

République Algérienne Démocratique Et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



Université Saad Dahlab -Blida1-



Faculté des Sciences de la nature et de la vie
Département de Biologie et Physiologie Cellulaire

Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme de Master en Sciences de la
Nature et de la Vie, filière Biologie

Option : Microbiologie et Toxicologie Alimentaire (MTA)

Dont le Thème :

Étude comparative du nombre de probiotiques en début et fin du processus de fabrication du yaourt brassé, et jusqu'à sa DLC à 6°C, avec contrôle des paramètres physico-chimiques et microbiologiques.

Présenté par :

- ❖ MEDDAD Nesrine
- ❖ TALHA Amel

Soutenu le :

20/09/2017

Devant le Jury :

Mr OUSSADOU. L (MAA).....Président

Mme ROUAKI. F (MCB)Examinatrice

Mr MOHAMED SAID. R (MCB).....Promoteur

Mme BOUZID. L.....Co-promotrice

Promotion : 2016/2017



Remerciements

*Au terme de ce travail, nous tenons tout d'abord à remercier « **DIEU** le tout puissant » de nous avoir donné le courage et la volonté pour achever ce travail.*

*Nous avons l'honneur et le plaisir de présenter notre profonde gratitude et nos sincères remerciements à notre promoteur **Mr MOHAMED SAID.R** pour sa précieuse aide, ses orientations et le temps qu'il nous a accordé pour notre encadrement.*

Veillez trouver ici l'expression de notre respectueuse considération et notre profonde admiration et estimation pour toutes vos qualités scientifiques et humaines.

*Nous exprimons nos vifs remerciements à notre co-promotrice **Mme BOUZID Lynda**, chef de laboratoire de qualité de **DANONE**, pour son attention, sa disponibilité et ses conseils avisés.*

*Nous remercions chaleureusement les **membres du jury** qui nous font le grand honneur d'évaluer ce mémoire :*

***Mme ROUAKI. F** d'avoir accepté d'examiner ce travail.*

***Mr OUSSADOU. L** pour nous avoir fait l'honneur de présider le jury.*

Veillez trouvez ici l'expression de notre grand respect et nos vifs remerciements.

*Nos remerciements s'adressent également à tous le personnel du laboratoire, qui nous ont mis sur le bon chemin et fait leur possible pour nous aider pendant notre stage, particulièrement **Mr Amine** et **Mme Karima**.*

Enfin, à tous ceux qui de près ou de loin ont contribué moralement ou matériellement à l'aboutissement de ce travail. Nous disons merci.



Dédicaces

*À **Maman**, la source de mes efforts et la lumière de mes jours, pour ton soutien, ta patience et les sacrifices que tu n'as cessé de me donner depuis ma naissance, aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer ce que tu mérites.*

*À **Papa**, ma source de bonheur, tu m'as transmis ton ambition et ta motivation pour les longues études. Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation, ma formation et mon bien être.*

Je vous dois ma réussite, je n'aurais pas pu aller si loin sans vous. Puisse Dieu, le tout puissant, vous préserver et vous accorder santé, longue vie et bonheur.

*À mes adorables sœurs **Nesrine, Kawthar et Douaa**.*

À mes grands-parents, et à toute ma famille sans exception, tantes, oncles, cousins et cousines.

*À mes chères amies **Hadjer, Nadia, Nassima, Soumia, Zahra, Fedwa et Yasmine**...*

À nos camarades de la promotion. Merci pour tous les moments partagés et pour l'amitié qui s'est installée. Bonne chance à toutes.

Et à tous qui ont contribué, de pré ou de loin, pour la réalisation de ce projet, je vous dis merci.

Amel





Dédicaces

À chère mère,

Tu représentes pour moi le symbole de la bonté par excellence, la source de tendresse et l'exemple du dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi.

À cher père,

Tu trouves en moi la source de ta fierté.

Sans ton aide, tes conseils et tes encouragements ce travail n'aurait vu le jour.

Les mots ne suffisent guère pour exprimer l'amour, l'estime, et le respect que j'ai toujours eu pour vous.

À mon cher mari Nassim,

Tes sacrifices, ton soutien moral et matériel, ta gentillesse sans égal, ton profond attachement m'ont permis de réussir mes études.

Que dieu réunisse nos chemins pour un long commun serein.

À mon frère Rafik et ma sœur Sabrina pour leur soutien.

À mon petit ange et mon âme Anes. Que dieu te protège.

À ma belle mère et mon beau père,

Un remerciement particulier et sincère pour tous vos aides et efforts fournis.

Et à toute ma famille sans exception, tantes, oncles, cousins et cousines.

Enfin à toutes mes amies de la promotion qui me sont chères.

Nesrine



Résumé

Le yaourt est le produit le plus connu des laits fermentés. On l'obtient grâce à l'action des bactéries lactiques dites « probiotiques », qui lui apportent des intérêts technologiques et thérapeutiques de plus de son apport nutritionnel contribuant à une alimentation équilibrée recommandée.

L'objectif de notre travail est de comparer le nombre de probiotiquesensemencés dans la cuve (yaourt semi fini) au cours de fabrication avec celui retrouvé en produit fini conditionné (yaourt brassé fruité fraise, Danone), ainsi qu'un suivi de l'évolution des ferments lactiques en dénombrant chaque semaine jusqu'à la DLC, pendant le stockage à 6°C, avec un contrôle de qualité microbiologique et de stabilité physico-chimique.

Dans ce contexte, nous avons suivi des protocoles standardisés de Danone tout en respectant les conditions de prélèvement.

Nos résultats révèlent qu'il ne s'agit pas d'une perte de probiotiques au cours des dernières étapes du processus de fabrication mais d'une diminution normale.

De plus, le dénombrement des bactéries lactiques a fait apparaître une diminution significative mais reste conformes aux normes exigées, de $32,7 \times 10^7$ à $22,6 \times 10^7$ pour *S. thermophilus* et de $31,3 \times 10^6$ à $19,8 \times 10^6$ pour *L. bulgaricus*. Ce qui explique que leur croissance est inhibée par le froid.

D'autre part, les résultats des analyses microbiologiques du produit fini ont montré une absence totale des germes recherchés (pathogènes, d'altération, et de contamination fécale).

Cependant, les résultats des analyses physico-chimiques ont montré une légère diminution de l'EST et du pH accompagnée d'une augmentation de l'acidité titrable et de la viscosité. Ceci indique que le yaourt analysé est de qualité microbiologique et physico-chimique satisfaisante et ne présente aucun danger ou risque sur la santé du consommateur.

Mots clés : yaourt, laits fermentés, probiotiques, DLC, bactéries lactiques.

Abstrat

Yoghurt is the best known product of fermented milks, obtainable by the action of the so-called "probiotic", who bring its technological and therapeutic interests of more than its nutritional contribution contributing to a recommended balanced diet.

The aim of our work is to compare the number of probiotics seeded in the vat (semi-finished yoghurt) during the manufacturing process with that found in a finished conditioned product (fruity yoghurt strawberry Danone), as well as a monitoring of the evolution of Lactic ferments by counting each week until the LDC, during storage at 6°C, with microbiological quality control and physico-chemical stability.

In this context, we followed standard protocols Danone while respecting sampling conditions.

Our results show that this is not a loss of probiotics during the final stages of the manufacturing process.

In addition, lactic bacteria counts showed a significant decrease but remained within the required standards, from $32,7 \times 10^7$ to $22,6 \times 10^7$ for *S. thermophilus* and from $31,3 \times 10^6$ to $19,8 \times 10^6$ for *L. bulgaricus*. This explains why their growth is inhibited by the cold.

On the other hand, the results of the microbiological analyzes of the finished product showed a total absence of the germs sought (pathogens, alteration, and fecal contamination). However, the results of the physico-chemical analyzes showed a slight decrease in TSE and pH, accompanied by an increase in titratable acidity and viscosity. This indicates that the yoghurt analyzed is of satisfactory microbiological and physico-chemical quality and does not present any danger or risk to the health of the consumer.

Keywords: yoghurt, fermented milks, probiotics, LDC, lactic bacteria.

ملخص

الياغورت من منتجات الحليب المخمرة المعروفة، يتم الحصول عليه بفضل نشاط البكتيريا اللبنية تدعى «بروبيوتيك» المسؤولة على فوائده التكنولوجية والعلاجية، إضافة إلى قيمته الغذائية التي تساهم في إتباع نظام غذائي متوازن.

الهدف من عملنا هو مقارنة عدد البروبيوتيك في المنتج شبه النهائي أثناء عملية التصنيع مع العدد الموجود في المنتج النهائي (ياغورت ممزوج بالفواكه، فراولة دانون)، وأيضاً تتبع تطور الخمائر اللبنية كل أسبوع أثناء التخزين عند درجة حرارة 6°م إلى غاية تاريخ نهاية الاستهلاك، مع مراقبة الجودة والنوعية الميكروبيولوجية والاستقرار الفيزيوكيميائي.

وفي هذا السياق، تابعنا البروتوكولات القياسية لـ دانون مع احترام شروط أخذ العينات. نتائجه أظهرت أنه لا يوجد نقص في كمية البروبيوتيك المبذورة خلال عمليات ما بعد البذر أثناء الصنع. أما تعداد البكتيريا اللبنية أثناء التخزين أظهر انخفاضاً تدريجياً من $10^7 \times 32,7$ إلى $10^7 \times 22,6$ بالنسبة لـ *S. thermophilus* ومن $10^6 \times 31,3$ إلى $10^6 \times 19,8$ بالنسبة لـ *L. bulgaricus* لكن لا تزال مطابقة للمعايير المطلوبة، وهذا نتيجة لدرجة الحرارة المنخفضة، مما منع نموهم.

من جهة أخرى، نتائج التحاليل الميكروبيولوجية للمنتج النهائي أظهرت الغياب التام للجراثيم التي بحثنا عنها (البكتيريا المضرة ومؤشرات التلوث البرازي).

في حين أن نتائج التحاليل الفيزيوكيميائية أظهرت انخفاضاً طفيفاً في درجة الحموضة والمادة المجففة مرفقة بزيادة حمض اللاكتيك واللزوجة، وهذا ما يدل على أن الياغورت المحلل ذو نوعية ميكروبيولوجية وفيزيوكيميائية مرضية، ولا يحمل أي خطر على صحة المستهلك.

الكلمات المفتاحية: ياغورت، الحليب المخمر، البروبيوتيك، تاريخ نهاية الاستهلاك، البكتيريا اللبنية.

Liste des abréviations

Abs : Absence

ADP : Adénosine Di-Phosphate

AFNOR : Association Française de Normalisation

ATP : Adénosine Tri-Phosphate

B : *Bifidobacterium*

CO₂ : Dioxyde de carbone

CF : Coliformes fécaux

CRS : *Clostridium* Sulfito-réducteurs

CT : Coliformes totaux

°D : Degré Dornic

DLC : Date Limite de Consommation

DM : Dilution Mère

EPS : Exo-polysaccharide

EST : Extrait Sec Total

FAO : Food and Agriculture Organisation

FIL : Fédération Internationale de Laiterie

FTAM : Flore Totale Aérobie Mésophile

GC : Giolitti Cantonii

G+C : Guanine + Cytosine

h : Heure

ISO : International Organisation for Standardization

J : Jour

J.O.R.A : Journal Officiel de la République Algérienne

L : *Lactobacillus*

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

M17 : Gélose Mannitol ou Terzahi

MG : Matière grasse

MO : Micro-organisme

MRS : Gélose Man, Rogosa et Sharpe

NAD⁺ /NADH H⁺ : Couple oxydant/réducteur du nicotinamide adénine dinucléotide

NF : Norme Française

P : Phosphate inorganique

PCA : Gélose Plat Count Agar

pH : Potentiel d'hydrogène

OGA : Gélose Oxytetra-cycline Glucose Agar

S/C : Simple Concentration

S : *Streptococcus*

SFB : Bouillon au Sélénite-Cystine

TSE : Tryptone Sel Eau

UFC : Unité Formant Colonies

VF : Gélose Viande-Foie

VRBG : Gélose au Glucose Bilié au Cristal Violet et au Rouge Neutre

VRBL : Gélose au Lactose Bilié au Cristal Violet et au Rouge Neutre

Liste des figures

Figure 1 : Technologie du yaourt.....	8
Figure 2 : Représentation schématique des principales phases de croissance d'une culture bactérienne.....	10
Figure 3 : Schéma des facteurs stimulants de la coopération inter espèces.....	15
Figure 4 : Schéma représentant les différentes analyses effectuées sur le produit fini.....	21
Figure 5 : Préparation de la solution mère et des dilutions décimales.....	25
Figure 6 : Dénombrement de <i>Streptococcus thermophilus</i>	27
Figure 7 : Dénombrement de <i>Lactobacillus bulgaricus</i>	29
Figure 8 : Etapes de coloration de Gram.....	31
Figure 9 : Recherche et dénombrement des germes totaux (FTAM).....	33
Figure 10 : Recherche et dénombrement des coliformes totaux et fécaux.....	35
Figure 11 : Recherche et dénombrement des entérobactéries.....	37
Figure 12 : Recherche et dénombrement des levures et moisissures.....	39
Figure 13 : Recherche et dénombrement des <i>Clostridium</i> sulfito-réducteurs.....	41
Figure 14 : Recherche et dénombrement de <i>Staphylococcus aureus</i>	43
Figure 15 : Recherche et dénombrement des Salmonelles.....	45
Figure 16 : Recherche et dénombrement de <i>Listeria</i>	47
Figure 17 : Variation du pH du yaourt brassé durant 28 jours de stockage à 6°C.....	48
Figure 18 : Variation de l'acidité titrable du yaourt brassé durant 28 jours de stockage à 6°C.....	49
Figure 19 : Variation de la matière grasse du yaourt brassé durant 28 jours de stockage à 6°C.....	50

Figure 20 : Variation de l'EST du yaourt brassé durant 28 jours de stockage à 6°C.....	51
Figure 21 : Variation de la viscosité du yaourt brassé durant 28 jours de stockage à 6°C.....	52
Figure 22 : Evolution des bactéries lactiques du yaourt brassé durant 28 jours de stockage à 6°C.....	53

Liste des tableaux

Tableau I : Teneur moyenne pour 100g de produit	3
Tableau II : Evolution du pH du yaourt brassé durant le stockage à 6°C.....	48
Tableau III : Evolution de l'acidité titrable du yaourt brassé durant le stockage à 6°C.....	49
Tableau IV : Evolution de la matière grasse du yaourt brassé durant le stockage à 6°C.....	50
Tableau V : Evolution de l'EST du yaourt brassé durant le stockage à 6°C.....	51
Tableau VI : Evolution de la viscosité du yaourt brassé durant le stockage à 6°C.....	52
Tableau VII : Résultats de dénombrement des ferments lactiques au cours de fabrication du yaourt brassé, et durant le stockage à 6°C.....	53
Tableau VIII : Résultats des analyses microbiologiques des germes contaminants effectuées sur le produit fini.....	55

Table des Matières

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction.....1

Partie I : Synthèse bibliographique

I.1. Généralités

I.1.1. Définition du yaourt.....2

I.1.2. Composition chimique du yaourt.....2

I.1.3. Classification du yaourt.....4

I.1.4. Technologie de fabrication du yaourt.....4

I.1.5. Date de limite de consommation.....8

I.2. Bactéries lactiques et probiotiques

I.2.1. Classification des bactéries lactiques.....9

I.2.2. Croissance des bactéries lactiques.....9

I.2.3. Bactéries lactiques caractéristiques du yaourt.....10

I.2.3.1. *Streptococcus thermophilus*.....10

I.2.3.2. *Lactobacillus bulgaricus*.....11

I.2.4. Notion de probiotique.....12

I.2.5. Critères technologiques de sélection des souches probiotiques.....12

I.2.5.1. Activité acidifiante.....12

I.2.5.2. Activité texturante épaississante13

I.2.5.3. Activité aromatisante.13

I.2.5.4. Activité protéolytique.....	13
I.2.6. Association entre <i>S. thermophilus</i> et <i>L. bulgaricus</i> : Protocoopération.....	14
I.2.7. Pharmacologie des bactéries lactiques ingérées par le yaourt.....	15
I.2.8. Intérêts thérapeutiques des probiotiques.....	16
I.2.8.1. Amélioration de la digestion du lactose.....	16
I.2.8.2. Traitement et prévention des diarrhées.....	16
I.2.8.3. Inhibition des pathogènes.....	17
I.2.8.4. Stimulation du système immunitaire.....	17
I.2.8.5. Action anti-cancérogène.....	17
I.2.8.6. Yaourt et l'hypocholestérolémie.....	18
I.2.9. Effets indésirables potentiels des probiotiques.....	18

Partie II : Matériel et Méthodes

II.1. Matériel.....	19
II.1.1. Matériel biologique.....	19
II.1.2. Matériel non biologique.....	20
II.2. Méthodes d'étude.....	20
II.2.1. Echantillonnage.....	20
II.2.2. Prélèvement.....	20
II.2.3. Analyses physico-chimiques.....	21
II.2.3.1. Détermination de pH.....	21
II.2.3.2. Détermination de l'acidité titrable.....	22
II.2.3.3. Détermination de la matière grasse (MG).....	23
II.2.3.4. Détermination de l'extrait sec total (EST).....	24

II.2.3.5. Détermination de la viscosité.....	24
II.2.4. Analyses microbiologiques.....	24
• Préparation des dilutions décimales.....	25
II.2.4.1. Dénombrement de <i>S. thermophilus</i>	26
II.2.4.2. Dénombrement de <i>L. bulgaricus</i>	28
• Confirmation microscopique.....	30
II.2.4.3. Recherche et dénombrement des germes totaux (FTAM).....	32
II.2.4.4. Recherche et dénombrement des coliformes totaux et fécaux.....	34
II.2.4.5. Recherche et dénombrement des entérobactéries.....	36
II.2.4.6. Recherche et dénombrement des levures et moisissures.....	38
II.2.4.7. Recherche et dénombrement des <i>Clostridium</i> sulfito-réducteurs.....	40
II.2.4.8. Recherche et dénombrement de <i>Staphylococcus aureus</i>	42
II.2.4.9. Recherche et dénombrement des Salmonelles.....	44
II.2.4.10. Recherche et dénombrement de <i>Listeria</i>	46

Partie III : Résultats et Discussion

III.1. Résultats des analyses physico-chimiques.....	48
III.1.1. Variation du pH.....	48
III.1.2. Variation de l'acidité titrable.....	49
III.1.3. Variation de la matière grasse (MG).....	50
III.1.4. Variation de l'extrait sec total (EST).....	51
III.1.5. Variation de la viscosité.....	52
III.2. Résultats des analyses microbiologiques.....	53
III.2.1. Résultats de dénombrement des bactéries lactiques.....	53

III.2.1.1. Résultats microscopiques.....	54
III.2.2. Résultats de recherche des germes contaminants.....	55
Conclusion.....	57
Références bibliographiques	
Annexes	

Introduction

La prise en compte du lien entre l'alimentation et la santé dans l'esprit du consommateur a augmenté considérablement, notamment en Europe. De plus en plus de citoyens adhèrent à l'idée qu'il est possible de réduire le risque de maladies et de demeurer en bonne santé.

Le concept des probiotiques a pris racine dans l'industrie alimentaire, notamment le secteur laitier, par l'introduction dans les laits fermentés des bactéries d'origine intestinale : Les bifidobactéries et les lactobacilles, présentant un fort potentiel comme probiotique **(Luquet et Corrieu, 2005)**.

Depuis près de 8000 ans, l'homme consomme des yogourts et divers produits laitiers. Ces derniers sont issus de la fermentation lactique du lait, qui consiste à la transformation de glucose en acide lactique. L'acidité ainsi obtenue permet au produit laitier de se conserver plus longtemps, empêchant des microorganismes potentiellement pathogènes d'envahir le produit **(Hansen, 2011)**.

L'Algérie est le premier consommateur laitier du Maghreb, dont le développement des produits laitiers frais est de l'ordre de 10% par an, et les plus grands producteurs de yaourt sont : Soummam, Danone, Hodna et Trèfle **(Recham, 2015)**.

Tout aliment peut provoquer des intoxications alimentaires; le lait et les produits laitiers n'y font pas exception, car leur composition représente une source riche et appréciable d'éléments nutritifs, et constitue donc un milieu propice au développement de micro-organismes pathogènes. Pour cette raison, l'application de mesures appropriées de maîtrise de l'hygiène du lait et des produits laitiers sur l'ensemble de la chaîne alimentaire est essentielle pour garantir la sécurité sanitaire et la salubrité de ces aliments **(FAO et OMS, 2007)**.

Ainsi, la conservation du yaourt, au froid, durant sa mise en vente, pose le problème de viabilité des ferments lactiques, des modifications du pH, de la concentration d'acide lactique, de la rhéologie du produit **(Irkin et Eren, 2008)**.

Pour cela le but de notre travail à la laiterie Danone de Blida porte d'une part sur le contrôle de qualité physico-chimique et microbiologique d'un yaourt brassé afin qu'il soit sans danger pour le consommateur et conforme aux normes exigées et d'autre part sur la comparaison de la quantité de probiotiquesensemencés, et celle dénombrée en produit fini stocké à (6°C) jusqu'à sa DLC.

Partie I :
Synthèse bibliographique

I.1. Généralités

I.1.1. Définition du yaourt

Le premier nom turc, apparu au VIII^e siècle, fut « yogurur » pour être changé au XI^e siècle par le nom « yoghourt » utilisé actuellement.

L'origine du mot reste mystérieuse. Le mot yoghourt proviendra de la langue bulgare (yoghurt), « yog » qui voulait dire « épais » et « urt » qui signifiait « lait » (**Luquet et Corrieu, 2005**).

Produit laitier coagulé obtenu par fermentation lactique grâce à l'action de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus* à partir du lait (pasteurisé, concentré, partiellement écrémé enrichi en extrait sec) (**FAO, 1975**). Les bactéries dans le produit fini doivent être vivantes et présentes en abondance.

La Fédération Internationale de Laiterie (FIL) fixe la quantité de ferments vivants égale à 10^7 bactéries/g de produit jusqu'à sa DLC, alors que le *Codex alimentarius* fixe la même valeur en fin de vie de produit.

Selon les pays, les réglementations locales fixent des minima variant entre 10^6 et 10^8 UFC, mais avec des unités variables (par g de produit le plus souvent, mais également par ml ou cm^3) (**Luquet et Corrieu, 2005**).

I.1.2. Composition chimique du yaourt

➤ Les glucides

La principale modification de la fermentation du lait est la baisse de la teneur en lactose de 20 à 30 %. La dégradation du lactose conduit à la formation de galactose, de glucose et d'acide lactique. Les quantités finales de galactose sont aux alentours de 1 à 1,5 %. Les concentrations en glucose et oligosaccharides sont très faibles (**Toba et al., 1983 ; Vidal-Valverde et al., 1984**).

➤ Les protéines

Les bactéries lactiques produisent des enzymes qui hydrolysent partiellement les protéines du lait. Ainsi, **Poznanski et al. en 1965** ont rapporté une dégradation de la caséine in vitro par une protéase et une peptidase provenant respectivement de *Lactobacillus bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus*.

De ce fait, un yaourt contient plus de peptides et d'acides aminés libres que le lait (**Rasic et al., 1971**). Il est généralement admis que la préhydrolyse des caséines améliore la digestibilité des protéines du yaourt (**Breslaw et Kleyn, 1973**).

➤ **Les lipides**

Il existe une hydrolyse très modérée des triglycérides qui n'a pas d'incidence nutritionnelle observable (Alm, 1982a ; Boccignone *et al.*, 1984).

