacité du traitement. L'objectif de ces expériences est de voir si des cycles de pression permettent d'atteindre de meilleures réductions décimales avec des conditions qui ne pasteurisent pas en temps normal.

La Figure 39 représente un traitement à base de deux cycles de pression de durée t à une pression P_1 avec une différence de pression entre les deux cycles ΔP . Ainsi les différents facteurs que l'on peut moduler sont :

- le nombre de cycles n
- leur durée t
- le niveau du ΔP imposé

L'impact de tous ces effets est analysé sur les conditions du point au centre du plan d'expériences (38°C, 100 bar et 75 min de durée de contact statique), avant d'être élargi pour des temps et pressions différents.

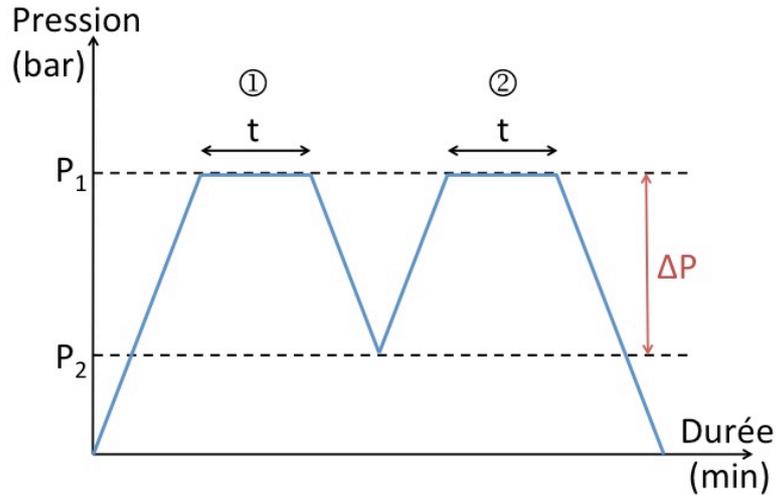


Figure 39 : Représentation schématique d'un traitement comprenant 2 cycles de pression

Le Tableau 31 récapitule les résultats obtenus lors des expériences avec des cycles de pression. Un traitement avec un nombre de cycle de 1 correspond à un traitement classique avec une seule période de statique.

Tableau 31 : Réductions décimales associées aux différents traitements par cycles de pression. Les expériences ombrées en vert ont été menées avec une concentration initiale en vitamine C de 4 g/L et de 1 g/L pour les autres essais. (T : température, P : pression, vitesse de dépressurisation fixée à 30 bar/min, n : nombre de cycles ; t : durée de chaque cycle, ΔP : différence de pression entre chaque cycle * : inactivation totale, ND : non déterminé)

Exp N°	T	P	n	t	ΔP	Log (N/N ₀)			Réduction décimale totale	Concentration vit C	Taux de conservation vit C
	°C	bar	-	min	bar	<i>E. coli</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>L. innocua</i>		g/L	
O5 (n=10)	38	100	1	75	0	-3,2 ± 0,6	-2,2 ± 1,0	-7,0 ± 1,7	-3,2 ± 1,1	0,83 ± 0,1	89%
CP1	38	100	1	19	0	-3,2	-2,3	-4,5	-3,3	0,89 ± 0,06	100%
CP2	38	100	1	120	0	-4,7	-2,9	-7,6	-4,7	0,81 ± 0,05	90%
CP3	38	100	2	38	20	-1,9	-1,8	-7*	-1,9	2,29 ± 1,5	ND
CP4	38	100	2	38	40	-2,4	-1,8	-6,4	-2,6	1,09 ± 0,1	92%
CP5	38	100	2	38	70	-3,2	-2,2	-7*	-3,2	2,97 ± 0,1	80%
CP6	38	100	2	19	70	-3,2	-2,2	-5,2	-3,2	0,85 ± 0,01	100%
CP7	38	100	2	60	70	-3,5	-2,8	-5,7	-3,6	0,91 ± 0,02	93%
CP8	38	100	4	19	20	-3,2	-1,9	-7*	-3,3	2,92 ± 0,1	90%
CP9	38	100	4	19	70	-3,8	-2,0	-8*	-3,7	0,75 ± 0,01	94%
O1	50	80	1	50	0	-4,8	-7*	-8*	-5	0,86 ± 0,05	87%
CP10	50	80	2	25	50	-4,6	-3,9	-6,7	-5,1	0,71 ± 0,08	100%
O2 (n=2)	50	80	1	75	0	-7,2 ± 2,6	-6,5 ± 0,7	-8,0 ± 1,4	-7,6 ± 3,0	0,79 ± 0,06	87%
CP11 (n=2)	50	80	2	38	50	-7,1* ± 1,3	-6,8* ± 1,1	-8,8* ± 1,1	-7,6* ± 1,7	0,72 ± 0,06	88%
O3 (n=2)	50	100	1	50	0	-6,4 ± 0,4	-5,4 ± 3,2	-8,0* ± 1,4	-6,5 ± 0,5	0,79 ± 0,06	96%
CP12	50	100	2	25	70	-6,3	-8,1*	-10,5*	-6,5	0,74 ± 0,11	82%

2.3.2. Impact des paramètres du cycle (nombre, durée et ΔP) à 38°C et 100 bar

Les paramètres sont étudiés en comparaison avec le traitement 38°C – 100 bar – 75 min de durée statique de traitement (point au centre du plan d'expérience, rappelé sous le nom O5). 9 essais ont permis de faire varier ΔP , t et le nombre de cycles (expérience CP1 à CP9).

Sur les expériences à 2 cycles de pression, de durée égale (2 x 38 min) (expériences CP3 à CP5), la réduction décimale progresse avec le ΔP . Plus la pression est abaissée entre chaque cycle, plus le traitement est efficace. Cette tendance à la hausse se retrouve éventuellement sur les expériences à 4 cycles (CP8 et CP9). Toutefois les réductions décimales obtenues sont suffisamment proches pour être comprise dans les écarts-types.

En outre, tous les paramètres étant égaux par ailleurs, une durée de traitement de 75 min fractionnée en 2 cycles de 38 min (CP 3 et 4) est moins efficace qu'un traitement de 75 min en une fois (CP0) sauf si le ΔP imposé permet de passer nettement sous le point critique (CP5 : retour à 30 bar contre retour à 80 et 60 bar dans les cas de CP3 et 4). Ainsi une hausse du ΔP est avantageuse mais uniquement si le retour se fait nettement sous la pression critique du CO₂.

A nombre de cycle constant, augmenter la durée des cycles, c'est à dire augmenter le temps de contact avec le CO₂, semble contribuer légèrement à l'inactivation. C'est valable dans le cas des expériences sans cycle (expériences O5, CP1 et CP2) où la réduction décimale totale progresse de -3,2 à -4,7 lorsque le temps de contact passe de 75 à 120 min. Dans le cas des expériences à 2 cycles (expériences CP5 à CP7) la progression est moins nette. La réduction décimale totale évolue de -3,2 à -3,6 lorsque le temps de contact varie de 40 à 120 min. Une fois de plus cette tendance est à nuancer au vu des écarts-types.

Pour une durée de palier constant, augmenter le nombre de cycles, ce qui revient à augmenter le temps de contact avec le CO₂, (expériences CP1, CP6 et CP9) n'apporte qu'une très sensible amélioration. En effet, la réduction décimale totale progresse à peine de 0,4 unité (passage de -3,3 à -3,7) quel que soit le nombre de cycle imposé et ce bien que le temps de contact passe de 19 à 76 min.

A temps de contact équivalent avec le CO₂ (comparaison de O5, CP3 et CP8 et de O5, CP5 et CP9), augmenter le nombre de cycle, ce qui correspond à raccourcir la durée des paliers, ne semble pas réellement significatif. Pour la première série, où le temps de contact vaut 75 min avec un ΔP de 20 bar, la réduction décimale totale fluctue entre -1,9 et -3,3, alors que la durée des paliers varie de 75 min à 19 min. Pour la seconde série avec un temps de

contact de 75 min également mais avec un ΔP de 70 bar, la réduction totale évolue de -3,2 pour 1 palier de 75 min à -3,7 pour 4 paliers de 19 min.

De manière générale, les résultats des cycles de pressions sont relativement similaires et de l'ordre de grandeur des écarts-types calculés à partir des reproductions. On en conclue que les traitements en fractionné ne sont pas meilleurs que les traitements statiques de durée équivalente, même dans le cas d'un retour à une pression basse (30 bar) et quel que soit le microorganisme envisagé. Des expériences réalisées ultérieurement avec un réacteur muni d'une fenêtre saphir ont montré que le dégazage de la solution n'intervient qu'en dessous d'une pression autour de 30 bar. Au dessus de cette pression, c'est principalement le CO_2 du ciel du réacteur qui est évacué, n'entraînant qu'une faible variation de la concentration en CO_2 dissous. Cette variation est insuffisante pour provoquer la rupture mécanique des cellules. En revanche, un temps de contact plus long permet d'améliorer l'efficacité. Par ailleurs, imposer un ΔP plus grand (i.e. descendre plus bas en pression) semble plus bénéfique qu'une augmentation du nombre de cycles. Dans la mesure où faire 4 cycles ne semble pas plus avantageux, nous avons choisi de privilégier des traitements à 2 cycles.

2.3.3. Impact des cycles de pression à 50°C

Suites à ces observations, nous avons tenté d'appliquer le principe du double cycle et d'un ΔP important à des conditions qui étaient proches de la pasteurisation totale. Nous avons repris les conditions des expériences O1 (50 min à 50°C et 80 bar), O2 (75 min à 50°C et 80 bar) et O3 (50 min à 50°C et 100 bar) du Tableau 30. Leur durée totale a été scindée deux cycles égaux avec un retour sous la pression critique. Les résultats sont présentés dans le Tableau 31, respectivement sous le nom CP10, CP11 et CP12.

La comparaison entre les nouvelles expériences et leur jumelle sans cycle de pression montre des résultats relativement similaires en terme de réduction décimale totale. Il n'y a que dans le cas de l'expérience CP11 (50°C – 80 bar – 2x38 min) où l'application de cycle de pression permet de franchir le gap nécessaire à l'obtention d'une pasteurisation totale.

Bien que ces résultats puissent paraître décevant au regard des promesses de la littérature (voir ci-après), on s'aperçoit d'une part que le cycle CP11 assure une pasteurisation totale, contrairement aux mêmes conditions sans cycle. D'autre part, le cycle CP12 affiche également de meilleures performances que sa version sans cycle. Par ailleurs la

réduction décimale en *E. coli* est assez proche des niveaux qui assurent une pasteurisation totale. Une contamination initiale moins importante aurait très certainement été éradiquée par ces conditions opératoires.

Ainsi les cycles permettent une petite amélioration des performances mais le gain reste en deçà de l'amélioration obtenue par exemple par (2013). En effet, réaliser au moins 4 cycles sur un traitement de 160 min à 36°C et 80 bar avec un retour à la pression de vapeur du CO₂ entre chaque cycle provoque dans leur étude une inactivation totale de *E. coli*. Cet effet positif serait lié à l'enchaînement des phases de pressurisation/dépressurisation, qui plongerait les microorganismes en état de stress, favorisant ainsi leur inactivation. Cette technique est privilégiée dans les tentatives d'inactivation de spores, afin de provoquer une tyndallisation, mais avec des résultats mitigés (Calvo and Torres, 2010; Dillow et al., 1999; S. Spilimbergo et al., 2003).

2.4. Conclusion sur la recherche de l'amélioration des conditions

Nous avons montré qu'il était possible d'abaisser les conditions température/pression du traitement (au prix d'une augmentation de la durée) tout en maintenant une pasteurisation totale : les conditions deviennent 75 min à 50°C et 100 bar au lieu de 10 min à 55°C et 170 bar. La différence de durée est conséquente mais le gain sur la température et la pression laisse envisager une amélioration sensible pour une extrapolation à l'échelle industrielle. Les valeurs pasteurisatrices (détail du calcul dans le chapitre 6 de la partie 3) sont du même ordre de grandeur et respectivement de 1,03 et 1,26.

Les essais sur cycle de pression, consistant à fractionner une durée de traitement en imposant des retours à des niveaux de pression plus bas, permettent une petite amélioration. Toutefois, cette dernière ne conduit pas à un gain tel qu'une pasteurisation totale serait obtenue dans des conditions où l'inactivation est modérée (pour un log N/N₀ compris entre -2 et -4). Dans les cas où un niveau d'inactivation plus élevé est déjà atteint, les cycles de pression permettent éventuellement d'aboutir à une pasteurisation totale.

3. Effet de la température et de la pression sans CO₂

Les essais précédents convergent vers la conclusion qu'à 38°C, quelle que soit la pression de CO₂, il n'y a pas d'inactivation totale, alors qu'à 50°C, on peut trouver des conditions pasteurisatrices, pourvu qu'une durée longue (50 min au minimum) compense une pression faible (50 bar). Dans quelle mesure le CO₂ pressurisé contribue-t-il à l'efficacité du

traitement ? Est ce le niveau de pression ou le CO₂ en lui-même qui assure l'inactivation ? Dans quelle mesure l'acidité naturelle du complément alimentaire y contribue-t-elle ? Dans le but de répondre à ces questions, des essais avec de l'azote (inerte) et sous air ont été réalisés.

3.1. Essais sous N₂ et en Air

Des expériences avec l'échantillon standard⁴ ont été menées sous une pression de 100 bar avec de l'azote (N₂) au lieu du CO₂. La durée en statique du traitement était de 75 min et nous avons fait varier : la température, la vitesse de dépressurisation et le temps de contact avec le gaz. Des essais sous air à pression atmosphérique servent de référence et représente un traitement thermique simple.

Dans le cas des expériences sous N₂, une bouteille de N₂ à 200 bar de pression est connectée à la vanne V1 du dispositif batch de pasteurisation. Le même protocole que pour les expériences sous CO₂ a été suivi. Un détendeur en sortie de bouteille permet de réguler la vitesse de pressurisation, qui est identique à celle sous CO₂. Les expériences à pression atmosphérique (répertoriées sous la nomenclature « Air » dans le Tableau 32) sont réalisées dans un second réacteur inox en tout point similaire à celui utilisé pour le CO₂ ou N₂. Elles sont conduites en parallèle de celles sous CO₂ ou N₂ dans la même étuve et sous agitation, de façon à subir exactement la même histoire thermique.

A 50°C, il y a une réduction notable sur tous les microorganismes. Le CO₂ montre une efficacité supérieure à celle de l'air qui est supérieure à celle de l'azote en terme de réduction décimale totale. Toutefois en prenant en compte les écarts-types on peut considérer que l'efficacité est équivalente quel que soit le gaz utilisé pour le traitement. On observe donc majoritairement un effet de la température. Si on raisonne par microorganisme. *L. innocua* affiche des réductions décimales similaires quel que soit la gaz. C'est le microorganisme le plus sensible à l'effet de la température. Pour *S. cerevisiae*, l'air et l'azote ont une efficacité équivalente, légèrement inférieure à celle du CO₂. Pour *E. coli*, le CO₂ permet également d'obtenir un meilleur niveau d'inactivation. Ainsi pour ces deux espèces le CO₂ contribue sensiblement à l'inactivation en plus de l'effet thermique.

⁴ 10 mL de *Jambes Légères* + 4 mL de vitamine C à 5,25 g/L + 4 mL d'acide gallique à 0,1 g/L + 1 mL de bouillon de chaque microorganisme

Tableau 32 : Réductions décimales pour les expériences conduites sous CO₂, N₂ et air ⁵

Exp N°	Log (N/N ₀)			Réduction décimale totale	Taux de conservation vit C
	<i>E. coli</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>L. innocua</i>		
① 38°C – 82 min – 30 bar/min					
CO ₂ (n=10)	-3,2 ± 0,6	-2,2 ± 1,0	-7,0 ± 1,7	-3,2 ± 1,1	89%
N ₂	-1,1	-0,1	-2,7	-1,2	84%
Air	0,5	-0,2	-0,9	0,4	67%
② 38°C – 152 min – 2 bar/min					
CO ₂ (n=2)	-10,5* ± 0,3	-7,2* ± 0,2	-9,9* ± 0,6	-10,6* ± 0,4	85%
N ₂	-0,1	-0,3	-2,1	-0,2	100%
Air (n=3)	-0,1 ± 0,4	-0,2 ± 0,1	-9,1* ± 1,0	-0,3 ± 0,4	100%
③ 50°C – 82 min – 30 bar/min					
CO ₂ (n=2)	-8,2* ± 1,1	-6,1* ± 1,3	-7,5* ± 0,7	-9,4* ± 1,0	82%
N ₂ (n=3)	-4,2 ± 1,2	-4,1 ± 1,2	-6,1 ± 2,4	-4,5 ± 1,4	85%
Air (n=4)	-6,2 ± 2,2	-4,6 ± 1,4	-7,8 ± 0,6	-7,0 ± 2,6	83%
* inactivation totale					

Pour les deux traitements à 38°C, la différence se joue sur le temps de contact avec le CO₂ ainsi que sur la vitesse de dépressurisation. Pour le traitement ① (82 min et 30 bar/min), le CO₂ est plus efficace que l'azote qui est plus efficace que l'air. Dans le cas du traitement ② (152 min et 2 bar/min), le CO₂ est nettement plus efficace que les deux autres gaz dont l'efficacité est équivalente. La comparaison des traitements ① et ② par microorganismes permet d'affiner les conclusions. Quel que soit l'espèce considérée, le traitement ② sous CO₂ est plus efficace que le traitement ①. Comme d'après le plan d'expériences, la vitesse de dépressurisation n'a pas d'influence sur l'inactivation, c'est la durée d'exposition au CO₂ qui joue. Pour les traitements sous azote, l'efficacité entre ① et ② est similaire pour *S. cerevisiae* et *L. innocua*. En revanche pour *E. coli* le traitement ①, qui est plus court, est plus efficace. Normalement, un traitement plus long aboutit à une meilleure réduction. On en déduit donc que la vitesse de dépressurisation a une légère influence sur l'inactivation de *E. coli* sous N₂. Enfin, les traitements sous air à 38°C sont équivalents pour *E. coli* et *S. cerevisiae*. En revanche, le traitement ②, qui est plus long, offre une meilleure réduction décimale pour *L. innocua*. Dans la mesure où c'est un traitement à une

⁵ Concentration initiale en vitamine C : 1 g/L. Les vitesses de dépressurisation mentionnées ne concernent que les essais en CO₂ et en N₂. Les temps rapportés sont les temps d'exposition globale au gaz, tenant compte des étapes de pressurisation et de dépressurisation.

température proche de sa température optimale de croissance, on peut penser que c'est la durée d'exposition de *L. innocua* à la solution qui joue.

L'influence intrinsèque à la pression peut être écartée, à moins de dépressuriser rapidement (30 bar/min). En effet, si la mortalité des microorganismes était liée uniquement à un effet barométrique, les expériences menées sous N₂ seraient aussi efficaces que celles menées sous CO₂. Or, la comparaison des résultats à 38°C montre que les microorganismes sont peu affectés quand la dépressurisation est lente, alors que l'on trouve une inactivation dans les cas à 30 bar/min. Par ailleurs, l'avantage du CO₂ est bien plus net dès qu'un temps de contact plus long est pourvu (expérience à 38°C avec un temps de contact doublé) car il aboutit à une pasteurisation totale, tandis que N₂ est pratiquement sans effet.

Des conditions plus drastiques ont été imposées afin de voir s'il était tout de même possible d'inactiver totalement des microorganismes avec N₂. Les résultats sont reportés dans le Tableau 33. La durée du traitement statique a été poussée jusqu'à 2 heures pour les expériences X1 et X2 et maintenue à 75 min pour l'expérience X3.

Tableau 33 : Résultats des manipulations avec N₂ en conditions extrêmes à une vitesse de dépressurisation de 30 bar/min avec une concentration initiale en vitamine C de 1 g/L

Exp N°	T	P	D	Log (N/N ₀)			Taux de conservation vit C
	°C	bar	minutes	<i>E. coli</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>L. innocua</i>	
X1	50	180	120	-8*	-6*	-8*	95%
X2	38	180	120	0,1	-0,3	-3	100%
X3	50	180	75	-8*	-3,1	-8*	89%

* inactivation totale

Augmenter la durée statique du traitement et la pression à 38°C (expérience X2 : 2 heures – 180 bar - 38°C) n'est pas suffisant pour assurer l'inactivation totale. Une augmentation de la pression (expérience X3 : 50°C – 180 bar – 75 min à comparer avec l'expérience N₂ du Tableau 32 : 50°C - 100 bar - 75 min) permet une certaine amélioration de la réduction décimale pour les bactéries. Cependant, les levures résistent toujours à ce traitement. En revanche, une température élevée (50°C), couplée à un temps de traitement long (2 heures) et une pression importante (180 bar) permet d'atteindre une pasteurisation totale sous N₂, mais on ne peut nier qu'une grosse partie de l'effet puisse provenir de la seule température (prolongation du temps d'exposition par rapport à l'essai Air/50°C du Tableau 32 qui avait déjà donné des niveaux d'inactivation importants).

Dans l'absolu, pour assurer une comparaison pertinente, il aurait fallu pouvoir mener des expériences sous air comprimé à 100 bar et non à pression atmosphérique. Toutefois, il n'a pas été possible de les mettre en place. Le faible effet de N₂ par rapport au CO₂ pourrait provenir de sa plus faible solubilité dans l'eau (Tableau 34). Cette dernière diminue avec la température et augmente avec la pression. Selon les conditions opératoires 5 à 200 fois plus de CO₂ que de N₂ peut se dissoudre dans l'eau. Expérimentalement, aucune mousse ne se forme lors de la dépressurisation et l'échantillon n'est pas effervescent à l'ouverture du réacteur. Il est donc peu probable que de l'azote se soit dissous dans le milieu au cours du traitement. Il est donc normal que l'azote montre une efficacité très limitée en comparaison avec le CO₂.

Tableau 34 : Valeurs à pression atmosphérique des solubilités dans l'eau de certains gaz (source : <https://encyclopedia.airliquide.com>)

Gaz	T _c	P _c	Solubilité dans l'eau à 20°C	Solubilité dans l'eau à 35°C
	°C	bar	mol/L	mol/L
Air	-	-	7,9.10 ⁻⁴	5,8.10 ⁻⁴
Ar	-122	49	1,3.10 ⁻³	9,4.10 ⁻⁴
CO ₂	31	74	3,7.10 ⁻²	2,3.10 ⁻³
O ₂	-199	50	1,3.10 ⁻³	9,4.10 ⁻⁴
N ₂	-147	34	6,3.10 ⁻⁴	4,7.10 ⁻⁴

4. Impact du traitement sur la structure des microorganismes

Nous avons vu que nous parvenions à inactiver significativement les 3 microorganismes de nos solutions voire à pasteuriser dans certaines conditions. Un mécanisme qui est mis en avant pour expliquer l'effet du CO₂ est une altération de la membrane et des modifications plus profondes dans le cytoplasme cellulaire (Garcia-Gonzalez et al., 2010a; Spilimbergo et al., 2009; Tamburini et al., 2014). Les techniques de microscopie électronique à transmission (TEM) (Oulé et al., 2006; Tahiri et al., 2006) et le marquage à l'iodure de propidium permettant de visualiser en partie ces phénomènes, nous avons fait appel aux moyens techniques et à l'expertise de CBMN pour analyser les dégradations de l'ultrastructure cellulaire.

4.1. Impact sur la membrane cellulaire

Dans un premier temps, nous avons voulu savoir si la membrane des cellules était impactée par le traitement. Un marquage au iodure de propidium (PI) permet de révéler ce type de dégradation. En effet, le PI se fixe à l'ADN des cellules. Ce n'est possible que si la

membrane a été altérée, permettant ainsi au PI de pénétrer dans la cellule et de se lier à l'ADN. L'ADN marqué devient fluorescent. Une observation par microscopie à fluorescence permet donc de mettre en évidence l'altération létale pour la cellule de la membrane.

Etant donné que les solides présents dans le complément *Jambes Légères* étaient fluorescent et auraient pu nuire aux observations, le complément a été centrifugé deux fois 5 minutes à 1000 g avant d'être utilisé pour la préparation des échantillons. Par ailleurs, comme les bactéries (*E. coli* et *L. innocua*) sont d'un diamètre très faible (0,5 à 3 µm), non compatible avec des observations en microscopie optique classique, seule la souche *S. cerevisiae* (6 à 12 µm) a été ajoutée à l'échantillon. L'échantillon traité était donc composé de : 10 mL de *Jambes Légères* centrifugé, 4 mL d'acide ascorbique à 5,25 g/L, 4 mL d'acide gallique à 0,1 g/L et 3 mL de bouillon enrichi en *S. cerevisiae*. Cette solution a été soumise à un traitement de 75 minutes à 38°C et 100 bar. Un marquage au PI a été effectué sur un petit prélèvement de cette solution avant et après traitement. Les images sont reproduites sur la Figure 40.

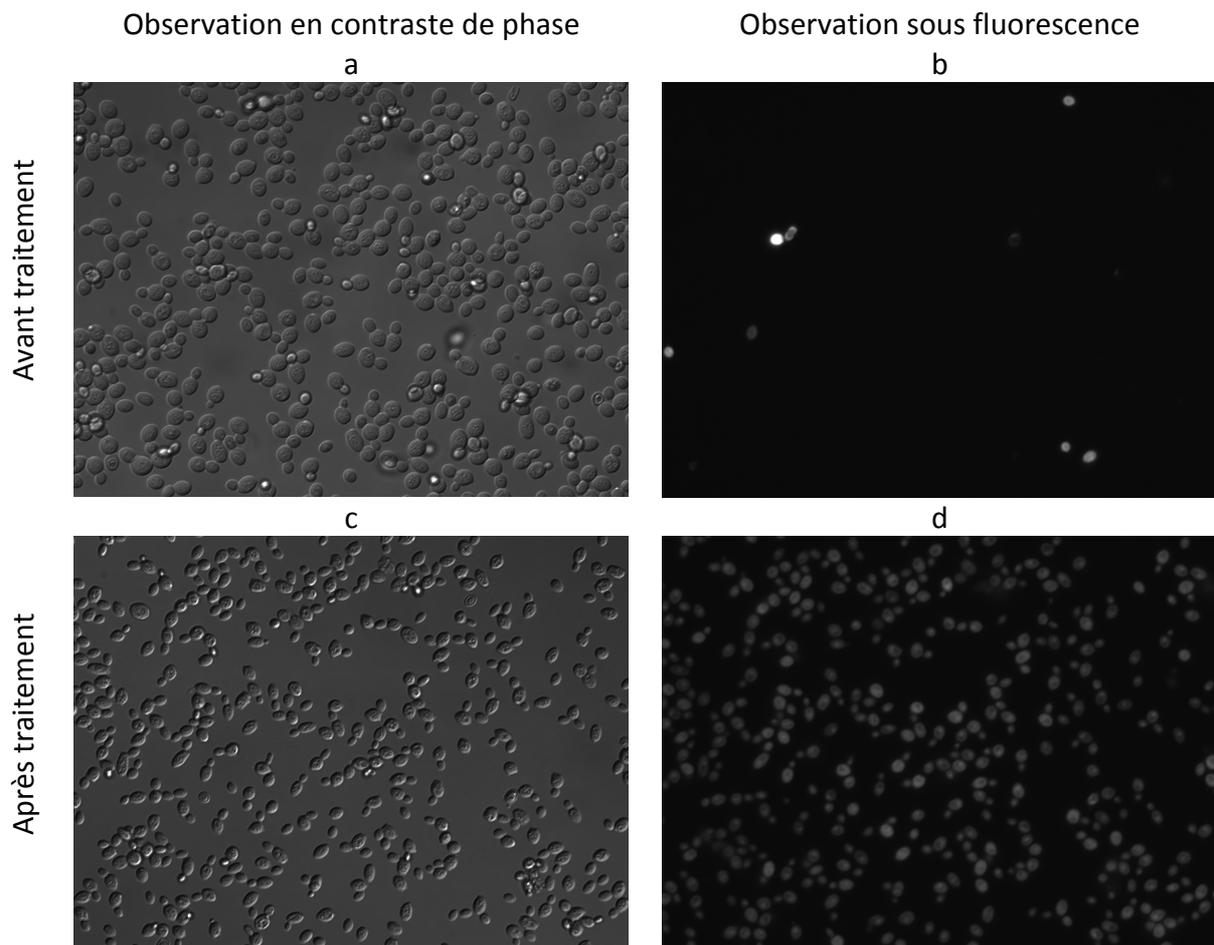


Figure 40 : Observation au microscope à fluorescence (dilution de l'échantillon préparé au 1/100 e et grossissement x60) de *S. cerevisiae* marquée au PI (a, b) avant traitement et (c, d) après un traitement de 75 minutes à 38°C et 100 bar

La comparaison directe entre les clichés (a) et (c) montre une légère évolution de la forme des levures. Après traitement, celles-ci sont plus ovales que circulaires. La différence de marquage entre les clichés (b) et (d) est très nette. Avant traitement, très peu de cellules sont marquées. Il s'agit de cellules mortes qu'il est habituel de retrouver dans un bouillon de culture. En revanche après traitement la tendance s'inverse. La comparaison minutieuse du cliché (c) avec le (d), indique que seules 15 cellules ont survécu au traitement sur les 478 présentes sur l'image. Cela correspond à une réduction de -1,5. L'action du traitement au CO₂ pressurisé est indéniable et affecte visiblement les membranes cellulaires.

4.2. Impact sur l'ultrastructure

Afin d'affiner nos conclusions et d'observer l'influence du traitement sur la morphologie des cellules, des observations au microscope électronique à transmission (TEM) ont été réalisées. Le milieu *Jambes Légères*, centrifugé deux fois 5 min à 4600 rpm, enrichi de vitamine C et d'acide gallique et contaminé avec nos 3 souches a été soumis au traitement décrit dans la partie 3.

Deux échantillons ayant subi des traitements au CO₂ d'intensités différentes ont été comparés à la référence avant traitement. Le premier échantillon a été traité 75 min à 38°C et 100 bar aboutissant à une inactivation partielle, tandis que le deuxième a subi un traitement de 75 min à 50°C et 100 bar permettant d'atteindre une pasteurisation totale. Un troisième échantillon obtenu à l'issue d'un traitement sous N₂ partiellement efficace a été aussi examiné (traitement de 50°C, 100 bar, 75 min).

4.2.1. Echantillons traités sous CO₂

La Figure 41 montre les échantillons dans leur ensemble, avant de se focaliser plus précisément sur les souches étudiées à travers la Figure 42. Il n'est pas possible de distinguer les cellules *Listeria* des cellules *Escherichia* sur les clichés, dans la mesure où ce sont deux bacilles.

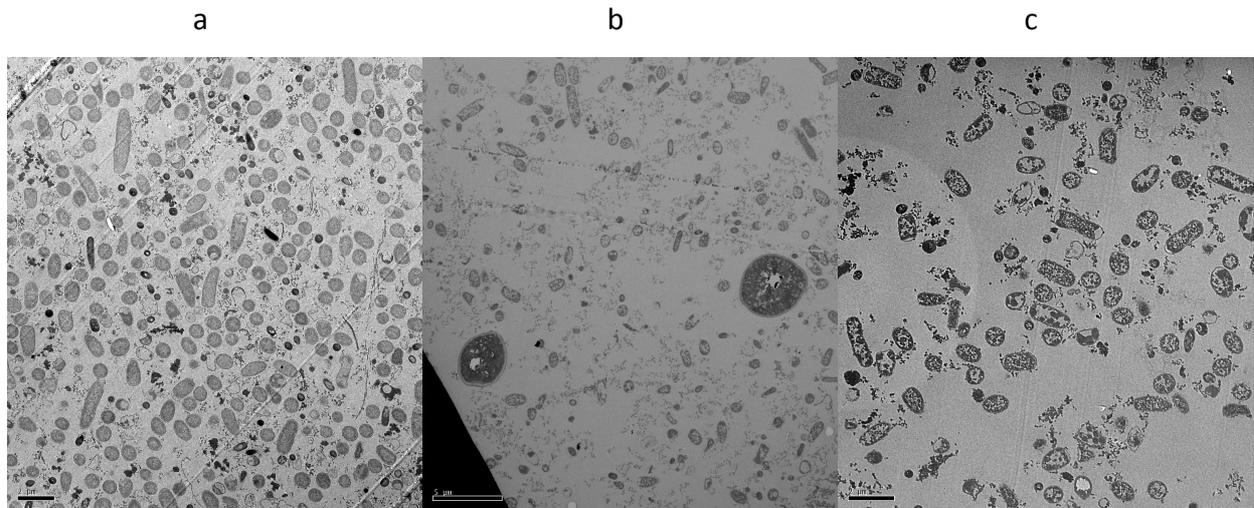


Figure 41 : Aspect global au TEM des échantillons traités (a) avant traitement, (b) après un traitement de 75 min à 38°C et 100 bar et (c) un traitement de 75 min à 50°C et 100bar

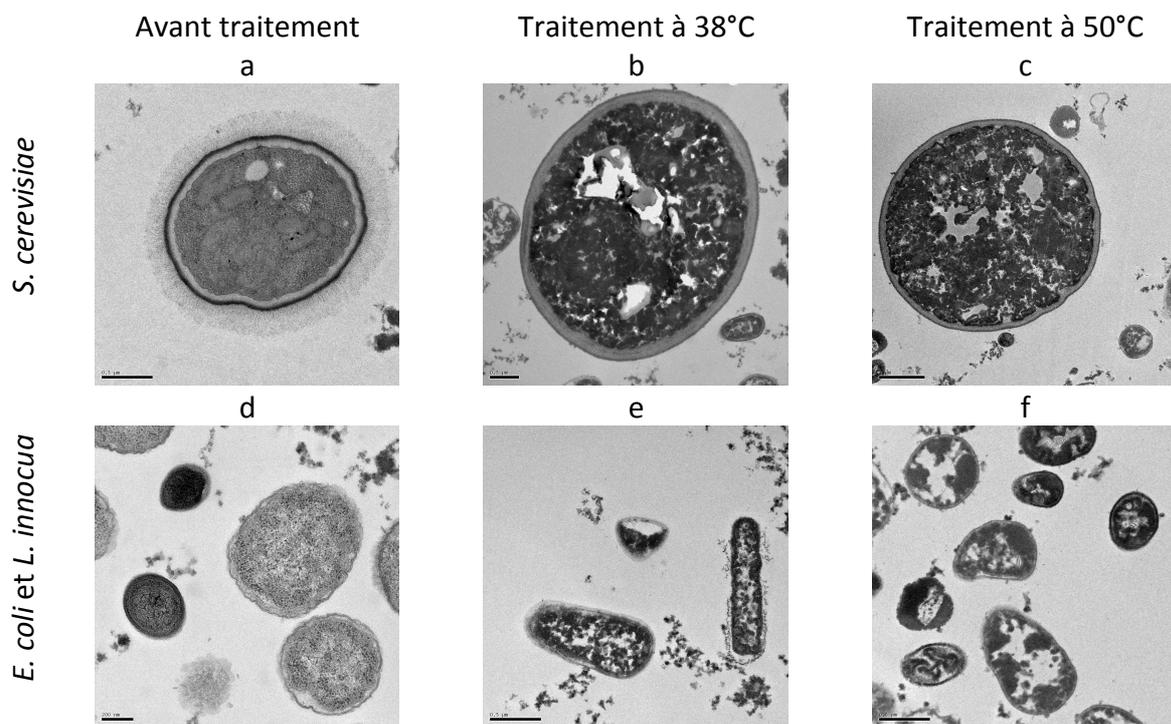


Figure 42 : Aspect au TEM avant traitement de *S. cerevisiae* (a) et *E. coli* et *L. innocua* (d), aspect après un traitement de 75 min à 38°C et 100 bar de *S. cerevisiae* (b) et *L. innocua* (e) et aspect après un traitement de 75 min à 50°C et 100 bar de *S. cerevisiae* (c) et *E. coli* et *L. innocua* (f)

Avant traitement, la solution présente de nombreux débris et des microorganismes au contenu cellulaire clair et homogène. L'espèce *S. cerevisiae* se présente par exemple sous la forme d'une cellule de forme circulaire parfois entourée d'une couronne de « cheveux » (cliché a de la Figure 42). Sa membrane se distingue nettement par un trait noir épais. Le cytoplasme présente une couleur homogène. Des organites ainsi qu'une certaine forme d'organisation sont repérables dans la masse. Après traitement, les cellules conservent leur

forme circulaire ou allongée selon la coupe mais leur cytoplasme montre des disparités et semble particulièrement inhomogène. Aucune cellule éclatée n'est particulièrement visible, réfutant ainsi l'hypothèse d'un éclatement des cellules lié à la détente du CO₂ au cours de la dépressurisation. Il n'y a pas de différence notable d'aspect entre les deux traitements. Toutes les cellules impactées le sont de la même manière et présentent le même type de dégradations. Bien que la membrane des cellules soit intègre, elle semble plus fine. L'ultrastructure est particulièrement affectée et présente une dégradation généralisée. Le cytoplasme apparaît noir, totalement désorganisé et inhomogène. Il semble agrégé au sein de la cellule.

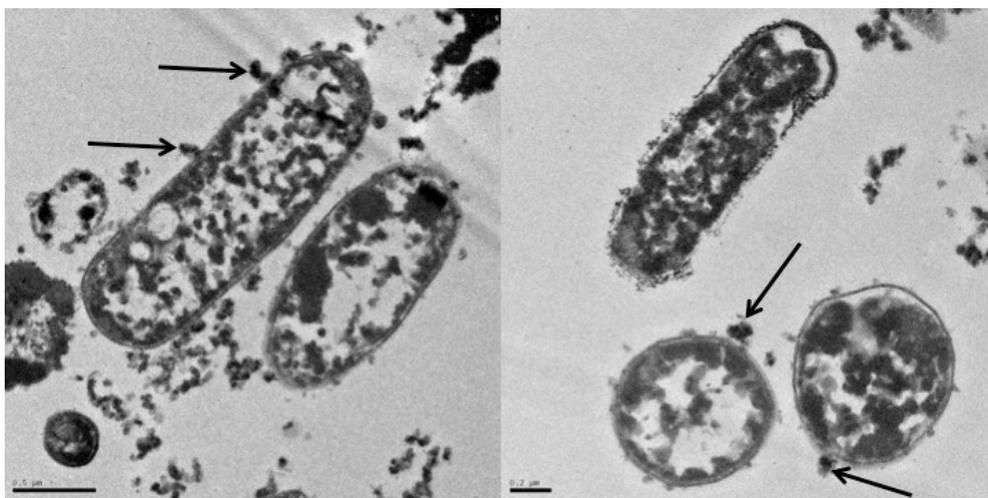


Figure 43 : Clichés TEM de cellules type *E. coli* ou *L. innocua* traitées 75 min à 50°C et 100 bar. Les flèches représentent le cytoplasme fuyant à travers des pores dans la paroi cellulaire

(Garcia-Gonzalez et al., 2010a) ont observé des résultats similaires sur *E. coli*, *S. cerevisiae* et *L. monocytogenes* après un traitement de 60 min à 45°C et 210 bar. Ils ont notamment remarqué des changements de la distribution du cytoplasme ainsi qu'une perte en densité. Ils observent des cellules ayant la même allure que celles présentées sur la Figure 43. Ils observent des « excroissances » sur le pourtour des cellules et les interprètent comme du cytoplasme qui s'échappe à travers des micropores apparus au cours du traitement. Ces mêmes excroissances sont observées sur nos clichés et sont désignées par les flèches. Ces observations vont dans le sens d'un mécanisme où le CO₂ pressurisé compromet l'intégrité de la membrane et rend les cellules perméables, rendant ainsi possible l'extraction du matériel cellulaire. De tels clichés permettent également de prouver que le traitement au CO₂ pressurisé altère considérablement la structure interne de la cellule. Le matériel cellulaire est clairement endommagé. Cependant devant l'intégrité des cellules observées, l'hypothèse de la rupture mécanique des cellules peut être repoussée, bien que certains

auteurs (Oulé et al., 2006) aient observé des fractures au niveau des membranes de souches type *E. coli*. Des études ultérieures (Tamburini et al., 2014, 2013) sont venues confirmer par d'autres techniques (marquage bicolore des cellules et suivi par RMN des phospholipides membranaires) la perméabilisation et les modifications de la membrane induites par le CO₂ pressurisé.

4.2.2. Echantillon traité sous N₂

Un échantillon ayant subi un traitement de 75 min à 50°C et sous 100 bar de N₂ a été comparé à la référence avant traitement (Figure 44). Ce traitement n'aboutit pas à une pasteurisation totale ($-4,2 \pm 1,2$, $-4,1 \pm 1,2$, $-6,1 \pm 2,4$ pour *E. coli*, *S. cerevisiae* et *L. innocua* respectivement).

Les cellules présentent le même aspect qu'après un traitement au CO₂ pressurisé. Dans la mesure où le N₂ est très peu soluble dans un milieu aqueux, il a difficilement pu diffuser à travers les cellules pour engendrer de telles altérations. Les dégradations observées sont donc plus probablement liées à la température qu'à l'action du CO₂ ou du N₂. En comparant ces clichés à ceux du traitement à 38°C (clichés b et e de la Figure 42), on en conclue que le CO₂ génère le même type de dégradation que la température.

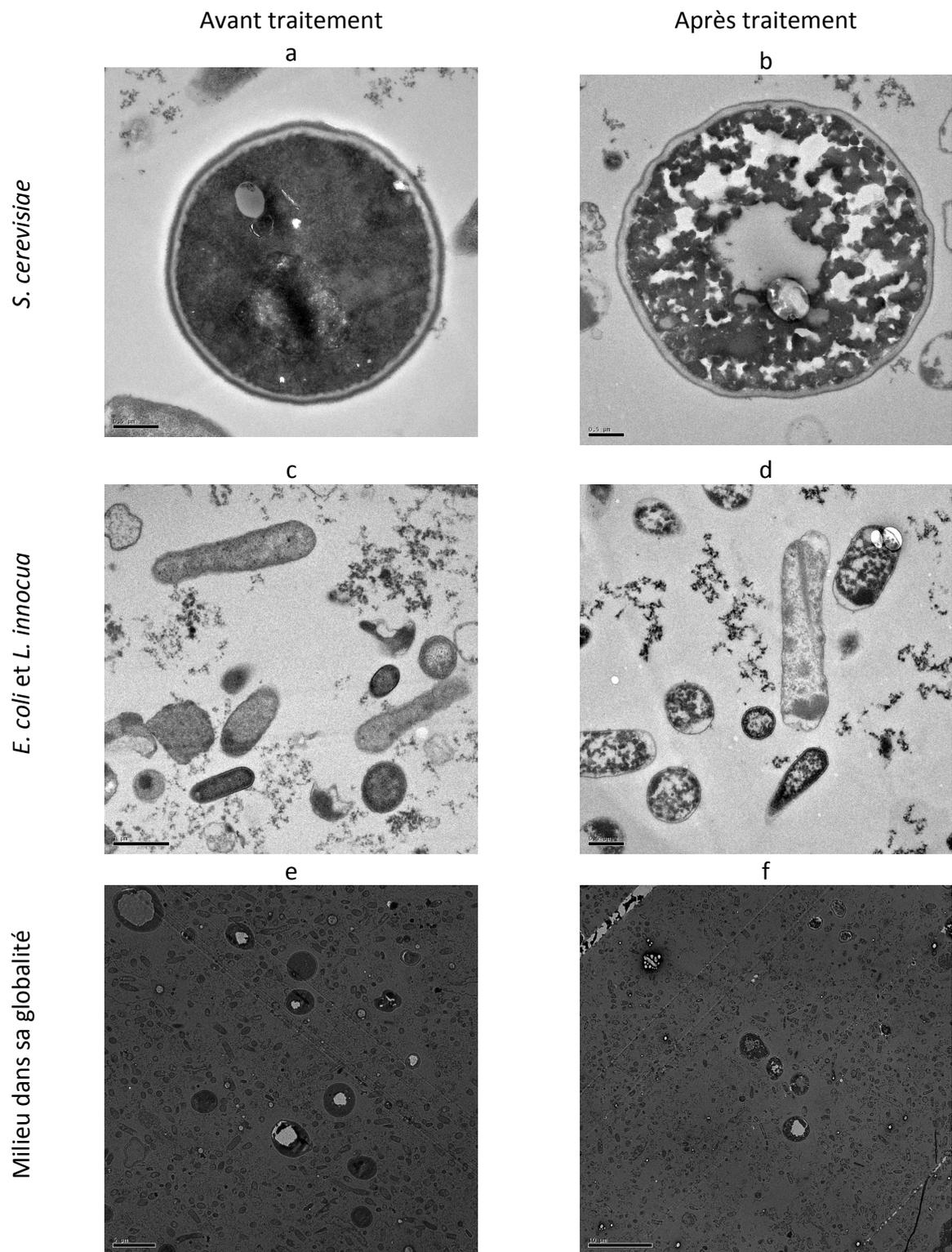


Figure 44 : Aspect au TEM d'une solution de *Jambes Légères* après un traitement de 75 min à 50°C et 100 bar de N₂

5. Mise en évidence de l'effet conjoint T / pH

Les résultats expérimentaux ont montré que dans le complément alimentaire *Jambes Légères*, caractérisé par un pH naturellement acide, un traitement thermique d'au moins

50 minutes même sans CO₂ (essais Air du Tableau 32) conduit à l'inactivation, alors qu'à 38°C, le CO₂ a effectivement un effet pasteurisateur que n'a pas la seule température.

Dans l'idée de mettre en évidence cette relation pH/T, nous avons conduit des essais à pression atmosphérique à 38°C et 50°C sur du *Jambes Légères* amené à un pH légèrement acide de 6 par ajout de soude. Les essais sont réalisés toujours dans le réacteur, à l'étuve, pendant une durée totale donnée, en subissant le même historique que les essais Air du Tableau 32. Deux essais sous CO₂ à 50°C – 100 bar et à 38°C - 100 bar sur *Jambes Légères* à pH 6 ont été réalisés pour mettre en évidence le rôle du CO₂. Le Tableau 35 résume les résultats obtenus au cours de ces expériences. Au cours du traitement au CO₂ pressurisé, le pH du milieu *Jambes Légères* ajusté à 6 chute à 5,3. Dans le cas du *Jambes Légères* original, le pH reste stable autour de 3,7.

Tableau 35 : Influence du couple température / pH sur l'inactivation dans le milieu *Jambes Légères* soit à son pH naturel de 4, soit avec son pH ajusté à 6

	CO ₂			AIR		
	Log (N/N ₀)			Log (N/N ₀)		
	<i>E. coli</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>L. innocua</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>L. innocua</i>
38°C – 100 bar - 75 min						
pH 4	-3,2 ± 0,6	-2,2 ± 1,0	-7,0 ± 1,7	0,5	-0,2	-0,9
pH 6	-3,9	-2,9	-4,0	-0,6	-0,04	-0,4
50°C - 100 bar - 75 min						
pH 4	-8,2* ± 1,1	-6,1* ± 1,3	-7,5* ± 0,7	-6,3 ± 2,3	-4,7 ± 1,5	-7,8* ± 0,5
pH 6	-3,6	-6,7*	-3,9	<-2,1	-6,8*	<-2,7
* inactivation totale						

Les expériences sous 50°C aboutissent à des réductions décimales supérieures à celles sous 38°C, que le traitement ait eu lieu sous CO₂ ou air, à pH 4 ou 6. On constate que les expériences sur le milieu à pH 6 sont moins efficaces en terme d'inactivation que celle à pH 4. Si cette tendance est moins marquée à 38°C, l'écart est très net à 50°C. On observe presque 4 log de différence pour *E. coli* dans le *Jambes Légères* à pH 4 et celui à pH 6, à la fois sous air et sous CO₂. Il y a donc une synergie entre le pH et la température. Toutefois à 38°C, condition favorable à la croissance des microorganismes, l'effet du CO₂ sur la destruction des microorganismes est important par comparaison aux résultats obtenus avec de l'air. Les expériences sous air n'entraînent presque pas de réduction de la population. En revanche, le CO₂ permet d'atteindre des niveaux de réduction de l'ordre de -3 pour *S. cerevisiae* et de -4 pour *E. coli* et *L. innocua*. Le CO₂ introduit donc un réel avantage par

rapport à un traitement uniquement thermique. Cet effet est moins significatif à 50°C où l'inactivation thermique est plus importante que celle liée au CO₂. Ainsi toutes les expériences menées à 38°C et 100 bar de CO₂ reflètent bien l'action du CO₂ en lui même et non un éventuel effet thermique.

