



Université Mohamed Khider de Biskra
Faculté des sciences exactes et sciences de la nature et de
la vie
Département des sciences de la nature et de la vie

MÉMOIRE DE MASTER

Domaine : Sciences de la nature et de la vie
Sciences biologiques
Microbiologie appliquée

Réf. :

Présenté et soutenu par :
Fatima Zohra AMRI et Manal KHELIFA

Le : dimanche 8 novembre 2020

Thème

CONTRIBUTION A L'ETUDE DE LA QUALITE MICROBIOLOGIQUE DU LAIT AROMATISE DESTINEE A LA CONSOMMATION DES ENFANTS

Jury :

M.	AGLI Abdenacer	Pr	Université de Biskra	Président
Mme	MOHAMMEDI Kenza	MAB	Université de Biskra	Promoteur
Mme.	GUEROUI Mouna	MCB	Université de Biskra	Examineur

Année universitaire : 2019 -2020

Remerciements

Nous remercions :

Tout d'abord dieu le tout puissant, de m'avoir guidé vers la science et le savoir et de nous avoir donné courage et volonté pour élaborer ce modeste travail.

En tout premier lieu nous tenons à remercier Madame MOHAMMEDI Kenza pour l'honneur qu'elle nous a fait en nous encadrant, pour l'aide précieuse qu'elle nous a donné, pour ses remarques et ses conseils qui nous ont permis de mener à bien ce travail.

Nous tenons à remercier également AGLI Abdenacer pour avoir acceptée de nous honorer par sa présence comme présidente de membres de jury GUEROUI Mouna pour accepter d'examiner ce travail.

Nous exprimons également nos chaleureux remerciements à Tous les travailleurs de la faculté des SNVST et tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce mémoire.

Dédicace

Je dédie ce modeste travail :

A la lumière de ma vie mes très chers parents, que Dieu les garde et les protège.

A mon père, la base de toute ma carrière, le plus cher qui existe sur terre, école de mon enfance, qui a été mon ombre durant toutes les années des études, et qui a veillé tout au long de ma vie à m'encourager, à me donner l'aide et à me protéger.

A ma chère mère qui s'est toujours sacrifiée pour mon éducation, qui ma entourée de son amour, qui a été à mes côtés et ma soutenu durant toute ma vie

A mes chères sœurs Nadjeh et Amani.

A mes frères AbdElmalek et AbdEssalem.

A tous mes oncles et tantes, cousins et cousines, et toute la famille Khelifa

A mes chères amies

A toute la promotion Microbiologie Appliquée 2019/2020.

A Tous mes enseignants du primaire jusqu'à la fin de notre formation.

Manal

Dédicace

Je dédie ce modeste travail :

A l'âme de mon cher père ABDELLAH, que Dieu ait pitié de lui

A La lumière de ma vie ma mère HALIMA qui s'est toujours sacrifiée pour mon éducation,
qui ma entourée de son amour, qui a été à mes côtés et ma soutenu durant toute ma vie et que

Dieu la garde et la protège.

A mon marie MOHAMMED Bradai qui a été mon ombre durant toutes les années des études,
et qui a veillé à m'encourager, à me donner l'aide et à me protéger.

A mes enfants YAHYA KHALIL et ZAKARIA

A mes sœurs et mes frères.

A tous mes oncles et tantes, cousins et cousines, et toute la famille

Amri et Bradai

A mes chères amies et mes collègues de travail

A toute la promotion Microbiologie Appliquée 2019/2020.

A Tous mes enseignants du primaire jusqu'à la fin de notre formation.

Fatima zohra

Table des matières

Liste des Tableaux.....	I
Liste des Figures.....	II
Liste des abréviations.....	III

Partie 1 : Partie bibliographique

Chapitre 1 : Généralité sur le lait

Introduction.....	1
1.1. Définition du lait.....	3
1.2. La composition du lait.....	3
1.2.1. L'eau.....	3
1.2.2. Les lipides.....	3
1.2.3. Les protéines.....	3
1.2.4. Les glucides.....	4
1.2.5. Les minéraux.....	4
1.2.6. Les vitamines.....	4
1.2.7. Les enzymes.....	4
1.3. Les différents types du lait.....	4
1.3.1. Le lait sans traitement thermique (Lait cru).....	5
1.3.2. Le lait traité thermiquement.....	5
1.3.2.1. Lait pasteurisés.....	5
1.3.2.2. Lait stérilisés.....	5
1.3.2.3. Lait aromatisés.....	5

Chapitre 2 : Le lait aromatisé

2.1. Définition.....	6
2.2. Exemple d'un lait aromatisé : Le lait chocolaté.....	6
2.2.1. Définition.....	6
2.2.2. Informations nutritionnelles.....	6

2.2.3. Matières premières utilisées.....	6
2.2.3.2. Poudre du lait	6
2.2.3.3. Poudre de cacao.....	7
2.2.3.5. Amidon.....	7
2.2.3.6. Arôme vanille	7
2.2.3.7. Stabilisants	7
2.2.3.8. Sels	8
2.2.4. Processus de fabrication.....	8
2.2.4.1. Reconstitution.....	8
2.2.4.2. Préchauffage.....	8
2.2.4.3. Dégazage	8
2.2.4.4. Homogénéisation.....	8
2.2.4.5. Pasteurisation	9
2.2.4.6. Stérilisation UHT	9
2.2.4.7. Refroidissement.....	9
2.2.4.8. Conditionnement aseptique	9
2.2.4.9. Emballage.....	9
2.2.4.10. Stockage et commercialisation.....	10

Chapitre 3 :La qualité microbiologique du lait

3.1. Les propriétés microbiologiques du lait	11
3.1.1. Flore originelle ou indigène	11
3.1.2. Flore de contamination	11
3.1.2.1. Germes d'altération	12
3.1.2.2. Les germes pathogènes.....	12

Partie 2: Partie expérimental

Chapitre 4: Matériels et méthodes

4.1. Matériels et méthodes.....	13
---------------------------------	----

4.1.1. <i>Listeria monocytogenes</i>	13
4.1.1.1. Matériels	13
4.1.1.2. Méthodes	13
4.1.2. Les FTAM.....	16
4.1.2.1 Matériels	16
4.1.2.2. Méthodes	17
4.1.3. <i>Escherichia coli</i>	18
4.1.3.1. Matériels	18
4.1.3.2. Méthodes	19
a. La première phase	19
b. La deuxième phase	21
4.1.4. Staphylocoques	23
4.1.4.1. Matériels	23
4.1.4.2. Méthodes	23
a. Extraction du lait au chocolat	23
b. Normes.....	24
c. Détermination de la récupération des entérotoxines	24
d. Analyse des entérotoxines	24

Chapitre 5 :Résultats et discussion

5.1. Résultats et discussion	25
5.1.1. <i>Listéria monocytogènes</i>	25
5.1.1.1. Résultats	25
5.1.1.2. Discussion	25
5.1.2. FTAM	29
5.1.2.1. Résultats	29
5.1.2.2. Discussion	31
5.1.3. <i>Escherichia Coli</i>	32

5.1.3.1. Résultats	32
5.1.3.2. Discussion	33
5.1.4. Staphylocoque	34
5.1.4.1. Résultats	34
a. Récupération de SEA	34
b. Quantité de SEA dans le lait contaminé	34
5.1.4.2. Discussion	35
Conclusion.....	38

Bibliographie

Annexes

Résumés

Liste des Tableaux

Tableau 1: Caractérisation biochimique d'E. Coli (Priyanka S et Alka ,2008).....	16
Tableau 2: Quelques caractéristiques métaboliques et de croissance des isolats bactériens.....	30
Tableau 3: Effet de la concentration d'inoculum sur le taux d'altération	30
Tableau 4: Valeurs D d'Escherichia coli A TCC no 9673 au lait au chocolat.	32
Tableau 5: Températures d'entretien requises pour produire une létalité de 10 D pour Escherichia Coli A TCC N° 9637 pour quatre temps d'attente différents.....	32
Tableau 6: Récupération d'entérotoxine A dans le lait au chocolat 2%	34
Tableau 7: Analyse des entérotoxines du lait au chocolat 2%.	35

Liste des Figures

Figure 1: L'isolement et dénombrement de <i>Listeria monocytogènes</i> à partir du lait.....	14
Figure 2 : Colonies de <i>Listeria monocytogènes</i> sur gélose sélective	15

Liste des abréviations

Bouillon MRVP : Bouillon méthyl rouge et Voges Proskauer.

CM : Carboxy-méthyle cellulose.

D : Pente de la courbe du taux de destruction.

FTAM : flore total aérobie mésophile.

g : Le temps de génération.

H₂O₂ : Eau oxygéné.

ISO : International Standard Organization.

J.O.R.A : Journal officiel de la république algérienne.

NB : Bouillon nutritif.

PCA : Plate count agar.

PCR : Polymerasechainreaction.

pH : Potentiel hydrogène.

SEA : Entérotoxines Staphylococciques A.

TR : Tank de reconstitution.

UFC : Unité formant une colonie.

UHT : Ultra haute température.

UVM-2 : University of Vermont.

Vit : Vitamine.

Z : Pente de la courbe de temps de mort thermique.

Introduction

Le lait est le premier aliment que nous consommons depuis notre naissance. Il joue un rôle essentiel dans notre régime alimentaire journalier puisqu'il est consommé en grande quantité sous forme de lait de consommation, ou de produits laitiers variés comme les boissons lactées (Cayot et Lorient, 1998).

En raison de sa richesse en nutriments, le lait constitue un excellent milieu de culture pour les microorganismes. En conséquence, les altérations d'origine microbienne sont les plus fréquentes et les plus rapides à apparaître. De ce fait, pour avoir un lait sain et assurer une longue conservation sans altérer sa valeur nutritionnelle, un procédé de traitement thermique et technologique a été développé la stérilisation UHT suivi d'un conditionnement aseptique (Guiraud, 1998).

Si le lait est ajouté avec certains ingrédients, des colorants, des arômes artificiels ou naturels et un édulcorant, cette forme modifiée est appelée lait aromatisé et elle est plus acceptable et plus appétissant, en particulier pour les enfants. Il y a différents types de laits aromatisés ayant plusieurs saveurs, sont disponibles sur le marché actuel tels que le chocolat, la fraise, la pistache, la framboise, la vanille, etc. Il contient les mêmes 9 nutriments essentiels que dans le lait nature comme le calcium, le potassium, le phosphore, les protéines, la vitamine D, la vitamine A, la vitamine B12, la riboflavine et la niacine. Le lait aromatisé est préparé par pasteurisation, stérilisation ou traitement à ultra haute température (UHT), qui offre une durée de conservation plus longue que le lait nature (Praveen K.T et Shakeel A, 2017).

Le lait aromatisé est un excellent moyen d'augmenter la consommation de lait chez les enfants et constitue un meilleur moyen d'aider les enfants à rendre leur alimentation plus nutritive. Des études ont montré que le lait aromatisé peut aider à combler l'écart nutritionnel chez les enfants, car ils le préfèrent et boivent plus de lait quand il est aromatisé. L'inclusion du lait au chocolat et d'autres laits aromatisés dans l'alimentation des enfants ne semble pas avoir d'impact négatif sur le poids corporel ni sur l'apport en calories (Praveen K.T et Shakeel A, 2017).

Dans notre travail, nous avons étudié et analysé certains des travaux liés au lait au chocolat en termes de recherche des microbes les plus importants qui causent des maladies des consommateurs ou la corruption des produits, nous avons donc compté la présence de certains microbes tels que *Listeria monocytogenes*, FTAM, Staphylocoque et *Escherichia coli*.

Nous avons conclu que cette infection était causée par l'absence de contrôle pendant la chaîne de production, en particulier après un traitement thermique ou de mauvaises conditions de conservation et de transport.

Dans ce cadre, on a partagé notre travail en cinq chapitres:

Le premier chapitre traite les généralités sur le lait.

Le deuxième chapitre traite le lait aromatisé (le lait chocolaté).

Le troisième chapitre présente la qualité microbiologique du lait.

Le quatrième chapitre expose le matériel et les méthodes travaux étudiés.

Le dernier chapitre rapporte les résultats et leur discussion.

Partie
Bibliographique

Chapitre 1

Généralité sur le lait

1.1. Définition du lait

Le lait a été défini en 1909, au cours du Congrès International de la Répression des Fraudes à Genève comme étant : « Le produit intégral de la traite totale et ininterrompue d'une femelle laitière bien portante, bien nourrie et non surmenée. Le lait doit être recueilli proprement et ne doit pas contenir de colostrum » (Luquet, 1985).

Le lait est un liquide blanc, opaque, d'une odeur peu prononcée, d'un goût légèrement sucré et d'une viscosité égale à deux fois celle de l'eau. Ce complexe hétérogène, altérable et de composition variable, est le résultat de la sécrétion mammaire de femelles mammifères. En pratique, le lait a pour fonction d'être non seulement un aliment exclusif des jeunes, mais il doit être aussi présent dans l'alimentation humaine et comme matière première dans la transformation industrielle (Kassa et al., 2016).

