

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
Spécialité Microbiologie Appliquée



Réf :

Mémoire de fin de cycle
En vue de l'obtention de diplôme

MASTER

Thème

**L'Efficacité de traitement thermique UHT sur les
bactéries sporulées dans la poudre de lait**

Présenté par :

Laib Sihem & Mouloua Lydia

Soutenu le : **22 septembre 2021**

Devant le Jury composé de :

Mr AMIR N.

Mme BENACHOUR K.

Mme BENDALI F.

Mr BOUCHENOUA F.

MCB Président

MAA Promotrice

Pr Examinatrice

Invité

Année universitaire : 2020/2021

Dédicace

Je tiens tous d'abord à remercier le bon Dieu de m'avoir aidé à réaliser ce travail.

Je dédie ce travail :

À les plus chers du monde, mes parents, source de vie. Ma chère mère qui je ne trouve pas les mots pour s'exprimer et m'a toujours offert ses aides morales durant mes études. Mon cher père pour son aide et soutien, cette aventure n'aurait certainement pas existé sans vous. Que Dieu vous protège et vous prête bonne santé et longue vie.

À mes chères sœurs, qui ont toujours été là pour moi.

À mes chers frères, qui ont montré une totale disponibilité chaque sollicitation.

À toute personne qui occupe une place dans mon cœur.

À tous ceux qui ont participé à ma réussite.

À ma collègue Lydia, pour sa collaboration efficace.

À mes proches amies pour l'aide et disponibilité à chaque moment.

À tous mes enseignants de tous mon cursus.

Sihem

Dédicace

Je tiens tous d'abord à remercier le bon Dieu de m'avoir aidé à réaliser ce travail.

Je dédie ce travail :

À ma merveilleuse mère qui n'a jamais cessé de ménager ses efforts pour que je puisse finir mes études.

À mon chère père qui se montre patient et encouragement qui a été un grand réconfort pour moi.

À mes chère grands- parents

À mes chères sœurs, qui ont toujours été là pour moi.

À mes chers frères, qui ont montré une totale disponibilité chaque sollicitation.

À toute personne qui occupe une place dans mon cœur.

À tous ceux qui ont participé à ma réussite.

À ma collègue Sihem, pour sa collaboration efficace.

À mes proches amies pour l'aide et disponibilité à chaque moment.

À tous mes enseignants de tous mes cursus.

Lydia

Remerciements

Avant tout nous remercions le bon Dieu, le tout puissant qui nous aide et nous donne le courage de réaliser ce travail.

Nous tenons à exprimer nos sincères remerciements à notre promotrice Madame Benachour Karima pour toute l'aide et le soutien de tous les instants, pour son encadrement scientifique très formateur et de qualité, ainsi pour les conseil qui ont permis de nous faciliter le travail. Merci pour votre gentillesse. Merci pour tout.

Nous avons l'honneur et le plaisir d'exprimer notre gratitude à Monsieur Bouchencua Farouk Pour avoir accepté de nous encadrer au sein de l'entreprise Candia (tehin lait) et pour ses conseils, ses orientations et son soutien continu.

Un énorme merci à Monsieur Amir pour l'intérêt qu'il a porté à notre travail et pour avoir accepté de présider le jury.

Nos vifs remerciements vont également à Madame Bendali qui a bien voulu examiner ce modeste travail.

Un grand merci au personnel de laboratoire bactériologique de Candia pour tous les moments de travail passés au laboratoire et toute personne ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Enfin, nous tenons à exprimes remerciements à nos familles et tous nos amis. Merci pour votre compréhension.

Liste des abréviations

UHT : Ultra Haute température

SARL : Société A Responsabilité Limitée

MG : Matière Grasse

JORA : Journal Officiel de la République Algérienne

VRBG : Violet Red Bile Glucose Agar

PCA : Plate Count Agar

UFC : Unité Formant Colonie

P : produit

NE : Norme Enterprise.

DLC : Date limite de consommation.

Liste des figures

Figure 01 : Principe de séchage par le procédé des cylindres	04
Figure 02 : Procédé par pulvérisation du lait sec (SPRAY).....	05
Figure 03 : Température de destruction des spores et des formes végétatives	10
Figure 04 : Schéma général pour le dénombrement des spores dans la poudre de lait	14
Figure 05 : Schéma pour l'analyse microbiologique du produit fini (lait HUT)	15
Figure 06 : Colonies bactériennes observées sur milieu PCA.....	19
Figure 07 : Observation au microscope des cellules bactériennes obtenue sur milieu PCA à partir de la poudre de lait	19
Figure 08 : Résultats du test de catalase réalisé sur les cellules obtenues sur gélose PCA	20

Liste des tableaux

Tableau I : Traitement thermique des échantillons avant analyse **12**

Tableau II: Résultats de la recherche des spores dans la poudre de lait **17**

Sommaire

Introduction	01
--------------------	----

Partie 1 : synthèse bibliographique

I. Poudre de lait	03
1. Définition.....	03
2. Méthodes de fabrication.....	03
2.1. Séchage sur cylindres ou procédé « HATMAKER »	03
2.2. Séchage par pulvérisation « SPRAY ».....	04
3. Caractéristiques physico-chimiques	05
4. Caractéristiques microbiologiques	06
4.1. Microorganismes d'altération	06
4.2. Microorganismes pathogènes	06
II. Traitement thermique.....	06
1. Généralités	06
2. Types traitements thermiques	07
2.1. Pasteurisation	07
2.2. Stérilisation	07
2.3. Séchage	08
2.4. Concentration par évaporation	08
2.5. Réfrigération et congélation	08
III. Résistance des bactéries sporulées aérobies à la chaleur	08
1. Facteurs affectant la résistance des spores à la chaleur.....	09
2. Traitement thermique et les spores	09

Partie 2 : partie pratique

I. Matériel et méthodes	11
1. Objectif de l'étude	11

2. Echantillonnage	11
2.1 Poudre de lait	11
2.2. Produit fini.....	11
3. Analyses microbiologiques	11
3.1. Microorganismes recherchés dans la poudre de lait	12
3.2. Microorganismes recherchés dans le produit fini	15
4. Examen macroscopique et microscopique	16
4.2.Examen macroscopique	16
4.2. Examen microscopique	16
5. Test catalase	16
II. Résultats et discussion.....	17
1. Résultats	17
1.1. Analyse microbiologique.....	17
1.2. Examen macroscopique et microscopique	19
1.3. Test de catalase	20
2. Discussion.....	21
Conclusion.....	23

Références bibliographiques

Annexes

Le lait est le premier aliment de l'Homme. Il a le statut d'aliment universel de tous les temps et de tous les lieux, au moins pour la première partie de la vie de l'être Humain. En Algérie qui est un pays de tradition laitière, il occupe la deuxième place parmi les produits alimentaires. Il représente en moyenne 18,4% de la facture alimentaire totale par an (CNIS, 2013).

Les besoins algériens en lait et produits laitiers sont également considérables. Avec une consommation moyenne de 110 litres de lait par habitant et par an, l'élevage ne couvre même pas le tiers de cette consommation. La production laitière en Algérie régulièrement croissante depuis les années 80 est très faiblement intégrée à la production industrielle des laits et dérivés (Makhlouf et al., 2015).

La transformation du lait cru en lait en poudre augmente sa durée de vie et permet de conserver sa valeur nutritive et ses caractéristiques sensorielles pendant de longues périodes, même à température ambiante (Pal et al., 2016).

le lait constitue un milieu de croissance idéal pour une grande variété de microorganismes, y compris les bactéries, les levures et les moisissures (Sadiq et al., 2016).

La qualité microbiologique du lait en poudre s'explique généralement par les résultats des tests qui mesurent la conformité aux différentes normes réglementaires et aux spécifications du client (Pal et al., 2016).

Les bacilles formant des spores sont des contaminants majeurs dans les industries de transformation du lait. La présence d'un nombre élevé de spores réduit la valeur du lait en poudre et elle est considérée comme une absence de bonnes pratiques de fabrication et une mauvaise hygiène d'industrie laitière (Sadiq et al., 2016).

