République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université A. MIRA-Bejaia

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Microbiologie
Filière : Sciences biologiques
Option : Génie biologique

Ref : ……

Mémoire de Fin de Cycle

En vue de l'obtention du diplôme de

MASTER

Thème

Evolution de la flore microbienne au cours du process de fabrication de la margarine Matina de Cevital

Présenté par :

Adel Meriem et Affoune Ibtissam

Devant le jury composé de :

CHIBANE Nouara	**MAA**	**Présidente**
BENSAID Karim	**MAA**	**Examinateur**
BOUSSALAH Noureddine	**MAA**	**Promoteur**
DJEMAOUNE Lounis		**Invité**

Année universitaire : 2016/2017

Remerciements

Nous souhaitons adresser nos remerciements les plus sincères aux personnes qui nous ont apportés leurs aides et qui ont contribué à l'élaboration de ce mémoire ainsi qu'à la réussite de cette année universitaire.

Nous tenons d'abord à remercie très chaleureusement ***Mr BOUSSALAH N.*** *Qui nous a permis de bénéficier de son encadrement. Les conseils qu'il nous a prodigués, la patience, la confiance qui nous a témoigné ont été déterminants dans la réalisation de notre travail. Nos remerciements s'étendent également à* ***Mme CHIBANE N****. La présidente du jury et à notre examinateur* ***Mr BENSAID K.*** *pour avoir accepté d'évaluer ce modeste travail.*

Ensuite, nous tenons à exprimer nos sincères remerciements à :

Mr DJEMAOUNE L. *Le chef de laboratoire de microbiologie de complexe Agro-alimentaire Cevital et a toute l'équipe de laboratoire. Qui nous ont mis à l'aise tout au long de notre stage et qui nous ont bien orienté et aidé.*

Enfin, nous remercions tous les professeurs qui nous ont enseigné et qui par leurs compétences nous ont soutenu dans le poursuit de nos études.

Dédicace

Je dédie ce travail à :

Ma mère et mon père pour leur soutien, leur aide, leur

Patience et leur amour, ce travail est l'aboutissement de votre dévouement constant, de vos sacrifices, de vos consolantes sollicitudes et de vos prières.

Puisse ce modeste travail vous procurer la satisfaction du devoir

Accompli et que Dieu m'accorde un jour l'occasion de relever le défi.

J'espère qu'aujourd'hui, un de vos vœux les plus chers se réalise.

Ma petite sœur Ghofrane

Mon frére Yacine et mes sœur Wafia et Lamia

Mes deux grands-mères Khadra et Oum saad

Mes grand père Amer et Ibrahim

Amti Saida et Khalti Souhila et Zoulikha

Mes oncles et leurs femmes, mes tantes et leurs maris

Mes cousins et cousines

Mes copine de chambre Houda et Soumia et Nariman

Mon binôme et ma copine intime Meriem et sa famille. Ce travail est le reflet de toute une complicité inoubliable

A tous ceux que j'aime

À mes collègues et camarades de ma promotion 2016/2017 ; Courage et réussite dans la vie professionnel1e.

Ibtissam

Dédicace

Je dédie ce travail à :

Mes très chers parents

À qui je dois ce que je suis

Je leur exprime ma profonde gratitude pour les sacrifices consentis pour mon éducation

La bienveillance avec laquelle ils m'ont toujours entourée

Et leur soutien qu'ils n'ont jamais cessé de m'approvisionner.

Mes très chères sœurs : Nissa et Samia à qui je souhaite une vie pleine de bonheur, santé et réussite.

Mes oncles et tantes

Mes cousins et cousines

A mes anges Mayssa ; Sousou ; Massito et Mouloud

Pour Tous ceux qui me connaissent et que je n'ai pas pu citer leurs noms

Mon binôme et ma copine intime ibtissam et sa famille. Ce travail est le reflet de toute une complicité inoubliable

Toute la promotion master II 2016/2017

Meriem

Sommaire

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations

Introduction

Introduction……... 01

I Corps gras……... 03

I-1 Classification des corps gras…….. 03

I-2 Classification des corps gras selon leurs origines…… 03

I-3 Classification des corps gras selon leurs consistances à température ambiante... 03

II Margarine…….. 04

II-1 Historique……... 04

II-2 Définition…… 04

II-3 Composition globale de la margarine…….. 05

II-3-1 Phase grasse…… 05

II-3-2 Phase aqueuse……. 06

II-4 Procédé de fabrication de la margarine…….. 07

II-4-1 Préparation de la phase grasse……. 07

II-4-2 Préparation de la phase aqueuse…….. 07

II-4-3 Préparation de l'émulsion……. 07

II-4-4 Refroidissement et cristallisation…….. 07

II-4-5 Malaxage……. 07

II-4-6 Conditionnement…… 08

II-4-7 Stockage…….. 08

II-5 Types de margarines……. 08

Chapitre II : Matériel et Méthodes

I Margarine Matina…….. 10

I-1 Présentation du produit Matina……...……. 10

I-2 Valeurs nutritionnelles de la margarine Matina…….. 10

II Présentation et organisation du laboratoire de microbiologie de Cevital……... 11

III Analyses microbiologiques……. 13

III-1 Analyses de la poudre du lait……. 13

III-1-1 Echantillonnage…… 13

III-1-2 Préparation de la solution mère et des dilutions……... 13
III-1-3 Recherche et dénombrement des germes aérobie……. 15
III-1-4 Recherche et dénombrement des coliformes totaux……. 16
III-1-5 Recherche et dénombrement des Clostridium solfito-réducteurs…… 17
III-2 Analyse microbiologique de l'eau osmosée ……...…… 18
III-2-1 Echantillonnage…… 18
III-2-2 Recherche et dénombrement des entérocoques intestinaux……. 19
III-2-3 Recherche et dénombrement des *Escherichia Coli*…… 19
III-2-4 Recherche et dénombrement des Clostridium solfito-réducteurs…… 20
III-3 Analyse microbiologique du lait reconstitué pasteurisé……... 20
III-3-1 Echantillonnage…… 20
III-3-2 Recherche et dénombrement des germes aérobie……. 21
III-3-3 Recherche et dénombrement des coliformes totaux…….. 21
III-3-4 Recherche et dénombrement des coliformes fécaux……. 22
III-3-5 Recherche et dénombrement des *Staphylococcus aureus*……... 23
III-4 Analyses microbiologique de l'émulsion avant pasteurisation…… 24
III-4-1 Echantillonnage……..... 24
III-4-2 Recherche et dénombrement des germes aérobie……. 24
III-4-3 Recherche et dénombrement des coliformes fécaux……. 25
III-4-4 Recherche et dénombrement des *Staphylococcus aureus*……... 26
III-4-5 Recherche et dénombrement des levures……... 27
III-5 Analyse microbiologique du produit fini……... 28
III-5-1 Echantillonnage…… 28
III-5-2 Préparation de la solution mère……. 28
III-5-3 Recherche et dénombrement des germes aérobie……. 28
III-5-4 Recherche et dénombrement des coliformes fécaux……. 28
III-5-5 Recherche et dénombrement des levures……... 29
III-5-6 Recherche des Salmonelles……... 29

Chapitre III Résultats et discussions

I Résultats d'analyse microbiologique de la poudre du lait…….. 30
I-1 Recherche et dénombrement des germes aérobie…… 30
I-2 Recherche et dénombrement des coliformes totaux…… 30
I-3 Recherche et dénombrement des Clostridium solfito-réducteurs…….. 30

I-4 Recherche et dénombrement des Salmonelles…….. 30
I-5 Conclusion……... 31
II Résultats d'analyses microbiologiques de l'eau osmosée…….. 31
II-1 Recherche et dénombrement d'*E.coli*……. 31
II-2 Recherche et dénombrement des Entérocoques……. 31
II-3 Recherche et dénombrement des Clostridium solfito-réducteurs…… 32
II-4 Conclusion…….. 32
III Résultats d'analyses microbiologiques du lait reconstitué pasteurisé…… 32
III-1 Recherche et dénombrement des germes aérobies……... 32
III-2 Recherche et dénombrement des coliformes totaux……. 32
III-3 Recherche et dénombrement des coliformes fécaux……. 32
III-4 Recherche et dénombrement des *Staphylococcus aureus*……. 32
III-5 Conclusion…… 33
IV Résultats de l'analyse microbiologique de l'émulsion avant pasteurisation…….. 33
IV-1 Recherche et dénombrement des germes aérobies……... 33
IV-2 Recherche et dénombrement des coliformes fécaux……. 33
IV-2 Recherche et dénombrement des *Staphylococcus aureus* …… 33
IV-4 Recherche et dénombrement des levures …….. 34
IV-5 Recherche et dénombrement de Salmonelles……... 34
IV-6 Conclusion…… 34
V Résultats d'analyses microbiologiques de produit fini (maragrine matina)……... 35
V-1 Recherche et dénombrement des germes aérobie…….. 35
V-2 Recherche et dénombrement des coliformes fécaux…….. 35
V-3 Recherche et dénombrement des *Staphylococcus aureus*……... 35
V-4 Recherche et dénombrement des levures…… 35
V-5 Recherche et dénombrement des Salmonelles……. 35
V-6 Conclusion…….. 36

Conclusion

Conclusion…….. 37
Référence bibliographique
Annexe
Résumé

Liste des tableaux

Tableau I : Classification des corps gras selon leur origine……... 03

Tableau II : Valeurs nutritionnelles de la margarine Matina…… 10

Tableau III : Germes recherchés en fonction de la nature du produit……. 14

Tableau IV : Résultats de l'analyse microbiologique de la poudre du lait……... 31

Tableau V : Résultats de l'analyse microbiologique de l'eau osmosée……. 32

Tableau VI : Résultats de l'analyse microbiologique de lait reconstitué pasteurisé… 33

Tableau VII : Résultats de l'analyse microbiologique de l'émulsion avant pasteurisation…….. 34

Tableau VIII : Résultats de l'analyse microbiologique du produit fini…… 35

Liste des figures

Figure N°1 : Classification des margarines disponibles sur le marché mondial... 08

Figure N°2 : Diagramme de fabrication de la margarine……... 09

Figure N°3 : Photographie de la salle de préparation des milieux de culture…... 12

Figure N°4 : Photographie de la salle d'analyses microbiologiques……... 12

Figure N°5 : Schéma de préparation de la solution mère et dilution……. 15

Figure N°6 : Schéma de recherche des germes aérobie dans la poudre du lait … 16

Figure N°7 : Schéma de recherche des coliformes totaux dans la poudre du lait 17

Figure N° 8 : Schéma de recherche des anaérobies sulfito-réducteurs dans la poudre du lait…….. 18

Figure N° 9 : Schéma d'analyse de l'eau par filtration……... 20

Figure N° 10 : Schéma de la recherche des germes aérobie dans le lait pasteurisé……. 22

Figure N° 11 : Schéma de la recherche des coliformes dans le lait pasteurisé……. 23

Figure N°12 : schéma de la recherche des coliformes fécaux dans l'emulsion…. 26

Figure N°13 : Schéma de la recherche des *Staphylococcus aureus* dans l'emulsion……. 27

Liste des abréviations

BP : Bard Parker

CEE : Communauté Economique Européenne.

JORA : Journal Officiel de la République Algérienne.

ISO : International Standard Organization.

M**GLA** Matière Grasse Laitière Anhydre

MKTTn : Muller-Kauffmann au Tétrathionate-Novobiocine

OGA: Oxytetracycline Glucose Agar

PCA: Plate Count Agar

RVS : Rappaport-Vassiliadis Soja

SB : Slanetz et Bartley

SS : Salmonella-Shigella

UFC : Unité Formant Colonies.

UV : Ultraviolet

pH : Potentiel Hydrogène

VF : Viande-Foie.

XLD : Xylose-Lysine-Désoxycholate.

Introduction

INTRODUCTION

La microbiologie est une science en plein développement ayant des applications dans des domaines très variés et en particulier dans l'alimentation et les industries alimentaires.