1.2. La composition du lait

Les principaux constituants du lait sont:

1.2.1. L'eau

L'eau est l'élément quantitativement le plus important: 900 à 910 g par litre. Dont lequel, sont dispersés tous les autres constituants du lait, tous ceux de la matière sèche (Vignola, 2002).

1.2.2. Les lipides

Les matières grasses sont les éléments majeurs du lait (30 à 60 g/l), dont la quantité varie en fonction des conditions d'élevage ; elles se trouvent en émulsion sous forme de globules gras individualisés (0.1 à 20 µm de dimension) (Danthine et al., 2000).

La matière grasse du lait se compose principalement de triglycérides, phospholipides et une fraction insaponifiable constituée en grande partie de cholestérol et de β-carotène (Chilliard et al., 2007).

1.2.3. Les protéines

La matière azotée du lait est divisée en deux parties: la matière azotée protéique (correspond à 95 % de l'azote total) et la matière azotée non protéique. En fonction de leur solubilité à pH 4,6. Les protéines du lait peuvent être réparties en deux catégories:

- Les caséines ou protéines insolubles à pH 4,6.
- Les protéines du lactosérum ou protéines solubles à pH 4,6 (Ilboudo et al., 2012).

1.2.4. Les glucides

Quantitativement, ils sont les constituants les plus importants après l'eau. Le sucre principal du lait est le lactose. Il représente 40% de la composition moyenne du lait de vache. C'est un disaccharide constitué d'un résidu galactose uni à un résidu glucose (O'Connor et Tripathi, 1991).

1.2.5. Les minéraux

Les principaux minéraux sont calcium, magnésium, sodium et potassium pour les cations et phosphate, chlorure et citrate pour les anions. Ils représentent une quantité variant de 0.7 à 0.9 % (Vignola, 2002).

Le lait contient également d'autres oligo-éléments indispensables pour l'organisme humain tels que le manganèse, bore, fluor, silicium, molybdène, cobalt, baryum, titane, lithium (Vignola, 2002).

1.2.6. Les vitamines

On répartit les vitamines en deux classes selon leur solubilité, soit les vitamines hydrosolubles (vitamine du groupe B, vit C, vit H, acide folique, niacine et niacinamide, acide pantothénique), se trouve en plus grand concentration dans le sérum, et les vitamines liposoluble (vit A, vit D, vit K) qui sont associées à la matière grasse (Lesné et Vagliano, 1925).

1.2.7. Les enzymes

Environ 60 enzymes principales ont été répertoriées dans le lait dont 20 sont des constituants natifs (Blanc, 1982). Les enzymes naturelles du lait de celles qui sont sécrétées par les microbes présents dans le liquide (Pougheon, 2001).

1.3. Les différents types de lait

Les laits destinés à la consommation humaine existant actuellement, peuvent être classés en deux catégories, selon le mode de traitement:

1.3.1. Le lait sans traitement thermique (Lait cru)

Le lait cru est un produit intéressant sur le plan de la nutrition puisqu'il n'a subi aucun traitement d'assainissement lui permettant d'assurer une meilleure conservation, sa production et sa commercialisation doivent être sévèrement contrôlées en raison des risques qu'il peut présenter pour la santé (Luquet, 1985).

1.3.2. Le lait traité thermiquement

Selon le degré de traitement thermique qui permet une augmentation de la durée de conservation, deux types du lait sont distingués:

1.3.2.1. Laits pasteurisés

La pasteurisation est un traitement thermique qui est capable de détruire l'agent de transmission de la tuberculose (bacille de Koch) (Luquet, 1985).

Elle se pratique dans des appareils à plaque ou à tubes. Deux catégories du lait pasteurisé sont à distinguer: le lait pasteurisé conditionné et le lait pasteurisé de haute qualité, dont lequel le traitement thermique d'assainissement est une pasteurisation dont le couple temps-température oscille entre 72-75°C pendant 15 à 30 secondes (Luquet, 1985).

1.3.2.2. Laits stérilisés

Selon le procédé de stérilisation qui est une conservation du lait par la destruction thermique des germes capables de s'y développer, et qui se fait avec des échangeurs thermiques à plaques ou tubulaires, on peut distinguer le lait stérilisé et le lait stérilisé UHT. Ces laits doivent être stables jusqu'à la date limite de consommation (Luquet, 1985).

1.3.2.3. Laits aromatisés

Ce sont tous des laits stérilisés auxquels on ajouté des arômes autorisés (notamment cacao, vanille, fraise) (Leseur et Melik, 1999).

Chapitre 2

Le lait aromatisé

2.1. Définition

Vierling (1999) rappelle que cette dénomination est réservée aux boissons stérilisées préparées à l'avance, constituées exclusivement de lait écrémé ou non, sucré ou non, additionné des colorants généralement autorisés et de substances aromatiques naturelles qui peuvent être renforcées artificiellement : abricot, ananas, fraise, prune, cerise, framboise. Les laits aromatisés peuvent avoir subi l'addition d'agar-agar, alginates, carraghénanes et pectines comme stabilisants.

Les laits aromatisés sont généralement obtenus par stérilisation en récipients ou par stérilisation UHT (Leseur et Melik, 1999).

2.2. Exemple d'un lait aromatisé : Le lait chocolaté

2.2.1. Définition

C'est une boisson lactée chocolatée stérilisée UHT, additionné du cacao pendant le processus de fabrication, elle présente un goût de chocolat et apporte calcium, protéines, et vitamines. Cette boisson est destinée surtout aux enfants et adolescents (Vignola, 2002).

2.2.2. Informations nutritionnelles

Le lait chocolaté a fait ses preuves, en démontrant son potentiel à augmenter la masse musculaire, favoriser le plein d'énergie grâce à l'apport de tous les bien fait du lait. C'est un excellent hydratant (85% d'eau), source de calcium et vitamine D, qui contribuent à la bonne croissance des os pour couvrir les besoins nutritionnels quotidiens des enfants (Hartman, 2007).

2.2.3. Matières premières utilisées

2.2.3.1. Eau

L'eau utilisée par les industries alimentaires doit d'être décontaminée, ne doit pas y avoir de substances toxiques comme des ions de métaux lourds (Pb...), les cyanures, les détergents, les hydrocarbures ou les phénols, et les ions minéraux doivent être à des concentrations réglementaires, (Joffin et Joffin, 2003).

2.2.3.2. Poudre du lait

Selon la teneur en matière grasse, les poudres de lait sont classées en trois groupes : la poudre de lait entier (26% de MG), la poudre de lait partiellement écrémé (15% de MG) et la poudre de lait écrémé (0% de MG) (Michel et al., 2002).

2.2.3.3. Poudre de cacao

La poudre de cacao constitue une matière première indispensable à l'industrie alimentaire, soit pour leurs caractéristiques aromatiques, soit pour leur pouvoir colorant (Cros et Bianchi, 1998). Elle est appelée tourteau et obtenue à partir de la pâte de cacao (Anonyme, 2002).

2.2.3.4. Sucre blanc cristallisé (Sucre commercialisé)

Le sucre blanc cristallisé est pur, puisqu'il est constitué de 99,9 % de saccharose. Il se présente sous forme de cristaux plus ou moins gros (Arzate, 2005).

2.2.3.5. Amidon

L'amidon constitue la substance de réserve de nombreux végétaux dans lesquels on le retrouve sous forme de granules. Lorsque l'amidon est chauffé en présence d'eau, il augmente la viscosité dans le milieu (Chêne, 2004 ; Malumba, 2011).

2.2.3.6. Arôme vanille

Les arômes sont des préparations concentrées, isolées de matières végétales ou animales à propriétés aromatisantes, utilisées pour conférer une saveur aux denrées alimentaires.

L'exemple de la « vanille » (arôme le plus utilisé) est caractéristique. Un extrait naturel de vanille est composé principalement de vanilline- 3-méthoxy-4-hydroxybenzaldéhyde- mais aussi d'autres substances. Dans ce mélange, la vanilline est la substance aromatique déterminante (appelée Character Impact Compound), les autres composants ne contribuent que secondairement à « l'arrondissement » de l'arôme (Etournaud, 2010).

2.2.3.7. Stabilisants

Le carraghénane (CGN; E-407) , la gomme xanthane (XG; E-415) et le carboxyméthyl cellulose (CMC) deux polysaccharides anioniques sont approuvés pour des applications alimentaires et sont documentés pour interagir avec les protéines laitières. Le principal mode d'action est les interactions électrostatiques de biopolymère], bien que le piégeage physique et la gélification aient également été signalés (Shlomit et al., 2020).

En présence d'eau, ils forment généralement des solutions colloïdales et sont utilisés pour leurs fonctions gélifiantes, épaississantes et stabilisantes (Fischer, 2010).

2.2.3.8. Sels

Le sel de table (NaCl) est utilisé pour renforcer la flaveur et le goût des aliments (Blank et Spadone, 2010).

2.2.4. Processus de fabrication

2.2.4.1. Reconstitution

La reconstitution du lait est un mélange d'eau et de lait en poudre en vue de rétablir un rapport eau/matière sèche de produit initial (Boularak, 2005).

Cette opération consiste à mélanger la poudre du lait, cacao et sucre avec l'eau de processus (15°F) à une température ambiante dans un circuit fermé qu'on appelle le Tank de Reconstitution (TR) et qui contient un agitateur pour assurer la dispèrsibilité (Boularak, 2005).

2.2.4.2. Préchauffage

Le lait chocolaté est porté à une température convenable pour le dégazage. Cette opération est réalisée à l'aide d'un échangeur de chaleur à plaque ou tubulaire où le lait est chauffé à une température de 68°C (Moller, 2000).

2.2.4.3. Dégazage

Le lait chocolaté préchauffé à 68°C est introduit tangentiellement dans la cuve sous vide du dégazeur. Cette opération a pour but de retirer les odeurs désagréables et d'éliminer l'air entraîné et la mousse formée (Veisseyre, 1979).

2.2.4.4. Homogénéisation

L'homogénéisation consiste à réaliser un mélange intime entre la phase lipidique et la phase aqueuse.

L'homogénéisation est réalisée à environ 55°C. Sous l'effet de la pression dans l'homogénéisateur (200 à 300bars), la taille des globules gras du lait est fortement réduite, favorisant ainsi leur émulsion dans la phase aqueuse (Juilerat et Badoud, 2010). De plus, ce traitement donne au lait une saveur et une texture plus douces.

2.2.4.5. Pasteurisation

C'est un procédé thermique qui permet de détruire la forme végétative de certaines bactéries pathogènes et d'éliminer un grand nombre de bactéries thermorésistantes. Elle détruit aussi certaines enzymes en particulier les lipases (Cheftel, 1982).

2.2.4.6. Stérilisation UHT

Le traitement UHT est un traitement thermique intense, à des températures de l'ordre de 135°C à 140°C pendant 4 secondes. Ceci permet la destruction totale des micro-organismes et des spores présentes, de conserver le lait plusieurs mois à température ambiante dans des emballages aseptique (Vignola, 2002).

2.2.4.7. Refroidissement

Le lait stérilisé se refroidit jusqu'à ce qu'il atteigne une température de 20°C, qui est par la suite envoyé vers un tank stérile (Muthwill et *al.*, 1998).

2.2.4.8. Conditionnement aseptique

Pour garder la qualité bactériologique et organoleptique du lait chocolaté, il est nécessaire de le conditionner aseptiquement (Chapman et Hall, 1996).

Le conditionnement aseptique est une opération qui consiste à mettre un produit biologiquement stable, dans des récipients stériles hermétiquement clos, de manière à éviter toute contamination microbienne. Il permet aussi l'augmentation de la durée de conservation des produits stérile (Bureau, 1998).

2.2.4.9. Emballage

D'après (Odet et *al.*, 1985), quelle que soit la conception de l'emballage qui en sera issu, le matériau mis en œuvre doit impérativement respecter les exigences de la réglementation relative aux matériaux en contact avec les denrées alimentaires :

- Constituer une barrière efficace contre les micro-organismes ; Présenter une résistance mécanique suffisante pour supporter tous les aléas de la vie du préemballage (transport, stockage, manutention, etc....).
- Préserver les qualités physico-chimiques et organoleptiques du lait.

2.2.4.10. Stockage et commercialisation

Une fois emballé, le lait stérilisé est stocké à une température ambiante (Vignola, 2002).

Chapitre 3

La qualité

microbiologique du lait

3.1. Les propriétés microbiologiques du lait

Le lait est un aliment dont la durée de vie est très limitée. En effet, son pH voisin de la neutralité, le rend très facilement altérable par les microorganismes et les enzymes, sa richesse et sa fragilité font du lait un milieu idéal aux nombreux microorganismes comme les moisissures, les levures et les bactéries qui se reproduisent rapidement (Balezi et Mushagalusa, 2018).

Les micro-organismes du lait, selon leur importance sont repartis en deux grandes classes : la flore indigène ou originelle et la flore de contamination. Cette dernière est subdivisée en deux sous classe : la flore d'altération et la flore pathogène (Vignola, 2002).

3.1.1. Flore originelle ou indigène

Le lait contient peu de microorganismes lorsqu'il est prélevé dans des bonnes conditions à partir d'un animal sain (moins de 10³ germes/ml). A sa sortie du pis, il est pratiquement stérile et protégé par des substances inhibitrices appelées lacténines à activité limitée dans le temps (une heure environ après la traite) (Cuq, 2007).