Le traitement thermique UHT consiste à éliminer les formes sporulées qui résistent après le procédé de fabrication de la poudre de lait.

L'objectif général de cette étude est l'évaluation de l'efficacité de traitement thermique UHT sur les formes de résistances (spores) qui existe dans la poudre de lait.

Ce présent travail est subdivisé en trois parties :

- Une synthèse bibliographique sur la poudre de lait et traitement thermique.

- Méthodologie du travail, dans laquelle le matériel et les méthodes mises en place pour le protocole expérimental sont décrits.
- Discussion des différents résultats obtenus.

Partie 1

Synthèse bibliographique

I. Poudre de lait

1. Définition

Le lait en poudre appelé aussi lait sec ou lait déshydraté, est un produit de texture solide issu de l'élimination partielle de l'eau du lait cru et l'évaporation autant que possible et le lait devient poudre. Il existe trois types de lait en poudre : entier, partiellement écrémé et totalement écrémé. Le lait en poudre est le produit obtenu par la dessiccation de lait entier ou lait écrémé ou de lait partiellement écrémé propre à la consommation Humaine. Il peut aussi être sucré ou contenir des additifs (la vitamine D), la teneur finale en eau n'excède pas 5% en poids de produit fini. Cette déshydratation permet au lait en poudre de se conservé à température ambiante, 3 ans pour la poudre de lait écrémé et 6 mois maximum pour la poudre de lait entier (**Arie et al., 2012**).

Le lait en poudre est une réserve utilisée lorsque les approvisionnements deviennent insuffisants. L'élimination presque de la totalité de l'eau du lait (environ 87%) donne un produit compact concentré facile à transporter et à stocker mise à part qu'il est produit à réaliser l'économie de transport et des coûts liés à la réduction du volume et du poids. Le lait sec ne permet pas le développement microbien, et il peut être conservé pendant des longues périodes et donne du lait reconstitué par simple adjonction d'eau (**Arie et al., 2012**).

2. Méthodes de fabrication

Le but de fabrication de la poudre de lait est d'éliminer l'eau et d'inhibe le développement microbien. Il existe deux méthodes de fabrication de ce type de lait (**Vignola, 2002**).

2.1. Séchage sur cylindres ou procédé « HATMAKER »

Cette appareil de séchage contient deux cylindres rapprochés, chauffés intérieurement par de la vapeur (130-150°C) et tournant lentement en sens inverse (figure 01).Le lait circule entre les deuxcylindres et se répartit uniformément sur leur surface. Le séchage est rapide, le lait formant un film qui est détaché par un couteau racleur. La vapeur d'eau formée est aspirée par une hotte placée au-dessus des cylindres (**Kons, 1995**).

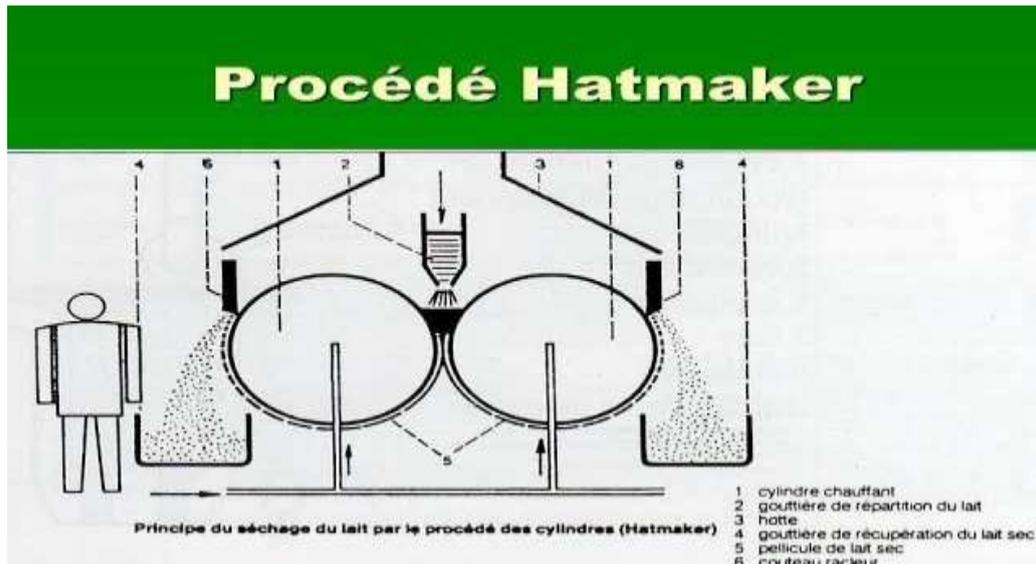


Figure 01 : Principe de séchage par le procédé des cylindres (Veisseyre, 1979).

Le traitement thermique brutal provoque des modifications sensibles de la structure physico-chimique du produit. Les appareils à cylindres rendent encore de grands services dans la préparation de certaines poudres entrant dans les aliments du bétail ou à usage industriel (Kons, 1995).

2.2. Séchage par pulvérisation « SPRAY »

La concentration de lait par évaporation dans un concentrateur à film tombant à effets multiples avant d'être séché dans une tour d'atomisation. Après, le lait concentré peut subir le traitement d'homogénéisation et traitements thermiques. Le lait concentré (50 - 60% de Matière Sèche) est introduit au sommet de la tour d'atomisation. Le lait est atomisé (transformé en aérosol ou brouillard) au moyen d'une turbine d'atomisation ou par injection à haute pression à travers de buses. Les petites gouttes liquides formées sont entraînées et déshydratées par un courant d'air chaud. Les gouttelettes sont séchées en une poudre sèche avant de tomber sur les parois inférieures de l'appareil. La séparation poudre - air humide est obtenue à l'aide de séparateurs cyclones (figure 02) (Kons, 1995).

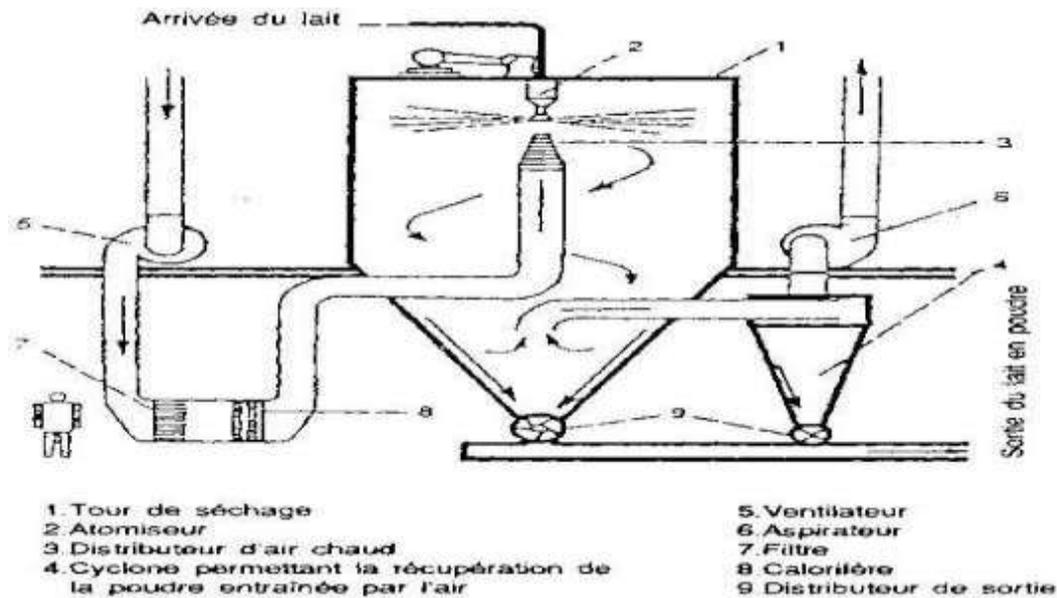


Figure 02: Procédé par pulvérisation du lait sec (SPRAY) (Kons, 1995).