L'aspect microbiologique des transformations alimentaires et l'incidence des accidents microbiologiques doivent être pris en compte pour assurer la maitrise des fabrications ainsi que la santé du consommateur.

La flore microbienne est constituée des microorganismes qui sont généralement dans l'aliment c'est la flore normale, si cette flore microbienne n'est pas contrôlée, la qualité et la conservation des aliments ne sont pas assurée.

Les corps gras ou lipides, qu'ils soient d'origine animale ou végétale, jouent un rôle important dans l'alimentation. Ce rôle est d'abord d'ordre nutritionnel grâce à leur apport d'énergie (environ 9 kcal/g), d'acides gras essentiels et de vitamines liposolubles (vitamines A, D, E, K), puis d'ordre organoleptique, par leur contribution à la texture, à la sapidité et aux emplois culinaires des aliments **(Cheftel, 1976).**

La margarine est constituée essentiellement de deux phases, grasse et aqueuse, elle contient en outre 2% d'additifs hydro et liposolubles. 82% de sa composition est représentée par un mélange d'huiles et 16% de la phase aqueuse. C'est un produit riche en lipides qui englobe de multiples acides gras avec des teneurs bien différentes selon les recettes utilisées pour sa confection **(Karleskind, 1992).**

Ce travail a été réalisé au niveau du laboratoire de microbiologie du complexe agro-alimentaire de Cevital Bejaia, dont l'objectif est le suivi de la qualité microbiologique lors du process de fabrication de la margarine « Matina », de la matière première (la poudre du lait, l'eau osmosée, lait reconstitué pasteurisé), le produit intermédiaire (l'émulsion) au produit fini. Dans le but de déterminer l'évolution de la flore microbienne d'origine et d'altération à travers les différentes étapes de fabrication de « Matina », des analyses microbiologiques ont été effectuées à des points critiques du processus de fabrication (matières premières, avant pasteurisation, émulsion et après pasteurisation). Ces analyses portent sur l'innocuité et la conformité du produit fini vis-à-vis des exigences réglementaires et assurent aux consommateurs la qualité et la stabilité recherchée.

Cette étude est scindée en deux parties : une partie théorique présentant une synthèse bibliographique sur les cors gras et la margarine ; et une partie expérimentale contenant un

chapitre sur le matériel et les méthodes utilisés et un autre sur les résultats obtenus et leurs interprétations.

La margarine

I Corps gras

Les corps gras sont un groupe de substances chimiquement hétérogène, ayant en commun la propriété de l'insolubilité dans l'eau, mais la solubilité dans les solvants non polaires tels que le chloroforme, les hydrocarbures ou les alcools.

Ils comprennent une grande varié de produits naturels, y compris les acides gras et leurs dérivés, les stéroïdes, les terpènes, les caroténoïdes et les acides biliaires **(O'Keefe, 2002).**

I-1 Classification des corps gras

Les corps gras peuvent être classés en fonction de leur origine et/ou en fonction de leur point de fusion

I-2 Classification des corps gras selon leur origine

Le tableau I donne une classification des corps gras selon leur origine

Tableau I : classification des corps gras selon leur origine (Fredot, 2005).

Origine	Corps gras
Animale	Beurre ; Crème ; Graisse de bœuf, d'oie, de canard, saindoux ; Shortenning (graisse raffinées et hydrogénées) à base de graisses animales adaptées aux fritures profondes ; Huile d'animaux marins.
Végétale	Huile pour assaisonnement ; Huiles pour friture et assaisonnement ; Végataline (huile de coprah hydrogénée) ; Margarines végétales.
Mixte	Margarine standards à base d'huiles végétales et de graisses de poisson ; Margarine et shortenning pour pâtisserie.

I-3 Classification des corps gras selon leur consistance à température ambiante

Les propriétés physiques des corps gras dépendent directement de leur composition chimique en acide gras, qui influence leur consistance. Ainsi, on n'appelle point de fusion la température à partir de laquelle un corps gras se liquéfie. Par conséquent, plus le nombre d'instauration est important, plus le corps gras est fluide à température ambiante, et plus les acides gras saturés sont plus abondant, plus le corps gras est solide à température ambiante.

Les corps gras sont classés selon leur consistance à température ambiante en deux classes :

- Corps gras fluides : huile de colza, soja, arachide, olive, etc.
- Corps gras concret : Beurre, graisses animales (saindoux, suif, …), margarine, huile de palme, etc. **(Fredot, 2005)**.

II Margarine

II-1 Historique

La margarine a été développée en 1869 par le chimiste et pharmacien Français Hippolyte Mège-Mouriès ,dans le but de trouver une alternative au beurre dont la formulation originale contenant le suif de bœuf a été remplacé par le lait ; afin de donner à la margarine une faible teneur en matières grasses avec des propriétés nutritionnelles et sensorielles similaires à celles du beurre (la saveur, la sensation dans la bouche et la tartinabilité**) (Arellano et *al.*, 2015)**.La margarine était préparée avec des graisses animales, suif et saindoux, émulsionnées avec de l'eau et du lait. La découverte de la désodorisation, permettant l'amélioration du gout et l'odeur des corps gras, a rendu possible la substitution des graisses animales par des graisses végétales concrètes (coco, palme…). L'hydrogénation des corps gras, une étape capitale dans le développement de la margarine, permit l'emploie des huiles fluides comme matière première, après leur solidification par cette technique (**François, 1974**). La margarine peut être un bon compromis nutritionnel entre l'huile et le beurre pour certaines utilisations **(Cheftel et Cheftel, 1977).**

II-2 Définition

La margarine peut être considérée comme un corps gras alimentaire sous forme d'émulsion plastique eau/huile, présentant une composition et un ensemble de caractères

physique, chimique, organoleptique, bactériologique et nutritionnels propres (**François, 1974**).

II-3 Composition globale de la margarine

La margarine est une émulsion de deux phases essentielles :

- Une phase continue : la phase grasse, représente 80% de la margarine au minimum ;
- Une phase dispersée : la phase aqueuse, représente 18% de la margarine.

La margarine contient aussi des additifs (Lécithines, mono glycérides, sel, colorants, antioxydants, conservateurs, vitamines) répartis en partie dans la phase grasse et en partie dans la phase aqueuse **(Karleskind, 1992)**.

II-3-1 Phase grasse

Elle est constituée par différents matières grasses :

- Matières grasse d'origine végétale hydrogénées ou non hydrogénées ;
- Matières grasse d'origine animales.

Et aussi, elle contient les ingrédients liposolubles (les émulsions, colorants, vitamines et arômes) **(Karleskind, 1992)**.

a) Emulsifiants

Les émulsifiants sont des composés ayant des propriétés tensio-actives dues à leur caractère amphi phatique. Leur structure chimique étant composée à la fois de groupe hydrophile et lipophile et de ce fait pouvant se dissoudre dans les deux phases permettant leur union sous forme homogène **(Karleskind, 1992).**

b) Colorants

La couleur de la margarine, assez voisine à celle de beurre, est obtenue soit par addition d'huile de palme rouge, soit par ajour du β-carotène **(Karleskind, 1992)**.

c) Vitamines

Les margarines peuvent être enrichies par l'ajout de vitamines liposolubles (A, D, E), afin d'éviter leurs carences **(Karleskind, 1992)**.

Elles peuvent, également, être employées comme antioxydants, additionnées de substances dites synergiques, comme l'acide citrique ou phosphorique qui complète leurs actions stabilisatrices **(François, 1974 ; Faur, 1992)**.

d) Aromatisants

Les margarines sont souvent aromatisées par le diacétyle, arôme naturel du beurre, qui est un liquide jaunâtre à forte odeur et lui confère une odeur et un gout de beurre d'une manière permanente **(Faur, 1992)**.

II-3-2 Phase aqueuse

Elle comprend de l'eau pure et/ou de lait. Ce dernier est écrémé et pasteurisé. Elle est très sensible à des contaminations bactériennes, donc une pasteurisation préalable est nécessaire **(Karleskind, 1992)**.

Cette phase contient :

a) Eau

Le constituant le plus important de la phase aqueuse. Elle doit être pure et saine sur le plan microbiologique **(Faur, 1992)**.

b) Lait

Le lait doit être pasteurisé, écrémé et généralement additionné de ferments lactiques qui développent un arome agréable proche de celui du beurre (**Faur, 1992)**.

c) Sel (NaCl)

Le sel (0,5 - 2% du poids du produit fini) est un additif important, qui à travers ses propriétés bactériostatiques peut contribuer à la protection du produit contre les dégradations microbiologiques, et en même temps améliorer la sapidité du produit à la consommation **(Kone, 2001)**.

d) Conservateurs

L'acide sorbique (E200) est un acide faible, il présente un bon effet fongistatique, il convient à la conservation des aliments. L'action inhibitrice est en fonction de la concentration en acide : elle augmente quand le pH diminue **(Karleskind, 1992)**.

e) Correcteurs de pH

L'acide citrique (E330) est un antioxydant synergiste puissant, il permet de contrôler le pH de la phase aqueuse **(Kone, 2001)**.

II-4 procédé de fabrication de la margarine

La fabrication de la margarine comprend les étapes suivantes (figure 2) :

II-4-1 Préparation de la phase grasse

La phase grasse est constituée d'un mélange de corps gras dans les proportions définies selon la recette, additionnée d'ingrédients mineurs solubles dans les graisses tels que les émulsifiants, les vitamines, les arômes et les colorants **(Kone, 2001 ; Gerstenberg, 2012)**.

Le choix des huiles de cette phase détermine en grande partie les qualités du produit fini notamment la texture, la consistance, le point de fusion et la stabilité **(Karleskind, 1992)**.

II-4-2 Préparation de la phase aqueuse

Elle constitue 16% à 18% d'eau et/ou lait (écrémé et pasteurisé) de la masse totale qui subit une pasteurisation préalable, suivit par l'addition de sel, aromes, conservateurs et correcteurs de pH **(Karleskind, 1992)**.

II-4-3 Préparation de l'émulsion

L'émulsion est le résultat de la combinaison entre la phase aqueuse, la phase grasse et les émulsifiants, mélangés dans le bac d'émulsion. Elle est obtenue, le plus souvent, à l'aide d'une pompe à haute pression pour bien proportionner les deux phases. Une agitation importante est nécessaire pour bien disperser de manière fine la phase aqueuse dans la phase graisse **(Aboiron et Hameury, 2004)**.

II-4-4 Refroidissement et cristallisation

Ces deux étapes sont souvent couplées. Une fois l'émulsion faite, il faut la maintenir de façon durable et compléter ainsi l'action des émulsifiants. Pour cela, le mélange est refroidi à des températures très basses qui permettent la cristallisation de la phase grasse. La formation de cristaux entraîne un meilleur maintien de la structure de la margarine **(Cossut et al, 2002)**.

II-4-5 Malaxage

L'émulsion cristallisée est acheminée par la trémie jusqu'au malaxeur, afin de désaérer et

malaxer le mélange en lui donnant consistance, souplesse et homogénéité **(Himed et Barkat, 2014)**.

II-4-6 Conditionnement

Une fois refroidie et cristallisée, la margarine est conditionnée dans des barquettes en plastique ou dans du papier aluminium. Par ailleurs, c'est à cette étape que sont prélevés les échantillons nécessaires au contrôle qualité du produit fini **(Cossut et *al.* 2002)**.

II-4-7 Stockage

Le produit fini est conservé à une température de 4 ◦C pour éviter le rancissement et l'altération de ce dernier **(Himed et Barkat, 2014)**.

II-5 types de margarines

La phase grasse représente la partie la plus importante de l'émulsion, soit 82 à 84 % dans les margarines traditionnelles d'aspect proche du beurre et 60 % seulement dans les margarines dites « allégées ». Suivant la composition de la matière grasse (choix du mélange de corps gras, caractère hydrogéné, fractionné, ou interestérifié de tout ou partie des matières premières), il est possible de formuler une large gamme de margarines à usages spécifiques (par exemple margarine tartinable, margarine pour pâtisserie...) (**O'Brien, 2009)**.