➤ **Les minéraux**

C'est surtout la richesse en calcium du yaourt et des laits fermentés qui est à noter. Un pot de yaourt de 125 g apporte 180 à 200 mg de calcium (Dupin, 1992).

➤ **Les vitamines**

La composition des vitamines du yaourt dépend principalement de celle du lait utilisé. De plus, elle sera modulée au cours de la fermentation, dépendant aussi des souches employées.

La composition en vitamines liposolubles A et D varie en fonction de leur teneur dans le lait utilisé (entier ou partiellement écrémé) (Megalla et Hafez, 1984).

Tableau I : Teneur moyenne pour 100g de produit (source : Syndifrais).

	Teneur moyenne pour 100 grammes de produit							Valeur énergétique
	Protéines (g)	Lipides (g)	Glucides (g)	Calcium (mg)	Sodium (mg)	Potassium (mg)	Phosphore (mg)	Kj
Yaourt nature	4.15	1.2	5.2	174	57	210	114	201
Yaourt au lait entier	3.8	3.5	5.3	171	56	206	112	284
Yaourt nature 0%	4.2	traces	5.4	164	55	180	100	163
Yaourt nature sucré	3.8	1.1	14.5	160	52	195	105	347
Yaourt aromatisé au lait entier	3.2	3.2	12	140	50	190	106	372
Yaourt brassé nature	4.3	1.8	5.2	165	40	205	115	230
Yaourt brassé aux fruits	3.75	1.65	14.5	140	50	190	110	368
Yaourt au lait entier aux fruits	3.1	2.7	16.5	140	45	180	100	431
Yaourt maigre aux fruits	3.6	traces	17.2	140	45	180	100	351

I.1.3. Classification du yaourt

Il existe deux types de yaourts :

- Yaourts fermes, dont la fermentation a lieu en pots : ce sont généralement les yaourts naturels et aromatisés ;
- Yaourts brassés, dont la fermentation a lieu en cuve avant brassage et conditionnement : c'est le cas des yaourts veloutés naturels et aux fruits.

La fabrication de ces deux types de yaourts peut être réalisée soit à partir de lait entier, soit à partir de lait partiellement ou totalement écrémé (3,5 % ; 1,0 % ; 0,0 % de MG) (**Jeantet et al., 2008**).

I.1.4. Technologie de fabrication du yaourt

➤ Préparation et réception du lait

Dans les pays de production laitière, le lait arrive en camions-citernes réfrigérés à l'unité de production. Il est contrôlé lors de sa réception, pompé puis filtré pour éliminer les résidus solides, puis stocké à froid (<5°C).

Le contrôle de la qualité du lait se fait sur :

- La qualité sanitaire : la température de transport, le nombre de germes totaux, et l'acidité titrable.
- La qualité technologique : analyse de sa composition en matière grasse et en matière azotée, dépistage des antibiotiques.

Une légère thermisation à 60 – 65 °C peut être pratiquée si le lait doit être stocké plus d'une journée (**Luquet et Corrieu, 2005**).

➤ Standardisation

La composition du lait de vache varie selon les races, l'alimentation, le stade de lactation de l'animal et la saison. Il est nécessaire donc de standardiser le lait en matière grasse et en matière protéique, pour répondre aux spécifications nutritionnelles et organoleptiques des produits et obtenir une qualité constante au cours de l'année pour un type de produit.

De plus, un ajout de sucre est parfois réalisé à ce stade à des fins gustatives (**Luquet et Corrieu, 2005**).

➤ **Homogénéisation**

L'homogénéisation vise à réduire la taille des globules gras et est indispensable pour éviter la remontée de la matière grasse pendant la fermentation. Elle est réalisée sous pression (généralement entre 100 et 300 bars)

Cette opération augmente également la viscosité du lait et par conséquent, lui confère une meilleure stabilité et un aspect plus blanc (**Luquet et Corrieu, 2005**).

➤ **Traitement thermique (Pasteurisation)**

Le mix de fabrication est soumis à un traitement thermique à double objectif :

- Élimination de la plus grande partie de la flore d'altération ou pathogène du lait.
- Amélioration des propriétés physiques du yoghourt (viscosité, capacité de rétention d'eau)

En effet, le traitement thermique dénature plus de 85% des protéines solubles. Ceci permet d'augmenter la quantité de matière insoluble dans le caillé pour la coagulation et d'assurer une bonne texture au produit fini

Le traitement le plus courant, est un chauffage à 92 – 95 °C pendant quelques minutes.

Malgré un traitement thermique, il est possible d'observer des inhibitions de croissance des bactéries lactiques à cause d'une forte concentration en oxygène dissous dans le mix laitier. Il y a donc possibilité d'installer un système de **dégazage** réalisé aux environs de 80°C (**Luquet et Corrieu, 2005**).

Les ferments (*S. thermophilus* et *L. bulgaricus*) sont soit préparés préalablement en cuve (levain) par un ensemencement « semi-direct », soit incorporés directement, c'est l'ensemencement « direct », qui est le plus couramment utilisé. Ils sont commercialisés sous forme lyophilisée ou congelée (**Luquet et Corrieu, 2005**).

a) Fabrication de yaourt ferme

➤ **Refroidissement**

Après un traitement thermique, le mix laitier est refroidi à 4°C afin de dissocier les étapes de pasteurisation et de fermentation. En effet, cette dissociation offre plus de souplesse dans l'organisation de la production (**Luquet et Corrieu, 2005**).

➤ **Ensemencement**

Il est le plus souvent réalisé en ligne à l'aide d'une pompe, qui assure l'incorporation et le mélange du ferment au mix laitier.

À ce niveau peuvent être également additionnés colorants et arômes. Ce mix laitierensemencé est alors directement distribué dans les pots (**Luquet et Corrieu, 2005**).

➤ **Incubation**

Les potsensemencés et thermoscellés sont conditionnés sur palettes et placés en étuve à la température de fermentation.

En général, la fermentation est réalisée à une température comprise entre 36 et 45°C, qui correspond à la température optimale de croissance des ferments du yoghourt. Dans ce cas, la période d'incubation peut être très courte : 2h30 (**Luquet et Corrieu, 2005**).

➤ **Refroidissement**

Une fois l'acidité cible atteinte, les pots sont refroidis dans des chambres froides, par circulation d'air refroidi, ou en tunnels.

Ce refroidissement rapide permet de ralentir significativement la poursuite de la fermentation et par conséquent d'éviter l'obtention de produits trop acides (**Luquet et Corrieu, 2005**).

➤ **Conditionnement et stockage**

Les pots sont maintenus à basse température pendant leur stockage, leur transport et lors de leur distribution (**Luquet et Corrieu, 2005**).

b) Fabrication de yaourt brassé

➤ **Refroidissement**

Le mix laitier thermisé est le plus généralement directement refroidi à la température de fermentation (**Luquet et Corrieu, 2005**).

➤ **Ensemencement**

Selon les mêmes principes que ceux cités dans le cas des yoghourts fermes (**Luquet et Corrieu, 2005**).

➤ **Incubation**

La fermentation a lieu en cuve, plus communément appelée « tank de maturation », qui est régulée en température tout au long de la fermentation. Cette dernière est arrêtée lorsque le pH atteint la valeur cible. Le « caillé » est alors formé (**Luquet et Corrieu, 2005**).

➤ **Brassage**

Le caillé est brassé par pompage du gel. C'est le « décaillage », éventuellement complété par un passage au travers d'un filtre effectuant ainsi un « lissage » du caillé (**Luquet et Corrieu, 2005**).

➤ **Refroidissement**

Le caillé est aussitôt refroidi grâce à un échangeur thermique pour atteindre une température proche de 20°C. Ceci permet de conditionner plus rapidement et de limiter les altérations de structure de gel.

Un mélange des préparations de fruits est réalisé (**Luquet et Corrieu, 2005**).

➤ **Conditionnement et stockage**

Le produit est alors conditionné dans l'emballage de commercialisation, puis subi une deuxième étape de refroidissement à 4°C, température qui doit être maintenue au cours des opérations de stockage, transport et distribution (**Luquet et Corrieu, 2005**).

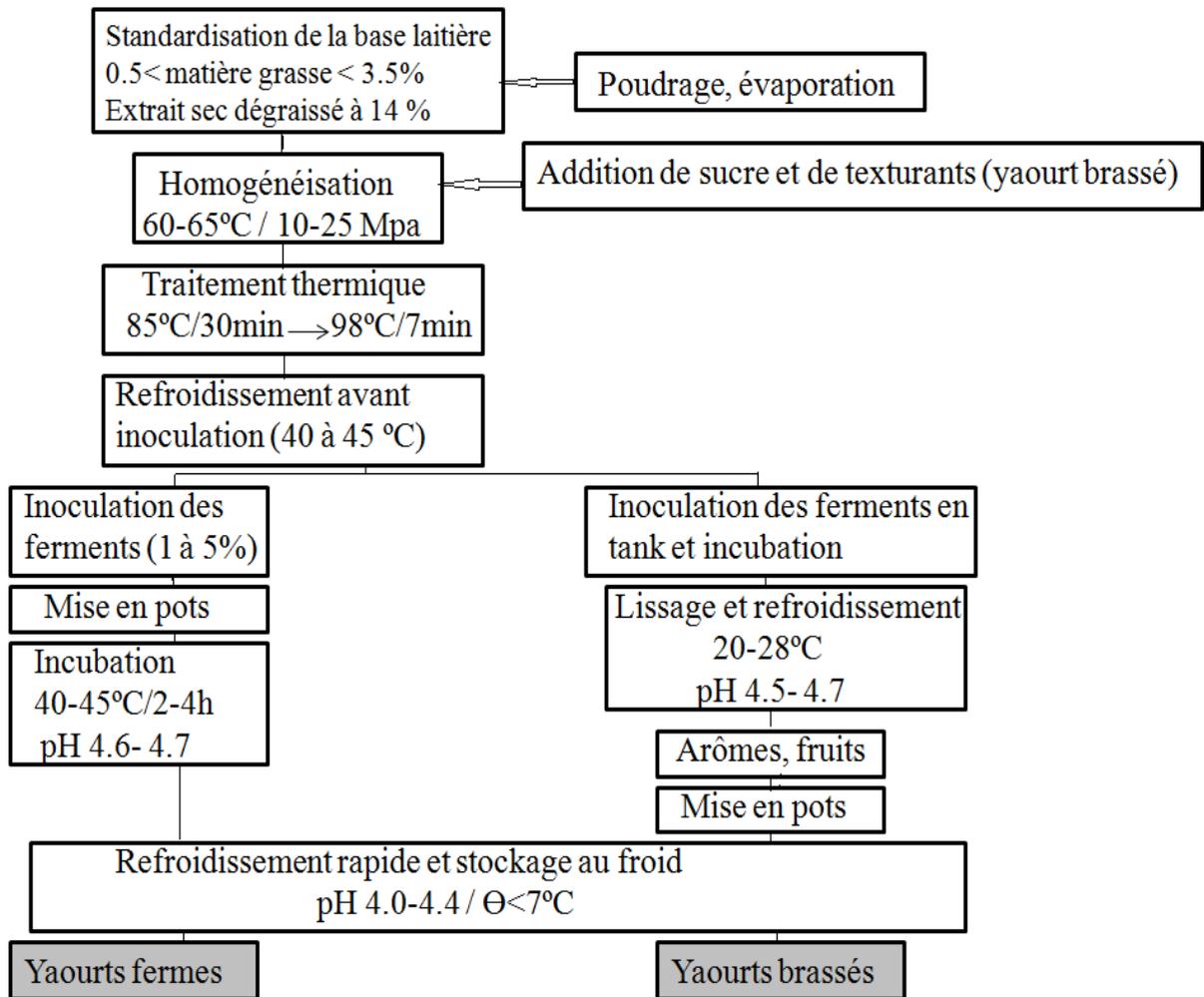


Figure 1 : Technologie du yaourt (Lucey, 2004)

I.1.5. Date Limite de Consommation de yaourt DLC

La date limite de consommation est une norme alimentaire, elle s'applique à des produits très périssables, conservés au froid et dont les traitements en industrie ont été parfois insuffisants pour tuer la totalité des germes présents. Cette date figure sur l'emballage sous l'appellation « à consommer jusqu'au », suivie de l'indication du jour et du mois (Burtin et al., 2013).

Cette DLC est de 28 jours (pour le yaourt) en France par exemple (Luquet et Corrieu, 2005).

I.2. Bactéries lactiques et probiotiques

I.2.1. Classification des bactéries lactiques

Une bactérie lactique est capable d'excréter l'acide lactique D(-), L(+) ou DL en utilisant les voies cataboliques suivantes (Annexe I) :

- Voie d'Embden Meyerhof Parnas, homofermentation dans laquelle l'acide lactique est le seul produit du métabolisme excrété à partir du substrat ;
- Voie de Dickens-Horecker et Entner Doudoroff, hétérofermentation, conduisant à l'acide lactique en mélange avec d'autres produits d'excrétion comme le CO₂, l'acide acétique, l'éthanol...

Regroupées pour la première fois par Orla-Jensen en 1919, les bactéries lactiques comprennent les genres suivants :

- *Lactobacillus*, bacilles homofermentaires et hétérofermentaires ;
- *Carnobacterium*, bacilles homofermentaires ;
- *Enterococcus*, cocci homofermentaires ;
- *Lactococcus*, cocci homofermentaires ;
- *Streptococcus*, cocci homofermentaires ;
- *Pediococcus*, cocci homofermentaires ;
- *Leuconostoc*, cocci hétérofermentaires.

Seuls les *Lactobacillus*, les *Enterococcus*, les *Streptococcus* et éventuellement les *Lactococcus* sont utilisés comme probiotique en alimentation animale et humaine (**Larpent et al., 1994**).

I.2.2. Croissance des bactéries lactiques

Chez les bactéries, le terme « croissance » est essentiellement utilisé pour désigner l'accroissement de la population cellulaire d'une culture. Au cours chaque cycle de division cellulaire, la bactérie croît jusqu'à un volume critique puis elle se divise en deux cellules filles par scissiparité (**Corrieu et Luquet, 2008**).

La croissance d'une bactérie cultivée sur un milieu et dans un environnement favorable présente un enchaînement de six phases distinctes : (Figure 2).

- Une phase de latence, qui suit immédiatement l'ensemencement du milieu par l'inoculum bactérien. Elle correspond à une période de restauration des fonctions physiologiques et à l'adaptation des cellules aux nouvelles conditions de culture ;
- Une phase d'accélération de la croissance, pendant laquelle le métabolisme cellulaire reprend et la croissance débute ;
- Une phase de développement exponentiel, au cours de laquelle les bactéries se multiplient avec un taux de croissance constant et maximal, fonction de la souche considérée et des conditions dans lesquelles elle est cultivée ;
- Une phase de ralentissement, qui est due soit à l'épuisement d'un ou plusieurs substrats, soit à l'accumulation de composés inhibiteurs ou toxiques ;
- Une phase stationnaire, qui correspond à un arrêt de la croissance ;
- Une phase de déclin, qui correspond à la mort des cellules, et éventuellement à leur lyse.

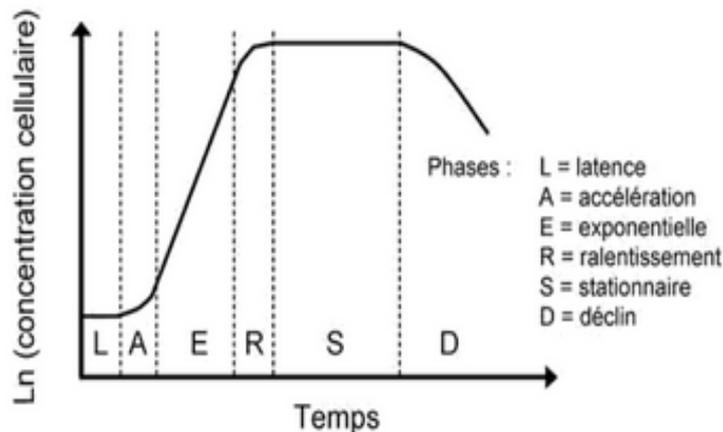


Figure 2 : Représentation schématique des principales phases de croissance d'une culture bactérienne (Corrieu et Luquet, 2008).

I.2.3. Bactéries lactiques caractéristiques du yaourt

I.2.3.1. *Streptococcus thermophilus*

Le genre *Streptococcus* appartient au phylum des *Firmicutes* et regroupe des bactéries à coloration Gram positive, dépourvues d'activité catalase, et à bas pourcentage en bases G+C (Farrow et Collins, 1984). Les streptocoques sont tous immobiles, asporulés, en chaînettes ou en diplocoques, certains présentent une capsule.

S. thermophilus se retrouve au sein du groupe "salivarius". Au sein du genre *Streptococcus*. C'est la seule espèce "alimentaire" parmi des espèces commensales, opportunistes et pathogènes (**Delorme, 2008**).

Streptococcus salivarius, subsp. *thermophilus*, est une bactérie lactique thermophile anaérobie et aérotole'ante dont la température optimale de croissance se situe entre 37°C et 42°C. En industrie agro-alimentaire, *S. thermophilus* est en deuxième position derrière *L. lactis* dans le classement des bactéries lactiques utilisées. Elle est la seule espèce du genre streptocoque utilisée dans la fabrication des produits laitiers fermentés (**de Roissart et Luquet, 1994**), grâce à son rôle dans la fermentation du lait qui transforme le lactose en acide lactique (homofermentaire), entraînant la diminution rapide du pH.

En plus de la baisse rapide du pH, *S. thermophilus* produit des métabolites importants pour des propriétés technologiques spécifiques des produits laitiers. Ainsi, de nombreuses souches de *S. thermophilus* synthétisent des exopolysaccharides (EPS) qui contribuent à obtenir une texture et des propriétés rhéologiques recherchées pour les produits laitiers fermentés.

La croissance de *S. thermophilus* dans le lait, est donc liée à sa capacité à utiliser les lactoprotéines comme source des acides aminés que la bactérie n'est pas capable de synthétiser et qui ne sont pas en quantité suffisante sous forme libre (**Garault et al., 2000 ; Fernandez-Espla, 2000 ; Savijoki et al., 2006**).

S. thermophilus est principalement cultivé sur M17 (**Terzaghi et Sandine, 1975**).

1.2.3.2. *Lactobacillus bulgaricus*

Le groupe de *Lactobacillus* est constitué de bacilles réguliers, souvent allongés, Gram positif, asporulés, parfois groupés en paires ou en chaîne, généralement immobiles et réalisant une fermentation de type lactique. Ils sont pour la plupart catalase -, micro-aérophiles ou anaérobies (**Guiraud, 1998**).

Lactobacillus delbrueckii, subsp. *bulgaricus*, ne produit que de l'acide lactique au cours de la fermentation du lactose. Il se développe bien à la température de 45 à 50 °C en acidifiant fortement le lait jusqu'à 1,8 pourcent (pH voisin de 4.5), voire, avec certaines souches, jusqu'à 2,7 pourcent d'acide lactique (pH 3,8 à 3,6) (**FAO, 1995**).

Le milieu de culture et d'isolement de base le plus connu est le milieu MRS, qui contient du Tween 80 (**Guiraud, 1998**).

I.2.4. Notion de probiotique

À partir des travaux de Teissier, en 1906 et de Metchnikoff, en 1908, l'idée que des bactéries lactiques ingérées vivantes pourraient avoir un effet bénéfique a été développée (**Luquet et Corrieu, 2005**).

Le terme de probiotique dérive des deux mots grecs « pro » et « bios » et signifie littéralement « en faveur de la vie ». Ce terme a été proposé pour la première fois par Parker en 1974 pour désigner les micro-organismes et substances qui contribuent au maintien de l'équilibre de la flore intestinale (**Gournier-Château et al., 1994**).

Selon la FAO et l'OMS, les probiotiques sont : « des micro-organismes vivants qui, lorsqu'ils sont administrés en quantité adéquate, confèrent un bénéfice pour la santé de l'hôte au-delà de l'effet nutritionnel premier ».

Les probiotiques utilisés dans les laits fermentés sont des micro-organismes, producteurs d'acide lactique tels que les lactobacilles, certains streptocoques et les bifidobactéries (**Luquet et Corrieu, 2005**).

I.2.5. Critères technologiques de sélection des souches probiotiques

La sélection de souches de *S. thermophilus* et *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, afin de disposer d'un ferment qui permette d'obtenir un yoghourt à caractéristiques organoleptiques bien définies, nécessite une caractérisation préalable des souches pures sur la base de critères déterminés.

Le choix des souches pures nécessite expérience et savoir faire afin que l'association choisie réponde à l'attente (**Luquet et Corrieu, 2005**).

I.2.5.1. Activité acidifiante

L'acide lactique confère au produit fini une saveur acide, et aide à déstabiliser les micelles des caséines et la formation du gel.

En plus de son impact organoleptique, l'acide lactique, par son action sur la diminution de pH, a un rôle protecteur contre d'éventuelles contaminations par des germes indésirables (flore d'altération ou pathogènes).

Deux facteurs essentiels de la fabrication du yoghourt doivent être pris en compte : le niveau maximal de production d'acide lactique, et la vitesse d'acidification (**Luquet et Corrieu, 2005**).

I.2.5.2. Activité texturante épaississante

Une des difficultés à prévoir dans la fabrication des yoghourts commerciaux est le maintien tout au long de la durée de conservation, de la texture.

L'augmentation de la matière sèche du lait par l'addition de poudre de lait se développe par l'utilisation de souches capables de produire des exo-polysaccharides, polymères exocellulaires constitués de résidus osidiques, aux propriétés texturantes (**Luquet et Corrieu, 2005**).

I.2.5.3. Activité aromatisante

Pette et Lolkema (1950) ont été les premiers à suggérer que l'acétaldéhyde serait le composé aromatique principal du yogourt. De nombreux auteurs tels que **Bottazzi et Vescovo (1969)**, **Dumont et Adda (1973)** ou **Law (1981)** l'ont confirmé.

L'espèce *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* a été décrite par certains auteurs comme produisant une quantité d'acétaldéhyde plus importante que *S. thermophilus* dans le yoghourt, alors que d'autres auteurs ont montré le contraire (**Schirch et al., 1985 ; Ott et al., 1997**).

I.2.5.4. Activité protéolytique

L'activité protéolytique est également un des critères de sélection des bactéries utilisés dans la production de yoghourt.

Les souches de *S. thermophilus* présentent généralement une activité protéasique faible, voir parfois inexistante par l'absence de protéase de la paroi (**Shahbal et al., 1991, 1993**).

En revanche, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* est beaucoup plus protéolytique. Ainsi, il lui est possible d'hydrolyser les caséines en petits peptides et acides aminés assurant sa croissance et celle de *S. thermophilus* lorsqu'il s'agit de cultures mixtes (Figure 3) (**Luquet et Corrieu, 2005**).

D'autres critères de sélection des souches probiotiques :

- Absence de pathogénicité (critère sécuritaire).
- Résistance aux conditions rencontrées *in vivo* au cours du transit digestif.
- Colonisation du tractus digestif et adhésion aux cellules intestinales.
- Activité antimicrobienne.
- Résistance aux additifs alimentaires et aux antibiotiques.
- Viabilité et stabilité (survie pendant la lyophilisation, centrifugation...) (**Gournier-Château et al., 1994**).

