

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Blida-1



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

Option : Microbiologie et Toxicologie Alimentaire

Mémoire de fin d'étude en vue de l'obtention du diplôme de Master

Thème :

**Etude de l'effet de l'incorporation de la
spiruline sur la qualité physico-chimique,
microbiologique et toxicologique d'un jus**

Présenté par

Mlle MAHDJOUR Wissam & *Mlle* EL GHRIBI Soumia

Devant le jury :

- **Mme KADRI F.** Maitre assistante A Université Blida-1 Présidente
- **Mme DEBIB A.** Maitre de conférences B Université Blida-1 Examinatrice
- **Mme DEFFAIRI D.** Maitre assistante A Université Blida-1 Promotrice

Promotion 2015 / 2016

Remerciements

*Tout d'abord nous remercions **DIEU** qui nous a donné la volenté, la patience et le courage pour accomplir ce travail dans les meilleures conditions.*

Ce travail a été réalisé au niveau du laboratoire de contrôle de qualité de l'unité SARL VITAJUS ainsi le laboratoire toxicologique du complexe SAIDAL.

Nous tenons à exprimer nos profonds remerciements :

*A notre promotrice, **Mme DEFFAIRI D.**, Maitre assistante A au Département des Sciences agroalimentaires à l'Université BLIDA 1, Faculté des Sciences de la nature et de la vie pour son encadrement, sa confiance, sa patience, ses encouragements, ses suggestions toujours aussi pertinentes et son œil critique qui nous a été très précieux, nous la remercions vivement.*

*Nous remercions également au membre de jury la **présidente Mme KADRI F. Maitre assistante A** et l'**examinatrice Mme DEBIB A. Maitre de conférences B** au département de biologie et physiologie cellulaire, à la faculté des sciences de la nature et de la vie, l'Université BLIDA-1, pour avoir eu l'amabilité d'avoir accepté de lire notre manuscrit et d'apporter les critiques nécessaires à la mise en forme finale de cet ouvrage.*

Qu'elles trouvent ici le témoignage de nos sincères remerciements.

A Mr BEN MASSOUD Kh., et toute l'équipe de recherche de Vitajus de nous avoir accueillir au sein de leurs laboratoire, et surtout à l'ingénieur Mme BANNANA M. pour sa disponibilité tout au long de notre stage, ses orientations, ses conseils aussi pertinentes dont le mérite lui revient grâce à son aide.

A toute l'équipe du laboratoire de toxicologie de Sidal Biotic «Gué de Constantine » Ce fut un honneur pour nous d'avoir eu la chance de travailler parmi vous. Un grand merci à Mme MIMI et Mr SALI.

Veillez trouver ici l'expression de notre profonde gratitude.

Notre profonde gratitude à nos parents pour leur sacrifice, leur soutien inestimable durant toutes nos études, et pour la patience dont ils ont fait preuve tout au long de notre travail « nous vous sommes redevables d'une éducation dont nous sommes fier ».

A tous nos camarades de la promotion 2015/2016 Microbiologie et Toxicologie Alimentaire, merci pour tous ces moments de partage, de complicité et de rire sans lesquels la pression aurait été insoutenable.

Enfin nous tenons à remercier tous ceux qui de près ou de loin ont voulu contribuer à nous aider avec compréhension et bien vaillance à mener à bien cette thèse.

Dédicaces

Je dédie ce mémoire:

*Aux personnes les plus chères au monde, à **mes très chers parents.***

Aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect, mon amour et ma profonde gratitude pour tout le soutien et l'amour que vous me portez depuis mon enfance.

Que ce travail soit le fruit de vos prières et sacrifices, qui m'ont été d'un grand secours pour atteindre cette étape de ma vie, et que Dieu tout puissant vous procure santé, bonheur et longue vie.

*A mes chers frères **Mohammed et Zohir**, merci pour votre présence, humeur, conseils et encouragement dans tout ce que j'entreprends.*

Je vous souhaite tout le bonheur et la réussite dans votre vie et que Dieu vous protège et vous garde.

A toute ma famille et mes amis qui ne tiendront jamais en une seule page,

Je suis vraiment reconnaissante de vous avoir dans ma vie.

Wissam

Dédicaces

Je dédie ce mémoire:

A Mes Très Chers Parents

Tous les mots du monde ne sauraient exprimer l'immense amour que je vous porte, ni la profonde gratitude que je vous témoigne pour tous les efforts et les sacrifices que vous n'avez jamais cessé de consentir pour mon instruction et mon bien-être. C'est à travers vos encouragements que j'ai opté pour cette noble profession, et c'est à travers vos critiques que je me suis réalisée.

J'espère avoir répondu aux espoirs que vous avez fondé en moi.

Que Dieu tout puissant vous garde et vous procure santé, bonheur et longue vie.

*A Mes Frères **Abdellah** et **Amine** et mes Sœurs **Roukia**, **Khadidja** et **Hadjer**.*

Je vous souhaite la réussite dans votre vie, avec tout le bonheur qu'il faut pour vous combler.

Merci pour votre précieuse aide à la réalisation de ce travail.

*A mes chers neveux **Oussama**, **Seifeddine** et **Nadhir**.*

A toute ma famille et mes amis merci pour les bons moments qu'on a passé ensemble, de votre soutien et de votre serviabilité.

Soumia

Liste des abréviations

°Brix : Degré Brix.

°F: Degré français.

Abs : Absence.

AFNOR : Association Française de Normalisation.

AMM : Autorisation de Mise sur le Marché.

BPF : Bonnes pratiques de fabrication.

CE : Comité Européen.

D/C : Double Concentration.

DL50 : Dose létale médiane.

DM : Dilution mère.

DPD : Diéthyl-phénylènediamine.

E.D.T.A : Éthyle diamine tétra acétique.

F : Formule.

FAO: Food Agricultural Organization.

ISO : International Standardisation Organisation.

J : Jour.

JORA : Journal Officiel de la République Algérienne.

Kcal : Kilo calorie.

Kj : Kilo joule.

mEq : Milli équivalent.

N.E.T : Noire Erichrome T.

N.P.P : Nombre le Plus Probable.

NF : Norme française.

OMS : Organisation Mondiale de la Santé.

P.C : Poids corporel.

pH : Potentiel hydrogène.

RAS : Rien à signaler.

S/C : Simple Concentration.

SM : Solution mère.

TA : Titre Alcalimétrique.

TAC : Titre Alcalimétrique Complet.

TH : Titre Hydrométrique.

V : Volume.

Liste des figures

Figure	Titre	page
1	Aspect microscopique de l' <i>Arthrospira platensis</i>	3
2	La spiruline utilisée (BIOMUNYL).	16
3	Le produit fini enrichi en spiruline.	18
4	Préparation de la solution mère et les dilutions décimales pour les produits liquides	Annexe IV
5	Préparation de la solution mère et les dilutions décimales pour les produits solides.	Annexe IV
6	Recherche et dénombrement des bactéries Coliformes et <i>Escherichia coli</i> en milieu liquide dans l'eau de process (test de présomption).	Annexe IV
6*	Recherche et dénombrement des bactéries Coliformes et <i>Escherichia coli</i> en milieu liquide dans l'eau de process (test de confirmation).	Annexe IV
7	Recherche et dénombrement des Spores de bactéries anaérobies sulfito-réductrices et de <i>Clostridium sulfito-réducteurs</i> dans l'eau de process.	Annexe IV
8	Recherche et dénombrement des Germes Aérobie Mésophiles Totaux dans l'eau de process.	Annexe IV
9	Recherche et dénombrement des Streptocoques du groupe D dans l'eau de process (test de présomption).	Annexe IV
9*	Recherche et dénombrement des Streptocoques du groupe D dans l'eau de process (test de confirmation).	Annexe IV
10	Recherche et dénombrement des Coliformes et Coliformes Thermo-Tolérants dans le concentré et le produit fini (test de présomption).	Annexe IV
10*	Recherche et dénombrement des Coliformes et Coliformes Thermo-Tolérants dans le concentré et le produit fini (test de confirmation).	Annexe IV
11	Recherche et dénombrement des anaérobies sulfito-réducteurs dans le concentré et le produit fini.	Annexe IV
12	Recherche et dénombrement des levures et moisissures dans le concentré et le produit fini.	Annexe IV
13	Recherche et dénombrement des Germes aérobie mésophiles totaux à 30°C dans le concentré.	Annexe IV
14	Recherche et dénombrement de <i>Staphylococcus aureus</i> dans le concentré.	Annexe IV

15	Alimentation des souris à base des granules (originale 2016).	37
16	Logements numérotés des souris (originale 2016).	38
17	Un lot des souris males (originale 2016).	39
18	Contention des souris (originale 2016).	39
19	Gavage des souris témoins par l'eau distillée (originale 2016).	40
20	Gavage des souris par la spiruline diluée (originale 2016).	40
21	classement des trois formules relatif au critère couleur.	53
22	classement des trois formules relatif au critère odeur.	54
23	classement des trois formules relatif au critère gout.	55

Liste des tableaux

Tableau	Titre	Page
1	Produit alimentaires à base de spiruline.	9
2	Informations nutritionnelles d'un pur jus 100% orange (Vitajus).	11
3	Échelle de toxicité de Hodge et Sterner (1943).	13
4	Les différentes doses de chaque formulation (g/l).	35
5	Résultats des analyses physicochimiques de l'eau de chaudière.	41
6	Résultats des analyses physicochimiques de l'eau de bêche.	42
7	Résultats des analyses physicochimiques de l'eau de process.	43
8	Résultats des analyses physicochimiques du concentré.	43
9	Résultats des analyses physicochimiques du produit semi fini.	44
10	Résultats des analyses physicochimiques du produit fini.	45
11	Résultats des analyses physicochimiques du produit fini enrichi en spiruline et son test de stabilité.	46
12	Résultats des analyses physicochimiques de peroxyde d'hydrogène.	47
13	Résultats des analyses microbiologiques de l'eau de process.	48
14	Résultats des analyses microbiologiques de Concentré.	49
15	Résultats des analyses microbiologiques de produit fini.	49
16	Résultats des analyses microbiologiques de produit fini enrichi en spiruline et son test de stabilité.	50
17	Classement des formules selon les trois critères (Couleur, odeur et gout).	52
18	Résultats des analyses sensorielles de produit fini enrichi en spiruline après 4 semaines.	56
19	L'effet toxique de la spiruline sur le comportement des animaux et le taux de mortalité.	57

Résumé

Durant notre étude expérimentale, nous avons divisé notre travail en deux étapes, la première étape est basée sur la formulation d'un pur jus 100% orange enrichi par des différentes doses de spiruline (0.5, 1 et 1.5 g/l), suivi par des analyses physico-chimiques, microbiologiques et sensorielles des trois formules préparées et un test de stabilité.

La deuxième étape consiste à réaliser un test de toxicité aigüe de la spiruline par un gavage oral des souris aux doses suivantes (0,5 ; 4 ; 8 et 15g/Kg de poids corporel) de la spiruline diluée dans l'eau distillée.

D'après les résultats obtenus, on remarque que les résultats des analyses physicochimiques et microbiologiques sont conformes aux normes établies par l'unité vitajus. Concernant les analyses sensorielles, la majorité des dégustateurs ont choisi la formule 1 (0.5 g/l) comme meilleure formule d'après les trois critères de dégustation : couleur, odeur et goût.

Le test de toxicité aigüe montre qu'aucun comportement anormal ni décès n'a été constaté chez les souris traités ce qui n'a pas permis la détermination de la DL50 de la spiruline qui est supérieur à 15000 mg/Kg ce qui confirme l'intoxïcité de cette dernière.

Mots clés : Spiruline, Analyse physicochimique, Analyse microbiologique, Analyse sensorielle, Test de stabilité, Toxicité aigüe, DL50.

Abstract

In our experimental study, we divided our work into two stages, the first stage is based on the formulation of a pure juice 100% orange fortified with different doses of Spirulina (0.5, 1 and 1.5 g / l), followed by a physico-chemical, microbiological and sensory analysis of the three formulas and a stability test.

The second step is to perform a test of acute toxicity of Spirulina by mice's oral gavage at the following doses of spirulina (0.5, 4, 8 and 15 g/kg of body weight), diluted in distilled water.

According to the results, we note that the results of physico-chemical and microbiological analysis are consistent with the standards established by the Vitajus unit. Regarding sensory analysis, the majority of tasters chose the formula 1 (0.5 g / l) as the best formula based on three criteria tasting: color, smell and taste.

The acute toxicity test showed no abnormal behavior or deaths in treated mice that did not allow the determination of the LD50 of spirulina which is above 15000 mg/Kg B.W which confirms the intoxicité thereof.

Keywords: Spirulina, Physico-chemical analysis, Microbiological analysis, Sensory analysis, Stability test, Acute toxicity, LD50.

الملخص

خلال دراستنا التجريبية، قمنا بتقسيم عملنا إلى مرحلتين، حيث تستند المرحلة الأولى على تركيب عصير البرتقال 100% نقي، مدعم بجرعات مختلفة من السبيرولينا (0.5، 1، و 1.5 غ/ل)، متبوع بتحليلات فيزيوكيميائية؛ ميكروبيولوجية وحسية للتركيبات الثلاثة، يليه اختبار لإستقرار العصير.

فيما تتمثل المرحلة الثانية في إجراء اختبار السمية الحادة للسبيرولينا بواسطة تغذية أنبوبية عن طريق الفم لفئران بالجرعات التالية للسبيرولينا (0.5، 4، 8، و 15 غ / كغ من وزن الجسم) المخففة في الماء المقطر.

و من النتائج المتحصل عليها، نلاحظ أن نتائج التحاليل الفيزيوكيميائية و الميكروبيولوجية تتفق والمعايير المتبعة من قبل وحدة فيطاجو. أما فيما يتعلق بالتحليل الحسي، فقد اختار معظم المتذوقين الصيغة 1 (0.5 غ/ل)، كأفضل صيغة وفقاً لثلاثة معايير للتذوق: اللون، الرائحة والطعم.