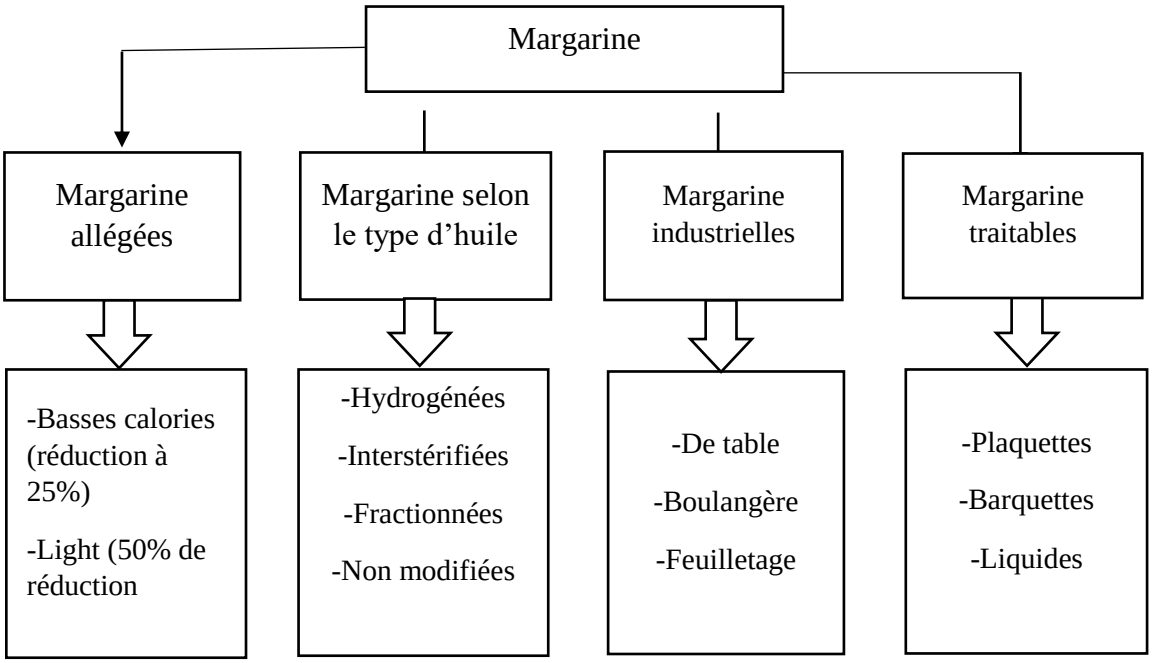

Figure 1 : classification des margarines disponibles sur le marché mondial (O'Brien, 2009)

Figure 2 représente le diagramme de fabrication de la margarine

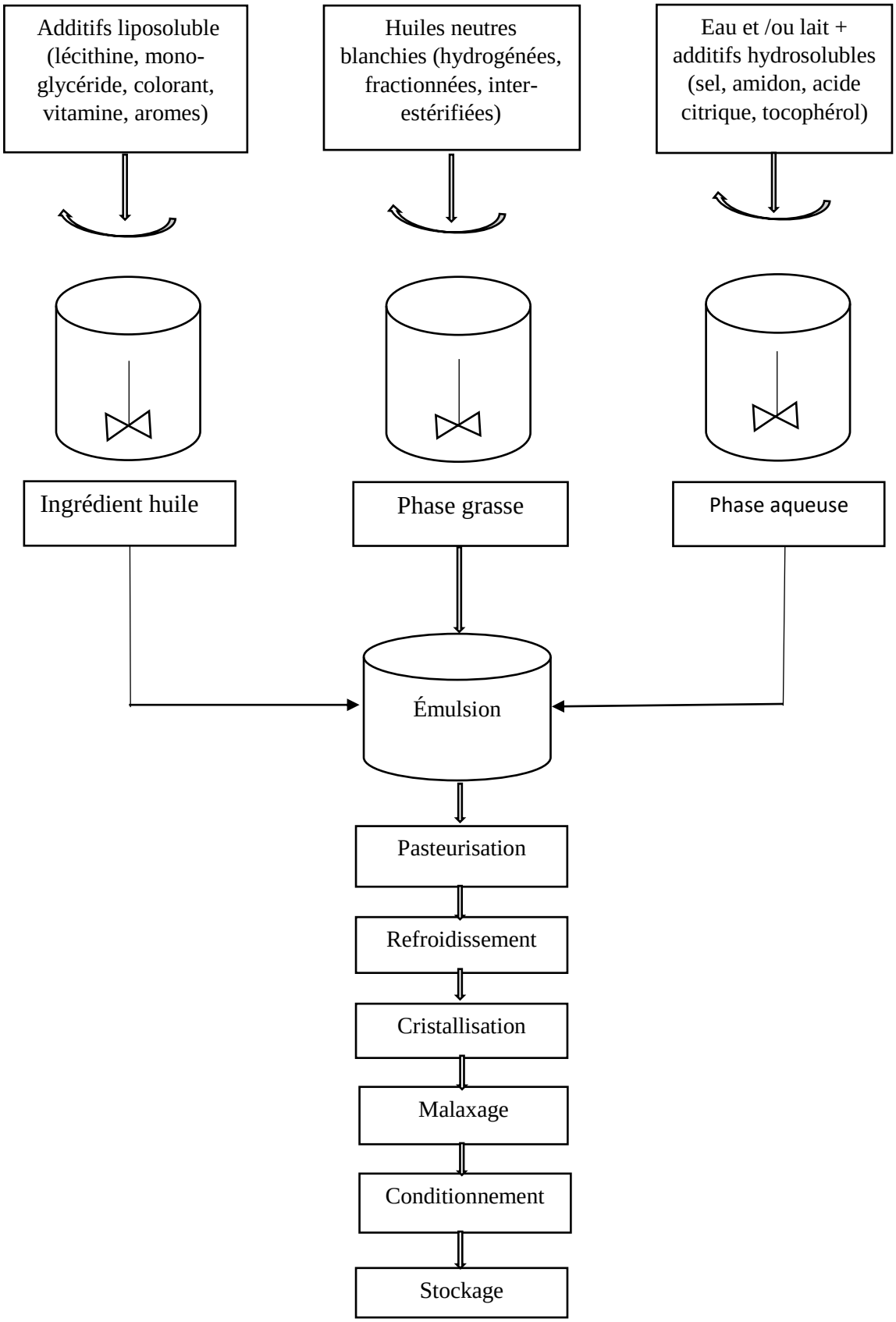

Figure 2 : Diagramme de fabrication de la margarine (Karleskind, 1992).

Matériel et méthodes

I Margarine Matina

I-1 Présentation du produit Matina

La margarine Matina est un corps gras solide issus d'un mélange de margarine et de beurre. C'est une margarine tartinable qui est enrichie en vitamines A, D et E. Elle est conditionnée dans des barquettes de 400 g.

Les principales matières premières utilisées pour la fabrication de la margarine Matina sont :

- Les huile et graisse végétales raffinées (tournesol, palme, coprah) ;
- Matière grasse laitière anhydre (MGLA) ;
- Eau osmosée ;
- Poudre de lait ;
- Sel (NaCl).

II-2 Les valeurs nutritionnelles de la margarine Matina

Le tableau II représente les valeurs nutritionnelles de la margarine Matina.

Tableau II : valeur nutritionnelles de la margarine Matina

Energie	630 KCAL / 2600 KJ
Lipides	70g dont 55g acides gras saturés Acides gras trans < 2g
Protéines	0,15 g
Glucides	0,2g
Sel	0,4g
Vitamine A	600 µg
Vitamine D	2.5 µg
Vitamine E	80 mg

II Présentation et organisation du laboratoire de microbiologie de Cevital

Les microorganismes rencontrés dans les aliments en général sont des germes de contamination indésirable ou néfastes pour la qualité des aliments. Les contrôles portant sur le respect des valeurs maximales pour les microorganismes doivent être effectués avec les méthodes de recherche et de dénombrement de référence.

Pour l'obtention de bons résultats microbiologiques, le respect de certaines conditions est nécessaire. Parmi ces conditions, l'application et le respect des conditions d'asepsie, la stérilité de tout le matériel utilisé pendant le prélèvement et après le prélèvement, les récipients doivent être hermétiquement fermés et soigneusement étiquetés. Leur transport au laboratoire doit être fait immédiatement après le prélèvement pour éviter toutes modifications de croissance de la flore présente, ainsi des glacières sont donc prévues pour la conservation des échantillons pendant le transport. Le contrôle au laboratoire est effectué dans des conditions d'asepsie lors des analyses en travaillant dans une paillasse nettoyée avec l'alcool devant un bec bunsen avec un matériel d'analyse stérile.

Le laboratoire de microbiologie du complexe agroalimentaire de Cevital est organisé en six salles équipées de matériels spécifiquement adaptés aux analyses. Ces derniers sont bien entretenus dans le but d'avoir des résultats fiables. Le laboratoire comprend les salles suivantes :

- Salle d'enregistrement : chaque produit à analyser doit être enregistré.
- Salle de préparation des milieux de culture (voir figure N° 3) comprenant :
  - pH mètre.
  - Une plaque chauffante agitateur.
  - Un bain marie.
  - Une balance analytique.
  - Des autoclaves.
  - Un réfrigérateur.
  - Une armoire pour le stockage des milieux de cultures déshydratés.

Figure N° 3 : photographie de la salle de préparation des milieux de culture

❖ Deux salles de manipulation comprenant (voir figure N°4) :

- Des becs bunsens.
- Une rampe de filtration.
- Une balance.
- Un compteur des colonies et un microscope.
- Un réfrigérateur pour garder les échantillons.
- Un bain marie.
- Une armoire pour ranger la verrerie

Figure N° 4 : photographie des salles d'analyses microbiologiques

❖ Salle d'incubation contenant (voir annexe 1) :

- Six étuves réglées à différentes températures en fonction de l'analyse et des germes recherchés (22°C, 25°C, 30°C, 37°C 44°C et 55°C).

❖ Salle de nettoyage et de destruction des microorganismes comprenant **:**

- Un distillateur
- Un four pasteur pour le séchage de la verrerie et la stérilisation de cette dernière à chaleur sèche.
- Un autoclave pour la destruction des microorganismes recherchés après analyses des échantillons.

III Analyses microbiologiques.

L'analyse microbiologique et les germes recherchés pour les différentes matières premières, produits intermédiaires et du produit fini ont été réalisées selon les recommandations des normes de l'organisation international de standardisation (ISO) et les exigences du Journal Officiel de la République Algérienne (JORA N° 35 du 1998).

III-1 Analyse de la Poudre du lait

L'analyse microbiologique de la poudre du lait consiste à la recherche et /ou le dénombrement d'un certain nombre de microorganismes susceptibles d'être présents selon les exigences du JORA n°35 1998.

III-1-1 Echantillonnage (ISO 6887-4/2003)

- Prendre 05 sacs de poudre de lait aléatoirement.
- Désinfecter les mains avec de l'alcool et allumer la flamme.
- Dans des conditions d'asepsies, à l'aide d'une spatule stérile prélever une quantité de 500 g de poudre de chaque sac.
- Identifier les échantillons de 1 jusqu'à 5.

III-1-2 Préparation de la solution mère et des dilutions (ISO 6887-4/2003)

- Pour chaque échantillon, dissoudre 10g de la poudre de lait dans des flacons stériles et ajouter 90 ml de diluant (solution de Ringer).
- A l'aide d'une pipette graduée stériles, transférer 1mL de la solution mère dans des tubes stériles pour avoir la dilution 10^{-1}
- Ajouter 9mL de diluant (solution de Ringer) pour chaque tube.

La figure n°5 représente le schéma de préparation de la solution mère et des dilutions.