La flore originelle des produits laitiers se définit comme l'ensemble des microorganismes retrouvés dans le lait à la sortie du pis, les genres dominants sont essentiellement des mésophiles (Vignola, 2002).

Il s'agit de microcoques, mais aussi streptocoques lactiques et lactobacilles. Ces microorganismes, plus ou moins abondants, sont en relation étroite avec l'alimentation et n'ont aucun effet significatif sur la qualité du lait et sur sa production (Richard et Halima, 1983).

3.1.2. Flore de contamination

Cette flore est l'ensemble des microorganismes contaminant le lait, de la récolte jusqu'à la consommation. Elle peut se composer d'une flore d'altération, qui causera des défauts sensoriels ou qui réduira la durée de conservation des produits, et d'une flore pathogène dangereuse du point de vue sanitaire (Vignola, 2002).

L'origine de cette contamination est :

- Contamination par l'animal.
- Contamination au cours de la traite.
- Contamination au cours du transport.

3.1.2.1. Germes d'altération

Ce sont des bactéries et champignons indésirables apportés par la contamination. Cette flore regroupe les bactéries thermorésistantes, les coliformes, les psychrotropes, les levures et moisissures. Ce sont des germes provoquant l'autolyse des aliments, et donc leur altération. Ils ne sont en général pas dangereux pour le consommateur parce que leur présence en grande quantité est visible par l'état du produit (changement d'aspect, odeur désagréable, etc.) (Dieng, 2001).

3.1.2.2. Les germes pathogènes

La contamination du lait et des produits laitiers par les germes pathogènes peut être d'origine endogène, et elle fait alors suite à une excrétion mammaire de l'animal malade ; elle peut aussi être d'origine exogène, il s'agit alors d'un contact direct avec des troupeaux infectés ou d'un apport de l'environnement (eaux, personnel). L'ensemble des procédés de traitement et de transformation du lait peut freiner la multiplication des germes éventuellement présents ou au contraire favoriser leur développement (Brisabois et *al.*, 1997).

Les germes les plus souvent évoqués sont les Mycobactéries, *Brucella*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, les entérobactéries, parmi lesquelles les *Escherichia coli* producteurs de toxines et *Salmonella*. Actuellement, la maîtrise de ces bactéries pathogènes dans le lait et les produits dérivés nécessite la mise en place de systèmes de contrôle et de surveillance qui s'appuient sur une réglementation devenue maintenant européenne. Les moyens de prévention doivent prendre en compte les données désormais bien connues de la microbiologie prévisionnelle en matière du lait et des produits laitiers (Monique et Souad, 2013).

Partie

Expérimental

Chapitre 4

Matériel et méthodes

Nous avons étudié et analysé quelques travaux liés au lait au chocolat, en termes de recherche des micro-organismes les plus importants qui causent des maladies chez les consommateurs, mais aussi pour tenter de comprendre l'altération de ces produits laitiers. De ce fait, nous avons dénombré la présence de certains micro-organismes tels que :

- *Listeria monocytogenes*
- FTAM
- *Echerichia coli*
- Staphylocoque

4.1. Matériel et méthodes

4.1.1. *Listeria monocytogenes*

Des personnes ont développé des épidémies de gastro-entérite et de fièvre après avoir consommé du lait au chocolat lors d'un pique-nique, et ces symptômes sont similaires à ceux qu'ils provoquent par listériose (Craig, 1997). Afin de vérifier que les responsables de ces symptômes est *Listériamonocytogenes* nous avons réalisé l'étude suivante:

4.1.1.1. Matériel

- Deux cartons de lait au chocolat (l'un provenant du pique-nique et l'autre produit le même jour à la laiterie).
- Bouillon d'enrichissement stérile UVM-2.
- Gélose sélective PALCAM.

4.1.1.2. Méthodes

La détection et le dénombrement de *Listeria monocytogenes* selon la norme ISO-11290 nécessite une étape d'enrichissement afin de proliférer le petit nombre de *L. monocytogenes* à un niveau détectable et réparer les cellules stressées ou blessées lors du traitement de lait avant l'isolement qui se suit par une étape de confirmation (Jordan et *al.*, 2015).

- Des échantillons ont été prélevés à partir de deux cartons de lait au chocolat non ouverts, l'un provenant du pique-nique et l'autre produit le même jour à la laiterie (Craig, 1997).
- 10 ml de chaque échantillon a été extrait aseptiquement et homogénéisé avec 90 ml de bouillon d'enrichissement stérile UVM-2 et incubé à 37 ° C pendant 24 heures pour une analyse biochimique supplémentaire.

- Au temps t, 0,2 ml de lait de chaque carton sont directement étalés au râteau sur une gélose sélective PALCAM et incubés à 37 °C. Deux lectures sont effectuées respectivement à 24 et 48 h afin de distinguer les colonies suspectées *L. monocytogenes* (Figure 1).
- Parallèlement, un volume minimal de 30 ml de lait de deux échantillons est dilué au 1/2 en bouillon d'enrichissement et incubé à 37 °C pendant 7 j.
- L'isolement de *L. monocytogenes* à partir dumélange « bouillon + lait » a été effectué sur gélose PALCAM aux temps t + 24 h et t + 7 j, incubé à 37 °C et lu après 24 et 48 h (Bind, 1991).

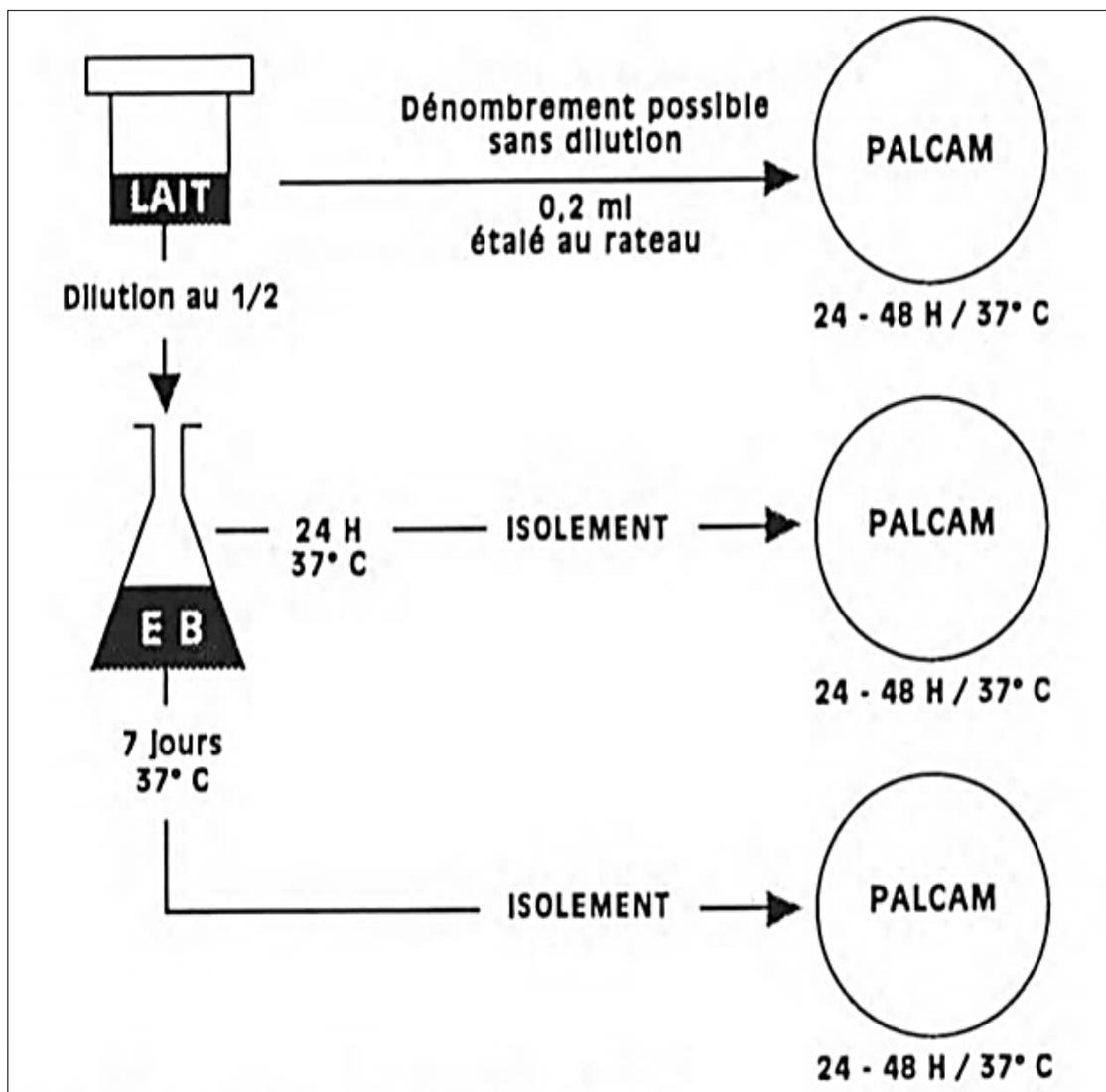


Figure 1: L'isolement et dénombrement de *Listeria monocytogenes* à partir du lait (Bind, 1991).

La confirmation se réalise par des tests biochimiques (tableau 1) à partir des colonies de couleur bleu verdâtre entourées d'un halo (Figure 2) de chacune des cultures sur la gélose sélective PALCAM (ISO, 1996 ; ISO 2005). Les colonies morphologiquement typiques de *L. monocytogenes* ont été identifiées par coloration de Gram. Une réaction de catalase, une motilité de tumbling à 20-25 °C, un test au rouge de méthyle, un test de Voges-Proskauer, une réduction des nitrates, une fermentation des sucres et une hémolyse sur une gélose au sang de mouton à 5% ont été réalisés.

La confirmation se réalise encore par les tests ELISA (Jordan et *al.*, 2015) ou par les différentes techniques basées sur l'analyse des acides nucléiques ; notamment la PCR (Gasnov et *al.*, 2005 ; Jordan et *al.*, 2015).

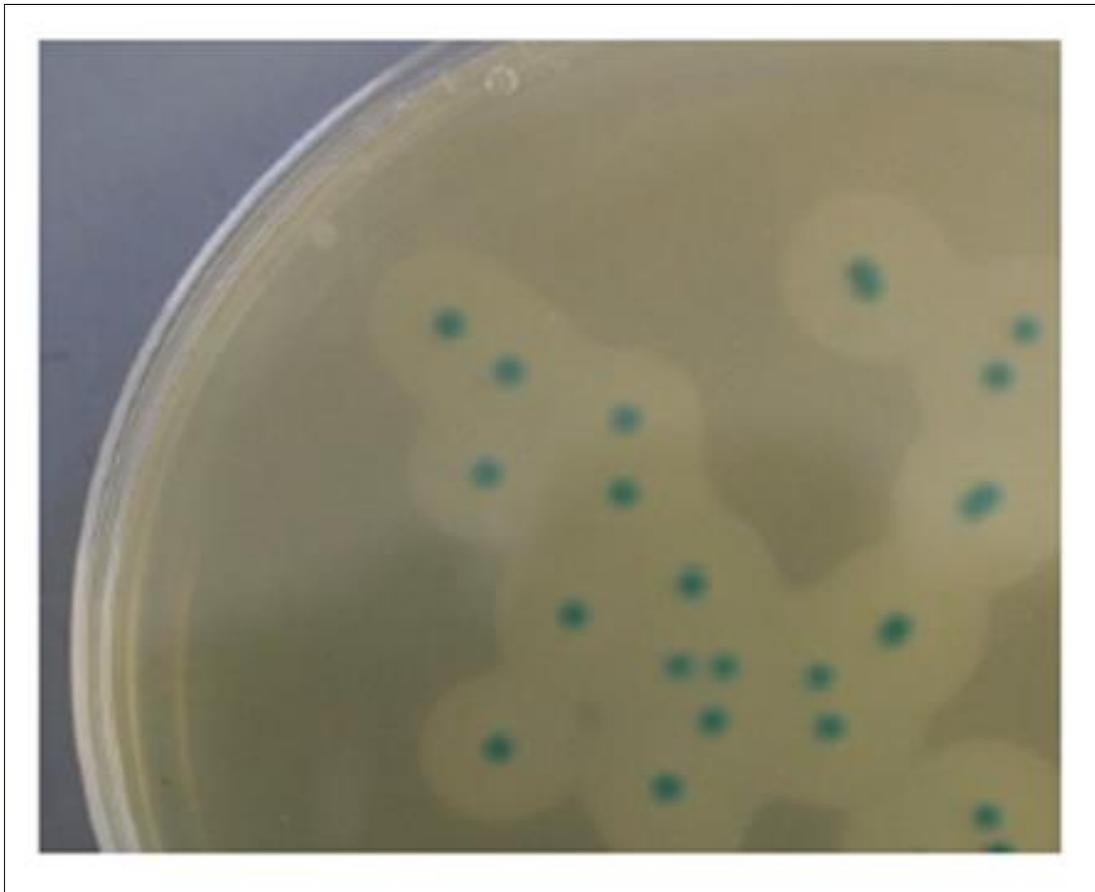


Figure 2: Colonies de *Listeria monocytogenes* sur gélose sélective

(Jordan et *al.*, 2015).