I.2.6. Association entre *S. thermophilus* et *L. bulgaricus* : Protocoopération

Le yaourt résulte de la fermentation du lait par l'association des deux espèces *S. thermophilus* et *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Cette association, appelée protocoopération, est bénéfique pour les deux espèces, mais n'est indispensable ni à leur croissance ni à leur survie.

Dans une protocoopération, chaque espèce produit une ou plusieurs substances, absentes initialement du milieu de culture, qui stimulent la croissance de l'autre espèce.

Au cours de la symbiose observée dans le yoghourt, on assiste dans la première phase principalement à la croissance de *S. thermophilus*. Dans un deuxième temps, celle-ci est ralentie du fait de l'effet inhibiteur de l'acide lactique produit, alors que le taux de croissance de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* augmente (**Luquet et Corrieu, 2005**).

Le lactobacille, par son activité protéolytique, attaque la caséine qui libère les peptides permettant au streptocoque de poursuivre sa croissance. De son côté, le streptocoque stimule le lactobacille par production d'acide formique (**FAO, 1995**).

S. thermophilus produit du dioxyde de carbone (CO₂), issu de la décarboxylation de l'urée contenant dans le lait, qui stimule *L. bulgaricus* (**Luquet et Corrieu, 2005**).

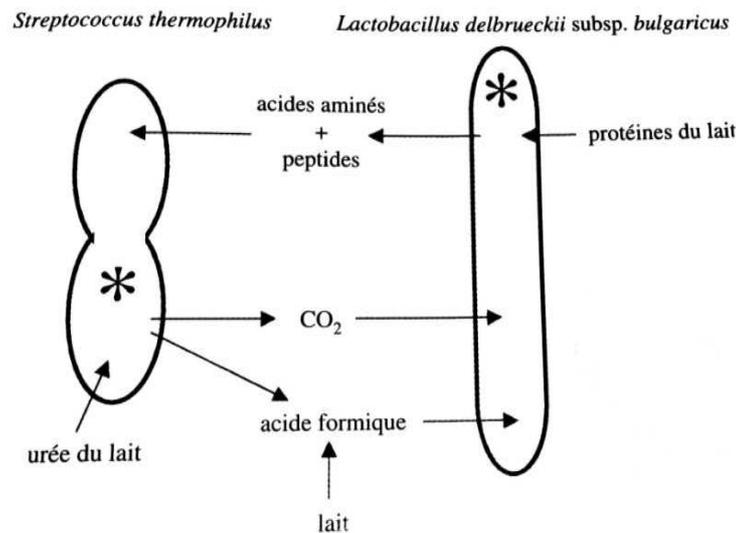


Figure 3 : Schéma des facteurs stimulants de la coopération inter espèces (Loones, 1994).

I.2.7. Pharmacologie des bactéries lactiques ingérées par le yaourt

Les bactéries probiotiques pour être efficaces doivent parvenir vivantes au site de leur action, à savoir l'intestin et donc résister aux différents mécanismes de défense de l'hôte.

Ces bactéries étant administrées par voie orale, il est nécessaire qu'elles franchissent les obstacles majeurs du transit digestif : elles doivent donc résister aux enzymes présentes dans la cavité buccale, au pH acide de l'estomac, aux sucs pancréatiques et aux concentrations de bile et de mucus présentes dans l'intestin grêle (**Gournier-Château et al., 1994**).

Les probiotiques peuvent être considérés comme un moyen de véhiculer des principes actifs jusqu'à leur cibles d'action dans le tractus digestif.

Les principes actifs des probiotiques ne sont pas les mêmes pour tous les effets.

Les enzymes peuvent être actives dans l'intestin (ex. : la lactase des bactéries lactiques).

Les peptides formylés, les lipo-polysaccharides, les peptidoglycane composants de la paroi cellulaire et les nucléotides sont reconnus par le système immunitaire (**Luquet et Corrieu, 2005**).

Les bactéries du yaourt *L. bulgaricus* et *S. thermophilus* ont une résistance à l'acide faible et sont rapidement détruites en quelques minutes à pH 1.

Pochart et al (1989) ont observé que les concentrations de bactéries du yaourt parvenant au duodénum chez des sujets sains ayant ingéré 430g de yaourt contenant 10^7 UFC/ml était environ 10^5 UFC/ml au moment du pic.

Certains auteurs ont observé la survie de quelques bactéries du yaourt jusqu'à la fin de l'iléon terminal chez une partie des sujets volontaires étudiés mais ces bactéries n'ont jusqu'ici pas pu démontrer une survie significative jusque dans les selles (**Luquet et Corrieu, 2005**).

I.2.8. Intérêts thérapeutiques des probiotiques

I.2.8.1. Amélioration de la digestion du lactose

Le premier effet démontré avec un haut niveau de preuve a été l'amélioration de l'intolérance au lactose et de la malabsorption de ce sucre par des bactéries lactiques et tout particulièrement celles du yaourt (**Kolars et al., 1984 ; Marteau et al., 1990 ; De Vrese et al., 2001**).

L'intolérance au lactose est prouvée par l'absence de synthèse de la lactase ou β -galactosidase par les cellules en brosse de la surface épithéliale de l'intestin.

De ce fait, n'étant pas assimilé, le lactose, principale glucide du lait, est responsable de troubles intestinaux chez les personnes déficientes en cette enzyme

Les yaourts ou les laits fermentés avec des souches de *B. Bifidum* n'améliorent pas significativement l'assimilation du lactose chez les patients. Seules les souches le *L. bulgaricus*, *L. acidophilus* et *S. thermophilus* ont une action positive sur la digestion du lactose (**Gournier-Château et al., 1994**).

I.2.8.2. Traitement et prévention des diarrhées

Des travaux anciens montrent l'intérêt de l'utilisation du yaourt dans le traitement des diarrhées de l'enfant (**Niv et al., 1963**)

Le remplacement du lait par du yaourt a conduit à une amélioration significative chez les enfants souffrant de diarrhée persistante (**Touhami et al., 1992**)

En effet, sur 78 enfants, l'échec clinique, défini par la non-guérison de la diarrhée au terme de 5 jours d'étude ou par une perte de poids supérieure à 5 % en 24 heures, a été noté chez 45 ± 8 % d'entre ceux recevant du lait, contre seulement 15 ± 6 % de ceux recevant le yaourt. De plus, 67 ± 8 % des enfants nourris au yaourt ont guéri dans les premières 48 heures.

I.2.8.3. Inhibition des pathogènes

Il a été montré que l'inhibition produite *in vitro* sur un certain nombre de micro-organismes par *L. acidophilus* et *L. bulgaricus* porte sur les genres *Salmonella*, *Shigella*, *Staphylococcus*, *Proteus*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Bacillus* et *Vibrio* (**Shahani et al., 1976**).

Les produits laitiers sont protégés contre la plupart des contaminations microbiennes ultérieures. Cette propriété est le résultat de la production par des bactéries lactiques de nombreuses molécules antimicrobiennes comme les acides organiques (acides lactique et acétique), le peroxyde d'hydrogène et les bactériocines. Ces dernières sont définies comme étant des molécules de nature protéique, présentant une action antibactérienne contre des souches distinctes de la souche productrice (**Luquet et Corrieu, 2005**).

I.2.8.4. Stimulation du système immunitaire

Au niveau cellulaire, ce sont **Vesely et al** qui, en **1985** mirent en évidence chez l'animal nourri avec du yaourt une légère stimulation de la rate et une réponse proliférative accrue des lymphocytes spléniques à divers mitogènes, observations non retrouvées avec le même produit après chauffage.

De Simone et al (1986) et Perdigon et al (1987 et 1989) ont observé une production de lymphokines *in vivo*, une augmentation de la population des cellules B, des cellules cytotoxiques ainsi que de l'activité *natural killer* (Nk) et de l'activation de la phagocytose après administration de diverses bactéries lactiques chez l'homme.

Ces résultats ont été confirmés par **Solis Pereyra et Lemonnier (1991)**, montrant clairement que les lactobacilles du yaourt sont capables d'induire une stimulation de la réponse immunitaire non spécifique, notamment la production d'interféron lorsqu'ils sont mis en culture avec les cellules compétentes, en présence d'agent mitogène.

I.2.8.5. Action anti-cancérigène

Un travail épidémiologique français a montré un moindre risque d'adénomes coliques de grande taille chez les sujets consommant du yaourt plus de trois fois par semaines (**Boutron et al., 1996**).

I.2.8.6. Yaourt et l'hypocholestérolémie

Un taux élevé de cholestérol dans le plasma est souvent associé à l'apparition des maladies cardiovasculaires.

Un grand nombre d'étude a été effectué en utilisant les probiotiques pour déterminer si ces derniers possèdent des propriétés permettant de diminuer le taux de cholestérol sanguin (**Gournier-Château et al., 1994**).

Une recherche a été reprise aux Etats-Unis par **Mann (1977)** suggère que le yaourt serait encore plus efficace que le lait pour maintenir une cholestérolémie basse.

Chez l'homme, il ya une diminution de la cholestérolémie lors de l'ingestion de grandes quantités de yaourt. Avec des quantités plus faibles, les résultats sont difficiles à interpréter (**Walker et Gilliland, 1993**).

I.2.9. Effets indésirables potentiels des probiotiques

Au cours de la colonisation bactérienne pathologique de l'intestin grêle, les micro-organismes présents dans cet organe en forte quantité induisant une diarrhée et des lésions intestinales.

Une dégradation excessive du mucus intestinal pourrait également être un effet indésirable de certains probiotiques.

Un seul effet immunologique indésirable a été observé chez l'homme sous forme d'hépatite auto-immune qui a été aggravée par l'ingestion de très forte quantité de yaourts.

La résistance des probiotiques aux antibiotiques n'est pas en elle-même un risque sauf si elle rend le probiotique intraitable en cas d'infection ou si elle peut être transmise à des pathogènes chez lesquels la résistance thérapeutique pourrait avoir des conséquences cliniques néfastes (**Luquet et Corrieu, 2005**).

Partie II: Matériel et Méthodes

Notre étude expérimentale a été réalisée au niveau du laboratoire de microbiologie et de physico-chimie de l'unité de DANONE à Blida, du mois de Mars à Juin 2017.

L'objectif de cette expérience est de quantifier le nombre de probiotiquesensemencés dans un yaourt brassé, et de suivre leur viabilité lors de la conservation à 6°C et jusqu'à la DLC, avec contrôle de la qualité microbiologique et de stabilité physico-chimique.

❖ **Présentation de l'unité**

Le groupe Danone figure parmi les leaders mondiaux de l'alimentation et s'appuie sur quatre métiers : les Produits Laitiers Frais, la Nutrition Infantile, les Eaux et la Nutrition Médicale. Il possède un portefeuille de marques internationales (Activia, Actimel, Danette, Danonino, Danio, Nutricia...).

Danone est présent sur plus de 130 marchés, d'où il a réalisé en 2015 un chiffre d'affaires de 22,4 milliards d'euros.

En Algérie, Danone est présent depuis 2001 à travers le rachat des laiteries de Djurdjura d'Akbou à Béjaïa.

En recherche de capacités supplémentaires de Danone, et en vue de l'extension de ses activités, il a racheté l'usine de production de yaourts de l'entreprise privée «Tréfle», située à la zone industrielle de Ben Boulaid de Blida, en juin 2015. D'où le directeur général de Danone Djurdjura Algérie (DDA) a souligné que son groupe prévoit un investissement de deux milliards de dinars sur trois ans.

L'unité de Blida est spécialisée en fabrication et commercialisation des tous types de yaourts, crèmes desserts, flans, leben, charbet...

II.1. Matériel

II.1.1. Matériel biologique

Les échantillons à analyser sont :

- Yaourt semi-fini (masse blanche prélevée à la sortie de pasteurisation effectuée dans la cuve).
- Yaourt semi-fini (masse blanche prélevée après décaillage).
- Produit fini conditionné (pots de yaourt brassé fruité fraise de 100g, produits le 16/04/2017).

II.1.2. Matériel non biologique

L'appareillage, les réactifs et les milieux de culture sont illustrés en Annexe III.

II.2. Méthodes d'étude

II.2.1. Echantillonnage

L'échantillonnage correct est une opération qui demande le plus grand soin, et qui doit être effectué de manière à obtenir des échantillons représentatifs du produit.

Les échantillons destinés aux examens microbiologiques doivent être prélevés en utilisant des techniques aseptiques, du matériel et récipients qui doivent être propres et stérilisés avant usage.

Le récipient pour échantillon doit être fermé immédiatement après échantillonnage.

Le matériel d'échantillonnage des produits destinés aux examens physico-chimiques doit être propre, sec et sans influence sur les différentes propriétés, à savoir : l'odeur, la flaveur et la consistance ou la composition du produit.

II.2.2. Prélèvement

Avant de procéder au prélèvement du yaourt semi-fini « masse blanche » au cours de sa fabrication à partir de la cuve « tank de maturation », nous avons flambé le robinet du réservoir à l'aide d'un coton imbibé d'alcool.

Nous avons ouvert le robinet, et nous avons laissé couler pendant 2 à 3 min pour éliminer d'éventuels contaminants présents dans la conduite.

Un flacon stérile de 250 ml a été rempli et bien fermé dans des conditions ultra-hygiéniques.

Un premier prélèvement d'une masse blanche a été effectué juste après un refroidissement à 40°C qui suit l'étape de pasteurisation (95°C/5min).

Après l'ensemencement par des ferments lactiques lyophilisés et conditionnés dans des sachets, en les introduisant dans la cuve, un deuxième prélèvement a été effectué en fin de 4 h de fermentation à 40°C.

Les échantillons conditionnés appartenant au même lot, produit le 16/04/2017 ont été placés immédiatement dans une chambre froide (6°C) située au niveau de l'unité de production.

Nous avons prélevé aléatoirement 1 pot pour les analyses physico-chimiques, et un autre pour les analyses microbiologiques.

Par ailleurs, afin de suivre l'évolution des ferments lactiques et la stabilité physico-chimique au cours du stockage, et jusqu'à la DLC, nous avons prélevé aléatoirement 2 pots chaque semaine, et ceci durant 28 jours (J₇, J₁₄, J₂₁, J₂₈).

Les différentes analyses effectuées sont illustrées dans la figure 4.

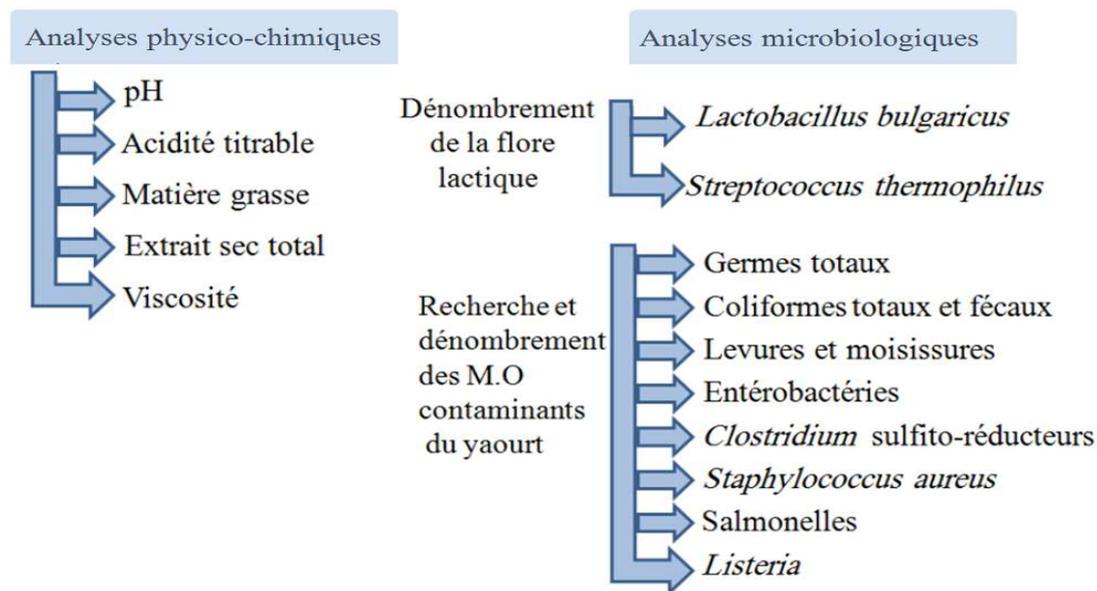


Figure 4 : Schéma représentant les différentes analyses effectuées sur le produit fini

II.2.3. Analyses physico-chimiques

L'analyse physico-chimique a pour but de déterminer la stabilité et la consistance d'un produit afin de conserver ses caractéristiques nutritionnelles, vitaminiques et organoleptiques.

L'ensemble des analyses effectuées sur le yaourt (produit fini à J_0) sont résumées dans la figure 4.

II.2.3.1. Détermination de pH

▪ Définition

Le pH est le potentiel d'hydrogène des ions H^+ dans une solution. Il est mesuré à l'aide d'un pH mètre, qui est équipé par deux sondes; une sonde de température et une autre de pH.

Il doit être étalonné quotidiennement avant de commencer l'analyse avec des solutions tampon de pH=4, puis pH=7.

▪ Principe

Le principe repose sur la différence de potentiel chimique existant entre une électrode de verre, et une électrode de référence (Calomel-K Cl) plongeant dans une même solution, est une fonction linéaire du pH de celle-ci.

Selon les lois de NERST, le potentiel de l'électrode est lié à l'activité des ions H^+ .

- **Mode opératoire**

- Plonger les deux sondes du pH mètre ; de température et de pH dans l'échantillon à analyser.
- Attendre jusqu'à la stabilité du pH puis lire la valeur trouvée.

- **Expression des résultats**

La lecture est révélée, directement sur l'échelle du pH mètre, et les résultats sont exprimés en unité de pH.

II.2.3.2. Détermination de l'acidité titrable (NF V 04-369)

- **Définition**

L'acidité titrable d'un produit laitier est la quantité d'acide lactique libérée à partir du lactose, après fermentation, en présence des bactéries lactiques.

- **Principe**

Le principe repose sur titrage de l'acide lactique, libéré par une solution alcaline (NaOH 0.1 mole/litre) en présence d'un indicateur de couleur, qui est la phénophtaléine.

- **Mode opératoire**

- Prélever à l'aide d'une pipette 10 ml de l'échantillon à analyser.
- Ajouter deux gouttes de phénophtaléine.
- Titrer avec de la soude (NaOH) à 1/90N jusqu'au virage de l'indicateur au rose clair qui persiste pendant 10 secondes.

- **Expression des résultats**

Le résultat est lu directement sur l'acidimètre, il est exprimé en degré Dornic (°D).

D'où 1 ml de NaOH correspond à 10 °D, et 1 °D correspond à 0,1g/l d'acide lactique, selon l'équation suivante :

$$A = 10 \times V$$

A : Acidité titrable, en °D.

V : Volume de la solution sodique utilisé pour le titrage, en ml.

II.2.3.3. Détermination de la matière grasse (MG) (NF V 04-210)

▪ Définition

La matière grasse est définie comme étant la quantité de gras retrouvé dans un produit laitier.

C'est le constituant le plus variable du lait. Elle est constituée d'un mélange d'acides gras saturé et non saturé, qui se trouve en suspension dans le lait, sous forme de minuscules gouttelettes (globules gras) et forme une émulsion.

▪ Principe

La détermination du taux de la MG se fait selon une méthode butyrométrique dite de Gerber.

Cette méthode consiste à doser la MG par un butyromètre gradué après dégradation des protéines par ajout d'acide sulfurique (H_2SO_4) et séparation des phases par ajout d'alcool iso-amylque suivi d'une centrifugation.

▪ Mode opératoire

- Introduire 10 g de l'échantillon à analyser (yaourt) dans 10 ml de l'eau distillée, afin de réaliser une dilution.
- Introduire dans un butyromètre gradué 10 ml d'acide sulfurique, 11 ml du yaourt dilué et 1 ml d'alcool iso-amylque.
- Fermer le butyromètre avec un bouchon propre et sec et bien homogénéiser, jusqu'à la disparition des grumeaux.
- Placer le butyromètre dans une centrifugeuse à une vitesse de 1500 tours/min pendant 10 min.

▪ Expression des résultats

La teneur en MG est lue directement sur le butyromètre gradué. Elle est exprimée en pourcentage selon l'équation suivante :

$$MG \% = N \times 2$$

N : Valeur lue sur le butyromètre

II.2.3.4. Détermination de l'Extrait Sec Total (EST) (NF V 04-370)

▪ Définition

L'EST d'un produit laitier est le pourcentage des matières sèches, existant dans le produit, et résultant de sa dessiccation.

▪ Principe :

Le principe repose sur l'évaporation de l'eau contenue dans le yaourt à analyser, à l'aide d'un dessiccateur sous l'effet d'une source de chaleur, qui est la lumière infrarouge.

▪ Mode opératoire

- Peser 2 g du yaourt à analyser dans une coupelle en aluminium séchée et tarée.
- Étaler toute la surface de la coupelle à l'aide d'une spatule en inox.
- Mettre la coupelle dans la thermo-balance (Balance dessiccatrice électrique).
- Baisser le couvercle de l'appareil, et appuyer sur "START".

▪ Lecture et expression des résultats

Après 10 min, un bip sonore indique la fin de l'opération de dessiccation, et le résultat s'affiche sur l'écran de l'appareil en pourcentage massique de matière sèche par rapport au total.

II.2.3.5. Détermination de la viscosité

▪ Définition

La mesure de la viscosité est une évaluation de la texture du yaourt, qu'elle augmente avec l'augmentation de la production des exo-polysaccharides par *Streptococcus thermophilus*.

▪ Principe

La détermination de la viscosité se fait à l'aide d'un viscosimètre, qui est équipé par une plate forme et une tige pénétrante (cylindre), qu'il doit être étalonné quotidiennement avant de commencer l'analyse.

▪ Mode opératoire

- Placer le produit à analyser dans la plate forme, au dessous de la tige.
- Appuyer sur le bouton pour faire descendre la tige pénétrante à peut près 1 à 2 cm de la surface de produit, puis elle pénètre en profondeur de produit.

- Arrêter et commencer de faire sortir le produit.
- **Expression des résultats**

Les résultats sont affichés sur le trait final en gramme.

II.2.4. Analyses microbiologiques

- **Préparation des dilutions décimales**
 - Introduire aseptiquement 25 grammes de yaourt brassé à analyser dans 225 ml de diluant TSE, et bien homogénéiser à l'aide d'un agitateur; ceci constitue alors la dilution mère (DM) qui correspond à la dilution 1/10 ou 10^{-1} .
 - Ensuite, prélever à l'aide d'une pipette graduée et stérile 1 ml de la DM, et l'introduire dans un tube à vis stérile contenant au préalable 9 ml de diluant TSE : On obtient alors la dilution au 1/100 ou 10^{-2} qu'on mélange soigneusement.
 - Enfin, introduire toujours à l'aide d'une autre pipette stérile 1 ml de la dilution 10^{-2} dans un tube à vis stérile contenant au préalable 9 ml du même diluant (TSE) : Cette dilution est alors au 1/1000 ou 10^{-3} , qu'on mélange soigneusement.
 - Les dilutions sont ainsi réalisées jusqu'à la dilution 10^{-7} , en changeant la pipette après chaque utilisation (Figure 5).