La déshydratation dans la tour d'atomisation ne doit pas être totale (6 à 14% d'humidité résiduelle). Cette humidité permet une agglomération limitée des particules qui conduit à la formation de granulés à structure poreuse. Elle est terminée dans des dispositifs complémentaires de type sécheurs à lit fluidisé. A la fin la poudre est refroidie (Kons, 1995).

La différence entre les deux méthodes, la poudre obtenue par le procédé des cylindres a une consistance en paillette, une couleur plus ou moins jaune, le lactose y est à l'état cristallin, la caramélisation et le brunissement non enzymatique sont avancées. Et le procédé par pulvérisation, la poudre est moins jaune que la première méthode et le lactose est amorphe (Kons, 1995).

3. Caractéristiques physico-chimiques

Les qualités physicochimiques et biochimiques des poudres de lait dépendent essentiellement des paramètres technologiques utilisés pour les produire. La qualité nutritionnelle dépend principalement de l'intensité des différents traitements thermiques au cours du procédé de fabrication. Les traitements thermiques provoquent des changements physico-chimiques qui tendent à diminuer la disponibilité des nutriments (destruction de vitamines, diminution de la dénaturation des protéines solubles) ou à produire des composés d'intérêt nutritionnel tel que le lactulose. Les poudres issues par pulvérisation sont plus riches que celles obtenues sur cylindres chauffants d'un point de vue nutritionnel (Jeant *et al.*, 2008).

4. Caractéristiques microbiologiques

Les caractéristiques microbiologiques des poudres dépendent principalement de la qualité initiale du produit et de la nature des procédés technologiques. Les traitements technologiques sont traitement thermique, bactofugation, microfiltration, subits par le produit avant séchage, conditionnent la qualité microbiologique de la poudre. Durant le séchage, une partie de la flore initiale est détruite. Une autre partie n'est qu'inactivée par le stress thermique (**Jeant et al., 2008**).

La poudre obtenue par atomisation constitue un produit plus variable d'un point de vue bactériologique (**Crossley, 1945**).

Les laits en poudres Hatmaker, le préchauffage ou la pasteurisation et le séchage sur les cylindres rotatifs chauffés intérieurement par la vapeur à 150°C, détruisent tous les microorganismes sauf les spores (**AFNOR, 1994**).

4.1. Microorganismes d'altération

Les microorganismes lipolytiques sont responsables du rancissement de la matière grasse des laits en poudre. Ce rancissement est lié à l'apparition de composés d'odeurs désagréables (acides, aldéhydes, cétones) issues de l'hydrolyse de la matière lipidique. Parmi ces microorganismes, les microcoques, *Bacillus*, les levures (*Candida*) et les moisissures (*Aspergillus, Penicillium...*)(**Bourgeois et Leveau, 1991**).

4.2. Microorganismes pathogènes

Les bactéries pathogènes telle que les Salmonelles, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*, ont un intérêt majeur dans la poudre de lait. Ces micro-organismes ne se développent pas dans la poudre, mais ils restent nombreux pour de longues durées de temps et peuvent se développer lorsque la poudre est reconstituée et conservée à température favorable (**Azza et al., 2010**).

II. Traitement thermique

1. Généralités

Les techniques thermiques de destruction des micro-organismes sont très largement utilisées dans l'agroalimentaire. La connaissance des modalités de cette destruction est importante afin d'avoir une meilleure maîtrise des risques, généralement des traitements

thermiques à température peu élevée (de l'ordre de 80°C à 100°C) suffisent à détruire des micro-organismes sous leur forme végétative. Le produit peut néanmoins contenir encore des micro-organismes sous forme sporulée, susceptible de donner de nouveau des formes végétatives (**Stumboet al ., 1975**)

Ces traitements ont pour objectif de détruire totalement les germes pathogènes susceptibles d'être présents dans le lait. Ces traitements seront d'autant plus efficaces que la qualité microbiologique du lait au stade de la production aura été bien maîtrisée (**Debry et al., 2001**). Il s'agit de la stérilisation, de la pasteurisation, du séchage, de la concentration par évaporation et enfin de la réfrigération et de la congélation (**Bazinet et al.,2002**).

2. Types traitements thermiques

2.1. Pasteurisation

Le lait pasteurisé est un lait dont le traitement thermique peut varier (oscillant entre 15-20 secondes / 72 à 85 °C) mais qui doit toujours présenter un test négatif à la phosphatase alcaline. Cependant, le lait pasteurisé contient toujours une flore résiduelle dont le développement doit être empêché en réfrigérant le lait immédiatement et rapidement, après chauffage, à une température comprise entre 2 et 4 °C puis conservé à cette température jusqu'à sa consommation. Il se conserve entre sept et 15 jours au frais et il doit être consommé deux à trois jours après l'ouverture(**Ayerbe, 2001**).

2.2. Stérilisation

C'est un traitement utilisé pour détruire tous les microorganismes du lait. Le lait est chauffé pendant dix à 20 minutes, à 115-120°C, directement dans sa bouteille hermétiquement fermée. Ce type de traitement peut avoir un impact sur la qualité organoleptique : le lait brunit légèrement et peut avoir un léger goût de caramel. La destruction de la flore est totale (**Elsevier, 2012**).

➤ Stérilisation à ultra-haute température (UHT)

Le traitement UHT est le chauffage du lait en écoulement continu au dessus de 135°C, à l'avantage de détruire rapidement les microorganismes tout en minimisant les modifications des constituants du lait. Le lait est chauffé à 135-140 °C pendant deux à quatre secondes, puis conditionné dans un emballage stérile. Ce type de traitement permet de ne pas altérer les qualités organoleptiques du lait. D'une manière générale, les hautes températures appliquées pendant un temps très court ont un effet plus puissant sur la destruction des microorganismes et des enzymes que sur les modifications des constituants du lait, ce qui justifie l'intérêt des

traitements UHT. De plus, en assurant une montée en température et un refroidissement rapides, les procédés UHT évitent les effets cumulatifs des traitements thermiques et réduisent ainsi les modifications physicochimiques du lait (**Odet et al., 1988**).

2.3. Séchage

Le séchage de lait ou des différents effluents laitiers (concentrat de protéines du lactosérum (CPL 35%, CPL 55%, lactosérum, etc.) consiste à chauffer le produit dans les conditions contrôlées afin d'évaporer la majorité de l'eau qu'il contient. Il se produit deux phénomènes simultanés : le transfert de chaleur qui apporte l'énergie nécessaire à la transformation de l'eau en vapeur et le transfert de vapeur d'eau dans le produit laitier (**Bazinet et al., 2002**).

2.4. Concentration par évaporation

La concentration par évaporation est un procédé qui consiste à retirer, par ébullition, de l'eau d'un produit laitier liquide. Dans l'industrie, on chauffe le produit avec de la vapeur dans un échangeur de chaleur puis on l'envoie dans une enceinte ; cette dernière peut être sous vide pour que l'ébullition se produise à une température qui, dans certains cas, est bien inférieure à 100 °C (**Bazinet et al., 2002**).

2.5. Réfrigération et congélation

La réfrigération et la congélation sont des procédés qui consistent à abaisser la température d'un produit. La différence entre ces deux procédés est que dans la congélation, il y a formation de cristaux de glace à l'intérieur de l'aliment.

La réfrigération a pour but de refroidir le produit alimentaire jusqu'à une température comprise entre -1,5 et 8°C. Ce refroidissement ralentit la croissance des microorganismes et la vitesse des changements biochimiques des aliments frais ou transformés. La congélation est un moyen de choix pour la conservation à long terme de nombreux aliments, car en dessous de -10°C, aucun microorganisme n'est capable de se développer et aux températures d'entreposage pratiquées dans le domaine alimentaire (-18°C), la vitesse des réactions chimiques est fortement abaissée (**Bazinet et al., 2002**).