Tableau III : les germes recherchés en fonction de la nature du produit

Nature de produit	Germes recherché
Poudre du lait (lait déshydraté)	- Germes aérobies à 30°C - Coliformes - Clostridium sulfito-réducteurs à 46°C
Eau osmoseé	- *E. coli* - Entérocoques - Bactéries sulfito-réductrices
Lait pasteurisé reconstitué	- Germes aérobies à 30°C - Coliformes totaux - Coliformes fécaux - *Staphylococcus aureus*
Emulsion	- Germes aérobies à 30°C - Coliformes totaux - Coliformes fécaux - *Staphylococcus aureus* - Levures - Salmonelles
Produit fini	- Germes aérobies à 30°C - Coliformes totaux - Coliformes fécaux - *Staphylococcus aureus* - Levures - Salmonelles

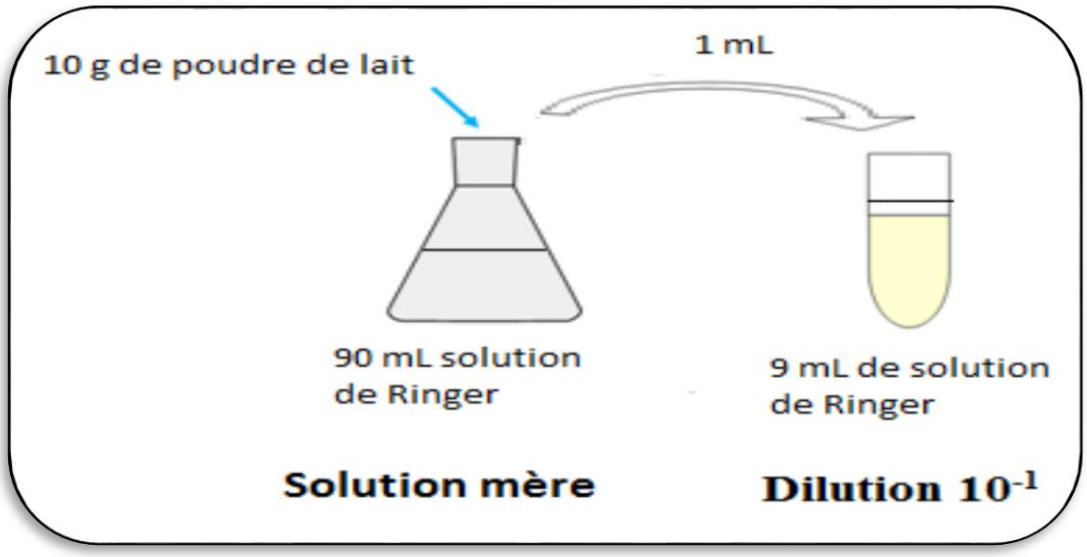

Figure n° 5 : Schéma de préparation de la solution mère et des dilutions

III-1-3 Recherche et dénombrement des germes aérobies (ISO 6610)

- Transférer dans deux boites de pétris 1 mL de la solution mère.
- Transférer dans deux boites de pétris 1 mL de la dilution 10^{-1}.
- Ajouter 15 ml de la gélose Plate Count Agar (PCA) en surfusion (voir annexe 4)
- Mélanger soigneusement l'inoculum et laisser se solidifier.
- Préparer également une boite témoin avec 15 mL du milieu PCA pour contrôler sa stérilité.
- Incuber les boites retournées dans une étuve à 30°C ± 1 °C pendant 72h.

Aspect des colonies

Des colonies de taille et de forme diverse.

Compter les colonies des boites contenant de 10 à 300 colonies.

Expression des résultats

$$N = \frac{\Sigma C}{(n1 + 0{,}1\ n2)d}$$

N : nombre de colonies par mL.

ΣC : somme totale des colonies comptées dans toutes les boites retenues.

n1 : nombre de boites retenue ou l'on compte entre 10 et 300 colonies à la première dilution.

n2 : nombre de boites retenue ou l'on compte entre 10 et 300 colonies à la deuxième dilution.

d : le facteur de dilution correspondant à la première dilution.

La figure N° 6 représente le schéma de la recherche des germes aérobie dans la poudre de lait.

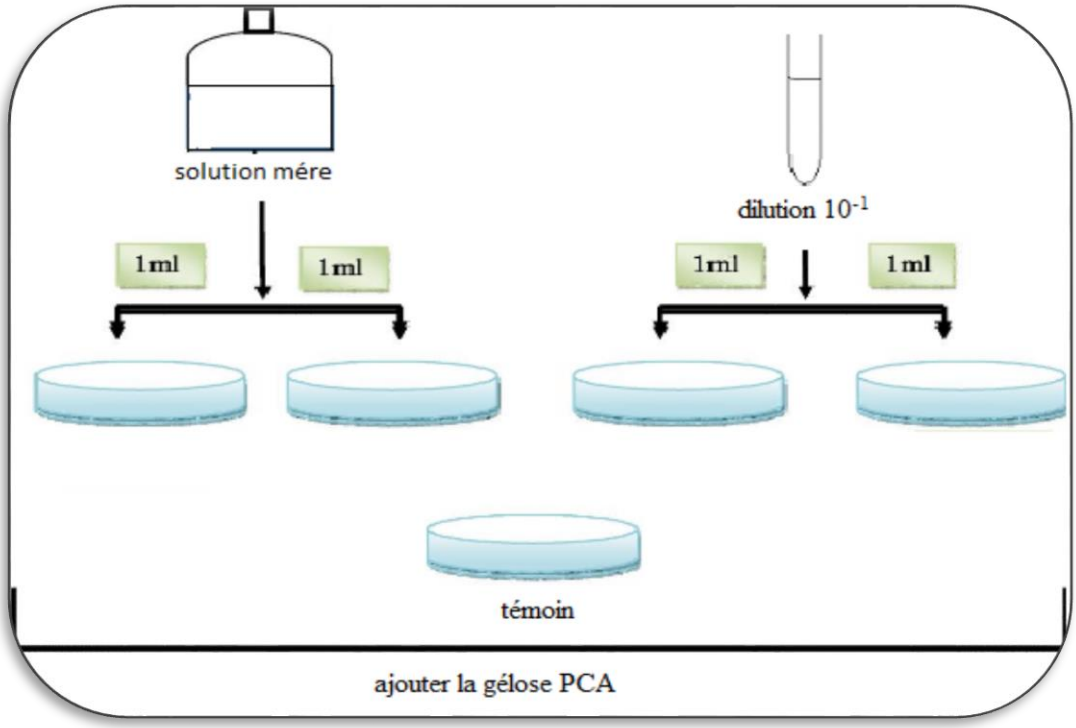

Figure N° 6 : Schéma de recherche des germes aérobie dans la poudre du lait

III-1-4 Recherche et dénombrement des coliformes totaux (ISO 4832)

- Transférer dans deux boites de pétris 1 mL de la solution mère.
- Ajouter 15 mL de la gélose désoxycholate en surfusion (voir annexe 2).
- Mélanger soigneusement l'inoculum et laisser se solidifier la gélose. Puis, ajouter une deuxième couche et laisser se solidifier la gélose.
- Préparer également une boite témoin avec 15 mL du milieu gélosé au désoxycholate.
- Incuber les boites retournées dans une étuve à 30°C ± 1 °C pendant 72h.

Aspect des colonies

Les colonies caractéristiques des coliformes totaux sont de couleur rouge foncée et

d'un diamètre supérieur ou égal à 0,5 mm

Expression des résultats

Les résultats sont exprimés par absence ou présence de colonies.

La figure N° 7 représente le schéma de la recherche des coliformes totaux dans la poudre de lait.

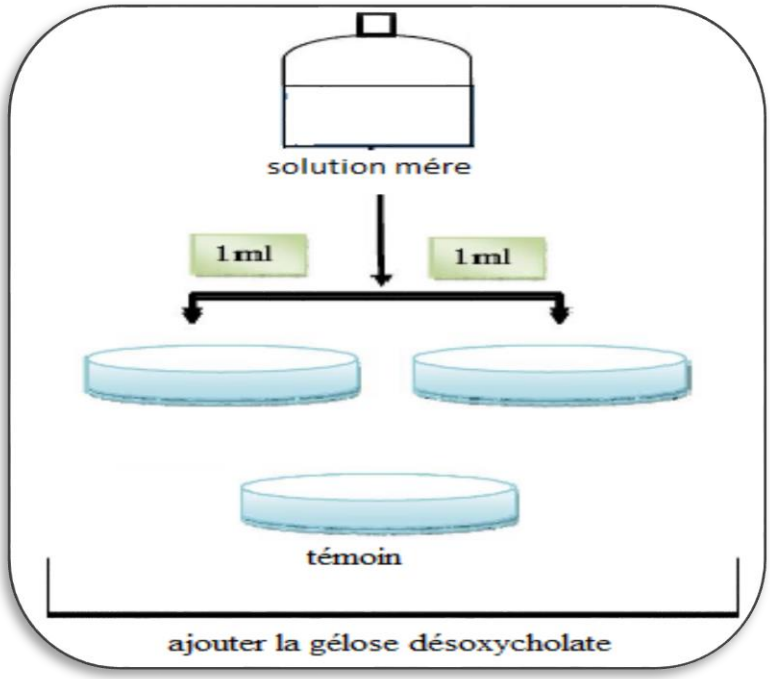

Figure N° 7 : Schéma de recherche des coliformes totaux dans la poudre de lait

III-1-5 Recherche et dénombrement des Clostridium solfito-réducteurs (ISO 15213)

- Transférer dans cinque tubes 1 mL de la solution mère.
- Remplir les tubes avec le milieu de culture Viande-Foie (VF) (voir annexe 7).
- Préparer également un tube témoin du milieu VF.
- Incuber les tubes à 46°C pendant 72h.

Aspect des colonies

Les colonies caractéristiques sont de couleur noire.

Expression des résultats

Le nombre de colonies trouvées doit être multiplié par l'inverse de la dilution.

La figure N° 8 représente le schéma de la recherche des Clostridium sulfito-réducteurs dans le lait pasteurisé.

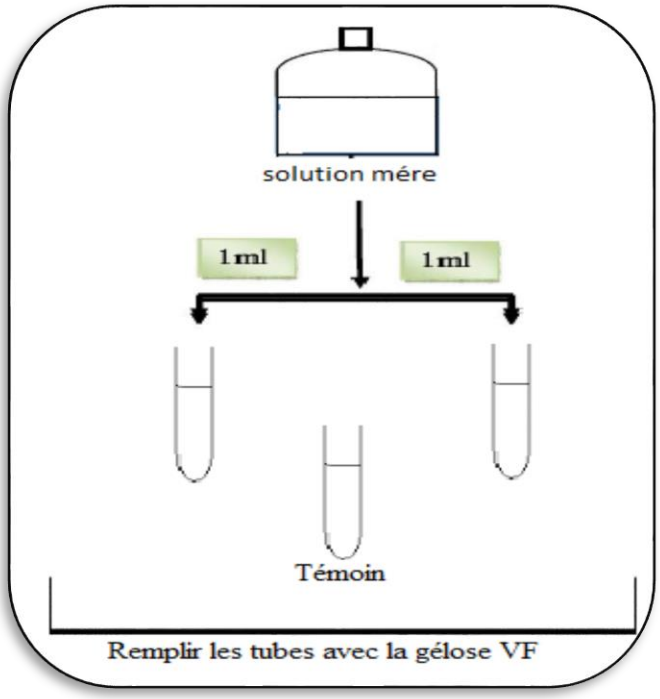

Figure N° 8 : Schéma de recherche des Clostridium sulfito-réducteurs dans la poudre de lait

III-2 Analyse microbiologique de l'eau osmosée

L'eau brute subie plusieurs opérations pour obtenir l'eau osmosée, qui est traitée par une lampe à UV afin de réduire la charge microbienne et détruire les germes pathogènes. La recherche des germes dans l'eau osmosée est faite par la méthode de filtration sur membrane.

III -2-1 Echantillonnage (ISO 19458 :2006(F))

- Désinfecter les mains et le robinet d'échantillonnage avec de l'alcool.
- Stériliser le robinet d'échantillonnage par flambage.
- L'eau stagnante doit être évacuée à débit lent.
- Remplir deux flacons stériles de 500 mL (avant et après UV).
- Fermer immédiatement les flacons.