لم يظهر اختبار السمية الحادة أي سلوك غير طبيعي ولم تلاحظ أي حالة وفاة للفئران المعالجة مما لم يسمح بتحديد الجرعة الوسطى المميتة 50% للسبيرولينا والتي تزيد عن 15000 ملغ / كغ من وزن الجسم وهو ما يؤكد عدم سمية هذه الأخيرة.

الكلمات المفتاحية: سبيرولينا؛ تحليل فيزيوكيميائي؛ تحليل ميكروبيولوجي؛ تحليل حسي؛ اختبار الاستقرار؛ السمية الحادة؛ الجرعة الوسطى المميتة 50% .

Sommaire

Introduction générale.....	1
----------------------------	---

Etude bibliographique

Chapitre I : Généralités sur la spiruline, les jus de fruits et la toxicologie

I. 1. Généralités sur la spiruline.....	3
I. 1.1. Définition.....	3
I. 1.2. Historique.....	4
I. 1.3. Aspect nutritionnel	4
I. 1.4. Législation.....	6
I. 1.5. L'utilisation de la spiruline	7
I. 2. Généralités sur les jus de fruits.....	9
I. 2.1. Définition d'un jus de fruit.....	9
I. 2.2. Classification des jus de fruit.....	9
I. 2.3. Définition d'un jus d'orange	11
I. 2.4. Valeur nutritionnelle d'un jus d'orange	11
I. 3. Généralités sur la Toxicologie	12
I. 3.1. La toxicologie	12
I. 3.2. La toxicité	12
I.3.3. Les types de toxicité.....	12
I. 3.4. La toxicité de la spiruline	13

Chapitre II : Matériel et méthodes

II. 1. Matériel	15
II. 1.1. Matériel d'étude	15
I. 1.1.1. Matières premières	15
II. 1.1.2. Matériel végétal	15
II. 1.1.3. Matériel animal	16
II. 1.2. Matériel non biologique	16
II. 1.2.1. Verrerie et appareillage	16
II. 1.2.2. Milieux de culture	16
II. 1.2.3. Réactifs et solutions	16

II. 2. Méthodes	16
II. 2.1. Echantillonnage	16
II. 2.2. Méthodes d'analyses physico chimiques	18
II. 2.2.1. Analyses physico-chimiques effectuées sur l'eau	18
II. 2.2.2. Analyses physico-chimiques effectuées sur le concentré	22
I. 2.2.3. Analyses physico-chimiques effectuées sur les produits : semi-fini, fini et fini enrichi en spiruline	23
II. 2.2.4. Analyses physico-chimiques effectuées sur le peroxyde d'hydrogène	24
II. 2.3. Méthodes d'analyses microbiologiques	24
II. 2.3.1. Préparation des diluions liquides et solides	25
II. 2.3.2. Analyses microbiologiques effectuées sur l'eau de process	26
II.2.3.3. Analyses microbiologiques effectuées sur le concentré	30
II. 2.3.4. Analyses microbiologiques effectuées sur le produit fini et fini enrichi en spiruline	35
II. 2.4. L'analyse sensorielle de jus	35
II. 2.5. Test de la stabilité de jus	35
II. 2.6. Etude toxicologique de la spiruline.....	36
II. 2.6.1. Informations générales sur les souris utilisées	36
II. 2.6.2. Conditions d'élevage	37
II. 2.6.3. Evaluation de la toxicité aiguë chez les souris	38

Chapitre III : Résultats et discussion

III. 1. Résultats des analyses physicochimiques	41
III. 1.1. Résultats des analyses physicochimiques de l'eau de chaudière	41
III. 1.2. Résultats des analyses physicochimiques de l'eau de bêche	42
III. 1.3. Résultats des analyses physicochimiques de l'eau de process	42
III. 1.4. Résultats des analyses physicochimiques du concentré	43
III. 1.5. Résultats des analyses physicochimiques du produit semi fini	44
III. 1.6. Résultats des analyses physicochimiques du produit fini	45
III. 1.7. Résultats des analyses physicochimiques du produit fini enrichi en spiruline et son test de stabilité	46
III. 1.8. Résultats des analyses physicochimiques de peroxyde d'hydrogène	47
III. 2. Résultats des analyses microbiologiques	47
III. 2.1. Résultats des analyses microbiologiques de l'eau de process	47

III. 2.2. Résultats des analyses microbiologiques du Concentré	48
III. 2.3. Résultats des analyses microbiologiques de produit fini	49
III. 2.4. Résultats des analyses microbiologiques de produit fini enrichi en spiruline et son test de stabilité	50
III. 3. Résultats des analyses sensorielles	51
III. 3.1. Couleur	52
III. 3.2. Odeur	53
III. 3.3. Goût	54
III. 3.4. Résultats des analyses sensorielles de test de stabilité de produit fini enrichi en spiruline	55
III. 4. Résultats de l'étude toxicologique	56
Conclusion.....	57
Références bibliographiques	
Annexes	

Introduction

Le groupe des cyanobactéries, anciennement appelées algues bleues, compte parmi l'une des plus anciennes formes de vie sur Terre et constitue l'essentiel des bactéries photosynthétiques avec production d'oxygène. Parmi elles existe le genre *Spirulina* ou *Arthrospira*, des cyanobactéries filamenteuses dont fait partie une bactérie particulièrement intéressante dénommée *Spirulina platensis* (ou *Arthrospira platensis*), qui semble actuellement l'une des meilleures solutions pour la production simple d'un complément alimentaire de haute qualité (Sguera, 2008).

La spiruline est consommée depuis des siècles par certains peuples primitifs d'Afrique et d'Amérique, et connue par les scientifiques depuis plusieurs décennies pour sa richesse nutritionnelle, elle fait l'objet d'une redécouverte depuis quelques années (Trabelsi *et al.*, 2010).

Cette micro algue bleu-verte a été proposée dans l'alimentation humaine par plusieurs scientifiques et nutritionnistes grâce à ses qualités nutritionnelles exceptionnelles, sa facilité de culture, sa haute productivité et son faible coût de production. La spiruline est considérée comme une ressource alimentaire non conventionnelle pouvant contenir jusqu'à 70% de protéines ; elle est riche en sels minéraux, en oligo-éléments et en nombreuses vitamines (B1, B2, B12, E,...) (Sall *et al.*, 1999).

Outre des propriétés nutritionnelles avérées, la spiruline connaît aujourd'hui un regain d'intérêt de la part de la communauté scientifique internationale du fait de sa possible utilisation comme source de produits à vertus thérapeutiques (Pascaud, 1993).

Les jus de fruits contiennent les éléments nutritifs des fruits dont ils sont issus, excepté les fibres : minéraux, vitamines et sucres.

Ils sont une bonne source de vitamine C, dont un verre de jus d'orange peut fournir 100% des apports conseillés en vitamine C d'un enfant de moins de 10 ans (Lecerf et Ragot, 2006). Ce qui n'est pas le cas de la spiruline (absence de la vitamine C) (Pietri, 2011).

L'objectif du présent travail est d'une part la formulation et le suivi de la qualité physico-chimique, microbiologique et organoleptique d'un pur jus 100% orange « Vitajus » enrichi en différentes doses de spiruline « 0,5, 1 et 1,5 g/l » et d'autre part la détermination de la dose létale médiane « DL50 » de la spiruline et l'épreuve de l'intoxication de cette dernière afin d'élaborer un produit alimentaire nouveau de type fonctionnel à base de spiruline.

Introduction

Notre mémoire est constitué de 3 chapitres :

Le premier chapitre est consacré à une étude bibliographique des différents éléments relatifs à notre travail. Dans ce chapitre, des généralités sur la spiruline sont données en spécifiant ses qualités nutritionnelles et son utilisation dans des différents domaines. Ce chapitre fait aussi apparaître des généralités sur les jus de fruit, la toxicologie et la toxicité de la spiruline.

Dans un second chapitre la partie expérimentale est détaillée. D'abord le matériel, puis les méthodes d'analyses utilisées, basées sur des protocoles expérimentaux référenciés, qui sont clairement expliqués.

Enfin le troisième chapitre donne un aperçu sur les résultats obtenus des analyses et des discussions ainsi que des comparaisons avec d'autres travaux sont présentées.

I. 1. Généralités sur la spiruline

I. 1.1. Définition

La spiruline est une cyanobactérie (0,3 mm de long), vieux comme le monde dont le nom scientifique est "cyanobactérie *Arthrospira platensis*" se présente sous la forme d'un filament pluricellulaire bleu-vert, mobile, non ramifié et enroulé en spirale, qui vit de photosynthèse comme les plantes et prospère naturellement dans les lacs salés et alcalins des régions chaudes du globe (Jordan, 1999; Cruchot, 2008) (voir figure1).

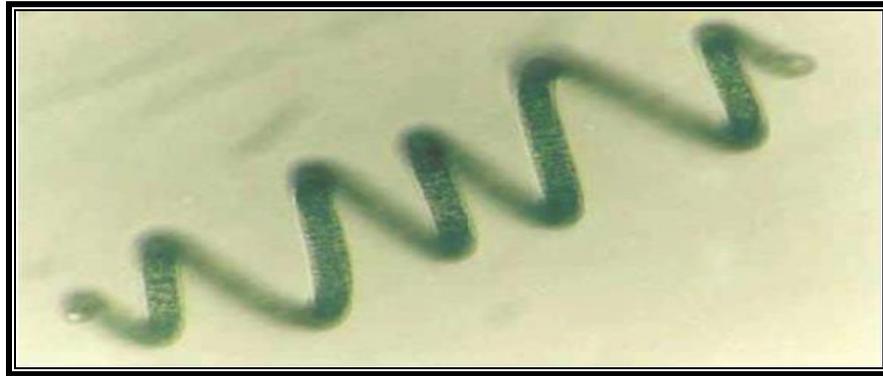


Figure 1: Aspect microscopique de l'*Arthrospira platensis* (Vicenete, 2008).

Ces caractéristiques biologiques font qu'elle se situe à la frontière du monde bactérien et du monde végétal.

C'est une microalgue puisant son énergie à la photosynthèse, et dépourvue de cellulose (Giraldine-Andréani, 2005), elle est incapable de réduire (fixer) l'azote de l'air, car elle est dépourvue des structures spécialisées appelées hétérocystes, contrairement à certaines autres cyanobactéries (Anabaena, Nostoc) (Cruchot, 2008).

Pour se développer, la Spiruline a besoin d'éléments minéraux simples tels l'eau, les sels minéraux, le gaz carbonique et l'oxygène qu'elle puise directement dans son milieu tout en utilisant la lumière solaire comme source d'énergie grâce à son système pigmentaire. Ce mode de synthèse de biomasse s'intitule la photo autotrophie (Bruno De Reviers, 2003).

La spiruline est considérée comme une source alimentaire de haute qualité nutritive, en raison notamment de sa haute digestibilité et de sa teneur élevée en protéines (70%) et particulièrement en phycocyanine. Elle présente une composition chimique riche en vitamines

(provitamines A, β Carotène, vitamine B1) et en acides gras insaturés : acide linoléique et linolénique (**Sironval, 1993**).

I. 1.2. Historique

Des traces de cyanobactérie, ont déjà été détectées dans des stromatolithes (restes de filaments d'algue pétrifiés dans du calcaire) datant de quelques 3.7 milliards d'années, en Afrique du Sud (**Perez, 1997**).

La spiruline ne fut vraiment redécouverte qu'en 1940 au Tchad par un botaniste français du nom de Dangeard. Les Kanembous, tribu du Tchad, la consomment encore de nos jours sous le nom de Dihé.

Depuis, on a su par les archives mexicaines que la spiruline était aussi consommée du temps des Aztèques, bien avant l'arrivée des Espagnols, sous le nom de Tecuitlatl (**Farrar, 1966**).

Depuis la mise en place de la culture en masse des microalgues à la fin des années 50, elle connaît un regain de popularité pour l'alimentation humaine.

En 1995, il existe une vingtaine d'exploitations industrielles dans le monde. Actuellement, leur nombre avoisine la trentaine. (**Fox, 1999**).

La première culture artisanale de spiruline méritant vraiment cette appellation revient sans doute à FOX Ripley qui fut le premier à lancer cette activité en Inde en 1973, en collaboration avec le Navsari Agricultural College.³

I. 1.3. Aspect nutritionnel

La spiruline est un aliment naturel qui a des valeurs nutritionnelles exceptionnelles en protéines, lipides, glucides et vitamines. Sa composition chimique varie en fonction de la souche et le milieu de croissance, La composition biochimique de la spiruline a été analysée depuis 1970 (**Salle et al., 1999; Charpy et al., 2008**).

Elle est considérée comme une source alimentaire de haute qualité nutritive (**Ould Belahcent, et al., 2013**).

I. 1.3.1. Protéines

Selon les souches et les conditions de culture, la quantité en protéines *d'Arthrospira platensis* varie de 55 à 70 % du poids sec. La spiruline contient la plupart des acides aminés et

notamment tous les acides aminés essentiels constituant près de 60% du poids total des protéines (**Jean –Paul. J, 2006**).

C'est l'aliment le plus riche en protéines connu à ce jour puisqu'elle en contient deux fois plus que le soja et trois fois plus que la viande ou le poisson (**Clément, 1975**).

I. 1.3.2. Glucides

Les glucides constituent globalement 15 à 25% de la matière sèche des spirulines (**Ciferri, 1983; Falquet et Hurni, 2006**). Les sucres simples et les polyols ne sont présents qu'en très faible quantité. Les glucides assimilables sont représentés par du rhamnosane et du glucosane aminés, respectivement environ 2% et 10%. On note aussi la présence de glycogène (0,5%) (**Ould Belahcent, et al., 2013**).

I. 1.3.3. Acides nucléiques

Chez *A. Platensis* comme chez *A. Maxima*, on rapporte des valeurs de 4.2 à 6% d'acides nucléiques totaux dans la matière sèche. La teneur en acides nucléiques de la spiruline est très inférieure à celle de la majorité des microorganismes unicellulaires (**Falquet, 1996**).