Des expériences avec un temps de contact équivalent à 50°C et dans un milieu à pH 4 en Air et en CO₂ ont été menées afin de quantifier la contribution du CO₂ dans le cas où l'effet du pH est plus marqué. Le Tableau 36 regroupe ces résultats.

Sur une durée de traitement de 75 min, en considérant les écarts-types, les réductions décimales en air et en CO₂ sont similaires. Toutefois, le CO₂ permet une inactivation totale ce qui n'est pas le cas avec l'air. En revanche, sur un temps d'exposition plus court au CO₂ (30 min), les résultats sous CO₂ sont meilleurs d'au moins 3 log pour *E. coli* et 1 log pour *S. cerevisiae* qu'avec l'air. Ainsi malgré la forte interaction pH-température qui contribue de manière sensible à l'inactivation, celle-ci n'est pas suffisante pour expliquer les niveaux d'inactivation obtenus lors d'un traitement sous CO₂ dans les mêmes conditions. Le CO₂ reste donc le principal moteur de l'inactivation, même à 50°C et dans un milieu de pH 4.

Tableau 36 : Apport du CO₂ par rapport à l'air sur un traitement à 50°C dans du Jambes Légères à pH 4 selon la durée du traitement

		CO ₂			AIR		
P	V _d	Log (N/N ₀)			Log (N/N ₀)		
bar	bar/min	<i>E. coli</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>L. innocua</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>L. innocua</i>
Temps court de 30 min							
50	10	-4,9 ± 0,1	-3,2 ± 0,7	-9*			
50	50	-3,9	-2,6	-7*	-1,1	-1,4	-6,1
150	10	-5,4	-3,2	-7*			
150	50	-8*	-5*	-7*			
Temps moyen de 75 min							
100	30	-8,2* ± 1,1	-6,1* ± 1,3	-7,5* ± 0,7	-6,3 ± 2,3	-4,7 ± 1,5	-7,8* ± 0,5
* inactivation totale							

6. Conclusion

La méthodologie du plan d'expériences de type composite centré couplé à l'analyse statistique a permis :

- d'évaluer les facteurs influents
- de hiérarchiser leur importance
- de trouver des conditions de pasteurisation efficaces.

Nous avons mis en évidence l'importance prépondérante de la température, ainsi que celle un peu moindre de la pression et d'une interaction entre la pression et la durée du traitement qui permet d'améliorer l'inactivation lorsque les températures de traitement sont modérées. La vitesse de dépressurisation ne joue pas un rôle significatif sur l'inactivation. Fragmenter le temps d'exposition en imposant des retours à des niveaux de pression inférieure n'a pas conduit à une amélioration sensible de l'inactivation.

La température et l'acidité naturelle du complément alimentaire se conjuguent pour contribuer à l'inactivation. Le CO₂ joue un rôle actif dans les conditions de 38°C où les microorganismes ne sont pas inactivés par l'effet thermique. A 50°C, le CO₂ amène un gain non négligeable sur l'inactivation quand les temps d'exposition sont courts (30 min). Mais, dans la mesure où un contact de 75 min à 50°C en air avec une solution de pH 4 suffit pour obtenir l'inactivation totale des microorganismes, le gain amené par le CO₂ n'est pas viable dans une logique industrielle de pasteurisation, notamment au regard des coûts d'investissements de la technique. Mais dans le cas d'une stérilisation, ces conditions pourraient apporter un plus.

Enfin, la littérature fait aussi état de résultats intéressants obtenus dans des conditions plus douces. Spilimbergo et Mantoan (2005) ont accompli une pasteurisation totale de *S. cerevisiae* dans du jus de pomme après un traitement de 5 minutes à 36°C et 100 bar. Les facteurs que nous avons étudiés ne suffisent pas à expliquer que ces auteurs aient pu obtenir des niveaux de réduction meilleurs en procédant dans des conditions plus modérées que celles prédites par notre plan d'expériences. On s'interroge alors sur l'efficacité du contact entre le CO₂ et les micro-organismes dans notre réacteur.

Chapitre 3 : Analyse de la pasteurisation sous l'angle des temps caractéristiques et des transferts de matière

Il est difficile de rationaliser les niveaux de décontamination reportés dans la littérature tant les dispositifs, les milieux à traiter et les niveaux de contamination initiale sont différents. Si les variations des différents paramètres étudiés au chapitre précédent ont permis d'atteindre un certain degré d'inactivation, il n'en demeure pas moins que nous sommes loin de cas extrêmes reportés (Ferrentino et al., 2009; Shimoda et al., 2006; Spilimbergo and Mantoan, 2005) qui affichent une inactivation importante de *E. coli* et *S. cerevisiae* même dans des conditions de 38°C, 60 bar et des temps de contact inférieurs à 20 min. Nous nous sommes interrogés sur l'efficacité de notre propre dispositif. Nous avons entrepris cette analyse en nous appuyant sur des nombres adimensionnels et la théorie des contacteurs gaz-liquide de manière à :

- évaluer le temps caractéristique du transfert de CO₂ via la grandeur $k_L a$ en solution aqueuse ;
- évaluer la cinétique de dissolution du CO₂ ;
- caractériser et comparer l'efficacité de différents dispositifs.

Sommaire du chapitre 3

1. Relation entre les mécanismes d'inactivation et la diffusion du CO₂ dans le milieu ..	205
2. Grandeurs caractéristiques liées au transfert de masse du CO₂	208
2.1. Flux à l'interface	208
2.2. Nombres et grandeurs caractéristiques d'un réacteur agité	210
2.3. Paramètres physico-chimiques invariants.....	212
2.4. Influence du choix de la corrélation sur la cinétique de dissolution estimée	214
2.5. Etude de sensibilité	217
2.5.1. <i>Effet des caractéristiques du liquide</i>	217
2.5.1.8. Masse volumique	217
2.5.1.9. Viscosité	218
2.5.1.10. Tension interfaciale	219
2.5.2. <i>Volume de liquide traité</i>	220
2.5.3. <i>Concentration à saturation</i>	221
2.5.1. <i>Débit de CO₂</i>	222
2.5.2. <i>Cas extrêmes</i>	223
3. Les dispositifs batch	224
3.1. Caractéristiques des deux dispositifs batch	224
3.2. Dispositif de pasteurisation (petit batch de 50 mL)	224
3.3. Dispositif GAS (grand batch).....	228
3.3.1. <i>Caractérisation du grand batch</i>	228
3.3.2. <i>Choix du modèle et impact sur les temps caractéristiques</i>	230
3.3.3. <i>Effet du dispositif sur la pasteurisation</i>	232
4. Miniréacteur continu	234
4.1. Caractérisation du dispositif continu.....	234
4.2. Simulation numérique.....	235
4.3. Influence de la surface d'échange, comparaison avec les dispositifs batch.....	236
4.4. Intérêt du ratio CO ₂ /échantillon.....	238
5. Conclusion	239

1. Relation entre les mécanismes d'inactivation et la diffusion du CO₂ dans le milieu

Reprenons le schéma proposé par Garcia-Gonzalez et al. (2009a) qui illustre les différents mécanismes susceptibles de contribuer à l'inactivation par le CO₂ pressurisé (Figure 45). La condition première pour que tous ces mécanismes se mettent en place est que du CO₂ se dissolve dans la phase aqueuse. Or la concentration du CO₂ en phase aqueuse (c_{CO_2}), est tributaire à la fois de la thermodynamique et de la cinétique du transfert à l'interface gaz-liquide. Une fois le CO₂ dissous dans le milieu, il réagit avec l'eau pour donner l'acide carbonique et les carbonates associés (STEP 1) et/ou diffuse dans le milieu extracellulaire, puis dans le milieu intracellulaire où à nouveau diverses réactions prennent place.

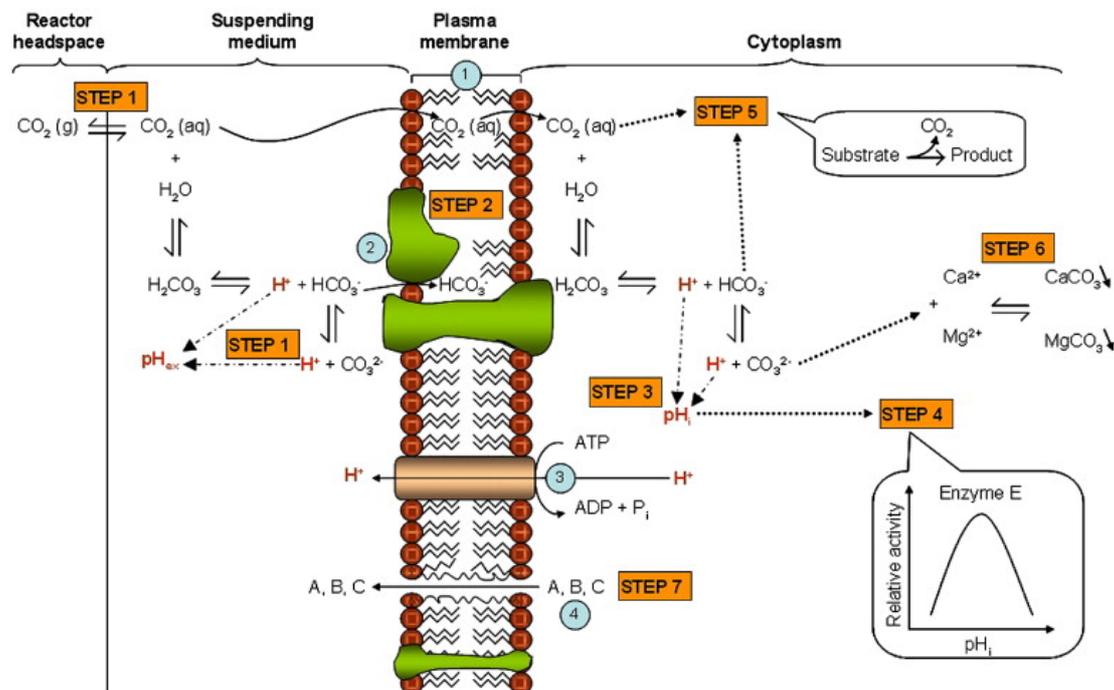


Figure 45 : Schéma des différentes étapes du mécanisme d'inactivation par CO₂ pressurisé proposées par Garcia-Gonzalez et al. (2007)

Si l'on raisonne en terme de transfert de matière, le processus peut se décomposer en une succession d'étapes et de résistances à franchir comme l'a présenté Garcia-Ochoa et Gomez (2009) (Figure 46) dans le cas de l'oxygénation d'un bioréacteur. Ces résistances sont caractérisées par des coefficients de transfert k_i où i désigne une certaine phase ($i = G$ pour gaz, $i = L$ pour liquide, $i = S$ pour solide).

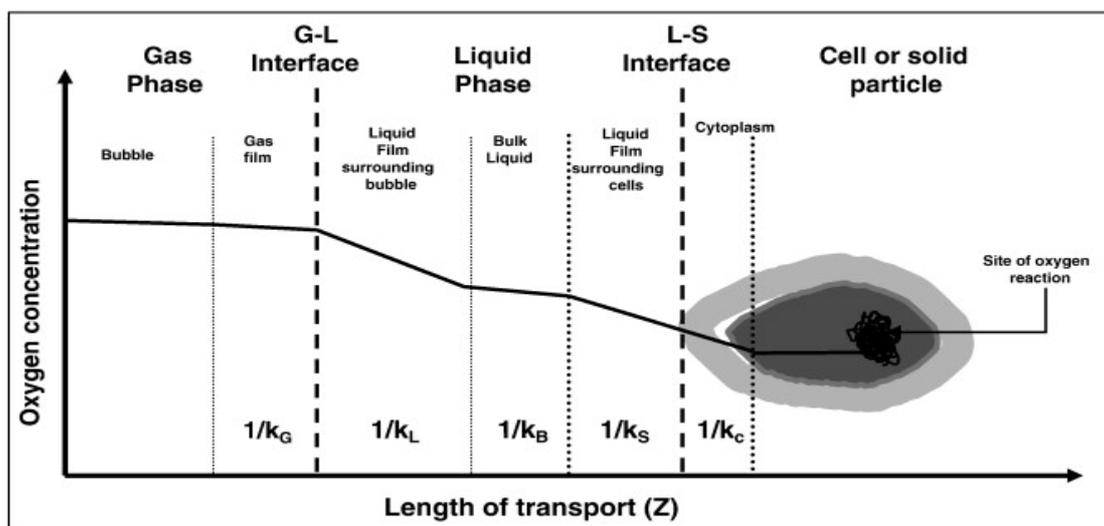


Figure 46 : Représentation schématique du chemin parcouru par l'oxygène afin de le transférer de la bulle à la cellule. Extrait de (2009)

Nous avons extrapolé cette manière de représenter les mécanismes au cas du CO₂ pressurisé, qui chemine de la phase gaz vers le microorganisme. Idéalement, il faudrait établir les temps caractéristiques de chacune des étapes afin de déduire l'étape limitante et ainsi agir sur les paramètres la contrôlant pour augmenter l'efficacité globale de la pasteurisation. L'objectif ici est plutôt de donner des éléments de réflexion pour mieux comprendre notre dispositif.

On peut néanmoins s'interroger sur les ordres de grandeurs des différents transferts. D'une façon générale, un temps de diffusion t_D (s) en l'absence de toute agitation, est représenté par une loi de type :

$$t_D = \frac{x^2}{D_{CO_2}} \quad (25)$$

x (m) étant une longueur caractéristique sur laquelle s'effectue la diffusion et D_{CO_2} (m²/s) le coefficient de diffusion moléculaire. En prenant un D_{CO_2} de l'ordre de 10⁻⁹ m²/s pour le CO₂ dans de l'eau pure, et un x de 4 cm correspondant à la hauteur du liquide dans notre réacteur batch, on aurait un temps de diffusion de l'ordre de 16.10⁵ secondes, soit plus de 18 jours. Agiter, chauffer, disperser le CO₂ dans la phase aqueuse permettent de réduire ce temps.

Pour la réaction du CO₂ avec l'eau conduisant à la formation de H₂CO₃ et de les réactions de décomposition suivantes (formation de HCO₃⁻ et CO₃²⁻, STEP 1 de la Figure 45), c'est la formation de l'acide carbonique (H₂CO₃) qui est la plus lente, avec un temps caractéristique de l'ordre de 0,05 seconde selon Van Eldik et Palmer (1982).

Le temps de diffusion à travers la membrane et les réactions au sein du compartiment intracellulaire sont plus difficiles à évaluer en tant que tels. La croissance des microorganismes nécessite, pour chaque espèce, des conditions optimales. Tout changement de ces conditions, que ce soit en termes de température, de présence d'acide faible, de pH bas etc... induit un stress. Selon l'importance de ce changement, le microorganisme pourra se développer plus lentement, cesser toute croissance voire être tué. La plupart des bactéries sont capables de tolérer des petits changements de leur environnement et de s'adapter progressivement à ces conditions nouvelles. L'échelle d'adaptation est variable et évolue de la minute à la journée. Les acides faibles, comme celui généré par la dissolution du CO₂, pénètrent facilement les membranes des cellules. De manière générale, on s'est aperçu que les bactéries Gram (-) sont plus résistantes aux acides faibles. Certaines espèces de *E. coli*, comme les O157 : H7 sont très réputées pour leur adaptabilité (Beales, 2004). Elles peuvent devenir acido-résistantes en l'espace de 17 min (Jonge et al., 2003). A l'inverse, une population de *L. monocytogenes* meurt en l'espace de 40 min à pH 3,5. En revanche, si la chute de pH s'effectue progressivement (par exemple avec un passage de 90 min dans une solution à pH 5 avant passage à pH 3,5) une population composée de la même souche confrontée à une solution de pH 3,5 sera résistante (Hill et al., 1995). Spilimbergo et al. (2009) ont comparé les vitesses d'inactivation et de perméabilisation de membrane dans le cas d'un traitement batch par CO₂ à 36°C et 100 bar, sous une agitation de 500 rpm. La perméabilisation des cellules intervient à partir de 5,4 min contre 10,1 min pour l'inactivation. Cela signifierait que les dégâts initiaux sur la membrane cellulaire ne sont pas létaux pour les cellules et que le CO₂ met un certain temps avant d'impacter significativement les membranes.

Le temps nécessaire à l'inactivation est déterminé par l'étape limitante correspondant à la phase au temps caractéristique le plus long. La diffusion du CO₂ et, d'une façon plus générale, son transfert à travers l'interface gaz-liquide peuvent donc contribuer de façon sensible à l'inactivation.

Dans notre étude, nous allons essayer de déterminer les temps caractéristiques associés à la diffusion du CO₂ afin de comprendre plus en détail le fonctionnement de notre système. Notre étude est basée sur une étude analogue, proposée par Hofland et al. (2003), qui s'intéressait à la précipitation de la caséine sous l'effet de l'acidité induite par l'introduction

de CO₂. Nous nous en sommes inspirés, notamment pour le choix des corrélations à utiliser. Les conditions de traitement pour lesquelles les temps caractéristiques sont évalués sont celles du point médian du plan d'expériences, à savoir 38°C, 100 bar et 75 min de contact. L'analyse que nous nous proposons de faire a aussi été appliquée sur un autre dispositif batch caractérisé par un réacteur de plus grandes dimensions et un mobile d'agitation plus classique de type turbine Rushton, et par la mise au point d'un mini dispositif continu.

2. Grandeurs caractéristiques liées au transfert de masse du CO₂

2.1. Flux à l'interface

En s'appuyant sur les travaux de Hofland et al. (2009), on peut établir que de manière générale, la quantité de CO₂ transférée entre deux phases est décrite par une loi de type (Roustan et al., 1999) :

$$\frac{dc_{CO_2}}{dt} = k_L a (c_{CO_2}^* - c_{CO_2}) \quad (26)$$

où $c_{CO_2}^*$ (mol/m³) est la concentration à l'équilibre du CO₂ dans le milieu, c'est-à-dire la concentration qu'on pourrait obtenir après un temps infini, k_L (m/s) est le coefficient de transfert massique côté liquide et a (m²/m³) est la surface interfaciale d'échange. L'intégration de (25) conduit à l'expression :

$$c_{CO_2}^* - c_{CO_2}(t) = (c_{CO_2}^* - c_{CO_2}^0). e^{-k_L a t} \quad (27)$$

où $c_{CO_2}^0$ (mol/m³) est la concentration de CO₂ dissous à $t = 0$. La concentration en CO₂ de la phase aqueuse dépend d'une part de sa valeur à l'équilibre ($c_{CO_2}^*$) et du coefficient de transfert $k_L a$, qui pour un contact gaz-liquide agité va être tributaire des conditions d'agitation et des propriétés des milieux. Le temps caractéristique t_{tr} (s) du transfert du CO₂ de la phase gaz vers la phase liquide est donné par la relation suivante :

$$t_{tr} = \frac{1}{k_L \cdot a} \quad (28)$$

En l'absence de détermination expérimentale, le coefficient de transfert $k_L a$ est estimé à partir de corrélations permettant, soit de déterminer $k_L a$ directement, soit d'estimer séparément k_L et a . Les corrélations de Calderbank (1958), fréquemment utilisées dans le cas de grosses bulles, proposent d'évaluer k_L et a selon les relations:

$$k_L = 0,42. \left(\frac{\eta_L}{\rho_L D_{CO_2}} \right)^{-0,5} \left(\frac{(\rho_L - \rho_G) \cdot \eta_L g}{\rho_L^2} \right)^{0,33} \quad (29)$$

$$a = 1,44. \frac{\rho_L^{0,2}}{\sigma^{0,6}} \left(\frac{P_G}{V_L} \right)^{0,4} \left(\frac{u_s}{u_G} \right)^{0,5} \left(\frac{\rho_G}{\rho_L} \right)^{0,16} \quad (30)$$

avec σ (N/m) la tension interfaciale entre le gaz et le milieu, ρ (kg/m³) la masse volumique soit du liquide (indice L) soit du gaz (indice G), η_L (Pa.s) la viscosité du liquide, V_L (m³) le volume de liquide traité, g l'accélération de la pesanteur qui vaut 9,81 m.s⁻², P_G (W) la puissance dispensée par l'agitateur en présence de gaz, u_s (m/s) est la vitesse superficielle du gaz, donnée par $u_s = Q_G/S$ (12), Q_G (m³/s) étant le débit volumique du CO₂ et S (m²) la section de la cuve, u_G (m/s) la vitesse terminale d'une bulle de gaz seule (cette valeur est souvent prise égale à 0,265 m/s (Sridhar and Potter, 1980)).

D'autres corrélations permettent d'estimer le $k_L a$ dans sa globalité. Nous avons retenu l'expression développée par Van't Riet (1979) décrivant un réacteur agité :

$$k_L a = 2,6. 10^{-2} \left(\frac{P_G}{V_L} \right)^{0,4} \cdot u_s^{0,5} \quad (31)$$

Ce coefficient a également été estimé par la corrélation issue des travaux de Ferreira et al. (2010) qui permet de caractériser le transfert de masse dans le cas d'une colonne de bulles :

$$k_L a = 3372,2. u_s^{0,87} \cdot \eta_L^{-0,24} \sqrt{\frac{D_{CO_2}}{\pi}} \sqrt{\frac{u_s g}{\eta_L}} \quad (32)$$

Comme indiqué par l'équation (27), le flux de CO₂ transféré dépend de la concentration à l'équilibre, $c_{CO_2}^*$. Nous avons utilisé les travaux de Diamond et Akinfiyev (2003), qui utilisent un modèle dérivant d'une correction empirique de la loi de Henry, pour déterminer la fraction molaire (x_{CO_2}) du CO₂ dissous dans l'eau pure. Cette valeur a ensuite été convertie en concentration de CO₂ à l'équilibre par les formules suivantes :

$$x_{CO_2} = \frac{n_{CO_2}}{n_{total}} = \frac{n_{CO_2}}{n_{CO_2} + n_L} \quad (33)$$

$$\text{d'ou } n_{CO_2} = \frac{x_{CO_2}}{1-x_{CO_2}} n_L = c_{CO_2}^* \cdot V_L \quad (34)$$

$$\text{or } n_L = \frac{\rho_L V_L}{M_L} \quad (35)$$

$$\text{donc } c_{CO_2}^* = \frac{x_{CO_2}}{1-x_{CO_2}} \frac{\rho_L}{M_L} \quad (36)$$

avec M_L (kg/mol) masse molaire du liquide. Dans la mesure où nous assimilons *Jambes Légères* à de l'eau pure, nous prenons $M_L = 18.10^3$ kg/mol. La concentration à l'équilibre $c_{CO_2}^*$ dans notre milieu *Jambes Légères* sera assimilée à la concentration à saturation du CO_2 dans l'eau pure. En effet, les solutés présents dans le milieu peuvent affecter la solubilité du CO_2 , comme montré par Ferrentino et al. (2009) sur du jus de pamplemousse ($c_{CO_2}^*$ de 4 g $_{CO_2}$ /100g $_{jus}$ contre 5,5 g $_{CO_2}$ /100g $_{eau}$). Néanmoins, ne pouvant déterminer expérimentalement cette valeur, nous l'assimilerons à celle obtenue dans l'eau pure.

2.2. Nombres et grandeurs caractéristiques d'un réacteur agité

L'agitation au sein d'un réacteur se définit par un régime d'écoulement (laminaire, intermédiaire ou turbulent) et dans le cas d'un contacteur gaz-liquide intervient la notion supplémentaire de régime de fonctionnement (engorgement, chargement ou dispersion complète, Figure 47). Ces deux propriétés sont caractérisées par des nombres adimensionnels.

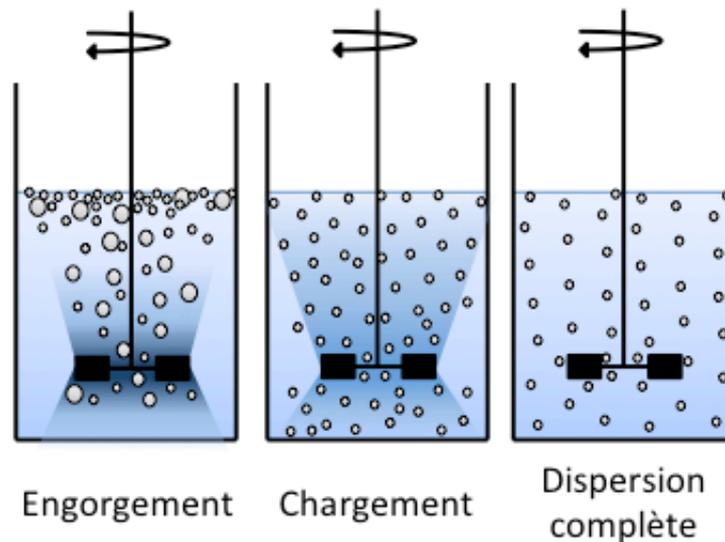


Figure 47 : Représentation des régimes de fonctionnement selon la vitesse de rotation (de gauche à droite : $N \nearrow$ pour un Q_G fixé et $Q_G \searrow$ pour N fixé)

Le type d'écoulement est décrit par le nombre de Reynolds :

$$Re = \frac{N d^2}{\nu_L} \text{ où } \nu_L = \frac{\eta_L}{\rho_L} \quad (37)$$

où N (s^{-1}) est la vitesse de rotation du mobile et d (m) le diamètre de l'agitateur. Il différencie un écoulement laminaire ($Re < 10$), d'un écoulement intermédiaire ($10 < Re < 10000$) et d'un écoulement turbulent ($Re > 10000$). Ces intervalles peuvent varier selon le type de mobile

d'agitation étudié. Deux nombres adimensionnels permettent de définir le régime de fonctionnement :

- le nombre de Froude :

$$Fr = \frac{N^2 \cdot d}{g} \quad (38)$$

- le nombre d'aération :

$$Na = \frac{Q_G}{N \cdot d^3} \quad (39)$$

La limite entre l'engorgement et le chargement est décrite par la relation :

$$Na_{e/c} = 30 \cdot Fr \cdot \left(\frac{d}{D}\right)^{3,5} \quad (40)$$

où D (m) est le diamètre du réacteur. La limite entre le chargement et la dispersion est donnée par la relation :

$$Na_{c/d} = 0,2 \cdot Fr^{0,5} \cdot \left(\frac{d}{D}\right)^{0,5} \quad (41)$$

Le type de régime est déduit de la comparaison entre le Na calculé à partir des conditions expérimentales et le $Na_{e/c}$ et $Na_{c/d}$.

En agitation, la puissance dissipée par l'agitateur P (W) est un paramètre très important. Le calcul se fait par la formule suivante (Roustan et al., 1999) :

$$P = \rho_L \cdot N_p \cdot N^3 \cdot d^5 \quad (42)$$

Il fait intervenir le nombre de puissance (N_p). Ce nombre adimensionnel, dépendant du régime d'écoulement (Re) et du type d'agitateur, est accessible via les données du fabricant ou des abaques (Roustan, 1991). La puissance d'agitation est modifiée par la présence de gaz et sa nouvelle valeur (P_G) peut être calculée par l'équation de Hughmark (1980) :

$$P_G = 0,1 \left(\frac{Q_G}{NV_L}\right)^{-0,25} \left(\frac{N^2 d^4}{g \cdot e \cdot V_L^{0,66}}\right)^{-0,2} \cdot P \quad (43)$$

avec e (m) la hauteur des pales de l'agitateur. Grâce aux puissances, on est en mesure de déterminer l'énergie dissipée ε_d en W/m^3 dans la solution au cours de l'agitation :

$$\varepsilon_d = \frac{P}{\rho_L V_L} \quad (44)$$

L'agitation va induire la dispersion d'un certain volume de gaz dans le milieu. On parle de rétention gazeuse ε (m^3). Il est possible d'estimer cette fraction volumique par une équation dérivée de Kudrewizki (1982) :

$$\frac{\varepsilon}{1 - \varepsilon} \approx 0,5 \frac{u_s^{0,66}}{(g \cdot l_k)^{0,33}} \frac{\rho_L}{(\rho_L - \rho_G)} \quad (45)$$

où l_k (m) est la longueur de Kolmogorov

$$l_k = \left(\frac{v_L^3}{\varepsilon_d} \right)^{1/4} \quad (46)$$

qui représente l'épaisseur de la couche limite de la diffusion moléculaire.

Nous avons ainsi posé les bases permettant de calculer les différents temps caractéristiques de l'agitation :

- le temps de circulation (s), qui correspond à la durée moyenne nécessaire à un élément de matière pour effectuer une rotation complète dans la cuve (McManamey, 1980) :

$$t_c = \frac{2D}{0,85 \pi N d \left(\frac{d}{D} \right)^{7/6}} \quad (47)$$

- le temps de macromélange (s), qui correspond au temps nécessaire à l'obtention d'un mélange d'une composition uniforme (Nere et al., 2003) :

$$t_M = 5 \cdot t_c \quad (48)$$

- le temps de micromélange (s), qui correspond au mélange régit par la diffusion moléculaire, il dépend de la longueur de Kolmogorov et du coefficient de diffusion (Nere et al., 2003) :

$$t_m = \frac{l_k^2}{D_{CO_2}} \quad (49)$$

- le temps de séjour du gaz (s) dans la phase liquide :

$$t_G = \frac{\varepsilon}{1 - \varepsilon} \frac{V_L}{Q_G} \quad (50)$$

2.3. Paramètres physico-chimiques invariants

Les calculs font appels à différentes valeurs, qui, si elles sont constantes dans le cas de contacteurs à pression atmosphérique ou à pression fixe, évoluent dans notre cas, puisque la pression du réacteur va augmenter au fur et à mesure de l'introduction du CO₂.

Afin de prendre en compte les modifications des caractéristiques physico-chimiques intervenant lors de la pressurisation, plusieurs paramètres (la masse volumique et la viscosité à la fois du CO₂ et du milieu, la concentration à de CO₂...) ont été calculés pour différentes pressions entre la pression atmosphérique et 100 bar. Les valeurs sont reportées

dans le Tableau 37. On suppose que la pression dans la pompe ne descend pas en dessous de 50 bar, donc pour les niveaux de 1 à 50 bar, la masse volumique du CO₂ à 0°C est considérée comme constante et équivalente à 941 kg/m³. Les valeurs en vert dans le tableau n'ont donc pas été utilisées dans les calculs.

Tableau 37 : Evolution des caractéristiques physico-chimiques en fonction de la pression à 38°C
(D_{CO2}: diffusivité du CO₂, ρ: masse volumique, η: viscosité, σ: tension interfaciale, x_{CO2}: solubilité du CO₂, C_{CO2}*: concentration à saturation, ν: viscosité cinématique)

P	D _{CO2}	ρ _G (0°C)	ρ _G (38°C)	η _G	σ _{JL/CO2}	x _{CO2}	C _{CO2} *	ρ _L	η _L	ν _L
bar	m ² /s	kg/m ³	kg/m ³	Pa.s	N/m	-	mol/m ³	kg/m ³	Pa.s	m ² /s
1		2	2	1,6.10 ⁻⁵	0,046	0,0025	138	993		
33		89	67	1,6.10 ⁻⁵	0,037	0,0125	699	994		
50	3,3.10 ⁻⁹	941	115	1,7.10 ⁻⁵	0,032	0,0175	985	995	6,8.10 ⁻⁴	6,8.10 ⁻⁷
75		959	244	2,1.10 ⁻⁵	0,024	0,0217	1228	996		
100		974	667	5,2.10 ⁻⁵	0,018	0,0225	1275	997		

Pour évaluer l'évolution de la tension interfaciale entre *Jambes Légères* et le CO₂ (σ_{JL/CO2}) avec la pression, nous nous sommes basé sur :

- la mesure expérimentale de la tension interfaciale de *Jambes Légères* contaminé et enrichi en vitamine C et en acide gallique contre l'air (45 mN/m à 38°C),
- la dépendance de la tension interfaciale avec la température,
- la variation de la tension interfaciale eau/CO₂ avec la pression.

A 38°C et pression atmosphérique, la tension interfaciale eau/air est de 69 mN/m. Elle est équivalente à la tension interfaciale eau/CO₂ d'après Chun et Wilkinson (1995). En supposant que l'influence de la pression s'exprime principalement par un changement des propriétés de la phase gaz, le changement relatif de la tension *Jambes Légères*-CO₂ peut être estimé égal à celui de la tension eau-CO₂. On considère donc que la tension *Jambes Légères*-CO₂ évolue de la même manière que la tension eau/CO₂. En extrapolant au couple *Jambes Légères*-CO₂ les variations observées à 38°C et 100 bar pour le couple eau-CO₂ et en appliquant une relation de proportionnalité, la tension interfaciale *Jambes Légères*-CO₂ à 100 bar est assimilée à 18 mN/m.

Tableau 38 : Evolution du débit volumique (Q_G) de CO_2 à $38^\circ C$ en fonction de la pression pour le petit batch avec un volume de solution de 19 mL

P	Q_G
bar	m^3/s
1	$1,4 \cdot 10^{-4}$
33	$3,6 \cdot 10^{-6}$
50	$2,1 \cdot 10^{-6}$
75	$1,0 \cdot 10^{-6}$
100	$3,7 \cdot 10^{-7}$

Le débit volumique de CO_2 introduit dans le réacteur (Q_G) varie également pendant la pressurisation, car c'est le débit de la pompe qui est imposé. Le débit délivré par la pompe (maintenue à $0^\circ C$ et 50 bar, pression bouteille) est lui constant et correspond à un volume délivré de 61 mL de CO_2 en 4 min. Le débit volumique de la pompe vaut $2,5 \cdot 10^{-7} m^3/s$. Une fois dans le réacteur thermostaté à $38^\circ C$ et initialement à pression atmosphérique, le CO_2 subit une détente. Le débit volumique dans le réacteur s'exprime alors ainsi pour une pression donnée :

$$Q_G = Q_{G,pompe} \frac{\rho_{G,0^\circ C}}{\rho_{G,38^\circ C}} \quad (51)$$

Les variations du débit volumique sont reportées dans le Tableau 38.

Ainsi, au cours de la pressurisation, les paramètres physico-chimiques les plus affectés par la pression sont la concentration du CO_2 à saturation (138 à $1275 mol/m^3$), la tension interfaciale *Jambes Légères*- CO_2 (46 à 18 mN/m) ainsi que la masse volumique du CO_2 (2 à $667 kg/m^3$).

2.4. Influence du choix de la corrélation sur la cinétique de dissolution estimée

Le coefficient de transfert $k_L a$ a été calculé soit en tant que tel (équation (31) modèle de Van't Riet (1979) ou équation (32) dans le modèle de Ferreira (2010)), soit à partir de corrélations distinctes pour k_L et pour a (équation (29) et (30), modèle de Calderbank (1958)). Pour chaque corrélation, le $k_L a$ décroît avec une augmentation de la pression (Tableau 39). Il en résulte des temps de transfert ($1/k_L a$) de plus en plus longs à mesure que la pression croît. Quelle que soit la corrélation employée, les $k_L a$ obtenus sont du même ordre de grandeur, même si on est parfois à la limite du domaine de validité de la corrélation (la corrélation de Van't Riet est valable pour un ratio P_G/V_L compris entre 500 et $10000 W/m^3$

alors qu'on de 115 à 509 W/m³ expérimentalement). Pour la suite de l'étude, nous utiliserons les relations de Calderbank, qui permettent de séparer le calcul du $k_L a$ et du α .

Tableau 39 : Evolution des $k_L a$ et du temps de transfert (t_{tr}) avec la pression pour le petit batch ($V_L = 19$ mL), selon différents modèles de calculs

Modèle utilisé	Van't Riet		Ferreira		Calderbank	
	$k_L a$	t_{tr}	$k_L a$	t_{tr}	$k_L a$	t_{tr}
P	s ⁻¹	s	s ⁻¹	s	s ⁻¹	s
bar						
1	$8,3 \cdot 10^{-2}$	12	1,24	1	$4,6 \cdot 10^{-2}$	22
33	$1,9 \cdot 10^{-2}$	52	$2,1 \cdot 10^{-2}$	49	$2,2 \cdot 10^{-2}$	46
50	$1,5 \cdot 10^{-2}$	65	$1,1 \cdot 10^{-2}$	90	$2,0 \cdot 10^{-2}$	49
75	$1,1 \cdot 10^{-2}$	87	$4,9 \cdot 10^{-3}$	204	$1,9 \cdot 10^{-2}$	53
100	$7,7 \cdot 10^{-3}$	129	$1,6 \cdot 10^{-3}$	619	$1,4 \cdot 10^{-2}$	73

Le transfert du CO₂ peut se faire conjointement par les bulles au cours de leur ascension dans la phase aqueuse (contacteur gaz-liquide) et par l'interface existant entre le liquide et le ciel gazeux du réacteur. Dans le cas, d'un réacteur engorgé, la dispersion du gaz dans la phase aqueuse est mauvaise et le gaz s'accumule directement dans la phase haute du réacteur avant de diffuser à travers la surface du liquide. Dans ce cas, le calcul du $k_L a$ a été réalisé en considérant que k_L est identique au k_L du réacteur non engorgé, calculé à partir de l'équation (29), puisqu'il ne dépend que des variables géométriques du réacteur et des caractéristiques physico-chimiques des 2 phases. En revanche, le α est calculé en prenant le rapport de la section du réacteur sur le volume de solution traité.

Le Tableau 40 présente le calcul de l'aire d'échange selon que l'on considère l'aire offerte par les bulles (équation (30)) ou celle offerte par l'interface ciel-solution (ratio surface/volume). Ces deux modes de calculs donnent des aires du même ordre de grandeur. Leur contribution est donc équivalente. Cependant, l'aire associée aux bulles n'est valable que lors de la configuration en contacteur gaz-liquide, c'est à dire pendant la phase de pressurisation. Que le système soit engorgé ou non, ne change pas ici fondamentalement la dissolution du CO₂ dans le milieu.

Tableau 40 : Comparaison des aires d'échanges liées aux bulles (calculés grâce à la formule (30)) et à l'interface ciel/liquide selon la pression

Contribution	Bulle	Interface ciel/liquide
P	a	a
bar	m^2/m^3	m^2/m^3
1	81*	32
33	38	32
50	37	32
75	37	32
100	35	32

La valeur du a marqué d'une * dans le Tableau 40 peut paraître surprenante. Elle découle de l'écart important entre les masses volumiques du CO_2 et du liquide à basse pression. Toutefois, c'est un régime transitoire et cette valeur peut être négligée.

Pour déterminer l'importance de chaque mécanisme à la dissolution du CO_2 , nous avons calculé la concentration en CO_2 dissous associée à chaque contribution. La concentration en CO_2 dissous a été calculée à partir de l'équation (30) en utilisant les données du Tableau 37, du Tableau 38 et du Tableau 40. Les différents paramètres (k_L , a et $c_{\text{CO}_2}^*$) ont été déterminés à trois pressions intermédiaires (33, 50 et 75 bar). Les courbes présentées sur la Figure 48 donnent une allure générale.

A la fin de la pressurisation le contact des bulles de gaz dans la matrice liquide a permis de dissoudre $1166 \text{ mol}/\text{m}^3$ de CO_2 (91% de la concentration à saturation). Compte tenu des différentes hypothèses utilisées pour évaluer les cinétiques de dissolution, cette valeur peut être considérée comme identique à celle obtenue en prenant uniquement en compte l'interface ciel-liquide ($1146 \text{ mol}/\text{m}^3$). La cinétique de dissolution est donc la même que l'on soit dans un régime de dispersion complète ou d'engorgement.

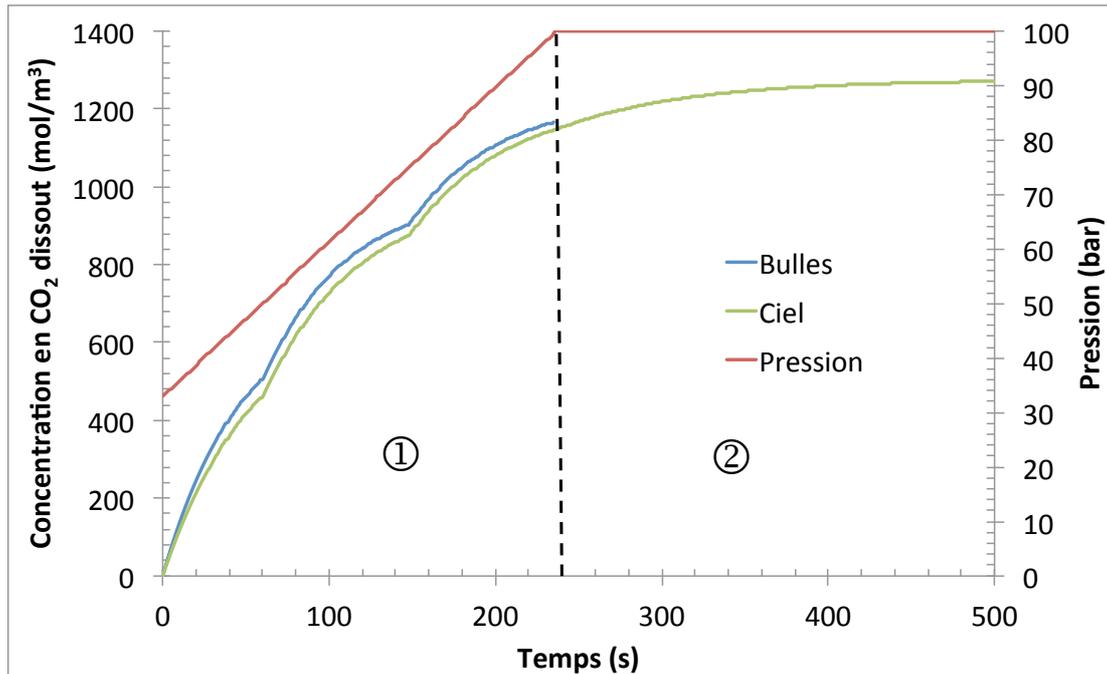


Figure 48 : Evolution de la concentration en CO₂ dissout dans le petit batch en fonction de la contribution considérée (bulle ou interface ciel-liquide)

2.5. Etude de sensibilité

Nous nous sommes interrogés sur la sensibilité de la cinétique et du temps de transfert aux différents paramètres expérimentaux. Nous avons donc quantifié l'impact des paramètres physico-chimiques et des conditions opératoires sur le transfert de masse. Pour ce faire, nous avons considéré un système de référence, constitué d'un réacteur d'une capacité de 50 mL (petit batch) contenant 19 mL de solution subissant un traitement de 75 min à 38°C et 100 bar. Le système d'agitation a été assimilé à un paddle. Les grandeurs k_L et a sont estimées en utilisant les corrélations de Calderbank (équations (29) et (30)).

2.5.1. Effet des caractéristiques du liquide

Précédemment nous avons assimilé *Jambes Légères* à de l'eau sauf pour ce qui est de la tension interfaciale avec le CO₂. La validité de cette hypothèse va être évaluée en quantifiant l'impact de la masse volumique du liquide, de sa viscosité et de sa tension interfaciale sur le temps de transfert du CO₂.

2.5.1.8. Masse volumique

Parmi les caractéristiques physico-chimiques du fluide, la masse volumique intervient dans de nombreux calculs (Re , k_L , P_G ...). Son effet sur le temps de transfert a donc été envisagé. A 23°C et à pression atmosphérique, l'estimation de la masse volumique de

Jambes Légères est de 1028 kg/m^3 , contre 998 kg/m^3 pour l'eau. En supposant que la masse volumique de *Jambes Légères* suit la même évolution que celle de l'eau avec la pression, les temps de transfert calculés pour des masses volumiques variant de 1023 à 1027 kg/m^3 lors de la pressurisation sont représentés dans le Tableau 41.

Tableau 41 : Influence de la masse volumique (ρ) sur les grandeurs du transfert, la dernière colonne représente les valeurs initialement calculées avec de l'eau pure (t_G : temps de séjour du gaz dans la phase liquide, t_{tr} : temps de transfert de CO_2)

P	ρ_{JL}	t_G	t_{tr}	t_{tr}
bar	kg/m^3	s	s	s
1	1023	0	21	22
33	1024	1	46	46
50	1025	1	48	49
75	1026	2	51	53
100	1027	5	70	73

La faible variation de la masse volumique entre *Jambes Légères* et l'eau fait que les temps de transfert ne sont pas affectés par la masse volumique de la phase liquide. En se plaçant à 100 bar, on constate qu'il faudrait une masse volumique de 2300 kg/m^3 pour avoir un temps de transfert deux fois plus court et une masse volumique de 46 kg/m^3 pour avoir un temps de transfert de 140 s. Ces valeurs, bien au-delà des masses volumiques communément rencontrées pour les liquides (500 à 1500 kg/m^3 à l'exception des métaux liquides à température ambiante comme le mercure) montrent que le temps de transfert est peu impacté par la masse volumique de la suspension aqueuse (Perry and Green, 1998).

2.5.1.9. Viscosité

La viscosité intervient dans les mêmes formules que la masse volumique (Re , t_m , k_L). Son effet sur le temps de transfert a donc également été envisagé. La viscosité de *Jambes Légères* a été mesurée à 38°C . Elle est d'environ $3,2 \cdot 10^{-3} \text{ Pa.s}$ au lieu de $6,8 \cdot 10^{-4} \text{ Pa.s}$ pour l'eau pure.

Tableau 42 : Influence de la viscosité (η) sur le temps de transfert (t_{tr}), la dernière colonne représente les valeurs initialement calculées avec de l'eau pure

P	η_{JL}	t_{tr}	t_{tr}
bar	Pa.s	s	s
1	$3,2 \cdot 10^{-3}$	28	22
33	$3,2 \cdot 10^{-3}$	61	46
50	$3,2 \cdot 10^{-3}$	64	49
75	$3,2 \cdot 10^{-3}$	68	53
100	$3,2 \cdot 10^{-3}$	95	73

En dépit de l'écart de presque un facteur 10 entre la viscosité de *Jambes Légères* et celle de l'eau pure, les temps de transfert varient peu. En se plaçant à 100 bar, on constate qu'il faudrait une viscosité de 1.10^{-5} Pa.s (ordre de grandeur de la viscosité des gaz) pour avoir un temps de transfert deux fois plus court et une viscosité de $3,5.10^{-2}$ Pa.s (ordre de grandeur des huiles de table à température ambiante) pour doubler le temps de transfert.

2.5.1.10. Tension interfaciale

La tension de surface intervient uniquement dans le calcul de a et affecte le temps de transfert. Plaçons nous maintenant dans l'hypothèse que cette tension de surface ne serait plus celle de *Jambes Légères* avec le CO₂ mais plutôt celle de l'eau avec le CO₂. Le Tableau 43 expose les variations du temps de transfert en fonction de la pression, si on choisit une tension de surface plus importante.

Tableau 43 : Influence de la tension de surface (σ) sur les grandeurs du transfert, la dernière colonne représente les valeurs de référence initialement calculées avec la tension de surface entre *Jambes Légères* et le CO₂ (a : surface interfaciale d'échange, t_{tr} : temps de transfert de CO₂)

P	$\sigma_{\text{eau/CO}_2}$	a	t_{tr}	t_{tr}
bar	N/m	m ² /m ³	s	s
1	0,069	64	27	22
33	0,056	30	60	46
50	0,046	30	62	49
75	0,035	29	65	53
100	0,027	27	93	73

On s'aperçoit que le temps de transfert croît légèrement avec la tension de surface. Mais pour cette gamme de variations, la tension interfaciale n'affecte pas de manière significative le temps de transfert. Pour observer une diminution par deux du temps de transfert, il faudrait une tension interfaciale de 55 mN/m (valeur comprise entre la tension de surface de l'éthylène glycol et du formamide à 20°C à pression atmosphérique). Doubler le temps de transfert serait possible avec une tension interfaciale de 5 mN/m (largement inférieure à la tension de surface du n-hexane à 20°C et à pression atmosphérique 18,43 mN/m).

Compte tenu du faible impact sur le temps de transfert du CO₂ des paramètres physico-chimiques pris individuellement, existe-t-il des synergies entre ces différents paramètres affectant le temps de transfert ? Pour répondre à cette question, le Tableau 44 compile d'une part les valeurs des propriétés du fluide permettant d'obtenir un temps de

transfert doublé (colonne $2 t_{tr}$) ou diminué de moitié (colonne $t_{tr}/2$) et d'autre part, la valeur du temps de transfert en prenant en compte les paramètres de chaque fluide : *Jambes Légères*, de l'eau pure, un fluide imaginaire combinant les paramètres permettant d'obtenir $t_{tr}/2$ et un fluide imaginaire combinant les paramètres permettant d'obtenir $2t_{tr}$.