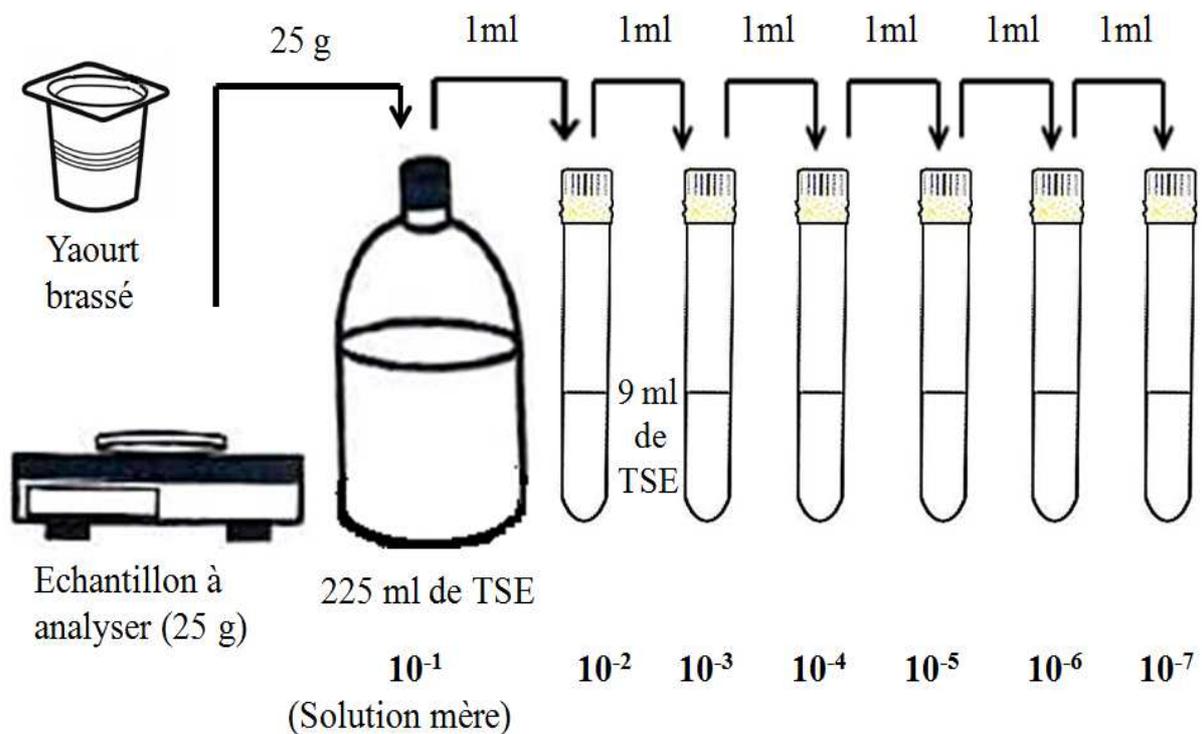


Figure 5 : Préparation de la solution mère et des dilutions décimales

II.2.4.1. Dénombrement de *S. thermophilus* (NF ISO 15214)**▪ Mode opératoire**

- À partir des dilutions décimales allant de 10^{-1} à 10^{-7} , transférer aseptiquement à l'aide d'une pipette stérile 1 ml de chaque dilution dans des boîtes de pétri stériles numérotées.
- Couler dans chaque boîte 20 ml du milieu M17 préalablement fondu au bain marie, et refroidi à 42°C.
- Faire des mouvements circulaires et de va-et-vient en forme de « 8 » pour bien homogénéiser le milieu et l'inoculum.
- Laisser solidifier sur paillasse.
- Incuber les boîtes, couvercles en bas, à 37 °C pendant 48 à 72 heures.

▪ Lecture et interprétation

- Après avoir choisi les boîtes contenant entre 10 et 300 colonies, dénombrer les colonies lenticulaires, de 1 à 3 mm de diamètre, et de couleur blanchâtre (Figure 6).
- Les colonies sont comptées avec soin en marquant au fur et à mesure à l'aide d'un marqueur sur le fond extérieur de la boîte.
- Le nombre des bactéries est exprimé en UFC/ml du produit analysé, il est calculé en multipliant le nombre des colonies trouvées par l'inverse de la dilution utilisée.
- Calculer ensuite la moyenne arithmétique des colonies entre les différentes dilutions.

▪ Calcul de la moyenne

- Ordonner les boîtes de la dilution 10^{-1} à 10^{-7} , en éliminant celles qui comprennent <30 et >300 colonies.
- Retenir les deux premières dilutions.

$$N = \frac{(\sum C \times d)}{(V \times 1,1)}$$

Avec :

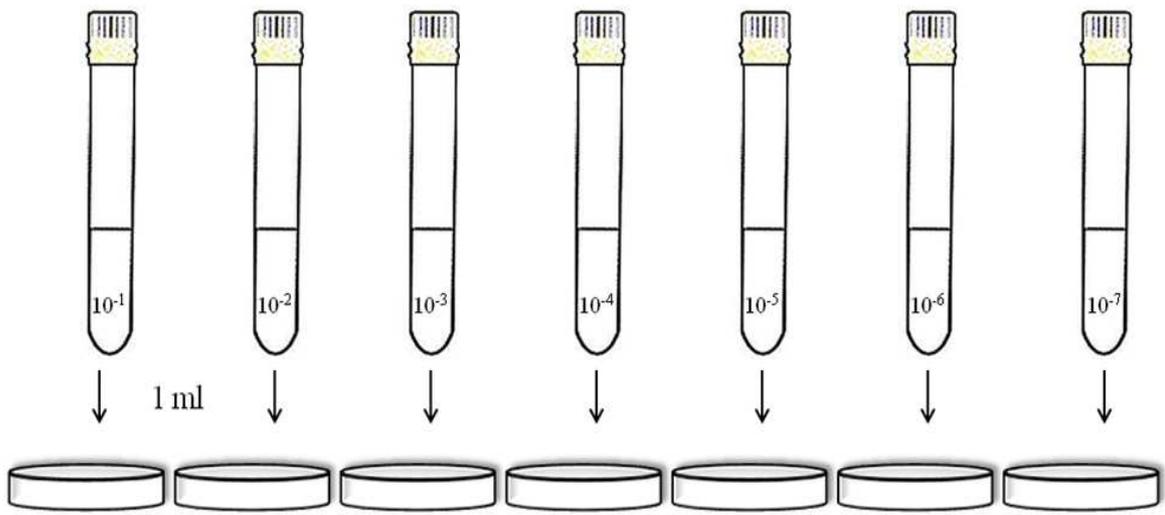
N : nombre de bactéries en UFC/g ou UFC/ml du produit initial.

C : nombre de colonies comptées sur boîtes retenues.

V : Volume de l'inoculum utilisé dans chaque boîte, en ml.

d : facteur de dilution qui correspond à la première dilution retenue.

À partir des dilutions décimales :



Couler 20 ml du milieu M17 préalablement fondu et refroidi à 42 °C.



Homogénéiser, laisser solidifier.

Incuber à 37 °C pendant 48h.



Compter les colonies blanchâtres lenticulaires.

Figure 6 : Dénombrement de *Streptococcus thermophilus*

II.2.4.2. Dénombrement de *L. bulgaricus* (NF ISO 15214)

▪ Mode opératoire

- À partir des dilutions décimales allant de 10^{-1} à 10^{-7} , transférer aseptiquement à l'aide d'une pipette stérile 1 ml de chaque dilution dans des boîtes de pétri stériles numérotées.
- Couler dans chaque boîte 15 ml du milieu MRS préalablement fondu au bain marie, et refroidi à 42°C.
- Faire des mouvements circulaires et de va-et-vient en forme de « 8 » pour bien homogénéiser le milieu et l'inoculum.
- Laisser solidifier sur paillasse.
- Ajouter une deuxième couche, mince, du milieu MRS, afin de créer l'anaérobiose, et laisser solidifier sur paillasse.
- Incuber les boîtes, couvercles en bas, à 37 °C pendant 48 à 72 heures.

▪ Lecture et interprétation

- Après avoir choisi les boîtes contenant entre 10 et 300 colonies, dénombrer les colonies lenticulaires, de 1 à 3 mm de diamètre, et de couleur blanchâtre (Figure 7).
- Les colonies sont comptées avec soin en marquant au fur et à mesure à l'aide d'un marqueur sur le fond extérieur de la boîte.
- Le nombre des bactéries est exprimé en UFC/ml du produit analysé, il est calculé en multipliant le nombre des colonies trouvées par l'inverse de la dilution utilisée.
- Calculer ensuite la moyenne arithmétique des colonies entre les différentes dilutions.

À partir des dilutions décimales :

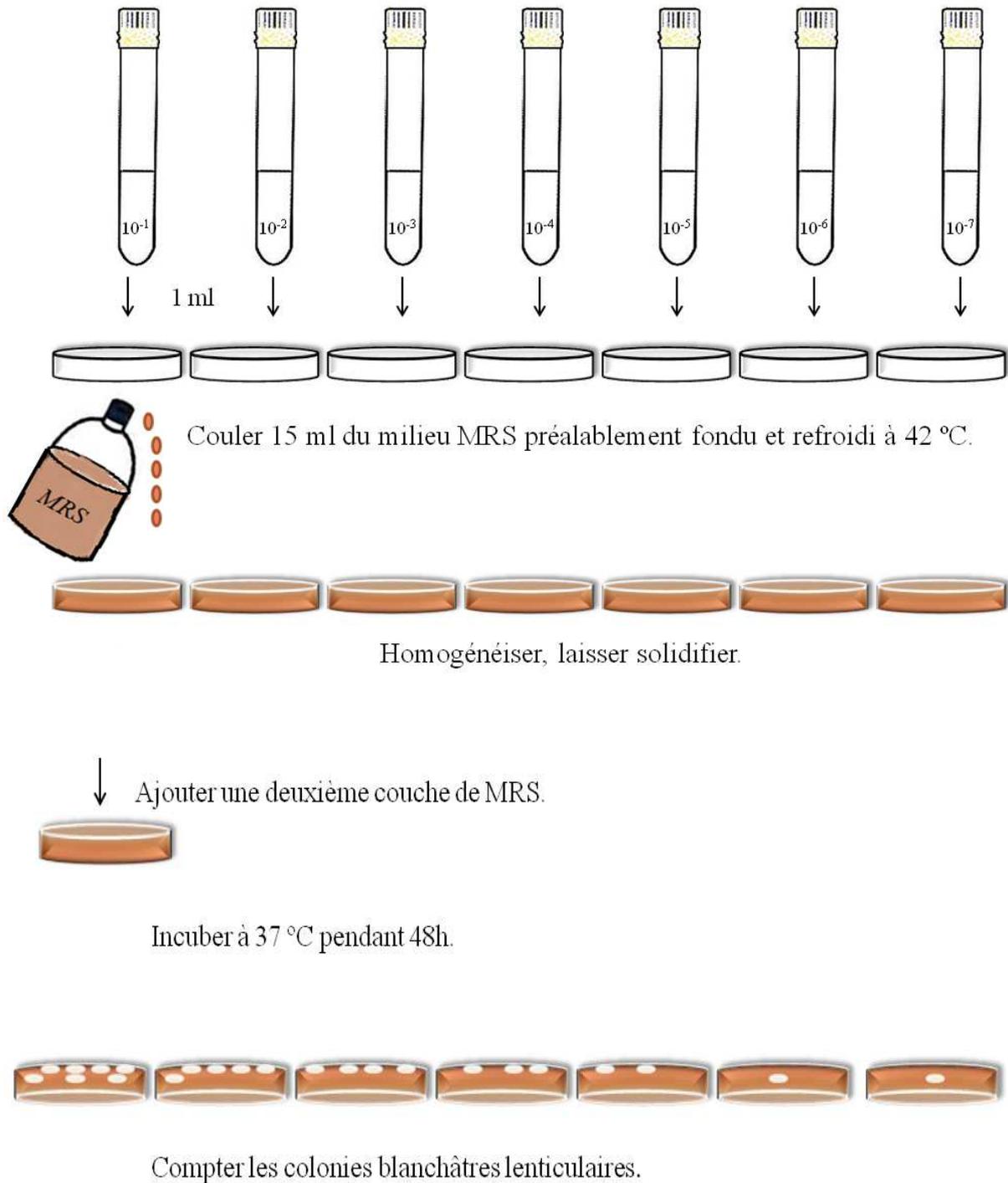


Figure 7 : Dénombrement de *Lactobacillus bulgaricus*

- **Confirmation microscopique**

- a) **Coloration de Gram**

Cette technique a été inventée par Christian Gram en 1884. Elle permet de distinguer la paroi bactérienne ayant \pm de peptidoglycane, et de visualiser facilement les bactéries et de donner des indicateurs sur leurs formes et leurs tailles.

Etapes :

1. Préparer un frottis sur une lame en verre, en prenant au hasard à l'aide d'une anse de platine quelques colonies de *S. thermophilus* ou *L. bulgaricus*.
2. Etaler puis ajouter quelques gouttes d'eau distillée.
3. Flamber le dos de la lame au dessus d'un bec bunsen pour sécher le frottis.
4. Plonger la lame dans un bain de violet de gentiane, pendant 2 min, puis rincer avec de l'eau distillée.
5. Plonger la lame dans un bain de lugol, pendant 1 min, puis rincer avec d'eau distillée.
6. Plonger la lame dans un bain d'alcool, pendant 30 secs, puis rincer avec d'eau distillée pour stopper la décoloration.
7. Plonger la lame dans un bain de fuschine, pendant 1 min, puis rincer avec d'eau distillée et sécher la lame.
8. Recouvrir la lame d'une lamelle.
9. Observer au microscope photonique, objectif x 40 puis x 100 en ajoutant une goutte d'huile à immersion (Figure 8).

- b) **Examen à l'état frais**

L'état frais met en évidence la forme et le mode de regroupement et la mobilité.

Etapes :

- Prélever, au hasard, à l'aide d'une anse de platine quelques colonies de *S. thermophilus* ou *L. bulgaricus*, et les déposer au centre d'une lame propre.
- Ajouter une goutte d'eau distillée.
- Recouvrir la lame d'une lamelle.
- Observer au microscope photonique objectif x 40.

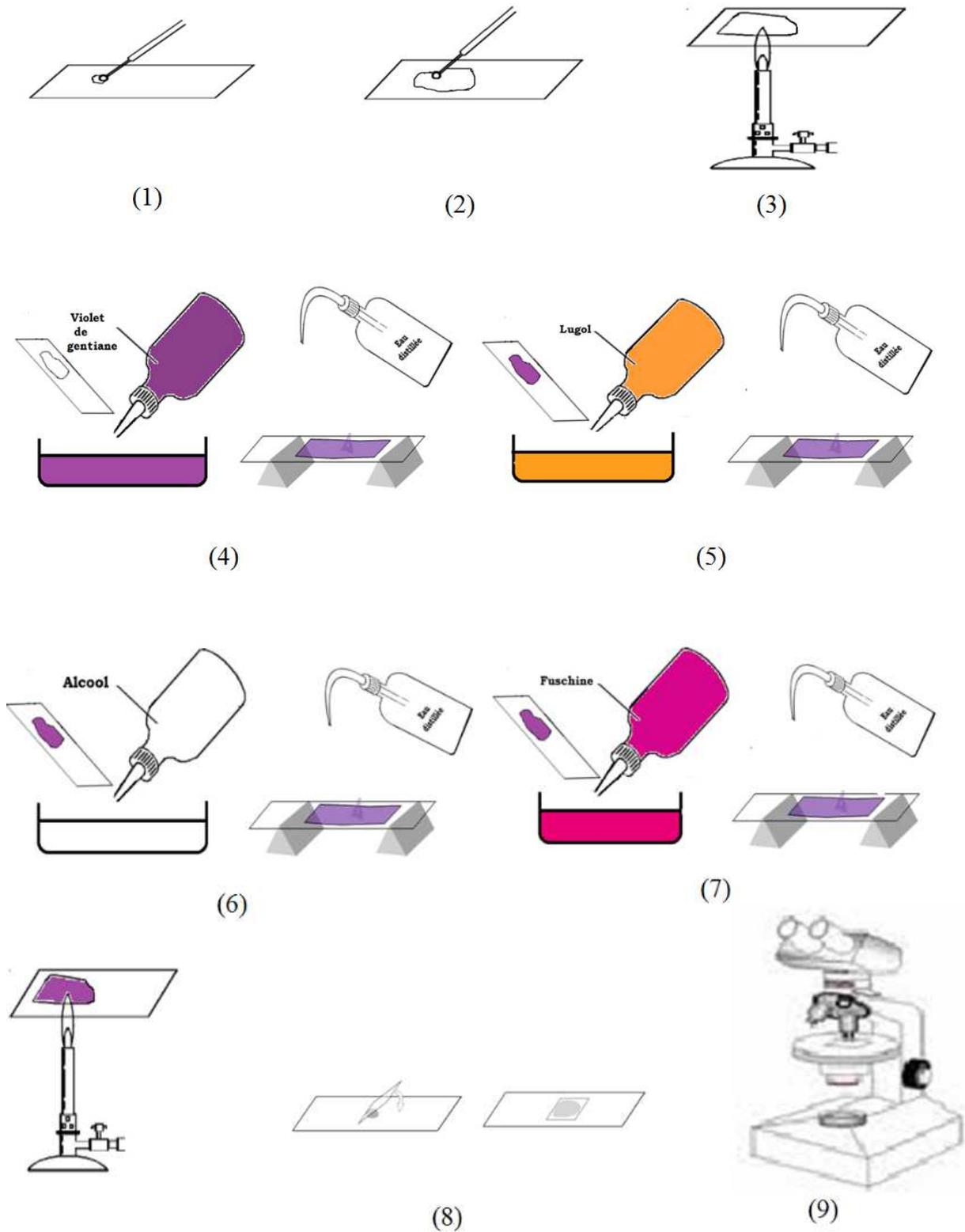


Figure 8 : Etapes de coloration de Gram

II.2.4.3. Recherche et dénombrement de germes totaux (FTAM) (ISO 4832)

▪ Définition

La flore mésophile aérobie totale (FTAM) est l'ensemble des micro-organismes aptes à se multiplier à l'air aux températures moyennes, plus précisément ceux dont la température optimale de croissance est située entre 25 et 40°C. Ils peuvent être des micro-organismes pathogènes ou d'altération (**Bourgeois et Leveau, 1996**).

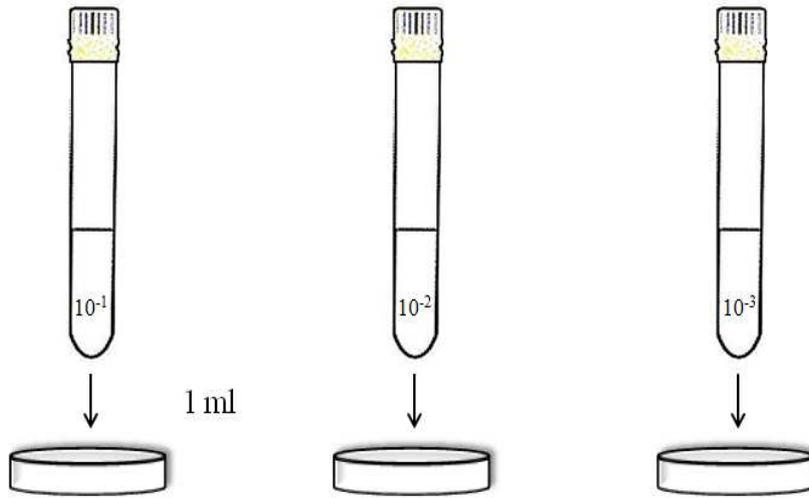
▪ Mode opératoire

- À partir des dilutions décimales allant de 10^{-1} à 10^{-3} , transférer aseptiquement à l'aide d'une pipette stérile 1 ml de chaque dilution dans des boîtes de pétri stériles numérotées.
- Couler dans chaque boîte 20 ml du milieu PCA préalablement fondu au bain marie, et refroidi à 42°C.
- Faire des mouvements circulaires et de va-et-vient en forme de « 8 » pour bien homogénéiser le milieu et l'inoculum.
- Laisser solidifier sur pailleasse.
- Incuber les boîtes, couvercles en bas, à 30 °C pendant 72 heures.

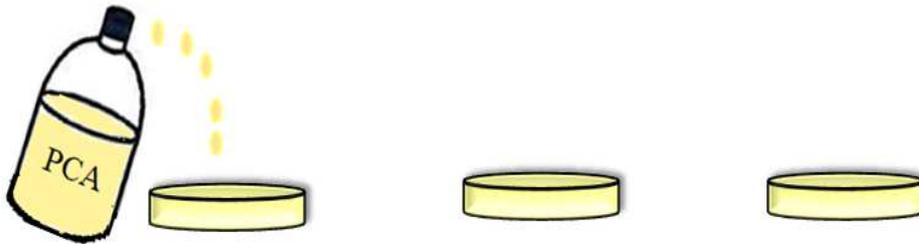
▪ Lecture et interprétation

- Après avoir choisi les boîtes contenant entre 30 et 300 colonies, dénombrer les colonies lenticulaires avec soin, en marquant au fur et à mesure à l'aide d'un marqueur sur le fond extérieur de la boîte (Figure 9).
- Le nombre des bactéries est exprimé en UFC/g du produit analysé, il est calculé en multipliant le nombre des colonies trouvées par l'inverse de la dilution utilisée.
- Calculer ensuite la moyenne arithmétique des colonies entre les différentes dilutions.

À partir des dilutions décimales :



Couler 20 ml du milieu PCA préalablement fondu et refroidi à 42 °C.



Homogénéiser, laisser solidifier.

Incuber à 30 °C pendant 72h.



Compter les colonies lenticulaires.

Figure 9 : Recherche et dénombrement des germes totaux (FTAM)

II.2.4.4. Recherche et dénombrement des coliformes totaux et fécaux (ISO 4832)

▪ Définition

Le terme coliforme correspond à des micro-organismes en bâtonnets, non sporogènes, à coloration Gram négative, oxydase négative, aérobies ou aérobies facultatifs et capables de fermenter le lactose en moins de 48 heures à 35°C pour les coliformes totaux, alors que les coliformes fécaux tolèrent une température de 44°C à laquelle ils fermentent le sucre en 24 heures (Hade, 2007).

Ces derniers constituent des germes indicateurs de contamination fécale en bactériologie alimentaire et des eaux. Ils appartiennent aux genres *Escherichia*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsella*, *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia* (Delarras, 2014).

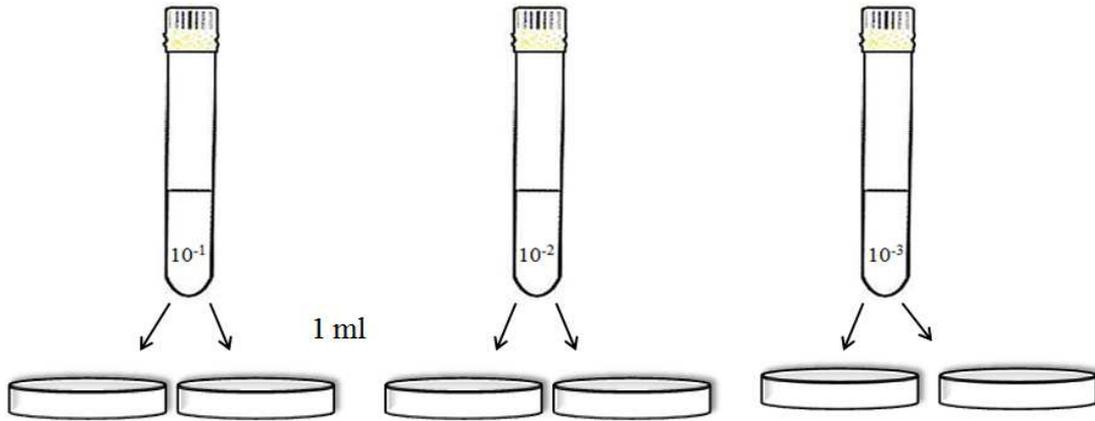
▪ Mode opératoire

- À partir des dilutions décimales allant de 10^{-1} à 10^{-3} , transférer aseptiquement 2 fois à l'aide d'une pipette stérile 1 ml de chaque dilution dans deux boîtes de pétri stériles numérotées ; l'une sert à la recherche des C.T et l'autre sert à la recherche des CF.
- Couler dans chaque boîte 15 ml du milieu VRBL préalablement fondu au bain marie, et refroidi à 42°C.
- Faire des mouvements circulaires et de va-et-vient en forme de « 8 » pour bien homogénéiser le milieu et l'inoculum.
- Laisser solidifier sur paillasse.
- Ajouter une deuxième couche, mince, du milieu VRBL, afin de créer l'anaérobiose, et de se protéger contre les contaminations diverses, et laisser solidifier sur paillasse.
- Incuber, couvercles en bas, les boîtes qui servent à la recherche des CT à 37 °C, et celles qui servent à la recherche des CF à 44°C pendant 24 heures.