III. Résistance des bactéries sporulées aérobies à la chaleur

La production des spores résistantes à la chaleur est une stratégie de survie pour de nombreux bacilles et genre apparentés. Les spores produits par certaines espèces bactériennes

ont le potentiel de rester dans un état de dormance pendant des années (**Sadiq et al., 2016**).

La présence de spores bactériennes n'implique pas toujours leur persistance en raison de leur capacité à survivre à tous traitements thermiques pendant le traitement. Les spores sont omniprésentes dans la nature et peut contaminer les produits lorsque des déficiences surviennent dans le stérilisation du matériel d'emballage pendant le remplissage (**Scheldeman et al., 2006**).

1. Facteurs affectant la résistance des spores à la chaleur

La résistance à la chaleur des spores bactérienne dépend fortement de la nature et composition des aliments, temps et température de sporulation, période de stockage des spores après maturation, méthode de traitement thermique, et conditions d'incubation après traitement thermique (**Baril et al., 2012**).

La sporulation à des températures plus élevées produit des spores avec une résistance élevée à la chaleur. Les spores des bactéries thermophiles sont plus résistantes à la chaleur que les spores bactéries mésophiles qui sont relativement plus résistant à la chaleur que les spores de bactéries psychrotrophes. (**Nicholson et al., 2000**).

La composition du fluide chauffant (présence de protéines, de lactose et de minéraux comme le calcium et le phosphore) et son pH affecte également la résistance à la chaleur des spores (**Iciek et al., 2006**).

2. Traitement thermique et les spores

Le traitement thermique est caractérisé par le couple temps/température. Les premiers travaux de thermo- résistance microbiologique se sont focalisés sur l'expression de la réponse des microorganismes. L'expression de la cinétique de destruction en base décimale a permis d'introduire le terme de "durée de réduction décimale". Cette durée, appelée D, correspond au temps nécessaire (en minutes) pour réduire la population d'un facteur 10, à une température donnée (**Katzin et al., 1943**).

Les traitements thermiques que subissent les produits au cours de procédé de fabrication vont inactiver les formes végétatives (quelque minute à 80 °C suffisent) (**Irudayaraj, 2001**).

Il peut être un traitement d'inactivation, comme une stérilisation ou pasteurisation, ou bien cuisson. Ces traitements peuvent être de 15 à 30 minutes à 60- 65°C pour une pasteurisation

basse à un traitement équivalent, à plusieurs minutes à 121.1°C pour les produits en conserves ou les produits UHT (ultra haute température)(Figure 03)(Bazinet *et al.* , 2011).

Le traitement par chauffage à 130°C–150°C pendant 1 à 2 secondes dans un stérilisateur est très sporicide (Galesloot, 1957).

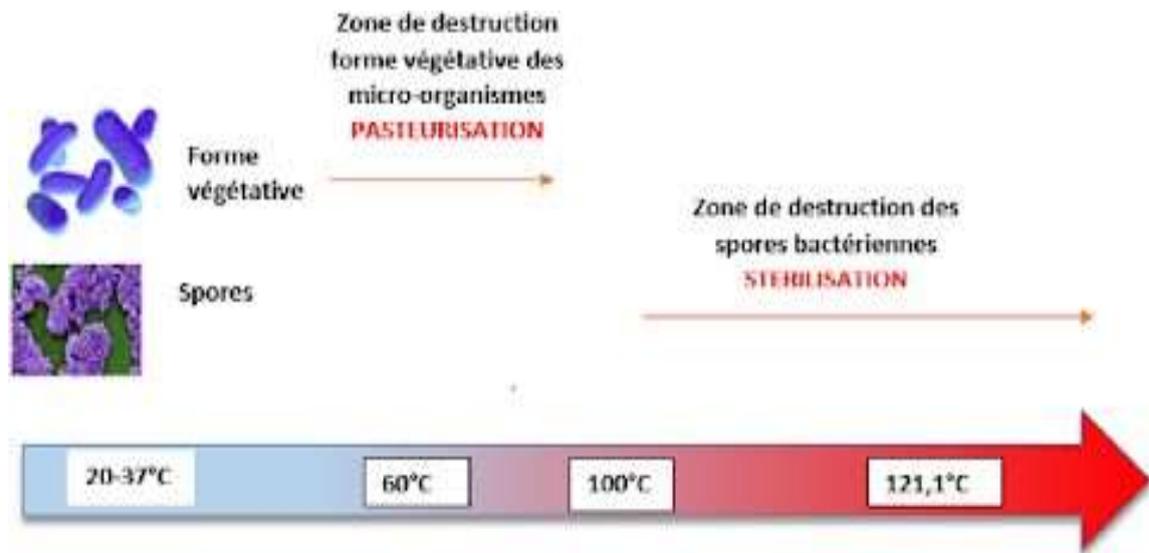


Figure 03 : Température de destruction des spores et des formes végétatives

Partie 2

Partie pratique

1. Matériel et méthodes

1. Objectif de l'étude

Le lait en poudre est un produit très riche en éléments nutritifs qui peuvent favoriser la croissance de divers micro-organismes surtout dans le cas où l'hygiène et les conditions de fabrication, ainsi que celles du conditionnement ne sont pas respectées. C'est pour cette raison qu'on réalise des analyses de contrôle de la qualité de la poudre du lait avant la reconstitution.

Le but de ce travail, réalisé à la laiterie Tchén-lait CANDIA pendant une durée de 45 jours, est l'étude de l'efficacité de traitement thermique UHT sur les spores (mésophiles et thermophiles) existants dans la poudre de lait.

2. Echantillonnage

L'échantillonnage est variable selon le but de la recherche effectuée et selon la nature du produit. Dans le cas où un plan à 2 ou à 3 classes est appliqué, chaque prélèvement doit être constitué au moins de 5 échantillons ($n=5$) pour s'assurer que le produit est dans les normes. (**Guiraud et Rosec , 2004**)

2.1 Poudre de lait

L'échantillonnage est effectué sur deux types de poudre de lait (0% et 26%) de matière grasse. On réalise 5 prélèvements des lots différents pour chaque type de poudre. Une quantité de 500 g à 1 kg est prélevée de chaque échantillon et mise dans les sacs zippés. Les prélèvements effectués ont été dirigés vers l'laboratoire dans un but de réaliser les analyses microbiologiques.

2.2. Produit fini

Le prélèvement de produit fini est réalisé au niveau des briques, dans cette étude, on a utilisé 5 briques de différents lots nommés A, B, C ,D ,E.

3. Analyse microbiologiques

L'analyse microbiologique de la poudre de lait (0% et 26%) et le lait UHT consiste en dénombrement de certains microorganismes.

3.1. Microorganismes dénombrés dans la poudre de lait

D'après la disposition réglementaire Algérienne (**JORA N° 39 ,2017**), les bactéries dénombrés sont les entérobactéries, et les Staphylocoques à coagulase+ et la recherche des salmonelles. La règlementation interne de l'usine exige des normes pour le dénombrement des spores.

Les entérobactéries et les spores sont dénombrés au niveau du laboratoire de l'usine, les salmonelles et staphylocoques sont recherchés ou dénombrés dans laboratoire externe de contrôle de qualité et d'analyses « IDRES ».

➤ **Dénombrement des entérobactéries**

Les entérobactéries sont très répandues dans la nature en raison de la contamination alimentaire. Ils peuvent être pathogènes ou toxique.

Une solution mère est préparée en mettant 10g de la poudre de lait dans 90 ml de l'eau physiologique, puis un ensemencement de 1ml de cette solution, en masse à l'aide d'une micropipette, dans deux boites de Pétri, est effectué. Les boitesensemencées avec une gélose VRBG (environ 15 ml).Une boite témoin, étéensemencée avec 1 ml de l'eau physiologique. Incubation de toutes les boites est réalisée pendant 24 h à 37 C°.