Tableau 44 : Evolution du temps de transfert (t_{tr}) calculé à partir des équations de Calderbank selon les propriétés du fluide considéré à 38°C et 100 bar (ρ : masse volumique, η : viscosité, σ : tension interfaciale)

Paramètre	unité	$t_{tr}/2$	t_{tr} JL	t_{tr}	t_{tr} eau	$2 t_{tr}$
ρ_L	kg/m ³	2300	1027	997	997	46
η_L	Pa.s	1.10^{-5}	$3,2.10^{-3}$	$6,8.10^{-4}$	$6,8.10^{-4}$	$3,5.10^{-2}$
σ_{L/CO_2}	mN/m	5	18	18	27	55
t_{tr} extrêmes	s	8	91	73	93	534

Que l'on prenne en compte le complément *Jambes Légères* ou l'eau, le temps de transfert est identique. Si on prend en compte les variations nécessaires pour modifier de manière significative le temps de transfert, on en conclue que le temps de transfert est peu sensible à la nature du fluide. De plus, dans le cas où nous aurions un fluide combinant l'ensemble des propriétés doublant le temps de transfert ($\rho_L = 46 \text{ kg.m}^{-3}$, $\eta_L = 3,5.10^{-2} \text{ Pa.s}$ et $\sigma_{L/CO_2} = 55 \text{ mN.m}^{-1}$), le temps de transfert obtenu serait d'environ 8 min, ce qui est négligeable devant la durée de la phase statique de notre traitement (75 min).

2.5.2. Volume de liquide traité

Nous avons cherché à savoir si le volume de liquide contenu dans le réacteur pouvait impacter la cinétique de dissolution (Tableau 45). Il joue sur l'estimation de l'énergie dissipée au cours de l'agitation (ϵ_d) qui conditionne le t_G et sur la puissance d'agitation en présence de gaz, qui intervient dans le $k_L a$ exprimé via la formule de Van't Riet. Il joue aussi sur la surface interfaciale d'échange utile au calcul du $k_L a$ via les formules de Calderbank.

Tableau 45 : Influence du volume de solution traitée (V_L) sur les grandeurs du transfert à 100 bar, pour le petit batch avec un agitateur paddle, en utilisant les formules de Calderbank (t_G : temps de séjour du gaz dans la phase liquide, t_{tr} : temps de transfert de CO₂)

V_L	P_G	t_G	t_{tr}
m ³	W	s	s
$9,5.10^{-6}$	$1,2.10^{-2}$	3	53
19.10^{-6}	$9,7.10^{-3}$	6	73
45.10^{-6}	$8,7.10^{-3}$	12	107

On s'aperçoit qu'augmenter le volume de solution à traiter permet certes d'allonger le temps de séjour du gaz dans la phase liquide mais augmente également légèrement le

temps de transfert. Dans un objectif de transfert rapide, on cherchera donc plutôt à privilégier les faibles volumes de solution.

2.5.3. Concentration à saturation

Comme nous avons précisé auparavant, nous avons eu recours aux travaux de Diamond et Akinfiiev (2003) pour estimer la solubilité du CO₂ dans l'eau. Or les travaux de (2009) montrent que la solubilité du CO₂ est supérieure dans l'eau (environ 5,5 g/100 g) comparée à celle dans un jus de fruit acide (4,1 g_{CO2}/100 g_{jus}) du fait de la présence de solutés (comme les sucres ou les acides). Le milieu *Jambes Légères* est fabriqué à partir d'extraits végétaux et contient de nombreux solutés indéterminés. Admettons donc, dans un premier temps que la solubilité du CO₂ soit inférieure à celle que nous avons prise. Cela va affecter la concentration à saturation et donc la vitesse de dissolution du CO₂. En effet, d'après la formule (27), l'écart entre la concentration à saturation et la concentration initiale sert de moteur à la dissolution. Pour évaluer la sensibilité du temps de transfert vis-à-vis de ce paramètre, nous envisageons une diminution de 30% de la solubilité du CO₂ dans le milieu mais aussi une augmentation de 30%. Le Tableau 46 expose les variations de la solubilité en fonction de la pression. Avec les hypothèses de majoration et de minimisation de la fraction molaire dissoute, la concentration en CO₂ à saturation à 100 bar ($c_{CO_2}^*$) varie entre 997 et 1669 mol/m³.

Tableau 46 : Variation de la solubilité du CO₂ (x_{CO_2}) et impact sur la concentration à saturation ($c_{CO_2}^*$), les colonnes en bleu représentent les valeurs de référence initialement calculées avec la solubilité du CO₂ dans l'eau

P	x_{CO_2} min	$c_{CO_2}^*$ min	x_{CO_2}	$c_{CO_2}^*$	x_{CO_2} maj	$c_{CO_2}^*$ maj
bar	-	mol/m ³	-	mol/m ³	-	mol/m ³
1	0,002	106	0,003	138	0,003	180
33	0,010	537	0,013	699	0,016	913
50	0,013	755	0,018	985	0,023	1287
75	0,017	940	0,022	1228	0,028	1607
100	0,017	977	0,023	1275	0,029	1669

La Figure 49 représente l'influence de la solubilité sur la cinétique de dissolution du CO₂. On constate qu'une hausse de la solubilité n'entraîne pas forcément un temps de dissolution totale plus court, même constat avec une diminution de la solubilité. En effet, il faut globalement le même ordre de grandeur de temps (entre 600 et 640 s) pour atteindre la concentration à saturation. Quelle que soit la solubilité envisagée, on atteint 91% de la

concentration à saturation à la fin de l'étape de pressurisation. En revanche, la concentration en CO₂ dissous sera plus importante dans le cas d'une solubilité plus grande. Pour l'aspect pasteurisation, dans la mesure où c'est le CO₂ dissous qui va engendrer les mécanismes d'inactivation des microorganismes, on peut penser qu'avoir une quantité plus importante de CO₂ en solution permettra d'inactiver un plus grand nombre de microorganismes et sera donc plus intéressante.

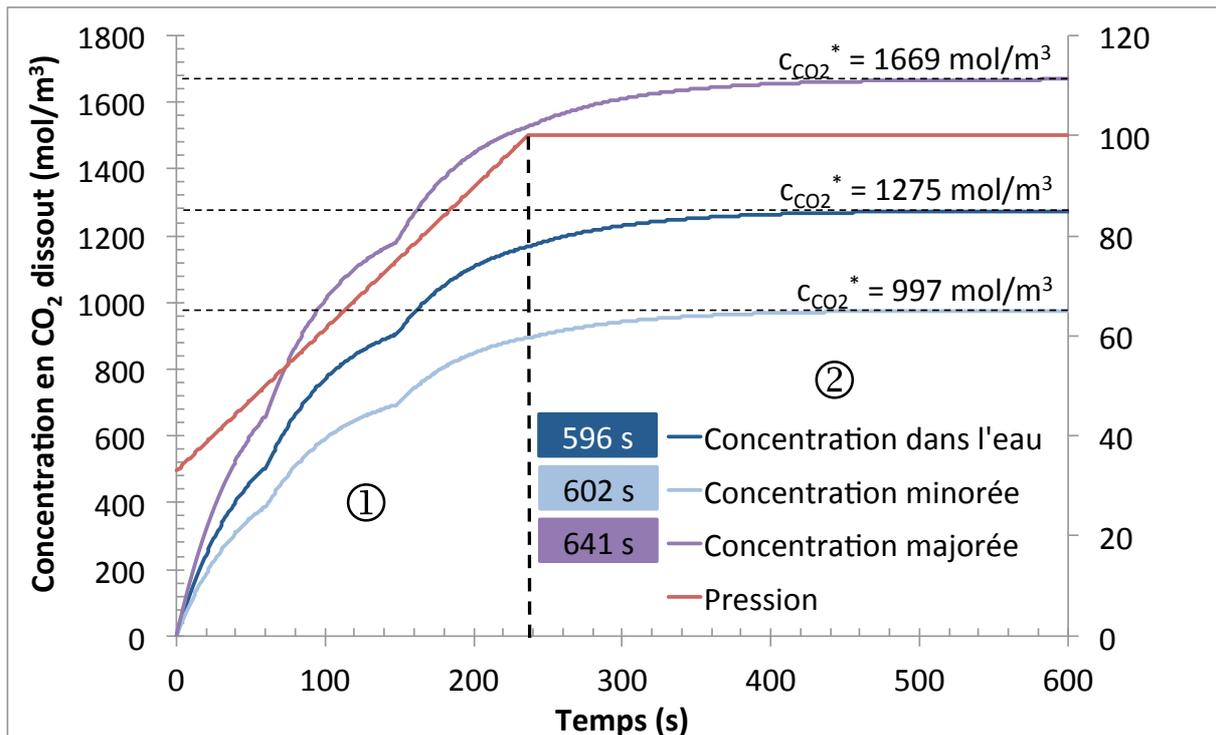


Figure 49 : Influence de la solubilité du CO₂ dans le milieu sur la cinétique de transfert de masse pour le petit batch avec 19 mL de solution traitée, à partir du modèle de Calderbank et un agitateur de type paddle. Les temps dans les encadrés correspondent aux temps nécessaires à la dissolution totale du CO₂.

2.5.1. Débit de CO₂

Le débit de CO₂ est un des facteurs clé de la cinétique de transfert de masse. Il intervient d'une part dans le calcul du nombre d'aération qui caractérise le régime de dispersion, et d'autre part dans le calcul de la puissance gazeuse (utilisée pour le calcul de a par la formule de Calderbank) ainsi que dans le temps de séjour du gaz dans la phase liquide. Admettons que ce débit soit évalué avec une erreur de 50%. Le Tableau 47 montre l'influence du débit sur les différentes grandeurs associées au transfert de masse. Diminuer le débit de gaz entraîne un temps de transfert plus long mais permet de s'approcher d'un régime de chargement plutôt que d'être dans un système engorgé.

Tableau 47 : Impact du débit de CO₂ (Q_G) sur le nombre d'aération (Na) et temps de transfert (t_{tr}), la dernière colonne représente les valeurs de référence initialement calculé avec le débit délivré par notre pompe avec Na_{e/c} = 0,028 et Na_{c/d} = 0,022

P	Q _G min	Na min	t _{tr} min	Q _G	Na	t _{tr}	Q _G maj	Na maj	t _{tr} maj
bar	m ³ /s	-	s	m ³ /s	-	s	m ³ /s	-	s
1	7,0.10 ⁻⁵	12	28	1,4.10 ⁻⁴	24	22	2,1.10 ⁻⁴	36	18
33	1,8.10 ⁻⁶	0,31	61	3,6.10 ⁻⁶	0,61	46	5,4.10 ⁻⁶	0,92	40
50	1,0. 10 ⁻⁶	0,18	65	2,1.10 ⁻⁶	0,36	49	3,1.10 ⁻⁶	0,53	42
75	5,0.10 ⁻⁷	0,09	69	1,0.10 ⁻⁶	0,17	53	1,5.10 ⁻⁶	0,26	45
100	1,9.10 ⁻⁷	0,03	96	3,7.10 ⁻⁷	0,06	73	5,6.10 ⁻⁷	0,10	62

2.5.2. Cas extrêmes

Nous avons vu qu'augmenter le débit de gaz (Q_G), diminuer le volume de solution traitée (V_L), augmenter la masse volumique du fluide traité (ρ_L) et diminuer la viscosité du fluide ainsi que sa tension de surface avec le CO₂ (σ_{L/CO2}) tendent à diminuer les temps de transfert. Un calcul a été fait dans ces conditions (t_{tr} min dans le Tableau 48) en prenant en compte une évolution réaliste des propriétés que nous venons de lister. En inversant les tendances de ces paramètres, on peut calculer le temps de transfert le plus long que l'on peut potentiellement obtenir. Les calculs sont effectués en considérant la fraction molaire x_{CO2} de 0,023 à 100 bar et 38°C.

Tableau 48 : Bornes du temps de transfert (t_{tr}) en fonction de paramètres expérimentaux des propriétés physico-chimiques du fluide à 38°C et 100 bar, calculées à partir des formules de Calderbank (ρ : masse volumique, η : viscosité, σ : tension interfaciale)

Paramètre	unité	t _{tr} min	t _{tr}	t _{tr} max
ρ _L	kg/m ³	1260	997	789
η _L	Pa.s	0,65.10 ⁻³	1.10 ⁻³	3,5.10 ⁻²
σ _{L/CO2}	mN/m	8	18	25
V _L	mL	9	19	45
Q _G	m ³ /s	1,2.10 ⁻⁶	3,7.10 ⁻⁷	2,4.10 ⁻⁸
t_{tr} extrêmes	s	15	78	1129

On s'aperçoit à partir du Tableau 48, que le cumul des paramètres permettant de maximiser le temps de transfert induit une différence significative. Le temps de transfert passe d'un peu plus de 1 min à 19 min. Cela reste négligeable pour des expériences avec 75 min de traitement statique mais il pourrait être utile de le prendre en compte pour les expériences de 30 min voire moins. Le calcul en prenant en compte les paramètres permettant de réduire le temps de transfert aboutissent à une valeur 5 fois plus petite que

celle que nous avons estimée en référence. Une erreur dans le sens de la minimalisation ne faussera pas l'interprétation des résultats.

3. Les dispositifs batch

Nous cherchons à observer l'impact de l'agitation et de la dispersion du CO_2 sur la cinétique de dissolution de manière à faire varier le temps de transfert. Pour ce faire, nous avons utilisé et comparé deux dispositifs batch.

3.1. Caractéristiques des deux dispositifs batch

Les deux réacteurs batch possèdent des caractéristiques différentes, en termes de dimensions et de système d'agitation. Les dimensions nécessaires aux différents calculs sont données Figure 50.

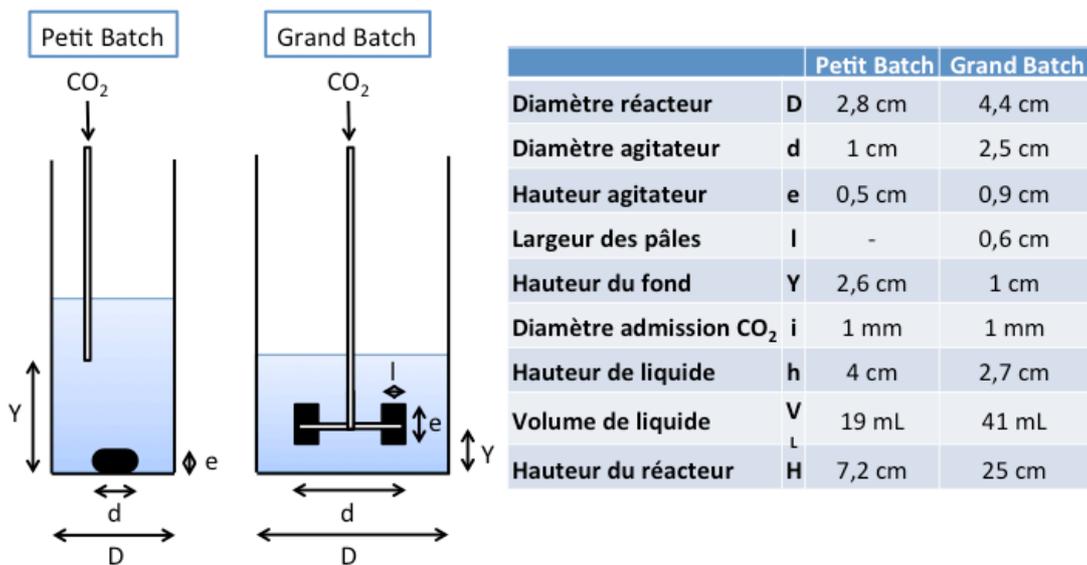


Figure 50 : Représentation cotée de nos cuves batch agitées avec leurs dimensions caractéristiques

3.2. Dispositif de pasteurisation (petit batch de 50 mL)

Le petit batch est agité à environ 350 rpm avec un barreau aimanté de 1 cm de long et 0,5 cm de diamètre. Le CO_2 est introduit via un tube plongeant au sein de la solution à traiter. Le barreau produit un petit vortex à la surface du liquide de 0,7 cm de haut.

D'après les valeurs des nombres adimensionnels reportés dans le Tableau 49, ce réacteur est engorgé et sous écoulement intermédiaire quelle que soit la pression.

Tableau 49 : Valeurs des nombres adimensionnels pour le petit batch à 38°C avec un volume de solution de 19 mL et l'agitateur assimilé à un paddle

P	Re	Fr	Na	Na _{e/c}	Na _{c/d}
bar	-	-	-	-	-
1	854	0,035	24	0,028	0,022
33	855		0,61		
50	855		0,36		
75	856		0,17		
100	857		0,06		

La Figure 51 montre l'évolution de la pression au cours des différentes étapes du traitement standard à 38°C et 100 bar. Le saut brutal de la pression au moment de la pressurisation correspond à la mise à pression bouteille du réacteur. Après ce décrochement, la montée en pression se fait à une vitesse de 17 bar/min. Pour la dépressurisation, on perd en moyenne 32 bar/min.

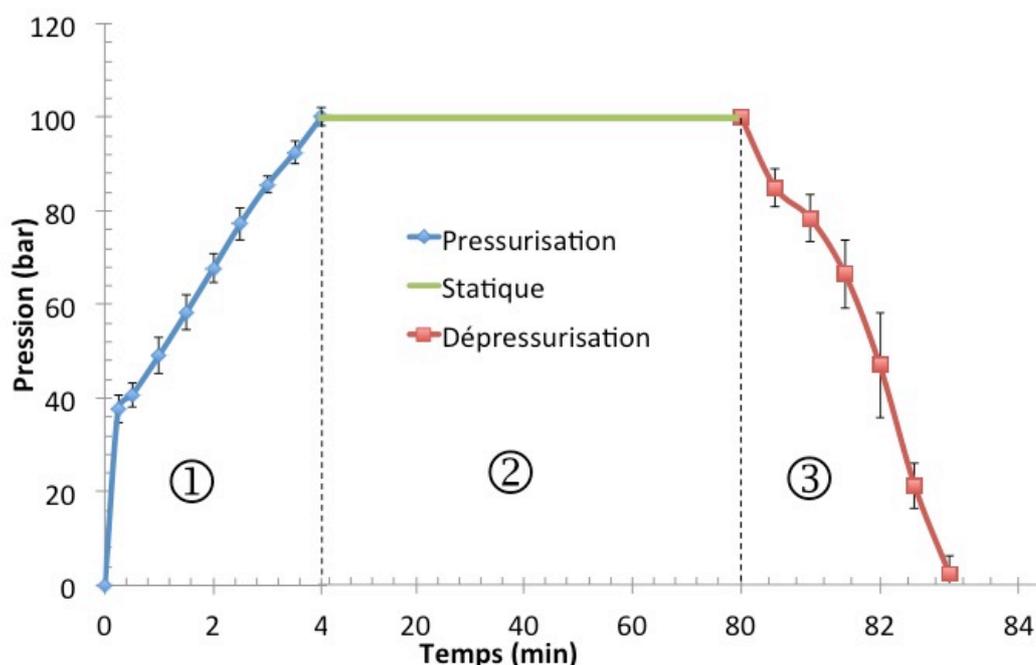


Figure 51 : Evolution de la pression au cours d'un traitement à 38°C et 100 bar avec le petit batch pour 19 mL de solution traitée, le statique dure 75 min

Le barreau aimanté n'est pas un mobile d'agitation utilisé dans l'industrie, donc il n'y a pas de courbe nombre de puissance/Reynolds associée. Nous avons donc cherché à quel mobile connu nous pourrions l'assimiler. Sur les bases de la similarité du profil d'agitation, le barreau pourrait être assimilé à une ancre (catégorie R7 du formulaire de Roustan (1991)). Sur un critère de ressemblance géométrique, le barreau aimanté pourrait être assimilé à une turbine à 2 pales droites (catégorie R2) ou un agitateur à palettes (paddle). Selon le dispositif

choisi, le nombre de puissance varie. Si on prend en compte le paddle, N_p serait de 2 (Hemrajani and Tatterson, 2003), pour l'équivalence avec la turbine, on aurait un N_p de 3,5 (Roustan, 1991); enfin le N_p serait de 0,7 pour l'ancre (Roustan, 1991). Selon le mobile choisi, les différences en termes de puissance développée et de temps caractéristiques sont significatives, comme le montre le Tableau 50.

Lorsque le nombre de puissance de l'agitateur augmente, le temps de micromélange (t_m) diminue tandis que le temps de séjour du gaz dans la phase aqueuse (t_G) augmente. Du fait d'une plus grande puissance délivrée par l'agitateur, le $k_L a$ est plus important dans le cas de la turbine, induisant un temps de transfert deux fois plus court que celui de l'ancre (58 contre 111 s). Ces variations se répercutent sur le temps de dissolution pour atteindre la concentration à l'équilibre.

Tableau 50 : Temps caractéristiques du petit batch selon la modélisation d'agitateur choisie, à 38°C et 100 bar pour 19 mL de solution, dans le cadre des équations de Calderbank (l_K : longueur de Kolmogorov, P : puissance d'agitation, ϵ : rétention gazeuse, t_c : temps de circulation, t_M : temps de macromélange, t_m : temps de micromélange, t_G : temps de séjour du gaz dans la phase liquide, t_{tr} : temps de transfert de CO_2)

		Ancre	Paddle	Turbine
N_p	-	0,7	2	3,5
l_K	μm	140	111	100
P	W	$1,4 \cdot 10^{-5}$	$4,0 \cdot 10^{-5}$	$6,9 \cdot 10^{-5}$
ϵ	m^3	0,6		
$k_L a$	s^{-1}	0,009	0,014	0,017
t_c	s	1,2		
t_M	s	6		
t_m	s	6	4	3
t_G	s	72	78	82
t_{tr}	s	111	73	58

L'impact sur la concentration en CO_2 de la phase aqueuse est illustré sur la Figure 52 calculé en supposant que la concentration initiale vaut 0 et que la pression de 100 bar est instantanément atteinte dans le réacteur à 38°C. Dans ces conditions, on constate qu'il faut entre 7 min et 14 min pour atteindre la concentration maximale en CO_2 selon le mobile d'agitation. Par la suite, nous assimilerons toujours le barreau aimanté du petit batch à un paddle, car il correspond à un temps de transfert intermédiaire qui permet de limiter les erreurs d'interprétation.

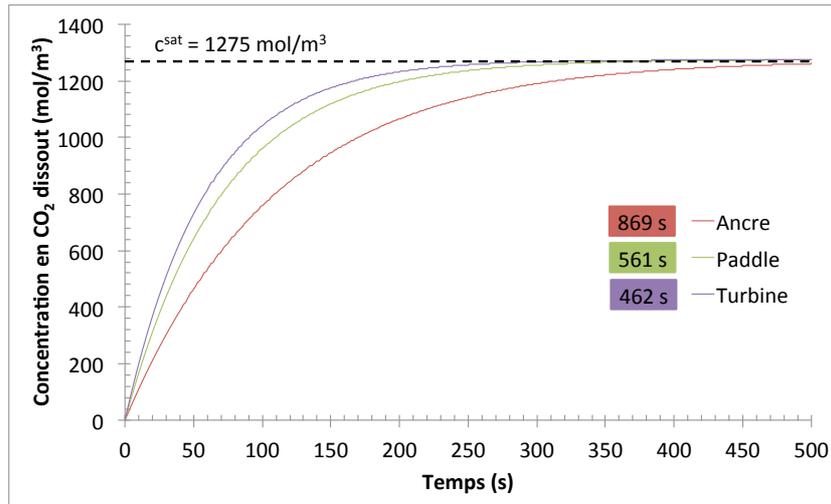


Figure 52 : Evolution de la concentration en CO₂ dissout selon le type de mobile pris en compte pour le petit batch en considérant que la concentration maximale atteignable est celle à 38°C-100 bar, sur les bases du modèle de Calderbank, Les temps dans les encadrés correspondent aux temps nécessaires à la dissolution totale du CO₂.

Comme nous l'avons déjà évoqué lors des calculs de $k_L a$, la pression de 100 bar n'est pas atteinte directement et nous avons divisé le profil de montée en pression (Figure 51) en plusieurs segments (tranche de 33 à 50 bar, 50 à 75 bar, 75 à 100 bar et enfin à partir de 100 bar) et nous avons calculé la concentration maximale atteignable pour chaque niveau de pression est calculée et vaut respectivement 699, 985, 1228 et 1275 mol/m³. La Figure 53 représente donc un profil de la dissolution du CO₂ dans le milieu prenant en compte la pressurisation.

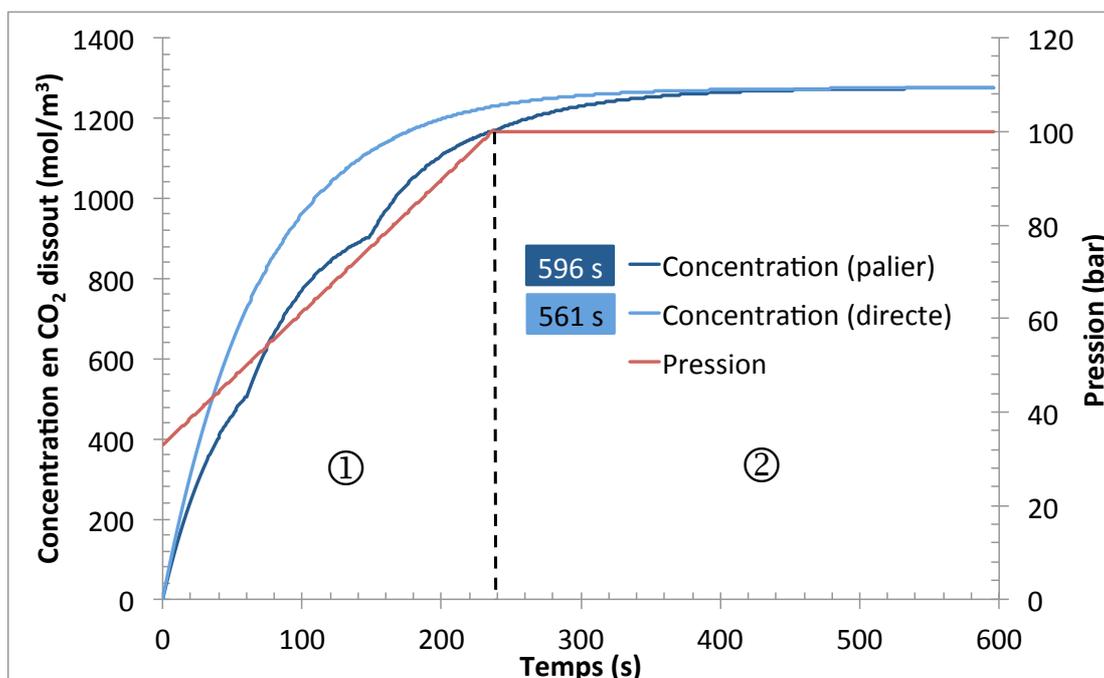


Figure 53 : Evolution de la concentration en CO₂ dissout à 38°C au cours de la phase de pressurisation pour le petit batch avec l'agitateur assimilé à un paddle en considérant que la concentration maximale atteignable évolue avec la pression, sur les bases du modèle de Calderbank. Les temps dans les encadrés correspondent aux temps nécessaires à la dissolution totale du CO₂

Le temps de dissolution totale (t_{DT}) vaut environ 10 min quelle que soit la méthode de calcul choisie (par palier ou directe). A la fin de la pressurisation (4 min), on atteint une concentration de 1166 mol/m³, soit 91% de la concentration maximale (contre 97% pour l'évolution directe). Ces valeurs sont très proches. Sur une durée de pressurisation aussi courte, on peut considérer que le calcul direct est une bonne approximation de ce qui se passe dans le réacteur.

3.3. Dispositif GAS (grand batch)

Dans l'optique d'améliorer la dispersion du gaz dans le liquide et ainsi de diminuer les temps de transfert, nous avons travaillé avec un dispositif batch de plus grand volume agité différemment.

3.3.1. Caractérisation du grand batch

Une turbine type Rushton à 8 pales droites avec une admission du CO₂ entre chaque pale (soit 8 points d'introduction de 1 mm de diamètre), entraînée à 154 rpm, assure l'homogénéisation de la solution et l'introduction du CO₂. Les nombres adimensionnels caractéristiques de ce dispositif sont donnés dans le Tableau 51. Ce dispositif est dans un régime d'écoulement intermédiaire, qui passe d'une situation d'engorgement au début de la

pressurisation (de 1 à 40 bar environ) à une dispersion complète à la fin de la pressurisation (à partir de 85 bar environ). Le régime de dispersion complète tend à maximiser la surface de contact entre le CO₂ et la solution à traiter.

Tableau 51 : Valeurs des nombres adimensionnels définissant le régime de fonctionnement et l'écoulement pour le grand batch (avec un volume de solution de 41 mL)

P	Re	Fr	Na	Na _{e/c}	Na _{c/d}
bar	-	-	-	-	-
1	2348	0,017	3,9	0,070	0,020
33	2351		0,09		
50	2353		0,06		
75	2355		0,03		
100	2356		0,01		

Le mobile d'agitation correspond à la catégorie R1 proposée par Roustan (1991). Dans nos conditions expérimentales, son nombre de puissance associé vaut 4 (Roustan, 1991). Cette donnée est normalement associée à un réacteur avec chicanes. Cependant, devant les faibles variations de N_p dans la zone de Re concernée, nous avons choisi cette valeur. Dans le cas de ce réacteur, la montée en pression se fait de manière progressive sur 23 min selon le profil reproduit sur la Figure 54. Environ 365 g de CO₂ sont injectés. Le débit volumique du CO₂ varie de 1,6.10⁻⁴ à 4,1.10⁻⁷ m³/s lorsque la pression varie de 1 à 100 bar.

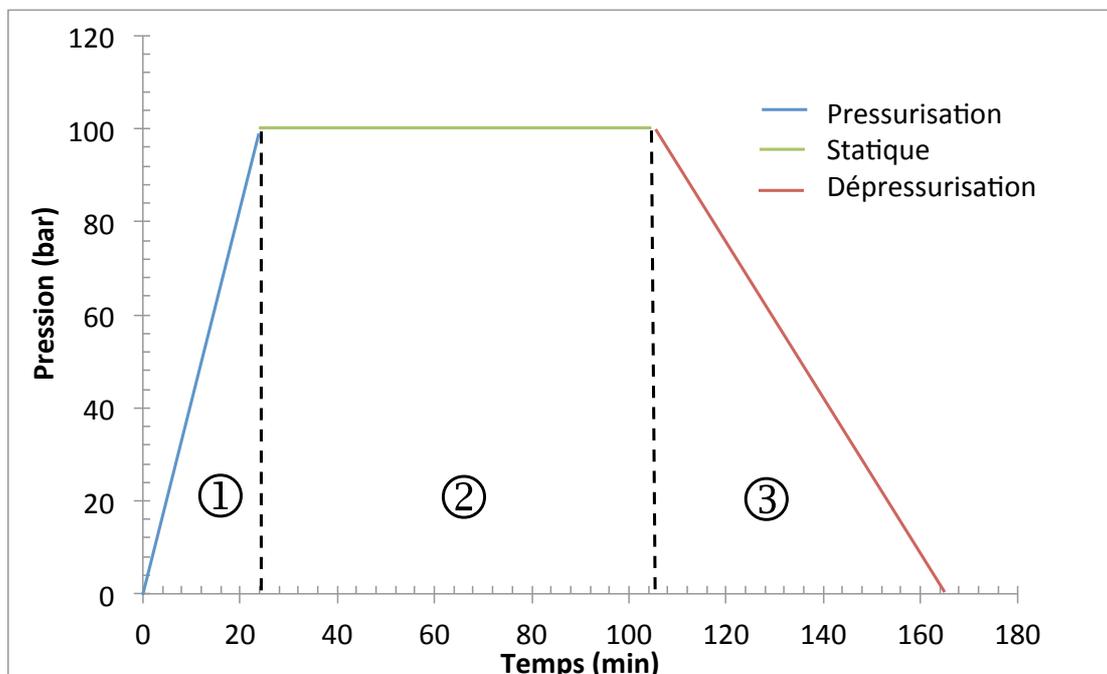


Figure 54 : Evolution de la pression au cours d'un traitement à 38°C et 100 bar avec le grand batch pour 41 mL de solution traitée, la phase statique dure 75 min

3.3.2. Choix du modèle et impact sur les temps caractéristiques

Le Tableau 52 détaille les valeurs caractéristiques de l'hydrodynamique dans le grand batch selon les corrélations sélectionnées. De manière générale, la puissance délivrée par l'agitateur du grand batch est plus importante (d'un facteur 10) que celle du petit. Il en découle, des temps caractéristiques (t_c , t_M , t_m) plus courts. Le temps de macromélange (t_M) est supérieur au temps de micromélange (t_m), ce sont donc les phénomènes de convection qui gouvernent l'homogénéisation de la solution.

Le temps de transfert du CO₂ diffère notablement avec le modèle choisi. Sauf dans le cas de la corrélation de Calderbank, le temps de séjour du gaz dans la phase aqueuse (t_g) est du même ordre de grandeur (calcul selon Van't Riet) ou bien inférieur (calcul selon Ferreira) au temps de transfert du gaz vers le liquide (t_{tr}). Le CO₂ a à peine ou n'a pas le temps de se transférer depuis les bulles vers la solution durant le temps que dure l'ascension des bulles. L'essentiel du CO₂ se retrouve dans le ciel du réacteur avant de se dissoudre progressivement dans le milieu via la surface du liquide.

Si on analyse la pertinence des modèles par rapport à la configuration de ce batch, on s'aperçoit que le ratio P_G/V_L varie entre 483 et 2136 W/m³ avec la pression dans le cas du grand batch. Ces variations sont comprises dans la gamme d'applicabilité de la formule de Van't Riet (de 500 à 10000 W/m³). Cette corrélation est adaptée pour décrire le transfert de masse du CO₂. C'est donc cette corrélation qui sera utilisée pour le grand batch.

Tableau 52 : Temps caractéristiques du grand batch pour un volume traité de 41 mL en fonction des corrélations choisies à 100 bar (l_k : longueur de Kolmogorov, P : puissance d'agitation, ε : rétention gazeuse, t_c : temps de circulation, t_M : temps de macromélange, t_m : temps de micromélange, t_g : temps de séjour du gaz dans la phase liquide, t_{tr} : temps de transfert de CO₂)

	Unités	Grand batch			Petit batch
		Van't Riet	Ferreira	Calderbank	Calderbank
N_p	-	4			2
l_k	μm	70			111
P_G	W	$8,8 \cdot 10^{-2}$			$9,7 \cdot 10^{-3}$
$k_L a$	s ⁻¹	$9,2 \cdot 10^{-3}$	$6,6 \cdot 10^{-4}$	$1,6 \cdot 10^{-2}$	$1,4 \cdot 10^{-2}$
t_c	s	1,0			1,2
t_M	s	5,0			6,0
t_m	s	1,3			3,7
t_g	s	106			78
t_{tr}	s	109	1521	61	73

A partir de la valeur du $k_L a$ donnée par la formule de Van't Riet, la cinétique de dissolution du CO₂ au cours du temps a été estimée. La Figure 55.a montre l'évolution de la

concentration en CO₂ dissout dans le cas du grand batch pour un traitement de 75 min à 38°C et 100 bar. D'après l'allure de la courbe, en considérant que le réacteur est directement à 38°C-100 bar, la dissolution est plus rapide que si on prend en compte l'évolution de la concentration à saturation et du $k_L a$ en fonction de la pression. A la fin de la pressurisation (au bout de 23 min), la concentration en CO₂ dissout vaut 1224 mol/m³ pour l'hypothèse des paliers, soit 96% de la concentration à saturation. Il faut 7 min de plus (soit 30 min après le début de la pressurisation) pour atteindre la concentration de saturation (1275 mol/m³).

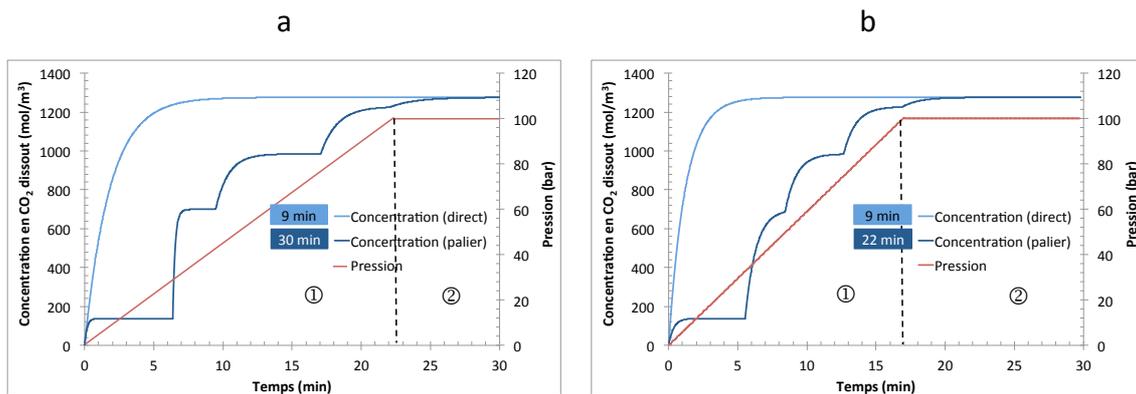


Figure 55 : Evolution de la concentration en CO₂ dissout au cours des différentes phases du procédé (① pressurisation, ② statique) (a) pour 41 mL traités avec le grand batch selon le modèle de Van't Riet et (b) pour 19 mL traités avec le petit batch selon le modèle de Calderbank

En comparaison, le petit batch (Figure 55.b) avec une durée de pressurisation de 17 min atteint également 96% de la concentration à saturation à l'issue de cette étape. Les profils sont similaires. Dans les deux cas, la concentration maximale atteignable est atteinte avant la fin de chaque palier. Les vitesses de pressurisation de 4,4 et 5,9 bar/min imposées respectivement sur les Figure 55.a et Figure 55.b ne sont donc pas optimales pour atteindre la concentration à saturation accessible à la fin de chaque palier. En revanche, la vitesse de 25 bar/min, appliquée sur la Figure 53 ne permet pas d'atteindre la concentration maximale de chaque palier, elle serait donc trop rapide. Dans une idée de minimisation du temps de dissolution, il faudrait que la concentration maximale de chaque niveau de pression soit atteinte sans observer de palier à cette concentration. Cependant, plus la vitesse de pressurisation est importante, plus cela permet de se rapprocher du profil de dissolution direct, sans palier. Ce profil impose la différence de concentration la plus forte dans l'équation (27) et donc induit la cinétique de dissolution la plus rapide. Expérimentalement on favorisera donc des vitesses de pressurisation plutôt de l'ordre de la quinzaine de bar/min de manière à avoir une cinétique de dissolution la plus rapide possible et ainsi atteindre la concentration à saturation le plus vite possible.

3.3.3. Effet du dispositif sur la pasteurisation

Le Tableau 53 récapitule les différentes réductions décimales observées au cours d'expériences menées sur les deux dispositifs batch. La référence notée GAS se rapporte au dispositif « grand batch ».

D'après le Tableau 53, des temps de contact (t_{CO_2}) plus longs induisent de meilleures réductions décimales. Les expériences GAS 1 et 2 ($t_{CO_2} \pm 160$ min) aboutissent à une pasteurisation totale tandis que GAS 3 et 4 (t_{CO_2} de 88 min) offrent une réduction totale de l'ordre de -5 log. En outre, le grand batch aboutit à de meilleurs degrés d'inactivation que le petit batch, toutes conditions étant égales par ailleurs.

L'allure des courbes de dissolution du CO_2 que ce soit avec le petit (Figure 55.b qui représente l'expérience P 2) ou le grand batch (Figure 55.a qui représente l'expérience GAS 1) ne permet d'expliquer l'amélioration apportée par des temps de contact plus longs. En effet, la concentration à saturation est presque atteinte à la fin de la pressurisation pour les deux dispositifs. Donc un temps de contact plus long ne permet pas de dissoudre une quantité de CO_2 significativement plus importante. Des phénomènes, autres que la dissolution du CO_2 , doivent donc agir sur l'inactivation dans la solution.

Tableau 53 : Résultat des expériences menées à 38°C et 100 bar sur les réacteurs batch. d_p : durée de la pressurisation, d_s : durée du statique, t_{CO_2} : le temps de contact total de la solution avec le CO_2 et V_L/V_r : ratio entre le volume de liquide traité et le volume du réacteur

	d_p	d_s	t_{CO_2}	V_L	V_L/V_r	Log (N/N ₀)			Réduction décimale totale	Taux de conservation vit C
	min	min	min	mL	-	<i>E. coli</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>L. innocua</i>		
Expériences avec le grand batch										
GAS 1 (n=2)	23	75	156	41	0,12	-9* ± 0,0	-7* ± 0,0	-8* ± 0,0	-9,2*	87%
GAS 2	23	75	176	82	0,24	-9,1*	-7,3*	-8,4*	-9,2*	100%
GAS 3	23	2	89	41	0,12	-4,9	-4,3	-9*	-5,1	100%
GAS 4	23	2	86	82	0,24	-5,6	-4	-8*	-5,5	77%
Expériences avec le petit batch										
O5 (n=10)	4	75	82	19	0,38	-3,2 ± 0,6	-2,2 ± 1,0	-7,0 ± 1,7	-3,2 ± 1,1	89%
P2	17	75	154	19	0,38	-4,1	-2,5	-6*	-3,8	71%
P3 (n=2)	17	75	154	9,5	0,19	-10* ± 0,0	-7* ± 0,7	-9* ± 0,7	-10,7* ± 0,4	85%
P4	4	75	82	9,5	0,19	-6,1	-3,1	-7,3	-5,8	93%
P5	16	75	142	9,5	0,19	<-4	-2,6	-4,7	-4,1	92%
P6	12	75	127	9,5	0,19	-10*	-4,3	-7,2	-7,8	79%
P5 : 30°C - 100 bar P6 : 38°C - 80 bar							ND : non déterminé * inactivation totale			

Contrairement au plan d'expériences exposé dans le chapitre 2, on se focalise désormais sur la durée totale de contact avec le CO₂ plutôt que sur la durée de la phase statique. Pour un même temps de contact, le traitement se fait de manière différente du grand batch au petit batch. C'est notamment le cas sur les expériences au temps de contact court. Pour le grand batch, la période de statique ne dure que 2 min contre 75 min dans le cas du petit batch. On pourrait penser que cela joue en défaveur de l'inactivation. En effet, on a vu qu'il fallait 30 min pour atteindre la concentration à saturation en CO₂ (Figure 55.a). Après 25 min de temps de contact avec le CO₂, moment où l'on commence à dépressuriser, la concentration à saturation du CO₂ dans le milieu n'a pas été atteinte. Pourtant, pour un temps court de l'ordre de 82 min (2 min de statique pour le batch et 75 min de statique pour le petit batch), les expériences GAS 3 (82 mL) et 4 (41 mL) aboutissent à des réductions décimales totales de -5,1 et -5,5 contre -3,2 pour l'équivalent petit batch (19 mL, expérience O5) et -5,8 (9,5 mL, expérience P4). Pour les expériences avec un temps de contact long de l'ordre de 150 min (expériences GAS 1 et 2), le profil expérimental est identique pour les deux batchs : pressurisation lente, période de statique de 75 min suivie d'une dépressurisation lente. Mais les expériences menées sur le grand batch affichent une inactivation totale des microorganismes, alors que ce n'est pas le cas que pour l'expérience P3 conduite avec le petit batch. Les temps de contact longs sont les seuls qui ont permis de pasteuriser totalement à 38°C et 100 bar.

Au cours des essais sur le grand batch, nous avons constaté que travailler sur un volume de solution plus faible permettait d'atteindre un niveau d'inactivation meilleur. Cette constatation a motivé des essais avec différents ratios V_L/V_r sur le petit batch. Pour un temps de contact court, l'expérience P4 (9,5 mL) induit une réduction décimale totale de -5,8 soit près de 2 logs de mieux que l'expérience O5 (19 mL). Pour un temps de contact long, les résultats sont encore plus significatifs. L'expérience P3 (9,5 mL) pasteurise totalement tandis que la P2 (19 mL) n'aboutit qu'à une réduction décimale totale de -3,8. Nous avons vu au cours de l'étude de sensibilité, qu'un volume plus faible, permettait d'atteindre des temps de transfert plus courts. Courts. On passe de 73s à 53s, conduisant alors à une saturation encore plus rapide de la solution en CO₂. Néanmoins, la durée de cette étape de dissolution est très courte devant le temps du traitement de 75min. Le meilleur –ou le plus rapide– mélange entre la solution et le CO₂ ne peut expliquer les différences notables observées sur l'inactivation, à moins d'avoir sous-évalué de façon significative les temps de transferts.

4. Miniréacteur continu

Dans l'optique de s'affranchir des corrélations pour estimer les temps de diffusion, nous avons mis au point un mini dispositif continu, dans le lequel la solution à traiter est injectée dans un flux continu de CO₂. La formation d'une alternance de segments de solution et de CO₂ permet d'améliorer le contact entre le CO₂ et le milieu en augmentant le ratio CO₂/solution. Cette configuration permet de considérer une longueur caractéristique de diffusion nettement plus petite et d'obtenir une surface d'échange plus importante.

4.1. Caractérisation du dispositif continu

La configuration du dispositif mis au point au laboratoire est décrite dans la partie 2 de ce manuscrit. Rappelons qu'il s'agit d'un tube de 4,7 m de long de diamètre intérieur 1,5 mm, dans lequel le CO₂ circule en un flux continu. La phase liquide est injectée via une pièce en Té. Dans la mesure où le complément *Jambes Légères* est turbide, il a été centrifugé (5 min à 4000 rpm) avant d'être utilisé afin d'éviter un colmatage du système. En outre, pour s'affranchir d'un éventuel risque de précipitation, la vitamine C et l'acide gallique n'ont pas été ajoutés à l'échantillon. Les solutions traitées par ce dispositif sont donc composées de 18 mL de *Jambes Légères* centrifugé et de 1 mL de bouillon enrichi pour chaque microorganisme (*E. coli*, *L. innocua* et *S. cerevisiae*).

Dans ce dispositif, le débit de CO₂ n'est pas directement mesuré. C'est le débit du gaz détendu en sortie de dispositif qui l'est. Le calcul de la vitesse dans le tube se fait après avoir converti ce débit gazeux en débit massique et en tenant compte de la masse volumique à la température et pression du réacteur, selon la formule suivante :

$$v_G = \frac{Q_m}{\rho_G \cdot S} \quad (52)$$

où Q_m (kg/s) est le débit massique en CO₂. On considère que la vitesse du CO₂ gouverne la vitesse de l'écoulement dans le tube. Le temps de séjour a donc été calculé à partir de la vitesse du CO₂. Le calcul du nombre de Reynolds de ce dispositif se fait à partir de la formule :

$$Re = \frac{\rho_L v_f d}{\eta_L} \quad (53)$$

où v_f est la vitesse du flux, associée ici à la vitesse du CO₂. En microfluidique, les gammes de Reynolds sont différentes. Un écoulement est considéré comme laminaire si Re < 2300. L'écoulement sera turbulent pour les valeurs au-delà. Si Re < 1, on parle d'écoulement de

Stokes, il est dominé par les forces de viscosité et les gradients de pressions. Dans nos conditions (Tableau 54), le régime est laminaire.

Dans le Tableau 54, la vitesse du liquide correspond à celle dans le capillaire d'alimentation en liquide, calculée d'après le débit volumique de la pompe qui délivre la solution. Les expériences C4 et C5 ont été menées en arrêtant le flux (*stop flow*) une fois le volume total de l'échantillon injecté dans le réacteur.