La proportion d'ADN serait d'un quart à un tiers par rapport à l'ARN (**Chamorro-Cevallos-G, 1980**).

I. 1.3.4. Lipides

La composition en lipides totaux se caractérise par un bon équilibre entre acides gras saturés et acides gras polyinsaturés. La composition des principaux acides gras révèle la présence d'une forte concentration en acides gras essentiels, incluant des oméga-3 et des oméga-6 qui préviendraient l'accumulation de cholestérol dans l'organisme (**Hug et Von der wied, 2011**). Ces lipides totaux peuvent être séparés en une fraction saponifiable (83%) et une fraction insaponifiable (17%), contenant essentiellement des paraffines, des pigments, des alcools terpéniques et des stérols (**Clément, 1975**).

La spiruline est considérée comme l'une des meilleures sources alimentaires connues d'acide γ -linoléique, après le lait humain et quelques huiles végétales peu courantes, fort chères et non chauffées (huiles d'onagre, de bourrache, de pépin de cassis et de chanvre) (**Cruchot, 2008**).

I. 1.3.5. Vitamines

La Spiruline est une algue vitaminée, elle est la deuxième source de vitamine B1 derrière la levure de bière. elle contient aussi une concentration relativement élevée en provitamine A, vitamine B 12 et β -carotène (Belay, 1997; Salle *et al.*, 1999; Cruchot, 2008).

La biodisponibilité de la vitamine B12 semble hautement dépendante de la souche de Spiruline utilisée et des procédés de culture (Falquet et Hurni, 2006).

I. 1.3.6. Minéraux et Oligoéléments

Les minéraux les plus intéressants chez la spiruline sont le calcium, le magnésium, le phosphore et le potassium. Les trois premiers minéraux cités sont présents dans la spiruline à des teneurs comparables à celles trouvées dans le lait. Les oligo-éléments présentant le plus d'intérêts dans la spiruline sont le fer, zinc, le sélénium (Cruchot, 2008).

Des enrichissements dans le milieu de culture en Zn, Fe, Se peuvent fortement augmenter la teneur en ces minéraux de la Spiruline. Il est même possible d'enrichir la Spiruline en acides gras (Kiet *et al.*, 1994).

I. 1.3.7. Pigments

Le système pigmentaire de la Spiruline est constitué de chlorophylle a; de pigments hydrosolubles, les phycobilines rouge (phycoérythrine) et bleu (phycocyanine); de caroténoïdes (β -carotène, cryptoxanthine) (Charpy *et al.*, 2008).

I. 1.4. Législation

La Spiruline répond à la législation sur les compléments alimentaires. Un récent décret a permis de fournir un cadre juridique complet pour les compléments alimentaires en transposant dans le droit national la majeure partie de la directive européenne n° 2002/46/CE.

Ce nouveau décret n° 2006/352 du 20 mars 2006, publié au Journal Officiel du 25 mars 2006, reprend la définition européenne des compléments alimentaires: « on entend par compléments alimentaires, les denrées alimentaires dont le but est de compléter le régime alimentaire normal et qui constituent une source concentrée de nutriments ou d'autres substances ayant un effet nutritionnel ou physiologique seuls ou combinés, commercialisés sous forme de doses, à savoir les formes de présentation telles que les gélules, les pastilles, les

comprimés, les pilules et autres formes similaires, ainsi que les sachets de poudre, les ampoules de liquide, les flacons munis d'un compte-gouttes et les autres formes analogues de préparations liquides ou en poudre destinées à être prises en unités mesurées de faible quantité». L'étiquetage de ces produits doit comprendre la dénomination de vente de «complément alimentaire », ainsi que d'autres informations comme le mode d'emploi détaillé, la dose journalière recommandée, la liste de toutes les substances utilisées lors de la fabrication, les précautions d'emploi. Dans plusieurs états africains, une Autorisation de Mise sur le Marché (AMM) est prévue pour la distribution de Spiruline (**Charpy et al., 2008**).

I. 1.5. L'utilisation de la spiruline

I. 1.5.1. Santé

Dans les pays développés, et depuis peu dans quelques régions d'Afrique, la Spiruline est consommée comme complément alimentaire « bénéfique à la santé ». Longtemps recommandée comme complément en cas de carences en acides gras essentiels (**Hudson et Karis, 1974**).

Elle est vendue :

- Pour une alimentation équilibrée : par ses apports en micronutriments.
- Dans les régimes amaigrissants : pour ses taux importants en protéines et en phénylalanine, qui réguleraient l'appétit.
- Pour l'amélioration des capacités sportives : par ses teneurs en fer, en vitamine B12, et en β carotène qui faciliteraient la récupération.
- Pour lutter contre l'asthénie : par son apport en oligoéléments et vitamines.
- Pour ses effets sur la sénescence : par les propriétés antioxydantes du β -carotène, de la phycocyanine et de la vitamine E, elle serait un frein au vieillissement des cellules.
- Pour son activité antioxydante liée à la phycocyanine. (**Charpy et al., 2008**).
- Pour son activité anticoagulante: (**Yamamoto et al., 2003**) montrent les effets anticoagulants du Spirulane Sodique (Sp-Na).
- Pour renforcer le système immunitaire : Plusieurs expériences positives sur les animaux attestent que la Spiruline régulerait favorablement le système immunitaire (**Qureshi et al., 1996; Pascaud, 1993; Borchers et al., 2007**).

- Pour son activité antivirale : L'activité antivirale de la Spiruline interviendrait selon deux mécanismes :
 - Inhibition de la pénétration des virus (**Hayashi et al., 1996**).
 - Inhibition de la phase de réplication des virus. (**Kiet Pham Quoc et Durand Chastel 2006**).
- Pour son activité antitumorale : la phycocyanine de la Spiruline induirait un mécanisme d'apoptose (autodestruction) des cellules cancéreuses (**Li et al., 2006**).
- Pour ses autres actions sur la santé: En plus de son utilité dans la prise en charge de la malnutrition et des personnes vivant avec le VIH, de nombreuses études de laboratoire et quelques études pré-cliniques indiquent plusieurs autres effets thérapeutiques. Ainsi, elle pourrait être administrée comme complément des traitements médicaux en cas de diabète, d'hypercholestérolémie ou d'hypertension (**Falquet, 1996**).

I. 1.5.2. Cosmétique

Elle est utilisée dans les masques cryogéniques et crèmes anti-âge, par son action sur le renouvellement cellulaire, la tonicité des tissus. Elle est aussi utilisée en synergie avec d'autres algues, comme agent cicatrisant et antiseptique (**Xue et al., 2002**).

I. 1.5.3. Agroalimentaire

En alimentation humaine elle est utilisée comme colorant naturel dans les chewinggums, produits laitiers, boissons non alcoolisées comme la menthe. La phycocyanine est un des rares pigments naturels de couleur bleue. Elle apparaît également dans une gamme de produits algaux mélangée à du sel, des tagliatelles. En Suisse et au Japon, il existe depuis longtemps du pain à la spiruline (**Sguera, 2008**).

La spiruline peut être consommée mélangée avec la farine, le miel, le sucre, la soupe et les boissons...etc. Elle rentre aussi dans la fabrication de plusieurs produits alimentaires (voir tableau 1).

Tableau 1 : Produit alimentaires à base de spiruline.

Aliments	Références
Gâteau de nouille (0,1-10) de spiruline ajoutée à la farine	Brevet chinois (Xu, 1993)
Pain de spiruline	(Chen et Li, 1999)
Boisson de spiruline	Brevet chinois (Zeng et Liang, 1995)
Liquide alimentaire constitué de l'extrait de spiruline et de miel	(Jaouen <i>et al.</i> , Liang <i>et al.</i> , 2001)
Comprimés de spiruline	(Yamaguchi, 1997)

I. 2. Généralités sur les jus de fruits

I. 2.1. Définition d'un jus de fruit

Selon la norme générale codex pour les jus et les nectars de fruits (**codex stan 247-2005**).

Le jus de fruits est le liquide non fermenté, mais fermentescible, tiré de la partie comestible de fruits sains, parvenus au degré de maturation approprié et frais ou de fruits conservés dans de saines conditions par des moyens adaptés et/ou par des traitements de surface post-récolte appliqués conformément aux dispositions pertinentes de la Commission du Codex Alimentarius.

Certains jus peuvent être obtenus à partir de fruits comprenant des pépins, graines et peaux qui ne sont pas habituellement incorporés dans le jus, bien que des parties ou composants de pépins, de graines et de peaux impossibles à retirer par des bonnes pratiques de fabrication (BPF) soient acceptés.

Le jus est obtenu par des procédés adaptés qui conservent les caractéristiques physiques, chimiques, organoleptiques et nutritionnelles essentielles des jus du fruit dont il provient. Le jus peut être trouble ou clair et peut contenir des substances aromatiques et des composés volatils restitués, à condition qu'ils proviennent des mêmes espèces de fruits et soient obtenus par des moyens physiques adaptés. De la pulpe et des cellules obtenues par des moyens physiques adaptés à partir du même type de fruits peuvent être ajoutées.

I. 2.2. Classification des jus de fruit

Les boissons et les rafraichissements non fermentés constituent un ensemble très hétérogène d'où les jus de fruits. Ces derniers sont caractérisés par une très grande diversité. D'une part,

de la nature des fruits utilisés, (un seul fruit, plusieurs fruits ou autres) et d'autres part, du procédé de fabrication mis en œuvre (**Benamara et Agougou, 2003**).

On peut les classer en :

I. 2.2.1. Pur jus de fruits ou 100% pur jus

Sont des jus obtenus à partir de fruits frais, pressés par des procédés mécaniques. Ils ne contiennent pas de colorants ni de conservateurs, aucune adjonction de sucre n'est effectuée, et sont riches en vitamine C (**Benamara et Agougou, 2003**).

I. 2.2.2. Jus de fruits à base de concentré

Selon le décret n° 2003-838 du 1 septembre 2003, du Journal Officiel de la République française, le jus de fruit obtenu à partir d'un concentré est défini comme : produit obtenu, en remettant dans le jus de fruits concentré, l'eau extraite du jus lors de sa concentration ; ainsi qu'en restituant les arômes, les pulpes et les cellules que le jus a perdus, mais qui ont été récupérés lors du processus de production du jus de fruits de même espèce. L'eau ajoutée doit présenter des caractéristiques appropriées, notamment du point de vue chimique, microbiologique et organoleptique, de façon à garantir les qualités essentielles du jus (**Berlinet, 2006**). Le produit ainsi obtenu doit présenter des caractéristiques organoleptiques et analytiques au moins équivalentes à celle d'un type moyen de jus obtenu à partir de fruit de la même espèce (**Vierling, 2008**).

I. 2.2.3. Jus déshydratés

C'est un produit obtenu à partir d'une ou plusieurs espèces par l'élimination physique de la quasi-totalité de l'eau de constitution, ils sont sous forme de poudre (**Vierling, 2008**).

I. 2.2.4. Nectars de fruits

Certains donnent des jus trop pulpeux ou trop acide (Cassin). Pour être consommable en état, il est nécessaire d'ajouter de l'eau et du sucre ou miel pour les rendre buvables. La boisson ainsi obtenue est appelée : nectars (**Roudaut et Lefranq, 2005**).

I. 2.2.5. Jus gazéifiés

Sont des jus saturés par le gaz carbonique qui augmente la propriété rafraichissante et sa valeur alimentaire (**Berlinet, 2006**).

I. 2.2.6. Jus fruités

Ces jus sont préparés à partir de deux à quatre types de fruits différents avec addition de sirop de sucre à faible concentration. La masse fruitière y compte 30 à 50% (**Berlinet, 2006**).

I. 2.3. Définition d'un jus d'orange

Le « Codex Alimentarius » ainsi que « Code of Federal Regulation » des Etats-Unis, définissent le jus d'orange pasteurisé, comme étant un « jus non fermenté mais fermentescible destiné à la consommation directe, obtenu par un procédé mécanique à partir de l'endocarpe d'oranges saines et mûres (*Citrus sinensis*) et conservé exclusivement par des procédés physiques. Ce jus peut contenir jusqu'à 10% de jus de mandarine (*Citrus reticulata*. Blanco) et ses teneurs en pulpe et en huiles essentielles peuvent être ajustées. Il doit être traité à la chaleur à fin de réduire substantiellement son activité enzymatique et le nombre de micro-organismes viables (**FAO/OMS, 1992 USFDA.1993**).

I. 2.4. Valeur nutritionnelle d'un jus d'orange

Les jus de fruits contiennent en partie les constituants hydrosolubles des fruits : Glucides, minéraux, vitamines, pigments, acides, arôme. Ils ont en partie leurs propriétés nutritionnelles et possèdent des propriétés apéritives (**Vierling, 2008**).

La valeur nutritionnelle de jus d'orange qu'on a utilisé est portée dans le tableau (2).

Tableau 2 : Informations nutritionnelles d'un pur jus 100% orange (**Vitajus**).

Valeur moyenne pour 100 ml de produit fini	
Valeur énergétique	187 Kj (44 Kcal)
Protéines	< 0,8 gr
Glucides	10,0 gr
Lipides	< 0,1 gr
Teneur en jus de fruit	100%

I. 3. Généralités sur la Toxicologie

I. 3.1. La toxicologie

La toxicologie est depuis longtemps reconnue comme étant la science des poisons. Elle étudie les effets nocifs des substances chimiques sur les organismes vivants. Elle fait appel à une multitude de connaissances scientifiques et s'intéresse à plusieurs secteurs de l'activité humaine : l'agriculture, l'alimentation, l'industrie pharmaceutique, l'environnement, les milieux de travail, etc. (**Lapointe, 2004**).

I. 3.2. La toxicité

Elle englobe l'ensemble des effets néfastes d'un toxique sur un organisme vivant.