Tableau 1: Caractérisation biochimique d'E. Coli (Priyanka S et Alka, 2008).

Tests biochimiques	Réactions
Catalase	+
Oxydase	-
Production d'indole	-
Réduction des nitrates -	-
Rouge de méthyle +	+
Voges -	-
Proskauer +	+
Hémolyse	+
Acide Du sucre	(a) Rambose + (b) α méthyl d mannoside + (c) Xylose -

4.1.2. Les FTAM

L'apparition sporadique de paquets gonflés de lait au chocolat dans une usine de transformation du lait locale est la principale raison de cette enquête et pour identifier et caractériser les agents de détérioration (Joan et Alfred, 1990).

4.1.2.1 Matériel

- L'échantillon : 62 paquets de 250 ml de lait au chocolat traité UHT.
- Plaque mésophile aérobie (PCA).
- Bouillon nutritif (BN)
- Plaques d'agar nutritif (AN).
- Spectrophotomètre Spectronic 20 à 660 nm
- Les milieux de cultures : Lactose, bouillon, lait de tournesol, gélose triple sucre fer, MacConkey Agar, gélose Koser citrate, bouillon MR-VP, gélose au bismuth et au sulfite, gélose verte brillante, milieu Baird Parker et gélatine nutritive.

4.1.2.2. Méthodes

62 paquets de 250 ml de lait au chocolat traité UHT, collectés dans une usine de transformation du lait locale sur une période de 6 semaines, ont été conservés à température ambiante pendant 24 h maximum (Joan et Alfred, 1990).

Les comptages sur plaque mésophile aérobie (PCA) de tous les emballages à température ambiante (28-30 ° C) pendant 24 h.

A partir de ces plaques, les micro-organismes ont été isolés par stries répétées sur plaques PCA.

Des emballages de lait au chocolat non contaminé ont été inoculés au moyen de seringues et d'aiguilles stériles avec des cultures de bouillon nutritif (BN) des isolats individuels et scellés avec de la cire de paraffine et incubées à température ambiante pendant 24 h pour déterminer les spoilers (Joan et Alfred, 1990).

Après l'incubation des échantillons ont été prélevés sur tous les emballages gonflés et les organismes qui s'y trouvaient ont été observés pour confirmer qu'ils étaient l'organisme inoculant.

Des portions de 10 ml de BN dans des tubes à essai ont été inoculées avec une boucle d'une culture en bouillon de 48 h de chaque isolat et placées dans des bains-marie de températures différentes. À diverses durées après avoir atteint les températures appropriées (environ 10 min), une boucle du contenu de chaque tube à essai a été transférée sur des plaques d'agar nutritif (AN) et incubée à température ambiante pendant 48 h pour évaluer la tolérance à la température des spoilers (Joan et Alfred, 1990).

La tolérance au H₂O₂ a été testée en inoculant des échantillons de 5 ml de différentes concentrations de H₂O₂ dans de l'eau distillée stérile avec une boucle de culture BN de 48 h de chaque isolat et maintenus à température ambiante. A différentes périodes de temps après l'inoculation, la croissance a été déterminée par transfert sur NA et incubation pendant 48 h à température ambiante (Joan et Alfred, 1990).

Des portions de 5 ml de BN dans des tubes à essai ont été inoculées avec une boucle de chaque isolat. Les cultures ont été incubées à 4, 26,5, 30 et 37 ° C de manière aérobie et anaérobie pour évaluer l'effet de la température sur la croissance, celle-ci a été mesurée par absorbance de la lumière sur un spectrophotomètre Spectronic 20 à 660 nm. Le temps de

génération (g) a été calculé à partir de la période entre la 1ère et la 4ème h de la phase de croissance exponentielle au moyen de l'équation suivante:

$$g = \frac{T_2 - T_1}{\log_{10} N_2 - \log_{10} N_1 / \log_{10} 2}$$

Où N_1 et N_2 sont l'absorbance aux temps T_1 et T_2 respectivement.

Un test similaire a été effectué pour évaluer l'effet du pH sur la croissance. Dans ce cas, les tubes de BN ont varié de pH et les organismes ont été incubés à 37°C. Pour identifier les isolats, leur croissance et leur activité ont été testées avec les milieux suivants qui ont tous été acquis auprès d'Oxoid Ltd.: Lactose, bouillon, lait de tournesol, gélose triple sucre fer, MacConkey Agar, gélose Koser citrate, bouillon MR-VP, gélose au bismuth et au sulfite, gélose verte brillante, milieu Baird Parker et gélatine nutritive (Joan et Alfred, 1990).

4.1.3. *Escherichia coli*

Avec la construction de nouveaux types d'équipements et la modification éventuelle des échangeurs de chaleur existants utilisés pour la pasteurisation du lait, plus de données sur le taux thermique de destruction des organismes en termes de D et Z valeurs serait souhaitable pour établir des normes réalistes pour de nouvelles procédures de pasteurisation du lait en haute plages de température. L'étude rapportée ici sur l'inactivation thermique d'*Escherichia coli* fait partie d'une étude générale de la résistance thermique de plusieurs organismes, principalement des agents pathogènes, qui peuvent être trouvés dans le lait au chocolat (Read et al., 1960).

E. coli a été inclus dans cette étude générale car il a été démontré qu'il avait une résistance à la chaleur de la même grandeur générale de plusieurs pathogènes étudiés précédemment (Read et al., 1957).

4.1.3.1. Matériel

- Lait chocolaté (396 ml).
- Milieu de culture : cerveau cœur.
- Suspension : eau distillée + l'organisme d'inclinaison standardiser par néphélométrie à une concentration cellulaire finale d'environ 1×10^8 par ml.

- Un ballon de distillation à trois cols de 500 ml.
- Tube échangeur de chaleur, est composé d'un réservoir en acier inoxydable de 5 gallons relié à un petit calibre tube en acier inoxydable composé d'un préchauffage et d'une section de chauffage (Read et *al.*, 1960).

4.1.3.2. Méthodes

a. La première phase

La détermination des pentes des courbes de taux de destruction thermique (valeurs D) pour *E. coli* (ATCC n° 9637) en suspension dans le lait au chocolat à la tenue températures de 125, 130 et 135 F (Read et *al.*, 1960).

L'organisme d'essai a été cultivé sur des pentes de gélose d'infusion cerveau-cœur (Difco) qui avait été incubé 24 + 2 heures à 98,6 F. Le calendrier de transfert a été maintenu tout au long de l'investigation.

L'inoculum d'essai a été préparé par suspendre les organismes de l'inclinaison dans l'eau distillée et standardiser cette suspension par néphélométrie à une concentration cellulaire finale d'environ 1×10^8 par ml.

Une aliquote de cette suspension cellulaire a été utilisée pour déterminer la concentration initiale exacte de l'organisme d'essai par des techniques standard de comptage sur plaque.

Un ballon de distillation à trois cols de 500 ml a été utilisé pour que le récipient de rétention expose le fluide de suspension contenant l'organisme d'essai vers les différentes exploitations des températures. Le col central du ballon a été utilisé pour accueillir une tige d'agitation motorisée.

Un thermomètre qui était auparavant calibré avec un certifié par le U. S. Bureau des normes ont été placés dans l'un des ports latéraux, tandis que l'autre orifice latéral a été utilisé pour l'inoculation de l'organisme d'essai et pour l'échantillonnage.

Un Bain-marie à température constante d'une précision de ± 0.02 F a été utilisé pour l'appareil de chauffage avec le niveau d'eau dans le bain toujours au moins $\frac{1}{2}$ au-dessus du vide menstruel dans le ballon à trois cols.

En quantité de 396 ml de lait au chocolat, a été ajouté au ballon et porté à la température désirée tout en étant continuellement agité.

L'inoculum, 4 ml de la suspension bactérienne ajustée, a ensuite été introduit dans le ballon. Cela a abouti à une concentration finale de l'organisme d'essai d'environ 1×10^6 cellules par ml.

Le lait au chocolat utilisé dans cette enquête comme un fluide de suspension a été obtenu de l'Université de Massachusetts Dairy. Il a été préparé en chauffant 396 ml de lait cru à 100 F et en ajoutant à cela 24,0 g de sucre granulé et 4,8 g de cacao en poudre (Van Houten's Suma Dutch Processus) (Read et al., 1960).

L'échantillon a été prélevé avec une pipette automatique, calibré pour délivrer des volumes de 1 ml à l'intervalle de temps approprié, et un refroidissement immédiat a été obtenu en expulsant l'échantillon dans des blancs de dilution d'eau distillée. Le temps nécessaire à cette opération était de 3 à 5 secs. Depuis la température de l'eau distillée les blancs étaient toujours inférieurs à 80 F après l'inoculation, non la létalité a été attribuée au refroidissement à une température non létale (Read et al., 1960).

Les numérations bactériennes après chauffage ont été déterminées par la technique de la plaque de coulée utilisant l'infusion cerveau-cœur agar comme milieu de récupération. L'échantillon a été étalé dans les 10 min après la collecte et incubé à 98,6 F pendant 24 à 36 heures avant le comptage. Étant donné que le lait au chocolat utilisé dans ces études n'étaient pas stériles avant la inoculation de l'organisme d'essai, les dénombrements finaux ont été déterminés en comptant les colonies typiques de l'organisme d'essai (Read et al., 1960).

La courbe de taux de destruction a été construite par tracer les survivants bactériens sur l'échelle logarithmique (ordonnée) par rapport au temps d'exposition respectif sur l'échelle linéaire (abscisse) sur papier millimétré semi logarithmique. Une ligne de meilleur ajustement visuel a été dessinée qui satisfait le mieux les points résultants et la valeur D a été prise comme pente de cette ligne.

La courbe de temps de mort thermique pour cet organisme a été déterminée en traçant la moyenne D valeurs obtenues pour chacune des températures de processus utilisé pour un fluide d'essai donné sur l'échelle logarithmique par rapport à la température respective sur l'échelle linéaire de papier millimétré semi logarithmique (Read et al., 1960).

$$X_n = \frac{U}{\text{Log } a - \text{Log } b}$$

b. La deuxième phase

Cette phase implique les températures d'exposition ont été effectuées dans un tube échangeur de chaleur (Read et al.1956).

Dans ces études, le chauffage a été réalisé en deux sections du tube. La première, qui a été désignée comme la section de préchauffage, sur élevée la température du fluide d'essai à une température constante de 120 F. La seconde, ou la section de chauffage a été utilisé pour augmenter la température du fluide de 120 F à la température de chauffage finale du processus. Les températures ont été mesurées par des thermocouples placés directement dans le flux du véhicule d'essai .Le temps de chauffage a été maintenu à 0,25 sec (Read et *al.*, 1960).

La méthode utilisée pour préparer l'inoculum bactérien était similaire à celle décrite pour la basse température enquêtes de la première phase.

Un gallon de fluide de suspension a été placé dans le réservoir de rétention de l'instrument et mélangé avec 190 ml de suspension bactérienne. Pour assurer l'homogénéité, le mélange a été agité manuellement avant le chauffage processus.

Le lait au chocolat utilisé comme fluide de suspension dans cette expérience est le même que celui utilisé dans la première phase de ce travail (Read et *al.*, 1960).

Lors de la préparation de ce produit à haute température études d'échange de chaleur, les ingrédients ont été mélangés tout en étant chauffé à 100 F qui n'a pas toujours complètement dissoudre l'émulsifiant. Parce que la nature de l'échangeur de chaleur à petit alésage est telle qu'il est incapable de tolérer grosses particules, le mélange a été filtré à travers deux doubles couches de gaze avant le traitement .Des échantillons de contrôle non chauffés ont été prélevés au début, à mi-chemin et à la fin de chaque expérience. Les échantillons ont été refroidis par collecte en eau distillée stérile et pré-refroidi (Read et *al.*, 1960).

Placage et les méthodes de dénombrement étaient identiques à celles décrites pour l'étude à basse température.

Les valeurs D dans cette phase d'étude ont été déterminées mathématiquement en utilisant la méthode de Stumbo, Murphy et Cochran (1950). La formule utilisée est la suivante:

U est le temps de maintien à une température donnée n

a est la concentration bactérienne initiale,

b est le concentration des survivants bactériens après exposition à température n pour U temps.

Depuis l'échange de chaleur appareil basé son efficacité principalement sur le temps de chauffe à une température donnée, le maintien total le temps (U) était par conséquent inconnu et devait être déterminé par la conversion du temps de chauffage en létalité du temps de maintien. Il fallait calculer un temps de maintien individuel pour chacune des températures enquêté avec chacune des menstruations. Cela a été fait en traçant une courbe de temps de mort thermique à partir des résultats des investigations à basse température de l'organisme dans le fluide de suspension étudié. Cette courbe était extrapolée pour fournir les valeurs D théoriques d'organisme à des températures aussi élevées que la température maximale de processus utilisée (Read et *al.*, 1960).