Tableau 54 : Résultat des expériences menées sur le dispositif continu

Exp	T	P	Re	Q _m	Vitesse CO ₂	Vitesse liquide	Temps de séjour	Log (N/N ₀)		
	°C	bar	-	g/min	m/sec	m/sec	sec	<i>E. coli</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>L. innocua</i>
C1 (n=3)	38	100	59	2,0	0,027	0,015	110	-1,9 ± 0,5	-1,4 ± 0,2	-1,9 ± 0,1
C2	50	100	90	1,4	0,033	0,017	94	-1,8	-2	-2,4
C3	38	100	35	1,1	0,016	0,009	189	-0,9	-1,3	-1,5
C4	38	100	79	2,5	0,036	0,021	30 min	-2,6	-2,7	-2,4
C5	38	100	68	2,2	0,031	0,019	60 min	-3,4	-2	-4,3

Bien que la microfluidique des gouttes soit réputée pour sa cinétique de mélange rapide et ses temps de réaction raccourcis (Teh et al., 2008), il apparaît clairement qu'un temps de séjour inférieur à 3 min dans le réacteur est insuffisant pour induire une inactivation totale. Comme nous ne pouvons diminuer d'avantage le débit de CO₂, ni augmenter la longueur du tube, l'astuce du *stop-flow* a été retenue afin d'augmenter le temps de contact entre la solution et le CO₂. On voit qu'il faut entre 30 et 60 min pour retrouver les niveaux d'inactivation que l'on observe habituellement à 100 bar et 38°C.

4.2. Simulation numérique

Pour comprendre ces effets, une simulation numérique, réalisée par Arnaud Erriguible du laboratoire ICMCB (CNRS UPR 9048), a été conduite à l'aide du code de calcul Thétis développé au laboratoire I2M (Bordeaux, France). Elle prend en compte les vitesses des fluides (CO₂ et *Jambes Légères*) pour déterminer comment s'agencent les deux phases après la réunion des lignes liquide et CO₂. La configuration dépend notamment de la tension de surface entre les deux fluides et de leur mouillabilité vis à vis du matériau du réacteur (Guillaument et al., 2013).

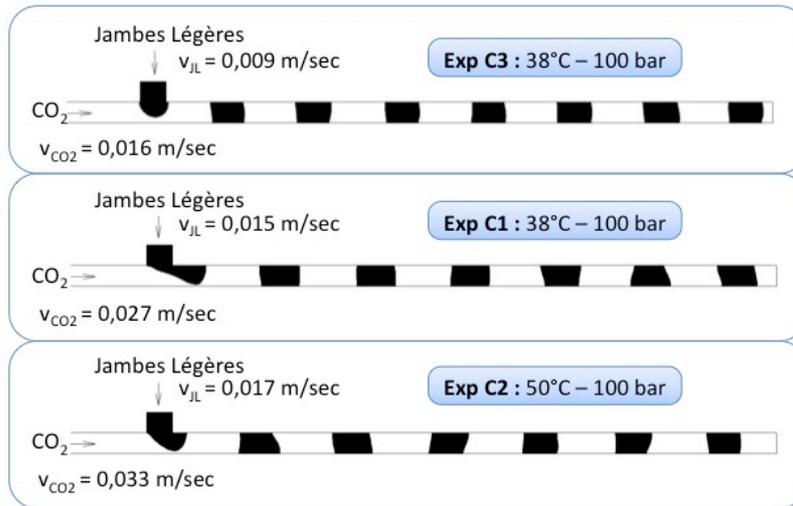


Figure 56 : Représentation de la répartition des flux de CO₂ et de *Jambes Légères* pour les expériences C1, C2 et C3 avec une tension de surface de 18 mN/m

Dans nos conditions expérimentales, les simulations (Figure 56) montrent que les 2 phases se répartissent en train de gouttes après la jonction en Té. Il y a alternance entre des segments de CO₂ et de *Jambes Légères*. Les segments de *Jambes Légères* et les segments de CO₂ sont du même ordre de grandeur (respectivement 2,8 mm et 4,7 mm) quelles que soient les conditions. Il est normalement possible de modifier la taille des gouttes sur un système en jonction Té en jouant sur le ratio des débits, le ratio des viscosités ou le diamètres des voies d'injection (Teh et al., 2008). De manière générale, la taille des segments de *Jambes Légères* (*slug*) augmenterait avec le débit du liquide et la longueur des segments de CO₂ (*plug*) augmenterait avec le débit de CO₂ (Cubaud et al., 2012).

4.3. Influence de la surface d'échange, comparaison avec les dispositifs batch

En fonction du dispositif considéré, la surface de contact entre le CO₂ et le milieu à traiter varie. La Figure 57 représente la répartition entre le CO₂ et la solution. Pour les configurations batch, la surface de contact regroupe à la fois les bulles dispersées dans le liquide ainsi que l'interface liquide-ciel. Une fois l'étape de pressurisation terminée, cette surface de contact se réduit à uniquement à l'interface ciel-liquide. Dans le cas de notre dispositif continu, la surface de contact entre le CO₂ et le milieu à traiter correspond à 2 fois la section du réacteur, soit $3,5 \cdot 10^{-6} \text{ m}^2$, par petit volume de goutte ($\pm 5 \cdot 10^{-9} \text{ m}^3$), soit une aire d'échange de $\pm 727 \text{ m}^2/\text{m}^3$.

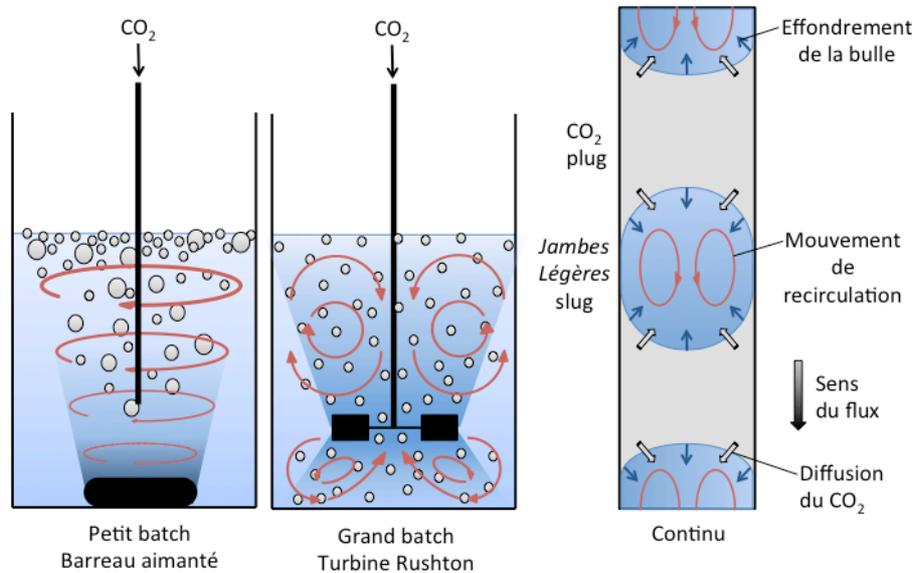


Figure 57 : Représentation de la dispersion du CO₂ après son introduction dans le milieu

La comparaison de l'interface gaz-liquide par volume à traiter est présentée dans le Tableau 55, au regard de la réduction décimale. Dans l'idéal, il est préférable de maximiser le ratio de manière à obtenir les meilleures performances. Cela passe soit par un abaissement du volume traité (V_L), soit par une augmentation de la surface de contact (S_c) par le biais de l'agitation ou de la configuration expérimentale.

Tableau 55 : Comparaison de l'interface gaz-liquide par volume à traiter selon le dispositif et des réductions décimales associées à un traitement à 38°C-100 bar (V_L : volume de solution, t_{CO_2} : temps de contact avec le CO₂, S_c : surface de contact gaz-liquide, $a = S_c/V_L$)

Exp n°	V_L m ³	S_c m ²	a m ² /m ³	t_{CO_2} min	Log (N/N ₀)			Réduction décimale totale	
					<i>E. coli</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>L. innocua</i>		
Petit batch	O5	1,9.10 ⁻⁵	6,2.10 ⁻⁴	32	82	-3,2	-2,2	-7	-3,2
	P2	1,9.10 ⁻⁵	6,2.10 ⁻⁴	32	154	-4,1	-2,5	-6*	-3,8
	P3	9,5.10 ⁻⁶	6,2.10 ⁻⁴	65	154	-10*	-7*	-9*	-10,7*
	P4	9,5.10 ⁻⁶	6,2.10 ⁻⁴	65	82	-6,1	-3,1	-7,3	-5,8
Grand batch	GAS 1	4,1.10 ⁻⁵	1,5.10 ⁻³	37	156	-9*	-7*	-8*	-9,2*
	GAS 2	8,2.10 ⁻⁵	1,5.10 ⁻³	19	176	-9*	-7*	-8*	-9,2*
	GAS 3	4,1.10 ⁻⁵	1,5.10 ⁻³	37	89	-4,9	-4,3	-9*	-5,1
	GAS 4	8,2.10 ⁻⁵	1,5.10 ⁻³	19	86	-5,6	-4	-8*	-5,5
Continu	C1	4,9.10 ⁻⁹	3,5.10 ⁻⁶	727	2	-1,9	-1,4	-1,9	-1,9
	C4	4,9.10 ⁻⁹	3,5.10 ⁻⁶	727	30	-2,6	-2,7	-2,4	-2,5
	C5	4,9.10 ⁻⁹	3,5.10 ⁻⁶	727	60	-3,4	-2	-4,3	-3,6

*inactivation totale

Dans le cas du petit batch, une augmentation du ratio (a) entraîne une inactivation plus forte des microorganismes. Au moins 2 unités sont gagnées sur la réduction décimale

totale, avec au moins 3 unités de mieux pour *E. coli* et 1 unité pour *S. cerevisiae* quel que soit le temps de contact. En revanche dans le cas du grand batch, une augmentation du ratio n'induit pas une meilleure inactivation (variations de l'ordre de l'incertitude expérimentale). Toutefois, le α calculé de cette manière néglige la surface de contact induite par la dispersion du gaz dans la matrice au cours de la phase de pressurisation. Pourtant, d'après l'analyse de la cinétique de dissolution du CO₂ dans le milieu (Figure 53 et Figure 55), le temps de contact avec le CO₂ devrait masquer tout autre effet de la dissolution, puisque dans tous les cas, la concentration à saturation est atteinte dans les 10 premières minutes de traitement. Pour autant, cela ne suffit pas à provoquer l'inactivation. Dans le cas du continu, bien que le ratio α soit nettement supérieur à ceux des dispositifs batch, la réduction décimale totale est au mieux du même ordre de grandeur. On peut calculer le temps de diffusion pour un segment de *Jambes Légères* en se basant sur l'expression (Na, 2013):

$$t_D \sim \frac{x^2}{2 \cdot D_{CO_2}} \quad (54)$$

où x correspond à la demi distance entre deux segments de CO₂, c'est à dire à la moitié de la longueur d'un segment de *Jambes Légères*. Le temps de diffusion à travers les segments vaut alors environ 4 min 50. Le CO₂ n'a donc pas le temps de diffuser dans tout le segment lors de l'expérience C1. On peut penser que seuls les microorganismes en périphérie du segment ont été au contact du CO₂ et soumis à son effet inactivateur. Si on laisse un temps de contact beaucoup plus longs (30 et 60 min, comme dans les expériences C4 et C5) la diffusion du CO₂ se fait dans tout le segment. La composition du segment de liquide est homogène et plus de microorganismes sont atteints. Nous avons envisagé l'hypothèse où la tension de surface jouerait sur la longueur ou la géométrie des gouttes et affecterait ainsi l'inactivation. Cependant, des simulations menées avec une tension de surface de 46 mN/m montrent des longueurs de segments similaires. Les temps de diffusion seront donc équivalents.

4.4. Intérêt du ratio CO₂/échantillon

Dans le cadre des dispositifs continus, plusieurs auteurs se sont penchés sur l'influence du ratio CO₂/échantillon. (2001) a estimé la concentration en CO₂ dissous au moyen du coefficient d'absorption de Kuenen. Il a associé cette concentration avec le ratio des débits massiques d'alimentation en CO₂ et en échantillon (exprimés en g/min). Il a montré qu'à 35°C et 100 bar, un ratio supérieur à 0,25, permet de presque atteindre la concentration de saturation en CO₂. Pour être sûr de saturer la solution en CO₂, il conseille

de se placer à un ratio d'au moins 0,35. Dans notre cas, le ratio varie entre 0,8 et 1,2. Nous sommes donc bien dans des conditions favorables à la saturation du milieu en CO₂. Il a également corrélé la quantité de CO₂ dissous à la réduction décimale et conclu qu'il existait une relation linéaire entre les deux. Au moyen d'un plan de Box-Behnken (2009) ont étudié l'influence de la température (20 à 40°C), de la pression (138 à 345 bar) et du pourcentage massique de CO₂ (de 7 à 13%) sur la réduction décimale. L'analyse des résultats par RSM a montré que seul le pourcentage massique de CO₂ et l'interaction entre ce pourcentage et la température avaient un effet significatif sur la réduction décimale. Ils soulignent que la solubilité et la vitesse de solubilisation du CO₂ augmentent avec la pression (Dodds et al., 1956) mais que l'efficacité du traitement est limitée par la concentration de saturation du milieu en CO₂. Ainsi, à partir du moment où le milieu a été saturé en CO₂, augmenter la pression ou la température n'implique pas d'améliorations significatives de l'inactivation en microorganismes. L'équipe de Yuk, Geveke et Zhang (2010) a travaillé sur un système de pasteurisation sous CO₂ pressurisé via un contacteur métallique poreux gaz-liquide. A partir de ce dispositif, ils ont montré qu'une hausse du ratio massique CO₂/cidre induit une réduction décimale plus forte. A 38°C et 76 bar, la réduction décimale évolue de -1 pour un ratio de 3% à -6 pour un ratio de 8%.

Le ratio de CO₂ injecté par rapport au volume de solution à traiter est donc un facteur clé en corrélation avec la concentration en CO₂ dissous pour l'efficacité du procédé de pasteurisation par CO₂ pressurisé. Nous injectons un large excès de CO₂ par rapport à la quantité de solution à traiter, principalement à cause du ciel présent dans le réacteur qu'il faut remplir pour atteindre la pression désirée. Grâce à cet excès nous sommes sûrs de pouvoir atteindre la concentration de saturation de CO₂ dans le milieu aqueux et ainsi d'assurer les meilleurs niveau d'inactivation possibles dans les conditions imposées.

5. Conclusion

Cette étude sous l'angle du génie des procédés devait nous apporter une compréhension plus fine des mécanismes mis en jeu et nous permettre d'interpréter de manière plus pertinente l'efficacité du procédé. La cinétique globale de la pasteurisation par CO₂ pressurisé peut être décomposée en différentes étapes ayant chacune des temps caractéristiques propres :

- transfert du CO₂ de la phase gaz vers la phase liquide (associé à la dissolution du CO₂)
- réaction du CO₂ avec l'eau pour former l'acide carbonique
- dispersion du CO₂ ou de l'acide carbonique de manière homogène au sein de la matrice liquide
- temps de réponse des microorganismes en prenant en compte un retard à l'inactivation par rapport à la perméabilisation, comme dans le cas de Spilimbergo et al. (2009)

Le Tableau 56 propose une comparaison des temps caractéristiques de chaque étape selon le dispositif envisagé.

Tableau 56 : Ordre de grandeur des temps caractéristiques des étapes de l'inactivation par CO₂ pressurisé, les temps sont donnés à partir du début de l'injection du CO₂ dans le milieu

Etape	Petit batch	Grand batch	Continu
Transfert CO₂ (g) → CO₂ (l)	1 min	2 min	3 sec
Dissolution totale	10 min	30 min	5 min
Réaction CO₂+H₂O → H₂CO₃	0,05 sec		
Homogénéisation du milieu	6 sec Contrôlée par convection	5 sec Contrôlée par convection	non pertinent
Perméabilisation ^a	± 5min (dépend de l'espèce)		
Inactivation ^a	± 10 min		
^a donnée extraite à partir de la littérature et ne correspondant pas forcément à ce que nous avons pu observer avec nos dispositifs			

La cinétique de dissolution ne relève pas que de données physico-chimiques, comme les propriétés du liquide traité (Figure 58). En effet, nous avons pu constater l'importance de la configuration expérimentale, notamment via la comparaison du mini réacteur continu avec les dispositifs batch. En outre un intérêt particulier doit être porté à la qualité de l'agitation, que ce soit en termes de vitesse que de choix du type de mobile. Il est intéressant de privilégier des dispositifs assurant une bonne dispersion du CO₂ dans la phase liquide pour accélérer le transfert de masse du CO₂ de la phase gaz vers la phase liquide. A cette fin, il peut être intéressant d'envisager d'utiliser des filtres pour disperser le CO₂ en fines bulles au sein du liquide.

La concentration en CO₂ dissous est un élément clé de l'inactivation. La concentration à saturation régit la cinétique de dissolution du CO₂ puisque c'est l'écart entre la concentration en CO₂ dissous et la concentration à saturation qui sert principalement de moteur à la cinétique de dissolution du CO₂. Elle contrôle également la cinétique d'inactivation des microorganismes, puisque c'est elle qui engendre les réactions successives menant à la mort des microorganismes. Dans la mesure où la solubilité du CO₂ dépend du

niveau de température et de pression des traitements, ainsi que la nature de la solution, on peut dès lors comprendre que des niveaux d'inactivation différents soient obtenus dans la littérature selon le temps de traitement imposé et l'efficacité de l'agitation. Plusieurs auteurs ont constaté un début d'inactivation uniquement à partir de 2 min (Spilimbergo and Mantoan, 2006). En général pour une température et une pression autour de 35-38°C et 100 bar, la réduction décimale dépasse rarement l'unité dans les 5 premières minutes de traitement (Garcia-Gonzalez et al., 2010a; Wu et al., 2007). C'est cohérent avec ce que nous avons pu observer en terme de cinétique de dissolution du CO₂ dans la matrice liquide.

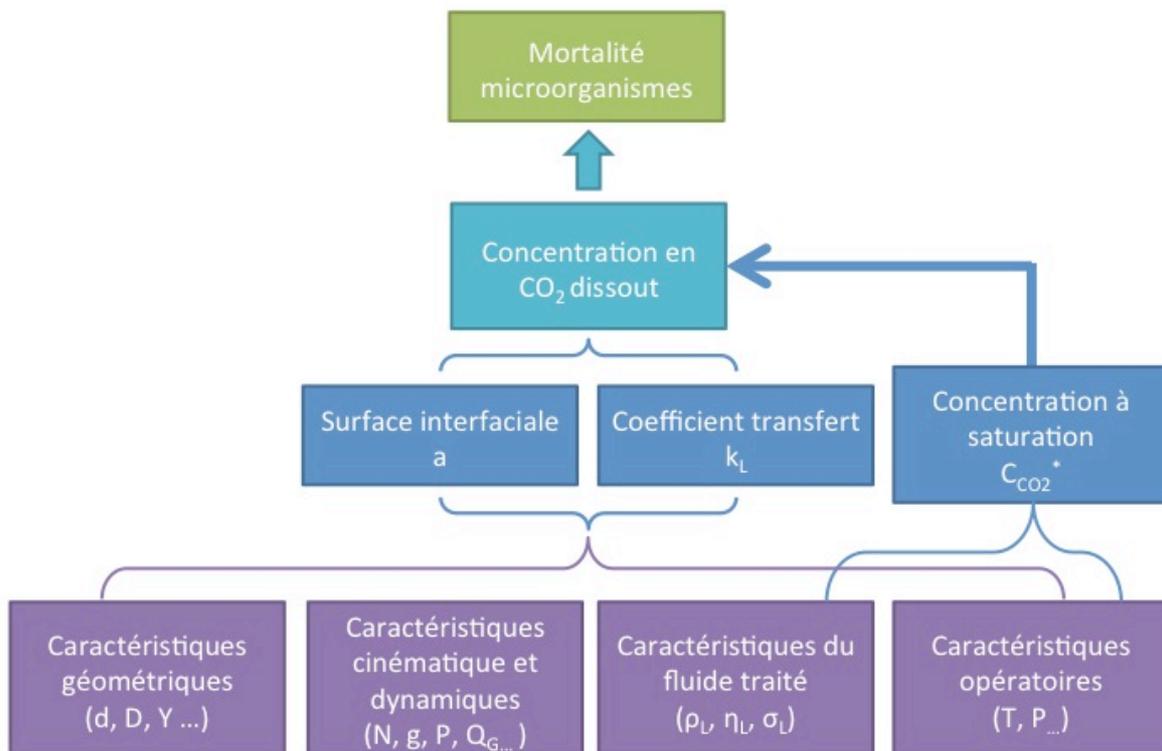


Figure 58 : Récapitulatif des paramètres influents sur les temps de transfert et la cinétique d'inactivation

Chapitre 4 : Modification du milieu et impact sur l'inactivation des microorganismes

La littérature fait état de sensibilité variables des microorganismes au traitement CO₂ selon la nature (solide ou liquide) et la composition de la matrice dans laquelle ils étaient dispersés (Garcia-Gonzalez et al., 2007; Kim et al., 2008). Au cours de ce chapitre nous avons réalisé des essais visant à :

- déterminer si la charge microbienne de la matrice a un impact sur l'inactivation ;
- abaisser les conditions de traitement dans le cas d'une charge microbienne plus faible ;
- déterminer l'importance de la nature de la matrice, notamment en terme de composition sur l'inactivation ;
- essayer de stériliser une matrice contaminée avec des spores.

Sommaire du chapitre 4

1. Influence de la contamination initiale	247
2. Influence de la composition de la matrice utilisée	251
2.1. Impact de la matrice.....	251
2.2. Impact de la concentration en vitamine C.....	253
3. Germination des spores de <i>Bacillus subtilis</i>	256
3.1. Activation de la germination des spores	256
3.2. Essais de stérilisations	257
4. Conclusion	258

1. Influence de la contamination initiale

L'influence de la charge initiale en microorganismes sur l'efficacité du traitement CO₂ a été explorée. Des échantillons contenant des concentrations variables en microorganismes ont été soumis à un traitement modéré (38°C, 100 bar et 75 minutes). Pour chaque traitement, les 3 espèces sont présentes mais à des concentrations différentes (Tableau 57).

Tableau 57 : Charge avant (N₀) et après traitement (N) en chaque microorganisme par expérience (R : reproduction)

Exp	N ₀ (UFC/mL)			Proportions des populations			N ₀ totale	
	<i>E. coli</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>L. innocua</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>L. innocua</i>	UFC/mL	log
D1	2,4.10 ⁹	2,5.10 ⁷	1,7.10 ⁹	58,8%	0,6%	40,6%	4,1.10 ⁹	9,6
D2	3,0.10 ⁹	1,8.10 ⁷	2,0.10 ⁹	59,3%	0,4%	40,3%	5,0.10 ⁹	9,7
D3	7,6.10 ⁸	5,2.10 ⁶	2,8.10 ⁸	73,1%	0,5%	26,4%	1,0.10 ⁹	9,0
D4	2,0.10 ⁸	1,9.10 ⁶	5,8.10 ⁷	77,2%	0,7%	22,1%	2,6.10 ⁸	8,4
D5	7,8.10 ⁵	1,8.10 ⁴	9,1.10 ⁴	87,7%	2,0%	10,3%	8,8.10 ⁵	5,9
D5R	8,2.10 ⁵	1,0.10 ⁴	7,8.10 ³	97,8%	1,2%	0,9%	8,4.10 ⁵	5,9
D6	9,3.10 ³	5,0.10 ¹	4,5.10 ²	94,9%	0,5%	4,6%	9,8.10 ³	4,0
Exp	N (UFC/mL)			Proportions des populations			N totale	
	<i>E. coli</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>L. innocua</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>L. innocua</i>	UFC/mL	log
D1	1,0.10 ⁷	9,1.10 ⁵	1,9.10 ³	92%	8%	0%	1,1.10 ⁷	7,0
D2	7,6.10 ⁶	6,5.10 ⁵	0	92%	8%	0%	8,3.10 ⁶	6,9
D3	3,0.10 ⁵	2,7.10 ⁴	0	92%	8%	0%	3,3.10 ⁵	5,5
D4	3,5.10 ⁴	5,0.10 ⁴	0	41%	59%	0%	8,5.10 ⁴	4,9
D5	0	0	0	0%	0%	0%	0	0
D5R	0	0	0	0%	0%	0%	0	0
D6	0	0	0	0%	0%	0%	0	0

La réduction totale a ensuite été mesurée et analysée en fonction de la charge initiale. Les valeurs sont données sur la Figure 59.a. Sur la Figure 59.b, les populations par espèce ont été regroupées par charge initiale du même ordre de grandeur. Par exemple, la réduction associée à la charge initiale de 9 log en *E. coli* a été calculée à partir de la moyenne des expériences D1, D2 et D3.

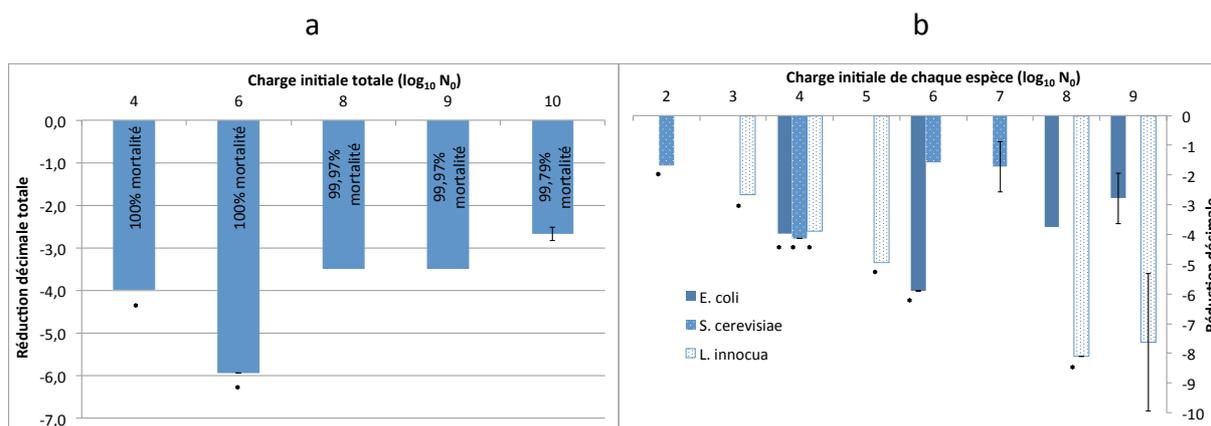


Figure 59 : Effet après un traitement de 75 min à 38°C et 100 bar de la (a) charge initiale totale sur la réduction décimale totale et selon (b) la charge initiale en chaque microorganisme (* pasteurisation totale)

D'après les résultats obtenus, nous constatons qu'un traitement de 75 min à 38°C et 100 bar permet l'inactivation totale d'une charge microbienne de l'ordre de $9 \cdot 10^5$ UFC/mL. Pour les charges supérieures, l'inactivation n'est pas totale mais dépasse en termes de concentration de microorganismes la valeur de $9 \cdot 10^5$ UFC/mL. Par ailleurs, pour ces charges importantes, la destruction est fonction du microorganisme utilisé. Pour *L. innocua* la destruction est totale quelque soit la charge initiale utilisée. En revanche, *E. coli* est relativement plus sensible que *S. cerevisiae*. En effet, la destruction obtenue est de l'ordre de 99,7% à 99,97% pour *E. coli* contre 96% à 99% pour *S. cerevisiae* selon la charge initiale (Tableau 57).

Des résultats semblables ont été cités par Tahiri et al. (2006) qui ont rapporté d'une part que l'efficacité du traitement est fonction de la charge microbienne initiale et d'autre part que *E. coli* est plus sensible que *S. cerevisiae*. L'hypothèse avancée pour expliquer ce phénomène serait que les charges microbiennes élevées agissent comme un écran. Les cellules sont alors moins exposées à la pression et donc moins touchées. Pour contrebalancer cet effet protecteur, des temps d'exposition plus longs au CO₂ sont requis (Erkmen, 2000a). Ces tendances rendent nos résultats plus cohérents avec ceux de la littérature qui montrent que des taux d'inactivation importants sont obtenus dans des conditions plus douces de température et de pression lorsque la charge microbienne est faible. Par ailleurs, il est important de préciser que dans notre cas un mélange de trois microorganismes différents est utilisé, ce qui représente une particularité par rapport à la littérature.

Afin de connaître l'incidence du mélange des trois microorganismes sur l'inactivation globale, nous avons réalisé des tests sur chaque microorganisme pris individuellement dans trois conditions différentes.

Tableau 58 : Effet de différents traitements sur la réduction décimale de chaque espèce présente seule dans le milieu ⁶ (* inactivation totale). Les lignes en vert correspondent aux réductions décimales observées sur les expériences avec les 3 microorganismes en même temps.

Exp	T °C	P bar	d min	V _d bar/min	<i>E. coli</i>			<i>S. cerevisiae</i>			<i>L. innocua</i>		
					N ₀	N	log N/N ₀	N ₀	N	log N/N ₀	N ₀	N	log N/N ₀
16	50	150	120	50	5.10 ⁷	0	-7,7*	1.10 ⁷	0	-7,1*	5.10 ⁶	0	-6,7*
					3.10 ⁸	0	-8,5*	1.10 ⁶	0	-6,2*	4.10 ⁷	0	-7,6*
05	38	100	75	30	6.10 ⁸	2.10 ⁴	-4,4	3.10 ⁷	0	-7,5*	3.10 ⁷	0	-7,4*
					3.10 ⁸	2.10 ⁶	-3,2 ± 0,6	3.10 ⁶	9.10 ⁴	-2,2 ± 1,0	1.10 ⁸	3.10 ⁵	-7,0* ± 1,7
1	25	50	30	10	5.10 ⁸	3.10 ⁸	-0,2	1.10 ⁷	1.10 ⁷	0	2.10 ⁷	6.10 ⁵	-1,4
					6.10 ⁸	1.10 ⁸	-0,8	2.10 ⁶	2.10 ⁶	-0,1	4.10 ⁵	0	-5*

D'après les résultats obtenus (Tableau 58), on remarque que l'inactivation de *L. innocua* n'est pas totale uniquement dans les conditions de traitement les plus douces avec 30 min à 25°C et 50 bar. En revanche, *E. coli* et *S. cerevisiae* ne sont totalement inactivées que dans les conditions les plus sévères de température et de pression (2 heures à 50°C et 150 bar). Pour *E. coli*, un traitement de 75 min à 38°C et 100 bar induit une réduction décimale de -4,4, légèrement supérieure à celle que l'on obtient lorsque les 3 microorganismes sont traités simultanément (-3,2 ± 0,6). Quant à *S. cerevisiae*, pour une charge initiale inférieure à 10⁸ UFC/mL, utilisée seule ou en mélange, la réduction obtenue est de 100%. Par contre, quand la charge est plus importante le taux de réduction varie entre 96 et 99,5% (Tableau 57).

Le traitement de 75 min à 38°C et 100 bar, nous permet d'inactiver une charge totale de l'ordre de 5.10⁹ UFC/mL d'un mélange des trois microorganismes, en rappelant que *L. innocua* est le microorganisme le plus sensible. Dans les mêmes conditions, en ne tenant compte que de *E. coli* et de *S. cerevisiae*, le taux d'inactivation totale n'est pas modifié de façon sensible, qu'elles soient traitées seules ou en association et inoculée respectivement à hauteur de 6.10⁸ UFC/mL et de 3.10⁷ UFC/mL.

⁶ Le milieu était composé de 10 mL de *Jambes Légères* + 4 mL de vitamine C à 1 g/L + 4 mL d'acide gallique à 0,1 g/L + 1 mL de bouillon de culture enrichi en 1 microorganisme

Des essais effectués, toujours dans les mêmes conditions de température (38°C) et de pression (100 bar), avec des charges initiales de 10^6 UFC/mL de *E. coli* et 10^4 UFC/mL de *S. cerevisiae* ont montré que la durée de la destruction totale est de 45 min pour le premier microorganisme et de 20 min pour le second. Il serait donc possible d'améliorer la destruction microbienne en prolongeant le temps de contact avec le CO₂ (Figure 60).

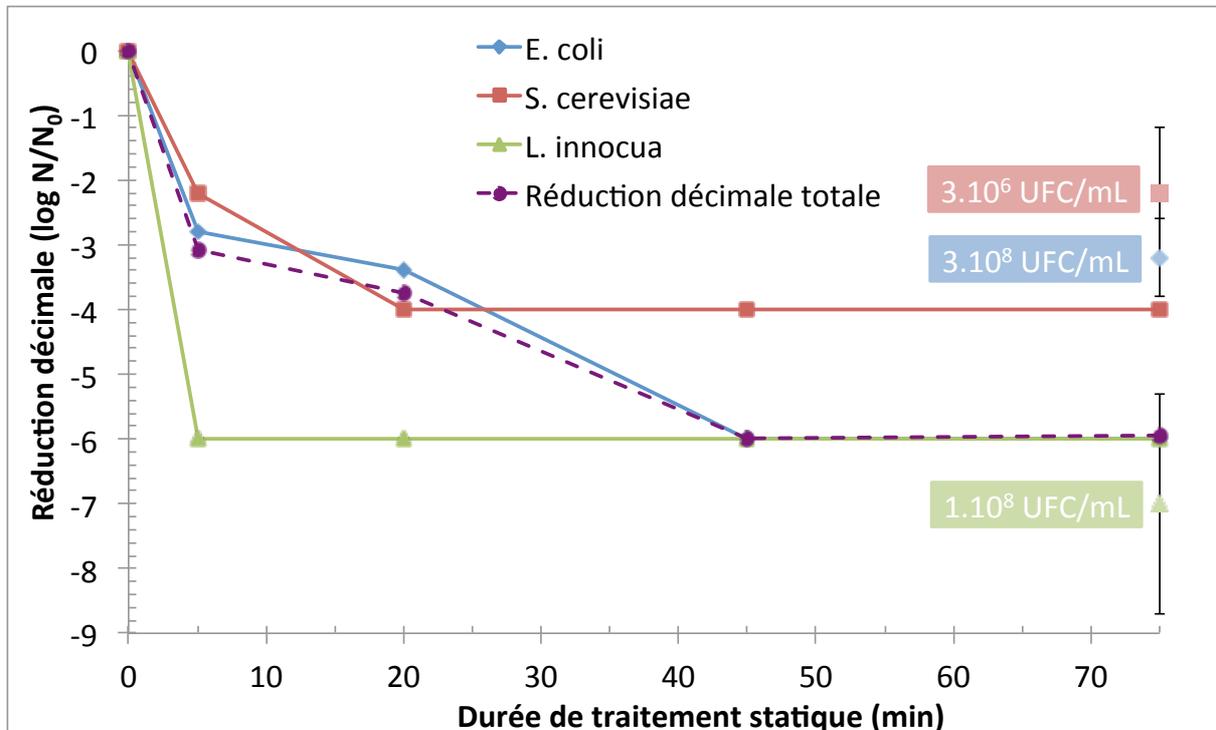


Figure 60 : Influence de la durée de traitement à 38°C et 100 bar sur une solution inoculée avec 10^6 UFC/mL de *E. coli* et *L. innocua* et 10^4 UFC/mL de *S. cerevisiae*, Les points en couleurs transparentes représentent les réductions décimales obtenues dans les mêmes conditions de traitement mais avec une contamination initiale plus importante, dans ce cas, la réduction décimale totale est de $-3,2 \pm 1,1$

Nous avons également cherché à voir si on pouvait observer l'effet de la température dans le cas d'une charge plus modeste. Les résultats sont donnés dans le Tableau 59. On note qu'il est possible de pasteuriser totalement avec un traitement de 45 min à 38°C ce qui n'était pas le cas avec une charge de 10^8 UFC/mL en *E. coli* et *L. innocua* et 10^6 UFC/mL en *S. cerevisiae*. En revanche, la température ambiante n'est pas suffisante pour pasteuriser totalement, bien que le niveau de CO₂ dissous soit relativement similaire (Diamond and Akinfiyev, 2003). A 25°C, les cinétiques sont plus lentes et les constantes d'équilibre plus faibles. Un temps de traitement plus long serait sans doute nécessaire pour atteindre la pasteurisation totale. Avoir recours à une température plus élevée est une solution envisageable pour réduire les temps de traitement.

Tableau 59 : Influence de la température sur l'inactivation pour un traitement de 45 min à 100 bar et une contamination initiale de 10^6 UFC/mL pour *E. coli* et *L. innocua* et 10^4 UFC/mL pour *S. cerevisiae*, * inactivation totale

Température	log (N/No)		
	<i>E. coli</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>L. innocua</i>
25°C	-4,0	-4,7 *	-6,6 *
38°C	-5,7*	-3,8*	-5,7*

2. Influence de la composition de la matrice utilisée

2.1. Impact de la matrice

L'étude de l'effet de la composition de la matrice a été réalisée dans les conditions suivantes : 75 min à 38°C et 100 bar. Les matrices testées se distinguent par leurs compositions et leur pH.

Nous avons choisi le bouillon de culture trypticase-soja (TSB) de pH 6, pour représenter un milieu riche favorable à la croissance des microorganismes. Le complément alimentaire liquide *Détox* a été choisi pour son pH aussi acide que celui de *Jambes Légères*. Deux solutions tampons phosphate-citrate de pH différents (4 et 6) servent de point de comparaison avec le bouillon et les compléments alimentaires. D'autres matrices alimentaires ont été choisies pour tester la sensibilité de nos microorganismes au CO₂, comme le lait de soja et du jus de grenade, respectivement pour leur richesse en protéine (de l'ordre de 30 g/L) et en matière sèche soluble, de l'ordre de 16°Brix, essentiellement des sucres (Mphahlele et al., 2016)). Enfin, pour tester l'effet du CO₂ en présence de substances apolaires, une émulsion huile dans eau (H/E)⁷ a été choisie.

10mL de chaque matrice ont été supplémentés en vitamine C et en acide gallique, de manière à obtenir des teneurs finales respectives de 1 g/L et 0,02 g/L. Les trois

⁷ La phase aqueuse est composée de 10 mL de *Jambes Légères*, 4 mL d'acide ascorbique à 5,25 g/L, 4mL d'acide gallique à 0,1 g/L et 1 mL de chaque microorganisme. 0,4 g d'acide alginique sont dispersés dans 20 mL de la phase aqueuse pour gagner en stabilité. 0,25 g de Tween 80 ont été ajoutés en tant que tensio-actif pour réaliser l'émulsion. L'émulsion est montée en deux temps. Tout d'abord, 5g d'huile de tournesol sont incorporés au goutte à goutte à la phase aqueuse. Cet adjonction se fait en l'espace de 4 minutes sous l'action d'un ultra-turrax T25 Digital IKA (Staufen, Allemagne) réglé à 8000 rpm. Puis l'homogénéisation de l'émulsion est poursuivie pendant 3 min à 10000 rpm. L'intégralité du mélange final a été traitée par CO₂ pressurisé.

microorganismes de référence (*E. coli*, *S. cerevisiae* et *L. innocua*) ont été ajoutés à raison de 1 mL chacun.

Tableau 60 : Récapitulatif des réductions décimales après un traitement de 75 min à 38°C et 100 bar sur différentes matrices avec des concentrations initiales en vitamine C de 1 g/L et en acide gallique de 0,02g/L

Matrice	pH	N ₀	Réduction décimale				Taux de conservation vit C
		UFC/mL	<i>E. coli</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>L. innocua</i>	TOTALE	
<i>Jambes Légères</i> (n=10)	4	9,4.10 ⁸	-3,2 ± 0,6	-2,2 ± 1,0	-7,0 ± 1,7	-3,2 ± 1,1	89%
Détox	4	3,0.10 ⁹	-2	-2,2	-4,9	-2,6	100%
Jus de grenade	4	1,2.10 ⁹	-2,3	-2,9	-4,6	-3,0	86%
Tampon phosphate-citrate	4	6,0.10 ¹⁰	-10,7*	-7,7*	-9,6*	-10,8*	Non dosé
Emulsion	5	1,5.10 ¹⁰	-2,5	-1,7	-3,0	-2,5	Non dosé
Eau osmosée	5	2,0.10 ¹⁰	-3,8	-3,6	-3,9	-3,8	94%
Eau robinet	6	1,0.10 ¹⁰	-3,1	-2,2	-2,7	-3,0	93%
<i>Jambes Légères</i>	6	2,2.10 ¹⁰	-3,9	-2,9	-4,0	-3,9	Non dosé
Tampon phosphate-citrate	6	2,4.10 ¹⁰	-3,7	-2,5	-3,7	-3,7	Non dosé
Bouillon TSB	6	2,2.10 ¹⁰	-3,3	-2,4	-3,1	-3,3	88%
Lait de soja	6	2,2.10 ¹⁰	-4,5	-3,6	-4,7	-4,5	65%
Eau physiologique	7	1,4.10 ⁹	-1,9	-1,8	-2,0	-1,9	Non dosé

* inactivation totale

Le Tableau 60 présente les valeurs des réductions décimales pour chaque milieu étudié. Les résultats varient sur une plage assez importante allant d'une réduction totale modeste de -1,9 dans l'eau physiologique à une inactivation totale dans le tampon phosphate-citrate de pH 4. Il n'existe pas de corrélation entre le pH des matrices et l'inactivation, sauf dans le cas des deux tampons phosphate-citrate. La comparaison des réductions associées aux deux tampons phosphate-citrate de pH différents, qui passent presque du simple au double, illustre l'importance significative du pH sur l'inactivation des microorganismes. Mais pour les autres matrices de pH similaire, des réductions très différentes sont obtenues. Par exemple l'eau du robinet et le lait de soja, de pH 6, offrent des réductions décimales sur la population totale respectivement de -3,0 et -4,5. Bien que le lait de soja ait un pH favorable à la croissance des microorganismes, une réduction logarithmique plus importante que la moyenne est observée. Par ailleurs, son traitement au CO₂ pressurisé entraîne l'apparition d'un précipité abondant, que l'on pourrait associer à la précipitation des protéines contenues dans le lait de soja. Il est possible que la réduction plus importante pour cette matrice soit liée à l'agglutination des protéines dans ce précipité. Les réductions obtenues sur l'émulsion, l'eau physiologique et le complément *Détox* sont les plus faibles obtenues.

Pour expliquer ces écarts de réductions décimales, il faut se pencher sur la composition des matrices, qui peuvent impacter la dissolution du CO₂.

La présence de sucre ou d'autres solutés impacte la solubilité du CO₂ et la cinétique de dissolution (Ferrentino et al., 2016), mais n'a pas pour autant modifié le degré d'inactivation de *S. cerevisiae* quand elle est dans l'eau ou l'eau de coco. D'après les travaux de Garcia-Gonzalez et al. (2009a), la présence de sel, d'amidon ou de protéines ne semble pas affecter non plus de manière significative la réduction décimale, alors qu'une richesse en huile, comme c'est le cas dans une émulsion, nuit à l'efficacité du traitement (Garcia-Gonzalez et al., 2009a; Kim et al., 2008). Par exemple, une émulsion réalisée avec une teneur de 30% en huile de tournesol affiche une réduction de 2 log moins bonne que l'émulsion avec une teneur en huile de 1% (Garcia-Gonzalez et al., 2009a). A l'inverse, l'utilisation de tensio-actif, comme le Tween 80 ou le sucrose stearate, permettrait d'améliorer le degré d'inactivation (Garcia-Gonzalez et al., 2009a). Dans notre cas la viscosité accrue (par l'ajout de 2%_{massique} d'acide alginique) ainsi que l'importante proportion d'huile (20%_{massique}) ont affecté l'efficacité du traitement en dépit de la présence de 1,2%_w d'émulsifiant. On a vu au cours du chapitre 3 qu'une hausse de la viscosité entraînait des temps de transfert plus longs. L'émulsion ralentit donc la cinétique de dissolution du CO₂, nuisant ainsi à l'inactivation.

2.2. Impact de la concentration en vitamine C

La vitamine C fait partie des additifs couramment utilisés dans l'industrie agroalimentaire (sous la dénomination E300), notamment pour ses propriétés anti-oxydantes et conservatrices (Chauhan et al., 1998). Afin d'évaluer l'impact de la vitamine C sur nos microorganismes, chaque souche a été cultivée dans son milieu de culture adéquat, dans les conditions physico-chimiques optimales avec des concentrations croissantes en vitamine C. Le pH a été mesuré initialement et à la fin du suivi de densité optique (DO) (Tableau 61). La DO de chaque bouillon a ensuite été mesurée au cours du temps à 600 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (Hitachi UH5300, Vélizy, France). Les résultats de ce suivi sont reportés sur la Figure 61.

D'après ces résultats, nous pouvons constater que la croissance de *S. cerevisiae* n'est pas affectée par la vitamine C jusqu'à une concentration de 4 g/L. En revanche, la croissance de *E. coli* n'est affectée qu'à partir d'une concentration en vitamine C de 4 g/L. En effet, à cette concentration la courbe de croissance est marquée par un temps de latence d'environ

trois heures, une faible vitesse de croissance et une baisse de la densité optique de 44% par rapport à des concentrations en vitamine C comprise entre 1 et 2 g/L. Ceci est probablement le résultat d'une baisse plus importante du pH (Tableau 61) due à la fois à la présence de la vitamine C et à l'activité métabolique de *E. coli*. Quant à la croissance de *L. innocua* en présence de cette vitamine, l'effet est plus prononcé. Aucune croissance n'est observée à partir d'une concentration de 1 g/L. Pour savoir si l'action de la vitamine C est bactériostatique ou bactéricide, nous avons procédé à l'ensemencement d'un milieu de culture neuf dépourvu de vitamine C à partir d'une culture de 48 h à 2 g/L de vitamine C, réalisée avec *L. innocua*. Une reprise de la croissance semblable à celle de la référence a été observée. Ainsi la vitamine C possède un effet bactériostatique notable sur *L. innocua*.

Tableau 61 : Evolution du pH des bouillons de culture des microorganismes en présence d'une concentration variable en vitamine C, le pH final est mesuré après 48 h d'incubation

Concentration vit C. (g/L)	0	0,5	1	2	4
Pour <i>E. coli</i>					
pH init	6,51	6,26	6,22	6,04	5,26
pH final	7,22	9,03	6,87	6,53	4,99
Pour <i>S. cerevisiae</i>					
pH init	7,12	6,98	6,77	6,35	5,22
pH final	7,00	6,69	6,76	6,2	6,63
Pour <i>L. innocua</i>					
pH init	6,84	6,47	6,00	5,08	4,46
pH final	7,05	6,91	6,63	4,99	4,20

La vitamine C est un polyacide faible ($pK_{a1} = 4,0$ et $pK_{a2} = 11,8$). Il est connu pour ses propriétés bactériostatiques voire bactéricides en fonction du pH du milieu (Giannuzzi and Zaritzky, 1996; Tajkarimi and Ibrahim, 2011). C'est la forme non dissociée des acides faibles qui est responsable de l'action antimicrobienne. En effet, ces dernières ne sont pas chargées et diffusent ainsi plus facilement dans les cellules. Ses propriétés significatives pourraient également être attribuées à son caractère réducteur.