Autrement dit, il s'agit de la capacité inhérente à une substance chimique de produire des effets nocifs chez un organisme vivant et qui en font une substance dangereuse (**Lapointe, 2004**).

I. 3.3. Les types de toxicité

I. 3.3.1. Toxicité aiguë

La toxicité aiguë englobe tous les phénomènes spécifiques et les signes adverses, qui se manifestent juste après l'exposition de l'organisme à une prise unique ou plusieurs prises très rapprochées d'un agent chimique. L'effet toxique aigu est généralement considéré comme un effet qui se produit immédiatement ou dans les premiers jours après l'exposition (**LeBlanc, 2010**).

Et permet de :

- Déterminer la dose létale DL50 de la ou des substances utilisées ;
- Etablir une relation entre la dose administrée et l'intensité des effets observés ;
- Contribuer à l'information générale nécessaire pour la programmation des essais thérapeutiques humains (médicament) (**Derach, 1986**).

❖ La DL50

Elle est dans sa forme la plus simple la dose d'un composé qui provoque une mortalité de 50% dans une population d'animaux mis en expérience. C'est-à-dire ayant reçu une

administration unique d'un produit dans des conditions expérimentales bien définies (**Wallace Hayes, 2008**).

On administre généralement le produit à des rats ou à des souris répartis en plusieurs groupes, et ce, à des doses croissantes suffisantes pour obtenir un pourcentage de mortalité s'échelonnant entre 0 % et 100 % (**Lapointe, 2004**).

De ce fait, la mesure de la DL50 peut établir un classement pour ces substances : plus qu'elle est faible, plus que la substance est toxiques, et l'inverse est juste (voir tableau 3).

Tableau 3. Échelle de toxicité de Hodge et Sterner (1943).

DL50	Indice de toxicité
Jusqu'à 1mg/kg	extrêmement toxique
1 à 50mg/kg	hautement toxique
50 à 500mg/kg	modérément toxique
500 à 5000mg/kg	légèrement toxique
5000 à 15000mg/kg	presque pas toxique
Plus de 15000mg/kg	relativement inoffensif

I. 3.3.2. Toxicité subaiguë

Elle résulte d'expositions fréquentes ou répétées à un toxique sur une période de plusieurs jours ou semaines. Elle permet de reconnaître de principaux sites et éventuellement les mécanismes d'action du toxique (**Lauwerys, 1999**).

I. 3.3.3. Toxicité chronique

Elle résulte d'expositions répétées à un toxique pendant une longue période (en général pendant toute la durée de vie de l'animal de laboratoire) (**Lauwerys, 1999**).

I. 3.4. La toxicité de la spiruline

La Spiruline n'est pas toxique car elle n'a pas les gènes qui assurent la synthèse des toxines de cyanobactéries. Par contre, de nombreuses autres cyanobactéries sont toxiques mais le milieu très alcalin dans lequel pousse la Spiruline, Le haut pH et de l'alcalinité du milieu de culture inhibe la croissance d'organismes potentiellement contaminants, et ne leur permet pas

de se développer ce qui entraîne une monoculture virtuel de *Arthrospira platensis*, ainsi qu'aucun cas avéré d'intoxication par la Spiruline n'a été rapporté (**Charpy *et al*, 2008; Belay, 2007**).

Ce micro-organisme en termes généraux ne dépasse pas les limites de concentration en métaux recommandées par les organismes internationaux. Mais en raison de l'utilisation d'engrais et la possibilité de la pollution de l'eau, le contrôle de la qualité optimale de l'environnement et des suivis périodiques de cette culture des cyanobactéries sont nécessaires pour détecter les concentrations élevées des métaux (**Chamorro *et al.*, 1996**).

Notre étude a été réalisée dans deux structures à savoir :

- ❖ Le laboratoire de contrôle de qualité à l'unité Vitajus de Blida durant une période allant du mois de février au mois de mars.

Cette étude consiste à contrôler la qualité physico-chimique, microbiologique et organoleptique d'un jus enrichi en spiruline.

- ❖ Le laboratoire de toxicologie du complexe Sidal Biotic à Gué de Constantine. Durant une période allant de mois de mars au mois d'avril.

Cette étude consiste à déterminer la DL50 de la spiruline et à prouver l'intoxication de cette dernière.

II. 1. Matériel

II. 1.1. Matériel d'étude

II. 1.1.1. Matières premières

- L'eau
 - Au niveau de l'unité Vitajus on a utilisé trois types d'eau : l'eau de chaudière, de bêche et de process).
 - Au niveau de laboratoire de toxicologie de Sidal Biotic on a utilisé l'eau de robinet.

- Le concentré

Un concentré d'orange (Louis dreyfus) d'origine de Brésil N° lot : G13/374. Dont la quantité d'un fut est de 250 Kg.

II. 1.1.2. Matériel végétal

La spiruline en poudre (BIOMUNYL) : N° lot:13004. Notre spiruline est sous forme de gélules d'origine de Tunisie (laboratoire BIOHEALTH) d'une quantité de 20 grammes, elle est de haute qualité nutritionnelle, 100% naturelle et issue de cultures biologiques, ce qui la préserve de toutes contaminations aux métaux lourds ou autres polluants présents dans les mers aujourd'hui (**Voir figure 2**).



Figure 2: La spiruline utilisée (BIOMUNYL).

II. 1.1.3. Matériel animal

Pour les besoins de l'expérimentation nous avons utilisés 30 souris (albinos), de sexe mâle et femelle, et dont le poids varie entre 26g à 30g.

II. 1.2. Matériel non biologique

II. 1.2.1. Verrerie et appareillage : voir annexe I.

II. 1.2.2. Milieux de culture : voir annexe II.

II. 1.2.3. Réactifs et solutions : voir annexe III.

II. 2. Méthodes

Première partie

II. 2.1. Echantillonnage

Notre recherche expérimentale est basée sur cinq produits différents : l'eau, le concentré d'orange, le produit semi-fini (avant la pasteurisation), le produit fini, et le produit fini enrichi en spiruline.

II. 2.1.1. Eau

Avant chaque prélèvement de l'eau à analyser il faut désinfecter les mains et le robinet de réservoir avec de l'alcool 96° puis flamber ce dernier et laisser couler pendant deux minutes pour éliminer d'éventuels contaminants présent dans la conduite, prélever 250 ml d'eau dans des flacons stériles, flamber le col du flacon et fermer, ensuite porter au laboratoire pour analyser.

II. 2.1.2. Le concentré d'orange

C'est une matière première qui vient préemballée dans un sac stérile composé de deux couches (plastique et aluminium); le tout contenu dans un fût métallique aseptique. Le concentré étant livré à l'état congelé ($T^{\circ}=-15$ à- 18°C), est laissé à températures ambiante pour sa décongélation puis il est stocké dans une chambre froide à une température de -4°C et muni d'un purificateur d'atmosphère.

Alors avant le prélèvement on désinfecte les mains et le ciseau qui servira à couper le sac avec l'alcool 96°, et ouvrir les fûts à moitié après homogénéisation. On prélève une quantité de concentré dans une boîte de pétri. L'opération se déroule devant une flamme à l'aide d'une spatule stérile.

II. 2.1.3. Le produit semi-fini

Le produit semi-fini est envoyé dans le bac de correction, une fois cette étape effectuée, et tout en homogénéisant le produit par un agitateur du système d'équipement, on effectue le prélèvement par le robinet dans des récipients stériles, en respectant les conditions aseptiques.

II. 2.1.4. Le produit fini

Cinq packs sont prélevés en fin de chaîne, à la sortie de pasteurisateur de façon que l'échantillon soit représentatif.

II. 2.1.5. Le produit fini enrichi en spiruline

Nous avons préparé un jus d'orange enrichi en utilisant 3 différentes doses de spiruline, dont la composition de chaque échantillon est la suivante :

- **Echantillon 1:** contient 0,5g de spiruline dans 1 litre d'un jus à orange 100% ;
- **Echantillon 2:** contient 1g de spiruline dans 1 litre d'un jus à orange 100% ;
- **Echantillon 3:** contient 1,5g de spiruline dans 1 litre d'un jus à orange 100%.

(Voir Figure 3).



Figure 3: Le produit fini enrichi en spiruline.

Remarque

Pour le prélèvement des échantillons destinés à une analyse physico-chimique, les conditions aseptiques ne sont pas exigées. Mais l'homogénéité des échantillons permet la fiabilité des résultats.

II. 2.2. Méthodes d'analyses physico-chimiques

II. 2.2.1. Analyses physico-chimiques effectuées sur l'eau

Toutes les méthodes d'analyses physicochimiques de l'eau sont réalisées d'après (Rodier *et al.*, 2005) et adaptées à Vitajus.

Les analyses physico-chimiques se réalisent sur trois types d'eau : l'eau de chaudière, l'eau de bêche et celle du process.

II. 2.2.1.1. Mesure du titre alcalimétrique (TA) et titre alcalimétrique complet (TAC)

- **Principe**

L'alcalinité d'une eau correspond à la présence des hydrogencarbonates, carbonate et l'hydroxyde. Le TA est la teneur de l'eau en alcalis libre et en carbonates alcalins caustiques. Le TAC correspond à la teneur de l'eau en alcalis libre carbonates et hydrogencarbonates.

Ces déterminations sont basées sur la neutralisation d'un volume d'eau par un acide dilué, en présence d'un indicateur coloré (Rodier *et al.*, 2005).

- **Mode opératoire**

- a) **Détermination du TA**

- Prélever 50 ml d'eau à analyser dans une fiole conique de 250ml.
 - Ajouter quelques gouttes de phénol phtaléine.
 - Une coloration rose doit alors se développer, dans le cas contraire le TA est nul.
 - Si la couleur est rose, titrer par l'acide sulfurique H_2SO_4 (0,1N) jusqu'à la décoloration complète de la solution.

- b) **Détermination du TAC**

- Utilisé la solution précédente.
 - Ajouter 2 gouttes de solution de méthylorange.
 - Titrer à nouveau par l'acide sulfurique (0,1N) jusqu'au virage de jaune au jaune orange.

- **Expression des résultats**

$$TA = V1. 10^{\circ}F$$

- ❖ $TA = 2. V1. 5^{\circ}F$

TA est exprimé en mEq et converti en degré Français. \longrightarrow 1mEq = 5°F

- ❖ **V 1** : volume de H_2SO_4 utilisé pour le titrage.

$$TAC = V. 10^{\circ}F$$

- ❖ $TAC = 2V. 5^{\circ}F$

- ❖ **V** : volume de H_2SO_4 versé depuis le début de titrage.

II. 2.2.1.2. Mesure du titre hydrométrique (TH)

- **Principe**

La mesure du TH est la méthode qui permet de doser la somme des ions Mg^{+2} et Ca^{+2} . Les alcalinoterreux (magnésium et calcium) présents dans l'eau sont amenés à former un complexe du type chélate par le sel disodique de l'acide éthylènediamine tétracétique (E.D.T.A) à pH=10. La disparition des dernières traces d'éléments libres à doser est décelée par le virage d'un indicateur spécifique, le noir d'ériochrome. En milieu convenablement tamponné pour empêcher la précipitation du magnésium (**Rodier et al., 2005**).

- **Mode opératoire**

- Mettre 100ml d'eau dans une fiole conique de 250 ml ;
 - Ajouter quelques gouttes de noir d'ériochrome (15gouttes) ;
 - Ajouter 2 ml de la solution de tampon pH =10 (Ammoniacal) ;

- Si la solution obtenue est bleue, donc TH= 0 ;
- si la solution obtenue est violette, procéder au titrage par la Solution de E.D.T.A (0,02 N) jusqu'à virage bleu.

- **Résultat**

$$\text{TH} = 1000. C. V1/V2$$

La concentration totale en Ca⁺⁺ et Mg⁺⁺ exprimée en mmol/l

C : Concentration en mol/l de la solution E.D.T.A de 0,02N

V1 : Volume en ml de la solution E.D.T.A

V2 : Volume en ml de l'échantillon (c.à.d. 100 ml) ;

Conversion :

0,1 mmol/l= 1°F

$$\text{TH (°F)} = V1$$

II. 2.2.1.3. Mesure du chlorure (Cl⁻)

- **Principe**

Les chlorures sont dosés en milieu neutre par une solution de nitrate d'argent, ce titrage est fait en présence de chromate de potassium. La fin de la réaction est indiquée par l'apparition de teinte rouge caractéristique de chromate d'argent (**Rodier et al., 2005**).

- **Mode opératoire (méthode de Mohr)**

- Prélever 10 ml d'eau à analyser dans une fiole conique de 250 ml ;
- Ajouter quelques gouttes de K₂Cr₄ à 10% ;
- Titrer avec une solution d'AgNO₃ 0,03N jusqu'à apparition d'une teinte rougeâtre, qui doit persister 1 à 3 minutes.

- **Résultat**

$$(\text{Cl}^-) = V . 100 \text{ mg/l}$$

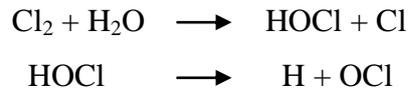
V : volume AgNO₃ versé.

II. 2.2.1.4. Mesure du chlore libre (Cl₂)

- **Principe**

Le chlore libre se présente sous forme d'acide hypochloreux, d'ions hypochlorite ou de Cl₂ élémentaire dissous.

La réaction est directe avec le diéthyl-phénylène diamine (DPD) qui s'oxyde en donnant une coloration rouge comme le montre la réaction suivante (**Rodier *et al.*, 2005**).



- **Mode opératoire**

- Remplir un tube colorimétrique avec 5ml de l'eau ; ceci représente le blanc ;
- Placer ce tube dans l'ouverture supérieure gauche du comparateur ;
- Remplir un autre tube avec 5ml de l'eau à l'analyser;
- Ajouter le contenu d'un sachet de réactif diéthyl-p-phénylène diamine (DPD) chlore libre au second tube ;
- Terminer l'essai et lire le résultat en moins d'une minute après l'addition du réactif et agiter pour mélanger ;
- Placer le second tube dans l'ouverture supérieure droite du comparateur ;
- Tenir le comparateur face à une surface uniformément éclairée (lampe) et regarder par les ouvertures de la face antérieure du comparateur ;
- Tourner le disque jusqu'à égalité des teintes dans les deux ouvertures.