➤ **Dénombrement des spores**

Avec la solution mère, on ensemence en masse de gélose PCA et PCA violet coulée en boite de pétri, après des différents traitements thermiques (tableau I), les colonies apparues sont dénombrées.

Tableau I : Traitement thermique des échantillons avant analyse

Spores	Traitement thermique avant ensemencement
Mésophiles	80°C/10mn
Thermorésistants mésophiles	100°C/10mn
Thermorésistants thermophiles	100°C/30mn
	106°C /30mn

Devant le bac bunsen, à l'aide d'une pipette, on verse 10ml de la solution mère dans des tubes à essais. Chaque tube est traité de la manière suivante : premier à 80 C° pendant 10 mn, deuxième à 100 C° pendant 10 mn, troisième à 100 C° pendant 30 mn (au bain marie) et le dernier à 106 C° pendant 30 mn (dans bain à huile) .

- Après le traitement thermique on refroidi immédiatement sous l'eau de robinet (figure 04).
- **Pour le tube 80 C°/10mn** : ensemencement 2 boites de pétri par 1 ml pour chaque boite, puis coulés avec la gélose PCA et incubé à 30 C° pendant 72 h ;
- **pour le tube 100 C°/ 10 mn** : ensemencement 4 boites de pétri par 1 ml pour chaque boite puis coulés avec la gélose PCA , 2 boites incubés à 30 C° pendant 72h (pour les mésophiles) et 2 boites à 55 C° pendant 5 jours (pour les thermophiles).
- **Pour le tube 100 C°/30mn** : ensemencement 2 boites de pétri par 1 ml puis coulés avec la gélose PCA et incubé à 30 C° pendant 48 h ;
- **pour le tube 106 C°/30mn** : ensemencement 8 boites de pétrie, les 6 boites ensemencés : par 1 ml (1 ml diviser pour 3 boites) et la dilution 10⁻² (1ml de la solution mère + 9ml de l'eau physiologique) pour les deux boites restants puis coulés les boites par la gélose PCA- V et incubé à 55C° pendant 48h.
- Deux boites témoins PCA et PCA – V.

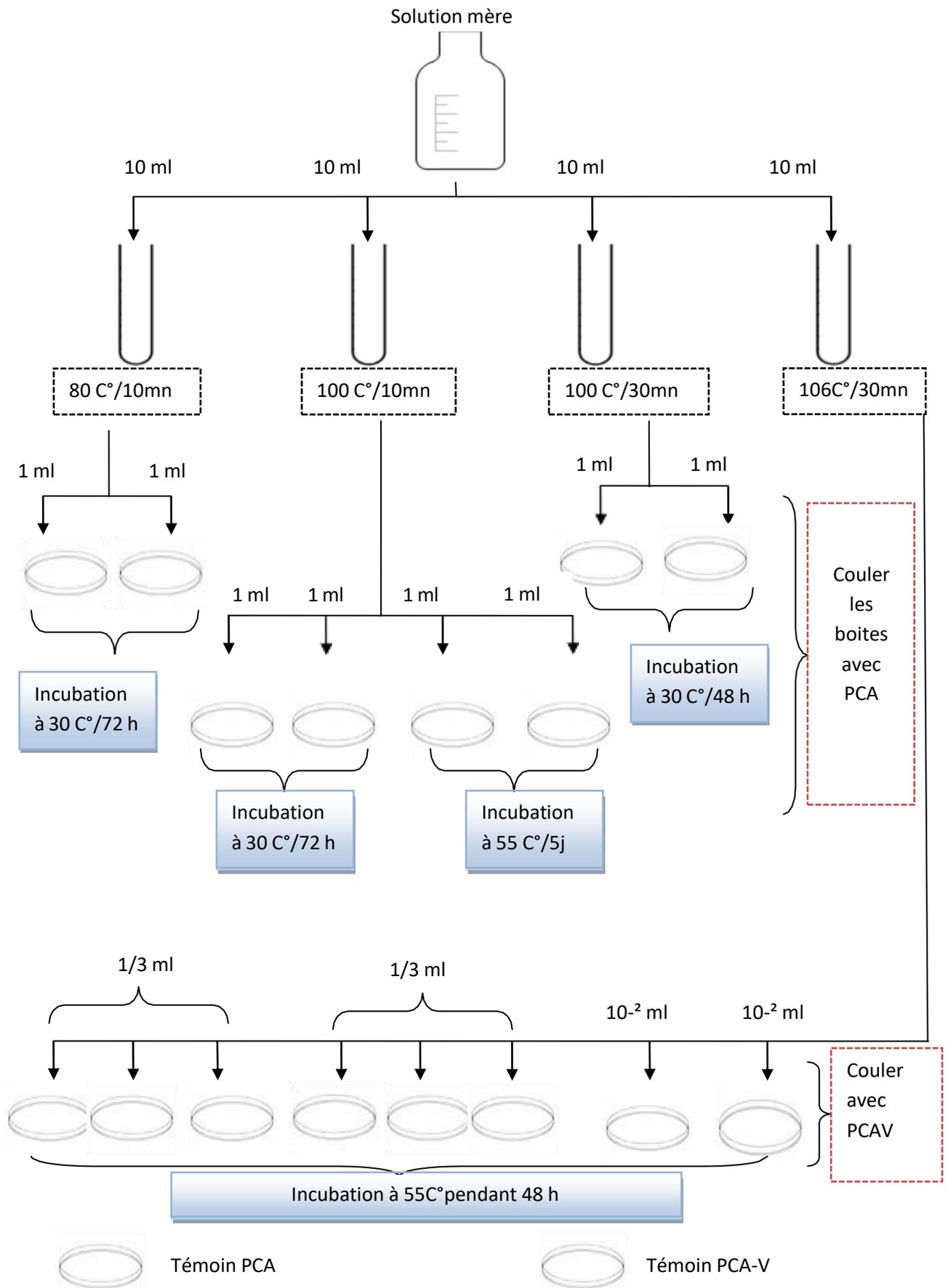


Figure 04 : Schéma général pour le dénombrement des spores dans la poudre de lait.

3.2. Microorganismes recherchés dans le produit fini

Les seuls bactéries recherchées sont les sporulées, le principe et le mode opératoire est le même avec la poudre de lait sans passer par l'étape de la reconstitution, la solution mère est le lait de la brique (figure 05).

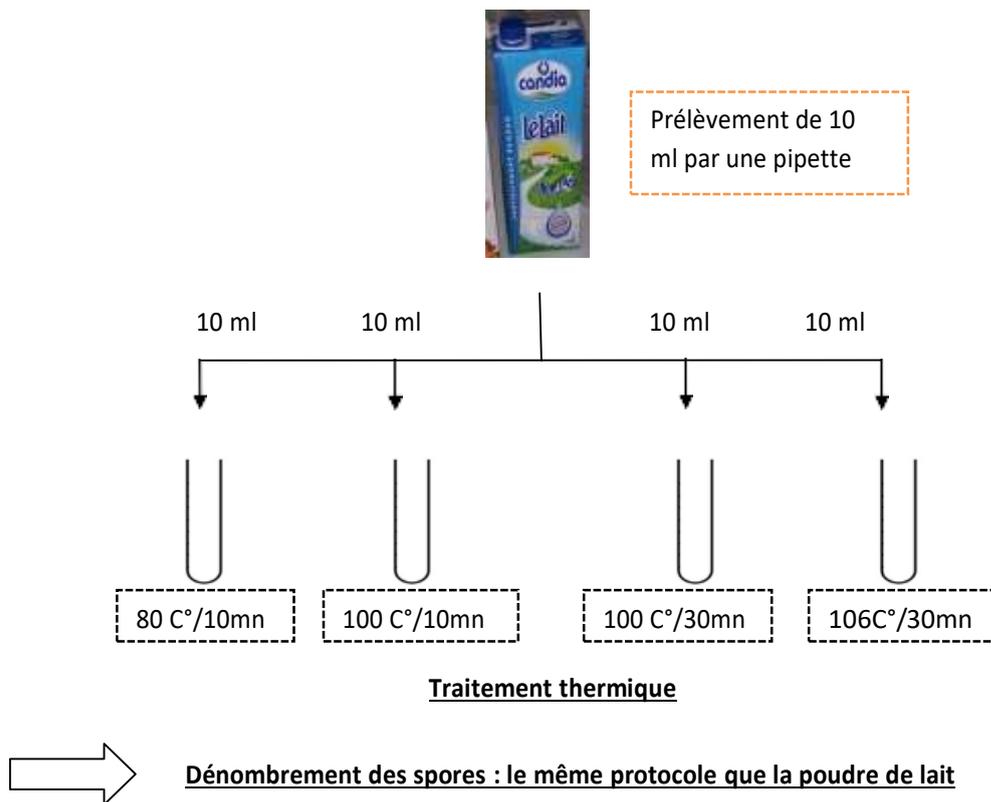


Figure 05 : Schéma pour l'analyse microbiologique du produit fini (lait HUT).