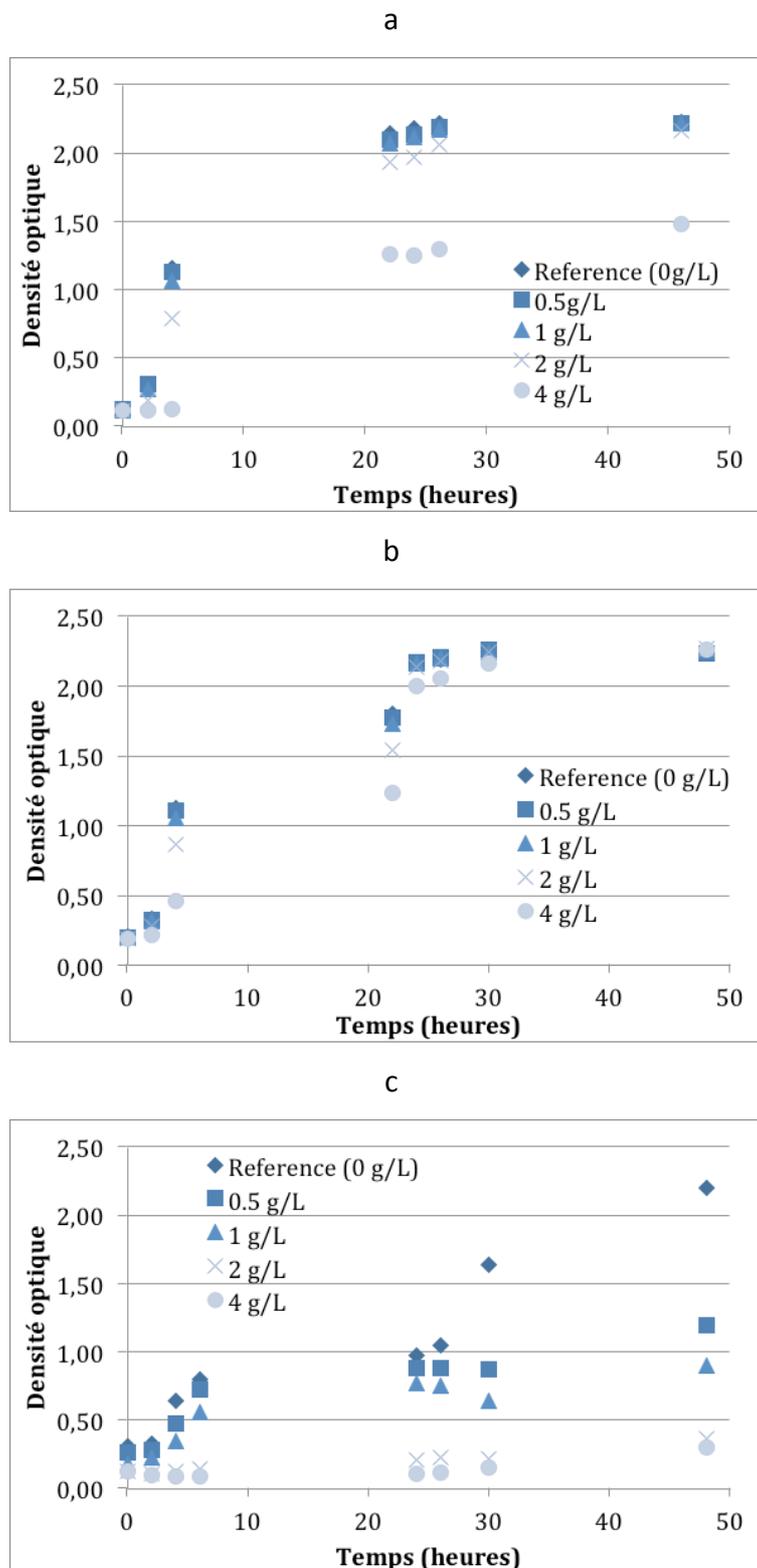


Figure 61 : Evolution de la densité optique de bouillons de microorganismes contenant des concentrations en vitamine C variées pour (a) *E. coli* (bouillon TSB), (b) *S. cerevisiae* (bouillon TSB) et (c) *L. innocua* (bouillon Fraser)

3. Germination des spores de *Bacillus subtilis*

3.1. Activation de la germination des spores

Dans l'objectif de connaître la capacité des spores de *B. subtilis* à germer dans le milieu *Jambes Légères*, nous avons ensemencé ce dernier ainsi qu'un milieu riche BHI (Brain Heart Infusion) favorable à la croissance de bactéries exigeantes avec des spores de *B. subtilis*. Après 24 h de culture à 37°C sous agitation, le nombre de spores et des cellules végétatives dans chaque milieu a été évalué après chauffage d'une partie de chaque échantillon pendant 10 min à 80°C. Ce traitement permet d'activer la germination et d'éliminer les cellules végétatives. Le principe de cette expérience est représenté sur la Figure 62.

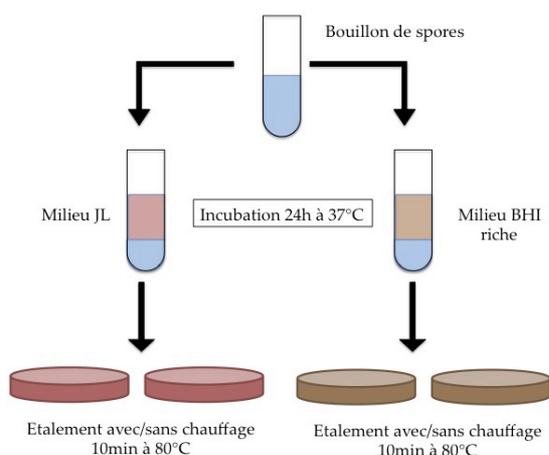


Figure 62 : Représentation du protocole pour activer la germination des spores

Tableau 62 : Dénombrements des spores et des cellules végétatives avec incubation dans 2 milieux différents (en UFC/mL)

	BHI	<i>Jambes Légères</i>
Population totale	$5,0 \cdot 10^8 \pm 1 \cdot 10^8$	$4,8 \cdot 10^8 \pm 2 \cdot 10^8$
Population sporulée	$4,1 \cdot 10^8 \pm 1 \cdot 10^8$	$6,0 \cdot 10^8 \pm 2 \cdot 10^8$

D'après les résultats du Tableau 62 et en tenant compte de l'écart type, nous pouvons constater l'absence de germination des spores dans les deux milieux utilisés. En effet, l'étude de l'évaluation de la cinétique de germination de ces spores dans BHI (Figure 63), milieu riche de pH 7,4, montre qu'une germination très faible ne commence à être détectée qu'après cinq jours d'incubation à température ambiante. Normalement, la germination des spores est une étape plutôt rapide. En présence d'un germinant approprié, la majorité des spores aura germé en l'espace de 3 heures (Setlow et al., 2003). Ainsi, sur un temps d'incubation de 24 heures, nous aurions dû observer une bien plus grande part de population végétative, si les milieux avaient été particulièrement favorables à la croissance.

De plus, l'augmentation relative de la population microbienne totale pourrait être la conséquence d'une faible germination des spores suivie d'une croissance et de la mort d'une fraction de la population végétative (Figure 63). Pourtant, d'après les travaux de Spilimbergo et al. (2003), le BHI est normalement un milieu propice à la germination des spores.

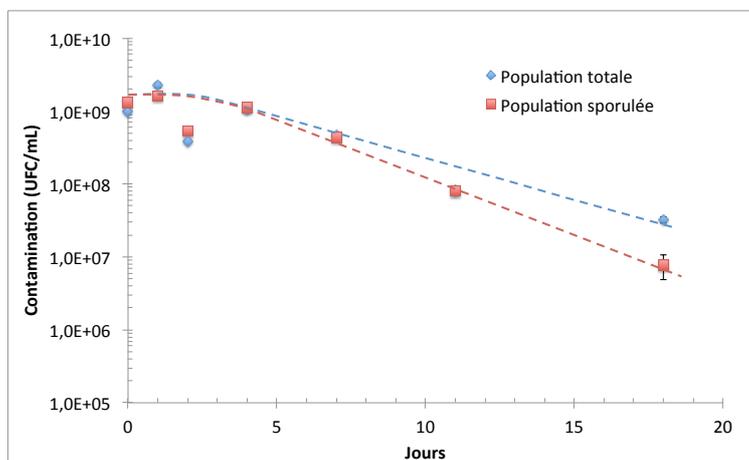


Figure 63 : Suivi de l'évolution naturelle d'un bouillon de spores dans le milieu BHI riche

3.2. Essais de stérilisations

Après avoir testé l'incapacité des spores de *B. subtilis* à germer spontanément dans le milieu *Jambes Légères*, nous nous sommes intéressés à l'étude de l'effet sporicide du CO₂ en mode batch. Trois conditions expérimentales ont été choisies, par rapport aux résultats obtenus au cours du chapitre 2, pour leur capacité à pasteuriser totalement : O4 (50°C – 100 bar – 82 min de temps de contact avec le CO₂), P3 (38°C – 100 bar – 154 min de temps de contact avec le CO₂) et CP11 (cycle de pression : 50°C - 80 bar – 2 x 38 min, temps de contact avec le CO₂ de 82 min). Le bouillon de spores a été passé 10 min à 80°C avant d'être ajouté au reste de l'échantillon à base de *Jambes Légères* de manière à être sûre que le milieu n'est pas enrichi avec des cellules végétatives.

Tableau 63 : Résultats des expériences de stérilisation avec une concentration initiale en vitamine C de 1 g/L

Exp n°	Contamination initiale (UFC/mL)	Contamination résiduelle (UFC/mL)		Log (N/N ₀)		Taux de conservation vit C
		Population totale	Population sporulée	Population totale	Population sporulée	
S1 = O4	1,6.10 ⁸ ± 4,4.10 ⁷	1,2.10 ⁸	1,3.10 ⁸	-0,2	-0,2	86%
S2 = P3		1,1.10 ⁸	1,3.10 ⁸	-0,1	0,0	90%
S3 = CP11		1,5.10 ⁸	1,5.10 ⁸	0,0	0,0	88%

Les trois jeux de conditions choisis pour leur efficacité à pasteuriser ne semblent pas être efficaces pour détruire des spores de *B. subtilis*. En conséquence, ils ne permettent pas de stériliser (Tableau 63).

Ces résultats sont en accord avec la littérature (Tableau 64). En effet, il a été montré que l'effet sporicide du CO₂ n'est efficace que pour des températures supérieures à 60°C, couplées à des pressions importantes généralement supérieures à 100 bar et de durée de contact. Pour des conditions plus modérées, il faut avoir recours à un co-solvant comme l'éthanol, l'acide peracétique ou le peroxyde d'hydrogène. Dans le cas de notre produit utilisé comme complément alimentaire, l'ajout de co-solvant n'est pas souhaitable pour ne pas altérer ses caractéristiques nutritives. Il serait donc intéressant de faire recours à l'utilisation de facteurs physiques induisant la germination, processus irréversible, comme la température ou les hautes pressions avant l'application du CO₂.

4. Conclusion

Au cours de ce chapitre nous avons montré que l'inactivation dépendait grandement de la charge microbienne initiale, comme c'est le cas avec les autres techniques de conservation. Pour un traitement de 75 min à 38°C et 100 bar, la destruction microbienne tout microorganisme confondu ne dépasse pas les 10⁹ UFC/mL. Les conséquences à l'échelle industrielle seraient de privilégier des ingrédients les moins contaminés initialement et une propreté sanitaire stricte des installations. Bien souvent, les produits issus de l'agriculture biologique contiennent plus de contaminants que les produits issus de la culture traditionnelle. Ils seront donc potentiellement plus contraignants en terme de traitement. Il est préférable de travailler avec des charges modestes de l'ordre de 10⁴ à 10⁶ UFC/mL. De plus, dans le milieu *Jambes Légères*, *S. cerevisiae* est le microorganisme le plus résistant comparé à *E. coli* et *L. inncoua*.

Les composants contenus dans la matrice impactent fortement la solubilité du CO₂ et la cinétique de dissolution. Cela engendre une efficacité variable. Des additifs, comme la vitamine C, possèdent une action bactéricide notable à de fortes concentrations. Dans le cas de notre étude, la teneur de 1 g/L ne contribue pas à l'inactivation. De manière générale, un pH bas est favorable à l'inactivation des microorganismes.

Tableau 64 : Récapitulatif de la littérature à propos du traitement des spores par CO₂ pressurisé (*inactivation totale)

Références	Dispositif	Micro organisme	T (°C)	P (bar)	Temps de séjour (min)	Log N/No
(Ishikawa et al., 1997)	Batch	<i>B. subtilis</i>	55	300	1h	-6
(Enomoto et al., 1997a)	Batch	<i>B. megaterium</i>	60	58	30h	-7 estimé
(Ballestra and Cuq, 1998)	Batch	<i>B. subtilis</i>	80	50	1h	-3,5
(Dillow et al., 1999)	Batch cycles	<i>B. cereus</i>	34	205	40min/3 cycles	-2
			60	205	4h/6 cycles	-8
(Spilimbergo et al., 2002)	Batch	<i>B. subtilis</i>	40	95	90	-1,1
			75	70	24h	*
(S. Spilimbergo et al., 2003)	Batch	<i>B. subtilis</i>	50	80	48h	-1
	Cycles 20/h		36	80	30	-2
(Qiu et al., 2009)	Batch CO ₂ -Sc + PAA	<i>B. atropeus</i>	35-41	94-100	27	-6
(Checinska et al., 2011)	Batch CO ₂ -Sc + H ₂ O ₂ cycles	<i>B. pumilus</i>	50	81	10/15 statique/5	*
(Park et al., 2012)	Batch CO ₂ -Sc + H ₂ O	<i>P. oxalicum</i>	44	100	11	-6,4
(Rao et al., 2015)	Batch	<i>B.subtilis</i>	86	100-150	60	-7*

En ce qui concerne l'effet sporicide, le CO₂ seul dans les conditions de température, de pression et de durée utilisées est inefficace. L'utilisation de co-solvants semble être nécessaire comme cela a été montré dans la littérature. Dans la mesure où l'usage de co-solvants n'est pas souhaitable dans notre cas, nous nous limiterons à l'étude de la pasteurisation, en visant plus particulièrement la destruction de *S. cerevisiae*.

Chapitre 5 : Effet des conditions expérimentales sur les principes actifs

Les polyphénols et la vitamine C font partie des nutriments les plus répandus dans les fruits et légumes et pour lesquels il existe des effets biologiques avérés. Les polyphénols sont directement impliqués dans les qualités organoleptiques des fruits et légumes, notamment en terme de couleur et de goût (amertume et astringence par exemple). Au delà d'assurer la sécurité sanitaire des consommateurs en pasteurisant convenablement, le second objectif imposé dans le cahier des charges établi par la société Cérébio était de garantir la teneur en principes actifs avec le traitement au CO₂ pressurisé. On s'interroge sur leur devenir au cours du procédé. Nous avons entrepris une étude sous la forme d'un plan d'expériences visant à :

- évaluer l'influence de chacun des paramètres opératoires (température, pression, durée de traitement et vitesse de dépressurisation) sur la préservation des principes actifs ;
- déterminer les éventuelles interactions entre ces paramètres ;
- établir les teneurs minimales garanties par notre procédé;
- déterminer les conditions opératoires pour assurer une bonne réduction décimale possible tout en ayant la meilleure préservation des actifs (vitamine C et polyphénols) possible.

Sommaire du chapitre 5

1. Impact sur les polyphénols.....	265
2. Impact sur la vitamine C	268
3. Analyse de <i>Jambes Légères</i> par la HPLC.....	270
3.1. Tendances générales.....	270
3.1.1. <i>Complètement Jambes Légères</i>	270
3.1.2. <i>Jus de grenade</i>	273
3.2. Quantification des polyphénols.....	274
3.3. Quantification sur la vitamine C.....	274
3.4. Conclusion	275
4. Conclusion.....	275

1. Impact sur les polyphénols

Dans le plan d'expériences présenté dans le chapitre 2, l'influence de 4 paramètres (température, pression de CO₂, durée du traitement et vitesse de dépressurisation) a été étudiée d'une part sur la réduction logarithmique de chacun des 3 microorganismes (*E. coli*, *S. cerevisiae* et *L. innocua*) pour évaluer l'aspect « pasteurisation » et d'autre part sur la concentration en polyphénols totaux et la teneur en vitamine C pour évaluer l'aspect « préservation » du procédé. Les expériences et leurs résultats sont listés dans le Tableau 65. La quantité de polyphénols contenue dans les échantillons traités comprends deux contributions : celle de l'acide gallique ajouté « artificiellement » et celle des polyphénols naturellement présents dans le complément alimentaire *Jambes Légères*. La concentration initiale en polyphénols totaux varie entre 0,40 g/L et 0,54 g/L en fonction du lot de *Jambes Légères* utilisé. L'acide gallique est rajouté à hauteur de 4 mL d'une solution à 0,1 g/L, ce qui représente 4% de la concentration en polyphénols totaux.

Les concentrations en polyphénols totaux après traitement varient entre 0,42 et 0,73 g/L mais restent très proches de leur valeur initiale. Elles affichent un écart type très faible et inférieur à 0,08 g/L. Au vu de ces très faibles variations, les polyphénols semblent peu voire pas affectés par le traitement au CO₂ pressurisé. La régression linéaire ainsi que l'analyse statistique confirment cette conclusion en donnant un coefficient de régression non pertinent de -0,160. Par ailleurs, les graphiques des effets (Figure 64) associés à la teneur en polyphénols ne permettent pas de déceler de tendance particulière, puisque chaque facteur est associé à une droite horizontale, signe de non influence. Ainsi aucun des paramètres étudiés n'induit d'influence sur la concentration en polyphénols totaux.

Tableau 65 : Détails du plan composite centré en variables réelles sur les concentrations en polyphénols totaux et en vitamine C. La concentration initiale en vitamine C est de 19 mg/L.

	Facteurs				Réponses	
	T	P	D	V _d	Vit C	PPT
	°C	bar	min	bar/min	mg/L	g/L
Points factoriels						
1	26	51	30	10	12,4	0,42
2	49	54	30	8	11	0,69
2 R	49	50	30	9	4,8	0,6
3	30	149	30	10	6,5	0,47
4	49	149	30	9	1,4	0,57
5	28	53	120	8	10,7	0,55
6	49	50	120	9	5,4	0,47
7	28	147	120	10	4,5	0,47
8	50	151	120	10	3,7	0,59
9	26	51	30	61	0	0,56
9 R	27	50	30	41	15,2	0,61
10	48	51	30	38	3,4	0,72
11	28	149	30	35	11,8	0,53
11 R	28	150	30	38	6,2	0,73
12	49	149	30	37	3,4	0,59
13	28	50	120	39	2,8	0,65
14	49	51	120	61	7	0,72
15	28	148	120	42	7,6	0,6
15 R	25	148	120	38	12,1	0,65
16	50	148	120	49	2,8	0,6
Points au centre						
17	39	99	75	28	9,6	0,47
18	39	103	75	34	10,1	0,52
19	38	101	75	28	2,8	0,69
20	38	102	75	31	4,8	0,62
21	39	100	75	33	8,4	0,5
22	40	100	75	26	6,8	0,49
23	38	100	75	29	0	0,66
Points en étoile						
E1	54	105	75	29	3,9	0,64
E2	19	100	75	18	11	0,6
E3	38	29	75	20	0	0,64
E4	39	170	75	29	8,2	0,71
E5	39	101	140	28	5,1	0,62
E6	39	100	10	21	11	0,6
E7	39	101	75	51	1,4	0,69
E8	39	100	75	5	5,1	0,65

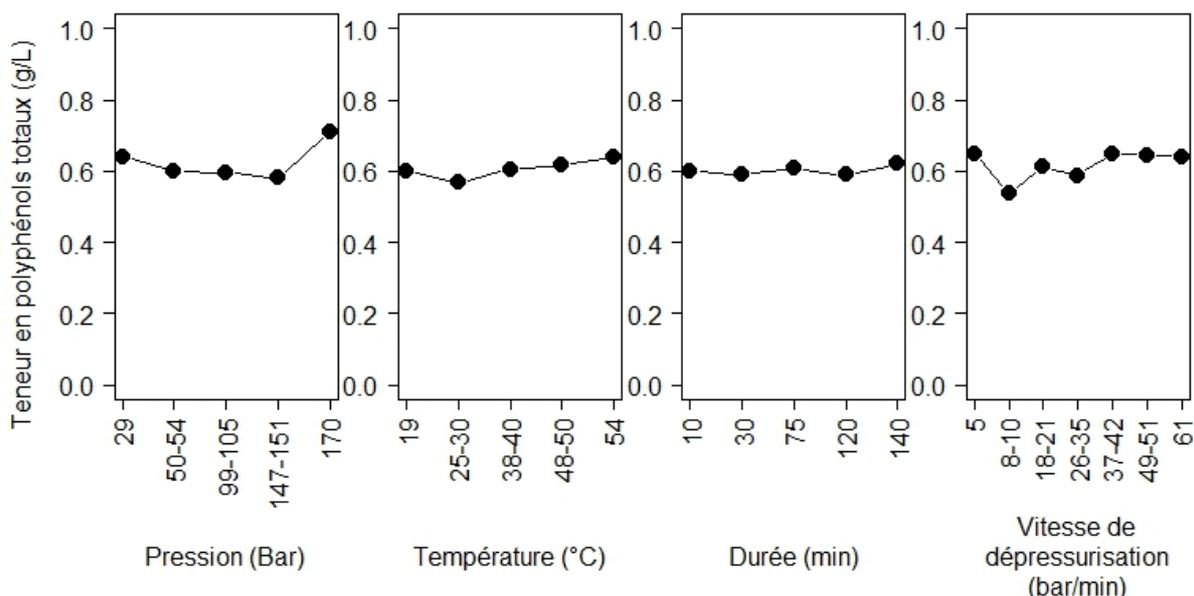


Figure 64 : Graphique des effets pour la concentration en polyphénols totaux après traitement

On peut se demander dans quelle mesure cette absence d'influence provient de l'acide gallique ajouté, qui n'est pas réputé pour être thermosensible (Ross et al., 2011). Mais il ne représente que 4 % de la concentration totale en polyphénols, donc il ne peut être responsable de la stabilité observée. Par ailleurs, comme nous avons travaillé à partir d'ampoules de *Jambes Légères* déjà stériles afin de pouvoir contrôler la contamination, on peut penser que les polyphénols les plus sensibles ont sans doute déjà été dégradés par ce premier traitement thermique. Néanmoins un dosage de Folin et un spectre UV-Vis (Figure 65) réalisés sur un même lot de production de *Jambes Légères* échantillonné avant et après stérilisation industrielle (30 min à 95°C) montre que la concentration en polyphénols totaux ainsi que le profil global sont identiques. Il n'y a donc pas de pertes notables de polyphénols lors du traitement par la chaleur. On peut donc en conclure que le traitement au CO₂ n'affecte pas de manière notable la quantité de polyphénols totaux. C'est en accord avec les observations d'autres auteurs. Skąpska et al. (2016) ont ainsi constaté que la teneur en polyphénols totaux d'une boisson à base d'aronia (pH = 3,5) était stable tant au traitement au CO₂ pressurisé (55°C – 650 bar – 10 min) qu'au traitement thermique (85°C – 6 min). De même, (2012) aboutissent à des conclusions similaires avec une boisson à l'hibiscus (pH = 2,4) après traitement au CO₂ pressurisé (40°C – 306 bar – 6,8 min) ou traitement thermique (75°C – 15 sec).

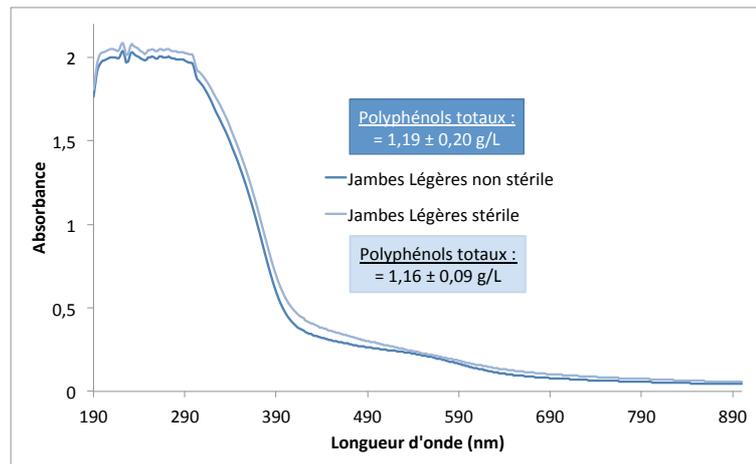


Figure 65 : Spectre UV-Vis du complément *Jambes Légères* (production du 18/11/2014) avant et après traitement de stérilisation

Certains auteurs (Pozo-Insfran et al., 2007) ont constaté que le CO₂ pressurisé permettait de limiter les pertes en polyphénols totaux. Ils affichent une perte de 25% en polyphénols totaux suite à un traitement de 6 min à 276 bar et 30°C contre une perte de 35% pour le même traitement sans CO₂. Ces pertes, jugées comme importantes, ont été attribuées à l'activité de la polyphénol oxydase (PPO), qui dégrade les polyphénols sous l'action de l'oxygène. Des expériences complémentaires conduites sans l'enzyme ont montré une conservation totale de la teneur en polyphénols totaux. Dans notre cas, un pH acide couplé à un effet de la température autour de 50°C contribuerait éventuellement à l'inactivation de l'enzyme si elle était présente et donc à la préservation des polyphénols.

2. Impact sur la vitamine C

A l'inverse des polyphénols, la concentration finale en vitamine C affiche une importante variabilité. Le caractère aléatoire de ces variations en rend l'interprétation difficile. Nous avons supposé que c'était du à un niveau d'enrichissement initial (19 mg/L) trop faible. Bien que cette concentration soit incluse dans la gamme de linéarité du kit utilisé, son dosage n'était pas fiable. La régression linéaire des résultats aboutit à un coefficient de régression non pertinent de -0,009. Néanmoins, les graphiques des effets (Figure 66) associés à la teneur en vitamine C mettent en évidence que l'augmentation de la température et de la durée de traitement provoque une chute de la teneur en vitamine C. Une hausse de 30°C de la température ou un traitement de 2 heures provoque une chute de l'ordre de 5 mg/L de la concentration en vitamine C.

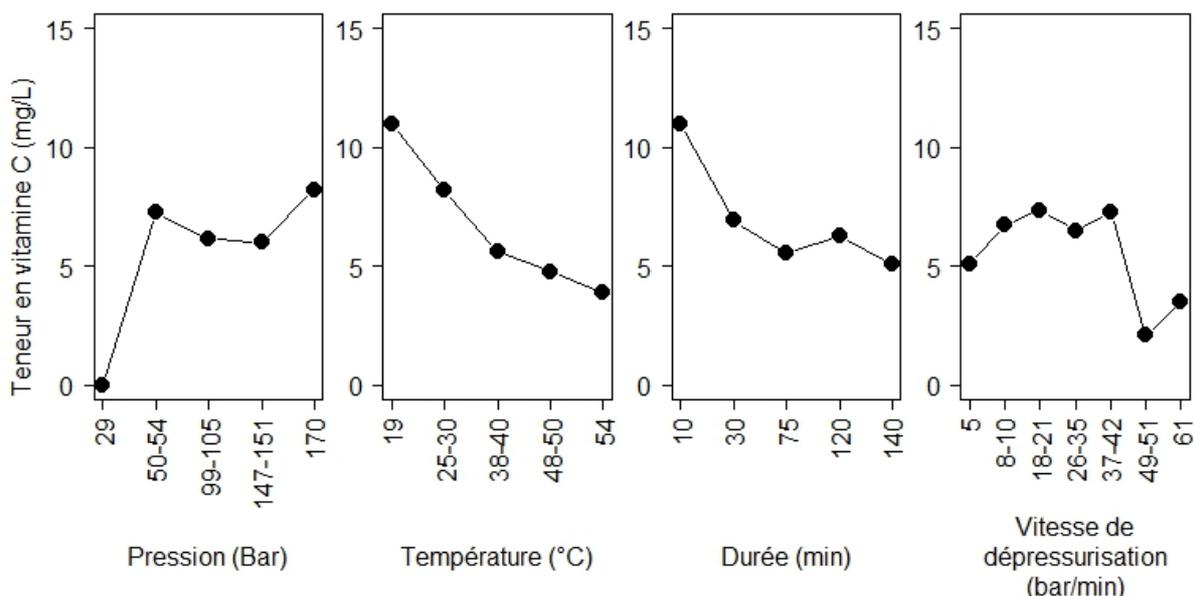


Figure 66 : Graphique des effets sur la concentration en vitamine C après traitement

Après vérification de l'innocuité de l'acide ascorbique vis à vis des microorganismes témoins (démarche expliquée dans le chapitre 4) la concentration initiale en vitamine C a été rehaussée à 1g/L afin de faciliter son dosage et son suivi dans les expériences d'optimisation.

Au cours des expériences d'optimisation (listées dans le Tableau 30), un taux moyen de conservation de $85 \pm 10\%$ en vitamine C a été quantifié, quelles que soient les conditions expérimentales. Cela représente une conservation non négligeable de la concentration initiale en acide ascorbique en dépit de la thermo-sensibilité connue de ce composé.

Les pertes en vitamine C reportées dans la littérature sont très variables. Dans les travaux de Chen et al. (2009) le traitement thermique ($90^{\circ}\text{C} - 1\text{min}$) n'assure qu'une conservation de 50% de la vitamine C d'un jus de melon ($\text{pH} = 6,4$) contre 74% avec le traitement au CO_2 pressurisé ($55^{\circ}\text{C} - 350\text{ bar} - 60\text{ min}$). Marszałek et al. (2015) ont également reporté des taux de conservation respectifs de 66 et 70% sur du jus de fraise après des traitements au CO_2 pressurisé (respectivement de $45^{\circ}\text{C} - 600\text{ bar} - 30\text{ min}$ et $45^{\circ}\text{C} - 300\text{ bar} - 30\text{ min}$). Les travaux de Oulé et al. (2013) proposent les chiffres les plus intéressants sur du jus d'orange ($\text{pH} = 3,9$) avec 88% de conservation (traitement de $40^{\circ}\text{C} - 250\text{ bar} - 90\text{ min}$) de la vitamine C contre 57% avec un traitement thermique ($90^{\circ}\text{C} - 1\text{ min}$). Enfin, Ferrentino et al. (2009) préservent l'intégralité de la vitamine C du jus de pamplemousse ($\text{pH} = 3,34$) avec un traitement de $40^{\circ}\text{C} - 345\text{ bar} - 7\text{ min}$.

Afin d'estimer la contribution du couple durée-température à la perte de vitamine C au cours du traitement, nous avons eu recours à la valeur cuisatrice. Obéissant au même

principe que la valeur pasteurisatrice, cette grandeur permet de déterminer les couples durée-température qui assurent un niveau de destruction donné. La valeur cuisatrice est définie par la formule suivante :

$$VC = d.10^{\frac{(T-T_{ref})}{z}}$$

où d correspond à la durée du traitement, T à la température du traitement, T_{ref} la température de référence pour la cuisson (100°C) et z à la valeur d'activation thermique qui varie selon la caractéristique observée. Dans le cas de la dégradation de la vitamine C, z prend la valeur de 33°C (Wagner et al., 2016). Ici, la VC est utilisée comme indicateur de l'intensité du traitement thermique.

Tableau 66 : Comparaison de la valeur cuisatrice de certains traitements au CO₂ pressurisé de la littérature

Référence	P	T	d	VC	Conservation vitamine C
	bar	°C	min	min	-
(Chen et al., 2009)	350	55	60	2,60	74%
Expérience O4	100	50	75	2,29	82%
(Oulé et al., 2013)	250	40	90	1,37	88%
Expérience O5	100	38	75	0,99	89%
(Marszałek et al., 2015)	600 à 300	45	30	0,65	66 à 70%
Expérience MM	170	55	10	0,43	81%
(Ferrentino et al., 2009)	354	40	7	0,11	100%

D'après le Tableau 66, quel que soit le traitement considéré, on observe un taux de conservation moyen de la vitamine C de l'ordre de 80% pour des VC variant de 0,11 à 2,60 min. Dans la mesure où la pression n'induit a priori pas de perte de la teneur en vitamine C (Barba et al., 2012), la chute de 20 % de la teneur en vitamine C est peut-être en lien avec à la quantité d'oxygène (constante) présente initialement dans notre réacteur, qui favorise son oxydation.

3. Analyse de *Jambes Légères* par la HPLC

3.1. Tendances générales

3.1.1. Complètement *Jambes Légères*

Nous avons caractérisé la composition générale du complément *Jambes Légères* à l'aide de la HPLC. La Figure 67 montre son profil à la fois seul mais aussi une fois additionné

de vitamine C et d'acide gallique à raison de 4 mL de vitamine C à 5,25 g/L et de 4 mL d'acide gallique à 0,1 g/L pour 10 mL de *Jambes Légères*. La forêt de pics entre 40 et 45 min correspond au rinçage de la colonne. Les composés retenus par la colonne sont alors élués. L'analyse du chromatogramme montre qu'à 5, 7 et 28 min, on observe trois pics caractéristiques de *Jambes Légères*. La vitamine C se démarque par un pic important à 3 min. Le temps de rétention de l'acide gallique est de 5 min. Le milieu *Jambes Légères* contient déjà de ce composé.

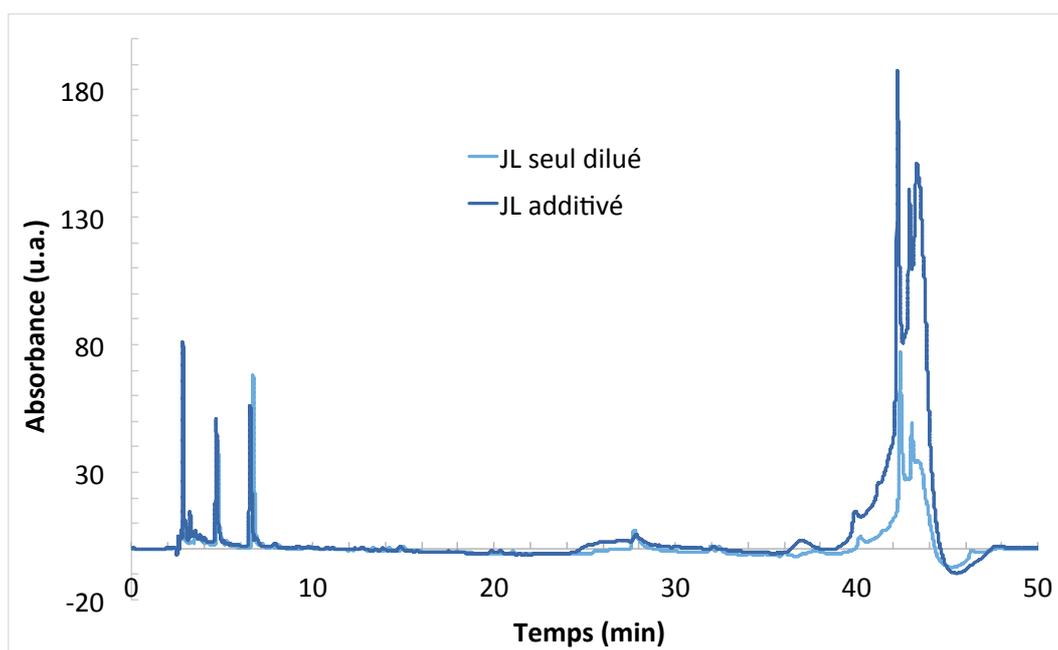
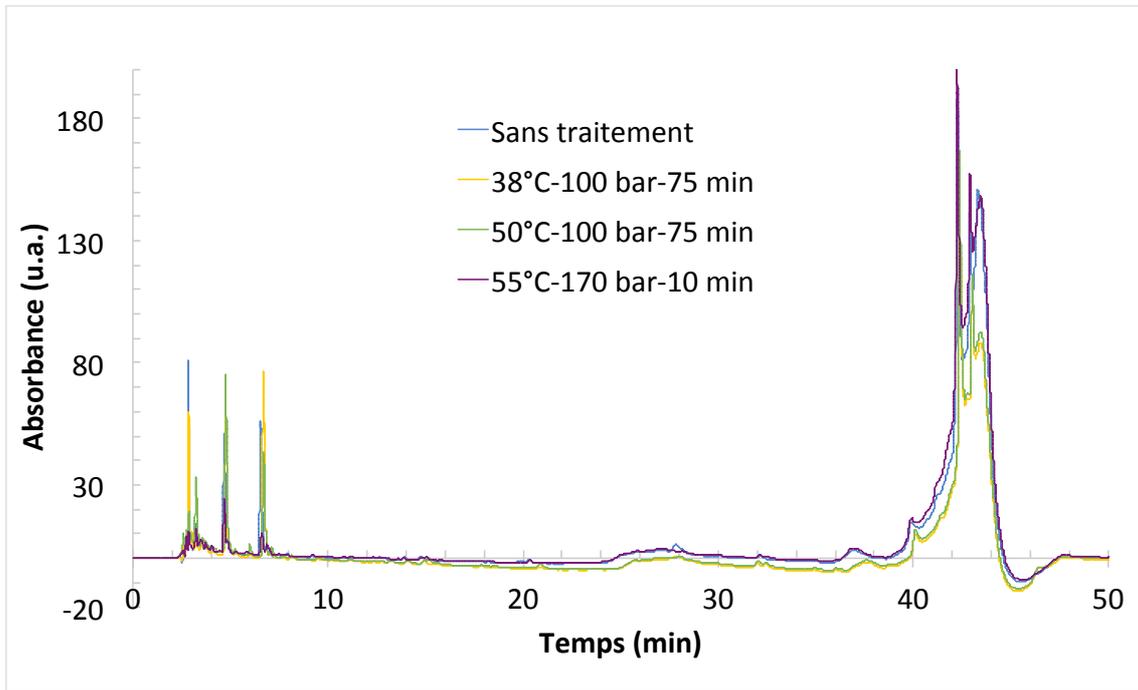


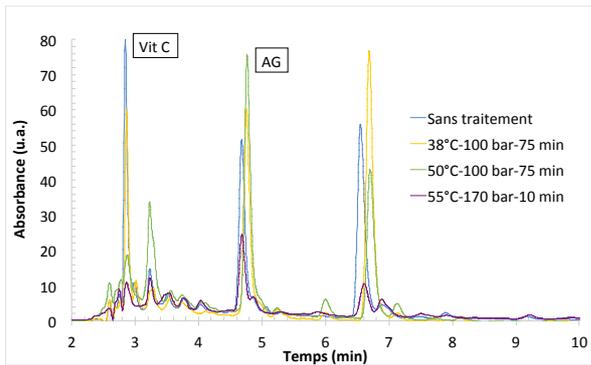
Figure 67 : Profil chromatographique de *Jambes Légères* seul rapporté à la dilution du mélange additivé de vitamine C et d'acide gallique

La comparaison des spectres HPLC d'échantillon à base de *Jambes Légères* permet de mettre en évidence les conséquences du traitement sur la matrice (Figure 68). On peut observer un décalage entre les pics d'un chromatogramme à l'autre. Il est lié soit à la composition des solvants ou au protocole qui a pu légèrement varier d'une analyse à une autre.

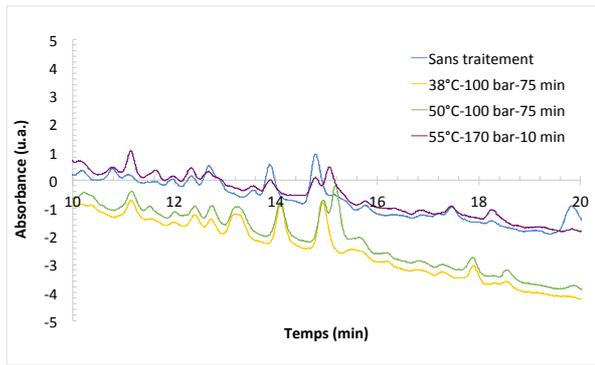
a



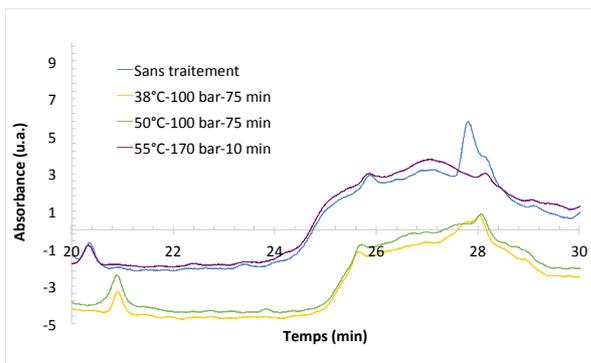
b



c



d



e

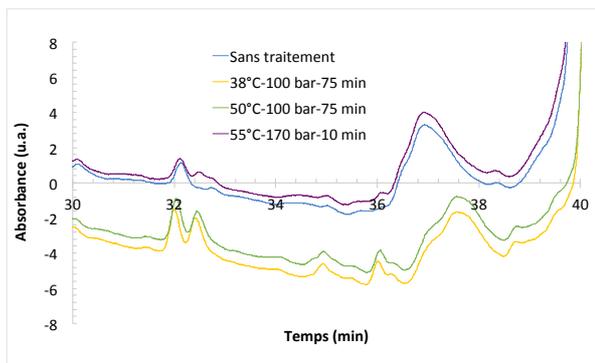


Figure 68 : Profil chromatographique de *Jambes Légères* à 280 nm après différents traitements au CO₂ pressurisé (a) dans sa globalité. (b), (c), (d) et (e) représentent des zooms du chromatogramme (a)

Le traitement à 38°C n'induit pas de différence significative du chromatogramme. On en conclue qu'il n'induit pas de dégradation notable.

Le traitement court à 55°C montre la diminution d'un certain nombre de pics (comme à 28 min) mais très peu d'apparition ou d'augmentation de pics (comme à 11,2 min). Le pic de la vitamine C à 2,8 min est particulièrement affecté, comme celui de l'acide gallique à 4,7 min ou encore le pic spécifique à 6,6 min. Ce traitement est donc relativement délétère mais ne génère pas la formation de composés de dégradation.

A l'inverse, le traitement long à 50°C montre la même évolution mais avec l'augmentation et l'apparition de certains pics comme à 3,2, 28 ou 32,4 min qui traduisent sans doute la présence de composés issus de réactions de dégradations. Le pic à 6 min est présent uniquement pour ce traitement, sans doute le fruit de la température élevée cumulée à une longue durée. Ce traitement est encore moins respectueux des principes actifs que le précédent. De manière surprenante, bien que la température soit plus élevée, les pics de dégradations sont moins marqués pour le traitement 55°C - 170 bar – 10 min. Cela est probablement dû à la brièveté du traitement, qui est trop court pour dénaturer les molécules.

3.1.2. Jus de grenade

La matrice de grenade (Figure 69) semble globalement plus résistante aux traitements que *Jambes Légères*. Le pic caractéristique de la vitamine C diminue peu voire pas. En revanche, on ne s'explique pas le décalage des pics du traitement à 38°C à partir de 3,5 min. De manière générale, la vitamine C et l'acide gallique au sein de la matrice grenade sont assez peu affectés par les traitements contrairement au cas de *Jambes Légères*.

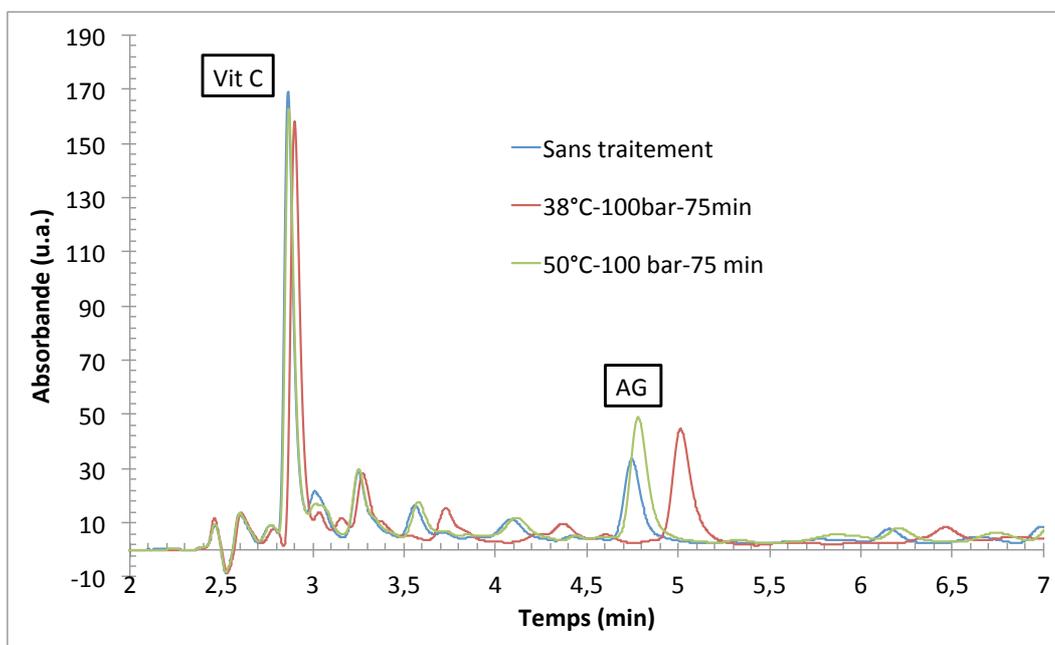


Figure 69 : Profil chromatographique à 280 nm après différents traitements au CO₂ pressurisé du mélange à base de grenade (zoom sur la zone de 2 à 7 min)

3.2. Quantification des polyphénols

La quantification de l'acide gallique via la HPLC des échantillons (Figure 68) tend à confirmer nos observations (Tableau 67). L'acide gallique est bien conservé par les traitements au CO₂ pressurisé étudiés dans le cadre du plan d'expériences. En revanche malgré sa durée très brève, le traitement à 55°C entraîne une perte de 55% de la teneur en acide gallique. Le composé inconnu caractéristique de *Jambes Légères* semble beaucoup plus sensible à la température. En effet ses pertes augmentent avec la hausse de température du traitement. Le dosage de Folin étant sensible à de nombreux autres composés, cela peut expliquer l'écart par rapport à ce que l'on peut observer avec la HPLC.

Tableau 67 : Taux de conservation de l'acide gallique et du composé inconnu (pic à 6, 7min) d'après HPLC

Expérience de référence	Conditions de traitement	Taux de conservation	
		Acide gallique	Composé inconnu
O5	38°C-100 bar-75 min	100%	100%
O4	50°C-100 bar-75 min	100%	72%
MM	55°C-170 bar -10 min	55%	19%

3.3. Quantification sur la vitamine C

Les 3 traitements semblent aboutir à une dégradation de la vitamine C (Figure 68.b), attesté par la diminution de l'aire du pic. Cette dégradation augmente avec la température, puisque l'aire du pic est de plus en plus petite. Malgré une durée très brève, le traitement à

55°C induit une diminution de la vitamine C encore plus forte que le traitement de 75 min à 50°C.

3.4. Conclusion

La HPLC a permis d'avoir une idée générale des dégradations induites par les traitements au CO₂ pressurisé, notamment à cause de l'influence délétère de la température : diminutions des aires de pics associées à certaines molécules, apparitions de nouveaux pics témoignant de la présence de composés de dégradations.

4. Conclusion

Les conditions de traitement semblent avoir assez peu d'effets sur les polyphénols totaux. C'est cohérent avec les observations reportées par d'autres auteurs dans la littérature. Nous sommes ainsi en mesure de garantir une préservation de 100% de ces actifs.

Bien que la vitamine C soit affectée par la température et la durée du traitement, nos conditions opératoires sous CO₂ pressurisé assurent une bonne préservation de la vitamine C (au moins 70%), du même ordre de grandeur que ceux observés dans la littérature. Nos résultats légèrement meilleurs peuvent éventuellement être attribués à la pression appliquée bien plus faible de nos traitements. Par comparaison avec les procédés thermiques classiques, le CO₂ pressurisé offre une réelle amélioration de la conservation de la vitamine C.

Chapitre 6 : Intérêt du traitement au CO₂ et stabilité au stockage

Dans ce chapitre nous cherchons à :

- évaluer la stabilité au stockage de nos échantillons pasteurisés au CO₂ comprimé à la fois en terme de contamination et de préservation de la vitamine C ;
- vérifier que les microorganismes ne développent pas une résistance au traitement CO₂ comprimé ;
- comparer l'apport du traitement au CO₂ comprimé par rapport à un traitement thermique classique.

Sommaire du chapitre 6

1. Résistance au traitement	281
2. Stabilité au stockage	282
2.1. Evolution de la teneur en vitamine C au stockage	282
2.2. Evolution de la flore microbienne au stockage	283
3. Apport du traitement au CO₂ pressurisé par rapport au traitement thermique	285
4. Conclusion	288

1. Résistance au traitement

Dans la mesure où les bouillons de culture servant à contaminer le milieu *Jambes Légères* ont parfois été préparés à partir de colonies isolées sur les boîtes étalées après traitement, il était essentiel de déterminer si les espèces étudiées pouvaient développer une forme de résistance au traitement.

Pour ce faire, un premier traitement (38°C, 100 bar et 75 minutes) a été appliqué sur une solution témoin contenant ces trois microorganismes. Cinq jours après ce premier traitement et un stockage à température ambiante (22°C), la solution a de nouveau été traitée dans les mêmes conditions. Les résultats des dénombrements microbiologiques sont récapitulés dans Tableau 68.