- **Lecture**

Lire la concentration du chlore libre en mg/L dans la fenêtre de l'échelle.

II .2.2.1.5. Mesure du pH

- **Principe**

Le pH est mesuré directement à l'aide d'un pH-mètre (**Tardat et Beaudry, 1995**).

- **Mode opératoire**

- Mettre le pH-mètre sous tension ;
- Mettre l'appareil sur pH ;
- Introduire l'électrode dans la solution à contrôler ;
- Laisser la valeur indiquée se stabilisée ;
- Faire la lecture du pH directement sur l'écran ;
- Rincer l'électrode par l'eau distillée après chaque utilisation.

- **Résultat**

Lecture directe de la valeur pH sur le pH-mètre.

II.2.2.2. Analyses physico-chimiques effectuées sur le concentré

Les analyses physicochimiques effectuées sur le concentré sont : l'indice de réfraction et l'acidité titrable. Mais avant de procéder à cette analyse, on doit d'abord faire diluer le concentré car il est très dense ce qui rend la lecture invisible sur le réfractomètre. Aussi c'est difficile de détecter le virage de la couleur lors du titrage avec NaOH.

II. 2.2.2.1. Mesure de l'indice de réfraction (Brix) (Afnor, 1986)

• Principe

L'indice de réfraction « Brix » permet de connaître le degré de pureté d'un liquide ou la dose de solide (matière sèche) dissout dans une solution.

1°Brix = 1g de sucre dans 100g de boisson

• Mode opératoire

Dilution : dans une fiole peser 5g du concentré, ajouter 20ml d'eau distillée, homogénéiser à l'aide d'une spatule pour une meilleure dissolution du concentré.

- étalonner l'appareil avec de l'eau distillée (ajuster la valeur à 0).
- appliquer une prise d'essai sur le prisme du réfractomètre en veillant à ce que les prismes soient pressés l'un contre l'autre.
- la prise d'essai doit couvrir uniformément la surface du verre.
- Effectuer la mesure conformément aux instructions opératoires de l'appareil utilisé

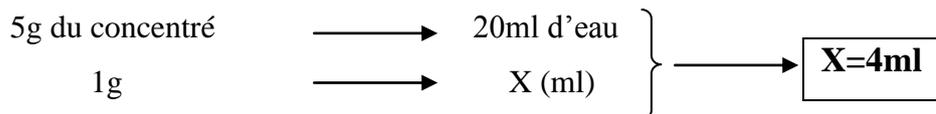
• Expression des résultats

La valeur du Brix dans un gramme du concentré est donnée par la formule suivante :

$$\text{Brix} = \text{valeur obtenue} \times 4$$

Le Brix est exprimé en g/kg.

• Remarque



II. 2.2.2.2. Mesure de l'acidité titrable

• Principe

Analyse de l'acidité par méthode titrimétrique à l'aide d'une base de normalité connue.

- **Mode opératoire :**

Dans un Erlen de 250 ml ;

- Peser 5 g de concentré ;
- Ajouter 70 ml d'eau distillée ;
- Mélanger à l'aide d'un agitateur magnétique ;
- Ajouter quelques gouttes de phénol phtaléine ;
- Titrer avec la soude 1 fois normale (1N) jusqu'au virage rose.

$$\text{Acidité} = V.14 \text{ g/Kg}$$

- **Expression des résultats**

V : volume en ml de NaOH.

14 : coefficient d'acidité.

II. 2.2.3. Analyses physico-chimiques effectuées sur les produits : semi-fini, fini et fini enrichi en spiruline

- **Objectif**

Le but des analyses physico-chimiques réalisées sur le produit semi fini est la mise en évidence des anomalies au début de la production et de vérifier si la production reste conforme à la norme, ce qui nous permet de procéder une action corrective même avant de passer à l'étape suivante et éviter ou minimiser le volume de perte.

Pour le produit fini, ces analyses viennent pour vérifier la conformité qui nous permet de dire qu'aucun défaut n'a été provoqué pendant le mélange des ingrédients (le non-respect des quantités demandées), le traitement thermique (changement de goût et de couleur quant à une pasteurisation trop longue) et cours de conditionnement (bouteilles déformées, sertissage).

On a quatre paramètres à analyser : pH, acidité, Brix, et la densité qui s'effectue uniquement pour les produits fini et fini enrichi en spiruline.

1. pH : La même méthode précédente.

2. Brix : La même méthode précédente sauf pour l'expression des résultats qui se fait directement sur le réfractomètre car les produits semi fini et fini contiennent une quantité importante d'eau donc on ne va pas faire des dilutions.

3. Acidité titrable : le même principe cité précédemment.

4. Densité :

• Principe

La détermination de la densité et de la température correspondante du produit à contrôler par lecture directe sur densimètre (AFNOR, 1986).

• Mode opératoire

- Verser le produit dans l'éprouvette tenue inclinée afin d'éviter la formation de bulle d'air ;
- Placer l'éprouvette verticale ;
- Introduire le densimètre doucement en le retenant dans sa descente, lorsqu'il a pris une position d'équilibre ;
- L'enfoncer légèrement puis le laisser reprendre une position d'équilibre sans qu'il touche l'éprouvette ;
- La lecture est faite à la partie inférieure du ménisque ;
- Après chaque utilisation, rincer le densimètre à l'eau distillée.

II. 2.2.4. Peroxyde d'hydrogène (Norme Tetra Pak)

• Matériels

- Eprouvette graduée de 35 à 50 mm de diamètre intérieur ;
- Aréomètre et thermomètre.

• Mode opératoire

- Verser une petite quantité du peroxyde d'hydrogène dans une éprouvette graduée ;
- Plonger l'aréomètre dans une éprouvette en s'assurant qu'elle contient suffisamment de liquide pour faire flotter l'aréomètre ;
- Si des bulles d'air adhèrent à l'aréomètre, remuer doucement pour les éliminer ;
- Relever simultanément la densité au niveau du liquide sur l'aréomètre et la température.

• Résultats

Avec une règle, joindre la valeur de densité de l'échantillon (sur l'échelle de densité) à la valeur de la température (sur l'échelle de température).

La concentration de H₂O₂ en terme de % du poids peut être lue sur l'abaque

II. 2.3. Méthodes d'analyses microbiologiques

L'analyse microbiologique peut avoir pour objectif de détecter ou de quantifier une grande variété d'organismes, comprenant les bactériophages, bactéries, levures et champignons. Ils peuvent être pathogènes ou toxigènes pour l'homme, s'ils ont

susceptibles de détériorer ou bien de compromettre la quantité d'un produit ; ils peuvent aussi indiquer si un produit a été traité de façon adéquate ou inversement, a été contaminée (Francis Lightfoot et Maier, 2002).

La préparation des échantillons en vue d'une analyse microbiologique nécessite au préalable une prise d'essai dans des conditions aseptiques.

II. 2.3.1. Préparation des diluions (NF V08-057-2)

a. Cas des produits liquides (jus) (voir figure 4)

Le jus d'orange étant un produit liquide le mélange de trois à cinq boites sera considéré comme solution mère (SM=1).

❖ Dilution décimales

- Introduire aseptiquement à l'aide d'une pipette stérile 1ml de la solution mère dans un tube stérile contenant au préalable 9ml du diluant Tryptone Sel Eau (TSE), on obtient donc la dilution 10^{-1} , mélanger soigneusement ;
- A l'aide d'une autre pipette stérile introduire 1 ml de la dilution (10^{-1}) obtenue dans un tube stérile contenant au préalable 9 ml du diluant TSE, on obtient la dilution 10^{-2} mélanger soigneusement ;
- De la même façon préparer les dilutions (10^{-3}).

b. Cas de produit solide (concentré) (voir figure 5)

Introduire aseptiquement 25g de produit à analyser dans un tube bocal stérile préalablement taré contenant au préalable 225ml diluant soit le TSE, homogénéisé.

Cette suspension constitue alors la dilution mère (DM^o), qui correspond donc à la dilution 1/10 ou 10^{-1} .

❖ Dilution décimales

- Introduire ensuite aseptiquement à l'aide d'une pipette en verre graduée et stérile, 1ml de la DM, dans un tube à vis stérile contenant au préalable 9 ml du diluant ; cette dilution sera alors au 1/100 ou 10^{-2} ;
- Introduire par la suite 1ml de la dilution dans un tube à vis stérile contenant au préalable 9ml du même diluant ; cette dilution est sera alors au 1/1000 ou 10^{-3} .

Ces dilutions serviront à la recherche des germes suivants :

- *Germe Aérobies Mésophiles totaux ;*
- *Coliforme Totaux et Escherichia coli ;*

- *Anaérobies Sulfito-réducteurs ;*
- *Staphylococcus aureus ;*
- *Levure et moisissure.*

• **Remarque**

Au moment de la réalisation des dilutions décimale, il est impératif de changer la pipette entre chaque dilution.

Contrairement à cela, lors de l'ensemencement il est recommandé de commencer par la plus forte dilution à savoir 10^{-3} dans le but justement de ne pas changer la pipette. On travaillera alors à l'aide d'une pipette graduée en verre stérile de 5ml.

La préparation des dilutions sont résumés dans les **figures (4) et (5)** en **Annexe IV**.

II. 2.3.2. Analyses microbiologiques effectuées sur l'eau de process

Vu l'importance de la qualité microbiologique de l'eau de process dans la détermination de la qualité hygiénique du produit fini, une analyse microbiologique est obligatoire.

II. 2.3.2.1. Recherche et dénombrement des bactéries Coliformes et *Escherichia coli* (NF T90-413) (voir figure 6 et 6*)

Cette méthode consiste en la recherche et le dénombrement des bactéries Coliformes et *Escherichia coli* en milieu liquide dans les eaux par la technique du nombre le plus probable (NPP).

• **Mode opératoire**

❖ **Test de présomption**

A partir de l'eau à analyser, porter aseptiquement :

- **3** fois 10 ml dans 3 tubes contenant 10 ml de milieu Bouillon lactosé à pourpre de bromocrésol (BCPL) double concentration (D/C) muni d'une cloche de Durham ;
- **3** fois 1 ml dans 3 tubes contenant 10 ml de milieu BCPL simple concentration (S/C) muni d'une cloche de Durham ;
- **3** fois 0,1 ml dans 3 tubes contenant 10 ml de milieu BCPL S/C muni d'une cloche de Durham;
- Chassez l'air éventuellement présent dans les cloches de Durham et bien mélangez le milieu et l'inoculum ;
- L'incubation se fait à 37°C pendant 24 à 48 heures.

• **Lecture**

Dans les deux cas, seront considérés comme positifs, les tubes présentant à la fois :

- Un dégagement de gaz (supérieur au 1/10^e de la hauteur de la cloche) ;
- Un trouble microbien accompagné d'un virage du milieu au jaune (ce qui constitue le témoin de la fermentation du lactose présent dans le milieu).

Ces deux caractères étant témoins de la fermentation du lactose dans les conditions opératoires décrites ci-avant.

La lecture finale se fait selon les prescriptions de la table du NPP correspondante à la méthode pratiquée (**voir annexe V**).

❖ Test de confirmation

Le test de confirmation est basé sur la recherche de Coliformes thermo tolérants parmi lesquels on redoute surtout la présence d'*Escherichia coli*.

Les coliformes thermo tolérants ont les mêmes propriétés de culture et de fermentation que les coliformes mais à 44°C.

Escherichia coli est un coliforme thermo tolérant qui entre autre produit de l'indole à partir du tryptophane présent dans le milieu à 44°C.

• Mode opératoire

- Les tubes de BCPL trouvés positifs lors du test de présomption feront l'objet d'un repiquage à l'aide de deux gouttes dans un tube correspondant numéroté contenant le milieu Schubert muni d'une cloche de Durham ;
- Chasser l'air éventuellement présent dans les Cloches de Durham ;
- Bien mélanger le milieu et l'inoculum ;
- Incuber à 44°C pendant 24 heures.

• Lecture

Dans les deux cas, seront considérés comme positifs, les tubes de Schubert présentant à la fois :

- un dégagement de gaz d'au moins 1/10^e de la cloche,
- un anneau rouge en surface, témoin de la production d'indole à partir du tryptophane présent dans le milieu de Schubert par *Escherichia coli* après adjonction de 2 à 3 gouttes du réactif de Kovacs.

La lecture finale s'effectue également selon les prescriptions de la table du NPP correspondante en tenant compte du fait qu'*Escherichia coli* est à la fois producteur de gaz et d'indole à 44°C.

II. 2.3.2.2. Recherche et dénombrement des Spores de bactéries anaérobies sulfito-réductrices et de Clostridium sulfito-réducteurs. (NF T 90-415) (voir figure 7)

Cette méthode consiste en la recherche et le dénombrement des spores des bactéries Anaérobies Sulfito-Réductrices et de Clostridium Sulfito-Réducteurs dans les eaux destinées à la production de jus de fruits, par incorporation en gélose en tubes profonds.

• Mode opératoire

A partir de l'eau à analyser :

- Transférer environ 25 ml dans un tube stérile, qui sera par la suite soumis à un chauffage de l'ordre de 80°C pendant 8 à 10 minutes, dans le but de détruire toutes les formes végétatives des bactéries anaérobies sulfito-réductrices éventuellement présentes ;
- Après chauffage, refroidir immédiatement le flacon destiné à l'analyse, sous l'eau de robinet ;
- Répartir ensuite le contenu de ce tube, dans 2 tubes différents et stériles, à raison de 10 ml par tube ;
- Ajouter environ 18 à 20 ml de gélose Viande Foie préalablement fondue puis refroidie à $47 \pm 1^\circ\text{C}$ et additionnée de ses additifs spécifiques soit une ampoule d'Alun de fer et une ampoule de Sulfite de sodium ;
- Mélanger doucement le milieu et l'inoculum en évitant d'introduire des bulles d'air et de l'oxygène ;
- Laisser solidifier sur paillasse pendant environ 30 minutes, puis incubé à $35 \pm 2^\circ\text{C}$, pendant 24 à 48 heures.