Les taux létaux ($1/j$) de l'organisme a été calculé à partir des valeurs D liées à températures comprises entre le préchauffage et la température finale de chauffage. Ces températures étaient alors liées graphiquement aux durées de chauffage sélectionnées à partir de 0,0 sec, pour une température initiale de chauffage de 120 F, à 0,25 s pour la température finale de chauffage. Le temps de chauffage pour les températures intermédiaires a été calculé par interpolation. Cela pourrait être fait depuis les caractéristiques de chauffage dans le tube chauffant ont été trouvées être linéaire (Read et *al.*, 1960).

Les taux létaux correspondant à un échauffement donné les températures étaient corrélées aux temps de chauffage auxquels les températures particulières ont été obtenues. Un complot de létalité, avec un temps de maintien arbitraire, a ensuite été dessiné qui correspond à la température finale de chauffage. La zone sous la courbe de chauffe et la courbe de temps de maintien standard a été déterminée avec un planimètre polaire compensateur. En établissant un ratio de la surface totale au temps de maintien entre les deux courbes, le temps de maintien (U) a été calculé pour l'original courbe de temps de chauffage. Cela a été effectué pour chaque finale température de chauffage et fluide de suspension étudiée (Read et *al.*, 1960).

4.1.4. Staphylocoques

Une épidémie de gastro-entérite dans un district scolaire aux États-Unis a été déterminée comme étant une intoxication alimentaire staphylococcique due à du lait au chocolat à 2% contenant de l'entérotoxine staphylococcique A (SEA) (Mary et *al.*, 1988).

4.1.4.1. Matériel

- Douze demi-pointes de lait au chocolat 2% associé épidémiologiquement à l'épidémie de gastro-entérite chez les écoliers.
- Six cartons d'une demi-pinte de lait au chocolat 2% provenant de la même usine laitière, mais non associés à une gastro-entérite, ont été fournis comme témoins.
- des sacs de dialyse.
- Polyéthylène glycol 20 M (Carbowax; Union Carbide Corp., Chicago, IL).
- Série de SEA (10 ng à 0,625 ng).
- Lait témoin.
- Immunisant des lapins avec le SEA purifié.
- Test ELISA.

4.1.4.2. Méthodes

a. Extraction du lait au chocolat

- 40 ml de lait au chocolat de chaque carton d'une demi-pinte ont été ajustés à pH 4,5 et centrifugés (Mary et *al.*, 1988).
- Le liquide surnageant a été ajusté à pH 7,5 et mélangé pendant 5 pluies avec CHCl₃ (concentration finale de 10%) (Freed et *al.*, 1982).
- Les échantillons ont été centrifugés et filtrés sur Miracloth (plus disponible) pour éliminer le CHCl₃ et toute matière particulaire.
- Les fluides surnageants ont été placés dans des sacs de dialyse et concentrés dans le composé de polyéthylène glycol 20 M (Carbowax; Union Carbide Corp., Chicago, IL).
- Les fluides concentrés ont été dialysés contre une solution saline tamponnée au phosphate 0,01 M à pH 7,2 avec plusieurs changements de tampon (= 5 ° C).
- Les solutions dialysées ont été ajustées à un volume standard pour chaque groupe d'expériences pour l'analyse des entérotoxines.

b. Normes

La courbe standard pour SEA a été préparée à partir de l'analyse de dilutions en série de SEA (10 ng à 0,625 ng) ajoutées à l'extrait d'un échantillon de lait témoin. Une courbe standard a été préparée pour chaque groupe d'analyses (Mary et *al.*, 1988).

c. Détermination de la récupération des entérotoxines

- SEA a été ajouté au lait témoin (0,5 et 1,0 ng / ml) et les échantillons ont été traités de la même manière que le lait au chocolat de l'épidémie.
- La quantité de SEA détectée dans les extraits concentrés a été divisée par le facteur de concentration (2,5) et par la quantité de SEA ajoutée au lait pour déterminer le pourcentage de récupération.
- Les pourcentages de récupération ont été utilisés pour calculer la quantité de SEA présente dans le lait au chocolat avant l'extraction en divisant les quantités obtenues par le pourcentage de récupération (Mary et *al.*, 1988).

d. Analyse des entérotoxines

Les analyses des entérotoxines ont été réalisées par le test immunoenzymatique (ELISA) selon la méthode de la plaque de microtitration décrite par Freed et al. (1982) avec les variations suivantes.

L'incubation après l'ajout du conjugué anticorps-enzyme a duré 15 min ; les lectures ont été prises 20-30 min après l'ajout du substrat avec un lecteur de plaque micr 97 ELISA sans l'ajout du réactif d'arrêt.

Chapitre 5

Résultats et discussion

5.1. Résultats et discussion

5.1.1. *Listéria monocytogènes*

5.1.1.1. Résultats

L'analyse de deux cartons de lait au chocolat non ouverts, l'un provenant du pique-nique et l'autre produit le même jour à la laiterie montrés respectivement 1,2109 et 8,8108 unités formant colonie (UFC) de *L. monocytogenes* par millilitre (Graig et al., 1997).

5.1.1.2. Discussion

Les résultats suggèrent qu'il y avait une forte association entre la consommation de lait au chocolat contaminé par *L. monocytogenes* et la maladie. Le lait au chocolat contenait des niveaux très élevés de *L. monocytogenes* (Graig et al., 1997).

La plupart des cartons de lait au chocolat servis lors du pique-nique du 9 juillet portaient la date d'expiration du 12 juillet. L'arôme de chocolat a été ajouté avant que le lait ne soit pasteurisé à 87 °C ou plus pendant 18 secondes; le lait a été immédiatement refroidi à moins de 8°C (Graig et al., 1997).

L'inspection a révélé une brèche dans la doublure qui permettait au lait de s'infiltrer dans la gaine isolante, créant une mare de lait séquestré. Lorsque le réservoir était vidé, le lait séquestré pouvait rentrer par la brèche. Les pulvérisateurs de solution désinfectante étaient gravement obstrués, ce qui empêchait l'écoulement de la solution désinfectante sur le revêtement du réservoir (Graig et al., 1997).

Cette épidémie a probablement été causée par une contamination post-pasteurisation due à de mauvaises pratiques d'assainissement dans la société laitière et exacerbée par le maintien des températures en transit vers le pique-nique qui a permis la croissance rapide de *Listeria* (Graig et al., 1997).

Ces résultats sont similaires aux résultats obtenus par Sarah et al (1999) qui montrent que l'usine dans laquelle les produits ont été transformés a considérablement influencé les nombres microbiens finaux, ce qui suggère que les paramètres et les conditions de transformation affectent la qualité du produit. L'interaction significative produit par plan indique que les produits de certains plans présentaient des différences de numération bactérienne plus importantes.

Les différences de produits entre les usines étaient probablement dues à des facteurs multiples et variés existant dans les environnements de traitement, le personnel, l'équipement et les paramètres de traitement. Les différences entre les températures et les temps de traitement pour les usines peuvent expliquer en partie les différences entre les modèles de détérioration des plans. Des températures de pasteurisation plus élevées et des temps de rétention plus longs semblent être associés à une diminution du nombre de bactéries au jour 14 dans le lait au chocolat (Sarah et *al.*, 1999).

Des facteurs de transformation supplémentaires semblent se combiner pour affecter la qualité finale du produit. L'un de ces facteurs est probablement les systèmes d'emballage utilisés. Les charges ont été identifiées comme des sources courantes de contamination post-pasteurisation (Sarah et *al.*, 1999).

Une usine qui applique le procédé d'emballage scellé TR7 est ainsi protégée de l'environnement. Cet appareil est également nettoyé et désinfecté automatiquement. D'autres systèmes d'emballage sont ouverts à l'environnement et doivent être démontés pour le nettoyage et la désinfection, permettant un plus grand contact avec l'environnement environnant (Sarah et *al.*, 1999).

D'autre côté d'après Sarah et *al.* (1999) les analyses du nombre de bactéries dans les produits laitiers au chocolat commerciaux ont indiqué que les propriétés intrinsèques des produits laitiers au chocolat étaient les principaux facteurs contribuant à l'augmentation relative du nombre de bactéries dans ces produits, car ils contiennent du chocolat en poudre, du sucre et un stabilisant.

Les résultats suggèrent que la poudre de chocolat a contribué à l'augmentation relative de nombre de bactéries dans le lait au chocolat, mais que le saccharose n'a pas contribué à cet effet. La poudre de chocolat utilisée dans la préparation des transformateurs de lait a été examinée pour le nombre de bactéries, et aucune croissance bactérienne n'a été observée à partir d'échantillons de chocolat en poudre soit soumis à un choc thermique, soit non traitée, indiquant que le nombre de bactéries dans la poudre était inférieur à nos limites de détection (10 CFU / g) (Sarah et *al.*, 1999).

Il est possible, Cependant que la poudre de chocolat ait introduit de faibles nombres de contaminants qui étaient capables de se reproduire aux températures de réfrigération. Bien que la poudre de chocolat puisse héberger des bacilles et des microcoques, nos résultats confirment les rapports précédents suggérant que la poudre de chocolat n'introduit pas nécessairement un

nombre significatif de bactéries dans une formulation de lait au chocolat. En fait, il a été précédemment rapporté que le cacao inhibait la croissance de divers organismes, y compris *Salmonella spp* et *Listeria monocytogenes* en bouillon de culture. Cependant, l'ajout de caséine masquait ces effets inhibiteurs (Sarah et al., 1999).

Gabis et collont rapporté que, bien que l'addition de 1,5% de cacao au lait entier avec 5% de sucre ait initialement ralenti la croissance des organismes inoculés, cette inhibition a été surmontée après 7 jours. De plus, les ingrédients du lait au chocolat ont amélioré la croissance de certaines bactéries dans le lait. (Sarah et al., 1999)

Rosenow et Marthont constaté que l'ajout de cacao au lait diminuait le temps de génération relatif de *L. monocytogenes*, mais que les populations étaient les plus élevées dans les échantillons contenant tous les ingrédients du lait au chocolat (cacao, sucre et carraghénane) après 8 jours à 13 ° C. On a émis l'hypothèse que la caséine masquait d'éventuels effets bactéricides du cacao, et en outre, le cacao a été suggéré d'ajouter des acides aminés essentiels, des peptides ou des facteurs de croissance importants pour la croissance de *L. monocytogenes*(Sarah et al., 1999).

Les auteurs ont également émis l'hypothèse que l'ajout de carraghénane, un stabilisant commun utilisé dans le lait au chocolat, réduisait encore le temps de génération de *L. monocytogenes* en maintenant le cacao en solution. Nos résultats soutiennent l'hypothèse selon laquelle l'ajout de poudre de chocolat au lait peut contribuer à une plus grande augmentation relative du nombre de bactéries dans les produits laitiers au chocolat que dans les produits laitiers non aromatisés assortis pendant le stockage réfrigéré. En plus des augmentations relatives plus importantes du nombre de bactéries dans le lait au chocolat que dans le lait sans saveur pendant le stockage, d'autres facteurs intrinsèques à la production de lait aromatisé contribuent probablement aussi à l'augmentation du nombre de bactéries dans les produits au lait au chocolat (Sarah et al., 1999).

La production de lait au chocolat implique plus d'étapes de transformation que la fabrication de lait sans saveur (par exemple, l'ajout d'arôme et le mélange et le pompage subséquents), créant ainsi potentiellement des opportunités supplémentaires de contamination bactérienne des produits laitiers au chocolat. Ces résultats sont similaires aux résultats obtenus par Eileen et Elmer (1987) qui montrent que la présence à la fois de poudre de cacao et de sucre de canne a contribué à une croissance accrue de *L. monocytogenes* dans du lait à 2%, bien que pas toujours à un degré statistiquement significatif.

Lorsque le sucre, le cacao et la carraghénine ont été ajoutés au lait, les populations finales obtenues dans ce substrat par les deux souches de *L. monocytogenes* étaient significativement plus importantes que dans le lait à 2% (Eileen et Elmer, 1987).

Le premier est peu probable car il n'a pas réussi à augmenter la croissance, en termes de population finale, lorsqu'il était utilisé en conjonction avec le cacao seul. Il n'est pas surprenant que le sucre de canne améliore le lait comme substrat de *L. monocytogenes*; en réalité, cette amélioration était minime pour les deux souches de la bactérie. Bien que des différences aient été notées dans la capacité de diverses souches de *L. monocytogenes* à métaboliser le saccharose, les résultats n'indiquent pas de telles différences pour nos souches (Eileen et Elmer, 1987).

De plus, la présence de saccharose dans le lait au chocolat pourrait entraîner une augmentation de la résistance de *L. monocytogenes* à la chaleur, tout comme le saccharose pour *Salmonella*. Cela doit être déterminé afin que le lait au chocolat puisse être traité de manière appropriée pour assurer la destruction de *L. monocytogenes* (Eileen et Elmer, 1987).

Il a été rapporté que le cacao inhibe la croissance de *Salmonella*. Cependant, l'effet des anthocyanes de cacao sur les salmonelles peut être neutralisé par la caséine. Par conséquent, les salmonelles peuvent survivre dans le cacao avec de la caséine et provoquer plus tard des maladies. Peut-être que la caséine dans le lait que nous avons utilisé a empêché la poudre de cacao de supprimer la croissance de *L. monocytogenes*. La caséine à 2,5% présente dans le lait à 2% se rapproche des 3% démontrés pour annuler l'inhibition des salmonelles par le cacao. Cependant, cela n'explique pas l'augmentation de la croissance de *L. monocytogenes* associée à la présence de cacao dans le lait. L'ajout de sucre ou de cacao au lait améliore la croissance de *L. monocytogenes*, mais pas de manière significative (Eileen et Elmer, 1987).