Tableau 68 : Effet d'un traitement répété (38°C-100 bar-75 min) sur la réduction décimale pour tester la résistance des microorganismes

	<i>E. coli</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>L. innocua</i>
Jour 1			
N₀ (log UFC/mL)	9,4	7,4	9,2
N (log UFC/mL)	7,0	6,0	3,3
Réduction décimale	-2,4	-1,4	-5,9
Jour 5			
N₀ (log UFC/mL)	6,6	7,5	3,0
N (log UFC/mL)	3,3	5,8	0
Réduction décimale	-3,4	-1,7	-3

D'une expérience à l'autre, les populations de *E. coli* et *L. innocua* n'ont pas varié lors du stockage entre les deux expériences. A l'inverse la concentration en *S. cerevisiae* a gagné 1,5 unité. Les niveaux de réduction décimale sont similaires d'une manipulation à l'autre. Cela permet de conclure que les souches ne développent pas de résistance. En effet, si le premier traitement avait éliminé toutes les cellules « sensibles » et préservés uniquement les cellules résistantes, aucune réduction décimale n'aurait été observée suite au second traitement. L'augmentation de la réduction décimale observée pour *E. coli* et *L. innocua* est due à la charge initiale plus faible.

2. Stabilité au stockage

2.1. Evolution de la teneur en vitamine C au stockage

Nous avons étudié la stabilité de la vitamine C contenue dans nos échantillons. Un échantillon classique, traité au CO₂ pressurisé (38°C – 100 bar – 75 min) a été stocké à température ambiante et à l'abri de la lumière. Sa teneur en vitamine C ainsi que son pH ont été mesurés régulièrement. L'évolution de la teneur en vitamine C a été reproduite sur la Figure 70.

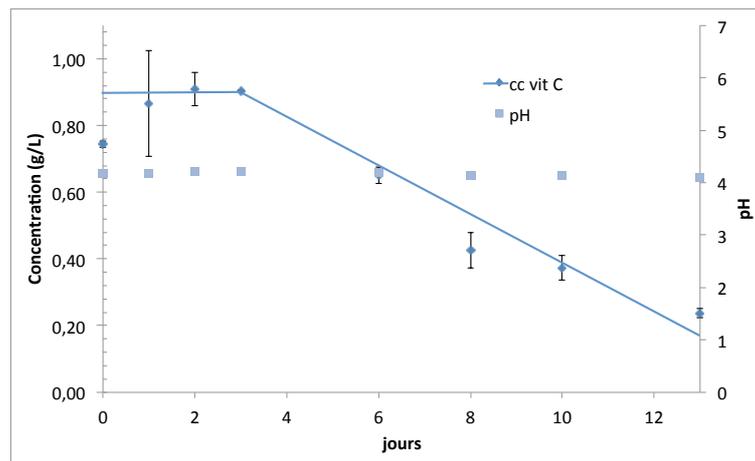


Figure 70 : Evolution de la concentration en vitamine C au cours du temps après un stockage à température ambiante à l'abri de la lumière

Le pH au cours du stockage est stable. En cas de repousse des microorganismes, on aurait pu observer un décalage progressif vers un pH plus basique. Qui plus est, la vitamine C se dégrade en aérobiose en acide furoïque dont le pKa est plus faible que celui de la vitamine C (3,1 contre 4,1 pour l'acide ascorbique). Dans notre cas, les variations de pH éventuellement liées à une modification de la composition du milieu sont neutralisées par l'effet tampon de *Jambes Légères*.

La teneur en vitamine C décroît progressivement au cours du stockage. Une perte de 70% est enregistrée en l'espace de 2 semaines. C'est une dégradation bien plus importante que celles observées dans la littérature. Après 4 semaines à 4°C, Oulé et al. (2013) n'enregistrent qu'une perte de 7% dans du jus d'orange. Quant à Ferrentino et al. (2009), c'est une perte d'uniquement 12% qui est rapportée après un stockage à 4°C. Bien évidemment, il est possible de tempérer nos résultats en prenant en compte le fait que nous n'avons pas stocké nos échantillons au réfrigérateur. Ces derniers étaient à température ambiante, ce qui a pu favoriser la dégradation de la vitamine C. Toutefois, des auteurs comme Marszałek et al. (2015) témoignent d'une perte de 91% en vitamine C malgré un stockage de 4 semaines à 6°C. D'après les travaux de Giménez et al. (2002) la dégradation de

la vitamine C peut être favorisée par la composition du milieu, notamment par la présence de certains sucres, comme le fructose, qui accélèrent l'oxydation de la vitamine C. C'est également le cas du saccharose (Hsieh and Harris, 1993). Des traces de métaux comme le fer ou le cuivre peuvent également servir de catalyseur à l'oxydation de la vitamine C (Serpen and Gökmen, 2007). Dans la mesure où le complément *Jambes Légères* est fabriqué à partir de jus de fruits concentrés, il est fort probable qu'il contienne du fructose ayant contribué à la perte en vitamine C, en plus de l'influence de la température.

Le facteur prépondérant dans la dégradation de la vitamine C au cours du stockage est la température. La dégradation induite par la lumière, l'oxygène, le pH, la présence de sucre ou la présence de métaux est influencée par la température.

2.2. Evolution de la flore microbienne au stockage

Pour évaluer la stabilité microbiologique dans le temps, un suivi sur 12 jours a été réalisé sur les échantillons ayant subis un traitement sévère (inactivation totale de la flore à la sortie du réacteur) et un traitement modéré (75 min à 38°C et 100 bar, présence d'une contamination résiduelle en sortie de réacteur). A titre de comparaison, la stabilité au stockage après un traitement thermique sans pression (75 min à 38°C) et sans traitement particulier (qui sert de référence) a également été mesurée. Les échantillons sont stockés dans des tubes en plastique transparent à température ambiante (22°C), sans être exposé à la lumière directe du soleil, le but étant de reproduire les conditions de stockage des compléments alimentaires. Ces derniers sont en général conservés dans des boîtes en cartons et des ampoules en verre teinté à température ambiante.

Les expériences ayant abouti à une inactivation totale n'ont pas montré de reprise de la croissance microbienne sur la durée étudiée. Les résultats associés aux expériences issues d'autres traitements sont présentés sur la Figure 71. Le jour 0 correspond au jour du traitement. *L. innocua* affiche des tendances similaires à celle de *E. coli*. Les graphiques associés à ses évolutions ne sont donc pas représentés.

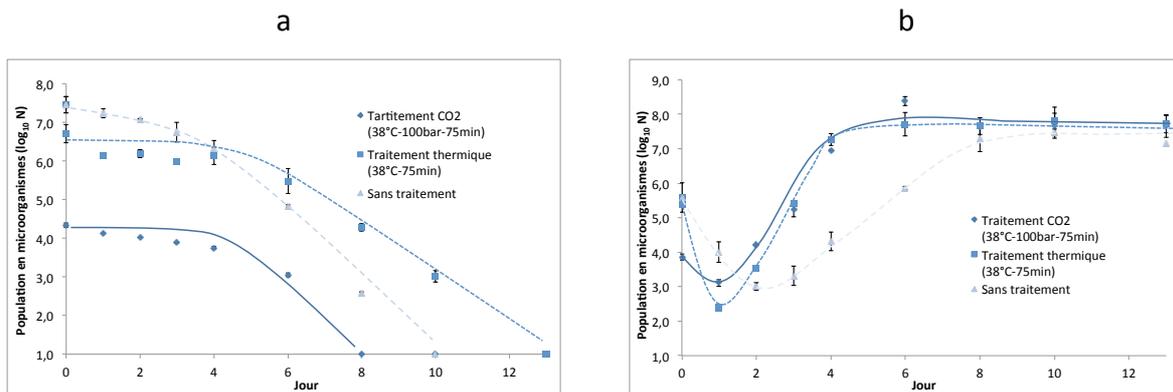


Figure 71 : Evolution de la population résiduelle en (a) *E. coli* et (b) *S. cerevisiae* après différents traitements

Sans aucun traitement de pasteurisation, la population en *E. coli* décroît naturellement après 3 à 4 jours. Cette souche est donc capable de supporter le pH très acide du milieu plus longtemps que la durée du traitement. Ainsi le niveau d'inactivation associé au traitement n'est pas la résultante de l'action du pH uniquement. Après 8 jours de stockage, la population en *E. coli* a été totalement inactivée. La souche *S. cerevisiae* affiche une reprise de la croissance une journée après les traitements. Elle atteint un palier 5 jours après les traitements. Dans la mesure où les levures ont une plage de pH optimum de croissance comprise entre 4 et 6,5, avec une tolérance pouvant aller jusqu'à un pH de 1,5, il est normal que cette souche survive et se redéveloppe si elle n'a pas été totalement inactivée par le traitement.

Assez peu d'auteurs se sont penchés sur la stabilité microbienne au cours du stockage des aliments traités au CO₂ pressurisé. (2006) a observé une hausse du nombre de bactéries endogènes au cours du stockage au réfrigérateur d'un jus d'orange (pH = 3,7) traité par CO₂ pressurisé (10 min à 1070 bar), alors qu'aucun microorganisme n'était dénombrable à l'issue du traitement. Après 6 semaines, la population était revenue à son niveau initial de 6 log d'UFC/mL. Ils suggèrent donc que la reprise de la croissance est liée soit à une réparation spontanée des microorganismes, soit à une post-contamination. Dans notre cas, 2 semaines ne sont pas suffisantes pour observer une repousse des microorganismes à température ambiante. Les résultats de (2006) montrent également une reprise de la croissance mais des levures uniquement, dans du jus de raisin (pH = 3,2) traité en continu pendant 15 sec à 75°C et 345 bar après 5 semaines de stockage à 4°C. En réalisant un suivi à la fois sur du jus de pamplemousse (pH = 3,3) non traité et du jus de pamplemousse traité au CO₂ pressurisé de 7 min à 40°C et 345 bar, les travaux de (2009) écartent la contribution du pH acide sur la stabilité au stockage. En effet, l'échantillon traité au CO₂ ne montre aucun signe de repousse

de la flore naturelle (comprenant des levures et des bactéries) au cours du suivi de 6 semaines tandis que l'échantillon témoin affiche une reprise de la croissance à partir de 2 semaines de stockage. L'effet bactéricide du CO₂ au cours du traitement est donc pérenne.

En cas de contamination résiduelle, l'acidité naturelle du milieu pourra contribuer à inhiber et détruire les bactéries non acido-tolérantes. En revanche, il n'empêchera pas la reprise de croissance des levures, entraînant une forme de fermentation des échantillons.

3. Apport du traitement au CO₂ pressurisé par rapport au traitement thermique

Le traitement au CO₂ pressurisé permet une stabilisation microbienne relativement durable. Mais est-il réellement avantageux comparé à un traitement thermique classique ?

D'après la Figure 71, au jour 0, le traitement au CO₂ de 75 min à 38°C et 100 bar permet d'obtenir une réduction décimale de $-3,5 \pm 0,4$ log contre seulement $-1,2 \pm 0,2$ log pour le traitement équivalent à 38°C sans CO₂. Le témoin sans traitement affiche une charge initiale de $9,0 \pm 0,1$ log.

La plupart des auteurs semblent pourtant observer que l'efficacité entre un traitement au CO₂ pressurisé et un traitement de même durée à la même température est similaire. Garcia-Gonzalez et al. (2009b) observe un degré d'inactivation similaire entre le traitement CO₂ pressurisé (45°C-130 bar-10 min) et un traitement thermique conventionnel (69°C-3 min). Dans les travaux de Chen et al. (2009), le traitement au CO₂ pressurisé (55°C - 350 bar – 60 min) aboutit à une réduction d'environ -4,5 log sur la flore spécifique au jus de melon. Elle est équivalente à celle obtenue par traitement thermique (1 min à 90°C). Il est surprenant que Chen et al. (2009) n'aient pas obtenu de pasteurisation totale avec de telles conditions opératoires, en considérant que notre traitement MM de 10 min à 55°C et 170 bar induit une pasteurisation totale sur une charge initiale de 10¹⁰ UFC/mL.

Pour comparer le traitement au CO₂ avec un traitement de pasteurisation thermique industrielle (barème de pasteurisation pris par rapport à *Enterococcus faecalis* dont T_{réf} = 70°C et z = 10°C (Zuber et al., 2008)), nous avons traité un échantillon de *Jambes*

Légères préparé habituellement⁸ à 70°C sans CO₂. Une sonde embarquée permet d'enregistrer le profil en température tout du long du traitement. Lorsque le contenu du réacteur a atteint les 70°C, le traitement est soit arrêté, soit prolongé de 40 min (Figure 72). Après chaque expérience, nous avons évalué la réduction décimale, le taux de conservation de la vitamine C et la valeur pasteurisatrice définie par la formule suivante :

$$VP = d. 10^{\frac{(T-T_{ref})}{z}} \quad (55)$$

où d correspond à la durée du traitement, T à la température du traitement, T_{ref} la température de référence et z à la valeur d'activation thermique. Expérimentalement, le calcul de VP revient à mesurer l'aire comprise entre la droite horizontale à 50°C et la courbe en température. En effet, on considère qu'en dessous de 50°C, la température ne possède pas d'effet létal sur les microorganismes.

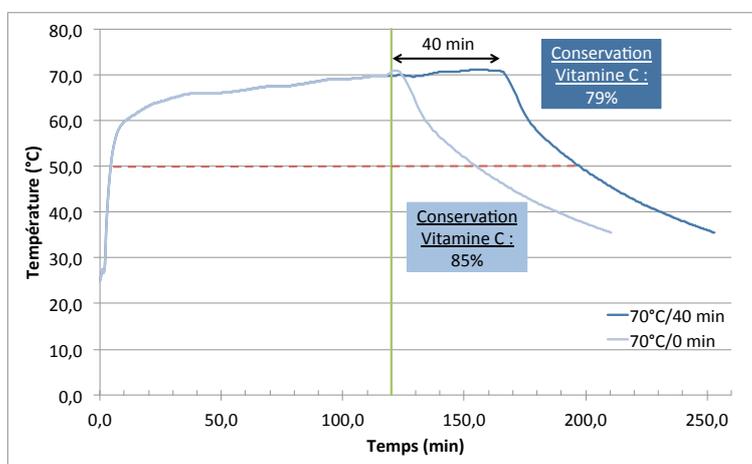


Figure 72 : Profils en température du mélange *Jambes Légères* lors de deux traitements thermiques classiques

Pour les deux traitements à 70°C, la pasteurisation a été totale, aucune croissance des microorganismes n'a été observée. Compte tenu du profil thermique de la solution et du calcul de la VP, le premier traitement sans palier à 70°C est équivalent à 70 min à 70°C (VP = 70 min). Le second traitement affiche quant à lui une VP de 116 min. Par comparaison à une valeur pasteurisatrice minimale (40 min), la première expérience semble être suffisante pour assurer une pasteurisation convenable.

⁸ 10 mL de *Jambes Légères* + 4 mL de vitamine C à 5,25 g/L + 4 mL d'acide gallique à 0,1 g/L + 3 mL de bouillon de chaque microorganisme

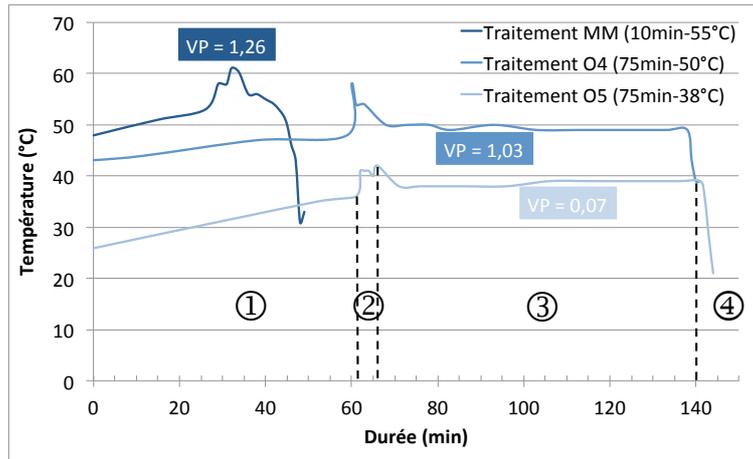


Figure 73 : Profils en température du mélange *Jambes Légères* au cours de trois traitements au CO₂ pressurisé. ① préchauffage, ② pressurisation, ③ phase statique et ④ dépressurisation

Compte tenu des profils de température relevés lors des traitements sous CO₂ (Figure 73), seuls les traitements aux plus hautes températures (50 et 55°C) affichent une VP non nulle mais très inférieure à 40 min. L'inactivation des microorganismes observée n'est donc pas uniquement due à un effet thermique. Le Tableau 69 compare les VP de différents traitements cités dans la littérature.

Tableau 69 : Comparaison de la VP de certains traitements au CO₂ pressurisé (* valeur calculée à partir du profil en température mesuré expérimentalement, les autres valeurs ont été calculées à partir de la formule) Les traitements donnés sans pression correspondent à des traitements thermiques uniquement.

Référence	P	T	d	VP	Réduction décimale	Micro-organisme
	bar	°C	min	min	-	-
(Ferrentino et al., 2009)	354	40	7	0	-5	<i>Bactéries aérobies</i>
(Garcia-Gonzalez et al., 2009b)	130	45	10	0	-2,5	<i>Bactéries aérobies</i>
	-	69	3	2,38	-1,5	<i>Bactéries aérobies</i>
Expérience O5	100	38	75	0*	-3,2	<i>E. coli</i>
(Oulé et al., 2013)	250	40	90	0	-6 (totale)	<i>L. helveticus</i>
(Marszałek et al., 2015)	600 à 300	45	30	0	-1,5 à -3,8	<i>Flore totale</i>
Expérience O4	100	50	75	1,03*	-7,4 (totale)	<i>E. coli</i>
Expérience MM	170	55	10	1,26*	-10 (totale)	<i>E. coli</i>
(Chen et al., 2009)	350	55	60	1,9	-4,5	<i>Flore totale</i>
	-	90	1	100	-4,75	<i>Flore totale</i>

Nos résultats sont confirmés par ceux de la littérature. Par exemple, Chen et al. (2009) observent une réduction décimale équivalente entre le traitement au CO₂ et le traitement thermique bien que la VP du traitement au CO₂ soit largement inférieure à celle du

traitement thermique (1,9 min contre 100 min). Ainsi les traitements au CO₂ pressurisé assurent des réductions décimales similaires à celles des traitements thermiques usuels, sans que la température soit l'acteur principal de l'inactivation.

4. Conclusion

Le traitement par CO₂ comprimé permet d'assurer la sécurité sanitaire de notre complément alimentaire à long terme. Le milieu naturellement acide ne permet pas la reprise de la croissance des bactéries en cas de présence résiduelle. En revanche, si l'intégralité des levures n'a pas été éliminée, il sera possible d'observer un retour progressif de la contamination.

Si le CO₂ comprimé n'offre pas d'avantage marqué vis à vis d'un traitement thermique classique en terme de d'efficacité pasteurisatrice, il permet cependant de limiter la perte en nutriment et molécules d'intérêt. En effet, ce type de traitement est plus respectueux et induit des pertes moins importantes. D'un point de vue préservation, les polyphénols contenus dans *Jambes Légères* et traités par CO₂ comprimé sont stables au stockage. En revanche, la vitamine C est plus sensible et peut afficher une perte non négligeable. Pour limiter ce phénomène, il est conseillé de stocker son complément alimentaire au frais et à l'abri de la lumière.

Conclusions et perspectives

Les compléments alimentaires constituent une source concentrée de nutriments ou d'autres substances ayant un effet nutritionnel ou physiologique. Sous leur forme liquide, ces compléments sont propices à la prolifération de microorganismes pathogènes du fait de leur forte teneur en eau et de la présence de solutés apportés notamment par les plantes dont ils sont issus. De par la fragilité de leurs composants, il est préférable de recourir à des techniques de pasteurisation douces pour pouvoir assurer la sécurité sanitaire du consommateur tout en conservant les propriétés nutritionnelles. Le CO₂ pressurisé a montré, depuis plusieurs années déjà, son efficacité à pasteuriser. La préservation simultanée des actifs nutritionnels et le traitement de matrices réelles telles que les jus de fruits sont des thématiques qui ont émergées plus récemment.

Le contexte industriel de la thèse a orienté un certain nombre de choix qui ont poussé cette étude en dehors du champ généralement exploré dans la littérature :

- les compléments alimentaires liquides commerciaux : il s'agit de macérats aqueux de plantes présentant des matières en suspension ;
- un large spectre de contamination microbienne: le traitement doit pouvoir inactiver totalement les bactéries, les levures et les spores ;
- un niveau élevé de contamination ;
- la préservation des actifs : quantifier la préservation en vue d'une argumentation commerciale sur la qualité du produit ;
- une logique d'industrialisation à court terme.

Le premier objectif de cette thèse était de déterminer les conditions opératoires permettant d'assurer une pasteurisation satisfaisante avec du CO₂ pressurisé. L'impact des paramètres opératoires a été mis en évidence au moyen d'un plan d'expériences et du traitement statistique des résultats ainsi que par l'exploration de différentes configurations expérimentales (cycles de pression, réacteur et mobile d'agitation différents, mini-dispositif continu...).

Le plan composite centré, ayant exploré des conditions entre 20 et 55°C, 30 et 170 bar, 10 et 140 min et 5 à 55 bar/min, a permis de mettre en évidence l'influence prépondérante de la température sur l'inactivation des microorganismes ; la pression et dans une moindre mesure l'interaction pression-durée de traitement interviennent également. Il est préférable de travailler à haute température (50°C), la durée venant

compenser la pression et inversement. La mise en œuvre de cycles de pression, au cours desquels il y a dépressurisation partielle, n'a pas amené d'amélioration significative de la réduction des microorganismes. Cette option pourrait être utilisée dans le cadre de la stérilisation comme l'a montré la littérature.

La comparaison de traitements CO₂ (38°C et 50°C à 100 bar) avec des essais aux mêmes températures sous N₂ ou en air (à pression atmosphérique) ont mis en évidence l'effet bactéricide intrinsèque du CO₂. L'effet du CO₂ est indiscutable à 38°C alors qu'à 50°C, c'est l'effet de la température sur des microorganismes thermosensibles qui prédomine. De plus, nous avons pu constater et démontrer que le pH acide renforçait la sensibilité des microorganismes notamment aux températures supérieures à 50°C. Le rôle du pH a été mis en évidence en réalisant des essais sur le milieu *Jambes Légères* dont le pH a été ajusté à 6 (essais à 38°C). Ces essais ont conduit à une moins bonne réduction décimale que ceux réalisés dans le milieu *Jambes Légères* natif. Cette résistance peut s'expliquer par la coexistence à pH 6 des différentes formes ionisées de l'acide carbonique, alors qu'à pH 4, le CO₂ est présent principalement sous la forme de H₂CO₃. Seule la forme non dissociée est capable de traverser la membrane cellulaire. A pH 6 sa proportion dans le milieu est plus faible, induisant une moins bonne efficacité.

Des clichés de microscopie ont permis d'illustrer les dégradations structurales subies par les microorganismes. Après traitement, les cellules sont intègres au sens qu'elles n'ont pas « explosé », mais le cytoplasme devient inhomogène et fuit partiellement à travers la membrane. Les destructions engendrées par le CO₂ sont similaires à celles causées par la température. D'une part, cela réfute l'hypothèse de la rupture des cellules sous l'effet de l'expansion du CO₂ lors de la dépressurisation et d'autre part cela met en évidence l'impact du CO₂ sur les membranes des cellules.

La pasteurisation a été abordée en terme de transfert de masse dans un contacteur gaz-liquide agité afin d'évaluer l'efficacité de notre dispositif et d'estimer la cinétique de dissolution du CO₂ dans la phase aqueuse. Il est important de souligner que c'est une approche plus théorique qui n'est que peu abordée dans la littérature, les exemples s'en rapprochant étant des suivis in-situ de pH ou de concentration de CO₂ par spectroscopie Raman. Les conditions de l'étude étaient celles d'un traitement de 75 min à 38°C et 100 bar. Le coefficient de transfert volumique $k_L a$ a été calculé au moyen de différentes corrélations au cours de la phase de pressurisation. Un temps de transfert de l'ordre de 100 s est obtenu.

L'étude de sensibilité et des tendances montre que le temps de transfert du CO₂ sera diminué entre autre par un milieu moins visqueux ou d'une masse volumique plus forte ou par un débit d'alimentation en CO₂ plus élevé. En terme de concentration, on a calculé que 91% de la concentration à saturation est atteinte à l'issue des 4 minutes de pressurisation et qu'il faut environ 10 min pour saturer le milieu en CO₂. Ainsi, dans nos conditions expérimentales, les traitements au CO₂ ont été fait dans des conditions de solutions saturées, autrement dit, on ne peut imputer l'absence d'inactivation totale à un déficit en CO₂. Un micro dispositif continu a quant à lui montré qu'il fallait un temps expérimental de contact entre le CO₂ et la solution de 30 minutes pour obtenir un niveau de mortalité (N_0-N/N_0 en %) équivalent à ceux obtenus en dispositif batch ($\pm 99,70\%$). Ainsi, même dans le cas où la dissolution du CO₂ n'est gouvernée que par simple diffusion dans le petit volume d'une goutte, il faut un certain temps de contact pour obtenir une réduction notable de la charge.

Les essais réalisés sur des charges plus faibles (6.10^6 UFC/mL vs 4.10^8 UFC/mL généralement) ont montré la dépendance entre durée du traitement et niveau de contamination. En effet une charge totale de 6.10^6 UFC/mL est totalement inactivée à partir de 45 min de traitement. Mais 10 min de traitement suffisent, après la phase de pressurisation, pour détruire 99,94% des microorganismes. On démontre qu'il est donc possible d'avoir une inactivation totale avec des temps de traitement courts, pourvu que la charge soit « faible ». Cela confirme aussi que notre dispositif était efficace et que ce qui pouvait apparaître comme des résultats peu satisfaisants lors de l'exploitation du plan d'expériences et des essais d'optimisation était en réalité la conséquence d'un niveau de contamination élevé. Par ailleurs, notre étude a été menée sur un trio de microorganismes. C'est un facteur supplémentaire de complexité car les microorganismes présentent une réactivité face au CO₂ différente. *L.innocua* s'avère être le plus sensible, tandis que *S. cerevisiae* est le plus résistant. Quant aux spores, abordés de façon marginale dans ce travail, l'inactivation de *B. subtilis* n'a pas été possible. Bien qu'un traitement de pasteurisation à 50°C mené dans un milieu de pH inférieur à 4,5 soit l'équivalent d'une stérilisation d'un point de vue microbiologique, le couplage température/pH acide du complément alimentaire / CO₂ n'a pas été suffisant pour engendrer la destruction de ces microorganismes. L'application de température et de pressions plus élevées pourrait permettre d'atteindre de meilleurs résultats, avec néanmoins un risque accru de perdre les principes actifs.

Le second aspect de ces travaux était la préservation des principes actifs au cours du traitement au CO₂ pressurisé. A partir de dosages réalisés dans le cadre du plan d'expériences et des analyses HPLC, nous avons pu montrer que bien que la composition générale soit affectée par la température et la durée du traitement, nos conditions opératoires sous CO₂ pressurisé (notamment à 38°C) assurent une bonne préservation de la vitamine C avec au moins une conservation de 70% de sa quantité initiale. La teneur en polyphénols totaux est conservée, même dans les conditions de pasteurisation les plus dures.

D'une façon plus générale on peut se poser la question de l'intérêt d'un tel traitement par le CO₂ pour un industriel, sachant que les coûts d'investissements d'une installation supercritique sont élevés. Dans le cas de nos compléments alimentaires ou des jus de fruits, les matrices sont naturellement acides, ce qui est un facteur peu favorable au développement des bactéries. En l'espace de quelques jours ces populations disparaissent. Toutefois, les levures sont plus résistantes et survivent. Pour garantir la sécurité sanitaire du consommateur, il faudra quand même appliquer un traitement de pasteurisation à ces denrées. A moins de parvenir à pasteuriser avec du CO₂ à basse température (de l'ordre de l'ambiante à 40°C) et avec des pressions très faibles, il n'est pas certain que le CO₂ soit concurrentiel par rapport à un traitement thermique largement utilisé dans l'industrie, même si ce dernier induit des pertes un peu plus importantes en principes actifs. Pour rendre ce procédé plus intéressant, il faudrait augmenter sa productivité. Ceci explique l'intérêt pour le mode continu dans lequel la solution et le CO₂ sont mélangés en permanence.

En terme de perspectives à ce travail, l'accent pourrait être mis sur l'amélioration de la compréhension des mécanismes via :

- la mesure de la quantité de CO₂ dissoute dans la phase aqueuse et donc le suivi de la cinétique de dissolution du CO₂ permettraient d'établir le lien entre conditions expérimentales de pression et température et taux d'inactivation. Cette étude doit être entreprise pour chaque milieu à traiter puisque le milieu lui-même peut induire des différences dans la concentration à saturation et/ou la prédominance des formes dissociées du CO₂ via la valeur de pH ;

- l'étude de l'influence de la charge en microorganismes de façon à établir une éventuelle corrélation entre quantité de CO₂ dissous et nombre de microorganismes à inactiver.

Ces deux approches contribueraient à aborder la pasteurisation sous l'angle du procédé qu'il est important de considérer pour une extrapolation à plus grande échelle. Pour dégager des tendances, il paraît souhaitable de traiter des charges moins concentrées que celles utilisées ici, afin de tirer des conclusions plus pertinentes et d'affiner l'étude de l'influence des conditions opératoires sur l'inactivation. De même, on favorisera des expériences avec une seule espèce de manière à pouvoir raisonner à la fois en termes de réduction décimale totale et de sensibilité d'un microorganisme. Cependant il serait intéressant de chercher à savoir si les microorganismes interagissent entre eux et exercent une forme d'effet tampon ou d'écran les uns vis à vis des autres. Puisque l'on a rarement une seule forme de contamination dans un échantillon réel, est-ce que les 3 populations de microorganismes sont tuées en même temps ou la population la plus sensible est-elle « attaquée » préférentiellement ? La coexistence des microorganismes modifie-t-elle leur réactivité ? A ce titre, mieux analyser les dégradations subies par les cellules, notamment en quantifiant la perméabilisation ou la dénaturation des membranes dans le cas des populations isolées permettrait de mieux cerner la spécificité de chaque microorganismes vis à vis du CO₂.

Références bibliographiques

- Aimar, P., Daufin, G., 2004. Séparations par membrane dans l'industrie alimentaire. Tech. Ing.
- Alais, C., Linden, G., Miclo, L., 2008. Biochimie alimentaire. Dunod, Paris.
- Al-Maiman, S.A., Ahmad, D., 2002. Changes in physical and chemical properties during pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit maturation. *Food Chem.* 76, 437–441. doi:10.1016/S0308-8146(01)00301-6
- Amiot-Carlin, M.J., Coxam, V., Strigler, F., 2012. Les phytomicronutriments. Tec & doc, Paris.
- Amrouche, 2010. La congélation & surgélation [WWW Document]. Génie Aliment. URL <http://genie-alimentaire.com/spip.php?article11> (accessed 9.1.15).
- Andersson, I., Öste, R., 1994. Nutritional quality of pasteurized milk. Vitamin B12, folate and ascorbic acid content during storage. *Int. Dairy J.* 4, 161–172.
- Arlabosse, P., 2008. Séchage industriel - Aspects pratiques. Tech. Ing.
- Arreola, A.G., Balaban, M.O., Wei, C.I., Peplow, A., Marshall, M., Cornell, J., 1991. EFFECT OF SUPERCRITICAL CARBON DIOXIDE ON MICROBIAL POPULATIONS IN SINGLE STRENGTH ORANGE JUICE. *J. Food Qual.* 14, 275–284. doi:10.1111/j.1745-4557.1991.tb00068.x
- Aubineau, N., 2014. La conservation des aliments [WWW Document]. Diététique - Nicolas Aubineau. URL <http://www.nicolas-aubineau.com/conservation-des-aliments/> (accessed 9.1.15).
- Balaban, M., Marshall, M., Wicker, L., 1995. Inactivation of enzymes in foods with pressurized CO₂. US 5393547 A.
- Balaban, M.O., Duong, T., 2014. Dense Phase Carbon Dioxide Research: Current Focus and Directions. *Agric. Agric. Sci. Procedia* 2, 2–9. doi:10.1016/j.aaspro.2014.11.002
- Ballestra, P., Cuq, J.-L., 1998. Influence of Pressurized Carbon Dioxide on the Thermal Inactivation of Bacterial and Fungal Spores. *LWT - Food Sci. Technol.* 31, 84–88. doi:10.1006/fstl.1997.0299
- Ballestra, P., Silva, A.A., Cuq, J.L., 1996. Inactivation of *Escherichia coli* by Carbon Dioxide under Pressure. *J. Food Sci.* 61, 829–831. doi:10.1111/j.1365-2621.1996.tb12212.x
- Barba, F.J., Esteve, M.J., Frígola, A., 2012. High Pressure Treatment Effect on Physicochemical and Nutritional Properties of Fluid Foods During Storage: A Review. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 11, 307–322. doi:10.1111/j.1541-4337.2012.00185.x
- Beales, N., 2004. Adaptation of Microorganisms to Cold Temperatures, Weak Acid Preservatives, Low pH, and Osmotic Stress: A Review. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 3, 1–20. doi:10.1111/j.1541-4337.2004.tb00057.x
- Bimbenet, J.-J., 1998. Bases conceptuelles du génie des procédés agroalimentaires. Tech. Ing.
- Biton, M., 1997. Dossier : Les procédés de conservation des aliments [WWW Document]. Inst. Danone Aliment. Pour Santé. URL <http://institutdanone.org/objectif-nutrition/les-procedes-de-conservation-des-aliments/dossier-les-procedes-de-conservation-des-aliments/> (accessed 9.1.15).
- Bi, X., Wang, Y., Zhao, F., Zhang, Y., Rao, L., Liao, X., Hu, X., Sun, Z., 2014. Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 by high pressure carbon dioxide combined with nisin in

- physiological saline, phosphate-buffered saline and carrot juice. *Food Control* 41, 139–146. doi:10.1016/j.foodcont.2014.01.012
- Bouchet Bert-Manoz, R., 2014. L'état supercritique en sciences de la Terre [WWW Document]. Planet TERre. URL <http://planet-terre.ens-lyon.fr/article/fluide-supercritique.xml> (accessed 10.26.16).
- Bourgeois, C.F., 2003. Les vitamines dans les industries agroalimentaires. Éditions TEC & DOC, Paris.
- Boussetta, N., 2010. Intensification de l'extraction des polyphénols par électrotechnologies pour la valorisation des marcs de champagne (Génie des procédés). Université de Compiègne.
- Bradford, M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 7, 248–254.
- Brat, P., George, S., Bellamy, A., Du Chauffaut, L., Scalbert, A., Mennen, L., Arnault, N., Amiot, M.J., 2006. Daily Polyphenol Intake in France from Fruit and Vegetables. *J. Nutr.* 136, 2368–2373.
- Bresson, J.-L., Mariotti, J.-F., 2016. Actualisation des repères du PNNS : élaboration des références nutritionnelles (No. 2012-SA-0103). Anses.
- Brunner, G., 2005. Supercritical fluids: technology and application to food processing. *J. Food Eng.* 67, 21–33. doi:10.1016/j.jfoodeng.2004.05.060
- Burns, D., Humphrey, R., Eisenhut, A., Christensen, T., 2011. Sterilization of drugs using supercritical carbon dioxide sterilant. US8012414 B2.
- Calderbank, P.H., 1958. Physical rate processes in industrial fermentation : part 1 : the interfacial area in gas-liquid contacting with mechanical agitation. *Trans. Inst. Chem. Eng.* 36, 443–463.
- Calix, T.F., Ferrentino, G., Balaban, M.O., 2008. Measurement of High-Pressure Carbon Dioxide Solubility in Orange Juice, Apple Juice, and Model Liquid Foods. *J. Food Sci.* 73, E439–E445. doi:10.1111/j.1750-3841.2008.00945.x
- Calvo, L., Muguerza, B., Cienfuegos-Jovellanos, E., 2007. Microbial inactivation and butter extraction in a cocoa derivative using high pressure CO₂. *J. Supercrit. Fluids* 42, 80–87. doi:10.1016/j.supflu.2007.01.009
- Calvo, L., Torres, E., 2010. Microbial inactivation of paprika using high-pressure CO₂. *J. Supercrit. Fluids* 52, 134–141. doi:10.1016/j.supflu.2009.11.002
- Carvalho, P.J., Pereira, L.M.C., Gonçalves, N.P.F., Queimada, A.J., Coutinho, J.A.P., 2015. Carbon dioxide solubility in aqueous solutions of NaCl: Measurements and modeling with electrolyte equations of state. *Fluid Phase Equilibria* 388, 100–106. doi:10.1016/j.fluid.2014.12.043
- Chauhan, A.S., Ramteke, R.S., Eipeson, W., 1998. Properties of ascorbic acid and its applications in food processing : A critical appraisal. *J. Food Sci. Technol.* 35, 381–392.
- Checinska, A., Fruth, I.A., Green, T.L., Crawford, R.L., Paszczynski, A.J., 2011. Sterilization of biological pathogens using supercritical fluid carbon dioxide containing water and hydrogen peroxide. *J. Microbiol. Methods* 87, 70–75. doi:10.1016/j.mimet.2011.07.008
- Chehue, A., Olvera Hernandez, E.G., Cern, T.F., lvarez, A., 2013. The Exogenous Antioxidants, in: Morales-Gonzalez, J.A. (Ed.), *Oxidative Stress and Chronic Degenerative Diseases - A Role for Antioxidants*. InTech.
- Chen, J., Zhang, J., Feng, Z., Song, L., Wu, J., Hu, X., 2009. Influence of Thermal and Dense-Phase Carbon Dioxide Pasteurization on Physicochemical Properties and Flavor

- Compounds in Hami Melon Juice. *J. Agric. Food Chem.* 57, 5805–5808. doi:10.1021/jf900752b
- Christensen, T., Burns, D., White, A., Ganem, B., Eisenhut, A., 2006. Sterilization methods and apparatus which employ additive-containing supercritical carbon dioxide sterilant. US 7108832 B2.
- Chun, B.-S., Wilkinson, G.T., 1995. Interfacial tension in high-pressure carbon dioxide mixtures. *Ind. Eng. Chem. Res.* 34, 4371–4377. doi:10.1021/ie00039a029
- Comim, S.R.R., Madella, K., Oliveira, J.V., Ferreira, S.R.S., 2010. Supercritical fluid extraction from dried banana peel (*Musa* spp., genomic group AAB): Extraction yield, mathematical modeling, economical analysis and phase equilibria. *J. Supercrit. Fluids* 54, 30–37. doi:10.1016/j.supflu.2010.03.010
- Cotzias, G.C., 1967. Importance of trace substances in experimental health, as exemplified by manganese. Presented at the Tracs Substances in Environmental Health, Columbia, University of Missouri, pp. 5–19.
- Cubaud, T., Sauzade, M., Sun, R., 2012. CO₂ dissolution in water using long serpentine microchannels. *Biomicrofluidics* 6, 022002. doi:10.1063/1.3693591
- Damar, S., Balaban, M.O., Sims, C.A., 2009. Continuous dense-phase CO₂ processing of a coconut water beverage. *Int. J. Food Sci. Technol.* 44, 666–673. doi:10.1111/j.1365-2621.2008.01784.x
- Debs-Louka, E., Louka, N., Abraham, G., Chabot, V., Allaf, K., 1999. Effect of Compressed Carbon Dioxide on Microbial Cell Viability. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 626–631.
- Del Pozo-Insfran, D., Balaban, M.O., Talcott, S.T., 2006. Microbial Stability, Phytochemical Retention, and Organoleptic Attributes of Dense Phase CO₂ Processed Muscadine Grape Juice. *J. Agric. Food Chem.* 54, 5468–5473. doi:10.1021/jf060854o
- Diamond, L.W., Akinfiev, N.N., 2003. Solubility of CO₂ in water from –1.5 to 100 °C and from 0.1 to 100 MPa: evaluation of literature data and thermodynamic modelling. *Fluid Phase Equilibria* 208, 265–290. doi:10.1016/S0378-3812(03)00041-4
- Dillow, A.K., Dehghani, F., Hrkach, J.S., Foster, N.R., Langer, R., 1999. Bacterial inactivation by using near- and supercritical carbon dioxide. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96, 10344–10348. doi:10.1073/pnas.96.18.10344
- Dillow, A., Langer, R., Foster, N., Hrkach, J., 2000. Supercritical fluid sterilization method.
- Dispositif national de nutrivigilance [WWW Document], n.d. . Anses - Agence Natl. Sécurité Sanit. L'alimentation L'environnement Trav. URL <https://www.anses.fr/fr/content/dispositif-national-de-nutrivigilance> (accessed 10.24.16).
- Dodds, W.S., Stutzman, L.F., Sollami, B.J., 1956. Carbon dioxide solubility in water. *Ind. Eng. Chem.* 1, 92–95.
- Doona, C.J., Kustin, K., Feeherry, F.E. (Eds.), 2010. Case studies in novel food processing technologies: innovations in processing, packaging and predictive modelling, Woodhead Publishing series in food science, technology, and nutrition. Woodhead Publishing, Oxford ; Philadelphia, PA.
- Dubuisson, C., Lioret, S., Touvier, M., Dufour, A., Calamassi-Tran, G., Volatier, J.-L., Lafay, L., 2010. Trends in food and nutritional intakes of French adults from 1999 to 2007: results from the INCA surveys. *Br. J. Nutr.* 103, 1035. doi:10.1017/S0007114509992625
- Elmnasser, N., Guillou, S., Leroi, F., Orange, N., Bakhrouf, A., Federighi, M., 2007. Pulsed-light system as a novel food decontamination technology: a review. *Can. J. Microbiol.* 53, 813–821. doi:10.1139/W07-042

- Enomoto, A., Nakamura, K., Hakoda, M., Amaya, N., 1997a. Lethal effect of high-pressure carbon dioxide on a bacterial spore. *J. Ferment. Bioeng.* 83, 305–307. doi:10.1016/S0922-338X(97)80999-3
- Enomoto, A., Nakamura, K., Nagai, K., Hashimoto, T., Hakoda, M., 1997b. Inactivation of Food Microorganisms by High-pressure Carbon Dioxide Treatment with or without Explosive Decompression. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 61, 1133–1137. doi:10.1271/bbb.61.1133
- Erkmen, O., 2001. Effects of high-pressure carbon dioxide on *Escherichia coli* in nutrient broth and milk. *Int. J. Food Microbiol.* 65, 131–135. doi:10.1016/S0168-1605(00)00499-2
- Erkmen, O., 2000a. Effect of carbon dioxide pressure on *Listeria monocytogenes* in physiological saline and foods. *Food Microbiol.* 17, 589–596. doi:10.1006/fmic.2000.0361
- Erkmen, O., 2000b. Antimicrobial effect of pressurised carbon dioxide on *Enterococcus faecalis* in physiological saline and foods. *J. Sci. Food Agric.* 80, 465–470.
- Everette, J.D., Bryant, Q.M., Green, A.M., Abbey, Y.A., Wangila, G.W., Walker, R.B., 2010. Thorough Study of Reactivity of Various Compound Classes toward the Folin–Ciocalteu Reagent. *J. Agric. Food Chem.* 58, 8139–8144. doi:10.1021/jf1005935
- Fernández-Segovia, I., Pérez-Llácer, A., Peidro, B., Fuentes, A., 2014. Implementation of a food safety management system according to ISO 22000 in the food supplement industry: A case study. *Food Control* 43, 28–34. doi:10.1016/j.foodcont.2014.02.042
- Ferreira, A., Ferreira, C., Teixeira, J.A., Rocha, F., 2010. Temperature and solid properties effects on gas–liquid mass transfer. *Chem. Eng. J.* 162, 743–752. doi:10.1016/j.cej.2010.05.064
- Ferrentino, G., Plaza, M.L., Ramirez-Rodrigues, M., Ferrari, G., Balaban, M.O., 2009. Effects of Dense Phase Carbon Dioxide Pasteurization on the Physical and Quality Attributes of a Red Grapefruit Juice. *J. Food Sci.* 74, E333–E341. doi:10.1111/j.1750-3841.2009.01250.x
- Ferrentino, G., Schuster, J., Braeuer, A., Spilimbergo, S., 2016. In situ Raman quantification of the dissolution kinetics of carbon dioxide in liquid solutions during a dense phase and ultrasound treatment for the inactivation of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Supercrit. Fluids* 111, 104–111. doi:10.1016/j.supflu.2016.01.019
- Fraser, D., 1951. Bursting Bacteria by Release of Gas Pressure. *Nature* 167, 33–34. doi:10.1038/167033b0
- Garcia-Gonzalez, L., Geeraerd, A.H., Elst, K., Van Ginneken, L., Van Impe, J.F., Devlieghere, F., 2009a. Influence of type of microorganism, food ingredients and food properties on high-pressure carbon dioxide inactivation of microorganisms. *Int. J. Food Microbiol.* 129, 253–263. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2008.12.005
- Garcia-Gonzalez, L., Geeraerd, A.H., Elst, K., Van Ginneken, L., Van Impe, J.F., Devlieghere, F., 2009b. Inactivation of naturally occurring microorganisms in liquid whole egg using high pressure carbon dioxide processing as an alternative to heat pasteurization. *J. Supercrit. Fluids* 51, 74–82. doi:10.1016/j.supflu.2009.06.020
- Garcia-Gonzalez, L., Geeraerd, A.H., Mast, J., Briers, Y., Elst, K., Van Ginneken, L., Van Impe, J.F., Devlieghere, F., 2010a. Membrane permeabilization and cellular death of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Saccharomyces cerevisiae* as induced by high pressure carbon dioxide treatment. *Food Microbiol.* 27, 541–549. doi:10.1016/j.fm.2009.12.004
- Garcia-Gonzalez, L., Geeraerd, A.H., Spilimbergo, S., Elst, K., Van Ginneken, L., Debevere, J., Van Impe, J.F., Devlieghere, F., 2007. High pressure carbon dioxide inactivation of

- microorganisms in foods: The past, the present and the future. *Int. J. Food Microbiol.* 117, 1–28. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2007.02.018
- Garcia-Gonzalez, L., Teichert, H., Geeraerd, A.H., Elst, K., Van Ginneken, L., Van Impe, J.F., Vogel, R.F., Devlieghere, F., 2010b. Mathematical modelling and in situ determination of pH in complex aqueous solutions during high-pressure carbon dioxide treatment. *J. Supercrit. Fluids* 55, 77–85. doi:10.1016/j.supflu.2010.05.024
- Garcia-Ochoa, F., Gomez, E., 2009. Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: An overview. *Biotechnol. Adv.* 27, 153–176. doi:10.1016/j.biotechadv.2008.10.006
- Garwood, A., 2009. Decontamination methods for meat using carbonic acid at high pressures.
- Giannuzzi, L., Zaritzky, N.E., 1996. Effect of Ascorbic Acid in Comparison to Citric and Lactic Acid on *Listeria monocytogenes* Inhibition at Refrigeration Temperatures. *LWT - Food Sci. Technol.* 29, 278–285. doi:10.1006/fstl.1996.0041
- Giménez, R., Cabrera, C., Olalla, M., Ruiz, M.D., López, M.C., 2002. Ascorbic acid in diet supplements: loss in the manufacturing process and storage. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 53, 509–518. doi:10.1080/09637480220164352
- Giulitti, S., Cinquemani, C., Quaranta, A., Spilimbergo, S., 2011. Real time intracellular pH dynamics in *Listeria innocua* under CO₂ and N₂O pressure. *J. Supercrit. Fluids* 58, 385–390. doi:10.1016/j.supflu.2011.07.012
- Gkogka, E., Reij, M.W., Gorris, L.G.M., Zwietering, M.H., 2013. The application of the Appropriate Level of Protection (ALOP) and Food Safety Objective (FSO) concepts in food safety management, using *Listeria monocytogenes* in deli meats as a case study. *Food Control* 29, 382–393. doi:10.1016/j.foodcont.2012.04.020
- Gómez-López, V.M., Ragaert, P., Debevere, J., Devlieghere, F., 2007. Pulsed light for food decontamination: a review. *Trends Food Sci. Technol.* 18, 464–473. doi:10.1016/j.tifs.2007.03.010
- Guillaument, R., Erriguible, A., Aymonier, C., Marre, S., Subra-Paternault, P., 2013. Numerical simulation of dripping and jetting in supercritical fluids/liquid micro coflows. *J. Supercrit. Fluids* 81, 15–22. doi:10.1016/j.supflu.2013.04.011
- Haas, G.J., Prescott, H.E., Dudley, E., Dik, R., Hintlian, C., Keane, L., 1989. INACTIVATION OF MICROORGANISMS BY CARBON DIOXIDE UNDER PRESSURE. *J. Food Saf.* 9, 253–265. doi:10.1111/j.1745-4565.1989.tb00525.x
- Hemrajani, R.R., Tatterson, G.B., 2003. Mechanically Stirred Vessels, in: Paul, E.L., Atiemo-Obeng, V.A., Kresta, S.M. (Eds.), *Handbook of Industrial Mixing*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, pp. 345–390.
- Hendrickx, M.E.G., Knorr, D., Ludikhuyze, L., Loey, A., Heinz, V., 2001. *Ultra High Pressure Treatments of Foods*. Springer US : Imprint : Springer, Boston, MA.
- Hill, C., O'Driscoll, B., Booth, I., 1995. Acid adaptation and food poisoning microorganisms. *Int. J. Food Microbiol.* 28, 245–254. doi:10.1016/0168-1605(95)00060-7
- Hofland, G.W., Berkhoff, M., Witkamp, G.J., Van der Wielen, L.A., 2003. Dynamics of precipitation of casein with carbon dioxide. *Int. Dairy J.* 13, 685–697. doi:10.1016/S0958-6946(03)00116-X
- Hofland, G.W., de Rijke, A., Thiering, R., van der Wielen, L.A., Witkamp, G.-J., 2000. Isoelectric precipitation of soybean protein using carbon dioxide as a volatile acid. *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. App.* 743, 357–368. doi:10.1016/S0378-4347(00)00259-0
- Hong, H.A., Khaneja, R., Tam, N.M.K., Cazzato, A., Tan, S., Urdaci, M., Brisson, A., Gasbarrini, A., Barnes, I., Cutting, S.M., 2009. *Bacillus subtilis* isolated from the human

- gastrointestinal tract. Res. Microbiol. 160, 134–143. doi:10.1016/j.resmic.2008.11.002
- Hong, S.-I., Pyun, Y.-R., 2001. Membrane damage and enzyme inactivation of *Lactobacillus plantarum* by high pressure CO₂ treatment. Int. J. Food Microbiol. 63, 19–28. doi:10.1016/S0168-1605(00)00393-7
- Hong, S.-I., Pyun, Y.-R., 1999. Inactivation Kinetics of *Lactobacillus plantarum* by High Pressure Carbon Dioxide. J. Food Sci. 64, 728–733. doi:10.1111/j.1365-2621.1999.tb15120.x
- Hsieh, Y.H.P., Harris, N.D., 1993. Effect of sucrose on oxygen uptake of ascorbic acid in a closed aqueous system. J. Agric. Food Chem. 41, 259–262. doi:10.1021/jf00026a023
- Hughmark, G.A., 1980. Power Requirements and Interfacial Area in Gas-Liquid Turbine Agitated Systems. Ind. Eng. Chem. Process Des. Dev. 19, 638–641. doi:10.1021/i260076a023
- Inyang, U.E., Ike, C.I., 1998. Effect of blanching, dehydration method and temperature on the ascorbic acid, colour, sliminess and other constituents of okra fruit. Int. J. Food Sci. Nutr. 49, 125–130. doi:10.3109/09637489809089392
- Isenschmid, A., Marison, I.W., Von Stockar, U., 1994. The influence of near-critical and supercritical CO₂ on the viability of yeast cells. Presented at the 3rd Internal Symposium Supercritical Fluids, G. Brunner, M. Perrut, pp. 367–370.
- Ishikawa, H., Shimoda, M., Shiratsuchi, H., Osajima, Y., 1995. Sterilization of Microorganisms by the Supercritical Carbon Dioxide Micro-Bubble Method. Biosci. Biotechnol. Biochem. 59, 1949–1950. doi:10.1271/bbb.59.1949
- Ishikawa, H., Shimoda, M., Tamaya, K., Yonekura, A., Kawano, T., Osajima, Y., 1997. Inactivation of *Bacillus* Spores by the Supercritical Carbon Dioxide Micro-bubble Method. Biosci. Biotechnol. Biochem. 61, 1022–1023. doi:10.1271/bbb.61.1022
- Jonge, R., Takumi, K., Ritmeester, W.S., Leusden, F.M., 2003. The adaptive response of *Escherichia coli* O157 in an environment with changing pH. J. Appl. Microbiol. 94, 555–560. doi:10.1046/j.1365-2672.2003.01865.x
- Kamihira, M., Taniguchi, M., Kobayashi, T., 1987. Sterilization of Microorganisms with Supercritical Carbon Dioxide. Agric. Biol. Chem. 51, 407–412. doi:10.1080/00021369.1987.10868053
- Karaman, H., Erkmén, O., 2001. High carbon dioxide pressure inactivation kinetics of *Escherichia coli* in broth. Food Microbiol. 18, 11–16. doi:10.1006/fmic.2000.0371
- Kim, S.R., Park, H.J., Yim, D.S., Kim, H.T., Choi, I.-G., Kim, K.H., 2008. Analysis of survival rates and cellular fatty acid profiles of *Listeria monocytogenes* treated with supercritical carbon dioxide under the influence of cosolvents. J. Microbiol. Methods 75, 47–54. doi:10.1016/j.mimet.2008.04.012
- Kincal, D., Hill, W.S., Balaban, M.O., Portier, K.M., Wei, C.I., Marshall, M.R., 2006. A Continuous High Pressure Carbon Dioxide System for Microbial Reduction in Orange Juice. J. Food Sci. 70, M249–M254. doi:10.1111/j.1365-2621.2005.tb09979.x
- Koch, A.L., 1970. Turbidity measurements of bacterial cultures in some available commercial instruments. Anal. Biochem. 38, 252–259. doi:10.1016/0003-2697(70)90174-0
- Kudrewizki, F., 1982. Zur Berechnung des gasgehaltes in begasteten Rührkesseln. Chem. Technol. 34, 247–249.
- Lehmann, G., Juchem, F.J., 1989. Verfahren zum haltbarmachen eines wasserhaltigen lebensmittels. E3734025 A1.
- Les compléments alimentaire : réglementation [WWW Document], 2014. . Synadiet Synd. Natl. Compléments Aliment. URL <http://www.synadiet.org/les-complements-alimentaires/reglementation> (accessed 7.9.15).