• Lecture

Dénombrer toute colonie noire de 0,5 mm de diamètre, ayant poussé en masse.

• Remarque

Rapporter le nombre total des colonies caractéristiques contenues dans les deux tubes dans 20 ml d'eau à analyser.

II. 2.3.2.3. Recherche et dénombrement des germes aérobies mésophiles totaux à 22°C et 37°C (GAMT) : (NF EN ISO 6222) (voir figure 8)

Cette méthode consiste en la recherche et le dénombrement des microorganismes dans les eaux destinés à la production des jus par comptage des colonies à 22°C et à 37°C.

• Mode Opérateur

A partir de l'eau à analyser (SM = 1) et facultativement à partir des dilutions décimales 10^{-1} et 10^{-2} ;

- porter aseptiquement 1 ml en double dans deux boîtes de Pétri vides, numérotées ;
- Compléter ensuite avec environ 19 ml de gélose tryptone glucose à extrait de levure agar (TGEA) fondue puis refroidie à $45 \pm 2^\circ\text{C}$;
- Faire ensuite des mouvements circulaires et de va-et-vient en forme de « 8 » pour permettre à l'inoculum de se mélanger à la gélose, sur une surface fraîche et horizontale ;
- Laisser solidifier les boîtes sur paille, puis rajouter une deuxième couche d'environ 5 ml de la même gélose ou de gélose blanche. Cette double couche, a un rôle protecteur contre les contaminations externes diverses ;
- Les boîtes seront partagées en deux séries distinctes :
 - La première série sera incubée à $22 \pm 2^\circ\text{C}$ pendant 68 ± 4 heures ;
 - La seconde série sera incubée à $36 \pm 2^\circ\text{C}$, pendant 44 ± 4 heures.

• Lecture

Les colonies de microorganismes revivifiables apparaissent en masse sous formes lenticulaires et bien distinctes.

• Dénombrement :

Le dénombrement effectué pour les boîtes dont le nombre de colonies varie entre 15 et 300 colonies.

II. 2.3.2.4. Recherche et dénombrement des Streptocoques du groupe D.**Méthode générale par ensemencement en milieu liquide (NPP) (NF T 90-411) (voir figure 9 et 9*)**

Cette méthode consiste en la recherche et le dénombrement des entérocoques intestinaux ou Streptocoques du groupe « D » de la classification de Lance Field, ou encore Streptocoques fécaux dans les eaux par la technique du nombre le plus probable (NPP).

• Mode opératoire**❖ Test de présomption**

A partir de l'eau à analyser,

- porter aseptiquement :
 - 3 fois 10 ml dans 3 tubes contenant chacun 10 ml de milieu ROTHE D/C ;

- 3 fois 1 ml dans 3 tubes contenant chacun 10 ml de milieu ROTHE S/C ;
 - 3 fois 0,1 ml dans 3 tubes contenant chacun 10 ml de milieu ROTHE S/C.
- Bien mélanger le milieu et l'inoculum ;
- L'incubation se fait à 37°C pendant 24 à 48 heures.

• Lecture

Les tubes présentant un trouble microbien seront considérés comme présomptivement positifs, seulement ces derniers :

- Ne doivent en aucun cas faire l'objet de dénombrement ;
- Et doivent par contre, absolument faire l'objet d'un repiquage (deux gouttes) sur milieu LITSKY-EVA dans le but d'être justement confirmés.

❖ Test de confirmation

Le test de confirmation est basé sur la confirmation des Streptocoques du groupe « D » éventuellement présents dans le test de présomption.

- Les tubes de ROTHE trouvés positifs feront donc l'objet d'un repiquage à l'aide de deux gouttes dans un tube contenant le milieu LITSKY-EVA ;
- Bien mélanger le milieu et l'inoculum ;
- L'incubation se fait cette fois-ci à 37°C, pendant 24 heures.

• Lecture

Dans les deux cas, seront considérés comme positifs, les tubes présentant à la fois :

- Un trouble microbien, et
- Une pastille violette ou blanchâtre au fond des tubes.

La lecture finale s'effectue également selon les prescriptions de la table du NPP correspondante (**voir Annexe V**).

II. 2.3.3. Analyses microbiologiques effectuées sur le concentré

II. 2.3.3.1. Recherche et dénombrement des Coliformes et Coliformes Thermo-Tolérants (NF V 08-050) (NF V 08-060) (voir figure 10 et 10*)

• Méthode en milieu liquide

Les Coliformes, Coliformes Thermo-Tolérants et *Escherichia coli* sont dénombrés en milieu liquide par la technique du NPP (nombre le plus probable).

❖ Test de présomption

- Préparer dans un portoir une série de 9 tubes contenant le milieu sélectif bouillon lactosé bilié au vert brillant (VBL) à raison de trois tubes par dilution ;

- A partir des dilutions décimales 10^{-3} à 10^{-1} , porter aseptiquement 1 ml dans chacun des trois tubes correspondant à une dilution donnée ;
- Chassez le gaz présent éventuellement dans les cloches de Durham ;
- Mélanger soigneusement et doucement le milieu et l'inoculum ;
- Incuber à 37°C pendant 24 à 48 heures.

• Lecture

Sont considérés comme positifs les tubes présentant à la fois :

- Un dégagement gazeux (supérieur au 1/10 de la hauteur de la cloche), et,
- Un trouble microbien, ce qui constitue le témoin de la fermentation du lactose présent dans le milieu.

Ces deux caractères étant témoins de la fermentation du lactose dans les conditions opératoires décrites.

La lecture finale se fait selon les prescriptions de la table de Mac Grady (**voir annexe V**).

❖ Test de confirmation

- Les tubes de VBL trouvés positifs lors du dénombrement des Coliformes feront systématiquement l'objet d'un repiquage à l'aide de deux gouttes sur à la fois
- Un tube de VBL muni d'une cloche et ;
- Un tube d'eau peptonée exempte d'indole
- Chasser le gaz présent éventuellement dans les Cloches de Durham ;
- Bien mélanger le milieu et l'inoculum ;
- Incuber les tubes à 44°C pendant 24 heures.

• Lecture

Les tubes considérés comme positifs, présentant à la fois :

- Un dégagement gazeux dans les tubes de VBL ;
- Un anneau rouge en surface, témoin de la production d'indole par *Escherichia coli* après adjonction de 2 à 3 gouttes du réactif de Kovacs dans le tube d'eau peptonée exempte d'indole (EPEI).

La lecture finale s'effectue également selon les prescriptions de la table de Mac Grady en tenant compte du fait que, *Escherichia coli* est à la fois, producteur de gaz et d'indole à $42 \pm 2^\circ\text{C}$.

• Remarque

Etant donné que les Coliformes fécaux font partie des Coliformes totaux, il est pratiquement impossible de trouver plus de Coliformes fécaux que de Coliformes totaux.

II. 2.3.3.2. Recherche et dénombrement des Anaérobies Sulfito-Réducteurs (XP V 08-061) (voir figure 11)**• Mode opératoire**

- A partir de la suspension mère, transférer 1 ml dans un tube stérile, qui sera par la suite soumis à un chauffage de l'ordre de 80°C pendant 8 à 10 minutes, dans le but de détruire toutes les formes végétatives des bactéries anaérobies sulfito-réductrices éventuellement présentes. Un second tube peut être utilisé de façon facultative ;
- Après chauffage, refroidir immédiatement les tubes sous l'eau de robinet ;
- Ajouter environ 18 à 20 ml de gélose Viande Foie préalablement fondue puis refroidie à 47 ± 1°C et additionnée de ses additifs spécifiques soit une ampoule d'Alun de fer et une ampoule de Sulfite de sodium ;
- Mélanger doucement le milieu et l'inoculum en évitant d'introduire des bulles d'air et de l'oxygène ;
- Laisser solidifier sur paillasse pendant environ 30 minutes, puis incuber à 37°C, pendant 24 à 48 heures.

• Lecture

Dénombrer les colonies caractéristiques dans le ou les deux tubes contenant moins de 30 colonies caractéristiques. Il faut qu'un tube renferme au moins 15 colonies caractéristiques.

II. 2.3.3.3. Recherche et dénombrement des levures et moisissures (XP V 08-059) (voir figure 12)**• Mode opératoire**

Les levures et moisissures sont recherchées et dénombrées dans les jus de fruits et concentrés selon le protocole suivant :

- A partir des dilutions décimales, 10^{-3} à 10^{-1} , porter aseptiquement 0,1 ml dans une boîte de Pétri contenant de la gélose Sabouraud au Chloramphénicol ou Oxytétracycline gélose agar (OGA) préalablement fondue, coulée en boîtes de pétrie puis séchées.
- Etaler les gouttes à l'aide d'un râteau stérile, puis incuber à 22°C pendant 5 jours, couvercle en haut.

Dans le souci de ne pas se trouver en face de boîtes envahies par des Levures ou par des Moisissures, on doit effectuer des lectures et des dénombrements tous les jours, Levures à part et les Moisissures à part.

- **Remarque importante**

On doit mettre une boîte de pétri contenant la gélose Sabouraud au Chloramphénicol comme témoin dans les mêmes conditions que les boîtes serviront au dénombrement.

- **Lecture et Dénombrement**

Il s'agit de compter toutes les colonies ayant poussé sur les boîtes en tenant compte des facteurs suivants :

- Ne dénombrer que les boîtes contenant entre 15 et 300 colonies ;
- Multiplier toujours le nombre trouvé par l'inverse de sa dilution ;
- Faire ensuite la moyenne arithmétique des colonies entre les différentes dilutions.

II. 2.3.3.4. Recherche et dénombrement des Germes aérobies mésophiles totaux (GAMT) à 30°C (NF 08-051) (voir figure 13)

- **Mode opératoire**

- A partir des dilutions décimales allant de 10^{-3} à 10^{-1} , porter aseptiquement 1 ml dans une boîte de Pétri vide préparée à cet usage et numérotée.
- Compléter ensuite avec environ 20 ml de gélose plate count agar (PCA) fondue puis refroidie à $45 \pm 1^\circ\text{C}$: le choix des milieux dépend de la nature des denrées à analyser ;
- Faire ensuite des mouvements circulaires et de va-et-vient en forme de « 8 » pour permettre à l'inoculum de se mélanger à la gélose utilisée ;
- Laisser solidifier sur paillasse, puis rajouter une deuxième couche d'environ 5 ml de la même gélose ou de gélose blanche. Cette double couche a un rôle protecteur contre les contaminations diverses.

- **Incubation**

Les boîtes seront incubées couvercle en bas à 30°C pendant 72 heures avec :

- première lecture à 24 heures,
- deuxième lecture à 48 heures,
- troisième lecture à 72 heures.

- **Lecture**

Les colonies des GAMT se présentent sous forme lenticulaire en masse.

• Dénombrement

Il s'agit de compter toutes les colonies ayant poussé sur les boîtes en tenant compte des facteurs suivants :

- Ne dénombrer que les boîtes contenant entre 15 et 300 colonies ;
- Multiplier toujours le nombre trouvé par l'inverse de sa dilution ;
- Faire ensuite la moyenne arithmétique des colonies entre les différentes dilutions.

II. 2.3.3.5. Recherche et dénombrement de staphylocoques aureus (Delarras, 2007) (Voir figure 14)**• Mode opératoire**

Préparation du milieu d'enrichissement :

- Au moment de l'emploi, ouvrir aseptiquement le flacon contenant le milieu de Giolitti Cantoni pour y ajouter une ampoule de Téliurite de Potassium.
- Mélanger soigneusement. Le milieu est alors prêt à l'emploi.
- Porter aseptiquement 1 ml par dilution dans un tube à vis stérile.
- Ajouter par la suite environ 15 ml du milieu d'enrichissement.
- Bien mélanger le milieu et l'inoculum.
- Incuber à 37°C pendant 24 à 48h.

• Lecture :

Sont présumés positifs, les tubes ayant virés au noir :

- Pour s'assurer qu'il s'agit bien d'un développement de *Staphylococcus aureus*, ces tubes feront l'objet d'une confirmation par isolement sur gélose Chapman. préalablement fondue, coulée en boîtes de pétri et bien séchées.
- Les boîtes de Chapman ainsiensemencées seront incubées à leur tour à 37°C pendant 24 à 48 heures.

• Dénombrement :

- Si à la dilution 10^{-3} , le tube a noirci au bout de 24 heures d'incubation, mais à l'isolement sur Chapman, il n'y a pas de colonies caractéristiques, ce tube est considéré comme négatif.
- Si par contre à la dilution 10^{-1} , le tube a noirci au bout de 24 heures d'incubation, et à l'isolement, il y a des colonies caractéristiques, il faut tenir compte de la dilution en question, car le nombre réel de *Staphylococcus aureus* correspond à l'inverse de la dilution.

II. 2.3.4. Analyses microbiologiques effectuées sur le produit fini et fini enrichi en spiruline

Le protocole utilisé est le même que celui préconisé pour les analyses microbiologiques de concentré, seulement dans le produit fini on ne fait pas la recherche des germes mésophiles totaux et *des staphylococcus Aureus*.

II. 2.4. L'analyse sensorielle de jus

Le choix de la meilleure formulation est basé non seulement sur les qualités nutritionnelles mais nécessite aussi les qualités organoleptiques ce qui nous a amené à réaliser l'analyse sensorielle qui permet d'appréhender les différentes propriétés organoleptiques (gustatives, olfactives, somesthésiques, visuelles et, parfois, auditives) d'un produit.