III-2-2 Recherche et dénombrement des entérocoques intestinaux (ISO 7899 - 2 :2000(F))

- Filtrer 100 mL d'eau à travers une membrane filtrante stérile ayant des pores de 0.45µm de diamètre.
- Placer la membrane filtrante sur les boites contenant le milieu Slanetz et Bartley (SB) (voir annexe 6).
- Incuber les boites à 36°C ±2 pendant 48 h.

Aspect des colonies

Les colonies sont bombées avec une couleur rouge, marron ou rose soit au centre soit sur l'ensemble de la colonie.

Expression des résultats

$$\mathrm{N(UFC/100\ mL)} = \frac{\text{nombre de colonies d'ontérocoques}}{\text{volume déchantillon analysé en mL}} \times 100$$

III-2-3 Recherches et dénombrement des *Escherichia coli* (ISO 9308-1)

- A l'aide d'une pince stérile placer la membrane stérile sur le support filtre de la rompe de filtration stérile.
- Filtrer un volume de 100 mL de l'échantillon à analyser sur la membrane filtrante.
- Placer la membrane filtrante sur une boite de pétri contenant la gélose au désoxycholate.
- Préparer également une boite témoin du milieu au désoxycholate contenant une membrane filtrante stérile pour contrôler sa stérilité.
- Ajouter une deuxième couche de la gélose au désoxycholate.
- Incuber les boites à 44°C dans une étuve pendant 48h.

Expression des résultats

$$\mathrm{N\ (UFC/100mL)} = \frac{\text{nombre de colonies de } E.coli}{\text{volume d'échantillon analysé en mL}} \times 100$$

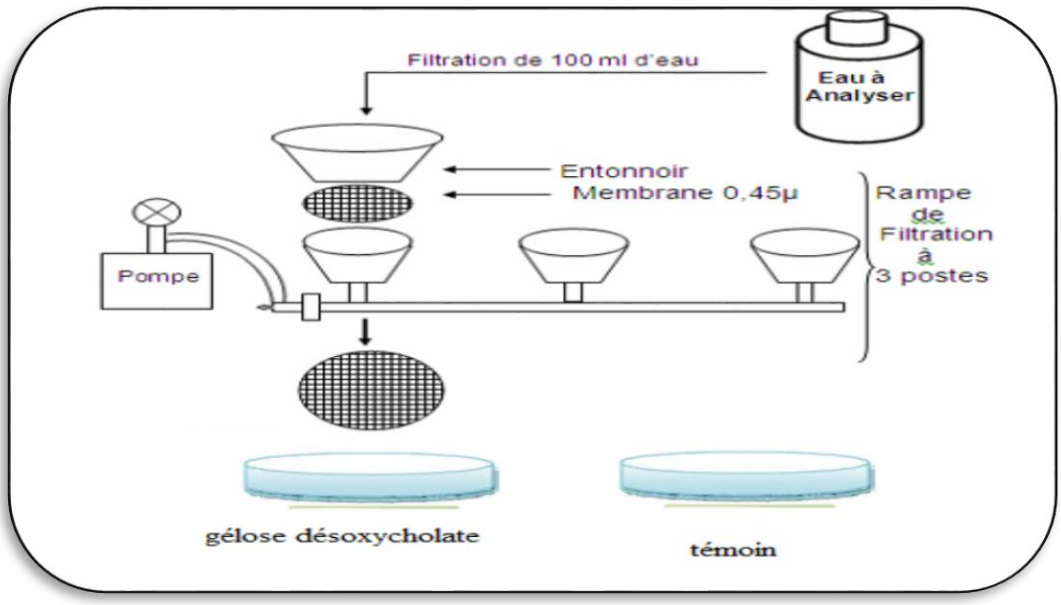

Figure N° 9: Schéma de l'analyse de l'eau par filtration

III-2-4 Recherche et dénombrement des Clostridium sulfito-réducteurs (ISO 6461/2-1986(F))

- Filtrer 100 mL d'eau à travers une membrane filtrante dont les pores présentent une dimension telle que les spores de 0.2 µm sont retenues par la membrane filtrante.
- Placer la membrane filtrante sur une boite de pétri contenant le milieu VF.
- Préparer également une boite témoin du milieu.
- Incuber à 46°C ± 1 pendant 48 h.

Aspect des colonies

Les colonies caractéristiques sont des colonies noires.

Expression des résultats

Comptabiliser toutes les colonies caractéristiques.

III-3 Analyse microbiologique du Lait reconstitué pasteurisé

Le lait pasteurisé préparé à base de la poudre de lait et de l'eau osmosée a été analysé après pasteurisation.

III-3-1 Echantillonnage

- Désinfecter les mains et la prise d'échantillon avec l'alcool.

- Stériliser le robinet d'échantillon avec flambage.
- Purger un volume de lait.
- Dans des conditions d'asepsie prélever une quantité de lait dans des flacons en verre stériles de 250 mL.
- Transporter l'échantillon dans une glaisière à 4°C.

III-3-2 Recherche et dénombrement des germes aérobies (ISO 6610)

- Transférer dans deux boites de pétris 1 mL d'échantillon.
- Ajouter pour chaque boite environ 15 mL de la gélose PCA en surfusion.
- Mélanger soigneusement et laisser se solidifier le milieu.
- Préparer également une boite témoin avec 15 mL du milieu PCA.
- Incuber les boites retournées dans une étuve à 30°C ± 1°C pendant 72h.

Expression des résultats

Retenir les boites contenant de 10 à 300 colonies. Le nombre de microorganisme par ml est calculé à l'aide de la formule suivante :

$$N = \frac{\Sigma C}{(n1 + 0{,}1n2 \ldots)d}$$

C : nombre de colonie par boites

n1 : nombre de boites retenue ou l'on compte entre 10 et 300 colonies à la première dilution.

n2 : nombre de boites retenue ou l'on compte entre 10 et 300 colonies à la deuxième dilution.

d : le facteur de dilution correspondant à la première dilution.

La figure N° 10 représente le schéma de la recherche des germes aérobie dans le lait pasteurisé.

III-3-3 Recherche et dénombrement des coliformes totaux (ISO 4832)

- Transférer dans deux boites de pétris 1 mL d'échantillon.
- Ajouter 15 mL de la gélose au désoxycholate en surfusion.

- Mélanger soigneusement l'inoculum au milieu et le laisser se solidifier. Ajouter une deuxième couche et laisser solidifier la gélose.
- Préparer également une boite témoin avec 15 mL du milieu désoxyhcolate.
- Incuber les boites retournées dans une étuve à 30°C ± 1 °C pendant 48h.

Aspect des colonies

Les colonies caractéristiques des coliformes totaux sont de couleur rouge foncée et d'un diamètre supérieur ou égal à 0,5 mm.

Expression des résultats

Les résultats sont exprimés par absence ou présence de colonies.

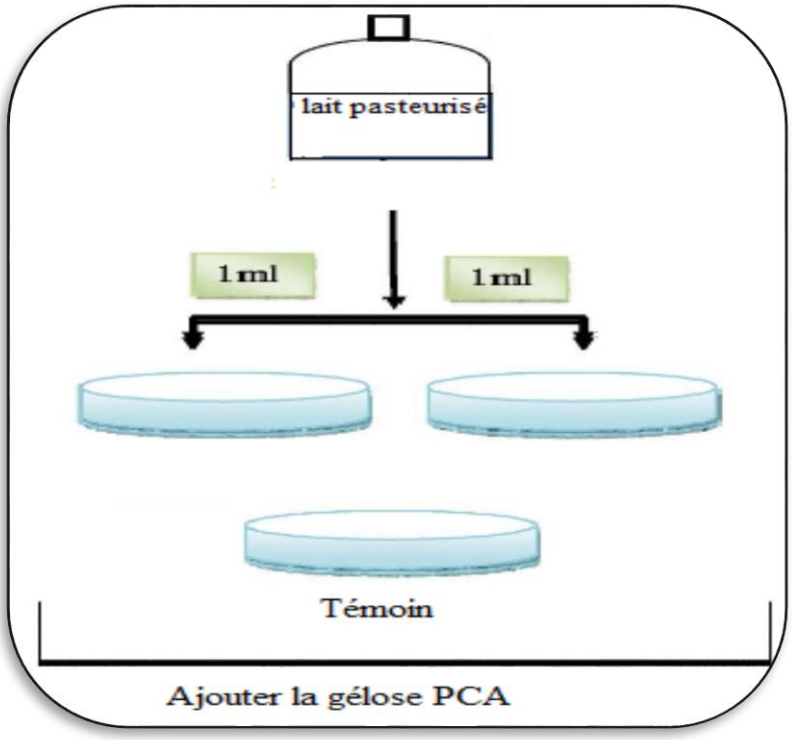

Figure N° 10 : Schéma de la recherche des germes aérobie dans le lait pasteurisé

III-3-4 Recherche et dénombrement des coliformes fécaux (ISO 4832)

- Transférer dans deux boites de pétris 1 mL d'échantillon (voir figure 11).
- Ajouter 15 mL de la gélose au désoxycholate en surfusion.
- Mélanger soigneusement l'inoculum au milieu et le laisser se solidifier. Puis, ajouter une deuxième couche de milieu et le laisser se solidifier.

- Préparer également une boite témoin avec 15 mL du milieu gélosé au désoxycholate.
- Incuber les boites retournées dans une étuve à 44°C ± 1 °C pendant 48h.

Aspect des colonies

Les colonies caractéristiques sont de couleur rouge foncées et d'un diamètre supérieur ou égal à 0,5 mm.

Expression des résultats

Retenir pour comptage, les boîtes de Pétri contenant moins de 150 colonies. Les résultats sont exprimés par absence ou présence des colonies.

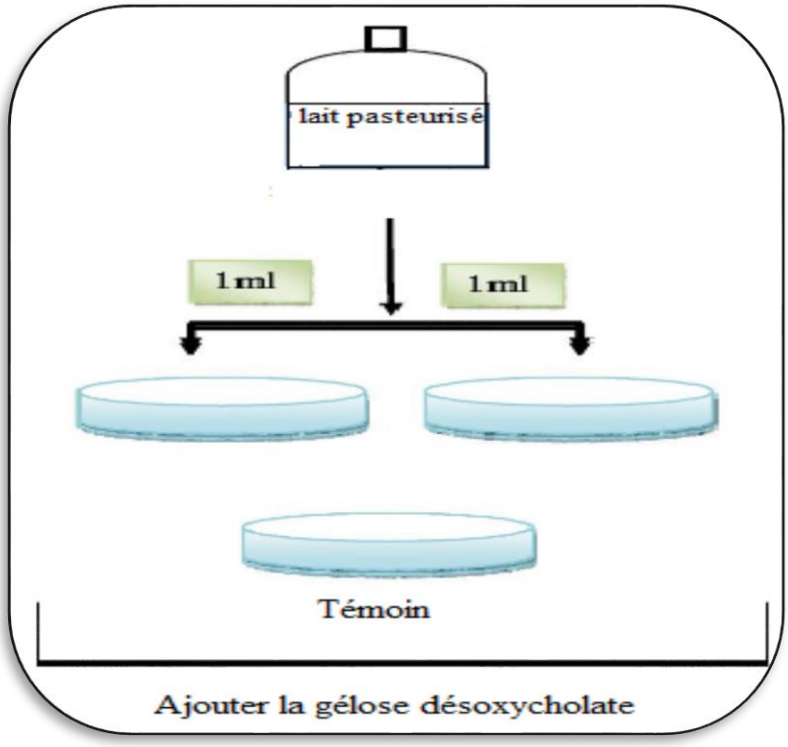

Figure N° 11 : Schéma de la recherche des coliformes dans le lait pasteurisé

III-3-5 Recherche et dénombrement de *Staphylococcus aureus* (6888-1/2003)

- Couler sur deux boites de pétri stérile la gélose de Bard Parker (voir annexe 1).
- Apres solidification, transférer 1 mL d'échantillon et l'étaler sur la surface de la gélose avec un râteau étaleur.
- Préparer une boite témoin de milieu Bard Parker (BP).
- Incuber les boites retournées dans une étuve à 37°C pendant 48h.