- Les compléments alimentaires : les chiffres [WWW Document], 2016. . Synadiet Synd. Natl. Compléments Aliment. URL <http://www.synadiet.org/les-complements-alimentaires/le-marche/les-chiffres-du-marche-en-2015> (accessed 10.24.16).
- Leveau, J.-Y., Larpent, J.-P., Bouix, M., 2001. Sécurité microbiologique des procédés alimentaires. Tech. Ing.
- Liao, H., Hu, X., Liao, X., Chen, F., Wu, J., 2007. Inactivation of *Escherichia coli* inoculated into cloudy apple juice exposed to dense phase carbon dioxide. *Int. J. Food Microbiol.* 118, 126–131. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2007.06.018
- Liao, H., Zhang, Y., Hu, X., Liao, X., Wu, J., 2008. Behavior of inactivation kinetics of *Escherichia coli* by dense phase carbon dioxide. *Int. J. Food Microbiol.* 126, 93–97. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2008.05.008
- Lim, S.B., Yagiz, Y., Balaban, M.O., 2006. Continuous High Pressure Carbon Dioxide Processing of Mandarin Juice. *Food Sci. Biotechnol.* 15, 13–18.
- Lin, H.-M., Cao, N., Chen, L.-F., 1994. Antimicrobial Effect of Pressurized Carbon Dioxide on *Listeria monocytogenes*. *J. Food Sci.* 59, 657–659. doi:10.1111/j.1365-2621.1994.tb05587.x
- Lin, H.M., Yang, Z., Chen, L.F., 1992. Inactivation of *Saccharomyces cerevisiae* by supercritical and subcritical carbon dioxide. *Biotechnol. Prog.* 8, 458–461. doi:10.1021/bp00017a013
- Liu, Y., Hu, X.S., Zhao, X.Y., Zhang, C., 2013. Inactivation of polyphenol oxidase from watermelon juice by high pressure carbon dioxide treatment. *J. Food Sci. Technol.* 50, 317–324. doi:10.1007/s13197-011-0356-6
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Brock, T.D., 2007. Brock biologie des micro-organismes. Pearson Education France, Paris.
- Marin, M., René, F., 2000. Lyophilisation. Tech. Ing.
- Marszałek, K., Skąpska, S., Woźniak, Ł., Sokołowska, B., 2015. Application of supercritical carbon dioxide for the preservation of strawberry juice: Microbial and physicochemical quality, enzymatic activity and the degradation kinetics of anthocyanins during storage. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 32, 101–109. doi:10.1016/j.ifset.2015.10.005
- McErlain, L., Marson, H., Ainsworth, P., Burnett, S., 2001. Ascorbic acid loss in vegetables : adequacy of a hospital cook-chill system. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 52, 205–211.
- McManamey, W.J., 1980. Circulation Model for Batch Mixing in Agitated, Baffled Vessels. *Trans. Inst. Chem. Eng.* 58, 271–276.
- Md Sikin, A., S.H. Rizvi, S., 2011. Recent Patents on the Sterilization of Food and Biomaterials by Super-critical Fluids. *Recent Pat. Food Nutr. Agric.* 3, 212–225. doi:10.2174/2212798411103030212
- Mead, P., 1999. Food-Related Illness and Death in the United States. *Emerg. Infect. Dis.* 5, 607–625. doi:10.3201/eid0505.990502
- Melo Silva, J., Rigo, A.A., Dalmolin, I.A., Debien, I., Cansian, R.L., Oliveira, J.V., Mazutti, M.A., 2013. Effect of pressure, depressurization rate and pressure cycling on the inactivation of *Escherichia coli* by supercritical carbon dioxide. *Food Control* 29, 76–81. doi:10.1016/j.foodcont.2012.05.068
- Metivier, R., 2015. Ecologie microbienne de produits végétaux : adaptation de traitements assainissants pour la valorisation de ces produits (Chimie analytique et environnementale). Université de Bordeaux, France.
- Meucci, E., Martorana, G., Ursitti, A., Pischiutta, M., Miggiano, G., Castelli, A., 1985. Ascorbic acid stability in aqueous solutions. *Acta Vitaminol. Enzymol.* 147–153.

- Michael, M., Jian, Z., 2010. Sterilization using high-pressure carbon dioxide. US 20100080790 A1.
- Monod, J., 1941. Recherches sur la croissance des cultures bactériennes (Sciences Naturelles). Université de Paris, Paris.
- Morris, C., Brody, A.L., Wicker, L., 2007. Non-thermal food processing/preservation technologies: a review with packaging implications. Packag. Technol. Sci. 20, 275–286. doi:10.1002/pts.789
- Mphahlele, R.R., Fawole, O.A., Mokwena, L.M., Opara, U.L., 2016. Effect of extraction method on chemical, volatile composition and antioxidant properties of pomegranate juice. South Afr. J. Bot. 103, 135–144. doi:10.1016/j.sajb.2015.09.015
- Mun, S., Kim, J., Ahn, S.-J., Lee, Y.-W., Yoon, J., 2012. Bactericidal effect of supercritical N₂O on *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. Int. J. Food Microbiol. 153, 15–20. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2011.10.008
- Nakamura, K., Enomoto, A., Fukushima, H., Nagai, K., Hakoda, M., 1994. Disruption of Microbial Cells by the Flash Discharge of High-pressure Carbon Dioxide. Biosci. Biotechnol. Biochem. 58, 1297–1301. doi:10.1271/bbb.58.1297
- Na, L., 2013. Supercritical Microfluidics for understanding CO₂ / water systems under pressure and temperature : Application to the sustainable management of the anthropogenic CO₂. Université de Bordeaux.
- Nere, N.K., Patwardhan, A.W., Joshi, J.B., 2003. Liquid-Phase Mixing in Stirred Vessels: Turbulent Flow Regime. Ind. Eng. Chem. Res. 42, 2661–2698. doi:10.1021/ie0206397
- Neurohr, C., 2015. Élaboration de cocristaux pharmaceutiques par procédés assistés au CO₂ (Génie des procédés). Université de Bordeaux.
- Non-thermal pasteurization of tomato puree by supercritical CO₂ and N₂O, 2009. . Presented at the 9th International Symposium Supercritical Fluids, F. Cansell, J. Mercadier, J. Fages, p. 183.
- Oliveira, T.L.C. de, Ramos, A.L.S., Ramos, E.M., Piccoli, R.H., Cristianini, M., 2015. Natural antimicrobials as additional hurdles to preservation of foods by high pressure processing. Trends Food Sci. Technol. 45, 60–85. doi:10.1016/j.tifs.2015.05.007
- Ortuño, C., Martínez-Pastor, M.T., Mulet, A., Bedito, J., 2012. Supercritical carbon dioxide inactivation of *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* in different growth stages. J. Supercrit. Fluids 63, 8–15. doi:10.1016/j.supflu.2011.12.022
- Osajima, Yutaka, Shimoda, M., Miyake, M., 2004. Continuous processing method and continuous processing apparatus for liquid-form substance, and liquid-form substance processed thereby. US 6821481 B1.
- Oulé, K.M., Dickman, M., Arul, J., 2013. Properties of Orange Juice with Supercritical Carbon Dioxide Treatment. Int. J. Food Prop. 16, 1693–1710. doi:10.1080/10942912.2011.604893
- Oulé, M.K., Tano, K., Bernier, A.-M., Arul, J., 2006. *Escherichia coli* inactivation mechanism by pressurized CO₂. Can. J. Microbiol. 52, 1208–1217. doi:10.1139/w06-078
- Park, H.S., Lee, Y.H., Kim, W., Choi, H.J., Kim, K.H., 2012. Disinfection of wheat grains contaminated with *Penicillium oxalicum* spores by a supercritical carbon dioxide-water cosolvent system. Int. J. Food Microbiol. 156, 239–244. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2012.03.032
- Parton, T., Elvassore, N., Bertuccio, A., Bertoloni, G., 2007. High pressure CO₂ inactivation of food: A multi-batch reactor system for inactivation kinetic determination. J. Supercrit. Fluids 40, 490–496. doi:10.1016/j.supflu.2006.07.022
- Peleg, M., 2003. Microbial Survival Curves: Interpretation, Mathematical Modeling, and Utilization. Comments Theor. Biol. 8, 357–387. doi:10.1080/08948550302436

- Peña-Estévez, M.E., Artés-Hernández, F., Artés, F., Aguayo, E., Martínez-Hernández, G.B., Galindo, A., Gómez, P.A., 2016. Quality changes of pomegranate arils throughout shelf life affected by deficit irrigation and pre-processing storage. *Food Chem.* 209, 302–311. doi:10.1016/j.foodchem.2016.04.054
- Peng, C., Crawshaw, J.P., Maitland, G.C., Martin Trusler, J.P., Vega-Maza, D., 2013. The pH of CO₂-saturated water at temperatures between 308K and 423K at pressures up to 15MPa. *J. Supercrit. Fluids* 82, 129–137. doi:10.1016/j.supflu.2013.07.001
- Perino, S., Chemat, F., 2015. Chauffage micro-ondes comme éco-procédé en industrie agroalimentaire - Pasteurisation et stérilisation en continu par micro-ondes. *Tech. Ing.*
- Perrut, M., 2012. Sterilization and virus inactivation by supercritical fluids (a review). *J. Supercrit. Fluids* 66, 359–371. doi:10.1016/j.supflu.2011.07.007
- Perry, R.H., Green, D.W., 1998. *Perry's chemical engineers' handbook*. McGraw-Hill, London.
- Pouchieu, C., Andreeva, V.A., Péneau, S., Kesse-Guyot, E., Lassale, C., Hercberg, S., Touvier, M., 2013. Sociodemographic, lifestyle and dietary correlates of dietary supplement use in a large sample of French adults: results from the NutriNet-Santé cohort study. *Br. J. Nutr.* 110, 1480–1491. doi:10.1017/S0007114513000615
- Pozo-Insfran, D. del, Balaban, M.O., Talcott, S.T., 2007. Inactivation of polyphenol oxidase in muscadine grape juice by dense phase-CO₂ processing. *Food Res. Int.* 40, 894–899. doi:10.1016/j.foodres.2007.03.002
- Proctor, A., Royal Society of Chemistry (Great Britain) (Eds.), 2011. *Alternatives to conventional food processing, RSC green chemistry*. RSC, Cambridge.
- Qiu, Q.-Q., Leamy, P., Brittingham, J., Pomerleau, J., Kabaria, N., Connor, J., 2009. Inactivation of bacterial spores and viruses in biological material using supercritical carbon dioxide with sterilant. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* 91B, 572–578. doi:10.1002/jbm.b.31431
- Que sont les compléments alimentaires ? [WWW Document], 2016. . Anses - Agence Natl. Sécurité Sanit. L'alimentation L'environnement Trav. URL <https://www.anses.fr/fr/content/que-sont-les-compléments-alimentaires> (accessed 10.24.16).
- Ramesh, M.N., 2003. STERILIZATION OF FOODS, in: *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*. Elsevier, pp. 5593–5603.
- Ramírez-Rodrigues, M.M., Plaza, M.L., Azeredo, A., Balaban, M.O., Marshall, M.R., 2012. Phytochemical, sensory attributes and aroma stability of dense phase carbon dioxide processed Hibiscus sabdariffa beverage during storage. *Food Chem.* 134, 1425–1431. doi:10.1016/j.foodchem.2012.03.042
- Rao, L., Xu, Z., Wang, Y., Zhao, F., Hu, X., Liao, X., 2015. Inactivation of Bacillus subtilis spores by high pressure CO₂ with high temperature. *Int. J. Food Microbiol.* 205, 73–80. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2015.04.012
- Rawson, A., Patras, A., Tiwari, B.K., Noci, F., Koutchma, T., Brunton, N., 2011. Effect of thermal and non thermal processing technologies on the bioactive content of exotic fruits and their products: Review of recent advances. *Food Res. Int.* 44, 1875–1887. doi:10.1016/j.foodres.2011.02.053
- Ross, C.F., Hoye Jr, C., Fernandez-Plotka, V.C., 2011. Influence of Heating on the Polyphenolic Content and Antioxidant Activity of Grape Seed Flour. *J. Food Sci.* 76, C884–C890. doi:10.1111/j.1750-3841.2011.02280.x
- Rothwell, J.A., Medina-Remón, A., Pérez-Jiménez, J., Neveu, V., Knaze, V., Slimani, N., Scalbert, A., 2015. Effects of food processing on polyphenol contents: A systematic

- analysis using Phenol-Explorer data. *Mol. Nutr. Food Res.* 59, 160–170. doi:10.1002/mnfr.201400494
- Roustan, M., 1991. Agitation. Mélange. Caractéristiques des mobiles d'agitation. Tech. Ing.
- Roustan, M., Pharamond, J.-C., Line, A., 1999. Agitation. Mélange. Concepts théoriques de base. Tech. Ing.
- Santhirasegaram, V., Razali, Z., George, D.S., Somasundram, C., 2015. Comparison of UV-C treatment and thermal pasteurization on quality of Chokanan mango (*Mangifera indica* L.) juice. *Food Bioprod. Process.* 94, 313–321. doi:10.1016/j.fbp.2014.03.011
- Sato, Y., 2005. Apparatus for liquid food sterilization or enzyme deactivation with supercritical carbon dioxide, and method of liquid food sterilization or enzyme deactivation, and liquid food obtained by the use of the apparatus and the method.
- Schimmerling, P., Sisson, J.-C., Zaidi, A., 1998. *Pratique des plans d'expériences*, Lavoisier Tec & Doc. ed. Paris.
- Serpen, A., Gökmen, V., 2007. Reversible degradation kinetics of ascorbic acid under reducing and oxidizing conditions. *Food Chem.* 104, 721–725. doi:10.1016/j.foodchem.2006.11.073
- Setlow, B., Cowan, A.E., Setlow, P., 2003. Germination of spores of *Bacillus subtilis* with dodecylamine. *J. Appl. Microbiol.* 95, 637–648. doi:10.1046/j.1365-2672.2003.02015.x
- Shieh, E., Paszczynski, A., Wai, C.M., Lang, Q., Crawford, R.L., 2009. Sterilization of *Bacillus pumilus* spores using supercritical fluid carbon dioxide containing various modifier solutions. *J. Microbiol. Methods* 76, 247–252. doi:10.1016/j.mimet.2008.11.005
- Shimoda, M., Cocunubo-Castellanos, J., Kago, H., Miyake, M., Osajima, Y., Hayakawa, I., 2001. The influence of dissolved CO₂ concentration on the death kinetics of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Appl. Microbiol.* 91, 306–311. doi:10.1046/j.1365-2672.2001.01386.x
- Shimoda, M., Yamamoto, Y., Cocunubo-Castellanos, J., Tonoike, H., Kawano, T., Ishikawa, H., Osajima, Y., 2006. Antimicrobial Effects of Pressured Carbon Dioxide in a Continuous Flow System. *J. Food Sci.* 63, 709–712. doi:10.1111/j.1365-2621.1998.tb15819.x
- Sims, M., Estigarribia, E., 2002. Continuous sterilization of aqueous pumpable food using high pressure carbon dioxide. Presented at the 4th International Symposium High Pressure Technology and Chemical Engineering, A. Bertucco, pp. 921–926.
- Sirisee, U., Hsieh, F., Huff, H.E., 1998. Microbial safety of supercritical carbon dioxide processes. *J. Food Process. Preserv.* 22, 387–403. doi:10.1111/j.1745-4549.1998.tb00358.x
- Skąpska, S., Marszałek, K., Woźniak, Ł., Zawada, K., Wawer, I., 2016. Aronia dietary drinks fortified with selected herbal extracts preserved by thermal pasteurization and high pressure carbon dioxide. *LWT - Food Sci. Technol.* doi:10.1016/j.lwt.2016.11.001
- Soares, D., Lerin, L.A., Cansian, R.L., Oliveira, J.V., Mazutti, M.A., 2013. Inactivation of *Listeria monocytogenes* using supercritical carbon dioxide in a high-pressure variable-volume reactor. *Food Control* 31, 514–518. doi:10.1016/j.foodcont.2012.11.045
- Spilimbergo, S., Bertucco, A., Basso, G., Bertoloni, G., 2005. Determination of extracellular and intracellular pH of *Bacillus subtilis* suspension under CO₂ treatment. *Biotechnol. Bioeng.* 92, 447–451. doi:10.1002/bit.20606
- Spilimbergo, S., Bertucco, A., Lauro, F.M., Bertoloni, G., 2003. Inactivation of *Bacillus subtilis* spores by supercritical CO₂ treatment. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 4, 161–165. doi:10.1016/S1466-8564(02)00089-9
- Spilimbergo, S., Elvassore, N., Bertucco, A., 2003. Inactivation of microorganisms by supercritical CO₂ in a semi-continuous process. *Ital. J. Food Sci.* 15, 115.

- Spilimbergo, S., Elvassore, N., Bertucco, A., 2002. Microbial inactivation by high-pressure. *J. Supercrit. Fluids* 22, 55–63. doi:10.1016/S0896-8446(01)00106-1
- Spilimbergo, S., Mantoan, D., 2006. Kinetic Analysis of Microorganisms Inactivation in Apple Juice by High Pressure Carbon Dioxide. *Int. J. Food Eng.* 2. doi:10.2202/1556-3758.1065
- Spilimbergo, S., Mantoan, D., 2005. Stochastic Modeling of *S. cerevisiae* Inactivation by Supercritical CO₂. *Biotechnol. Prog.* 21, 1461–1465. doi:10.1021/bp049554m
- Spilimbergo, S., Mantoan, D., Cavazza, A., 2007. Yeast Inactivation in Fresh Apple Juice by High Pressure Nitrous Oxide. *Int. J. Food Eng.* 3. doi:10.2202/1556-3758.1134
- Spilimbergo, S., Mantoan, D., Dalsler, A., 2007. Supercritical gases pasteurization of apple juice. *J. Supercrit. Fluids* 40, 485–489. doi:10.1016/j.supflu.2006.07.013
- Spilimbergo, S., Mantoan, D., Quaranta, A., Mea, G.D., 2009. Real-time monitoring of cell membrane modification during supercritical CO₂ pasteurization. *J. Supercrit. Fluids* 48, 93–97. doi:10.1016/j.supflu.2008.07.023
- Spilimbergo, S., Quaranta, A., Garcia-Gonzalez, L., Contrini, C., Cinquemani, C., Van Ginneken, L., 2010. Intracellular pH measurement during high-pressure CO₂ pasteurization evaluated by cell fluorescent staining. *J. Supercrit. Fluids* 53, 185–191. doi:10.1016/j.supflu.2010.03.004
- Sridhar, T., Potter, O.E., 1980. Interfacial areas in gas–liquid stirred vessels. *Chem. Eng. Sci.* 35, 683–695. doi:10.1016/0009-2509(80)80019-4
- Tahiri, I., Makhlof, J., Paquin, P., Fliss, I., 2006. Inactivation of food spoilage bacteria and *Escherichia coli* O157:H7 in phosphate buffer and orange juice using dynamic high pressure. *Food Res. Int.* 39, 98–105. doi:10.1016/j.foodres.2005.06.005
- Tajkarimi, M., Ibrahim, S.A., 2011. Antimicrobial activity of ascorbic acid alone or in combination with lactic acid on *Escherichia coli* O157:H7 in laboratory medium and carrot juice. *Food Control* 22, 801–804. doi:10.1016/j.foodcont.2010.11.030
- Tamburini, S., Anesi, A., Ferrentino, G., Spilimbergo, S., Guella, G., Jousson, O., 2014. Supercritical CO₂ Induces Marked Changes in Membrane Phospholipids Composition in *Escherichia coli* K12. *J. Membr. Biol.* 247, 469–477. doi:10.1007/s00232-014-9653-0
- Tamburini, S., Ballarini, A., Ferrentino, G., Moro, A., Foladori, P., Spilimbergo, S., Jousson, O., 2013. Comparison of quantitative PCR and flow cytometry as cellular viability methods to study bacterial membrane permeabilization following supercritical CO₂ treatment. *Microbiology* 159, 1056–1066. doi:10.1099/mic.0.063321-0
- Tang, Y., Bian, X., Du, Z., Wang, C., 2015. Measurement and prediction model of carbon dioxide solubility in aqueous solutions containing bicarbonate anion. *Fluid Phase Equilibria* 386, 56–64. doi:10.1016/j.fluid.2014.11.025
- Taniguchi, M., Suzuki, H., Sato, M., Kobayashi, T., 1987. Sterilization of plasma powder by treatment with supercritical carbon dioxide. *Agric. Biol. Chem.* 51, 3425–3426. doi:10.1271/bbb1961.51.3425
- Teh, S.-Y., Lin, R., Hung, L.-H., Lee, A.P., 2008. Droplet microfluidics. *Lab. Chip* 8, 198. doi:10.1039/b715524g
- U.S. Food & Drug Administration, 2001. Guidance for Industry: Juice HACCP Hazards and Controls Guidance First Edition; Final Guidance [WWW Document]. US Food Drug Adm. URL <http://www.fda.gov/Food/GuidanceRegulation/GuidanceDocumentsRegulatoryInformation/Juice/ucm072557.htm> (accessed 1.7.16).

- Van Eldik, R., Palmer, D.A., 1982. Effects of pressure on the kinetics of the dehydration of carbonic acid and the hydrolysis of CO₂ in aqueous solution. *J. Solut. Chem.* 11, 339–346. doi:10.1007/BF00649292
- Van't Riet, K., 1979. Review of Measuring Methods and Results in Nonviscous Gas-Liquid Mass Transfer in Stirred Vessels. *Ind. Eng. Chem. Process Des. Dev.* 18, 357–364. doi:10.1021/i260071a001
- Venturi, A., Dellaglio, F., Dallacasa, V., Pallado, P., Bertucco, A., 1999. Inactivation of some food microorganisms with supercritical carbon dioxide in a semi-continuous flow system. Presented at the 5th Conference Supercritical Fluids and their Applications, A. Bertucco, pp. 335–361.
- Vo, H.T., Imai, T., Teeka, J., Sekine, M., Kanno, A., Van Le, T., Higuchi, T., Phummala, K., Yamamoto, K., 2013. Comparison of disinfection effect of pressurized gases of CO₂, N₂O, and N₂ on *Escherichia coli*. *Water Res.* 47, 4286–4293. doi:10.1016/j.watres.2013.04.053
- Wagner, M., Mellouet, A.-G., Zuber, F., 2016. Traitement thermique en continu de produits pompables. *Tech. Ing.*
- Watanabe, T., Furukawa, S., Hirata, J., Koyama, T., Ogihara, H., Yamasaki, M., 2003. Inactivation of *Geobacillus stearothermophilus* spores by high-pressure carbon dioxide treatment. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 7124–7129.
- Wedzicha, B.L., 2003. PRESERVATIVES | Classifications and Properties, in: *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*. Elsevier, pp. 4773–4776.
- Wei, C.I., Balaban, M.O., Fernando, S.Y., Peplow, A.J., 1991. Bacterial Effect of High Pressure CO₂ Treatment on Foods Spiked with *Listeria* or *Salmonella*. *J. Food Prot.* 162–235.
- White, A., Burns, D., Christensen, T.W., 2006. Effective terminal sterilization using supercritical carbon dioxide. *J. Biotechnol.* 123, 504–515. doi:10.1016/j.jbiotec.2005.12.033
- Wu, Y., Yao, S.-J., Guan, Y.-X., 2007. Inactivation of Microorganisms in Carbon Dioxide at Elevated Pressure and Ambient Temperature. *Ind. Eng. Chem. Res.* 46, 6345–6352. doi:10.1021/ie0702330
- Xiong, R., Xie, G., Edmondson, A.E., Sheard, M.A., 1999. A mathematical model for bacterial inactivation. *Int. J. Food Microbiol.* 46, 45–55. doi:10.1016/S0168-1605(98)00172-X
- Yuk, H.-G., Geveke, D.J., Zhang, H.Q., 2010. Efficacy of supercritical carbon dioxide for nonthermal inactivation of *Escherichia coli* K12 in apple cider. *Int. J. Food Microbiol.* 138, 91–99. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2009.11.017
- Zhang, J., Davis, T.A., Matthews, M.A., Drews, M.J., LaBerge, M., An, Y.H., 2006. Sterilization using high-pressure carbon dioxide. *J. Supercrit. Fluids* 38, 354–372. doi:10.1016/j.supflu.2005.05.005
- Zuber, F., Biton, M., Cazier, A., 2008. Bases scientifiques pour la maîtrise des produits appertisés. *Tech. Ing.*
- 刘思杨, 周洪杰, 张德权, 李庆鹏, 李淑荣, 2008. Supercritical CO₂ sterilizing method of fluid food. CN 101327034 A.
- 刘璇, 许洪高, 高彦祥, 2011. Continuous dynamic high-pressure carbon dioxide sterilising and enzyme inactivating method and device thereof. CN101536807 B.

Annexe 1 : dosage acide-base de *Jambes Légères*

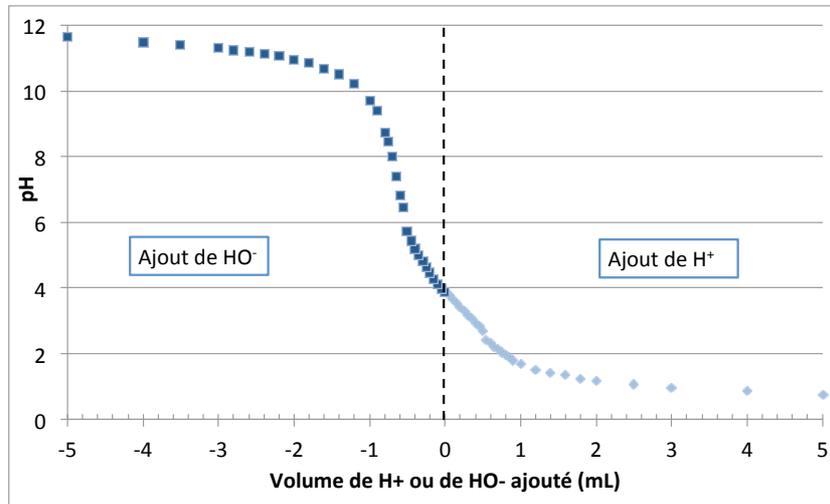


Figure 74 : Dosage acide-base de *Jambes Légères* seul avec un pH initial de 3,87, l'équivalence a été déterminée pour un volume de 0,5 mL de soude. Le pKa de ce milieu est de 6,2.

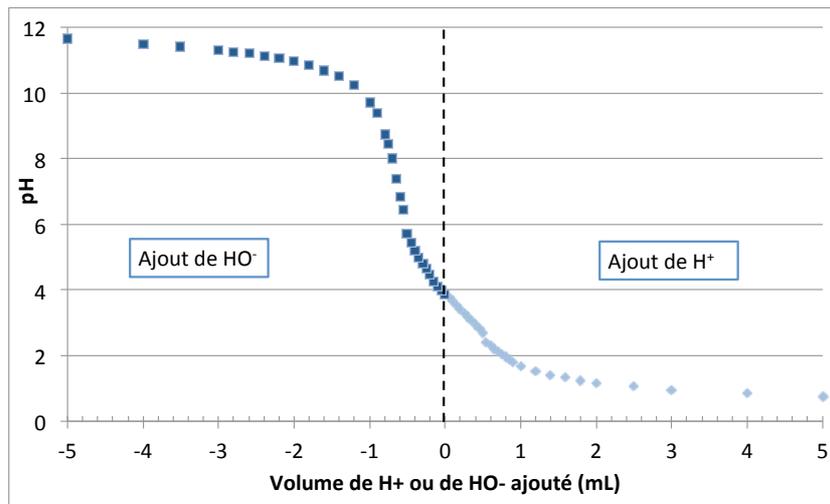


Figure 75 : Dosage acide-base de *Jambes Légères* avec les principes actifs et les microorganismes avec un pH initial de 4,44, l'équivalence a été déterminée pour un volume de 0,4 mL de soude. Le pKa de ce milieu est de 6,8.

Le pH a été mesuré à l'issue de l'ajout de chaque composé avec du papier pH :

Ajout de :	Volume	pH			
-	mL	Eau osmosée	Eau robinet	<i>Jambes Légères</i>	TSB
Milieu	10	5	7-8	4	7
Vitamine C à 5,25 g/L	4	3	4-5	4	5
Acide gallique à 0,1 g/L	4	3	4	4	6
Microorganismes	3	5	6	4	6

Annexe 2 : Détail de la régression linéaire et de l'ANOVA sur le pH des eaux

```

> plexp$T<-cut(plexp$T,c(10,29,34,40,54), include.lowest=TRUE, labels=c("25", "30", "38", "50"))
> table(plexp$T)

25 30 38 50
 6  4  9  6
> plexp$P<-cut(plexp$P,c(20,52,72,100,150), include.lowest=TRUE, labels=c("50", "72", "100", "150"))
> table(plexp$P)

 50  72 100 150
  6   4   9   6
> plexp$pHi<-cut(plexp$pHi,c(0,5.3,6,8.3), include.lowest=TRUE, labels=c("5.3", "5.7", "8.1"))
> table(plexp$P)

 50  72 100 150
  6   4   9   6
>
> plexp$P<-as.factor(plexp$P)
> plexp$T<-as.factor(plexp$T)
> plexp$pHi<-as.factor(plexp$pHi)
>
>
> windows(8,4)
> par(mfrow=c(1,3), mar=c(9,2,1,1), oma=c(0,3,0,0), las=2, cex.axis=1.5)
> plotMeans(plexp$rep, plexp$P, error.bars="none", main="",ylab="", xlab=""
, ylim=c(1.5, 3))
> title(xlab = "Pression (Bar)", mgp = c(6.5, 1, 0), cex.lab=1.5)
> mtext(text="Delta pH",side=2,line=1,las=0, adj=0.6,outer=TRUE, cex=1.2)
> plotMeans(plexp$rep, plexp$T, error.bars="none", main="",ylab="", xlab=""
, ylim=c(1.5, 3))
> title(xlab = "Température (°C)", mgp = c(6.5, 1, 0), cex.lab=1.5)
> mtext(text="Delta pH",side=2,line=1,las=0, adj=0.6,outer=TRUE, cex=1.2)
> plotMeans(plexp$rep, plexp$pHi, error.bars="none", main="",ylab="", xlab=""
, ylim=c(1.5, 3))
> title(xlab = "pH initial", mgp = c(6.5, 1, 0), cex.lab=1.5)
> mtext(text="Delta pH",side=2,line=1,las=0, adj=0.6,outer=TRUE, cex=1.2)
>
> library(rsm)
> plexp<-read.csv2("ph.csv")
> plexp$T<-as.numeric(plexp$T)
> plexp$P<-as.numeric(plexp$P)
> plexp$pHi<-as.numeric(plexp$pHi)
>
> mod<-lm(rep~P*T*pHi, data=plexp)
> summary.aov(mod)

```

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
P	1	0.121	0.121	1.921	0.184
T	1	0.030	0.030	0.483	0.497
pHi	1	10.490	10.490	167.017	3.21e-10 ***
P:T	1	0.016	0.016	0.247	0.625
P:pHi	1	0.007	0.007	0.114	0.739
T:pHi	1	0.118	0.118	1.886	0.188
P:T:pHi	1	0.000	0.000	0.005	0.946
Residuals	17	1.068	0.063		

```
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
> summary(mod)
```

```
Call:
lm.default(formula = rep ~ P * T * phi, data = plexp)
```

```
Residuals:
    Min       1Q   Median       3Q      Max
-0.44069 -0.17905 -0.02948  0.19690  0.36018
```

```
Coefficients:
            Estimate Std. Error t value Pr(>|t|)
(Intercept) -2.692e+00  3.133e+00  -0.859   0.4022
P             2.039e-03  3.007e-02   0.068   0.9467
T            3.343e-02  8.415e-02   0.397   0.6961
phi          7.936e-01  4.500e-01   1.764   0.0958
P:T          1.904e-05  7.919e-04   0.024   0.9811
P:phi       -5.331e-04  4.293e-03  -0.124   0.9026
T:phi       -6.989e-03  1.201e-02  -0.582   0.5683
P:T:phi     7.793e-06  1.127e-04   0.069   0.9457
```

```
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

```
Residual standard error: 0.2506 on 17 degrees of freedom
Multiple R-squared:  0.9099, Adjusted R-squared:  0.8728
F-statistic: 24.52 on 7 and 17 DF, p-value: 1.064e-07
```

```
> windows(5,5)
> par(mfrow=c(2,2))
> plot(mod)
> mod2<-lm(rep~T*phi, data=plexp)
> summary.aov(mod2)
```

```
      Df Sum Sq Mean Sq F value    Pr(>F)
T       1  0.022   0.022   0.407    0.530
phi     1 10.573  10.573 197.170 3.82e-12 ***
T:phi   1  0.129   0.129   2.408    0.136
Residuals 21  1.126   0.054
```

```
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
> summary(mod2)
```

```
Call:
lm.default(formula = rep ~ T * phi, data = plexp)
```

```
Residuals:
    Min       1Q   Median       3Q      Max
-0.4591 -0.1252 -0.0252  0.1759  0.3617
```

```
Coefficients:
            Estimate Std. Error t value Pr(>|t|)
(Intercept) -2.576664  1.076026  -2.395   0.026 *
T             0.037388  0.028988   1.290   0.211
phi          0.751054  0.155385   4.834 8.89e-05 ***
T:phi       -0.006463  0.004165  -1.552   0.136
```

```
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

```
Residual standard error: 0.2316 on 21 degrees of freedom
Multiple R-squared:  0.905, Adjusted R-squared:  0.8914
F-statistic: 66.66 on 3 and 21 DF, p-value: 6.697e-11
```

```
> plot(mod2)
> fit<-fitted(mod2)
> par(mfrow=c(1,1))
> plot(plexp$rep~fit)
> abline(0,1)
>
> mod3<-lm(rep~phi, data=plexp)
> summary.aov(mod3)
      Df Sum Sq Mean Sq F value    Pr(>F)
```

```

pHi          1  10.50  10.499  178.8 2.47e-12 ***
Residuals   23   1.35   0.059
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
> summary(mod3)

```

```

Call:
lm.default(formula = rep ~ pHi, data = plexp)

```

```

Residuals:
    Min       1Q   Median       3Q      Max
-0.46930 -0.16930 -0.02074  0.24482  0.34482

```

```

Coefficients:
            Estimate Std. Error t value Pr(>|t|)
(Intercept) -1.21107    0.25935   -4.67 0.000106 ***
pHi          0.51435    0.03846   13.37 2.47e-12 ***
---

```

```

Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

```

```

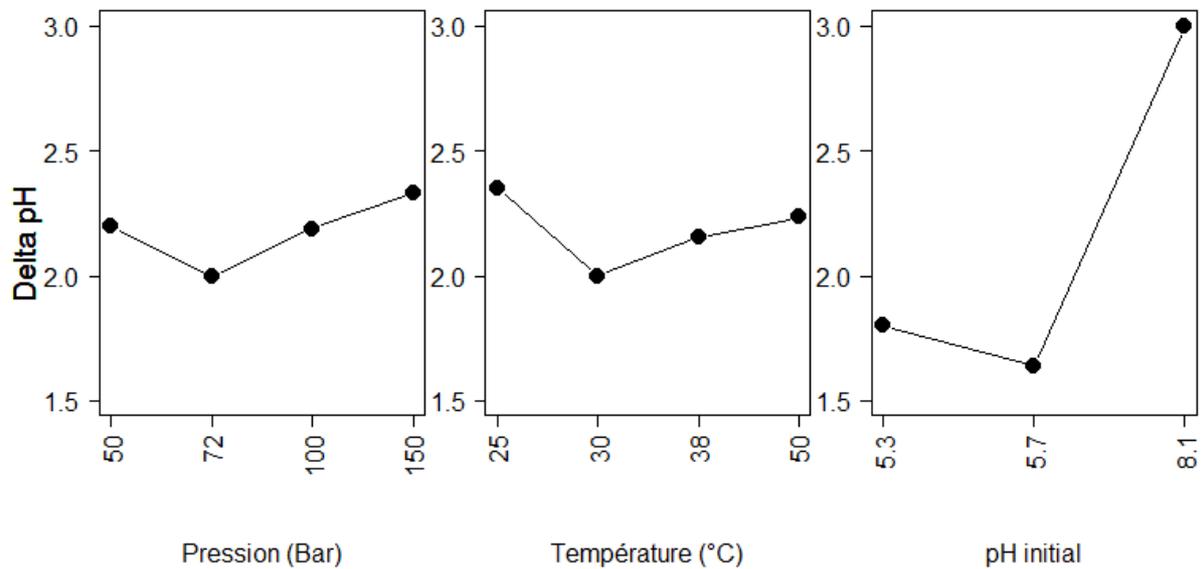
Residual standard error: 0.2423 on 23 degrees of freedom
Multiple R-squared:  0.886,    Adjusted R-squared:  0.8811
F-statistic: 178.8 on 1 and 23 DF,  p-value: 2.473e-12

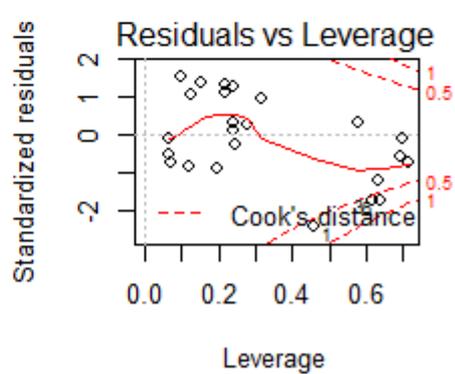
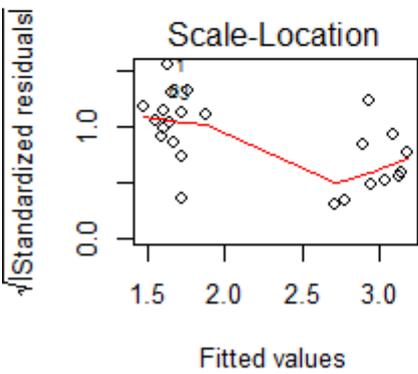
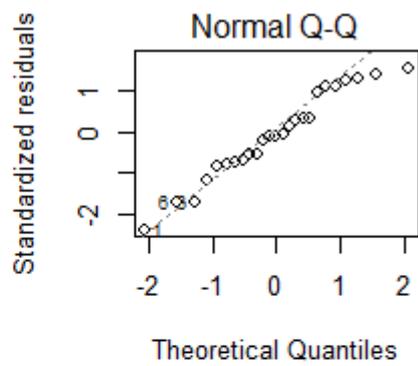
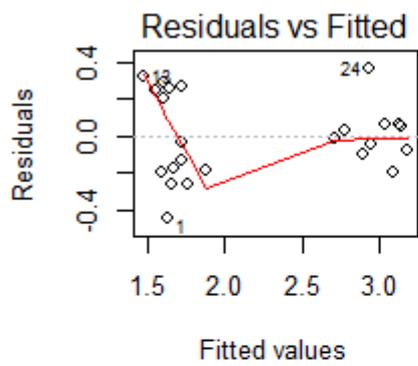
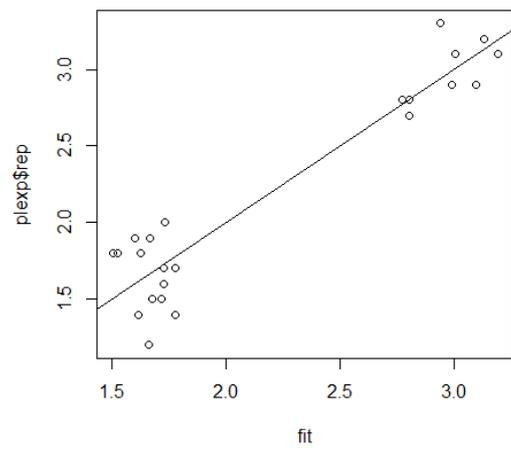
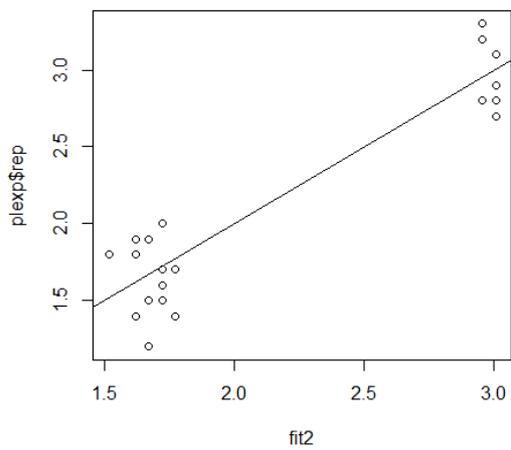
```

```

> windows(5,5)
> par(mfrow=c(2,2))
> plot(mod3)
> fit2<-fitted(mod3)
> par(mfrow=c(1,1))
> plot(plexp$rep~fit2)
> abline(0,1)