4. Examen macroscopique et microscopique

4.1 Examen macroscopique

Il consiste à observer directement à l'œil nu l'aspect morphologique des colonies obtenus après incubation.

4.2. Examen microscopique

Il consiste à observer au-delà d'un certain seuil, et nécessite de rechercher des bactéries et des éléments cellulaire sous microscope optique qui sont effectuées sur des lames de verre ordinaire propres.

➤ La coloration de Gram

La coloration de Gram c'est un test morphologique, permet de diviser le monde des bactéries en deux groupes Gram- et Gram+.

Elle consiste à la préparation d'un frottis sur une lame propre et nettoyée avec alcool ; puis le recouvert de violet cristal oxalaté ; laissé agir 1 minute, rincé à l'eau distillée ; du Lugol et laisser agir pendant 1 minute ; rincé à l'eau distillée ;décoloré à l'alcool pendant 30 secondes ; rincé à l'eau distillée ; recoloré avec de la fuchsine pendant 1 minute ; rincé à l'eau distillée ;sécher au –dessus de la flamme d'un bec Bunsen et Observé au microscope à l'objectif X100.

4. Test de catalase

Sur une lame propre, une goutte d'eau oxygénée est déposée et émulsionnée un peu de la colonie suspecte, puis l'observation est effectuée.

II. Résultats et discussion

1. Résultats

1.1. Analyse microbiologique

➤ **La poudre de lait**

Les résultats obtenus lors des analyses microbiologiques de la poudre du lait ont montré l'absence des Salmonelles, Staphylocoques et des Entérobactéries.

Tableau II : Résultats de la recherche des spores dans la poudre de lait

Bactéries recherchées	Traitement thermique +incubation	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	NE (UFC/g)
Les sporulées		Poudre 0%					Poudre 26%					
	80°C/30°C (10mn)	350	120	45	135	475	70	85	85	40	130	100
	100°C/30°C (10mn)	100	20	30	30	220	abs	35	50	25	60	100
	100°C/55°C (10mn)	860	90	40	440	35	abs	70	90	20	160	10
	100°C/30°C (30mn)	160	15	10	15	10	abs	570	220	15	Abs	800
	106°C/55°C (30mn)	60	abs	Ab	30	abs	abs	90	110	abs	70	100

Les résultats microbiologiques de la poudre de lait (0% et 26%) sont conformes, pour la recherche des salmonelles, staphylocoques et entérobactéries (**Normes de J.O.R.A. N° 39,2017**). La charge des spores dans la poudre de lait (26% et 0%) est supérieure à la norme de l'entreprise (100UFC/ml) pour quelque lots et inférieures pour d'autres lots.

➤ **Produit fini (brique)**

Les résultats obtenus lors des analyses microbiologiques du produit fini ont révélés l'absence de toutes les formes sporulées.

Les résultats obtenus pour le produit fini (lait UHT) sont dans les normes exigées par l'usine. Les témoins sont négatifs donc tous les milieux utilisés sont bien stériles et les résultats sont fiables et juste, aucun ne risque de contaminations par ces milieux utilisés.

1. 2. Examen macroscopique et microscopique

➤ Observation macroscopique

Colonies de couleur blanches et beiges, de forme rondes, il y a des colonies sèches et d'autres crémeuses. Donc plusieurs aspects des colonies indiquent qu'il y a une diversité microbienne (spores) dans la poudre de lait .



Figure 06 : Colonies bactériennes observées sur milieu PCA

➤ Observation microscopique

Des petits et grands bacilles, regroupés en cellules individuelles, chainettes, diplobacilles et en amas, la coloration de gramme est positive.

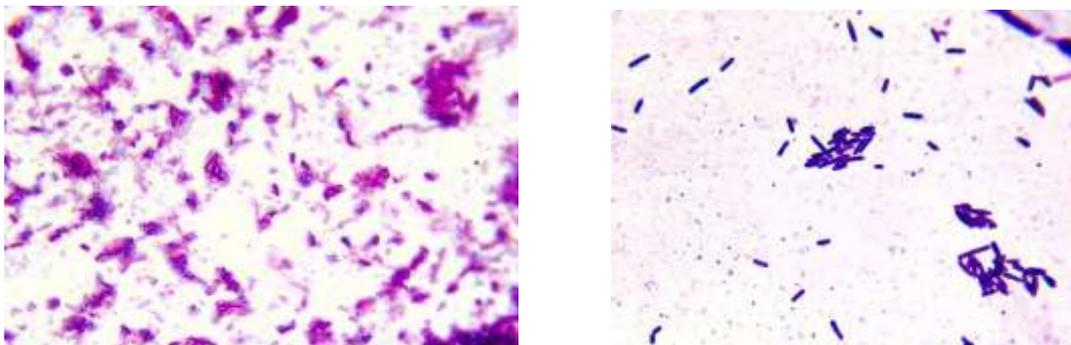


Figure 07 : Observation au microscope des cellules bactériennes obtenue sur milieu PCA à partir de la poudre de lait

1.3. Test de catalase

Test de catalase : la plupart des bactéries sont catalase + et d'autres catalase –



Figure 08: Résultats du test de catalase réalisé sur les cellules obtenues sur la gélose PCA

2. Discussion

Les analyses microbiologiques permettent de vérifier que le produit ne présente pas de risque pour la santé du consommateur, en tenant compte des conditions de conservation, des habitudes de consommation et des caractéristiques du produit. Il convient donc de s'assurer, par des tests microbiologiques, que le produit va être salubre et de bonne qualité marchande tout au long de sa durée de vie.

L'absence des salmonelles, staphylocoques et entérobactéries dans la poudre de lait indique que le procédé de fabrication de la poudre est efficace car il y'a élimination de toutes les bactéries de forme végétatives existants dans le lait cru utiliser grâce à la chaleur de séchage, aussi ce résultat nous informe sur la bonne qualité hygiénique et le bon conditionnement des sacs de 25Kg.

La présence des spores due à la résistance de certains microorganismes et leur sporulation lorsque les conditions devient défavorables ici c'est le séchage, le préchauffage ou la pasteurisation et le séchage par la vapeur à 150°C durant la fabrication de la poudre détruisent tous les microorganismes sauf les spores pourvu que le taux des thermorésistants ne soit pas élevé pour permettre leur suivie (**AFNOR, 1994**). Il n'existe pas des normes à suivre c'est des efforts par l'entreprise pour évaluer le fournisseur on cherche toujours moins de spores dans la poudre et la charge des spores varie selon l'efficacité du traitement thermique de séchage.

Il est bien établi que les bactéries thermophiles et mésophiles sont les principaux contaminants en poudre de lait à travers le monde (**Sadik et al., 2016**). Les taux élevés de contamination par les bactéries sporulées thermorésistantes ont été rapportés à partir de lait en poudre (**Lücking et al., 2013**).

Le nombre plus élevé des spores dans la poudre du lait comparé au lait cru reflète l'effet de concentration en tant que solides du lait sont concentrés lors de la fabrication de la poudre du lait (**Hill et Smythe, 2012**).