Cependant, des travaux supplémentaires sont nécessaires pour voir si le cacao a des propriétés antimicrobiennes contre *L. monocytogenes* en l'absence de caséine. Si tel est le cas, les effets neutralisants possibles de la caséine peuvent être importants. Ces expériences n'incluaient pas tous les ingrédients du lait au chocolat commercial; cependant, tous ses composants primaires ont été utilisés (Eileen et Elmer, 1987).

L'effet des autres ingrédients présents dans le lait au chocolat en petites quantités, comme l'amidon utilisé dans les granulés de cacao du commerce, a été jugé négligeable. Par conséquent, ils n'ont pas été testés. Bien que les résultats de ces expériences suggèrent que chacun des principaux ingrédients du lait au chocolat contribue positivement au mélange final en tant que

substrat pour la croissance de *L. monocytogenes*, ils soulèvent des questions sur les effets du cacao sur cet organisme (Eileen et Elmer, 1987).

Des travaux supplémentaires sont nécessaires pour bien comprendre les effets. Aucun foyer de listériose n'a jusqu'à présent été associé au lait au chocolat, bien que la bactérie ait été trouvée dans ce produit. Étant donné que *L. monocytogenes*, s'il est présent, se développera dans le lait au chocolat à la température de réfrigération (4 ° C), il existe un risque d'épidémie de maladie. Compte tenu de la manipulation supplémentaire que le lait au chocolat reçoit pendant le traitement et de la résistance à la chaleur unique de *L. monocytogenes* (qui peut éventuellement être renforcée par le saccharose), toutes les précautions doivent être prises pour inactiver la bactérie (par une pasteurisation efficace), puis pour empêcher son introduction dans le lait au chocolat après pasteurisation (Eileen et Elmer, 1987).

5.1.2. FTAM

5.1.2.1. Résultats

Sur les 62 paquets de lait au chocolat testés, 47 ne présentaient aucune numération bactérienne sur PCA, tandis que 15 présentaient des comptages allant de $2,0 \times 10^7$ à $5,6 \times 10^9$ CFU / ml (Joan et Alfred, 1990).

Les caractéristiques des colonies et les observations microscopiques des organismes cultivés sur PCA ont révélé deux types de bactéries. L'une caractérisée par des colonies circulaires concaves blanches avec des marges lisses est un bâtonnet Gram négatif court et épais, et l'autre caractérisée par des colonies circulaires mucoïdes blanches avec des marges lisses et disposées principalement par paires est un coccus Gram positif. Le premier a été identifié comme *Enterobacter* sp basé sur l'aspect mucoïde rose de ses colonies sur MacConkey Agar et sa réaction gram-négative. Ce dernier a été identifié comme *Micrococcus* sp car il était catalase positif et donnait naissance à de minuscules colonies noires sans compensation sur milieu Baird Parker (Joan et Alfred, 1990).

Le tableau 2 montre les caractéristiques des deux isolats. Les deux font partie des organismes aéroportés qui ont été identifiés comme présents dans une usine de transformation laitière (Joan et Alfred, 1990).

L'*Enterobacter* sp pouvait survivre à l'ébullition pendant 5 minutes, et le *Micrococcus* sp pourrait survivre à l'ébullition aussi longtemps que 10 min. Les deux micro-organismes étant éliminés après une exposition à 30% H₂O₂ pendant 15 sec.

La polyvalence des spoilers est démontrée par leur capacité à se développer sur les larges plages de pH et de températures testées, soit en aérobie, soit en anaérobie. Des temps de génération de 1,75 h (anaérobie) et 2,30 h (aérobie) et 2,25 h (anaérobie) et 4,30 h (aérobie) ont été présentés par les espèces *Entérobacter* et *25 Micrococcus*, respectivement, à 4 ° C. Les deux organismes ont grandi à pH 4,5, présentant des temps de génération de 1,85 (anaérobie) et 1,82 (aérobie) pour l'*Entérobacter* et 219 (anaérobie) et 1,35 (aérobie) pour *Micrococcus* (Joan et Alfred, 1990).

Tableau 2: Quelques caractéristiques métaboliques et de croissance des isolats bactériens (Joan et Alfred, 1990)

Teste	Isolât	
	Bâtonnet	Coccus
Bouillon de lactose	AG	UNE
Rouge de méthyle	-	N / A
Voges-Proskauer	-	N / A
Citrate	+	N / A
Indole	-	N / A
Fer à sucre triple	AG: H ₂ S Nég	A: H ₂ S Nég
Gélatine nutritive	liquéfaction	liquéfaction
Catalase	+	+
Lait de tournesol	AG: caillé	A: caillé
Sulfite de bismuth	Colonies vertes	pas de croissance
Vert brillant	pas de croissance	N / A
Baird-Parker	pas de croissance	minuscule, noir colonies
MacConkey	Mucoïde rose colonies	pas de croissance
Réaction de Gram	-	+

Tableau 3: Effet de la concentration d'inoculum sur le taux d'altération (Joan et Alfred, 1990)

Inoculum le volume (ml)	Nombre estimé d'organismes / ml de		Temps nécessaire aux signes visibles de détérioration par	
	Coccus	Bâtonnet	Coccus	Bâtonnet
0,1	151	134	72 heures	24 heures
0,3	454	403	72 heures	18 heures
0,5	756	672	48 heures	12 heures
0,7	1058	941	36 heures	12 heures

5.1.2.2. Discussion

La preuve que ces deux isolats étaient en fait des altérateurs était le gonflement des paquets de lait au chocolat qui avaient été inoculés avec l'un ou l'autre *Enterobactersp* ou *Micrococcussp*, et l'isolement et la confirmation des isolats inoculés à partir des emballages gonflés (Joan et Alfred, 1990).

De plus, il y avait une relation distincte entre la taille de l'inoculum et le début du gonflement des emballages (tableau 3). La tige gram-négative a provoqué un gonflement plus rapide, peut-être parce qu'elle est un producteur de gaz plus avide que le coccus gram-positif. En fait, des tests de fermentation avec du bouillon de lactose, de la gélose triple sucre fer et du lait de tournesol ont confirmé cette suggestion (tableau 2). La production de gaz par le coccus gram positif n'était pas significative sur ces substrats. Mis à part le lait au chocolat, les deux organismes ont pu faire gonfler des paquets de lait traité UHT, de lait de poule et de punch aux arachides. Les deux derniers sont des boissons aromatisées au lait populaires utilisées à Trinidad (Joan et Alfred, 1990).

Comme la chaleur est utilisée pour stériliser le lait au chocolat et le H₂O₂ utilisé pour laver les machines et le matériel d'emballage, l'effet des deux contre les organismes de détérioration a été testé. L'*Enterobactersp* pouvait survivre à l'ébullition pendant 5 minutes et le *Micrococcussp* pourrait survivre à l'ébullition aussi longtemps que 10 min. Ce degré remarquablement élevé de tolérance à la chaleur présenté par les deux organismes, qui n'a jamais montré de signes de sporulation, n'est pas normal pour *Enterobactersp*. L'effet de H₂O₂ sur les spoilers était assez encourageant, les deux organismes étant éliminés après une exposition à 30% H₂O₂ pendant 15 sec (Joan et Alfred, 1990).

La polyvalence des spoilers est démontrée par leur capacité à se développer sur les larges plages de pH et de températures testées, soit en aérobie, soit en anaérobie. Des temps de génération de 1,75 h (anaérobie) et 2,30 h (aérobie) et 2,25 h (anaérobie) et 4,30 h (aérobie) ont été présentés par les espèces *Enterobacter* et 25 *Micrococcus*, respectivement, à 4 ° C. Les deux organismes ont grandi à pH 4,5, présentant des temps de génération de 1,85 (anaérobie) et 1,82 (aérobie) pour *Enterobacter* et 219 (anaérobie) et 1,35 (aérobie) pour *Micrococcus*. La capacité de croître à basse température et à faible pH est importante car ce sont des méthodes utilisées pour empêcher la détérioration des aliments (Joan et Alfred, 1990).

La présence d'*Enterobactersp* dans les aliments suggère une contamination par les eaux usées et les sources humaines et est donc d'importance pour la santé publique, et la tolérance à

la température des deux spoilers pourrait avoir de sérieuses implications sur les niveaux acceptables de traitement thermique utilisés dans la conservation des aliments (Joan et Alfred, 1990).

5.1.3. *Escherichia Coli*

5.1.3.1. Résultats

Tableau 4: Valeurs D d'*E.coli* A TCC no 9673 au lait au chocolat(Read et *al.*, 1960).

Temperature de maintien	Nbrd'essais de	Valeur D moyenne	Gamme
F		Min	min
125	5	32.2	29.6 – 33.2
130	5	10.4	9.5 - 12.3
135	5	2.6	2.4 – 2.9
168	8	0.00265	0.00245 – 0.00290
170	8	0.00133	0.00124 – 0.00160
172	8	0.00069	0.00064 – 0.00076
174	8	0.00035	0.00035 – 0.00035
176	8	0.00028	0.00027 – 0.00030

Tableau 5: Températures d'entretien requises pour produire une létalité de 10 D pour *E. coli* A TCC N° 9637 pour quatre temps d'attente différents(Read et *al.*, 1960).

Viéculé	Temps de maintien			
	30.0 min	15.0 sec	1.0 sec	0.1sec
Lait	F	F	F	f
au chocolat	135.2	156.3	168.3	178.5

5.1.3.2. Discussion

Les résultats d'*E.coli* montrant les valeurs moyennes de D et la gamme de lait au chocolat étudiés se trouvent dans Tableau 4.

Bien que l'instrument utilisé fût telle que les valeurs D intermédiaires ne pouvaient être obtenues entre les études à basse et haute température, il est tentant de tracer ces valeurs sur papier semi-logarithmique pour avoir une idée sur les valeurs z de cet organisme dans le lait au chocolat. Lorsque cela est fait la valeur z de 10.2 F est obtenue pour le lait au chocolat. Il apparaît aussi qu'à 150 F, le lait au chocolat est la meilleure protection contre *E. coli* (Read et al., 1960).

Lorsque ces résultats dans le lait sont comparés à ceux de Holland et Dahlberg (1940), qui ont rendu compte d'un *E. coli* réputé pour sa résistance thermique, on le trouve l'organisme était considérablement plus résistant que la souche utilisée dans la présente étude (Read et al., 1960).

Hollande et Dahlberg signalé 99,99% de points de destruction. C'est aussi intéressant à noter que les données de Holland et Dahlberg donnent un valeur Z de 9,5 F contre 10,2 trouvés dans cette étude (Read et al., 1960).

Un problème associé à ce type de travail est la possibilité de changement de la résistance thermique de l'organisme d'essai. Des études ont été réalisées avec cet organisme auparavant et une extinction moyenne température de 174,5 rapportée pour $8,0 \times 10^6$ cellules par ml en utilisant un processus similaire à la haute température processus rapporté ici (Read et al., 1957).

Quand ces résultats sont comparés à ceux de la présente enquête, on voit que la résistance thermique est légèrement plus élevée dans la présente étude. Au cours de cette étude, il était constaté que les valeurs D étaient constantes sur une période de 2 ans période de réévaluation périodique. Les deux cultures portent le même numéro ATCC et ont été obtenus auprès de l'American Type Culture Collection à l'initiation de chaque étude (Read et al., 1960).

Puisque l'industrie laitière est principalement intéressée par des valeurs de processus plutôt que des valeurs D, les résultats peuvent être exprimés en valeurs 10 D pour obtenir ce que les auteurs considèrent comme une valeur de processus réaliste. La justification derrière cela a été discuté (Daoust et al., 1960). Températures de traitement pour cinq sélectionnées arbitrairement les temps de maintien sont indiqués dans le tableau 5 (Read et al., 1960).

5.1.4. Staphylocoque

5.1.4.1. Résultats

a. Récupération de SEA

La récupération du SEA ajouté au lait au chocolat 2% non contaminé est indiquée dans le tableau 6. Cela a été fait parce que les quantités détectées dans le lait contaminé étaient comprises entre 0,5 et 0,75 ng / ml (Mary et *al.*, 1988).

Tableau 6: Récupération d'entérotoxine A dans le lait au chocolat 2% (Mary et *al.*, 1988)

SEA ajouté (ng / ml)	Extraction% N°	Récupération			Global moyenne
		analyse 1	analyse 2	moyenne	
0,5	1	34,00	36,00	35,0	37,0
	2	42,00	36,00	39,0	
1,0	1	49,00	45,00	47,0	42,8
	2	48,00	39,00	38,5	
Tous les échantillons		40,8	39,00	39,9	39,9

b. Quantité de SEA dans le lait contaminé

La quantité de SEA dans les extraits concentrés a été déterminée à partir de la courbe standard préparée à partir des lectures résultant du SEA ajouté à un extrait de lait témoin. La quantité de SEA trouvée dans les extraits de lait concentré, la quantité calculée pour être présente dans le lait avant l'extraction et la quantité présente dans les cartons d'une demi-pinte est présentée dans le tableau 7.