Aspect des colonies

Les colonies caractéristiques sont noires ou grises, brillantes, convexe et entourées d'une auréole d'éclaircissement.

Expression des résultats

Retenir les boites de pétri contenant moins de 150 colonies. Le nombre de Staphylocoques est donné par la formule suivante :

$$\mathrm{N} = \frac{\sum a}{\mathrm{V(n1 + 0{,}1n2)d}}$$

N : nombre de colonie

$\sum a$: est la somme des colonies de Staphylocoques à coagulase positive identifiées sur les boites retenues.

V : est le volume étalé sur chaque série de trois boites.

n1 : est le nombre de boites retenues à la première dilution.

n2 : est le nombre de boites retenues à la seconde dilution.

d : est le taux de dilution correspondant à la première dilution retenue.

III-4 Analyses microbiologiques de l'émulsion avant pasteurisation

L'émulsion, produit intermédiaire, est obtenue par le mélange des deux phases constitutives de la margarine : la phase aqueuse et la phase grasse.

III-4-1 Echantillonnage

- Désinfecter le robinet d'échantillonnage et les mains avec l'alcool.
- Stériliser le robinet d'échantillonnage par flambage.
- Dans des conditions d'asepsie remplier un flacon stérile de 500 ml.
- Transporter l'échantillon dans une glacière à 4°C.

III-4-2 Recherche et dénombrement des germes aérobies (ISO 4833)

- Laisser l'émulsion décanter pour obtenir la séparation des deux phases.
- Transférer dans deux boites de pétris 1 mL de la phase aqueuse.

- Ajouter 15 mL de la gélose PCA en surfusion.
- Mélanger soigneusement l'inoculum au milieu et le laisser se solidifier.
- Préparer également une boite témoin avec 15 mL du milieu PCA.
- Incuber les boites retournées dans une étuve à 30°C ± 1 °C pendant 72h.

Expression des résultats

Retenir les boites contenant plus de 10 colonies et moins de 300 colonies. Calculer le nombre N de microorganismes selon la formule suivante :

$$N = \frac{\sum C}{(n1 + 0{,}1n2)\ d}$$

∑C : est la somme des colonies comptées sur toutes les boites retenues.

n_1 : est le nombre de boites retenues à la première dilution.

n_2 : est le nombre de boites retenues à la seconde dilution.

d : est le taux de dilution correspondant à la première dilution retenue.

III-4-3 Recherche et dénombrement des coliformes fécaux (ISO 7251)

- Transférer dans deux boites de pétris 1 mL de la phase aqueuse.
- Ajouter 15 mL de la gélose au désoxycholate en surfusion.
- Mélanger soigneusement l'inoculum au milieu et laisser se solidifier.
- Ajouter une deuxième couche et laissez solidifier.
- Préparer également une boite témoin avec 15 mL du milieu désoxycholate.
- Incuber les boites retournées dans une étuve à 44°C ± 1 °C pendant 72h.

Expression des résultats

Les résultats sont exprimés par présence ou absence de colonies.

La figure N°12 représente le schéma de la recherche des coliformes fécaux dans le produit intermédiaire

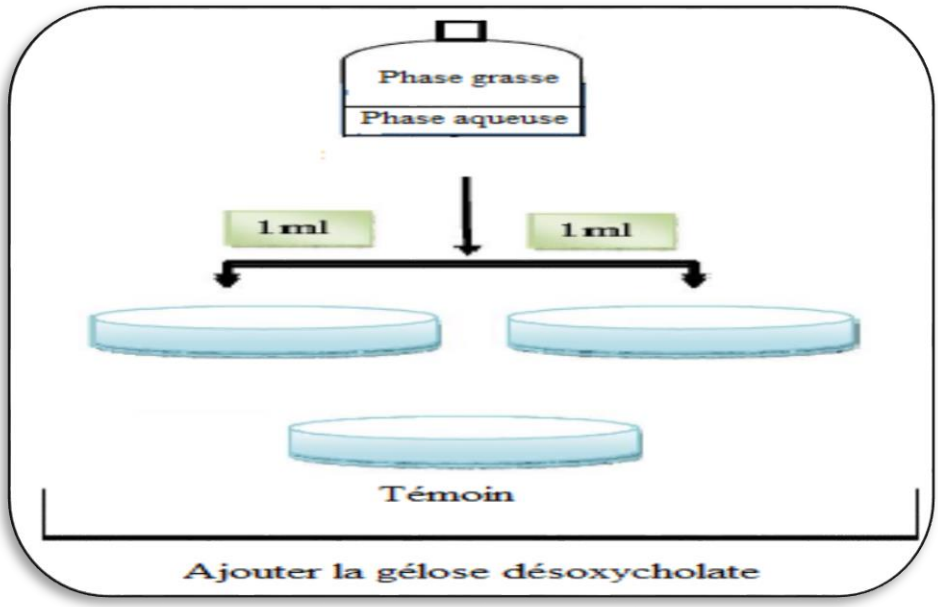

Figure N°12 : Schéma de la recherche des coliformes fécaux dans l'émulsion

III-4-4 Recherche et dénombrement de S*taphylococcus aureus* (ISO 6888-1/2003)

- Couler sur deux boites de pétri stérile la gélose de Bard Parker (figure N° 13).
- Apres solidification, transférer 1 mL de la phase aqueuse et l'étaler sur la surface de la gélose avec râteau étaleur.
- Préparer une boite témoin de milieu Bard Parker pour contrôler sa stérilité.
- Incuber les boites retournées dans une étuve à 37°C dans une étuve pendant 48h.

Aspect des colonies

Les colonies caractéristiques sont noires ou grises, brillantes, convexe et entourées d'une auréole d'éclaircissement après 24 heures d'incubation.

Expression des résultats

Retenir les boites de pétri contenant moins de 150 colonies. Le nombre de Staphylocoques est donné par la formule suivante :

$$N = \frac{\sum a}{V(n1 + 0{,}1n2)d}$$

N : nombre de colonies.

$\sum a$: est la somme des colonies de staphylocoques à coagulase positive identifiées sur les boites retenues.

V : est le volume étalé sur chaque série de trois boites.

n1 : est le nombre de boites retenues à la première dilution

n2 : est le nombre de boites retenues à la seconde dilution.

d : est le taux de dilution correspondant à la première dilution retenue.

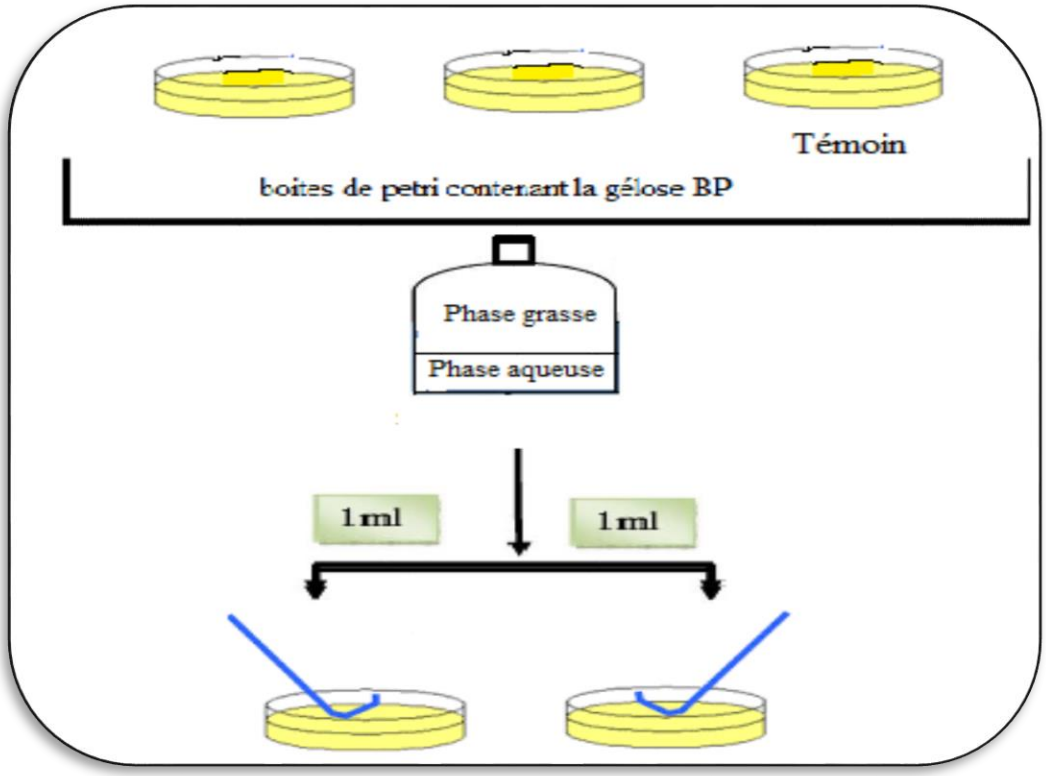

Figure N°13 : schéma de la recherche des S*taphylococcus aureus* dans l'émulsion

III-4-5 Recherche et dénombrement des levures (ISO 21579-2)

- Transférer dans deux boites de pétris 1 mL de la phase aqueuse.
- Ajouter 15 mL de la gélose glucosée à l'oxytétracycline (OGA) en surfusion (voir annexe 3).
- Mélanger soigneusement l'inoculum au milieu et laisser se solidifier.

- Préparer également une boite témoin avec 15 mL du milieu OGA pour contrôler sa stérilité.
- Incuber les boites retournées dans une étuve à 25°C ± 1 °C, pendant 5jours.

Expression des résultats

Le nombre de levure est calculé par la formule suivante :

$$N = \frac{\sum C}{(n1 + 0{,}1n2)}$$

$\sum C$: est la somme des colonies caractéristiques comptées sur toutes les boites retenues.

n_1 : est le nombre de boites retenues à la première dilution.

n_2 : est le nombre de boites retenues à la seconde dilution.

d : est le taux de dilution correspondant à la première dilution retenue.

III-5 Analyse microbiologique du produit fini

III-5-1 Echantillonnage

- Prélever 05 barquettes de 400 g à partir de la chaine de production de manière aléatoire

III-5-2 Préparation de la solution mère (ISO 6887-4/2003)

- Mettre dans un flacon stérile 50 g de margarine et ajouter 36 mL de solution de Ringer (voir annexe 5).
- Mettre le flacon dans un bain marie à 44°C pendant 15 min.
- Agiter le mélange (phase grasse et phase aqueuse) dans le but de faire un lavage.
- Laisser décanter les deux phases.

III-5-3 Recherche et dénombrement des germes aérobies (ISO 4833)

La recherche des germes aérobies s'effectuée suivant la méthode mentionnée ci-dessus (voir : III-4 Analyses microbiologiques de l'émulsion avant pasteurisation).

III-5-4 Recherche et dénombrement des coliformes fécaux (ISO 7251)

La recherche des coliformes fécaux s'effectuée suivant la méthode mentionnée ci-dessus (voir : III-4 Analyses microbiologiques de l'émulsion avant pasteurisation).

III-5-5 Recherche et dénombrement des levures (ISO 21579-2)

La recherche des levures dans le produit fini s'effectuée suivant la méthode mentionnée ci-dessus (voir : III-4 Analyses microbiologiques de l'émulsion avant pasteurisation).