L'aspect microscopique observé après coloration de Gram suivie par une identification phénotypique et des tests biochimiques ont permis de révéler que la plupart des isolats sont des bacilles à Gram positif, à catalase positif aéobies, les résultats sont conformes au traits généraux du genre *Bacillus* et autres genres proches, notamment les bacilles thermophiles décrits dans la littérature (**Madigan et al., 2006**).

Le genre *Bacillus* et les bacilles thermophiles obligatoires ont généralement de simples besoins nutritionnels (**Burgess et al., 2010**).

Les espèces retrouvées dans la poudre de lait varient selon la saison, l'origine mais également le processus de fabrication de la poudre qui diffère d'une industrie à une autre (**Rückert et al., 2004**).

Les souches de *Bacillus* sont généralement trouvées dans la poudre de lait (**Pujol et al., 2015**).

Parmi les bacilles aérobies, les bactéries mésophiles et thermophiles sont particulièrement préoccupantes en raison de leurs spores hautement thermorésistantes et les enzymes de détérioration sont stables à la chaleur (**Lücking et al., 2013**).

L'absence des spores dans la brik due à cela est dû à l'efficacité des traitements thermiques suivi d'un conditionnement aseptique qui protège le produit contre d'éventuelles contaminations, qui a éliminé tous les spores et qui assure la stérilité et la bonne qualité du lait, ce traitement passe par plusieurs températures (le préchauffage, pasteurisation puis stérilisation UHT). Le traitement UHT est très sporicide (**Galesloot., 1956**). Plus la pression de l'homogénéisation et le système de nettoyage appliqué pour stériliser le matériel et l'utilisation de l'emballage stérile, tous cela assure la stérilité de lait et éviter le risque de la contamination.

Conclusion

Au terme de ce mémoire, il conviendrait de retenir que :

Le lait est un aliment riche mais est très périssable car il permet la croissance microbienne, pour le conserver à des longues durées, il découvrit le lait en poudre issu par le séchage et lait UHT par la stérilisation UHT.

La technologie de fabrication de la poudre de lait est capable d'éliminé toutes les formes végétatives.

La stérilisation UHT est très efficace car elle a éliminé toutes les spores existant déjà dans la poudre de lait.

Les résultats m'entrent que le produit analysé est de haute qualité, et cela serait dû au traitement thermique strict et professionnel appliqués, et aux conditions d'hygiènes respectées.

Comme perspective suivre la qualité microbiologique du produit durant le stockage (test de stabilité).

Références bibliographiques

- AFNOR, (1994).** Contribution à l'étude de la qualité bactériologique des aliments vendus sur la voie publique de Dakar : Norme NF- V08-057-1 Novembre.
- Arie F., Sri K., et Ariesta W.A.(2012).** Process engineering of drying milk powder with foam mat drying method. *Journal of Basic and Applied Scientific Research*. 2(4):3588- 3592.
- Ayerbe A.(2002)** Influence des technologies sur les qualités nutritionnelles de quelques produits laitiers. *InfDiet*2002;4: 18—20.
- Azza. M. M.Deeb. Ai hawary.I.I , I. Amanet Doaa M H Shahine.(2010).**Bactériological investigation on milk powder in the Egyptian market with emphasis on its safety .*journal Global veterinaria* .4(5) :424-433.
- Bazinet,L,Castaigne, F.(2011).** Concepts de génie alimentaire : procédés associés et applications à la conservation des aliments. Tec et Doc Lavoisier, Paris.
- Bazinet L., Pouliot Y et Castaigne F.(2002)**Opération unitaire , In **Vignolac. L.,** Science et technologie du lait-transformation du lait, Ecole polytechnique de Montréal, ISBN: (221-258)(600 pages)
- Bourgeois C. M. et Leveau J. M.(1991).** Techniques d'analyse et de contrôle dans les industries agro-alimentaires : Vol 3 : le contrôle microbiologique.-2ème éd.- Paris : Apria.- 454p.- (Sciences et technique agro-alimentaire).
- Burgess,S.,Lindsay,D.,Flint,S,H.,2010.**Thermophilic bacilli and their importance in dairy processing.*International Journal of Food Microbiology*144:215-225.
- Baril, E., Coroller, L., Couvert, O., Leguerinel, I., Postollec, F., Boulais, C., et al. (2012).** Modeling heat resistance of *Bacillus weihenstephanensis* and *Bacillus licheniformis* spores as function of sporulation temperature and pH. *Food Microbiology*, 30, 29-36
- CNIS. (2013).** Centre National de l'Information et des Statistiques. Statistiques du commerce extérieur de l'Algérie. Ministère des finances. Direction Générale des Douanes.
- Crossley E. L., 1966.** Le lait sec. Hygiène du lait.- Genève : O.M.S.- 351p.
- Debry G. (2001)** Lait, nutrition et santé. Paris: Tec & Doc Lavoisier; 2001 [1—566].
- Elsevier M. (2012).** Le lait: produits, composition et consommation en France. *Cahiers de Nutrition et de Diététique*(2012)47 :242-249.

Galesloot, Th.E et Raderma , L.(1957)Rapport en Nederlands Instiuit voor Zuivelondes-Zoek,No.9

Hill B.M. and Smythe B.W. (2012). Endospores of Thermophilic Bacteria in Ingredient milk powders and their significance to the manufacture of sterilized milk product: an industrial Perspective. *food reviews international*, 28:3, 299-312 DOI:10.1080/87559129.2011.635487.

Irudayaraj, J.M., (2001). Food Processing Oprations Modeling : Design and Analysis. CRC Press.

Iciek, j., paplewska , A., and Molska , M. (2006). Inactivation of Bacillus Stearothermophilus spores during, thermal processing. *Journal of Food Engineering* .77, 406-410

Jeantet R., Croguennec T., Mahaut M., Schuck P. et Brule G., (2008) : Les produits laitiers ,2 Emme édition, Tec et Doc, Lavoisier : 1-3-13-14-17 (185 pages).

Kon s. K., (1995). Le lait et les produits laitiers dans la nutrition humaine.-Rome : F.A.O.-XXI – 271p.

Katzin, L. I., L. A. Sandholzer .(1943). "Application of the decimal reduction time principle to a study of the resistance of coliform bacteria to pasteurization."*Journal of Bacteriology* 45(3) : 265.

Lücking G., Stoeckel M., Atamer Z., Hinrichs J. and Ehling-Schulz M. (2013). Characterization of aerobic spore-forming bacteria associated with industrial dairy processing environments and product spoilage. *Int J Food Microbiol* 166(2): 270-27.

Madigan M.T. et Martino J.M., (2006).BrockBiology of Microorganisms, 11thed.; Pearson Education. UpperSaddle River, NJ, USA.

Nicholson, W. L., Munakata, N., Horneck, G., Melosh, H. J., & Setlow, P. (2000). Resistance of Bacillus endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64, 548-572

Odet G., Cerf O., Chevillotte J., Douard D., Gillis J C., Helaine E., lignac J.(1988)Groupe de travail « lait stérilisés » proposition pour la définition et le contrôle réglementaire des laits stérilisés et des laits stérilisés UHT. La maitrise de la qualité du lait stérilisé UHT. Paris : Tec & Doc lovoisier .195 p.

Pal M., Alemu J., Mulu S., Karanfil O., Parmar B.C. and Nayak J.B., (2016).Microbial and Hygienic aspects of Dry milk powder.beverage& food world - Vol. 43 - No. 7, 28-31.

Pujol L., Albert I., Magras C., Johnson N.B. et Membré J.-M., (2015). Probabilistic exposure assessment model to estimate aseptic-UHT product failure rate. *International Journal of Food Microbiology* 192 :124–141

Rückert, A., Ronimus, R.S., Morgan, H.W., (2004). A RAPD-based survey of thermophilic bacilli in milk powders from different countries. *Int. J. food microbiol.* 96, 263–272 .