Les échantillons du groupe 1 ont été concentrés 3 fois et ceux du groupe 2 ont été concentrés 4 fois. Pour déterminer la quantité présente dans le lait, la quantité présente dans les extraits concentrés a été divisée par le degré de concentration et le pourcentage de récupération. La quantité par carton a été déterminée en multipliant la quantité / ml par 236 ml (volume d'un carton).

Tableau 7: Analyse des entérotoxines du lait au chocolat 2% (Mary et *al.*, 1988).

Échantillon	SEA en extrait concentré (ng / ml)	SEA dans le lait (ng / ml)	SEA en ½ pinte (ng)	Moyenne (ng / ½ pinte)
Groupe 1				
1	0,48	0,40	94	129
2	0,53	0,45	106	
3	0,58	0,48	113	
4	0,75	0,63	149	
5	0,68	0,58	137	
6	0,87	0,73	172	
Groupe 2				
1	1,20	0,73	177	150
2	0,80	0,50	118	
3	1,00	0,62	146	
4	1,23	0,78	184	
5	1,20	0,75	177	
6	1,03	0,65	153	
Tous les échantillons		0,61	144	144

5.1.4.2. Discussion

La détermination de la quantité d'entérotoxine staphylococcique consommée par les personnes rendues malades à partir d'aliments impliqués dans des épidémies d'intoxication alimentaire staphylococcique n'a pas été faite. Bien que des analyses d'entérotoxine dans les aliments concernés aient été effectuées, en raison de la répartition inégale de l'entérotoxine dans les aliments contaminés et de la différence des quantités d'aliments ingérés, il était impossible de déterminer la quantité réelle consommée. Bien que la petite quantité d'entérotoxine (144 + 50 ng) nécessaire pour provoquer la maladie chez les écoliers puisse être due en partie au plus jeune âge des personnes concernées, les résultats antérieurs de l'analyse des entérotoxines des aliments impliqués dans des épidémies d'intoxication alimentaire indiquaient que la quantité requise était faible (Bergdoll, 1979).

L'épidémie parmi les écoliers a fourni une excellente occasion d'obtenir des informations fiables sur les quantités d'entérotoxines nécessaires pour provoquer la maladie, car dans presque tous les cas, la quantité de lait consommée était connue et le nombre d'élèves impliqués était suffisant pour que les conclusions soient fiables (Mary et *al.*, 1988).

Les résultats préliminaires de l'analyse du lait au chocolat 2% sans extraction ni concentration ont indiqué la présence de SEA à un faible niveau, environ 0,42 ng / ml ou 100 ng / carton. Ces valeurs ont été remises en question car elles étaient proches de la limite inférieure de détection. Il a été décidé que l'extraction du lait et la concentration de l'extrait devraient être effectuées pour donner des résultats plus fiables (Mary et *al.*, 1988).

Bien qu'il y ait eu des variations considérables dans les résultats obtenus, la moyenne globale de 144 + 50 ng / carton (tableau 7) est une valeur raisonnable, sur la base des résultats obtenus lors des épidémies précédents. Seule une partie de la variation de 35% des résultats peut être attribuée aux procédures d'extraction et de concentration (variation d'environ 10%, tableau 6); une grande partie peut être attribuée à une distribution inégale de la toxine dans le lait (Mary et *al.*, 1988).

Le lait au chocolat avait été conservé à l'état cru pendant plusieurs heures dans une cuve qui n'était pas suffisamment refroidie avant que le lait ne soit pasteurisé. La croissance des staphylocoques et la production d'entérotoxine se seraient produites principalement sur ou près de la surface du lait car l'oxygène est nécessaire pour la production d'entérotoxine. Même si le lait était prétendument agité quelques minutes par heure, il est peu probable que la toxine ait été uniformément distribuée avant la pasteurisation et le remplissage des cartons (Mary et *al.*, 1988).

La variation de la quantité d'SEA dans les cartons (94 à 184 ng / ml) peut expliquer le taux d'attaque de 31,3% de ceux qui n'ont bu qu'un seul carton par rapport au taux d'attaque de 37,6% pour ceux qui boivent plus d'un carton et le taux d'attaque de 44,4% pour ceux qui boivent trois cartons ou plus. Au moins un des étudiants qui ont bu trois cartons est tombé gravement malade. Le nombre moyen de cartons de lait au chocolat bu par les élèves qui ont vomi était de 1,33 (S.D. = 0,64), ce qui correspond à environ 192 ng de SEA (Mary et *al.*, 1988).

Les élèves plus jeunes semblaient être plus sensibles car le taux d'attaque de vomissements chez les élèves plus jeunes (5 à 9 ans) était plus élevé (42,0%) que chez les élèves plus âgés exposés (10 à 19 ans, 28,6%). Il peut être suggéré à partir de ces résultats que les élèves plus jeunes étaient plus sensibles à l'entérotoxine bien que la dose moyenne à 5-9 ans (1,42 cartons, 205 ng) était légèrement supérieure à la dose moyenne pour les 10 à 19 ans (1,25 cartons, 180 ng). Cela était dû à deux occasions d'exposition pour les plus jeunes enfants, qui avaient des pauses-collation en milieu de matinée en plus du déjeuner. Il est possible de conclure à partir de ces résultats que 200 ng ou moins de SEA peuvent provoquer la maladie chez les individus sensibles (Mary et *al.*, 1988).

Daniela et *al* (2009) montrent que l'entérotoxine Staphylococcique préoccupe l'industrie laitière en raison de la capacité de la toxine à résister aux combinaisons de temps et de température de pasteurisation couramment utilisées pour une large gamme de produits laitiers.

D'autres épidémies signalés, le principale cause de contamination dans les quelques cas signalés était toujours la post-pasteurisation en raison d'un équipement défectueux et de mauvaises pratiques de manipulation des produits. Des épidémies impliquant des laiteries biologiques relativement petites ont été signalées à plusieurs reprises; par exemple, 25 cas confirmés en laboratoire d'infection entéro hémorragique à *E. coli* O157 au Danemark en 2004. Les usines de production laitière hautement automatisées garantissent généralement un degré plus élevé de bonnes pratiques d'hygiène que dans les petites unités de production comme celle impliquée dans l'épidémie signalée (Daniela et *al.*, 2009).

Conclusion

Conclusion

On peut boire du lait aromatisé pour ses bienfaits nutritionnels et thérapeutiques. Étant donné que les enfants ne sont pas préparés à consommer du lait ordinaire de cette manière, il est nécessaire de modifier le lait de manière à ce qu'il soit plus acceptable pour les enfants de tous les groupes d'âge.

Le lait aromatisé à haute valeur nutritionnelle peut être une alternative riche en nutriments à cette catégorie de boissons, y compris les boissons gazeuses, les jus de fruits... etc. Bien que le lait aromatisé soit préparé avec pasteurisation, stérilisation ou traitement à ultra haute température (UHT), il existe de nombreuses maladies comme la gastro-entérite, peuvent être transportés à travers ces produits, en raison de leur contamination par les micro-organismes qui les provoquent. Cette contamination est due par un défaut dans le processus de la pasteurisation du lait aromatisé, d'emballage et le conditionnement, de transport et de conservation.

Pour éviter la contamination du lait aromatisé par des microorganismes pathogènes, il faut que les laiteries doivent surveiller leurs produits finis pour la détérioration et pour les agents pathogènes. Les dates d'expiration doivent être basées sur les résultats des analyses de contrôle microbiologique et le niveau général d'assainissement de l'usine, des normes élevées d'assainissement des installations devraient être maintenues grâce à un nettoyage, une désinfection et une maintenance adéquats des équipements guidés par un programme d'analyse des risques et de maîtrise des points critiques. Les consommateurs doivent conserver les produits laitiers pasteurisés à 4 ° C ou à des températures plus basses et doivent consommer les produits avant leur date d'expiration

Bibliographiques

Bibliographie

1. Anonyme, 2002. Le cacaoyer : l'arbre à chocolat <http://fauneetflore.haplosciences.com/cacao.htm>.
2. Arzate A. 2005. Extraction et raffinage du sucre de canne. Saint-Norbert d'Arthabaska. Centre de Recherche de Développement et de Transfert Technologique En Acériculture.
3. Balezi, Z. and G.N. Mushagalusa. 2018. Effets des techniques de transformation sur la qualité du fromage blanc traditionnel «Mashanza» produit au Sud-Kivu, RD Congo. *Journal of Animal & Plant Sciences*, 38(1):pp. 6097-6110.
4. Bergdoll M.S.1979. Staphylococcal infection. pp.443-494.
5. BindJI. 1991. Mise en évidence et dénombrement des *Listeria* à partir de produits laitiers. *Le Lait*, 71 (1). pp.99-105.
6. Blanc, B.(1982). Les protéines du lait à activité enzymatique et hormonale. *Le lait*, 62(617-620):pp. 350-395.
7. Blank I. et Spadone J.C. 2010. Arôme, Goût et Couleur. In : « Science et technologie des aliments ». Ed. Presses polytechniques et universitaires romandes, Lausanne. p.338.
8. Boularak A. 2005. Ministère du commerce : Guide des déterminations analytiques des laits et produits laitiers. la Direction Générale du contrôle Economique et de la Répression des Fraudes.
9. Brisabois A., LafargeV.,Brouillaud A., BuysenM.,Collette.,Garin B.et Thorat M. 1997. Les germes pathogènes dans le lait et les produits laitiers: situation en France et en Europe. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz*, 16(1):pp. 452-471.
10. Bureau G.1998. Emballage- conditionnement et microbiologie. Rôle du Conditionnement. In : *L'emballage des denrées alimentaires de grande consommation*. Ed. Tec & Doc, Lavoisier Paris, pp. 45-53.
11. Chapman et Hall. 1996. Emballage et conservation des produits alimentaires. Paris, p. 32
12. Cheftel, J. and Lorient D. 1982. Les propriétés fonctionnelles des protéines laitières et leur amélioration. *Le lait*, 62(617-620):pp. 435-483.
13. Chêne C.2004. Les Amidons – Dossier Technique. *Journal de l'Adrianor*. AgroJonction n°34.

14. Craig-Dalton B., Med B., Constance-Austin C., Jeremy Sobel., Peggy-Hayes S., William-Bibb F., Lewis-Graves M., BalaSwaminathan., Mary-Proctor E And Patricia-Griffin M. 1997. An outbreak of gastroenteritis and fever due to listeria monocytogenes in milk.pp.100-105.
15. Cuq, J. (2007).Contrôle microbiologique des aliments, Manuel technique. Polytech Département STIA, Univ Montpellier II.
16. Daniela Schmid., Rainer Fretz., Petra Winter., Michaela Mann., Gerda Höger., Anna Stöger.,WernerRuppitsch., Johann Ladstätter., Norbert Mayer., Alfred de Martin., Franz Allerberger.2009. Outbreak of staphylococcal food intoxicationafter consumption of pasteurized milk products,June 2007, Austria.121:pp.125–131.
17. Danthine S., Blecker C.,Paquot M., Innocente. et Deroanne C. 2000.Évolution des connaissances sur la membrane du globule gras du lait: synthèse bibliographique. Le lait, 80(2): pp. 209-222.
18. Daoust, D. R., Read R.B., Andw-Litsky Jr. 1960. Thermal inactivation studies on pathogenic bacteria in milk and various milk products. Corynebacterium diphtheriae.J.DairySci.44:pp.32-40.
Holland, R. F., And A. C. Dahlberg. 1940. The effect of the time and temperature of pasteurization upon some of the properties and constituents of milk. N. Y. StateAgr.Expt. Sta. Bull. No. 254.
19. Dieng, M.C. 2001. Contribution à l'étude de la qualité microbiologique des laits caillés industriels commercialisés sur les marchés dakarois. Méd. Vét., Dakar, (10): p. 91.
20. Eileen-RosenowM., and Elmer-Marth H. 1987. Addition of Cocoa Powder, Cane Sugar, and Carrageenan to Milk Enhances Growth of Listeria monocytogenes.pp.726-729.
21. Etournaud A. 2010. Contrôle des denrées alimentaires. In : « Science et technologie des aliments ». Ed. Presses polytechniques et universitaires romandes, Lausanne. pp.597-603.
22. Fischer M. 2010. Les glucides. In : « Science et technologie des aliments ». 1re édition. Presses polytechniques et universitaires romandes, Lausanne. pp. 240- 243.
23. Freed R.C., Evenson M.L., Reiser R.F and Bergdoll M.S.1982. Enzym-linked immunosorbent assay for detection of staphylococcal enterotoxins in foods.Environ Microbiol.44 :pp.1349-1355.