L'analyse sensorielle des jus obtenus a été réalisée par un panel de dégustateurs composé d'experts du laboratoire de l'unité Vitajus (6 dégustateurs), Aussi, nous avons fait appel à 14 autres personnes qui sont des étudiants de l'université de Blida 1. Les observations des dégustateurs sont prises en compte.

Les différentes formulations (les jus enrichi en spiruline) (voir tableau 4) sont classées selon les trois critères : couleur, odeur et goût.

Le test de classement a été réalisé avec une épreuve de notation sur une échelle de 3 points allant de un (1) pour l'échantillon le plus acceptable à trois (3) pour le moins acceptable sans admettre d'égalités. Les produits testés sont présentés sous forme codée et simultanément pour faciliter plusieurs observations au besoin (**voir annexe v**).

Tableau 4: Les différentes doses de chaque formulation (g/l).

Les formulations (F)	Dose de la spiruline (g/l)
F1	0,5
F2	1
F3	1.5

II. 2.5. Test de la stabilité de jus

Le test de stabilité a été effectué sur les 3 échantillons enrichi en spiruline. Ces derniers ont été préparés et analysés le jour même puis analysés après incubation à 22° C pendant 4 semaines.

L'intérêt principal est d'observer l'évolution au cours du temps pour estimer une date limite d'utilisation optimale et d'étudier la stabilité de ces jus de point de vue de leur qualité physicochimique, microbiologique et organoleptique.

• Mode opératoire

- Prendre trois bouteilles d'un litre de jus à orange 100%.
- Peser différentes doses de la spiruline (0,5g-1g-1,5g) en utilisant une balance à précision électrique.
- Mélanger 500ml de jus à orange 100% avec les doses de spiruline choisies dans un bêcher.
- Agiter bien à l'aide d'un agitateur pendant quelques minutes.
- Renverser ce mélange dans les 500ml du jus restant, et le mélanger encore une fois pendant quelques minutes à l'aide un agitateur.
- Verser le jus enrichi dans des flacons stériles.
- Effectuer un traitement thermique (une Flash pasteurisation) 95°C pendant 30 secondes.
- Les mettre à une température ambiante.

• Lecture

Effectuer une analyse de ces jus une fois par semaine pendant 1 mois :

- Analyse de paramètres physicochimiques (Acidité, Brix et pH) ;
- Analyse microbiologique ;
- Analyse des critères organoleptique.

Deuxième partie

II. 2.6. Etude toxicologique de la spiruline

Pour effectuer des essais toxicologiques, le choix de l'animal est particulièrement important.

Les animaux de laboratoire utilisés dans notre étude sont des souris mâles et femelles de race Albinos, jeunes, élevés au sein de l'animalerie du complexe Saidal Biotic.

II. 2.6.1. Informations générales sur les souris utilisées

La souris blanche est la race albinos de la Souris domestique ou Souris grise : *Mus Musculus*, qui fait partie de l'embranchement des vertébrés, la classe des Mammifères, l'ordre des Rongeurs, le sous- ordre des Myomorphes, la famille des muridés et la sous famille des murinés. (Anonyme, 2004).

La souris, *Mus musculus* est, en tant que mammifère, un des modèles animaux les plus proches de l'espèce humaine pour les différentes études (Anonyme, 2009).

II. 2.6.2. Conditions d'élevage

- a. **Alimentation** : Les souris reçoivent une alimentation à base granulée fournie par ONAB qui convient les besoins de leur croissance (**voir figure 15**). La nourriture souillée doit être retirée régulièrement.



Figure 15: Alimentation des souris à base des granules (originale 2016).

- b. **L'eau** : L'eau de robinet est utilisée au niveau de complexe SAIDAL.
- L'eau est remplis dans des biberons verticaux en plastique représentent l'option la plus convenable. Ces biberons sont munis d'un embout en acier inoxydable fixés aux barreaux de la cage de telle sorte que leur embout soit situé entre 2 et 5 cm du sol chez les souris.
- L'eau doit être changée dès qu'elle est souillée avec un minimum de 1 à 2 fois par jour selon la densité animale.
- c. **La température** : 22-24°C.
- d. **L'humidité** : 55%.
- e. **L'éclairage** : éclairage naturel maintenu 12 heures/24heures, la période d'éclairage débute à partir 07 h de matin.
- f. **Logement** : les souris sont hébergées dans des cages en plastique, chacune est marquée d'un numéro de lot qui lui correspond (**voir figure 16**). La litière utilisée est la sciure, renouvelée 2 fois par semaine pour assurer le bon état hygiénique des animaux.



Figure 16: Logements numérotés des souris (originale 2016).

• **Remarque**

L'eau de boisson et la nourriture standardisée sont disposées *ad libitum*.

II. 2.6.3. Evaluation de la toxicité aiguë chez les souris

Les tests de toxicité aiguë (DL50 orale) chez la souris, permet d'estimer la dose létale ainsi que les effets irritants ou sensibilisants d'un produit qui apparaissent dans un temps court entre 1 et 14 jours après l'administration d'une substance (pour notre étude la spiruline est administrée par une dose unique).

Les principaux effets et paramètres recherchés sont :

- Les signes cliniques ;
- Les modifications pathologiques visibles à l'œil nu ;
- La mortalité.

• **Mode opératoire**

Afin de déterminer la DL50 de la spiruline les souris ont subis une acclimatation d'une semaine, suivie d'une expérimentation de 14 jours.

a. Constitution des lots

On a utilisé 30 souris réparties en 5 lots dont chacun contient 6 souris (3 males et 3 femelles séparés) (**voir figure 17**), dont l'un des lots est utilisé comme témoin (recevant de l'eau distillée 0.5 ml) alors que les autres lots ont été traités, chacun, par une dose unique de la spiruline diluée dans l'eau distillée. L'administration a été effectuée par gavage oral aux doses suivantes (0,5; 4; 8 et 15g /Kg de poids corporel) diluées dans (0.5, 0.5, 1 et 2 ml) d'eau distillée respectivement.

Remarque : Les souris sont privées de nourriture 3 à 4 heures avant l'essai et pesés au moment de l'application.



Figure 17: Un lot des souris males (originale 2016).

b. Contention des souris (voir figure 18)

- Il est très important de saisir la souris par la base de la queue et non l'extrémité de celle-ci ;
- Maintenir une traction sur la queue afin que la souris s'agrippe et s'immobilise. ;
- Avec l'autre main, avancer l'index et le pouce de chaque côté de la souris en appuyant vers la surface de travail et bien saisir la peau du cou et du dos ;
- Vous pouvez saisir la queue et la maintenir avec l'auriculaire.

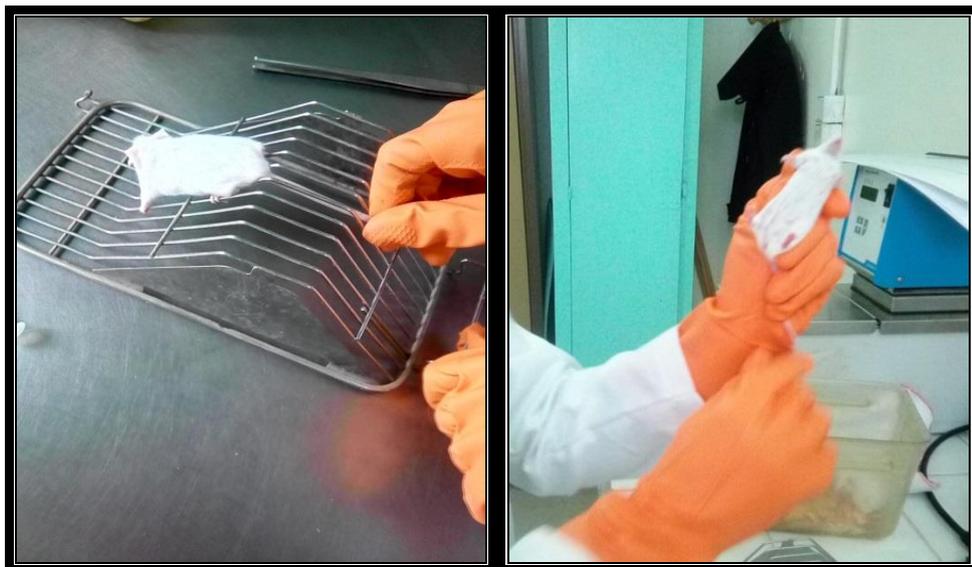


Figure 18: Contention des souris (originale 2016).

c. Gavage des souris (voir figure 19, 20)

Pour cela on a utilisé une sonde gastrique.

- Placer la sonde du côté gauche de la bouche de la souris avec un angle de 45° et l'insérer délicatement en longeant le palais ;
- Redresser la seringue à la verticale en douceur et la descendre sans qu'il y ait de résistance. On ne doit jamais forcer ;
- Administrer le volume et retirer doucement la sonde.



Figure 19 : Gavage des souris témoins par l'eau distillée (originale 2016).



Figure 20: Gavage des souris par la spiruline diluée (originale 2016).

d. Observation

Les souris sont surveillées en permanence dans les premières 24 heures après le traitement, pour toute mortalité ou changement de comportement. Ces signes de la toxicité ont été suivis quotidiennement pendant 14 jours.

Première partie**III. 1. Résultats des analyses physicochimiques****III. 1.1. Résultats des analyses physicochimiques de l'eau de chaudière**

Les résultats des analyses physico-chimiques de l'eau de chaudière sont portés dans le tableau (5).

Tableau 5 : Résultats des analyses physico-chimiques de l'eau de chaudière.

Paramètres Echantillons	TH (°F)	TA (°F)	TAC (°F)	Cl ⁻ (mg/l)	pH
Echantillon 1	0.7	52	87	40	11.52
Echantillon 2	0.5	50	81	50	11.41
Echantillon 3	1.8	86	129	60	11.77
Normes internes	0	Max 80	80 à 120	< 500	11 à 12

A partir des résultats du tableau ci-dessus, nous avons noté que le pH de tous les échantillons varie entre (11.41-11.77) et que le Cl⁻ varie entre (40-60), donc nous pouvons dire que tous ces valeurs sont conformes aux normes imposées par l'unité de Vitajus.

Le pH d'une eau naturelle dépend de l'origine de celle-ci et de la nature des terrains traversés.

Concernant les boissons le pH doit être maîtrisé car un pH supérieur aux normes favorise le développement des micro-organismes et par conséquent l'altération du produit fini.

Le gros inconvénient des chlorures est la saveur désagréable qu'il confère à l'eau de process. Ce qui influence sur la qualité organoleptique de notre jus. En plus, les teneurs élevées en Cl⁻ provoquent des risques de corrosion des canalisations et des réservoirs. (**Rodier et al., 2009**).

Le TH des trois échantillons est supérieur à la norme exigée par l'unité Vitajus, il nécessite donc d'effectuer un adoucissement, lorsque l'eau est trop dure le Mg⁺⁺ et Ca⁺⁺ se déposent dans les canalisations et forment du tartre. (**Fredot, 2006**).

Selon l'OMS (2004) une eau dure n'a pas d'effet nocif sur la santé mais le respect des normes permet d'éviter les problèmes d'entartrage qui peuvent endommager la chaudière (Rodier *et al.*, 2005).

Pour les paramètres TA et TAC, les échantillons 1 et 2 sont conformes aux normes, par contre l'échantillon 3 est en dessus de cela, cette non-conformité ne cause pas un danger, c'est seulement pour protéger la chaudière afin d'éviter les problèmes d'entartrage.

D'une manière générale, on peut dire que l'eau de chaudière est de bonne qualité de point de vue physicochimique.

III. 1.2. Résultats des analyses physicochimiques de l'eau de bêche

Les résultats des analyses physicochimiques de l'eau de bêche sont résumés dans le tableau (6).

Tableau 6 : Résultats des analyses physicochimiques de l'eau de bêche.

Paramètres	TH (°F)	pH
Echantillon 1	0.6	8.75
Echantillon 2	0.5	9.47
Echantillon 3	0.7	8.85
Normes internes	0.5	8.5 à 10

A partir des résultats du tableau ci-dessus, nous observons que le pH de tous les échantillons varie entre (8.75-9.47) ce qui est en conformité avec la norme imposée par l'unité de Vitajus. Cependant le TH de 2^{ème} échantillon est conforme à la norme contrairement au TH de 1^{er} et 3^{ème} échantillon qui est supérieur à la norme.

D'une manière générale, on peut dire que l'eau de bêche est de bonne qualité de point de vue physicochimique.

III. 1.3. Résultats des analyses physicochimiques de l'eau de process

L'eau de process est le constituant principal d'une boisson, sa qualité physicochimique est très importante car elle intervient directement sur la qualité du produit fini.

Les résultats des analyses physicochimiques de l'eau de process sont résumés dans le tableau (7).

Tableau 7 : Résultats des analyses physicochimiques de l'eau de process.

paramètres Echantillon	TH (°F)	Cl ₂ (mg/l)	Cl ⁻ (mg/l)	pH
Echantillon 1	3.2	0	35	7.31
Echantillon 2	2.7	0	28	7.31
Echantillon 3	4.9	0	40	7.32
Normes internes	0 à 5	0	Max 40	7 à 8.5

Les résultats du tableau ci-dessus montrent que :

Le TH des 3 échantillons varie entre (2.7- 4.9) qui est conforme aux normes internes de l'unité Vitajus.

Le Cl₂ de tous les échantillons est nul donc il est conforme à la norme.

Les chlorures sont aussi conformes aux normes, car toutes les valeurs ne dépassent pas 40 mg/l.

Concernant le pH, les 3 valeurs sont presque les mêmes (7.31 et 7.32) et sont en conformité avec la norme de l'unité Vitajus (7 à 8.5).

Cette conformité est due à l'efficacité des traitements effectués sur l'eau et confirme aussi la bonne qualité physicochimique de l'eau de process destinée à la fabrication de jus.

III. 1.4. Résultats des analyses physicochimiques du concentré

Les résultats des analyses physicochimiques du concentré sont portés dans le tableau (8).