Sadiq, F. A., Li, Y., Liu, T., Flint, S., Zhang, G., Yuan, L. (2016). The heat resistance and spoilage potential of aerobic mesophilic and thermophilic spore forming bacteria isolated from Chinese milk powders. *International Journal of Food Microbiology*, 238, 193-201

Scheldeman, P., Herman, L., Foster, S., & Heyndrickx, M. (2006). *Bacillus sporothermodurans* and other highly heat-resistant spore formers in milk. *Journal of Applied Microbiology*, 101, 542-555

Stumbo, C., K. Purohit. (1975). "Thermal process lethality guide for low-acid foods in metal containers." *Journal of Food Science* 40(6) : 1316-1323 .

Veisseyre R., (1979). *Technologie du lait : constitution, récolte, traitement et transformation du lait.* 3ème édition ; Paris : La Maison Rustique.- 714p.

Vignola C., (2002). *Sciences et technologie du lait : Transformation du lait.* Montréal : presses internationales polytechnique. 600 p.

Annexes

Annexes

Annexe 01. Présentation de lieu de stage

1. Présentation de l'unité

Le travail est réalisé 45 jours, à la laiterie Tchîn-lait CANDIA, labellisé CANDIA et qui est une entreprise agro-alimentaire, qui s'impose en leader de sa filière, grâce :

- A son expérience éprouvée dans la production, le conditionnement et la commercialisation de produits laitiers UHT et dérivés : Lait UHT, boissons au lait, et aux jus de fruits, lait chocolaté et boissons aux fruits.
- Aux efforts soutenus de l'ensemble de son personnel pour satisfaire le consommateur, par la mise à sa disposition d'un produit sain et sûr ;
- A la qualité de ses produits qui lui confère une notoriété et une honorable position dans son secteur.

Compte-tenu des dangers liés et leur impact sur la santé publique, Tchîn-lait décide de relever le niveau de sécurité de ses processus, par la mise en place d'un système de Management de la sécurité des denrées alimentaires- conformes aux exigences de la norme.

2. Historique et situation géographique

Tchîn-lait est une société privée de droit Algérien (SARL), implanté sur l'ancien site de la limonaderie Tchîn-Tchîn. Cette dernière était à l'origine d'une entreprise familiale spécialisée dans les boissons gazeuses depuis 1954, ayant de fait une longue expérience dans le conditionnement des produits sous forme liquide.

C'est à l'arrivée des grandes firmes multinationales sur le marché des boissons gazeuses, qu'elle a révisé sa stratégie d'où l'idée de reconversion vers le lait UHT qui a donné naissance à Tchîn lait sous label « Candia ».

C'est en 1999 qu'une franchise Candia est née en Algérie, devenue fonctionnelle en 2001. Cette laiterie moderne construite sur une superficie totale de 3000 m², situé sur la route nationale n°12 à l'entrée ouest de la ville de Bejaïa (Bir-Slam).

Les installations des machines ont été effectuées par la société française Tétra pack. L'unité est dotée d'un équipement ultra moderne, de très grande capacité sous la marque Candia, 25

tests de contrôle sont effectués quotidiennement d'une manière permanente et régulière par le laboratoire Tchou-Lait durant tout le cycle de fabrication. En plus de ces tests de qualité, le lait UHT est conservé durant 72 heures avant sa commercialisation, pour avoir la garantie d'un lait stérile.

3. Gestion de l'unité est subdivisée en plusieurs directions

- Direction commerciale.
- Direction administration générale.
- Direction finances et comptabilité.
- Direction marketing.
- Direction production.
- Direction maintenance.
- Direction laboratoire.

4. Produits de l'unité

La gamme de production de Tchou-lait est constituée actuellement de :

- Lait UHT demi-écrémé format 1L : 15% de MG ;
- Lait UHT entier format 1L : 26% de MG ;
- Lait UHT écrémé « Silhouette » à teneur garantie en vitamines B1, B2, E et enrichi en vitamine D, format 1L : 0% de MG et Lait UHT demi-écrémé vitaminé « VIVA », en vitamine A, B1, B2, B3, B5, B6, B8, B9, E, D : format 1L : 15% de MG ;
- Lait UHT additionné de jus de fruit (Orange-ananas et pêche-abricot), format 1L et 20CL ;
- Citronnade format 1L : c'est un nouveau produit (Jus à base de citron), sa commercialisation a commencé en mois de Juillet 2011 ;
- Lait UHT Chocolaté « Candy-choco » format 1L et 20CL.



Figure04: produits de l'unité Tchou-lait "Candia"

Annexe 02. Appareillage et réactifs

1. Appareillage

- ✓ Pipettes graduées 10 ml, 1 ml.
- ✓ Tubes à essais en verre de 25 ml.
- ✓ Flacons en verres.
- ✓ Boîtes de pétri.
- ✓ Etuves de 30° C, 37° C, 55° C.
- ✓ Autoclave.
- ✓ Agitateur électromagnétique.
- ✓ Balance.
- ✓ Sacs zippés.
- ✓ Bac bunsen.
- ✓ Bain marie.
- ✓ Bain à huile.
- ✓ Pipettes pasteur.
- ✓ Lames.
- ✓ Spatule.
- ✓ Microscope électronique.

2. Réactifs

- ✓ Violet cristal oxalate.
- ✓ Lugol.
- ✓ Fuchine.
- ✓ Peroxyde d'hydrogène.

Annexe 03 : Milieux de culture

- **Milieu VRBG (Violet Red Bile Glucose Agar) :**

- ✓ Extrait de levure.....3g.
- ✓ Digestion pancréatique de la gélatine 7g.
- ✓ Sels biliaires..... 1,5g.
- ✓ Chlorure de sodium5g.
- ✓ Glucose monohydrate 10g.
- ✓ Agar 14g.
- ✓ Rouge neutre..... 0,03g.
- ✓ Cristal violet0,002g
- ✓ Eau distillée.....Qrp 1L

pH = 7,4 +/- 0,2 à 25°C.

- **Milieu PCA (PLATE COUNT AGAR) :**

- ✓ Tryptone5g.
- ✓ Extrait de levure.....2.5g.
- ✓ Glucose 1g.
- ✓ Gélose bactériologique 12g.
- ✓ Eau distillée.....Qrp 1L

pH = 7 +/- 0 ,2 à 25°C.

- **Milieu PCA –Violet :**

- ✓ Milieu PCA.....23.5g.
- ✓ Poudre de lait écrémé 1g.
- ✓ Amidon 2g.
- ✓ violet de bromocrésol.....1ml.
- ✓ Eau distillée.....Qrp 1L

pH = 7 +/- 0,2 à 25°C.

Eau physiologique :

- ✓ NaCl..... 9g.
- ✓ l'eau distillé.....Qrp1000ml.

Résumé

Les spores sont des formes de résistance des bactéries, lorsque les conditions de croissance sont défavorables, ces dernières peuvent germer quand le milieu devient favorable.

Dans cette étude nous avons dénombré les spores dans la poudre de lait et le produit fini qui est le lait UHT après le traitement thermique UHT utilisé pour la stérilisation de lait.

Les résultats ont montré la présence d'une charge de bactéries sporulées dans la poudre de lait lors du processus de fabrication, et absence dans le produit fini grâce à l'efficacité de traitement appliqué.

Mots clés : Poudre de lait, lait UHT, bactéries sporulées, formes de résistances, stérilisation.

Abstract

Spores are forms of resistance of bacteria when the growth conditions are unfavorable, they can germinate when the environment becomes favorable.

In this study we looked for and counted the spores in the milk powder and the finished product which is UHT milk after the UHT heat treatment used for the sterilization of milk.

Presence of a load of spore-forming bacteria in the milk powder during the manufacturing process, and total absence in the finished product thanks to the efficiency of UHT treatment.

Key words: Milk powder, UHT milk, spore-forming bacteria, forms of resistance, sterilization.