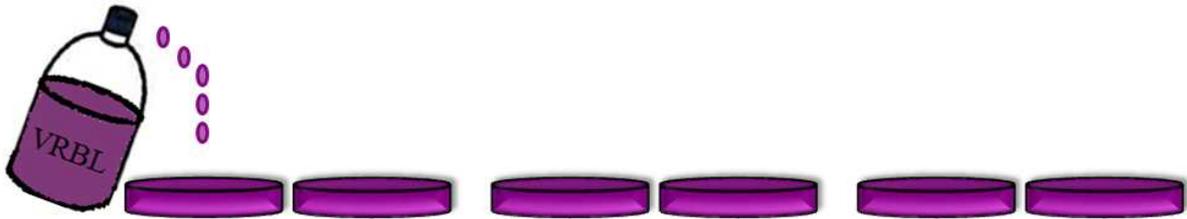
▪ Lecture et interprétation

- Après avoir choisi les boîtes contenant entre 30 et 300 colonies, dénombrer, avec soin, les colonies rouges violettes fluorescentes de 0,5 à 1 mm de diamètre, en marquant au fur et à mesure à l'aide d'un marqueur sur le fond extérieur de la boîte (Figure 10).
- Le nombre des bactéries est exprimé en UFC/g du produit analysé, il est calculé en multipliant le nombre des colonies trouvées par l'inverse de la dilution utilisée.
- Calculer ensuite la moyenne arithmétique des colonies entre les différentes dilutions.
- Il est impossible de trouver plus de CF que les CT.

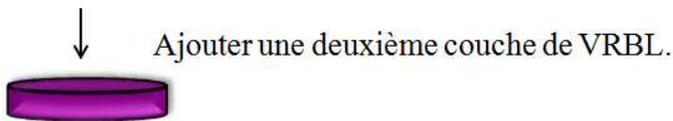
À partir des dilutions décimales :



Couler 15 ml du milieu VRBL préalablement fondu et refroidi à 42 °C.



Homogénéiser, laisser solidifier.



Incuber à 37 °C pendant 24h.
(Coliformes totaux)



Incuber à 44 °C pendant 24h.
(Coliformes fécaux)



Compter les colonies violettes fluorescentes.

Figure 10 : Recherche et dénombrement des coliformes totaux et fécaux

II.2.4.5. Recherche et dénombrement des entérobactéries (ISO 21528-2)

▪ Définition

La famille des entérobactéries ou *Enterobacteriaceae* est constituée de genres bactériens qui sont rassemblés en raison de caractères bactériologiques communs :

- Ce sont des bacilles à Gram négatif dont les dimensions varient de 1 à 6 µm de long sur 0.3 à 1 µm de large ;
- Mobiles car ciliature péritriche ou immobiles ;
- Se développent en aéro-anaérobiose et sur milieux nutritifs ;
- Acidifient le glucose par voie fermentative avec souvent production de gaz ;
- Ne possèdent pas l'oxydase ;
- Réduisent les nitrates en nitrites (Avril et al., 2000).

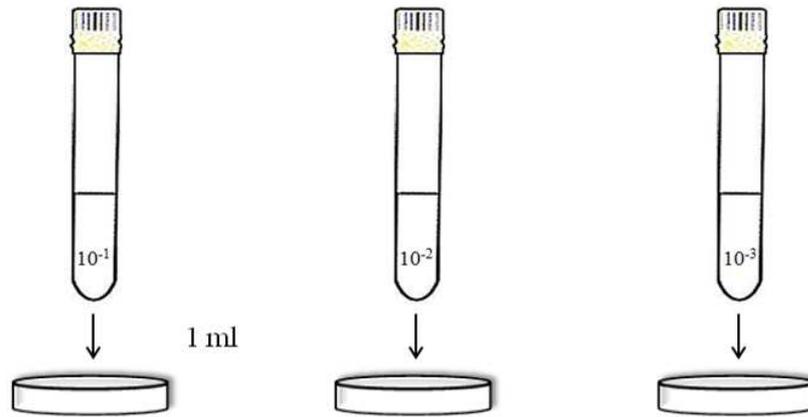
▪ Mode opératoire

- À partir des dilutions décimales allant de 10^{-1} à 10^{-3} , transférer aseptiquement à l'aide d'une pipette stérile 1 ml de chaque dilution dans des boîtes de pétri stériles numérotées.
- Couler dans chaque boîte 15 ml du milieu VRBG préalablement fondu au bain marie, et refroidi à 42°C.
- Faire des mouvements circulaires et de va-et-vient en forme de « 8 » pour bien homogénéiser le milieu et l'inoculum.
- Laisser solidifier sur paillasse.
- Ajouter une deuxième couche, mince, du milieu VRBG, afin de créer l'anaérobiose, et laisser solidifier sur paillasse.
- Incuber les boîtes, couvercles en bas, à 37 °C pendant 24heures.

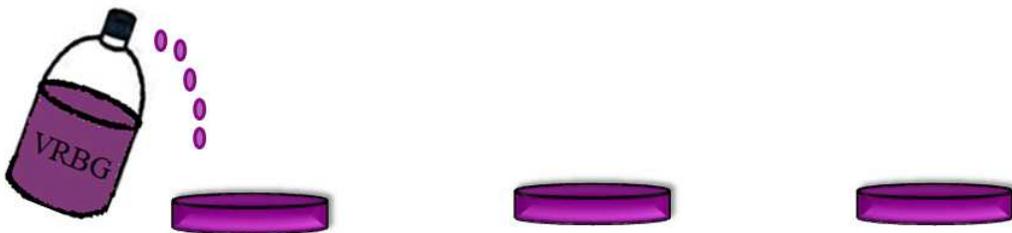
▪ Lecture et interprétation

- Après avoir choisi les boîtes contenant entre 30 et 300 colonies, dénombrer les colonies violettes (Figure 11).
- Les colonies sont comptées avec soin en marquant au fur et à mesure à l'aide d'un marqueur sur le fond extérieur de la boîte.
- Le nombre des bactéries est exprimé en UFC/g du produit analysé, il est calculé en multipliant le nombre des colonies trouvées par l'inverse de la dilution utilisée.
- Calculer ensuite la moyenne arithmétique des colonies entre les différentes dilutions.

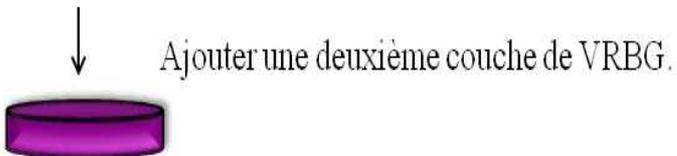
À partir des dilutions décimales :



Couler 15 ml du milieu VRBG préalablement fondu et refroidi à 42 °C.



Homogénéiser, laisser solidifier.



Incuber à 37 °C pendant 24h.



Compter les colonies violettes.

Figure 11 : Recherche et dénombrement des entérobactéries

II.2.4.6. Recherche et dénombrement des levures et moisissures (ISO 7954)

▪ Définition

Les levures sont des champignons unicellulaires, hétérotrophes, aérobies. Elles sont en général acidophiles et mésophiles, se multipliant à des pH compris entre 3 et 7,5 et à des températures optimales voisines de 25-28°C.

Elles interviennent fréquemment comme contaminants et agents de dégradation surtout dans les produits acides, sucrés, ou alcoolisés (**Guiraud, 1998**).

Les moisissures sont des champignons filamenteux unis ou multicellulaires, hétérotrophes, aérobies, en général acidophiles (pH de développement compris entre 3 et 7) et mésophiles (température optimale 20-30°C). Cependant certaines espèces sont psychrophiles (<15°C).

Elles sont souvent dotées de propriétés lytiques importantes (Cellulolytique, pectinolytique, protéolytique, lipolytique, etc...) qui en font des agents de dégradation dangereux (**Guiraud, 1998**).

▪ Mode opératoire

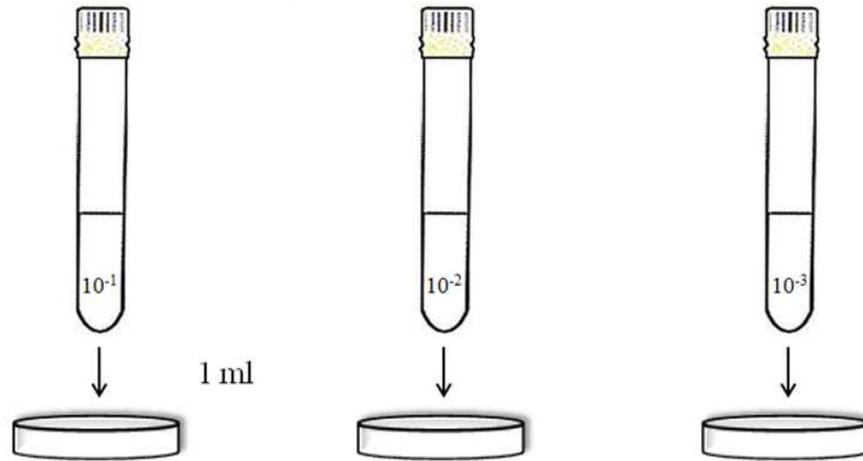
- À partir des dilutions décimales allant de 10^{-1} à 10^{-3} , transférer aseptiquement à l'aide d'une pipette stérile 1 ml de chaque dilution dans des boîtes de pétri stériles numérotées.
- Couler dans chaque boîte 20 ml du milieu OGA préalablement fondu au bain marie, et refroidi à 42°C.
- Faire des mouvements circulaires et de va-et-vient en forme de « 8 » pour bien homogénéiser le milieu et l'inoculum.
- Laisser solidifier sur paillasse.
- Incuber les boîtes, couvercles en bas, à 25 °C pendant 5 jours.

▪ Lecture et interprétation

- Après avoir choisi les boîtes contenant entre 10 et 300 colonies, dénombrer avec soin en marquant à l'aide d'un marqueur sur le fond extérieur de la boîte les colonies caractéristiques des levures qui apparaissent blanchâtres, lisses brillantes, rondes et bombées, et celles des moisissures qui apparaissent filamenteuses, pigmentées et de taille plus grande que les levures (Figure 12).

- Le nombre des germes est exprimé en UFC/g du produit analysé, il est calculé en multipliant le nombre des colonies trouvées par l'inverse de la dilution utilisée.
- Calculer ensuite la moyenne arithmétique des colonies entre les différentes dilutions.

À partir des dilutions décimales :



Couler 20 ml du milieu OGA préalablement fondu et refroidi à 42 °C.



Homogénéiser, laisser solidifier.

Incuber à 25°C pendant 5 jours.



Compter les colonies blanchâtres crémeuses (levures).

Compter les colonies filamenteuses (moisissures).

Figure 12 : Recherche et dénombrement des levures et moisissures

II.2.4.7. Recherche et dénombrement des *Clostridium* sulfito-réducteurs (NF V59-109)

▪ Définition

Bacilles anaérobies à Gram positif, souvent de grande taille, isolés ou en chainettes, généralement mobiles, catalase négative.

Ces bactéries sont capables de sporuler. Les spores peuvent être isolées et comptées en utilisant des milieux contenant du sulfate (**Guiraud, 1998**).

▪ Mode opératoire

- À partir des dilutions décimales allant de 10^{-1} à 10^{-3} , transférer aseptiquement à l'aide d'une pipette stérile 1 ml de chaque dilution dans des tubes à vis stériles numérotés.
- Soumettre les tubes à un chauffage au bain marie à 80 °C pendant 10 min, puis à un refroidissement immédiat, dans le but d'éliminer les formes végétatives et garder les formes sporulées.
- Faire fondre la gélose V.F au bain marie, et refroidir à 42 °C, puis additionner quelques gouttes de sulfite de sodium et Alun de fer.
- Ajouter dans chaque tube 9 ml du milieu V.F, et bien homogénéiser.
- Laisser les tubes solidifier sur portoir, en paille.
- Incuber les tubes, couvercles en bas, à 37 °C pendant 24 heures.

▪ Lecture et interprétation

- Dénombrer les colonies noirâtres qui poussent en profondeur, donc en anaérobiose, et qui correspondent aux spores thermorésistantes de CSR (Figure 13).
- Les résultats sont exprimés en nombre de spores par g du produit analysé.

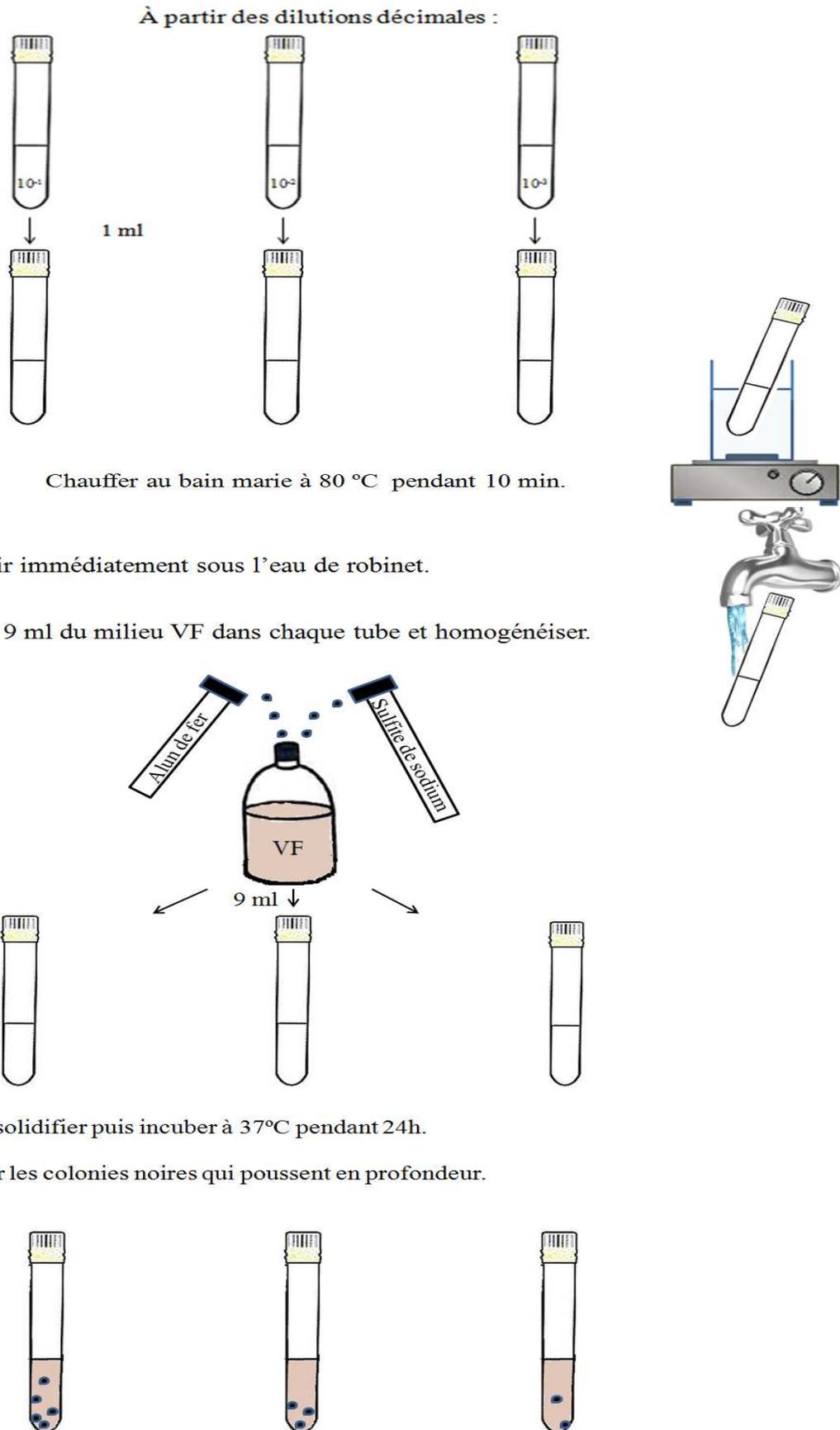


Figure 13 : Recherche et dénombrement des *Clostridium* sulfito-réducteurs

II.2.4.8. Recherche et dénombrement de *Staphylococcus aureus* (ISO 6888-1)

▪ Définition

Les staphylocoques sont des coques immobiles, isolés ou groupés en diplocoques ou, le plus souvent, en amas (du grec staphylo, grappe de raisin), diamètre moyen de 0.8 à 1 µm.

Après coloration de Gram, ce sont des cocci Gram positif.

Les staphylocoques à coagulase positive (SCP) sont généralement considérés comme pathogènes.

Staphylococcus aureus est aéro-anaérobie facultatif et cultive facilement sur milieu usuel. Sa température de croissance optimale est de 37°C et le pH optimal de 7.5 mais de grandes variations sont tolérées (Larpent, 2010).

▪ Mode opératoire

- À partir des dilutions décimales allant de 10^{-1} à 10^{-3} , transférer aseptiquement à l'aide d'une pipette stérile 1 ml de chaque dilution dans des tubes à vis stériles numérotés.
 - Ajouter dans chaque tube 0,1 ml d'une solution stérile de tellurite de potassium à 1 %.
- 1^{ère} étape : Enrichissement
- Ajouter 15 ml du bouillon G.C dans chaque tube, et bien homogénéiser.
 - Incuber les tubes, à 37 °C pendant 24 heures.

Lecture

Les tubes ayant virés au noir sont considérés comme positifs.

2^{ème} étape : Isolement

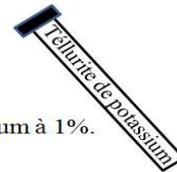
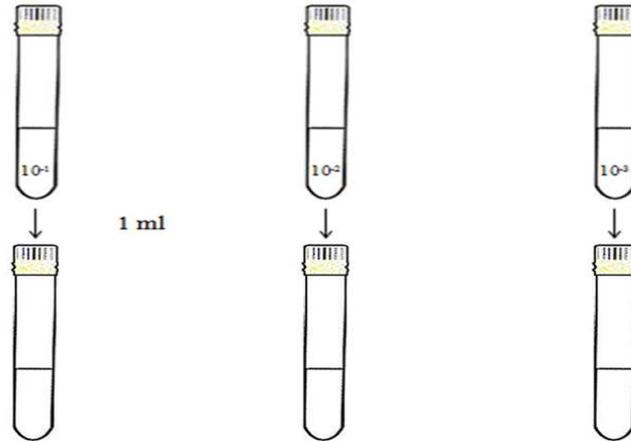
Pour la confirmation :

- Repiquer dans des boîtes de pétri stériles et numérotées, les tubes considérés comme positifs sur milieu Chapman préalablement fondu au bain marie et refroidi à 42°C.
- Faire des mouvements circulaires et de va-et-vient en forme de « 8 » pour bien homogénéiser le milieu et l'inoculum.
- Laisser solidifier sur paillasse.
- Incuber les boîtes, couvercles en bas, à 37°C pendant 24 heures.

▪ Lecture et interprétation

- Dénombrer les colonies lisses brillantes, bombées, de taille moyenne et de couleur jaune dorée due à la fermentation du mannitol, et qui sont comprises entre 30 et 300 (Figure 14).
- Les résultats sont exprimés en UFC/g du produit analysé.

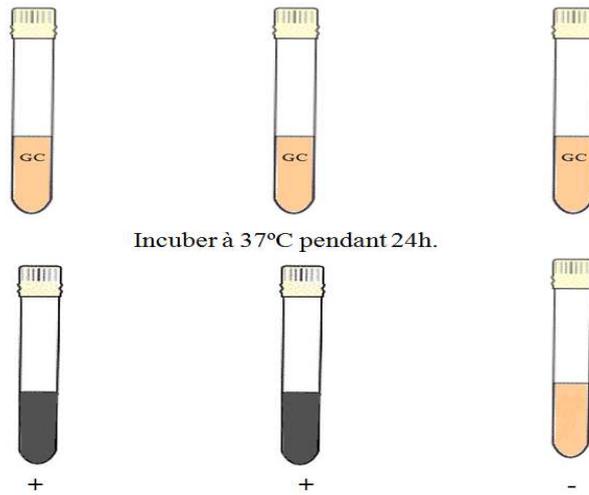
À partir des dilutions décimales :



Ajouter dans chaque tube 0,1 ml d'une solution stérile de téllurite de potassium à 1%.

Enrichissement :

Ajouter 15 ml du bouillon GC dans chaque tube et bien mélanger.



Isolement :

Repiquer les tubes présentant un noircissement ou un précipité noir sur milieu Chapman préalablement fondu et refroidi à 42 °C.

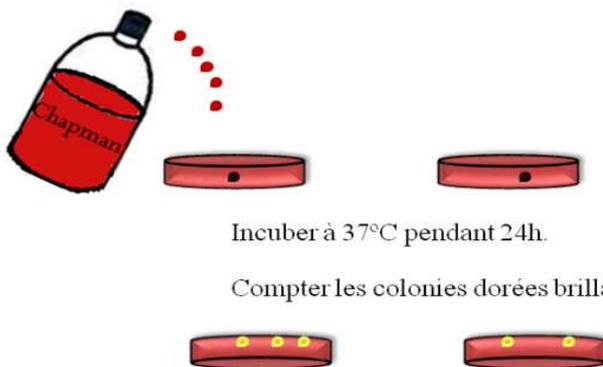


Figure 14 : Recherche et dénombrement de *Staphylococcus aureus*

II.2.4.9. Recherche et dénombrement des Salmonelles (ISO FDIS 6579)

▪ Définition

Les salmonelles sont des bâtonnets à gram négatif, motiles, aérobies, qui typiquement ne fermentent pas le lactose et ne forment pas de spores, et sont pathogènes pour l'homme et les animaux par voie orale. Elles croissent facilement en milieu ordinaire, elles forment de l'acide et habituellement du gaz à partir du glucose, du maltose, du mannitol et de la dextrine.

En épidémiologie, le lait et autres produits laitiers constituent une source importante d'infection par les salmonelles : contamination par des fèces ou due à une pasteurisation insuffisante (**Jawetz et al., 1973**).

▪ Mode opératoire

1^{ère} étape : Pré-enrichissement

- Introduire aseptiquement 25 g de l'échantillon à analyser dans un flacon stérile contenant 225 ml du milieu TSE, afin de revivifier les cellules.
- Homogénéiser et incuber à 37°C pendant 24 heures.