III-5-6 Recherche des salmonelles (ISO 6579/2002)

a- Pré-enrichissement en milieu non sélectif liquide

- Ensemencer 25g de margarine dans 225 mL d'eau peptonée tamponnée puis incuber pendant 18h ± 2h à 37 °C ± 1 °C.

b-Enrichissement sélectif

- Transférer 0.1 mL de culture obtenue dans le pré-enrichissement, dans un tube contenant 10 mL de bouillon Rappaport-Vassiliadis Soja (RVS) et 1 ml dans 10 mL de bouillon de Muller-Kauffmann au Tétrathionate-Novobiocine (MKTTn), puis incuber respectivement à 41,5 °C ± 1 °C et à 37 °C ± 1 °C pendant 24 h ± 3 h.

c-Isolement et identification

- A partir des cultures obtenues dans le milieu RVS, ensemencer avec une anse, la surface d'une boite de pétri du milieu d'isolement la gélose Xylose-Lysine-Désoxycholate (XLD).
- Opérer de même avec le deuxième milieu d'isolement, Salmonella-Shigella (SS).
- Répéter l'opération décrite ci-dessus, pour la culture obtenue dans le milieu MKTTn.
- Incuber le tout à 37 °C ± 1 °C pendant 24 h ± 3 h.

d-Confirmation

Il convient de soumettre toute colonie suspecte à une confirmation. Prélever à partir de chaque boite de chacun des milieux sélectifs les colonies considérées comme typiques. Ensemencer les colonies sélectionnées sur la surface des boites de gélose nutritive.

Incuber les boites ainsi ensemencées à 37 °C ± 1 °C durant 24 h ± 3h en vue d'une confirmation biochimique et sérologique.

Pour une confirmation définitive, les souches considérées comme étant des salmonelles doivent être envoyées à un centre agrée.

Résultats et discussions

I Résultats d'analyses microbiologiques de la poudre de lait

Les résultats de l'analyse microbiologique de la poudre de lait sont donnés dans le tableau V.

I-1 Dénombrement de germes aérobies

Les germes aérobies sont l'ensemble des microorganismes aptes à se multiplier à l'aire, ayant un intervalle température de croissance situé entre 25 et 45C°. Cet ensemble englobe les microorganismes pathogènes et les microorganismes d'altération **(Huss, 1988)**.

Les résultats du dénombrement des germes aérobies dans la poudre de lait montrent que la charge microbiologique de l'échantillon est de 175 UFC/g, inferieur à la limite maximale de la norme qui est de 2. 10^5 UFC/g.

I-2 Recherche et dénombrement des coliformes totaux

Les coliformes sont des bacilles Gram négatif non sporulée, aérobie facultative capable de se multiplier en présence de sels biliaires et de fermenter le lactose à 44°C avec production d'acide et de gaz. Ce sont des entérobactéries moyennement acidifiantes (pH=5) **(Delarras, 2010)**.

Les résultats du dénombrement des coliformes dans la poudre de lait montrant que la charge microbiologique de l'échantillon est de 0 UFC /g, inferieur limite maximale de norme qui est de 10 UFC/g.

I-3 Recherche et dénombrement des Clostridium solfito-réducteurs

Les Clostridium sulfito-réducteur regroupent des espèces telles que *Clostridium perfringens et Clostridium Bifermentans* ; Ils sont ainsi dénommés car ils sont capables de réduire les sulfites présente dans le milieu de culture en sulfures ; ceux-ci se combinent avec un sel de fer pour donner du de sulfure de fer noir. Les colonies noir entourées d'un halo noir sont caractéristiques de bactéries sulfito-réductrices **(Delarras, 2010)**.

Les résultats du dénombrement des Clostridium solfito-réducteur dans la poudre de lait montrent que la charge microbiologique de l'échantillon est de 0 UFC/g, inférieur à la limite maximale de la norme qui est de 10 UFC/g.

I-4 Recherche et dénombrement des salmonelles

Les salmonelles sont des bâtonnets à Gram négatif, asporulantes, aéro-anaérobies

facultatives et mobiles. Elles sont pathogènes pour l'homme et il est important d'éviter la présence de salmonelles dans l'alimentation humaine et animale **(Huss, 1988)**.

Les résultats de la recherche et dénombrement des salmonelles montrent leur absence dans la poudre de lait analysée (tableau IV).

Tableau IV : les résultats de l'analyse microbiologique de la poudre du lait

Désignation	Unité	Ech 1	Ech 2	Ech 3	Ech4	Ech 5	Normes	Méthode d'essai
Germes aérobies à 30°C	UFC/g	175	-	-	-	-	2.10^5	**ISO 6610**
Coliformes totaux	UFC/g	0	-	-	-	-	10	**ISO 4832**
Clostridium sulfito-réducteurs à 46°C	UFC/g	0	0	0	0	0	10	**ISO 15213**
Salmonelles	UFC/30g	Absence					Absence	**ISO 6785**

I-5 Conclusion

D'après les résultats des analyses microbiologiques effectuées, la poudre de lait utilisée pour la fabrication de la margarine Matina est d'une qualité microbiologique satisfaisante.

II Résultats d'analyse microbiologique de l'eau osmosée

II-1 Recherche et dénombrement d'*E. coli*

C'est une bactérie qui appartient à la famille des entérobactéries, Gram négatif, lactose positif et gazogène. Réalisant une fermentation acide mixte elle produit de l'indole. C'est un hôte normal de l'intestin de l'homme et des animaux **(Guiraud, 1998)**.

Les résultats de la recherche et dénombrement d'*E. coli* montrent leur absence dans l'eau analysée.

II-2 Recherche et dénombrement des Entérocoques

Les entérocoques comprennent entre autres *Enterococcus faecalis* et *Enterococcus faecium*, les deux espèces les plus fréquentes chez l'homme. Elles font partie de la flore commensale de la muqueuse intestinale et sont de ce fait souvent appelés streptocoques fécaux **(Yernault et Demedts ,1997)**.

Les résultats de la recherche et dénombrement des entérocoques montrent leur absence

dans l'eau analysée.

II-3 Recherche et dénombrement des Clostridium sulfito-réducteurs

Les résultats de la recherche et dénombrement des Clostridium sulfito-réducteurs montrent leur absence dans l'eau analysée (tableau V).

Tableau V : résultats de l'analyse microbiologique de l'eau osmosée

Désignation	Unité	Résultats	Norme	Méthode d'essai
E. coli	UFC/100 mL	Absence	Absence	**ISO : 9308-1**
Entérocoques	UFC/100 mL	Absence	Absence	**ISO : 7899-2**
Clostridium sulfito-réducteurs	UFC/100 mL	Absence	Absence	**ISO : 15213**

II-4 Conclusion

D'après les résultats des analyses microbiologiques effectuées, l'eau utilisée pour la fabrication de la margarine Matina est de qualité microbiologique satisfaisante.

III Résultats d'analyses microbiologiques du lait reconstitué pasteurisé

Les résultats de l'analyse microbiologique du lait reconstitué pasteurisé sont donnés dans le tableau VII.

III-1 Recherche et dénombrement des germes aérobies

Les résultats du dénombrement des germes aérobies dans le lait reconstitué pasteurisé montrent que la charge microbiologique de l'échantillon est de 93 UFC/mL, inferieur à la limite maximale de la norme qui est de 3. 10^4 UFC/mL.

III-2 Recherche et dénombrement des coliformes totaux

Les résultats obtenus montrent l'absence de coliformes totaux dans le lait reconstitué pasteurisé. La limite maximale fixée par la norme est inférieur à 1 UFC/mL.

III-3 Recherche et dénombrement des coliformes fécaux

Les résultats du dénombrement des coliformes fécaux dans le lait reconstitué pasteurisé montrent l'absence de ces germes dans l'échantillon analysé.

III-4 Recherche et dénombrement de *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus sont des cocci à Gram positifs qui tendent à se grouper en amas et aéro-anaérobie facultative. Tiennent une place très importante dans l'infection

communautaire et nosocomiale. Elle est cultivable facilement sur les milieux usuels et sur des milieux riches en NaCl. Toutes les souches sont à coagulase positive et quelques-unes sont capables de produire des entérotoxines **(Huss, 1988)**.

Les résultats du dénombrement de *Staphylococcus aureus* dans le lait reconstitué pasteurisé montrent que la charge microbienne de l'échantillon est inférieure à 1 UFC/mL. Ces résultats sont en adéquation avec la norme qui fixe la charge microbienne à 1 UFC/mL.

Tableau VI : résultats de l'analyse microbiologique du lait reconstitué pasteurisé

Désignation	Unité	Résultats	Normes	Méthode d'essai
Germes aérobies à 30°C	UFC/ml	93	3.10^4	**ISO 6610**
Coliformes totaux	UFC/ml	0	1	**ISO 4832**
Coliformes fécaux	UFC/ml	Absence	Absence	**ISO 4832**
Staphylococcus Aureus	UFC/ml	0	1	**ISO 6888**

III-5 Conclusion

D'après les résultats des analyses microbiologiques effectuées, le lait reconstitué pasteurisé utilisé pour la fabrication de la margarine Matina est de qualité microbiologique satisfaisante.

IV Résultat de l'analyse microbiologique de l'émulsion avant pasteurisation

IV-1 Recherche et dénombrement des germes aérobies

Les résultats du dénombrement des germes aérobies dans le produit intermédiaire montrent que la charge microbienne des 05 échantillons est de 02, 00, 05, 01, et 03 UFC/g, inférieur à la limite maximale de la norme qui est de 10^2 UFC/g.

IV-2 Recherche et dénombrement des coliformes fécaux

Les résultats du dénombrement des coliformes fécaux dans le produit intermédiaire montrent leur absence dans les 05 échantillons, ce qui répond à l'exigence de la norme.

IV-3 Recherche et dénombrement des S*taphylococcus aureus*

Les résultats du dénombrement des *Staphylococcus aureus* dans le produit fini montrent que leur charge microbienne est inférieure à la limite maximale de la norme qui est de 10 UFC/g.

IV-4 Recherche et dénombrement des levures

Les levures sont des microorganismes hétérotrophes, ont un métabolisme exclusivement oxydatif ou bien un métabolisme mixte, oxydatif et fermentaire. Elles sont aérobies et celles qui possèdent un métabolisme fermentaire ne peuvent se développer en anaérobiose stricte qu'en présence d'ergostérol et d'acide oléique (tween 80). Elles sont généralement acidophiles et mésophiles et à des températures optimales voisines de 25-28°C **(Guiraud 1998)**.

Les résultats du dénombrement des levures dans le produit intermédiaire montrent que leur charge microbienne est inférieure à la limite maximale de la norme qui est de 10 UFC/g.

IV-5 Recherche et dénombrement de *Salmonella*

Les résultats du dénombrement de *Salmonella* dans le produit intermédiaire montrent leur absence dans l'échantillon analysé.

Tableau VII : résultats de l'analyse microbiologique de l'émulsion avant pasteurisation

Désignation	Unité	Ech1	Ech2	Ech3	Ech4	Ech5	Normes	Méthode d'essai
Germes aérobies	UFC/g	02	00	05	01	03	10^2	**ISO 4833**
Coliformes fécaux	UFC/g	Absence	Absence	Absence	Absence	Absence	Absence	**ISO 7251**
Staphylococcus aureus	UFC/g	<10	<10	<10	<10	<10	10	**ISO 6888-1**
Levures	UFC/g	<10	<10	<10	<10	<10	10	**ISO 21527-2**
Salmonella	UFC/25g	Absence	Absence	Absence	Absence	Absence	Absence	**ISO : 6579**

IV-6 Conclusion

D'après les résultats des analyses microbiologiques effectuées l'émulsion est de qualité microbiologique satisfaisante selon la norme.

V Résultats de l'analyse microbiologique de produit fini (margarine Matina)

V-1 Recherche et dénombrement des germes aérobies

Les résultats du dénombrement des germes aérobies dans le produit fini montrent que la charge microbienne des 05 échantillons est de 12, 19, 03, 07, et 21 UFC/g, inférieur à la limite maximale de la norme qui est de 10^2 UFC/g.

V-2 Recherche et dénombrement des coliformes fécaux

Les résultats du dénombrement des coliformes fécaux dans le produit fini montrent leur absence dans les 05 échantillons, ce qui répond à l'exigence de la norme.

V-3 Recherche et dénombrement des *Staphylococcus aureus*.