```





Annexe 3 : Détail de la régression linéaire et de l'ANOVA du plan composite centré

```
library(rsm)
plexp<-read.csv2("plexp_ge_r.csv")
plexp$T<-as.numeric(plexp$T)
plexp$P<-as.numeric(plexp$P)
plexp$D<-as.numeric(plexp$D)
plexp$V<-as.numeric(plexp$V)

ANOVA sur la reduction décimale totale (somme des 3 microorganismes)
modrdt<-rsm(rdt~FO(P,T,D,V)+SO(P,T,D,V), data=plexp)
summary(modrdt)

##
## Call:
## rsm(formula = rdt ~ FO(P, T, D, V) + SO(P, T, D, V), data = plexp)
##
##           Estimate Std. Error  t value  Pr(>|t|)
## (Intercept) -1.9435043  0.3493961  -5.5625 1.914e-05 ***
## P           -0.9191319  0.2409887  -3.8140 0.001086 **
## T           -2.6517742  0.2563557 -10.3441 1.786e-09 ***
## D           -0.3594414  0.2365256  -1.5197 0.144245
## V           -0.2005723  0.2536073  -0.7909 0.438294
## P:T          0.5830127  0.2873992   2.0286 0.056027 .
## P:D          0.6037590  0.2570227   2.3490 0.029209 *
## P:V         -0.3267346  0.3046244  -1.0726 0.296231
## T:D         -0.5301358  0.3055347  -1.7351 0.098106 .
## T:V         -0.3089717  0.3189691  -0.9687 0.344285
## D:V          0.4570535  0.3000025   1.5235 0.143290
## P^2          0.0083609  0.3398649   0.0246 0.980617
## T^2         -2.0516747  0.3630468  -5.6513 1.569e-05 ***
## D^2         -0.4126158  0.3439219  -1.1997 0.244262
## V^2         -0.3622105  0.3442410  -1.0522 0.305255
## ---
## Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
##
## Multiple R-squared:  0.8976, Adjusted R-squared:  0.826
## F-statistic: 12.53 on 14 and 20 DF, p-value: 5.63e-07
##
## Analysis of Variance Table
##
## Response: rdt
##           Df Sum Sq Mean Sq F value  Pr(>F)
## FO(P, T, D, V)  4 126.803  31.701 29.3636 4.060e-08
## TWI(P, T, D, V)  6  14.038   2.340  2.1672 0.09002
## PQ(P, T, D, V)  4  48.526  12.131 11.2371 6.073e-05
## Residuals      20  21.592   1.080
## Lack of fit     20  21.592   1.080
```

```

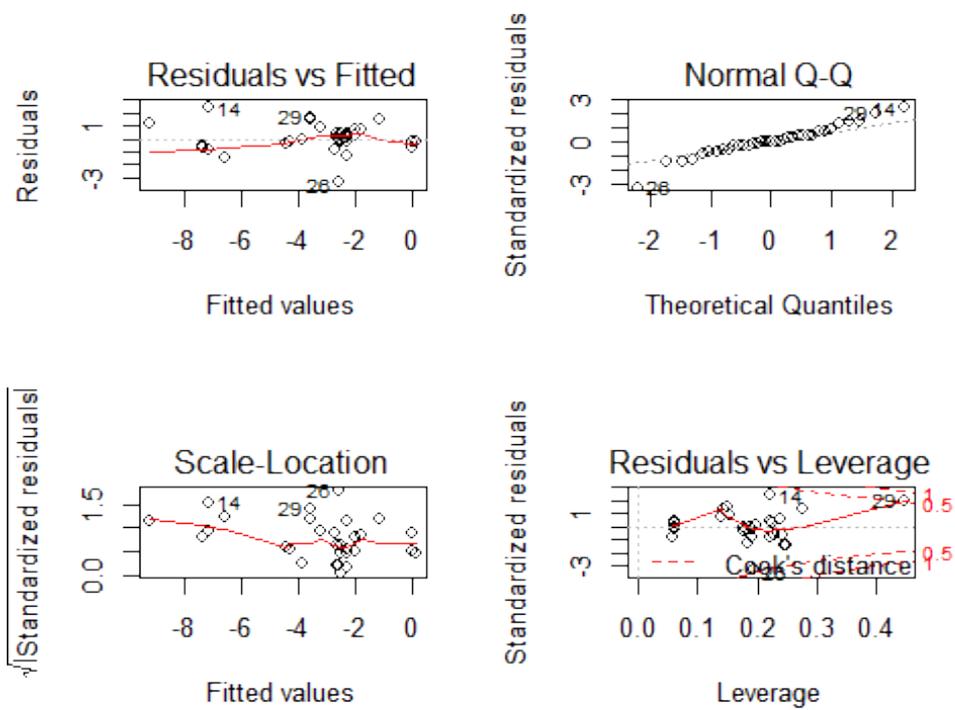
## Pure error      0    0.000
##
## Stationary point of response surface:
##           P           T           D           V
## 2.7803462 -0.4660268  1.7833547 -0.2069654
##
## Eigenanalysis:
## eigen() decomposition
## $values
## [1]  0.1833515 -0.1183593 -0.7325776 -2.1505547
##
## $vectors
##           [,1]           [,2]           [,3]           [,4]
## P  0.9139107 -0.1165268  0.3582293  0.15119690
## T  0.0851317 -0.1630346  0.1403938 -0.97286274
## D  0.3703726  0.6178243 -0.6729148 -0.16823476
## V -0.1426323  0.7603515  0.6317808 -0.04873041

modrdt2<-lm(rdt~P+T+D+P:D+I(T^2), data=plexp)
summary(modrdt2)

##
## Call:
## lm(formula = rdt ~ P + T + D + P:D + I(T^2), data = plexp)
##
## Residuals:
##      Min       1Q   Median       3Q      Max
## -3.2844 -0.4922 -0.0020  0.4217  2.3447
##
## Coefficients:
##              Estimate Std. Error t value Pr(>|t|)
## (Intercept)  -2.2981     0.2765  -8.311 3.67e-09 ***
## P             -0.7882     0.2354  -3.348 0.00227 **
## T            -2.5192     0.2586  -9.742 1.19e-10 ***
## D            -0.4945     0.2366  -2.090 0.04554 *
## I(T^2)       -2.2083     0.3714  -5.945 1.85e-06 ***
## P:D           0.6595     0.2691   2.451 0.02053 *
## ---
## Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
##
## Residual standard error: 1.121 on 29 degrees of freedom
## Multiple R-squared:  0.8272, Adjusted R-squared:  0.7974
## F-statistic: 27.77 on 5 and 29 DF,  p-value: 3.172e-10

windows(5,5)
par(mfrow=c(2,2))
plot(modrdt2)

```

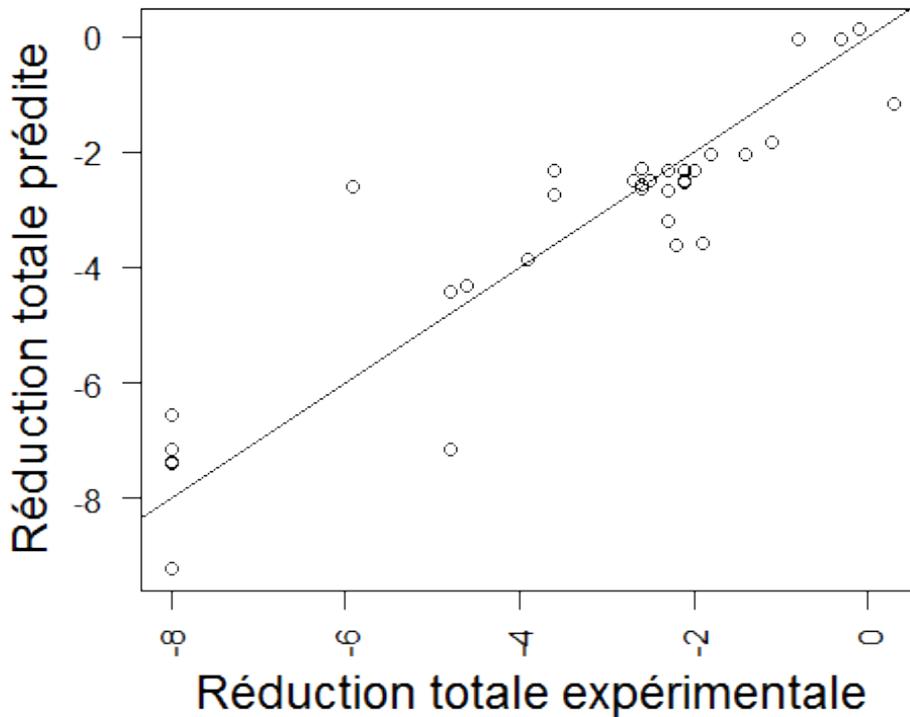


```

fitrdt<-fitted(modrdt2)
windows(5,5)
par(mar=c(0,0,0,0), oma=c(4,4,1,1), cex.lab=1.5, las=2)
x.text=expression(Réduction~totale~expérimentale)
y.text=expression(Réduction~totale~prédite)

plot(plexp$rdt, fitrdt, xlab="", ylab="")
mtext(text=x.text,side=1,line=2.5,las=1, outer=TRUE, cex=1.5)
mtext(text=y.text,side=2,line=2,las=0, outer=TRUE, cex=1.5)
abline(0,1)

```



```
## ANOVA E. coli
modrdco<-rsm(rdco~FO(P,T,D,V)+SO(P,T,D,V), data=plexp)
summary(modrdco)

##
## Call:
## rsm(formula = rdco ~ FO(P, T, D, V) + SO(P, T, D, V), data = plexp)
##
##           Estimate Std. Error  t value  Pr(>|t|)
## (Intercept) -1.8244470   0.3641090  -5.0107 6.706e-05 ***
## P           -0.7916173   0.2511366  -3.1521 0.005014 **
## T           -2.7824343   0.2671507 -10.4152 1.589e-09 ***
## D           -0.2414933   0.2464856  -0.9797 0.338915
## V            0.0067894   0.2642866   0.0257 0.979760
## P:T          0.4517536   0.2995014   1.5084 0.147100
## P:D          0.7266556   0.2678458   2.7130 0.013392 *
## P:V         -0.1986400   0.3174520  -0.6257 0.538566
## T:D         -0.5054508   0.3184006  -1.5875 0.128091
## T:V         -0.4770535   0.3324007  -1.4352 0.166692
## D:V          0.5753453   0.3126355   1.8403 0.080611 .
## P^2          0.0263552   0.3541765   0.0744 0.941421
## T^2         -2.1864426   0.3783345  -5.7791 1.180e-05 ***
## D^2         -0.3948316   0.3584044  -1.1016 0.283701
## V^2         -0.3979657   0.3587369  -1.1094 0.280440
## ---
## Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
##
## Multiple R-squared:  0.8954, Adjusted R-squared:  0.8222
## F-statistic: 12.23 on 14 and 20 DF, p-value: 6.906e-07
##
## Analysis of Variance Table
##
## Response: rdco
```

```

##           Df Sum Sq Mean Sq F value    Pr(>F)
## FO(P, T, D, V)    4 128.907   32.227  27.4871 7.056e-08
## TWI(P, T, D, V)    6  17.459    2.910   2.4819 0.05854
## PQ(P, T, D, V)    4  54.353   13.588  11.5899 4.939e-05
## Residuals        20   23.449    1.172
## Lack of fit       20   23.449    1.172
## Pure error         0    0.000
##
## Stationary point of response surface:
##           P           T           D           V
## 0.2922136 -1.1470182  2.4322309  2.3812427
##
## Eigenanalysis:
## eigen() decomposition
## $values
## [1] 0.2423802 -0.1148427 -0.8081311 -2.2722911
##
## $vectors
##           [,1]      [,2]      [,3]      [,4]
## P 0.84775874 -0.3769326  0.35530554 -0.1139513
## T 0.01507650 -0.1879890  0.07854525  0.9789093
## D 0.52121022  0.4746261 -0.69553511  0.1389275
## V 0.09704498  0.7728596  0.61953170  0.0972151

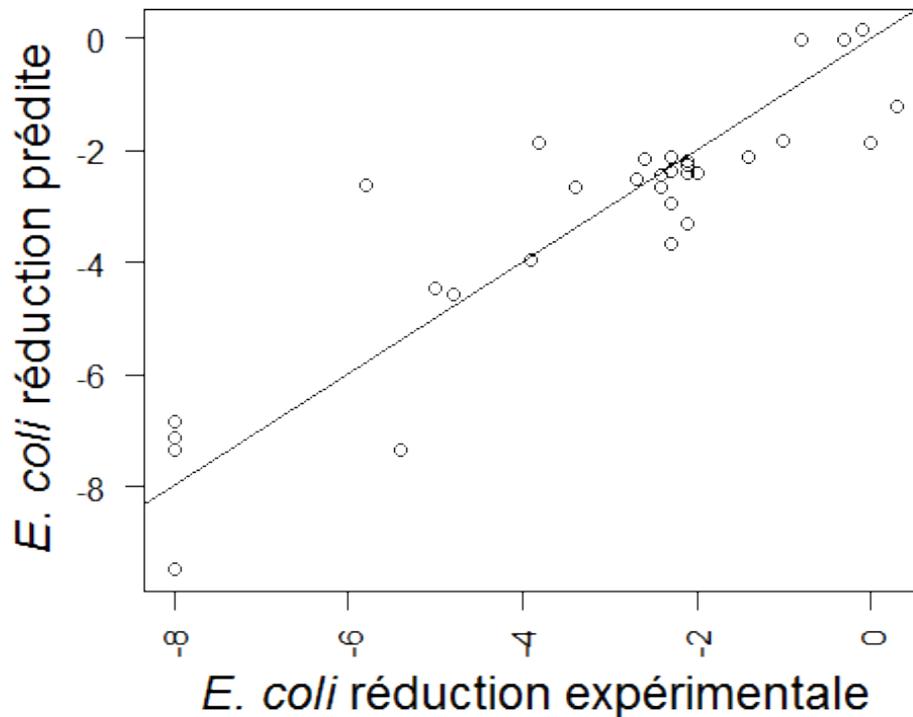
modrldco2<-lm(rldco~T+P+D+P:D+I(T^2), data=plexp)
summary(modrldco2)

##
## Call:
## lm(formula = rldco ~ T + P + D + P:D + I(T^2), data = plexp)
##
## Residuals:
##      Min       1Q   Median       3Q      Max
## -3.1713 -0.5887  0.0711  0.5245  1.9518
##
## Coefficients:
##              Estimate Std. Error t value Pr(>|t|)
## (Intercept)  -2.1680     0.2811  -7.713 1.66e-08 ***
## T             -2.6215     0.2628  -9.974 7.00e-11 ***
## P             -0.6594     0.2393  -2.756 0.01001 *
## D             -0.3998     0.2405  -1.662 0.10726
## I(T^2)        -2.3740     0.3775  -6.288 7.25e-07 ***
## P:D           0.8210     0.2735   3.001 0.00548 **
## ---
## Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
##
## Residual standard error: 1.14 on 29 degrees of freedom
## Multiple R-squared:  0.832, Adjusted R-squared:  0.803
## F-statistic: 28.72 on 5 and 29 DF, p-value: 2.128e-10

fitrldco<-fitted(modrldco2)
windows(5,5)
par(mar=c(0,0,0,0), oma=c(4,4,1,1), cex.lab=1.5, las=2)
x.text=expression(italic("E. coli")~réduction~expérimentale)
y.text=expression(italic("E. coli")~réduction~prédite)

```

```
plot(plexp$rdco, fitrdco, xlab="", ylab="")
mtext(text=x.text,side=1,line=2.5,las=1, outer=TRUE, cex=1.5)
mtext(text=y.text,side=2,line=2,las=0, outer=TRUE, cex=1.5)
abline(0,1)
```



ANOVA sur *S. cerevisiae*

```
modrdce<-rsm(rdce~FO(P,T,D,V)+SO(P,T,D,V), data=plexp)
summary(modrdce)
```

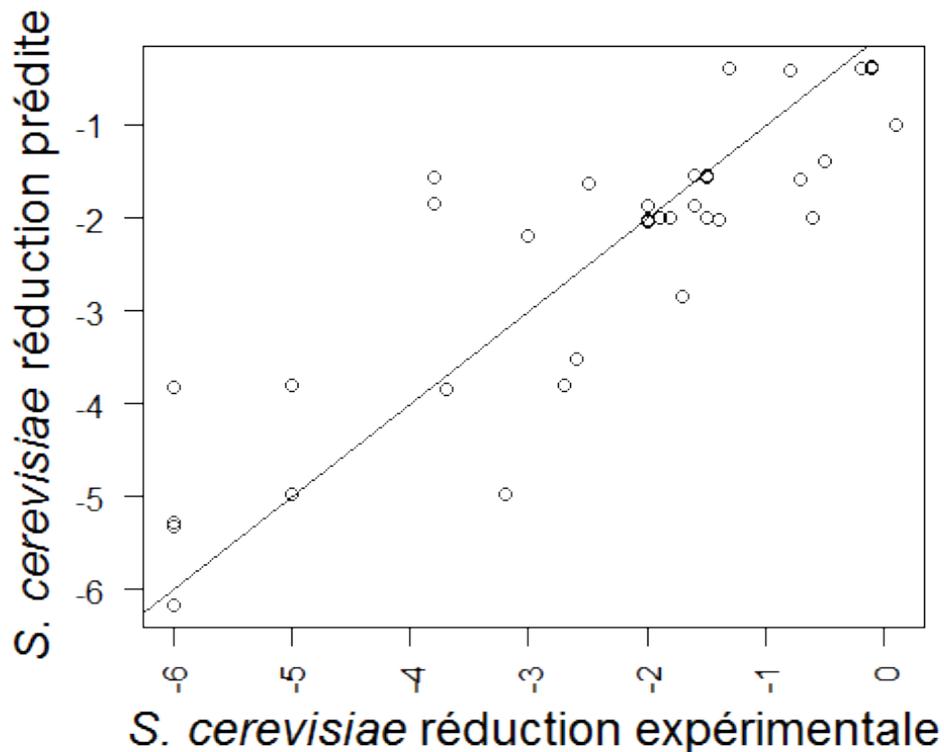
```
##
## Call:
## rsm(formula = rdce ~ FO(P, T, D, V) + SO(P, T, D, V), data = plexp)
##
##           Estimate Std. Error t value Pr(>|t|)
## (Intercept) -1.7677946  0.3184542 -5.5512 1.963e-05 ***
## P           -0.5556578  0.2190621 -2.5365 0.019636 *
## T           -1.8809697  0.2320065 -8.1074 9.480e-08 ***
## D           -0.4112798  0.2077303 -1.9799 0.061645 .
## V           -0.1241473  0.2312992 -0.5367 0.597369
## P:T          0.2716483  0.2617524  1.0378 0.311745
## P:D          0.3206389  0.2268824  1.4132 0.172961
## P:V          0.0254075  0.2774392  0.0916 0.927944
## T:D         -0.5143466  0.2697140 -1.9070 0.070987 .
## T:V         -0.0666970  0.2905126 -0.2296 0.820747
## D:V         -0.0091388  0.2648200 -0.0345 0.972813
## P^2          0.1191054  0.3096552  0.3846 0.704565
## T^2         -1.1187762  0.3306939 -3.3831 0.002954 **
## D^2         -0.0890120  0.2954605 -0.3013 0.766322
## V^2         -0.0841424  0.3135888 -0.2683 0.791200
## ---
## Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
##
## Multiple R-squared:  0.8423, Adjusted R-squared:  0.7319
```

```

## F-statistic: 7.631 on 14 and 20 DF, p-value: 3.019e-05
##
## Analysis of Variance Table
##
## Response: rdce
##           Df Sum Sq Mean Sq F value    Pr(>F)
## FO(P, T, D, V)  4 77.455  19.3638  21.6235 4.979e-07
## TWI(P, T, D, V)  6  6.312   1.0520   1.1747  0.35861
## PQ(P, T, D, V)  4 11.903   2.9758   3.3231  0.03056
## Residuals      20 17.910   0.8955
## Lack of fit     20 17.910   0.8955
## Pure error      0  0.000
##
## Stationary point of response surface:
##           P           T           D           V
## 0.5082222 -1.3504573  2.5203302 -0.2626260
##
## Eigenanalysis:
## $values
## [1] 0.20647008 -0.08330430 -0.09362668 -1.20236430
##
## $vectors
##           [,1]           [,2]           [,3]           [,4]
## P 0.877341353  0.00448158  0.46236565  0.12833577
## T -0.003788897 -0.01329500  0.27421470 -0.96156913
## D 0.478832686 -0.07341325 -0.84106085 -0.24072057
## V 0.031257845  0.99720291 -0.06034023 -0.03111833
modrdce2<-lm(rdce~T+P+I(T^2), data=plexp)
summary(modrdce2)
##
## Call:
## lm(formula = rdce ~ T + P + I(T^2), data = plexp)
##
## Residuals:
##      Min       1Q   Median       3Q      Max
## -2.2353 -0.5301  0.0973  0.5651  1.7767
##
## Coefficients:
##           Estimate Std. Error t value Pr(>|t|)
## (Intercept) -1.7706     0.2454  -7.215 4.10e-08 ***
## T           -1.8581     0.2281  -8.148 3.35e-09 ***
## P            -0.5938     0.2074  -2.864 0.00745 **
## I(T^2)       -1.0808     0.3271  -3.304 0.00241 **
## ---
## Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
##
## Residual standard error: 0.9957 on 31 degrees of freedom
## Multiple R-squared:  0.7294, Adjusted R-squared:  0.7032
## F-statistic: 27.85 on 3 and 31 DF, p-value: 6.245e-09
fitrdce<-fitted(modrdce2)
windows(5,5)
par(mar=c(0,0,0,0), oma=c(4,4,1,1), cex.lab=1.5, las=2)

```

```
x.text=expression(italic("S. cerevisiae")~réduction~expérimentale)
y.text=expression(italic("S. cerevisiae")~réduction~prédite)
plot(plexp$rdce, fitrdce, xlab="", ylab="")
mtext(text=x.text,side=1,line=2.5,las=1, outer=TRUE, cex=1.5)
mtext(text=y.text,side=2,line=2,las=0, outer=TRUE, cex=1.5)
abline(0,1)
```



ANOVA sur *L. innocua*

```
modrdli<-rsm(rdli~FO(P,T,D,V)+SO(P,T,D,V), data=plexp)
summary(modrdli)
```

```
##
## Call:
## rsm(formula = rdli ~ FO(P, T, D, V) + SO(P, T, D, V), data = plexp)
##
##               Estimate Std. Error t value Pr(>|t|)
## (Intercept) -4.0781513  0.5732620 -7.1139 9.151e-07 ***
## P            -0.5610328  0.4310743 -1.3015  0.20866
## T            -2.2031854  0.4157899 -5.2988 4.097e-05 ***
## D             0.8138051  0.3854451  2.1113  0.04822 *
## V             0.3702256  0.4153311  0.8914  0.38387
## P:T           0.5660780  0.4661447  1.2144  0.23948
## P:D          -0.2582114  0.4168757 -0.6194  0.54301
## P:V          -0.4787330  0.4941761 -0.9687  0.34484
## T:D          -0.3806167  0.4969763 -0.7659  0.45317
## T:V          -0.6167975  0.5181019 -1.1905  0.24851
## D:V          -0.0062732  0.4872558 -0.0129  0.98986
## P^2          -1.0965115  0.6861760 -1.5980  0.12654
## T^2           0.1240086  0.6060938  0.2046  0.84006
## D^2           0.3667972  0.5902940  0.6214  0.54173
## V^2          -0.2283306  0.5784326 -0.3947  0.69743
## ---
## Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

```

##
## Multiple R-squared:  0.71, Adjusted R-squared:  0.4963
## F-statistic: 3.323 on 14 and 19 DF,  p-value: 0.008151
##
## Analysis of Variance Table
##
## Response: rdli
##           Df Sum Sq Mean Sq F value    Pr(>F)
## FO(P, T, D, V)  4 108.285  27.0713   9.5324 0.0002107
## TWI(P, T, D, V)  6  13.595   2.2658   0.7978 0.5833423
## PQ(P, T, D, V)  4  10.232   2.5581   0.9008 0.4830607
## Residuals      19  53.959   2.8399
## Lack of fit    19  53.959   2.8399
## Pure error      0   0.000
##
## Stationary point of response surface:
##           P           T           D           V
## 0.68342295  1.73866121  0.01401928 -2.25427785
##
## Eigenanalysis:
## eigen() decomposition
## $values
## [1] 0.5741690 0.2031525 -0.4145026 -1.1968553
##
## $vectors
##           [,1]      [,2]      [,3]      [,4]
## P -0.2019329  0.1283338 -0.08049606  0.96761249
## T -0.6239933  0.5278901  0.55518736 -0.15404983
## D  0.6938709  0.7064551  0.12521562  0.06152531
## V  0.2973190 -0.4536338  0.81829605  0.19028759

modrdli2<-lm(rdli~T+D, data=plexp)
summary(modrdli2)

##
## Call:
## lm(formula = rdli ~ T + D, data = plexp)
##
## Residuals:
##      Min       1Q   Median       3Q      Max
## -4.3839 -1.1149  0.2093  1.2724  3.0738
##
## Coefficients:
##              Estimate Std. Error t value Pr(>|t|)
## (Intercept) -4.6436      0.2895 -16.039 < 2e-16 ***
## T            -2.1389      0.3853  -5.551 4.42e-06 ***
## D             0.7052      0.3541   1.991  0.0553 .
## ---
## Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
##
## Residual standard error: 1.683 on 31 degrees of freedom
## (1 observation deleted due to missingness)
## Multiple R-squared:  0.5279, Adjusted R-squared:  0.4974
## F-statistic: 17.33 on 2 and 31 DF,  p-value: 8.872e-06

```

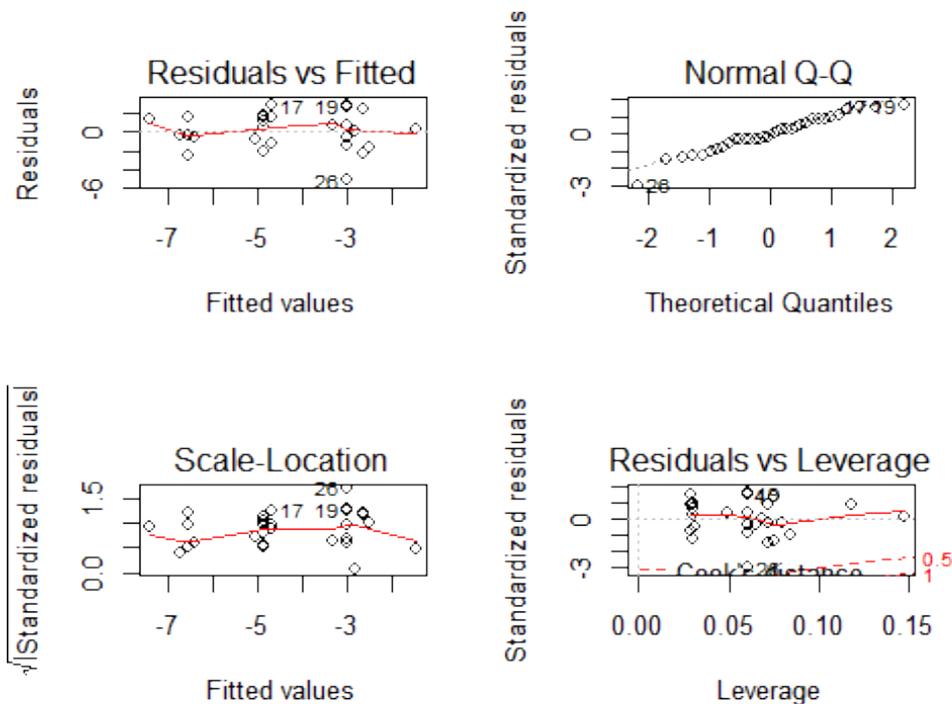
```

modrdli3<-lm(rdli~T, data=plexp)
summary(modrdli3)

##
## Call:
## lm(formula = rdli ~ T, data = plexp)
##
## Residuals:
##      Min       1Q   Median       3Q      Max
## -5.0240 -0.8120 -0.1309  1.3257  2.7837
##
## Coefficients:
##              Estimate Std. Error t value Pr(>|t|)
## (Intercept)  -4.6837     0.3019  -15.51 < 2e-16 ***
## T              -2.1346     0.4028   -5.30 8.3e-06 ***
## ---
## Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
##
## Residual standard error: 1.76 on 32 degrees of freedom
## (1 observation deleted due to missingness)
## Multiple R-squared:  0.4675, Adjusted R-squared:  0.4508
## F-statistic: 28.09 on 1 and 32 DF,  p-value: 8.301e-06

windows(10,10)
par(mfrow=c(2,2))
plot(modrdli3)

```

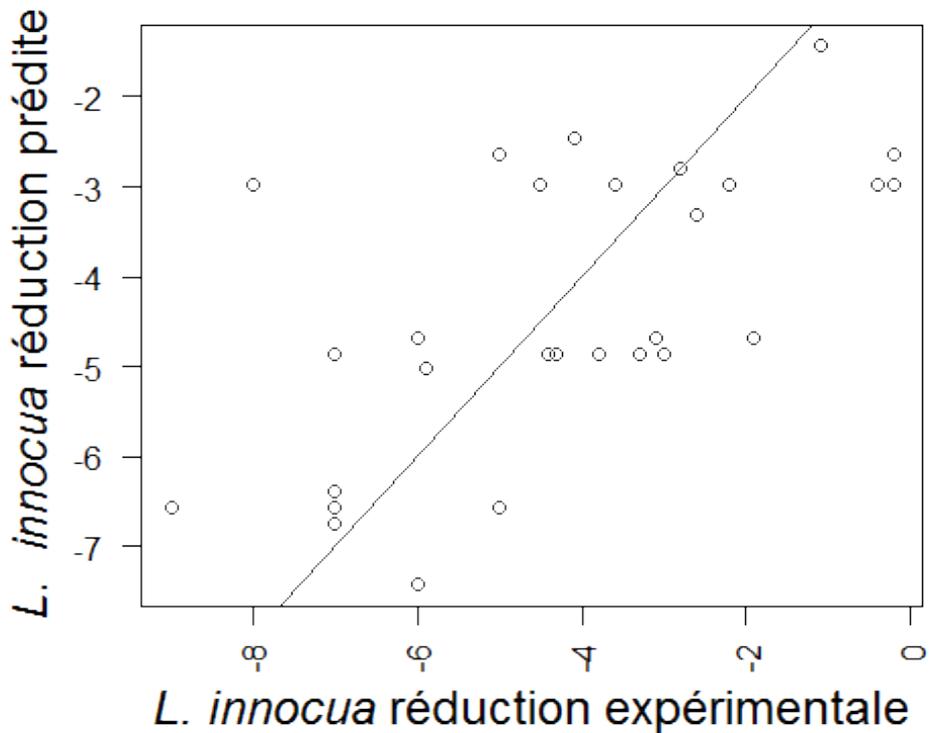


```

fitrdli<-fitted(modrdli3)
rdli<-na.omit(plexp$rdli)
windows(5,5)
par(mar=c(0,0,0,0), oma=c(4,4,1,1), cex.lab=1.5, las=2)
x.text=expression(italic("L. innocua")~réduction~expérimentale)
y.text=expression(italic("L. innocua")~réduction~prédite)

```

```
plot(rdli, fitrdli, xlab="", ylab="")
mtext(text=x.text,side=1,line=2.5,las=1, outer=TRUE, cex=1.5)
mtext(text=y.text,side=2,line=2,las=0, outer=TRUE, cex=1.5)
abline(0,1)
```



ANOVA sur la teneur en vitamine C

```
modvitc<-rsm(vitc~FO(P,T,D,V)+SO(P,T,D,V), data=plexp)
summary(modvitc)
```

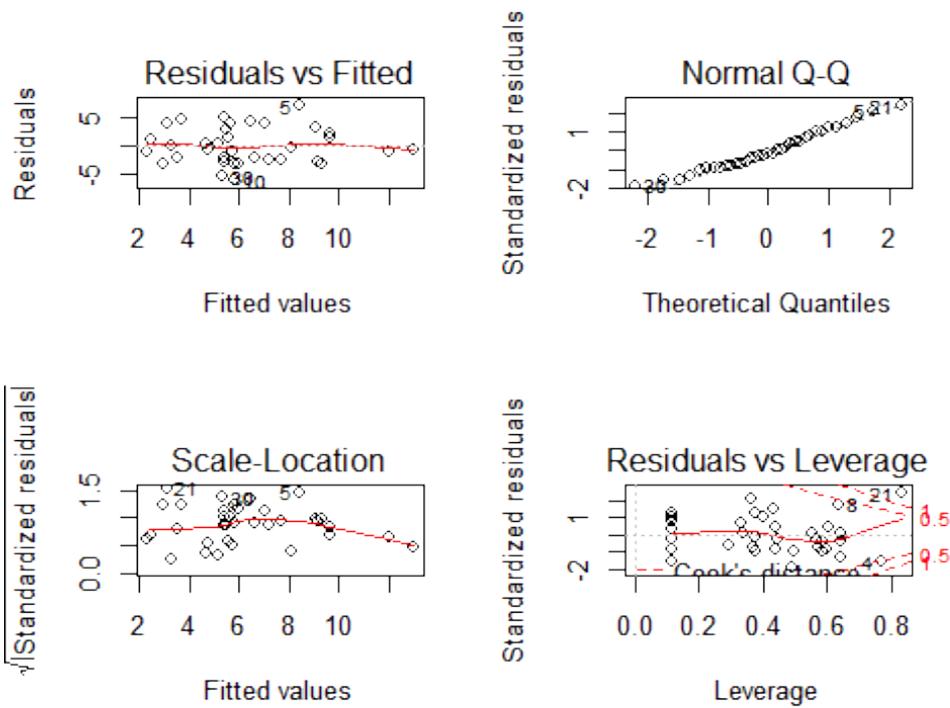
```
##
## Call:
## rsm(formula = vitc ~ FO(P, T, D, V) + SO(P, T, D, V), data = plexp)
##
##           Estimate Std. Error t value Pr(>|t|)
## (Intercept)  5.76385    1.35378   4.2576 0.0003852 ***
## P            -0.22254    0.93374  -0.2383 0.8140458
## T            -2.05639    0.99328  -2.0703 0.0515849 .
## D            -0.53247    0.91645  -0.5810 0.5677239
## V            -0.78765    0.98263  -0.8016 0.4322208
## P:T          -0.82724    1.11356  -0.7429 0.4661938
## P:D           0.55176    0.99587   0.5540 0.5856892
## P:V           0.93134    1.18031   0.7891 0.4393289
## T:D           1.15764    1.18383   0.9779 0.3398185
## T:V           0.68407    1.23589   0.5535 0.5860537
## D:V           0.92075    1.16240   0.7921 0.4375895
## P^2          -0.74277    1.31685  -0.5641 0.5789883
## T^2           1.06899    1.40667   0.7599 0.4561520
## D^2           1.40987    1.33257   1.0580 0.3026643
## V^2          -1.18936    1.33380  -0.8917 0.3831547
## ---
## Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

```

##
## Multiple R-squared:  0.4067, Adjusted R-squared:  -0.008573
## F-statistic: 0.9794 on 14 and 20 DF,  p-value: 0.505
##
## Analysis of Variance Table
##
## Response: vitc
##
##          Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
## FO(P, T, D, V)  4 108.93  27.2330   1.6803 0.1940
## TWI(P, T, D, V)  6  74.74  12.4572   0.7686 0.6034
## PQ(P, T, D, V)  4  38.55   9.6368   0.5946 0.6706
## Residuals      20 324.15  16.2076
## Lack of fit    20 324.15  16.2076
## Pure error      0   0.00
##
## Stationary point of response surface:
##          P          T          D          V
## -0.7123361  0.7176739  0.1468279 -0.3468037
##
## Eigenanalysis:
## eigen() decomposition
## $values
## [1]  1.9490292  0.8062938 -0.6221199 -1.5864753
##
## $vectors
##          [,1]          [,2]          [,3]          [,4]
## P 0.02357051  0.32327544  0.7832913 -0.53046403
## T 0.58130671 -0.77295321  0.1798257 -0.17969021
## D 0.79246570  0.54168570 -0.2769068 -0.04355848
## V 0.18309851  0.06791854  0.5267257  0.82729801

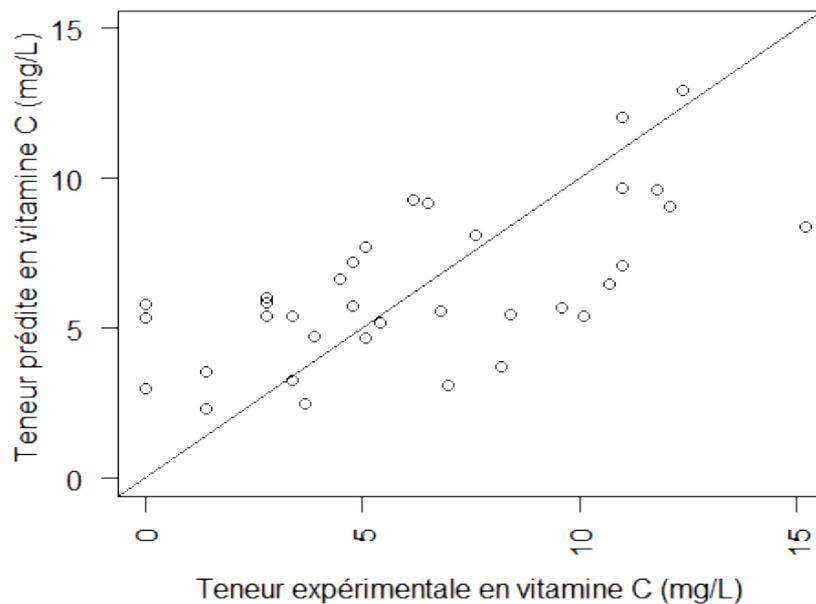
windows(10,10)
par(mfrow=c(2,2))
plot(modvitc)

```



```
fitvitc<-fitted(modvitc)

windows(5,5)
par(mar=c(0,0,0,0), oma=c(4,4,1,1), cex.lab=1.5, las=2)
x.text=expression("Teneur expérimentale en vitamine C (mg/L)")
y.text=expression("Teneur prédite en vitamine C (mg/L)")
plot(plexp$vitc, fitvitc, xlab="", ylab="", xlim=c(0,15), ylim=c(0,15))
mtext(text=x.text,side=1,line=2.5,las=1, outer=TRUE, cex=1)
mtext(text=y.text,side=2,line=2,las=0, outer=TRUE, cex=1)
abline(0,1)
```



ANOVA sur la concentration en polyphenols totaux

```
modppt<-rsm(ppt~FO(P,T,D,V)+SO(P,T,D,V), data=plexp)
```

```
summary(modppt)
```

```
##
## Call:
## rsm(formula = ppt ~ FO(P, T, D, V) + SO(P, T, D, V), data = plexp)
##
##           Estimate Std. Error t value Pr(>|t|)
## (Intercept)  0.59700324  0.03013924 19.8082 1.298e-14 ***
## P            -0.00692320  0.02078791  -0.3330  0.74257
## T             0.02354373  0.02211348   1.0647  0.29971
## D             0.00019967  0.02040292   0.0098  0.99229
## V             0.04753342  0.02187640   2.1728  0.04199 *
## P:T          -0.01736087  0.02479132  -0.7003  0.49182
## P:D          -0.00221327  0.02217102  -0.0998  0.92148
## P:V          -0.00587547  0.02627719  -0.2236  0.82534
## T:D          -0.02905551  0.02635571  -1.1024  0.28336
## T:V          -0.00983795  0.02751457  -0.3576  0.72442
## D:V           0.01056394  0.02587850   0.4082  0.68745
## P^2           0.02260009  0.02931707   0.7709  0.44979
## T^2           0.00725002  0.03131676   0.2315  0.81927
## D^2          -0.01381967  0.02966703  -0.4658  0.64637
## V^2          -0.00903569  0.02969456  -0.3043  0.76405
## ---
## Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
##
## Multiple R-squared:  0.3179, Adjusted R-squared:  -0.1595
## F-statistic: 0.6659 on 14 and 20 DF,  p-value: 0.7798
##
## Analysis of Variance Table
##
## Response: ppt
##           Df  Sum Sq  Mean Sq F value Pr(>F)
## FO(P, T, D, V)  4 0.045965  0.0114911  1.4305 0.2605
## TWI(P, T, D, V)  6 0.022572  0.0037621  0.4683 0.8236
## PQ(P, T, D, V)  4 0.006353  0.0015883  0.1977 0.9366
## Residuals      20 0.160664  0.0080332
## Lack of fit    20 0.160664  0.0080332
## Pure error      0 0.000000
##
## Stationary point of response surface:
##           P           T           D           V
## 0.68099911 0.67004555 0.03811299 2.06641549
##
## Eigenanalysis:
## eigen() decomposition
## $values
## [1]  0.02726371  0.01313220 -0.01126535 -0.02213580
##
## $vectors
##           [,1]           [,2]           [,3]           [,4]
## P  0.85967743  0.4743011  0.164309933 -0.09484414
## T -0.48746981  0.6838677  0.325709532 -0.43429419
## D  0.15160489 -0.4512250  0.001678362 -0.87943686
## V  0.01854357 -0.3221171  0.931081484  0.17024676
```

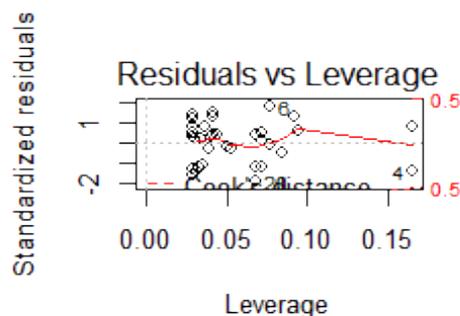
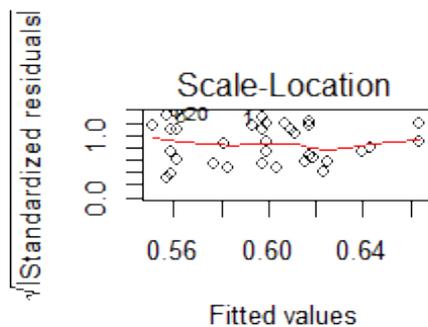
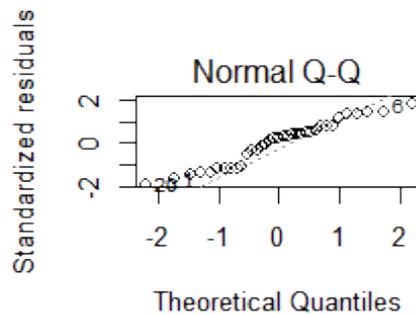
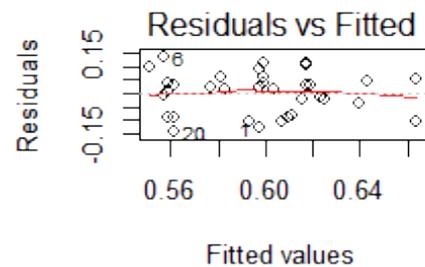
```

modppt2<-lm(ppt~V, data=plexp)
summary(modppt2)

##
## Call:
## lm(formula = ppt ~ V, data = plexp)
##
## Residuals:
##      Min       1Q   Median       3Q      Max
## -0.14122 -0.08528  0.01672  0.05153  0.13279
##
## Coefficients:
##              Estimate Std. Error t value Pr(>|t|)
## (Intercept)  0.60133    0.01340  44.862 <2e-16 ***
## V            0.04011    0.01748   2.295  0.0282 *
## ---
## Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
##
## Residual standard error: 0.07846 on 33 degrees of freedom
## Multiple R-squared:  0.1376, Adjusted R-squared:  0.1115
## F-statistic: 5.267 on 1 and 33 DF,  p-value: 0.02823

windows(10,10)
par(mfrow=c(2,2))
plot(modppt2)

```



```

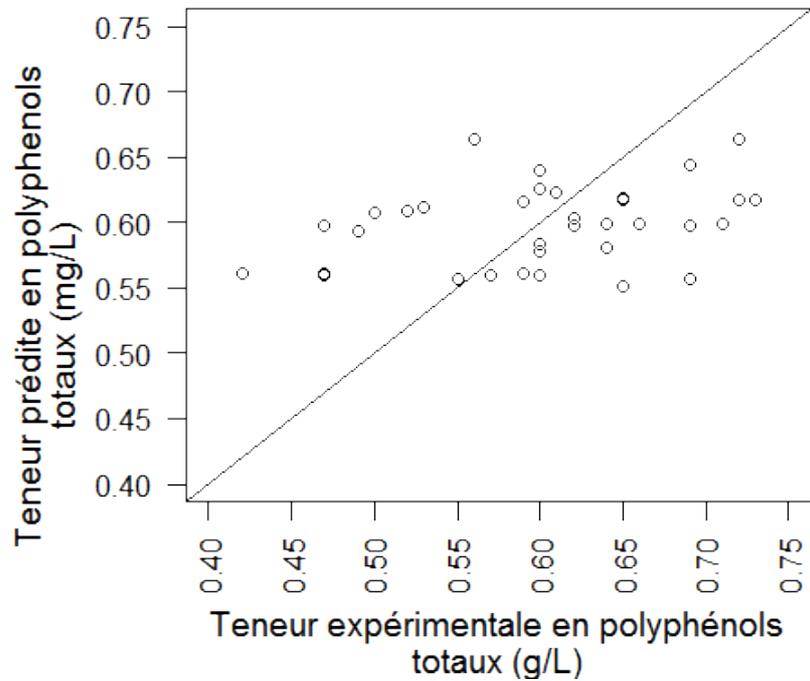
fitppt<-fitted(modppt2)
windows(5,5)
par(mar=c(5,2,1,1), oma=c(0,4,0,0), las=2, cex.axis=1)
plot(plexp$ppt, fitppt, xlab="", ylab="", xlim=c(0.4, 0.75), ylim=c(0.4, 0.75))
title(xlab = "Teneur expérimentale en polyphénols", mgp = c(3, 1, 0), cex.1

```

```

ab=1.2)
title(xlab = "totaux (g/L)", mgp = c(4, 1, 0), cex.lab=1.2)
mtext(text="Teneur prédite en polyphenols ",side=2,line=2,las=0, adj=0.6,
  outer=TRUE, cex=1.2)
mtext(text="totaux (mg/L)",side=2,line=1,las=0, adj=0.5, outer=TRUE, cex=
1.2)
abline(0,1)

```



OPTIMISATION D'UN PROCEDE PAR CO₂ PRESSURISE POUR LA PASTEURISATION ET LA PRESERVATION DE COMPLEMENTS ALIMENTAIRES LIQUIDES

Au sens de la législation, les compléments alimentaires sont des denrées alimentaires et doivent donc subir un traitement de pasteurisation pour détruire les microorganismes potentiellement pathogènes. L'utilisation du CO₂ comprimé peut être une alternative basse température aux traitements thermiques classiques. Dans ce travail, la technologie au CO₂ est optimisée pour traiter des compléments alimentaires fortement chargés par trois microorganismes.

L'impact des conditions expérimentales sur l'inactivation et la préservation des actifs a été mis en évidence via un plan d'expériences de type composite centré. La température et dans une moindre mesure l'interaction pression-durée ont été identifiés comme étant les facteurs les plus influents. Pour les actifs, la teneur en polyphénols totaux est préservée alors que la vitamine C est conservée à plus de 70%. Les résultats ont été analysés au regard de l'effet de la température et de la pression sous azote et sous air, de l'interaction pH/température, de la charge en microorganismes et de la nature de la matrice.

La pasteurisation est également examinée sous l'angle du transfert de masse et des temps caractéristiques dans un contacteur gaz-liquide afin d'estimer la cinétique de dissolution du CO₂ dans la matrice. L'étude de sensibilité montre que c'est la solubilité du CO₂ dans l'eau qui impacte la cinétique de dissolution plus que les paramètres liés au contacteur. Des essais avec deux dispositifs batch et un mini-dispositif continu illustrent ce propos.

La durée de vie des produits ainsi pasteurisés et l'apport du traitement CO₂ comparé à un traitement thermique ont été aussi étudiés.

Mots clés : CO₂ comprimé, pasteurisation, agro-alimentaire, microorganisme, préservation d'actifs

OPTIMIZATION OF A PRESSURIZED CARBON DIOXIDE PROCESS TO PASTEURIZE AND PRESERVE HIGHLY SENSITIVE LIQUID DIETARY SUPPLEMENT

According to the law, food dietary supplements belong to food products and must then be pasteurized to kill potentially pathogenic microorganisms. Pressurized carbon dioxide can be a low-temperature alternative to usual thermal treatments. In this study, a high pressure carbon dioxide process is optimized to pasteurize dietary supplements highly contaminated with 3 microorganism species.

This work reviews the effect of operating parameters on microbial inactivation and active ingredients thanks to a central composite design. Temperature and, at a lower extent, the pressure-duration interaction were identify as influent. Concerning active ingredients, total phenolic concentration is fully preserved whereas vitamin C retention rate is at least of 70%. Results were analyzed taking into account the synergistic effect of temperature and pH, temperature and atmospheric or N₂ pressure, contamination level and the composition of the food matrix.

Pasteurization was evaluated from the mass transfer and characteristic times point of view in a gaz-liquid contactor. The sensitivity analysis underlines that CO₂ solubility in water is the main factor that affects the kinetic dissolution, beyond contactor constraints. Experiments led with 2 different batch set-ups and a mini-continuous reactor illustrate that point.

Finally this work studies the shelf-life of our CO₂-pasteurized products and estimates the added value of such a treatment compared to a thermal one.

Keywords : pressurized carbon dioxide, pasteurization, food industry, microorganism, nutriment preservation

Unité de recherche

Institut de Chimie et de Biologie des Membranes et des Nano-objets (CBMN), UMR 5248, Allée Geoffroy Saint Hilaire, Bât B14 - 33600 Pessac