2^{ème} étape : Enrichissement

- Repiquer 10 ml du milieu de pré-enrichissement dans un flacon de 100 ml du milieu SFB, et bien homogénéiser.
- Répartir le milieu dans des tubes à vis stériles, contenant chacun 10 ml.
- Incuber les tubes à 37°C pendant 24 heures.

Lecture

Les tubes ayant virés au rouge brique sont considérés comme positifs.

3^{ème} étape : Isolement

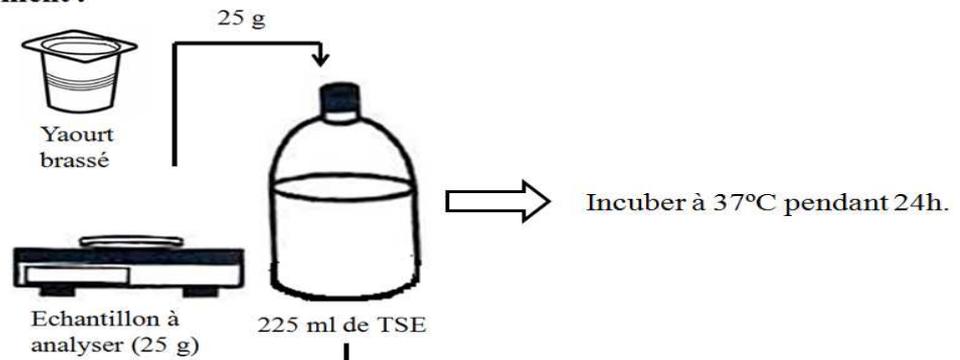
Pour la confirmation :

- Repiquer dans des boîtes de pétri stériles et numérotées, les tubes considérés comme positifs sur milieu Hektoen préalablement fondu au bain marie et refroidi à 42°C.
- Faire des mouvements circulaires et de va-et-vient en forme de « 8 » pour bien homogénéiser le milieu et l'inoculum.
- Laisser solidifier sur paillasse.
- Incuber les boîtes, couvercles en bas, à 37°C pendant 24 heures.

▪ **Lecture et interprétation**

- Dénombrer les colonies lisses verdâtres, de 2 à 4 mm de diamètre, avec ou sans un centre noir (Figure 15).
- Les résultats sont exprimés par une présence ou absence de germes.

Pré-enrichissement :



Enrichissement :

Repiquer 10 ml sur milieu **SFB**.



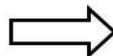
Incuber à 37°C pendant 24h.

Apparition de couleur rouge brique.



Isolement :

Repiquer sur milieu Hektoen préalablement fondu et refroidi à 42 °C.



Incuber à 37°C pendant 24h.

Compter les colonies verdâtres lisses, avec ou sans centre noir.



Figure 15 : Recherche et dénombrement des Salmonelles

II.2.4.10. Recherche et dénombrement de *Listeria* (NV V08-055)

▪ Définition

Les *Listeria* sont des bactéries ubiquitaires, telluriques, très répandues dans l'environnement (sol, végétaux, eaux douces et salées). Elles sont très résistantes au milieu extérieur (plusieurs années à 4°C). Ce sont aussi des hôtes des êtres vivants.

Listeria monocytogenes est un petit bacille à Gram positif, mobile à 20°C, aéro-anaérobie facultatif qui se développe facilement sur les milieux usuels.

Listeria monocytogenes est fréquente dans les produits laitiers souvent fortement contaminés : lait cru (45% de contamination) (Flandrois, 1997).

▪ Mode opératoire

1ère étape : Enrichissement primaire

- Introduire aseptiquement 25 g de l'échantillon à analyser dans un flacon stérile contenant 225 ml du milieu Frazer-demi, afin de revivifier les cellules stressées.
- Homogénéiser et incuber à 30°C pendant 24 heures.

2^{ème} étape : Enrichissement secondaire

- Repiquer 0,1 ml du milieu de pré-enrichissement primaire dans chaque tube contenant 10 ml du bouillon Frazer, et bien homogénéiser.
- Incuber les tubes à 37°C pendant 24 heures.

Lecture

Les tubes présentant un noircissement sont considérés comme positifs.

3^{ème} étape : Isolement

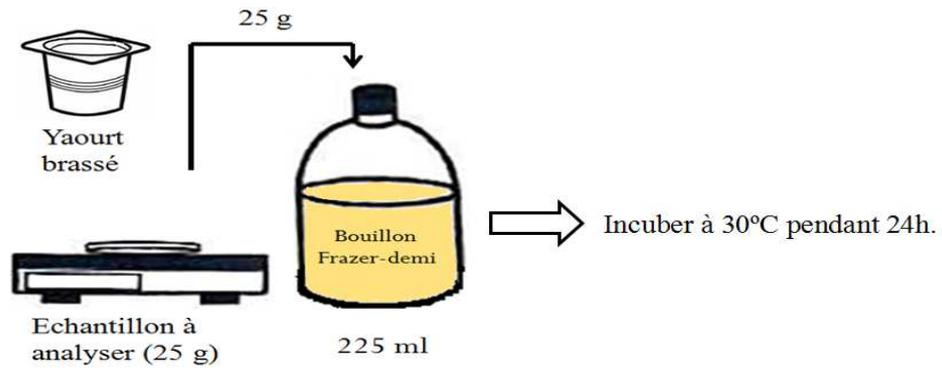
Pour la confirmation :

- Repiquer dans des boîtes de pétri stériles et numérotées, les tubes considérés comme positifs sur milieu Palcam préalablement fondu au bain marie et refroidi à 42°C.
- Faire des mouvements circulaires et de va-et-vient en forme de « 8 » pour bien homogénéiser le milieu et l'inoculum.
- Laisser solidifier sur paillasse.
- Incuber les boîtes, couvercles en bas, à 37°C pendant 24 heures.

▪ **Lecture et interprétation**

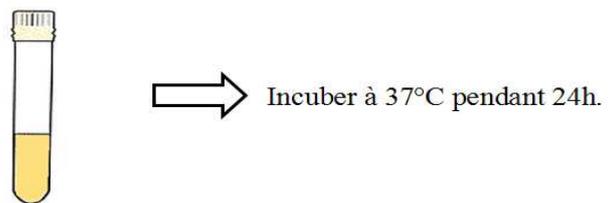
- Dénombrer les colonies gris-vertes (Figure 16).
- Repérer les colonies suspectes et les soumettre aux tests biochimiques d'identification.

Enrichissement primaire :



Enrichissement secondaire:

Repiquer 0.1 ml dans 10 ml du milieu **Frazer**.

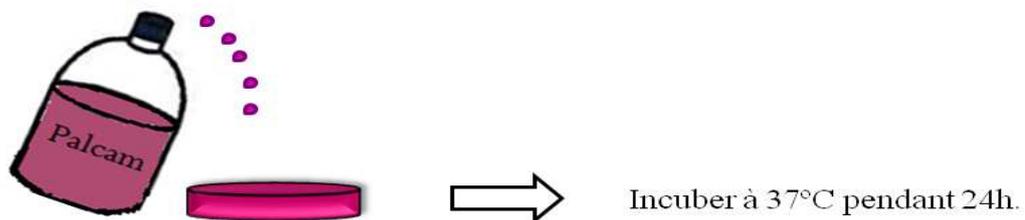


Noircissement



Isolement :

Repiquer sur milieu Palcam préalablement fondu et refroidi à 42 °C.



Compter les colonies gris-vertes.



Figure 16 : Recherche et dénombrement de *Listeria*

Partie III: Résultats et Discussion

III.1. Résultats des analyses physico-chimiques

III.1.1. Variation du pH

Les résultats de l'évolution de pH du produit fini durant 28 jours de stockage à 6°C sont représentés dans le tableau II et la figure 17.

Tableau II : Evolution du pH du yaourt brassé durant le stockage à 6°C

Jours	J ₀	J ₇	J ₁₄	J ₂₁	J ₂₈
pH	4,29	4,26	4,19	4,16	4,13
Normes de Danone	4,12 – 4,32		4,07- 4,27		4,02 – 4,22

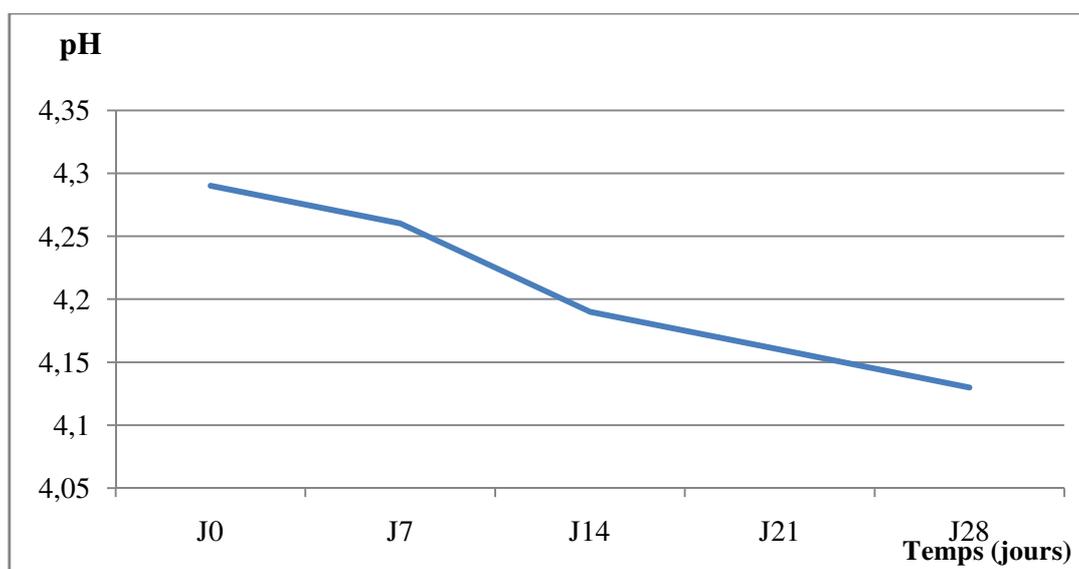


Figure 17 : Variation du pH du yaourt brassé durant 28 jours de stockage à 6°C

Les résultats de l'évolution du pH du yaourt brassé durant le stockage à 6°C montrent une légère diminution de 4,29 (à J₀) jusqu'à 4,13 (à J₂₈), mais qui reste toujours conformes aux normes de Danone.

Selon **Mahaut et al (2000)**, l'acidification résulte de la dégradation du lactose en acide lactique et aussi de l'activité protéolytique et lipolytique des ferments lactiques qui libèrent des acides aminés et des acides gras, aboutissant à la diminution du pH.

III.1.2. Variation de l'acidité titrable

Les résultats de la variation de l'acidité titrable du produit fini durant 28 jours de stockage à 6°C sont représentés dans le tableau III et la figure 18.

Tableau III : Evolution de l'acidité titrable du yaourt brassé durant le stockage à 6°C

Jours	J ₀	J ₇	J ₁₄	J ₂₁	J ₂₈
Acidité titrable (°D)	88	92	99	104	106
Normes de Danone	80 – 120				

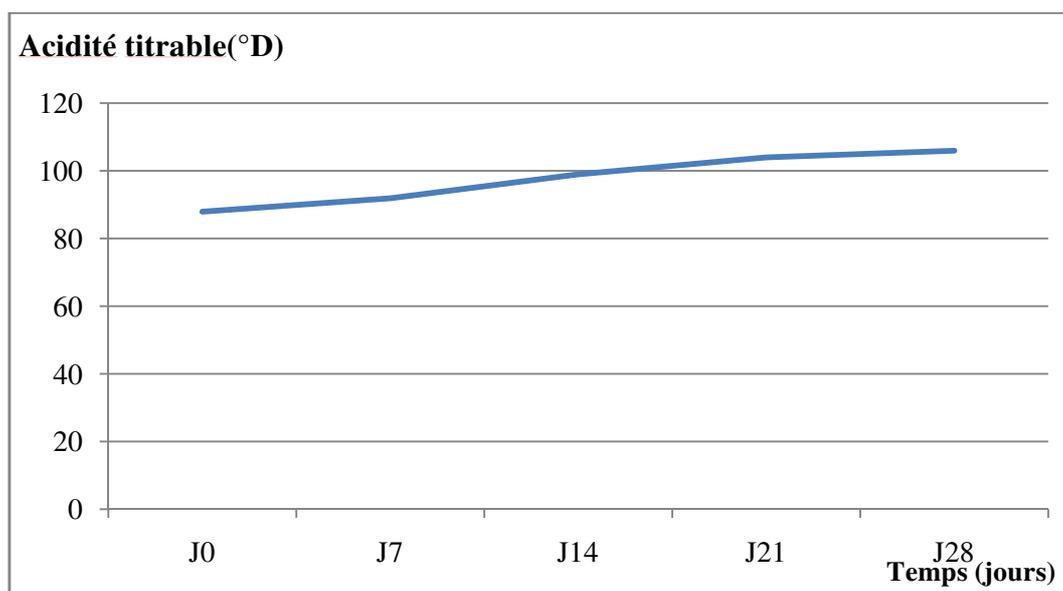


Figure 18 : Variation de l'acidité titrable du yaourt brassé durant 28 jours de stockage à 6°C

Les résultats de l'évolution de l'acidité titrable du yaourt brassé durant le stockage à 6°C montrent une augmentation de celle-ci de 88 °D (à J₀) jusqu'à 106 °D (à J₂₈), mais qui reste toujours conformes aux normes de Danone.

Selon la (FAO, 1995), le maintien des yaourts au froid n'arrête pas complètement l'activité métabolique, bien que lente, la production d'acide lactique se poursuit.

III.1.3. Variation de la matière grasse (MG)

Les résultats de la variation de la MG du produit fini durant 28 jours de stockage à 6°C sont représentés dans le tableau IV et la figure 19.

Tableau IV : Evolution de la matière grasse du yaourt brassé durant le stockage à 6°C

Jours	J ₀	J ₇	J ₁₄	J ₂₁	J ₂₈
MG (%)	3	3	3	3	3
Normes de Danone	2,7 – 3,00				

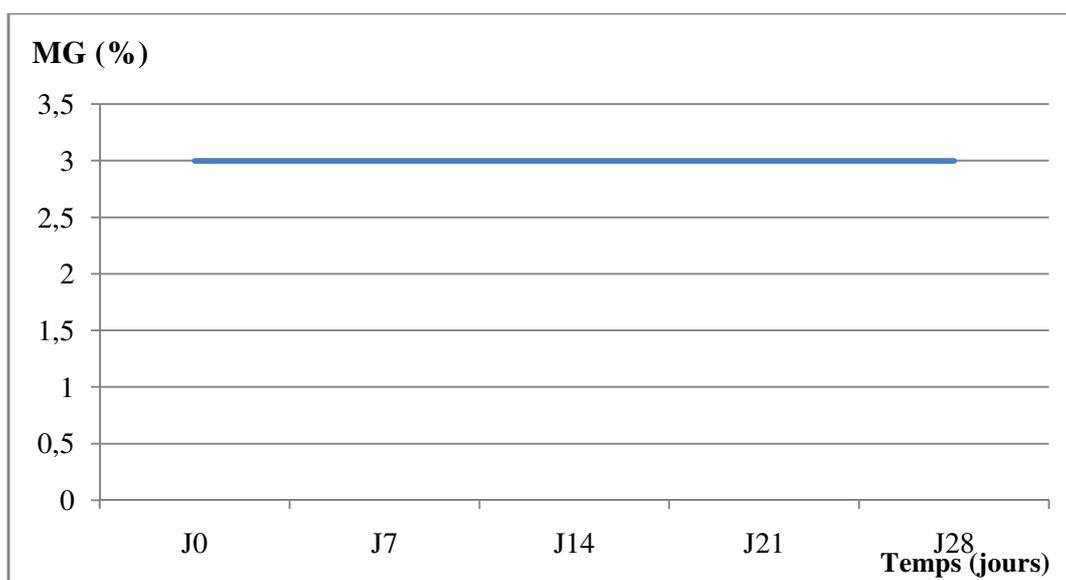


Figure 19 : Variation de la matière grasse du yaourt brassé durant 28 jours de stockage à 6°C

Les résultats de l'évolution de la MG du yaourt brassé durant le stockage à 6°C montrent une stabilité à 3% de J₀ à J₂₈ et une conformité aux normes de Danone.

Selon la **FAO (1995)**, la graisse :

- Confère de l'onctuosité ;
- Masque l'acidité ;
- Améliore la saveur.

III.1.4. Variation de l'extrait sec total (EST)

Les résultats de l'évolution de l'EST du produit fini durant 28 jours de stockage à 6°C sont représentés dans le tableau V et la figure 20.

Tableau V : Evolution de l'EST du yaourt brassé durant le stockage à 6°C

Jours	J ₀	J ₇	J ₁₄	J ₂₁	J ₂₈
EST (%)	24,25	24,07	23,88	23,66	23,20
Normes de Danone	23,09 – 26,59				

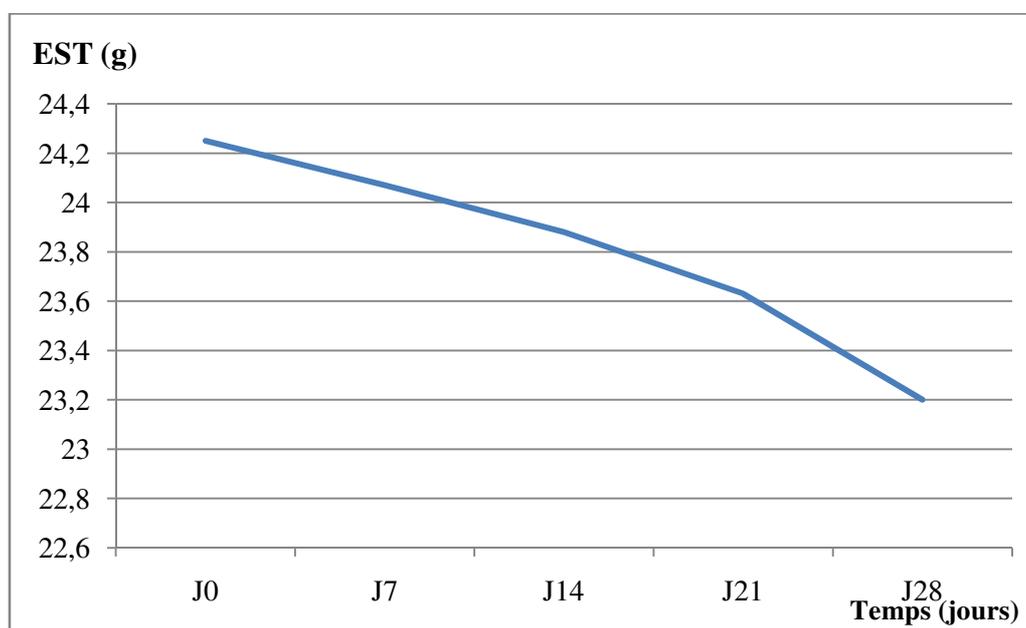


Figure 20 : Variation de l'EST du yaourt brassé durant 28 jours de stockage à 6°C

Les résultats de l'évolution de l'EST du yaourt brassé durant le stockage à 6°C montrent une légère diminution de 24,25 (à J₀) jusqu'à 23,20 (à J₂₈), mais qui reste toujours conformes aux normes de Danone.

Cette légère diminution selon **Leveau et Bouix, 1993**, s'explique par la cinétique de l'hydrolyse des sucres par les complexes enzymatiques ainsi que par l'activité protéolytique des bactéries lactiques.

III.1.5. Variation de la viscosité

Les résultats de la variation de la viscosité du produit fini durant 28 jours de stockage à 6°C sont représentés dans le tableau VI et la figure 21.

Tableau VI : Evolution de la viscosité du yaourt brassé durant le stockage à 6°C

Jours	J ₀	J ₇	J ₁₄	J ₂₁	J ₂₈
Viscosité (g)	24,2	25,8	26,3	27,9	29
Normes de Danone	21- 25		24 - 28		28-32

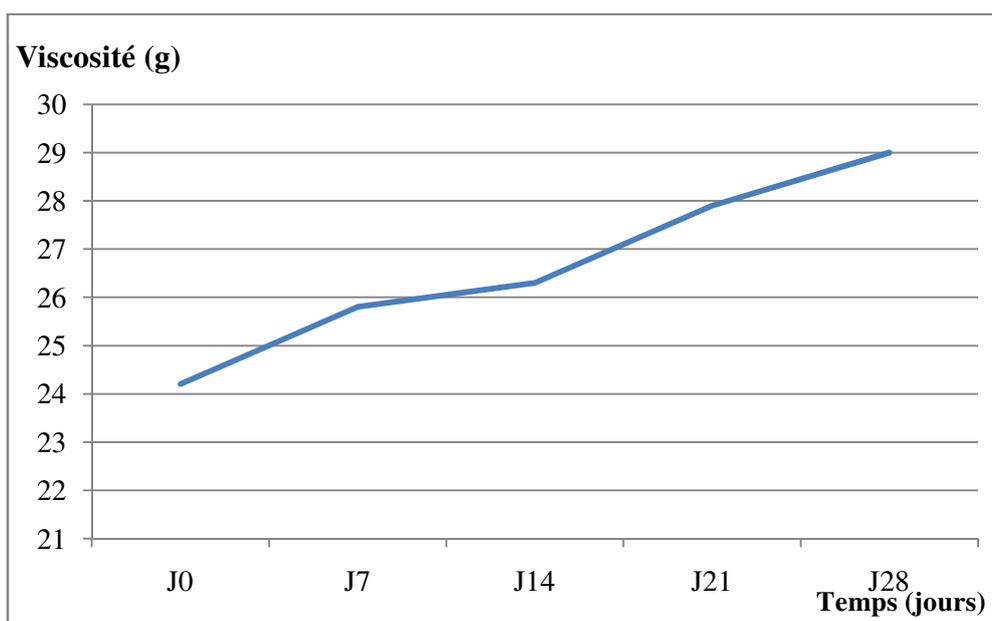


Figure 21 : Variation de la viscosité du yaourt brassé durant 28 jours de stockage à 6°C

Les résultats de l'évolution de la viscosité du yaourt brassé durant le stockage à 6°C montrent une augmentation de celle-ci de 24,2 g (à J₀) jusqu'à 29 g (à J₂₈), mais qui reste toujours conformes aux normes de Danone.

Cette augmentation de la texture est expliquée d'après (Corrieu et Luquet, 2008), par les bactéries lactiques qui sont capables de produire des exo-polysaccharides (EPS) dont l'accumulation provoque une augmentation de la viscosité des milieux.

III.2. Résultats des analyses microbiologiques

III.2.1. Résultats de dénombrement des bactéries lactiques

Les résultats de dénombrement des ferments lactiques au cours de fabrication à partir de la cuve (yaourt semi-fini) et après le conditionnement dans des pots (produit fini) durant 28 jours de son stockage à 6°C sont représentés dans le tableau VII et la figure 22.