Les résultats du dénombrement des *Staphylococcus aureus* dans le produit fini montrent que leur charge microbienne est inférieure à la limite maximale de la norme qui est de 10 UFC/g.

V-4 Recherche et dénombrement des levures

Les résultats du dénombrement des levures dans le produit fini montrent que leur charge microbienne est inférieure à la limite maximale de la norme qui est de 10 UFC/g.

Tableau VIII résultats de l'analyse microbiologique du produit fini

Désignation	Unité	Ech1	Ech2	Ech3	Ech4	Ech5	Normes	Méthode d'essai
Germes aérobies	UFC/g	12	19	03	07	21	10^2	ISO : 4833
Coliformes fécaux	UFC/g	Absence	Absence	Absence	Absence	Absence	Absence	ISO : 7251
Staphylococcus aureus	UFC/g	<10	<10	<10	<10	<10	10	ISO : 6888-1
Levures	UFC/g	<10	<10	<10	<10	<10	10	ISO : 21527-2
Salmonelles	UFC/25g	Absence	Absence	Absence	Absence	Absence	Absence	ISO : 6579

V-5 Recherche et dénombrement des Salmonelles

Les résultats du dénombrement de salmonella dans le produit fini montrent leur absence ce qui répond à l'exigence de la norme.

V-6 Conclusion

D'après les résultats des analyses microbiologiques effectuées la margarine Matina est d'une qualité microbiologique satisfaisante selon les normes du JORA N° 35 du 1998.

Conclusion

Conclusion

L'étude et le suivi de l'évolution de la flore microbienne au cours du procédé de fabrication de la margarine « Matina », depuis les matières premières au produit fini, a été effectuée au niveau du laboratoire de microbiologie du complexe agroalimentaire de Cevital Bejaia.

Des analyses microbiologiques ont été réalisées sur la poudre de lait, l'eau osmosée, le lait reconstitué pasteurisé, l'émulsion avant pasteurisation et le produit fini après son conditionnement. L'analyse microbiologique concerne les germes aérobies, les coliformes totaux, les coliformes fécaux, les Entérocoques, les Clostridium sulfito-réducteurs, les Staphylocoques, les levures et les Salmonelles.

Les germes aérobies revivifiables à 30°C sont un bon indicateur de la qualité microbiologique. Les résultats de leurs dénombrements dans la poudre de lait et dans le lait reconstitué pasteurisé sont de 175 UFC/g et 93 UFC/mL, respectivement. Ces résultats montrent que la charge microbiologique des échantillons analysés est inférieure aux limites maximales fixées par la réglementation algérienne qui sont de 2. 10^5 UFC/g de poudre de lait et de 3. 10^4 UFC/mL de lait pasteurisé. De plus, l'émulsion et le produit fini ont une charge microbienne moyenne de germes aérobies de 02 UFC/g et 12 UFC/g, respectivement.

L'absence de coliformes totaux, coliformes fécaux et Entérocoques dans les échantillons analysés, qui sont des flores indicatrices de la qualité hygiénique des aliments et de l'eau, constitue une preuve de l'absence de contamination par les matières fécales au niveau de l'usine.

Les résultats obtenus montrent, aussi, l'absence de germes pathogènes dans tous les échantillons analysés.

De par ces résultats, cette étude montre une bonne stabilité microbiologique au cours du process de fabrication de « Matina », ce qui est le résultat de la maitrise du risque microbiologique, de la maitrise du procédé de fabrication et la maitrise des bonnes pratiques de fabrication au niveau de l'unité de production.

Références bibliographiques

A

- **Aboiron J ; et Hameury E. (2004).** Additifs alimentaires : Les lécithines. Université Paris Val de Marne, 31p.
- **Arellano M; Norton I.T. et Smith P. (2015)**. Specialty oils and fats in margarines and low-fat spreads. In: Specialty Oils and Fats in Food and Nutrition Properties, Processing and Applications. A volume in Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition. p241-270.

C

- **Cheftel J.C. et Cheftel H. (1977).** Introduction à la biochimie et à la technologie des aliments –vol 1.382p.
- **Cossut J; Humbert S; Defrenne B; Roelstraete L; Desmedtc; Vanuxeem M; Ferroul S; Vidal D. ET Garnets. (2002).** Les Corps Gras : Entre Tradition et Modernité, Institut Agro-alimentaire de Lille, Université des Sciences et Technologies de Lille, 140p.

D

- **Delarras C. (2010)**. Surveillance sanitaire et microbiologique des eaux : Réglementation - Microorganismes - Prélèvements – Analyses. 2em édition. Lavoisier, paris. ISBN : 978-2-7430-1211-3.

E

- **Fredot E. (2005)**. Connaissance des aliments. Ed : Tec &Doc Lavoisier. ISBN : 2743008105. 397p.

F

- **Faur L. (1992).** Transformation des corps gras à des fins alimentaires. In « Manuel des corps gras ». Tec et Doc-Lavoisier, Paris. 2 : 938, 948, 950, 954, 957-961, 980, 984. ISBN : 2-85206-662-9.
- **François R. (1974).** Les Industries des corps gras : Biochimie, extraction, raffinage, nuisances et réglementation (I.P.E., industries, productions, environnement). Diffusion Technique et documentation, Paris. P283-291.ISBN : 2880200075

H

- **Huss H. H. (1988**). Le poisson frais : qualité et altération de la qualité. Ed: Food & Agriculture Organization of the United Nations. ISBN: 92-5-202395.132p.
- **Himed L. et Barkat M. (2014).** Élaboration d'une nouvelle margarine additionnée des huiles essentielles de citrus limon. OCL, (2014) ; Vol 21, n°1, A102 (1-5).

I

- **ISO 6461/2-1986(F)** Qualité de l'eau **—** Recherche et dénombrement des spores de micro-organismes anaérobies sulfito-réducteurs (*Clostridia*).
- **ISO 6610 : 1992** Lait et produit laitiers **—** Dénombrement des unités formant colonie de micro-organismes **—** comptage des colonies à 30°C.
- **ISO 7899 -2 :2000(F)** Qualité de l'eau **—** Recherche et dénombrement des entérocoques intestinaux.
- **ISO 9308-1 :2000(F)** Qualité de l'eau **—** Recherche et dénombrement des *Escherichia Coli* et des bactéries coliformes.
- **ISO 6579 :2002** Microbiologie des aliments **—**.Méthode horizontale pour la recherche des Salmonella.
- **ISO 6887-4 :2003** Microbiologie des aliments **—**Préparation des échantillons de la suspension mère et des dilutions décimales en vue de l'examen microbiologique.

- **ISO 6888-1 :2003** Microbiologie des aliments —Méthode horizontale pour dénombrement des staphylocoques a coagulase positive (*Staphylococcus aureus* et autres espèces).
- **ISO 15213 :2003** Microbiologie des aliments — Méthodes horizontale pour le dénombrement des bactéries sulfito-réducteurs se développant en conditions anaérobies.
- **ISO 7251 :2005** Microbiologie des aliments — Méthode horizontale pour la recherche et le dénombrement d'*Escherichia coli* présumés.
- **ISO 4832 :2006** Microbiologie des aliments — Méthode horizontale pour le dénombrement des coliformes — Méthode par comptage des colonies.
- **ISO 19458 :2006(F)** Qualité de l'eau — Echantillonnage pour analyse microbiologique.
- **ISO 21579-2 :2008** Microbiologie des aliments — Méthodes horizontale pour la recherche et dénombrement des levures.
- **ISO 4833-2 : 2013** Microbiologie de la chaine alimentaire — Méthode horizontale pour le dénombrement des micro-organismes – Méthode par comptage des colonies à 30°C.

J

- **Guiraud J-P. (1998)**. Microbiologie Alimentaire. Ed : Dunod, Paris. ISBN : 2 10 007259 5. 615p.
- **Journal officiel de la République Algérienne (JORA) n°35 (1998).** Arrêté interministériel du 25 Ramadhan 1418 correspondant au 24 janvier 1998 modifiant complétant l'arrêté du 14 Safar 1415 correspondant au 23 juillet 1994 relatif aux spécifications microbiologiques de certaines denrées alimentaires.

K

- **Karleskind A. (1992).** Manuel des corps gras 2ème Edition : Lavoisier. ISBN : 2-85206-662-9
- **Kone S.** Fabrication artisanale de margarine. Infogate [en ligne]. (2001). p6. Disponible sur : http/www.gtz.de/gate/ (consulté le 22/05/2017).

O

- **O'Brien R. D. (2009).** Fats and oils: formulating and processing for applications. Ed: CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton London New York. ISBN-13:978-1-4200-6166-6
- **O'Keefe S. F. (2002).** Nomenclature and Classification of Lipids. In: Food Lipids: Chemistry, Nutrition, and Biotechnology.2ème ed. Marcel Dekker, Inc., New York.

V

- **Viereling E. (2008).** Aliments et boissons filières et produits. Edition : Biosciences et techniques 3éme édition, Paris, 277p.

Y

- **Yernault J-C. et Demedts M. (1997).** Infections respiratoires pour le spécialiste Ed : Garant. ISBN : 90-5350-502-4.456p.

Annexes

Milieu Baird-Parker (BP) (Guiraud, 1998)

Tryptone	10 g
Extrait de viande	5 g
Extrait de levure	1 g
Chlorure de lethium	5 g
Gélose	20 g
Sulphamézathine de sodium à 0,2% (facultatif)	25 ml
pH	7
Ajouter au moment de l'emploi à 100 mL de milieu en surfusion	
Glycocolle à 12%	10 ml
Tellurite de potassium à 1 %	1 ml
Pyruvate de sodium à 2à%	5 ml
Emulsion stérile de jaune d'œuf	5 ml

Gélose au désoxycholate (Guiraud, 1998)

Peptone	10g
Lactose	10g
Désoxycholate de sodium	0,5/1g
Chlorure de sodium	5 g
Citrate de sodium	1 g
Rouge neutre	30 mg
Gélose	12 g
pH	7,1

Gélose Oxytétracycline- Glucose (OGA) (Guiraud, 1998)

Extrait de levure	5 g
Glucose	20 g
Gélose	16 g
pH	7

Plat Count Agar (PCA) (Guiraud, 1998)

Tryptone	5g
Extrait de levure déshydraté	2,5g
Glucose anhydre	1,0g
Agar-agar	12g
Eau distillée	1000mL

Solution de Ringer (Guiraud, 1998)

Chlorure de sodium	9 g
Chlorure de potassium	0,42 g
Chlorure de calcium	0 ,48 g
Bicarbonate de sodium	0,2 g

Milieu Slanetz et Bartley SB (Guiraud, 1998)

Tryptose	20 g
Extrait de levure	5 g
Glucose	2 g
Phosphate disodique	4 g
Azide de sodium	0,4 g
Chlorure de tetrazolium(TTC)	0,1 g
Gélose	14 g
pH	7,2

Milieu Viande Foie (VF) (Guiraud, 1998)

Extrait viande-foie	30 g
Glucose	2 g
Amidon	2 g
Gélose	12 g
pH	7,6

Résumé

Notre étude effectuée au niveau de complexe Agro-alimentaire Cevital de Bejaia a pour but de suivre l'évolution de la flore microbienne au cours du process de fabrication de la margarine Matina. Pour ce faire des analyses microbiologiques sont effectuées pour les matières premières (poudre du lait, eau osmosée, lait reconstitué pasteurisé), le produit intermédiaire et le produit fini.

Les résultats de l'étude ont montré que les échantillons analysés répondent aux exigences règlementaires. En conclusion, la margarine Matina est de qualité microbiologique satisfaisante.

Abstract

Our study at the Cevital Agri-Food complex in Bejaia aims to monitor the evolution of the microbial flora during the process of manufacturing the Matina margarine. For this purpose, microbiological analyzes are carried out for raw materials (milk powder, osmosis water, pasteurized reconstituted milk), the intermediate product and the finished product.

The results of the study showed that the samples analyzed meet the regulatory requirements. In conclusion, Matina margarine is of satisfactory microbiological quality.