24. Hartman JW. 2007. Consumption of fat-free fluid milk after resistance exercise promotes greater lean mass accretion than does consumption of soy or carbohydrate in young, novice, male weightlifters, p. 86.
25. Ilboudo, A., A.Savado.,G.Seydi et S.Traore.2012. Place de la matière azotée dans le mécanisme de la coagulation présure du lait. International Journal of Biological and Chemical Sciences, 6(6): pp. 6075-6087.
26. International Organization for Standardization (ISO). 1996. Microbiologie des aliments - Méthode horizontale pour la recherche et le dénombrement de *Listeria monocytogenes* - Partie 1: Méthode de recherche. ISO 11290-1:1996.
27. International Organization for Standardization (ISO). 2005. Microbiology of food and animal feeding stuffs-Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* - Partie 1: Detection method - Amendment 1: Modification of the isolation media, of the haemolysis test and inclusion of precision data. ISO 11290-1/A1:2005.
28. Joan-Antoine C. and Alfred-Donawa L.1990.The Spoilage of UHT-Treated Chocolate Milk by Thermotolerant Bacteria .pp.1050-1051.
29. Joffin C. Et Joffin J.N. 2003. Microbiologie alimentaire. 5e éd. Centre Régional de Documentation Pédagogique d'Aquitaine. pp. 85- 91.
30. Jordan K., Leong D., et Ordóñez A. A. 2015. *Listeria monocytogenes* in the Food Processing Environment. Springer, Heidelberg New York, Etats-Unis, 46-60.
31. Juilerat M.A. et Badoud R. 2010. Acides aminés et protéines. In : « Science et technologie des aliments. Edition. Presses polytechniques et universitaires romandes. Lausanne. pp. 80-82.
32. Kassak.,Ahounous., Dayo G., Salifou C., Issifoum., Dotché I ., Gandonou P., Koutinhouin B., Mensah G.et Youssa I. 2016. Performances de production laitière des races bovines de l'Afrique de l'Ouest. International Journal of Biological and Chemical Sciences, 10(5): pp. 2316-2330.
33. Leseur R., et Melik N.1999. Lait de consommation In LUQUEE F.M, Laits et produits laitiers vache brebis chèvre, Tec et Doc, Lavoisier, Paris : 5 (637 pages). alité du lait stérilisé U.H.T. Ed. Tec et Doc. Lavoisier, Paris.p94.
34. Lesné, E. and H. Vagliano. 1925. Les vitamines du lait. Le lait, 5(50): pp. 955-964.
35. Luquet, F.M.1985.Laits et produits laitiers: vache, brebis, chevre. v. 1: Les laits: de la mamelle à la laiterie.

36. Mary-Evenson. L., Ward-Hinds M., Robert-Bernstein S., and Merlin-Bergdoll S. 1988. Estimation of human dose of staphylococcal enterotoxin A from a large outbreak of staphylococcal food poisoning involving chocolate milk. pp. 311-316.
37. Michel J.C., Michel P. et Richard J. 2002. Lait de consommation. In : « Science et Technologie du Lait ».Ed. Presses Internationales Polytechnique, Canada. pp. 277-321.
38. Michel, V., A. Hauwuy, and J. Chamba. 2006. Gestion de la flore microbienne des laits crus par les pratiques des producteurs. Renc. Rech. Rum, 13: p. 309-312.
39. Moller S. 2000. La reconstitution du lait. Ed. p. 51.
40. Monique, Z. and C. Souad. 2013. Flores protectrices pour la conservation des aliments: Editions Quae.
41. Muthwill F., Berger J.F. et Lecoq M. 1998. Le conditionnement en continu des liquides alimentaires en complexe de papier, polyéthylène et aluminium. In : « l'emballage des denrées alimentaires de grandes consommation». 2e Ed. Tec et Doc. Lavoisier, Paris. p. 604.
42. O'Connor, C. and B. Tripathi .1991. Introduction à l'étude du lait: ILRI (aka ILCA and ILRAD).
43. Odet G., Cerf O., Chevillotte J., Douard D., Gillis J.C., Helaine E. et Lignac J. 1985. La maîtrise de la qualité du lait stérilisé U.H.T. Ed. Tec et Doc. Lavoisier, Paris. p.94.
44. Paraveen K.T et Shakeel A. 2017. Diversification in flavoured milk. 3(2) :15-20.
45. Pougheon, S. (2001). Contribution à l'étude des variations de la composition du lait et leurs conséquences en technologies laitières.
46. Priyanka S and Alka. 2008. Isolation of *Escherichia coli*, *staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* from milk products sold under market conditions at agra region. pp.83–88.
47. Read R.B., Norcross N. L., Hankinson D.J And Litsky W. 1957. Come-up time method of milk pasteurization. Bacteriological studies. J. Dairy Sci. 40:28-36.
48. Read R.B., Charles-Schwartz and Warren-Litsky. 1960. Studies on Thermal Destruction of *Escherichia coli* in Milk and Milk Products. pp.415-418.
49. Richard, J. and Z. Halima. 1983. Inventaire de la flore bactérienne dominante des Camemberts fabriqués avec du lait cru. Le lait, 1983. 63(623-624): pp. 25-42.
50. Sarah-Douglas A., Michael-Gray J., Allison-Crandall D., and Kathryn-Boor J. 1999. Characterization of Chocolate Milk Spoilage. pp. 516–521.

51. Shlomit D., Maya M K., Avi S and Uri L. 2020. Addition of Anionic Polysaccharide Stabilizers Modulates In Vitro Digestive Proteolysis of a Chocolate Milk Drink in Adults and Children.
52. Veisseyre R. 1979. Technologie du lait. Reconstitution, récolte, traitement et transformation du lait. Ed. La Maison Rustique, Paris, p.113.
53. Vierling E. 1999. Aliment et boisson-science des aliments, doinéitcentre régional de la documentation pédagogique d'Aquitaine, France:11(270 pages).
54. VignolaLapointe, C. 2002. Science et technologie du lait: transformation du lait: Presses inter Polytechnique.

Annexes

Annexes

1. Méthode de PALCAM

1.1. Composition des milieux de culture

1.1.1. Technique «FDA modifié», selon la note du ministère de l'Agriculture, 1987

- Bouillon d'enrichissement sélectif (EB) Préparer le bouillon trypticase soja en suivant les instructions du fabricant et ajouter 6 g/L d'extrait de levure; le pH doit être de 7,3 à 25 °C après stérilisation.
- Répartir le bouillon dans des récipients de 500 ml de telle sorte que le volume soit de 225 ml après stérilisation.
- Au moment de l'emploi, ajouter :
 - Solution à 0,75% d'acriflavine 0,5 ml
 - Solution à 2% d'acide nalidixique 0,5 ml
 - Solution à 2,5% de cycloheximide 0,5 ml (conservation possible 1 semaine aux environs de 5 °C) bien mélanger après chaque addition.
- Gélose sélective Mac Bride modifiée (MMA)
- Phényl éthanol agar 35,5 g; glycine anhydre 10 g; chlorure de lithium 0,5 g; eau distillée 1l.
- Le pH doit être de 7,3 à 25 °C après stérilisation.
- Répartir le milieu gélosé de telle sorte que le volume soit de 100 ml après stérilisation.
- Au moment de l'emploi, après fusion du milieu et refroidissement à 45 °C au bain d'eau, ajouter:
 - solution à 2,5% de cycloheximide 0,8 ml. Bien mélanger et répartir à raison de 15 ml dans des boîtes de Petri de 90-100 mm de diamètre.
- Ne pas sécher. Conservation 1 semaine au réfrigérateur.

1.1.2. Milieux de culture de la méthode Palcam

- Bouillon d'enrichissement sélectif (EB) Cf paragraphe précédent.
- Milieu Palcam (selon Van Netten et al, 1989)
 - peptone 23,0 g; amidon 1,0 g; chlorure de sodium 5,0 g; mannitol 10,0 g; citrate de fer ammoniacal 0,5 g; esculine 0,8 g; glucose 0,5 g; chlorure de lithium 15,0 g; rouge de phénol 0,08 g; agar agar 13 g; eau déminéralisée 1 000 ml.

- Le pH est ajusté à $7,2 \pm 0,1$, le milieu est autoclavé 15 min à 121°C puis ramené à 50°C , température à laquelle sont ajoutés : sulfate de polymyxine B 10,0 mg; ceftazidime 20,0 mg et acriflavine 5,0 mg. Le milieu est ensuite coulé en boîtes de Petri de 90 mm de diamètre.
- Après incubation à 37°C pendant 24-48 h, les colonies de *Listeria* sont facilement repérables à l'œil nu. De couleur marron vert foncé, elles présentent une petite dépression centrale et sont légèrement incrustées dans la gélose. Lorsque l'inoculum est suffisamment contaminé, elles sont visibles 4 fois sur 5 au bout de 24 h d'incubation.
- Le dénombrement est possible à partir de boîtes directementensemencées. Un des intérêts de ce milieu réside dans la présence d'esculine et de mannitol.
- Les colonies de *Listeria* (esculine + mannitol-) apparaissent entourées d'un halo noir dû à l'attaque de l'esculine, alors que la présence éventuelle d'entérocoques (esculine + mannitol +) se repère par un noircissement des colonies et un virage du rouge de phénol, provoquant une coloration jaune diffuse, révélant ainsi l'attaque du mannitol.

Résumé

Résumés

ملخص

يعتبر الحليب غذاء أساسي لنمو الأطفال ، ولتحسين استهلاكه وقد أضيف إليه نكهات وعناصر أخرى ، ولكنه معرض للفساد والغزو الجرثومي ، مما يؤدي إلى مشاكل صحية. عليك أن تحمي نفسك.

وقد تطرق هذا العمل إلى جانبين ، الأول يتعلق بدراسة نظرية عن الحليب ومكوناته ومزايه وأنواعه ، مع التركيز على الحليب المنكه ، مثل حليب الشوكولاتة. وقد أظهرنا مكوناته وطرق تصنيعه وخصائصه الميكروبيولوجية ، وقد تم تحديد أهم الميكروبات الموجودة هناك والتي تغزوها مسببة الفساد والأمراض لمستهلكيها.

والثاني يتعلق بدراسة وتحليل بعض المقالات المتعلقة بالمنتج والتي ناقشناها سابقاً. لقد قمنا بتحليل الدراسات حول بعض الميكروبات التي تلوث حليب الشوكولاتة والأمراض التي تسببها وتقنيات الكشف عنها. آخرون حول تأثير المعالجة الحرارية في صناعة الألبان وفعاليتها في قتل الميكروبات الممرضة والضارة.

لقد توصلنا إلى أن الحفاظ على سلامة وجودة الحليب المنكه يتطلب عملية بسترة فعالة لتدمير عوامل التلف ومسببات الأمراض التي تؤثر على الجودة الصحية ، والحفاظ على ظروف النظافة الجيدة والتطهير ، الحفظ والتخزين.

الكلمات المفتاحية: حليب منكه - حليب بالشوكولاتة - جودة ميكروبيولوجية - بسترة - تلوث

Résumé

Le lait est un aliment essentiel à la croissance des enfants, et pour améliorer sa consommation, des arômes et d'autres éléments lui ont été ajoutés, mais il est exposé à la corruption et à l'invasion microbienne, ce qui entraîne des problèmes sanitaires dont il faut se protéger.

Ce travail a touché deux aspects, le premier est lié à une étude théorique sur le lait et ses composants, ses avantages et ses variétés, en se concentrant sur le lait aromatisé, par exemple le lait au chocolat. Nous avons montré ses composants, ses méthodes de fabrication et ses propriétés microbiologiques. les microbes les plus importants qui y existent et qui l'envahissent, causant corruption et maladies pour ses consommateurs ont été identifiées.

Le second est lié à l'étude et à l'analyse de certains articles liés au produit dont nous avons discuté précédemment. Nous avons analysé les études sur certains microbes qui contaminent le lait au chocolat, les maladies qui les provoquent et les techniques de leur détection. D'autres sur l'effet du traitement thermique dans l'industrie laitière et son efficacité à éliminer les microbes pathogènes et nuisibles.

Nous avons conclu que le maintien de la sécurité et de la qualité du lait aromatisé nécessite un processus de pasteurisation efficace pour détruire les agents d'altération et pathogènes qui affectent la qualité sanitaire, et se tenir sur des conditions de bonne hygiène, de désinfection, de conservation et de stockage.

Mots clés: lait aromatisé - lait chocolaté - qualité microbiologique - pasteurisation - contamination.

Abstract

Milk is an essential food for the growth of children. To improve its consumption, flavors and other elements have been added to it, but it is exposed to corruption and microbial invasion which leads to problems of health that must be protected.

This work has touched two aspects, the first is related to a theoretical study on milk and its components, its benefits and varieties, focusing on flavored milk for instance, chocolate milk where we have shown its components, its manufacturing methods, and microbiological properties. The most important microbes, that exist and invade it, cause corruption and diseases for its consumers have been identified

The second one is related to the study and analysis of some articles related to the product which have been discussed earlier. We have analysed studies on certain microbes that contaminate chocolate milk then the diseases that cause them, and the techniques for their detection. In addition to the effect of heat treatment in the dairy industry and its effectiveness in eliminating pathogenic and harmful microbes.

We concluded that maintaining the safety and quality of milk requires an efficient pasteurization process to destroy pathogens microbes, and corruption that affect the sanitary quality, then to keep the conditions of good hygiene, sterilization, conservation, and storage.

Key words: flavored milk - chocolate milk - microbiological quality - pasteurization - contamination