Tableau VII : Résultats de dénombrement des ferments lactiques au cours de fabrication du yaourt brassé, et durant le stockage à 6°C

	Yaourt semi-fini		Yaourt fini				
	Après pasteurisation	Après décaillage	J ₀	J ₇	J ₁₄	J ₂₁	J ₂₈
<i>S. thermophilus</i> (UFC/ml)	0	32,7x10 ⁷	32,7x10 ⁷	31,3x10 ⁷	26,3x10 ⁷	24x10 ⁷	22,6x10 ⁷
<i>L. bulgaricus</i> (UFC/ml)	0	31,3x10 ⁶	31,3x10 ⁶	27x10 ⁶	25x10 ⁶	22,7x10 ⁶	19,8x10 ⁶
Normes de Danone	0	min 10 ⁶					

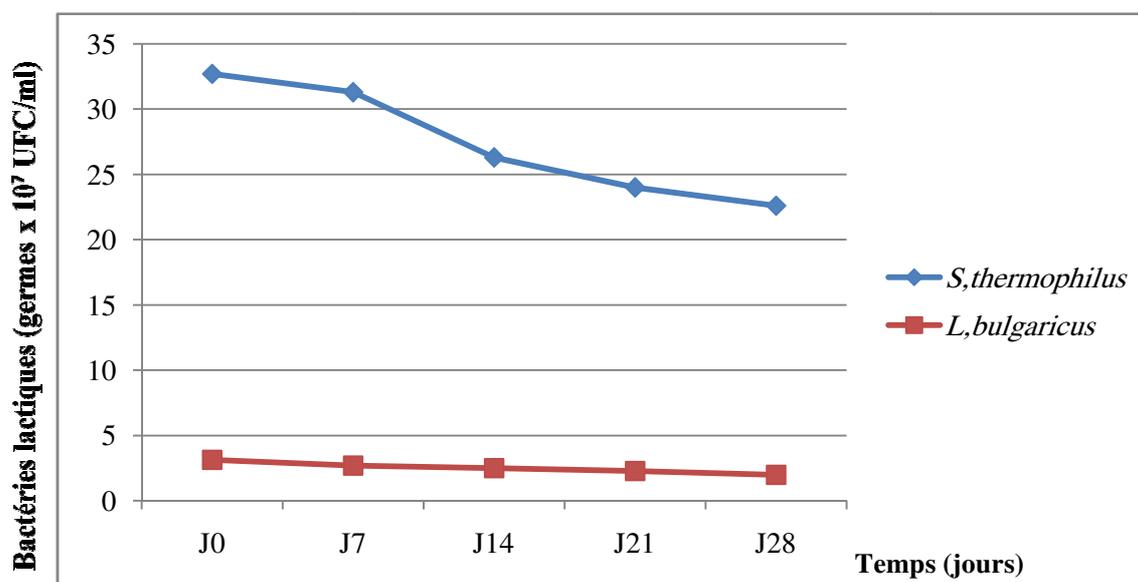


Figure 22 : Evolution des bactéries lactiques du yaourt brassé durant 28 jours de stockage à 6°C

D'après les résultats de dénombrement des bactéries lactiques illustrés en tableau VII et figure 22, nous remarquons :

- ✓ Une absence totale des ferments lactiques (0 UFC/ml) du yaourt semi-fini prélevé en fin de la pasteurisation à (95°C/5min).

- ✓ Une conservation du nombre de probiotiquesensemencés ; absence de fuite des probiotiques dénombrés après décaillage (yaourt semi-fini) et en fin de fabrication (yaourt brassé conditionné).
- ✓ Une prédominance de *S. thermophilus* dont le dénombrement a montré que le nombre de ce dernier est bien plus supérieur à celui de *L. bulgaricus*, pendant toute la durée de stockage. Ceci est expliqué par le choix des fabricants qui privilégieront soit les ferments acidifiants ou texturants (**Mahaut et al., 2000**).
- ✓ Une diminution du nombre des bactéries lactiques pendant le stockage, de $32,7 \times 10^7$ à $22,6 \times 10^7$ UFC/ml pour *S. thermophilus*, et de $31,3 \times 10^6$ à $19,8 \times 10^6$ pour *L. bulgaricus*. Elle est due à :
 - La température défavorable à la croissance (6°) (**Hui et al., 2004**) ;
 - D'après (**Beal et Sodini, 2001**) la température optimale de développement de *S. thermophilus* est de 42°C à 45 °C, et entre 37°C à 42 °C pour *L. bulgaricus*.
 - Selon la (**FAO, 1995**), le maintien des yaourts au froid empêche la multiplication bactérienne.
 - L'épuisement des nutriments (surtout le lactose par sa transformation en acide lactique) (**Corrieu et Luquet, 2008**).
 - L'auto-inhibition des ferments par le pH voir même la mort de certaines bactéries.

III.2.1.1. Résultats microscopiques

Les bactéries lactiques absorbent la couleur de cristal violet et apparaissent violettes, car la couche de peptidoglycane de leurs parois (Gram +) est très épaisse, et constitue donc une barrière imperméable à la décoloration par l'alcool.

- Les Streptocoques apparaissent en forme de coques isolés ou reliés en chainettes plus ou moins longues, immobiles.
- Les Lactobacilles apparaissent en forme de bâtonnets (bacilles) isolés ou attachés en file, immobiles (Annexe IV).

III.2.2. Résultats de recherche des germes contaminants

Les résultats de la recherche et dénombrement des différents germes contaminants du yaourt effectués sur le produit fini à J₀ sont représentés dans le tableau VIII.

Tableau VIII : Résultats des analyses microbiologiques des germes contaminants effectuées sur le produit fini

Germe recherché	Résultat	Norme
Germes totaux aérobies mésophiles (UFC/1g)	Abs	10 ²
Coliformes totaux (UFC/1g)	Abs	10
Coliformes fécaux (UFC/1g)	Abs	01
Entérobactéries (UFC/1g)	Abs	Abs
Levures (UFC/1g)	Abs	10 ²
Moisissures (UFC/1g)	Abs	Abs
<i>Clostridium</i> sulfito-réducteurs (UFC/1g)	Abs	Abs
<i>Staphylococcus aureus</i> (UFC/1g)	Abs	10
Salmonelles (UFC/25g)	Abs	Abs
<i>Listeria</i> (UFC/1g)	Abs	Abs

Les résultats des analyses microbiologiques illustrés en tableau VIII montrent une absence totale de tout germe recherché (pathogènes, d'altération, et de contamination fécale).

Ceci témoigne que le processus et les conditions de fabrication sont bien maîtrisés, et que la matière première utilisée est de bonne qualité microbiologique et hygiénique.

Ces résultats pourraient être expliqués également par :

- ✓ La pasteurisation, qui a pour but la destruction de tous les germes pathogènes (**Luquet, 1990**).
- ✓ Le pH acide du yaourt qui est inférieur à 4,5 constituant un milieu défavorable pour le développement des micro-organismes (**Bourgeois, 1996**).
- ✓ L'acide lactique, qui inhibe le développement des germes pathogènes, et constitue une bonne protection pour le yaourt (**Vierling, 1999**).

- ✓ La conservation des yaourts au froid, qui a pour effet de ralentir les réactions enzymatiques et chimiques. Par conséquent de ralentir aussi la multiplication des micro-organismes (**Spinnler, 2004**).

Conclusion

La série des analyses réalisées, et le suivi jusqu'à la DLC à 6°C des ferments lactiques d'un yaourt brassé fruité fraise produit le 16 avril 2017 par la laiterie Danone de Blida nous ont permis d'aboutir aux résultats suivants :

Pour les analyses physico-chimiques, nous avons constaté une diminution de l'EST, du pH, accompagnée d'une augmentation de l'acidité titrable et de la viscosité, mais qui reste dans les normes, avec une stabilité de la MG.

Ceci suggère que la conservation du yaourt au froid a pour effet de ralentir les réactions enzymatiques et chimiques, et s'explique par la production d'acide lactique par les bactéries lactiques en hydrolysant le lactose, et par la production des EPS qui confèrent de la texture.

Quant aux analyses microbiologiques, nous avons remarqué une absence totale des germes pathogènes et des indicateurs de contamination fécale, qui témoignent de l'efficacité de procédé de pasteurisation, et montrent l'effet inhibiteur de l'acide lactique.

Une conservation plus ou moins relative du nombre de probiotiquesensemencés et celui retrouvé en produit fini conditionné a été noté, avec une prédominance de *S. thermophilus* par rapport au *L. bulgaricus* qui est expliquée par le choix des fabricants qui privilégient les ferments texturants qu'acidifiants.

Le dénombrement des ferments jusqu'à la DLC a montré une diminution graduelle, mais qui reste conforme aux normes. Ceci est expliqué par le pH acide et le froid qui inhibent leur croissance.

Tous ces caractères pourraient avoir plusieurs causes :

- L'utilisation d'une matière première de bonne qualité.
- Bonnes conditions de fabrication et de stockage, y compris l'hygiène d'équipements et des personnels.

À la lumière des résultats obtenus, nous pouvons conclure que le yaourt analysé est de bonne qualité physico-chimique et microbiologique, et ne constitue aucun risque pour la santé du consommateur.

Par ailleurs, la diminution du nombre de probiotiques utilisés en début et en fin jusqu'à DLC n'est que normale et montre qu'économiquement il n'y a pas d'impact sur le coup de reviens de ce yogourt.

Références bibliographiques

A

Alm L (1982a). Effect of fermentation on milk fats of Swedish fermented milk products. *J Dairy Sei* **65**, 522-530.

Avril JL, Dabernat H, Denis F, Monteil H. (2000). *Bactériologie clinique*. Edition Ellipses, Paris.

B

Beal C et Sodini I, 2001. Fabrication des yaourts et des laits fermentés In techniques d'ingénieurs, traite agro-alimentaire, volume T2, Paris, Lavoisier (764p).

Bentley R.W., Leigh J.A. and Collins M.D. (1991). Intrageneric structure of *Streptococcus* based on comparative analysis of small-subunit rRNA sequences. *Int J Syst Bacteriol.* **41**, 487-494.

Boccignone M. Brigidi R. Sarra C (1984). Studi effettuati sulla composizione in trigliceridi ed acidi grassi liberi nello yoghurt preparato da latte vaccino, pecorino e caprino. *Ann Fac Med Vet (Turin)*, **28**, 223-233.

Bourgeois C.M., 1996 : Microbiologie alimentaire, tome 1, aspect microbiologique de la sécurité de la qualité des aliments. Edition Apria, Paris, 289p.

Bourgeois, C-M et Leveau, J-Y (1996). *Technique d'analyse et de contrôle dans les industries agro-alimentaires*. Ed : TEC & DOC, Lavoisier, Paris.

Bottazzi V, Vescovo M (1969). Carbonyl compounds produced by yoghurt bacteria. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, **23** (1) : 71-78.

Boutron MC, Faivre J, Mateau P, Couillault C, Senesse P, Quipourt V (1996). Calcium, phosphorus, vitamin D, dairy products and colorectal carcinogenesis : a French case-control study. *Brit J Cancer*, **74** : 145-151.

Breslaw ES. Kleyn DH (1973). In vitro digestibility of prote in in yogurt at various stages of processing. *J Food Sei*, **38**. 1016-1021.

Burtin H, Cheruel A, Collu E, Dudognon E, Moureau C, Schmitt C, Pace H, Plessis M (2013). Sécurité sanitaire des aliments. Direction Générale de la Concurrence, de la

Consommation et de la Répression des Fraudes (DGCCRF). « Date limite de Consommation (DLC et DLUO) » dans le portail de l'Economie et des Finances.

C

Corrieu, G et Luquet, FM (2008). *Bactéries lactiques : De la génétique aux ferments*. Ed TEC & DOC. Lavoisier, Paris. P872.

D

Delarras, C. (2014). *Pratique en microbiologie de laboratoire : Recherche de bactéries et de levures-moisissures*. Edition TEC & DOC, Lavoisier, Paris

Delorme C. (2008). Safety assessment of dairy microorganisms: *Streptococcus thermophilus*. *Int. J. Food Microbiol.* **126**, 274-277.

de Roissart H., and Luquet F.M. (1994) « Bactéries lactiques », I & II, Loriga (Chemin de Saint Georges, F-38410, France), pp. 1219.

De Simone C, Bianchi Salvadori B, Negri R, Ferrazi M, Boldinelli L, Vesely R (1986). The adjuvant effect of yogurt on production of gamma-interferon by con a-stimulated human peripheral blood lymphocytes. *Nutr Rep Int*, **33**, 419-433.

De Vrese M, Stegelmann A, Richter B, Fenselau S, Laue C, Schrezenmeir J (2001). Probiotics-compensation for lactase insufficiency. *Am J Clin Nutr*, **73** (2 Suppl) : 421S-492S.

Dumont JP, Adda J (1973). Méthode rapide d'étude des composés très volatils de l'arôme des produits laitiers. Application au yaourt. *Lait*, **53** (521/522) : 12-22.

Dupin H (1992). *Apports nutritionnels conseillés pour la population française*. In : TEC & DOC. Lavoisier, Paris, France.

F

Farrow J.A., and Collins M.D. (1984). DNA base composition, DNA-DNA homology and long-chain fatty acid studies on *Streptococcus thermophilus* and *Streptococcus salivarius*. *J Gen Microbiol.* **130**, 357-362.

FAO (1975) Norme FAO. II

FAO., 1995 : Le lait et les produits laitiers dans la nutrition humaine (Collection FAO : Alimentation et nutrition n°28) organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO) : 271p.

FAO/OMS., "Codex Alimentarius". Lait et produits laitiers. Première édition. Rome. P258.

Fernandez-Espla M.D., Garault P., Monnet V., and Rul F. (2000). *Streptococcus thermophilus* cell wall-anchored proteinase: release, purification, and biochemical and genetic characterization. *Appl Environ Microbiol*, **66**, 4772-4778.

Flandrois, J-P. (1997). *Bactériologie médicale*. Presses universitaires de Lyon, Lyon.

G

Garault P., Letort C., Juillard V., and Monnet V. (2000). Branched-chain amino acid biosynthesis is essential for optimal growth of *Streptococcus thermophilus* in milk. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 5128-5133.

Gournier-Chateau, N ; Larpent, JP ; Castellanos, MI ; Larpent, JL (1994). *Les probiotiques en alimentation animale et humaine*. Ed TEC & DOC. Lavoisier, Paris. P192.

Guiraud, J-P. (1998). *Microbiologie Alimentaire*. DUNOD, Paris.

H

Hade, A. (2007). *Nos lacs : les connaître pour mieux les protéger*. Edition FIDES, Québec.

Hansen, E (2011). *Approche microbiologique des yogourts et probiotiques*. Thèse. Gymnase Auguste Piccard, Epalinges.

Hui , Y. H., Meunier-Goddick, L., Hansen, A.S., Josephesen, J ., Nip, W. K., Stanfield P.S. et Toldrà, F.(2004). Yogourt and sour cream : Operational procedures and processing equipments. Handbook of food and beverage fermentation technology. Ed Marcel Dekker, p1000.

I

Irkin R & Eren U.V (2008). *A research about viable Lactobacillus bulgaricus and Streptococcus thermophilus numbers in the market yoghurts.* World Journal of Dairy & Food Sciences 3 (1): 25- 28.

J

Jawetz E, Melnick JL, Adelberg EA. (1973). *Microbiologie médicale.* Les presses de l'université Laval, Qubec. Librairie Maloine S.A, Paris.

Jeantet, R ; Croguennec, T ; Mahaut, M ; Schuck, P ; Brulé, G (2008). *Produits laitiers.* Ed TEC & DOC. Lavoisier, Paris. P183.

K

Kolars JC, Levitt MD, Aouji M, Savaiano DA (1984). Yogurt-an autodigesting source of lactose. *N Engl J Med*, **310** (1) : 1-3.

L

Larpent, JP ; Gournier-Chateau, N ; Castellanos, MI ; Larpent, JL (1994). *Les probiotiques en alimentation animale et humaine.* Ed TEC & DOC. Lavoisier, Paris. P192.

Larpent, J-P. (2010). *Staphylococcus aureus.* Edition TEC & DOC, Lavoisier, Paris.

Law BA (1981). The formation of aroma and flavour compounds in fermented dairy products. *Dairy Science Abstracts*, **43** (3) : 143-154.

Leveau J-Y et Bouix M., 1993. Microbiologie industrielle. Edition TEC & DOC. Lavoisier, Paris, (210p).

Loones A (1994). Lait fermenté par les bactéries lactiques. *In* : De Roissard H et Luquet FM, Bactéries Lactiques. Loriga, Uriage, 135-154.

Luquet JP, 1990 : Les ferments microbiens dans les industries agro-alimentaires (Produits laitiers et carnés). Edition APRA, Paris, (298p).

Luquet, FM et Corrieu, G (2005). *Bactéries lactiques et probiotiques*. Ed : TEC & DOC. Lavoisier, Paris. P307.

M

Mahaut M, Jeantet R, Brulé G, Schuck P, 2000. Les produits industriels laitiers. Ed TEC & DOC, France (178p).

Mann GV (1977). A factor in yogurt which lowers cholesterolemia in man. *Atherosclerosis*, **26**, 335-340.

Marteau P, Fourié B, Pochart P et al. (1990). Effect of the microbial lactase activity in yogurt on the intestinal absorption of lactose : an in vivo study in lactase-deficient humans. *Br J Nutrition*, **64** : 71-79.

Megalla SE, Hafez AH (1984). Detoxification of aflatoxin B₁, by acidogenous yogurt. *Mycopathologia*, **77**, 89-91.

N

Niv M, Levy W, Greenstein NM (1963). Yogurt in the treatment of infantile diarrhea. *Clin Pediat*, **2**, 407-411.

O

Ott A, Fay LB, Chaintreau A (1997). Determination and origin of the aroma impact compounds of yogurt flavour. *J Agric Food Chem*, **45** (3) : 850-858.

P

Perdigon G, Nader de Macias ME, Alvarez S, Oliver G, Pese de Ruiz Holgado AA (1987). Enhancement of immune response in mice fed with *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus acidophilus*. *J Dairy Sci*, **70**, 919-926.

Perdigon G, Alvarez S, Nader de Macias ME, Medici M (1989). Effect of lactic acid bacteria orally administered and of yoghurt on the immune system. In : *Les laits fermentés. Actualités de la recherche*. John Libbey Eurotext, Paris, France, 77-84.

Pette J, Lolkema H (1950). Yoghurt, III : Acid production and aroma formation in yogurt. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, **4** : 261-273.

Pochart P, Dewit O, Desjeux JF, Bourlioux P (1989). Viable starter culture, β -galactosidase activity and lactose in duodenum after yogurt ingestion in lactase-deficient humans. *Am J Clin Nutr*, **49** : 828-831.

Poznanski S, Lenoir J, Mocquot G (1965). La protéolyse de la caséine par les enzymes intracellulaires de certaines bactéries. *Lait*, **45**, 3-26.

R

Rasic J, Curcic R, Stojsavljevic T, Obradovic B (1971). A study on the amino acids of yogurt. *Milchwissenschaft*, **26**, 496-499.

Recham H, 2015. Le marché des industries alimentaires en Algérie. www.agroligne.com.

S

Savijoki K., Ingmer H., and Varmanen P. (2006). Proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol*. **71**, 394-406.

Schrch V, Hopkins S, Villar E, Angelaccio S (1985). Serine hydroxymethyltransferase from *Escherichia coli* : purification and properties. *J Bacteriol*, **163** (1) : 1-7.

Shahani KM, Vakil JR, Kilara A (1976). Natural antibiotic activity of *Lactobacillus acidophilus* and *bulgaricus*. Cultural conditions for the production of antibiosis. *Cult Dairy Prod J*, **11**, 14-17.

Shahbal S, Hemme D, Desmazeaud MJ (1991). High cell wall-associated proteinase activity of some *Streptococcus thermophilus* strains (H-strains) correlated with a high acidification rate in milk. *Lait*, **71** (3) : 351-357.

Shahbal S, Hemme D, Renault P (1993). Characterization of a cell envelope-associated proteinase activity from *Streptococcus thermophilus* H-strains. *Appl Environ Microbiol*, **59** (1) : 177-182.

Solis Pereyra B, Lemonnier D (1991). Induction of 2'-5'A synthetase activity and interferon in humans by bacteria used in dairy products. *Eur Cytokine Network*, **2**, 137-140.

Spinnler HE, 2004 : Technologie de transformation des produits agro-alimentaires. Edition (DOC 1170 volume F2), (15p).

Syndifrais, La Maison du Lait, 42 rue de Chateaudun, 75314 Paris cedex 09, France.

T

Terzaghi, B.E. et Sandine, W.E. (1975). Improved medium for lactic streptococci and their bacteriophages. *Applied Microbiology* **29**, 807-813.

Toba T, Watanabe A, Adachi S (1983). Quantitative changes in sugars, especially oligosaccharides, during fermentation and storage of yogurt. *J Dairy Sei*, **66**, 17-20.

Touhami M, Boudraa G, Mary JY, Soltana R, Desjeux JF (1992). Conséquences cliniques du remplacement du lait par le yaourt dans les diarrhées persistantes du nourrisson. *Ann Pediat (Paris)*, **39**, 79-86.

V

Vesely R, Negri R, Bianchi Salvadori B, Lavezarri D, De Simone C (1985). Influence of a diet additioned with yogurt on the mouse immune system. *J Immunollmmunopharmacol*,**5**, 30-35.

Vidal-Valverde C, Martin-Villa C, Herranz J (1984). Determination of soluble carbohydrates in yogurts by high performance liquid chromatography. *J Dairy Sei*, **67**, 759-763.

Vierling E, 1999 : aliment et boisson : filières et produits. Edition Biosciences et techniques, Paris, 277 pages.

W

Walker DK, Gilliland S (1993). Relationships among bile tolerance, bile salt deconjugation, and assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*. *J Dairy Sei*, **76**, 956-961.

Annexes

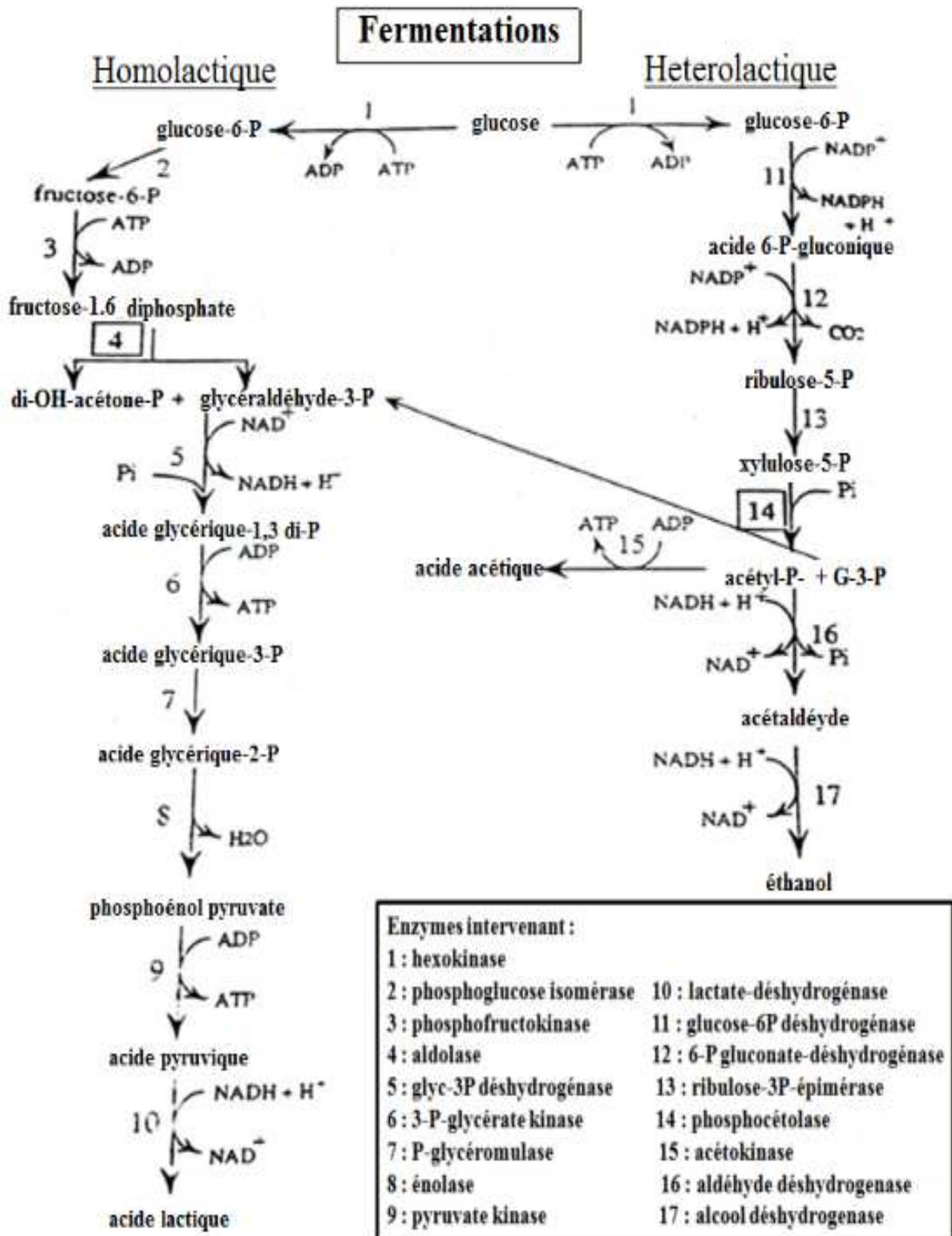


Figure 1 : Principales voies fermentaires des bactéries lactiques (Larpent et *al.*, 1994)

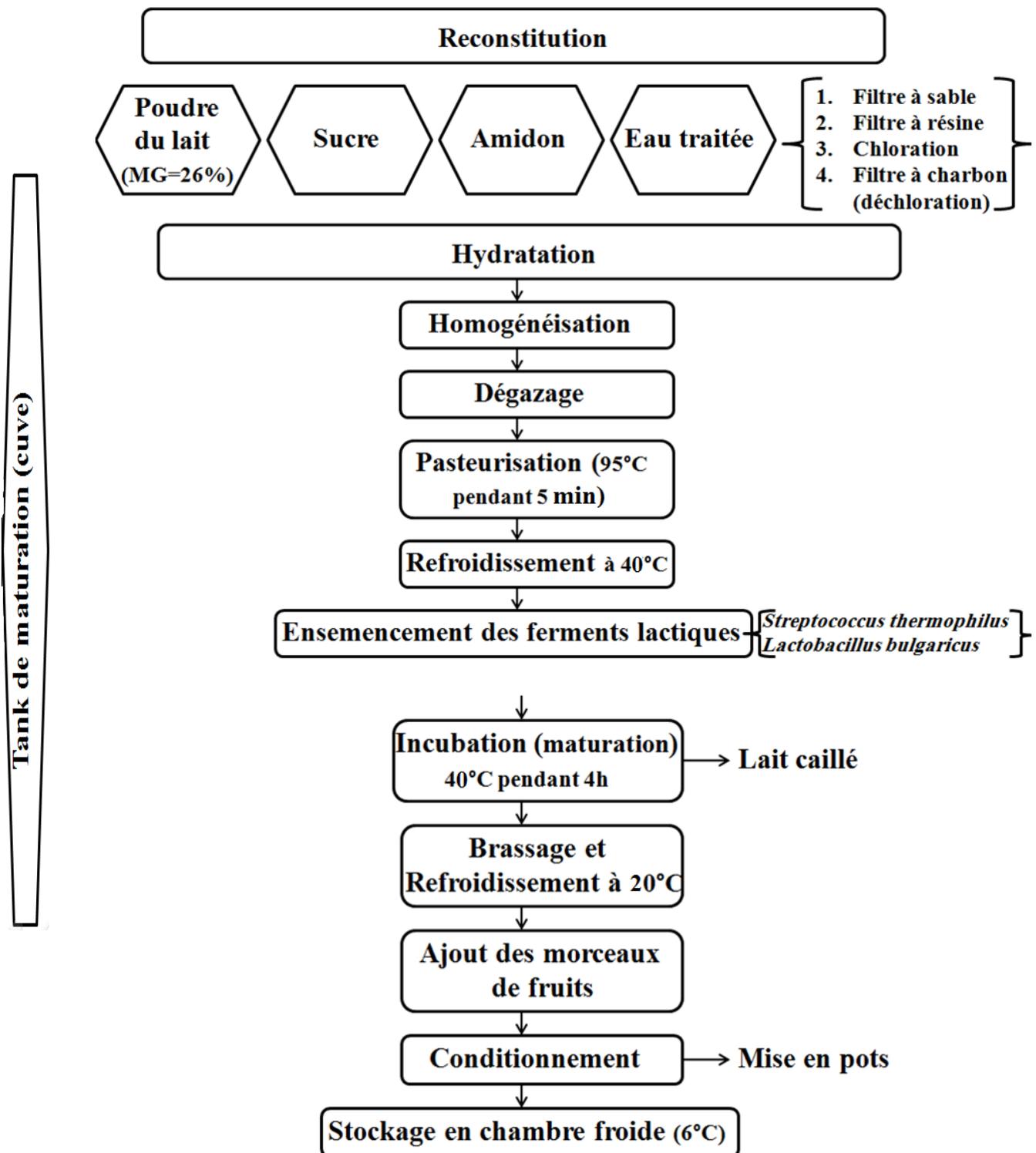


Figure 2 : Diagramme de fabrication du yaourt brassé fruité, morceaux de fraise selon Danone

I. Matériels utilisés pour les analyses physico-chimiques**❖ Equipements et appareillage**

- pH mètre
- Centrifugeuse électrique
- Balance électrique de précision
- Spatule métallique
- Coupelles en aluminium
- Réfrigérateur à 6°C
- Thermo-balance (balance dessiccatrice)
- Viscosimètre
- Butyromètre gradué
- Acidimètre

❖ Réactifs

- Acide sulfurique
- Alcool iso-amylique
- Soude NaOH 0,11 mole/l (1/9 N)
- Phénophtaléine
- Solution tampon à pH = 7, 4 et 10.

II. Matériels utilisés pour les analyses microbiologiques**❖ Equipements, appareillages et verreries**

- Hotte lumineuse
- Etuves réglables à 25°C, 30°C, 37°C et 44°C
- Bain marie
- Microscope photonique
- Autoclave
- Portoir métallique
- Bec benzène
- Agitateur magnétique
- Boîtes de pétri
- Flacon de 225 ml
- Pipettes stériles
- Pro-pipette

- Bécher
- Tubes à vis
- Anse de platine
- Lames et lamelles
- Pince

❖ **Milieux de culture**

- Milieu TSE (Tryptone Sel Eau)
- Gélose MRS (Man, Rogosa et Sharpe)
- Gélose M17 (Mannitol ou Terzahi)
- Gélose PCA (Plat Count Agar)
- Gélose VRBL (Lactose Bilié au Cristal Violet et au Rouge Neutre)
- Gélose VRBG (Glucose Bilié au Cristal Violet et au Rouge Neutre)
- Gélose OGA (Oxytetra-cycline Glucose Agar)
- Gélose VF (Viande-Foie)
- Bouillon GC (Giolitti Cantonii)
- Gélose Chapman
- Bouillon SFB (Bouillon au Sélénite-Cystine)
- Gélose Hektoen
- Bouillon Frazer-demi (1/2)
- Bouillon Frazer
- Gélose Palcam

❖ **Réactifs et additifs**

- Ampoule d'alun de fer à 5%
- Ampoule de sulfite de sodium à 5%
- Ampoule de téllurite de potassium à 1%
- Ampoule de violet de gentiane
- Ampoule de lugol
- Ampoule de fuschine

❖ **Solutions**

- Eau distillée
- Alcool
- Huile à immersion

❖ **Compositions des milieux de culture (g/l)**✓ **TSE**

- Tryptone.....	1g
- Chlorure de sodium (NaCl).....	8,5g
- Eau distillée.....	1000 ml

pH = 7

✓ **Gélose MRS**

- Peptone.....	10g
- Extrait de viande.....	10g
- Extrait de levure.....	5g
- Glucose.....	20g
- Tween 80.....	1g
- Citrate d'ammonium.....	2g
- Acétate de sodium.....	5g
- Sulfate de magnésium (MnSO ₄).....	0,1g
- Sulfate de manganèse (MgSO ₄).....	0,05g
- Phosphate disodique.....	2g
- Agar.....	15g
- Eau distillée.....	1000ml

pH = 6,5

✓ **Gélose M17**

- Tryptone.....	2,5g
- Peptone de viande.....	2,5g
- Peptone de Soja.....	5g
- Extrait de levure.....	2,5g
- Extrait de viande.....	5g
- Lactose.....	5g
- Glycérophosphate de sodium.....	19g
- Sulfate de magnésium.....	0,25g
- Acide ascorbique.....	0,5g
- Agar-agar.....	15g
- Eau distillée.....	1000ml

pH = 7,1

✓ **Gélose PCA**

- Peptone de caséine.....5g
- Extrait de levure.....2,5g
- Glucose.....1g
- Agar.....15g
- Eau distillée.....1000ml

pH = 7

✓ **Gélose VRBL**

- Peptone.....7g
- Extrait de levure.....3g
- Sels biliaires.....1,5g
- Lactose.....10g
- Chlorure de sodium.....5g
- Rouge neutre.....0,03g
- Cristal violet.....0,002g
- Agar.....13g
- Eau distillée.....1000ml

pH = 7,4

✓ **Gélose VRBG**

- Peptone.....7g
- Extrait de levure.....3g
- Sels biliaires.....1,5g
- Glucose.....10g
- Chlorure de sodium.....5g
- Rouge neutre.....0,03g
- Cristal violet.....0,002g
- Agar.....13g
- Eau distillée.....1000ml

pH = 7,4

✓ **Gélose OGA**

- Extrait de levure.....5g
- Glucose.....20g
- Agar.....12g
- Oxytetra-cycline.....0,1g

- Eau distillée.....1000ml
pH = 7

✓ **Gélose V.F**

- Peptone viande-foie.....30g
- Glucose.....2g
- Amidon soluble.....2g
- Sulfate de sodium.....2,5g
- Citrate ferrique ammoniacal.....0,05g
- Agar.....11g
- Eau distillée.....1000ml
pH = 7,6

✓ **Bouillon G.C**

- Tryptone.....10g
- Extrait de viande.....5g
- Extrait de levure.....5g
- Glycine.....1,2g
- Mannitol.....20g
- Pyruvate de sodium.....3g
- Chlorure de sodium.....5g
- Chlorure de lithium.....5g
- Tween 80.....1g
- Eau distillée.....1000ml
pH = 6,9

✓ **Gélose Chapman**

- Peptone.....8g
- Extrait de levure.....2g
- Lactalbumine.....3g
- Chlorure de sodium.....30g
- Mannitol.....10g
- Rouge de phénol.....0,0225g
- Chlorure de lithium.....7g
- Glycine.....1g
- Pyruvate de sodium.....3g
- Agar.....12g

-
- Eau distillée.....1000ml
pH =7,4
 - ✓ **Bouillon SFB**
 - Peptone de caséine.....5g
 - L(-) cystine.....0,01g
 - Phosphate de sodium.....4g
 - Lactose.....4g
 - Eau distillée.....1000ml
pH = 7
 - ✓ **Gélose Hektoen**
 - Peptone pepsique de viande.....12g
 - Extrait de levure.....3g
 - Lactose.....12g
 - Saccharose.....12g
 - Salicine.....2g
 - Sels biliaires.....9g
 - Chlorure de sodium.....5g
 - Thiosulfate de sodium.....5g
 - Citrate ferrique ammoniacal.....1,5g
 - Bleu de bromothymol.....65mg
 - Fuchsine acide.....40mg
 - Agar-agar.....13,5g
 - Eau distillée.....1000ml
pH = 7,6
 - ✓ **Bouillon Frazer-demi**
 - Tryptone.....10g
 - Extrait de viande.....5g
 - Extrait de levure.....5g
 - Chlorure de sodium.....20g
 - Phosphate de sodium dibasique.....9,6g
 - Phosphate de potassium monobasique.....1,35g
 - Esculine.....1g
 - Acide nalidixique.....0,01g
 - Acriflavine HCl.....0,0125g

-
- Chlorure de lithium.....3g
 - Citrate ferrique ammoniacal.....0,5g
 - Eau distillée.....1000ml
- pH = 7,2

✓ **Bouillon Frazer**

- Polypeptone.....10g
 - Extrait autolytique de levure.....5g
 - Extrait de viande.....5g
 - Chlorure de sodium.....20g
 - Phosphate monopotassique.....1,35g
 - Esculine.....1g
 - Chlorure de lithium.....3g
 - Acide nalidixique.....20mg
 - Acriflavine (chlorhydrate).....25mg
 - Citrate de fer III ammoniacal.....0,5g
 - Eau distillée.....1000ml
- pH = 7,2

✓ **Gélose Palcam**

- Bacto Columbia Blood Agar Base.....39g
 - Mannitol.....10g
 - Glucose.....0,5g
 - Esculine.....1g
 - Citrate d'ammonium ferrique.....0,5g
 - Chlorure d'ammonium ferrique.....0,5g
 - Chlorure de lithium.....15g
 - Rouge de phénol.....0,08g
 - HCl d'acriflavine.....0,005g
 - Sulfate de polymyxine B.....0,01g
 - Ceftazidine.....0,008g
 - Gélose Bacto.....2g
 - Eau distillée.....1000ml
- PH = 7,2



pH mètre



**Balance dessiccative électronique
(thermo-balance)**



Balance de précision



Viscosimètre



Butyromètre



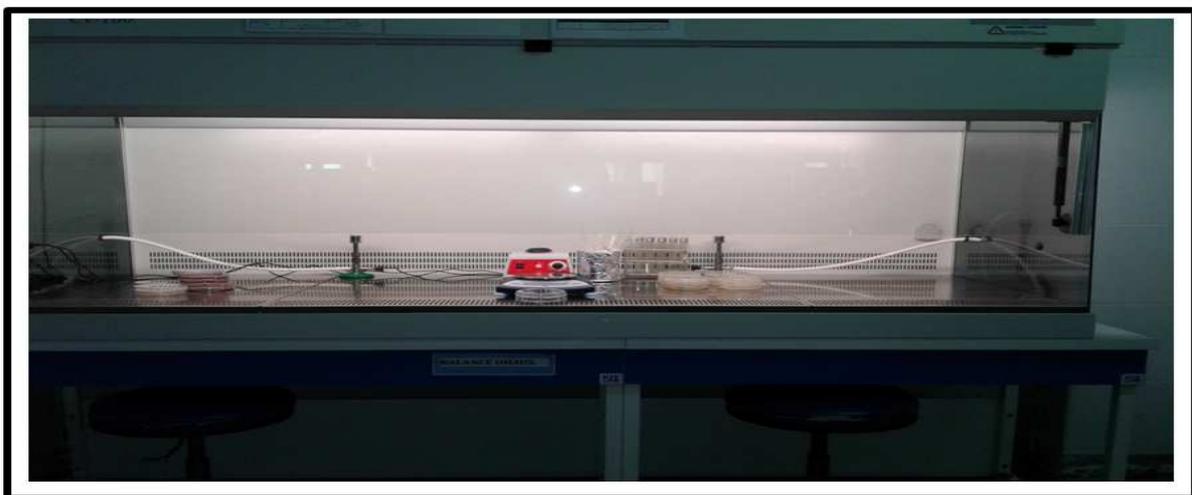
Centrifugeuse



Bain marie



Autoclave



Hotte lumineuse



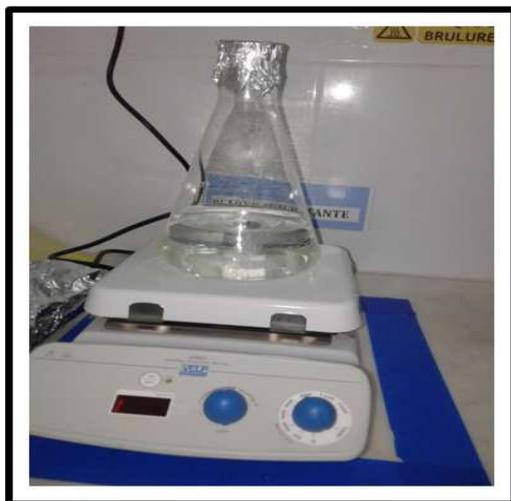
Etuves à 37, 25 et 30 °C



Balance de précision



Agitateur



**Agitateur magnétique
(plaque chauffante)**



Microscope photonique



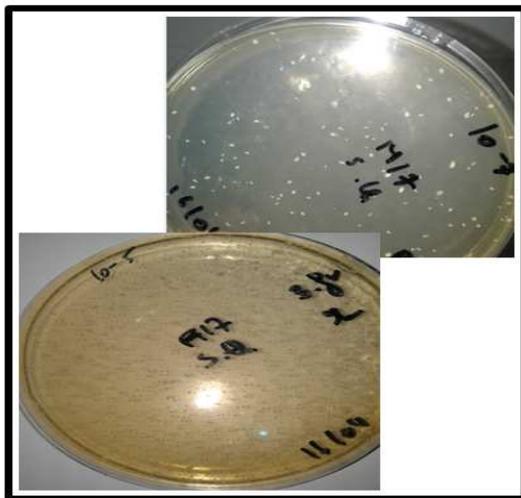
**Yaourt brassé fruité fraise
(produit fini)**



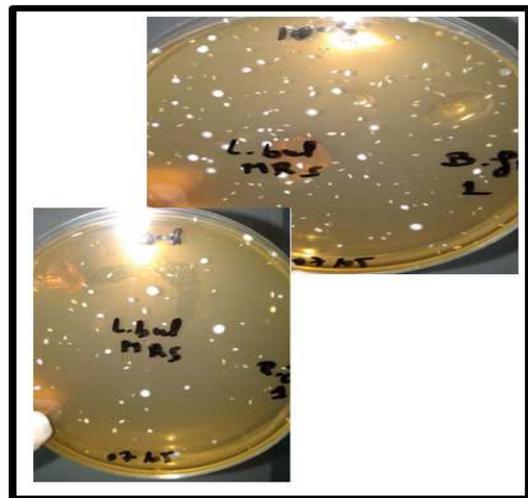
Ferments lactiques



Milieux de culture



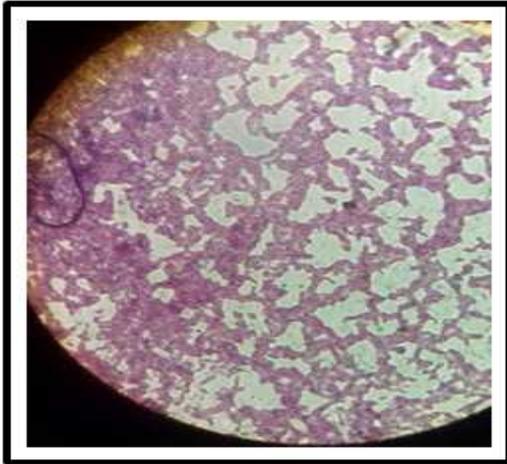
Streptococcus thermophilus



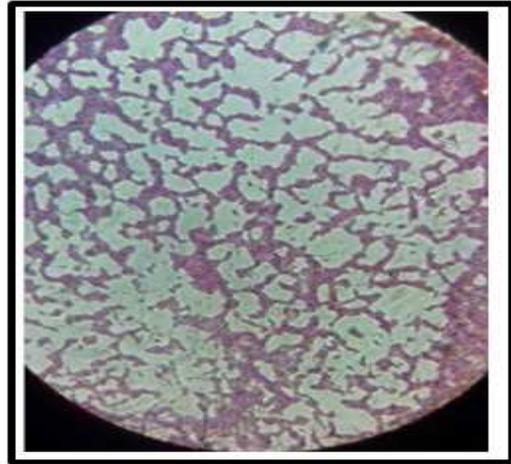
Lactobacillus bulgaricus



Différents germes recherchés

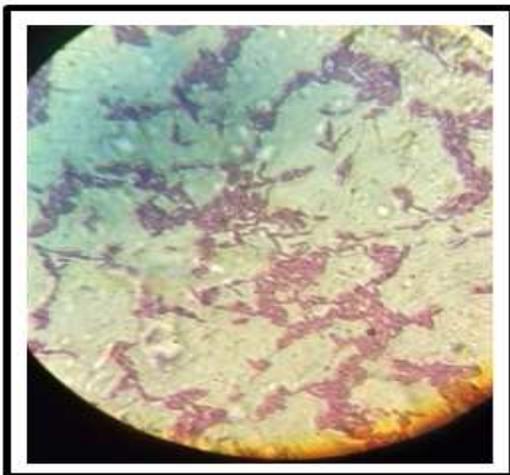


L. bulgaricus

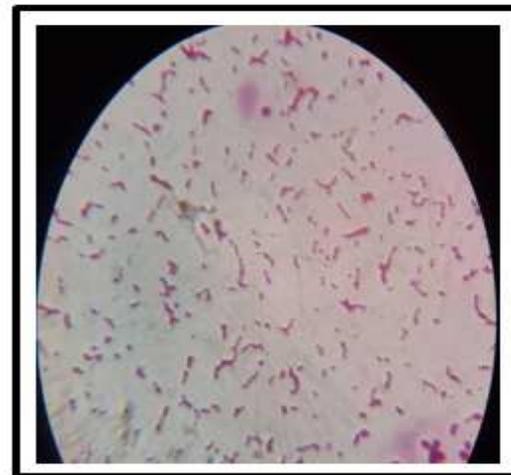


S. thermophilus

Coloration de Gram (objectif x 40)

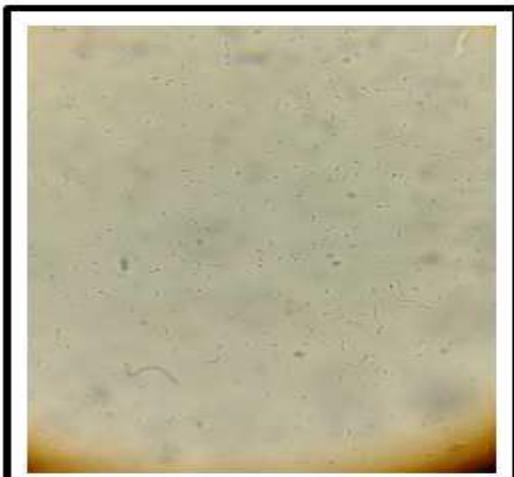


L. bulgaricus

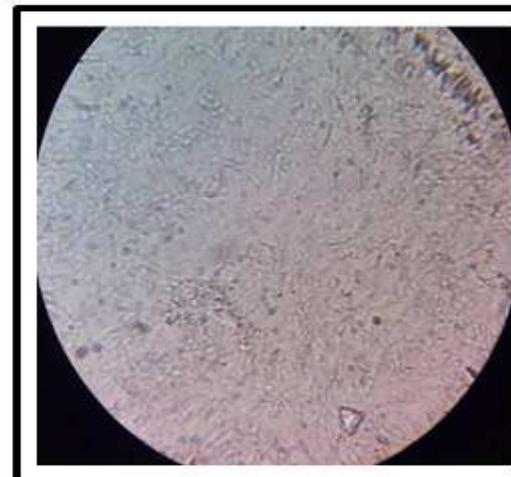


S. thermophilus

Coloration de Gram (objectif x 100)



L. bulgaricus



S. thermophilus

Examen à l'état frais (objectif x 40)