Tableau 8 : Résultats des analyses physicochimiques du concentré.

Analyses Echantillons	Concentré	
	Acidité (g/l)	Brix (°Brix)
Echantillon 1	54.6	66
Echantillon 2	64.4	65.8
Echantillon 3	63	65.9
Normes internes	[53.5 – 65.0]	66 ± 0.2

Les résultats des paramètres physicochimiques du concentré des trois échantillons analysés montrent que l'acidité varie entre (54.6 – 64.4) et que le Brix varie entre (65.8 – 66), ces valeurs sont tous conformes aux normes imposées par l'unité de Vitajus qui sont (53.5-65.0) pour l'acidité et (66 ± 0.2) pour le Brix.

Cette conformité est le résultat d'un bon conditionnement du concentré depuis leur pays d'origine. Ainsi, la bonne qualité physicochimique du concentré est garantie.

III. 1.5. Résultats des analyses physicochimiques du produit semi fini

Les résultats des analyses physicochimiques du produit semi fini sont résumés dans le tableau (9).

Tableau 9 : Résultats des analyses physicochimiques du produit semi fini.

Analyses Echantillons	Acidité (g/l)	Brix (°Brix)	Densité	pH
Echantillon 1	9.52	11.2	1.041	3.53
Echantillon 2	9.38	11.5	1.043	3.55
Echantillon 3	9.10	11.1	1.043	3.51
Normes internes	7.1 à 9.6	Min 10.20	1.037 à 1.047	3.40 à 3.70

Les résultats des paramètres physicochimiques du produits semi fini montrent que l'acidité des trois échantillons analysés varie entre (9.10-9.52) et que la densité est presque la même pour tous les échantillons (1.041 à 1.043). Ces valeurs contrôlés répondent parfaitement aux normes imposées par l'unité de Vitajus qui sont (7.1 à 9.6) pour l'acidité et (1.037 à 1.047) pour la densité.

Les valeurs de Brix obtenues varient entre (11.1-11.5) et sont tous conformes à la norme de l'unité car elles doivent être supérieurs à la valeur (10.20).

Le pH des échantillons varie entre (3.51-3.55). Ces valeurs sont conformes à la norme exigée par l'unité Vitajus.

La conformité de tous ces résultats affirme le respect des doses de la recette lors de la préparation des échantillons. Ainsi, le produit peut être pasteurisé et conditionné.

III. 1.6. Résultats des analyses physicochimiques du produit fini

La vérification de la conformité du produit fini du point de vue physicochimique est obligatoire car il est destiné directement à la consommation. Cette vérification permet de s'assurer qu'aucun défaut n'est survenu pendant le conditionnement, à titre d'exemple, le changement du goût, ou encore de la couleur du produit suite à un long passage dans le pasteurisateur.

Les résultats des analyses physicochimiques du produit fini sont résumés dans le tableau (10).

Tableau 10 : Résultats des analyses physicochimiques du produit fini.

Analyses Echantillons	Acidité (g/l)	Brix (°Brix)	Densité	pH
Echantillon 1	9.52	11.1	1.043	3.50
Echantillon 2	9.38	11	1.042	3.52
Echantillon 3	9.24	10.5	1.041	3.45
Normes internes	7.1 à 9.6	Min 10.20	1.037 à 1.047	3.40 à 3.70

Les résultats des paramètres physicochimiques du produit fini montrent que l'acidité des trois échantillons analysés varie entre (9.24-9.52) et que la densité de tous les échantillons est voisine (1.041 à 1.043). Ces valeurs sont tous conformes aux normes imposées par l'unité de Vitajus qui sont (7.1 à 9.6) pour l'acidité et (1.037 à 1.047) pour la densité.

Les valeurs de Brix obtenues varient entre (11.1-11.5) et sont tous conformes à la norme de l'unité Vitajus (Min 10.20).

Le pH des échantillons varie entre (3.45-3.52). Ces valeurs sont conformes à la norme exigée par l'unité vitajus qui est entre (3.40 à 3.70).

D'après ces résultats obtenus on peut dire que cette conformité s'explique par la bonne maîtrise de processus de fabrication. Ces échantillons sont validés pour le stockage ou la livraison.

III. 1.7. Résultats des analyses physicochimiques du produit fini enrichi en spiruline et son test de stabilité

Les résultats des analyses physicochimiques du produit fini enrichi en spiruline et son test de stabilité sont résumés dans le tableau (11).

Tableau 11 : Résultats des analyses physicochimiques du produit fini enrichi en spiruline et son test de stabilité.

		Jours					Normes internes
Formules		J - 0	J - 7	J - 14	J - 21	J - 28	
Acidité	Jus témoin (0 g/l)	9.38	9.38	9.45	9.45	9.52	7.1 à 9.6 (g/l)
	F1 (0.5 g/l)	9.24	9.24	9.38	9.38	9.52	
	F2 (1 g/l)	9.60	9.45	9.38	9.52	9.60	
	F3 (1.5 g/l)	8.82	8.82	8.96	8.96	9.1	
Brix	Jus témoin (0 g/l)	11	11,1	11	10.9	10.9	10 à 20
	F1 (0.5 g/l)	11.1	11.2	10.9	10.8	10.3	
	F2 (1 g/l)	11.2	11.4	11.2	11.1	11.1	
	F3 (1.5 g/l)	10.5	10.6	10.5	10.5	10.4	
pH	Jus témoin (0 g/l)	3.52	3.51	3.49	3.48	3.47	3.40 – 3.70
	F1 (0.5 g/l)	3.57	3.54	3.52	3.50	3.49	
	F2 (1 g/l)	3.55	3.59	3.56	3.50	3.47	
	F3 (1.5 g/l)	3.59	3.61	3.59	3.55	3.52	

F : Formule.

J : Jour.

D'après les résultats obtenues nous remarquons une légère augmentation dans l'acidité de jus témoin et des deux formules 1 et 3 et pour la formule 2 on remarque une légère diminution de l'acidité dans les premiers 14 jours puis une augmentation. Mais cette variation d'acidité est négligeable puisque les résultats obtenus sont conformes aux normes établies par l'unité Vitajus.

Ces augmentations sont expliquées par :

- L'abaissement du pH ;
- L'influence de la température sur l'acide citrique (régulateur de l'acidité).

Les résultats obtenus dans le tableau ci-dessus montrent que le degré Brix de jus témoin et des 3 formules pendant les 28 jours sont conformes aux normes exigées par l'unité Vitajus.

Les trois formules ainsi que le jus témoin présentent un pH qui varie entre (3,47 et 3.59) en moyenne et qui ne dépassent pas les limites critiques exigées par l'unité Vitajus qui sont entre (3.40 et 3.70).

Les résultats des analyses physico-chimiques (Acidité, Brix et pH) confirment la stabilité et la bonne qualité physicochimique du produit fini (témoin) et du produit fini enrichi en spiruline, donc la spiruline n'a pas changé les paramètres physico-chimiques de ce produit.

III. 1.8. Résultats des analyses physicochimiques de peroxyde d'hydrogène

Les résultats des analyses physicochimiques effectués sur le peroxyde d'hydrogène sont montrés dans le tableau (12).

Tableau 12 : Résultats des analyses physicochimiques de peroxyde d'hydrogène.

Les paramètres Echantillons	Densité	Température (°C)	Concentration (%)	Normes TetraPak
Echantillon 1	1.133	58	43%	30% - 50%
Echantillon 2	1.130	54	41.5%	30% - 50%
Echantillon 3	1.145	55	45.5%	30% - 50%

Les résultats obtenus dans le tableau ci-dessus montrent l'efficacité du traitement par peroxyde d'hydrogène qui est dans la norme 30% à 50%.

Ce traitement se fait juste pour préserver la qualité organoleptique et nutritionnelle du produit alimentaire « jus » destiné à l'alimentation humaine dans un emballage aseptique.

III. 2. Résultats des analyses microbiologiques

III. 2.1. Résultats des analyses microbiologiques de l'eau de process

L'eau est un élément très important dans les industries agro-alimentaire, utilisée comme élément pour le lavage, nettoyage, ainsi que pour la reconstitution. Sa qualité microbiologique peut affecter directement sur la qualité microbiologique du produit fini.

Les résultats des analyses microbiologiques effectués sur l'eau de process sont portés dans le tableau (13).

Tableau 13 : Résultats des analyses microbiologiques de l'eau de process.

Analyses Echantillons	Coliformes totaux	Coliformes Thermo- Tolérants	ASR	GAMT		Streptocoques du groupe D
				22°C	37°C	
Echantillon 1	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs
Echantillon 2	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs
Echantillon 3	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs
Normes*	<10/100ml*	Abs/100ml*	<5/20ml	<10 ² /ml*	<20/ml*	Abs/50ml*

* : Le journal officiel de la république algérienne N°35, Mai 1998.

Abs : Absence.

Les résultats microbiologiques de l'eau de process montrent une absence totale des germes pathogènes et non pathogènes ce qui résulte une conformité aux normes de JORA (1998). Cette absence indique l'efficacité du traitement appliqué (la chloration) pour la destruction des germes présents dans l'eau, et le temps de contact satisfaisant pour la destruction des germes présent dans l'eau. (Potelon et zysman, 1998).

III. 2.2. Résultats des analyses microbiologiques du Concentré

Les résultats des analyses microbiologiques du concentré sont montrés dans le tableau (14).

Tableau 14 : Résultats des analyses microbiologiques de Concentré.

Analyses Echantillons	Coliformes totaux	Coliformes Thermo- Tolérants	ASR	Levures	moisissures	GAMT à 30°C	staphylocoques aureus
Echantillon 1	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs
Echantillon 2	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs
Echantillon 3	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs
Normes *	Abs*	Abs*	Abs	< 20/ 1 litre*	10/100ml*	Abs	Abs

* :Le journal officiel de la république algérienne N°35, Mai 1998.

Abs : Absence.

Les résultats des analyses microbiologiques du concentré montrent l'absence totale des germes recherchés, qui indique sa bonne qualité microbiologique et qui confirme le respect des bonnes pratiques de fabrication lors de sa préparation, ainsi par l'acidité du milieu qui constitue un paramètre limitant pour le développement de la majorité des bactéries.

III. 2.3. Résultats des analyses microbiologiques de produit fini

Ces analyses sont exécutées sur le produit destiné à la consommation.

Les résultats des analyses microbiologiques de produit fini sont résumés dans le tableau (15).

Tableau 15 : Résultats des analyses microbiologiques de produit fini.

Analyses Echantillons	Coliformes totaux	Coliformes Thermo- Tolérants	ASR	Levures	moisissures
Echantillon 1	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs
Echantillon 2	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs
Echantillon 3	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs
Normes*	Abs*	Abs*	Abs	<20/1 Litre*	10/100ml*

* : Le journal officiel de la république algérienne N°35, Mai 1998.

Abs : Absence.

Ces résultats indiquent une absence totale de toute catégories de germes ce qui est en concordance avec les normes de JORA, et qui confirment l'efficacité du traitement thermique et la maîtrise des risques microbiologiques de la matière première jusqu'au produit fini (Bourgeois et Larpent, 1996).

Ainsi la bonne qualité microbiologique du produit fini est atteinte par le respect des trois règles fondamentales suivantes :

- Eviter les apports de micro-organismes ;
- Limiter la multiplication des micro-organismes ;
- Assainir en détruisant les micro-organismes (dont les spores) et les toxines.

III. 2.4. Résultats des analyses microbiologiques de produit fini enrichi en spiruline et son test de stabilité

Les résultats des analyses microbiologiques de produit fini enrichi en spiruline et son test de stabilité sont montrés dans le tableau (16).

Tableau 16 : Résultats des analyses microbiologiques de produit fini enrichi en spiruline et son test de stabilité.

Analyses Formules		Coliformes	Coliformes	ASR	Levures	moisissures
		totaux	Thermo-Tolérants			
Formule 1	J-0	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs
	J-28	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs
Formule 2	J-0	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs
	J-28	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs
Formule 3	J-0	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs
	J-28	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs
Normes*		Abs*	Abs*	Abs	<20/1 Litre*	10/100ml*

* : Le journal officiel de la république algérienne N°35, Mai 1998.

Abs : Absence.

J : Jour.

Les résultats représentés dans le tableau 16 montrent une absence totale de toute catégories de germes pendant 28 jours ce qui affirme que ce jus enrichi en spiruline est de bonne qualité microbiologique et que la spiruline n'a pas contaminée ce dernier.

III. 3. Résultats des analyses sensorielles

Les paramètres étudiés lors de notre analyse sensorielle sont : La couleur, l'odeur et le goût.

Les résultats sont montrés dans le tableau (17), dont les dégustateurs ont attribué une note allant de un (1) pour la formule la plus acceptable à trois (3) pour la moins acceptable sans admettre d'égalités.

Tableau 17 : Classement des formules selon les trois critères (Couleur, odeur et goût).

Critères Formules Sujets	Couleur			Odeur			Goût		
	F1 (0.5 g/l)	F2 (1 g/l)	F3 (1.5 g/l)	F1 (0.5 g/l)	F2 (1 g/l)	F3 (1.5 g/l)	F1 (0.5 g/l)	F2 (1 g/l)	F3 (1.5 g/l)
1	1	2	3	1	2	3	1	2	3
2	1	2	3	2	1	3	2	1	3
3	2	1	3	2	1	3	1	2	3
4	1	2	3	1	2	3	1	2	3
5	3	2	1	3	2	1	3	2	1
6	1	2	3	1	2	3	1	2	3
7	2	1	3	1	2	3	2	1	3
8	3	1	2	2	1	3	3	2	1
9	1	2	3	1	2	3	1	2	3
10	1	2	3	1	3	2	1	3	2
11	1	2	3	1	2	3	1	2	3
12	2	1	3	2	1	3	2	1	3
13	3	2	1	1	2	3	1	2	3
14	1	2	3	1	2	3	1	2	3
15	1	2	3	1	2	3	1	2	3
16	2	1	3	2	1	3	1	2	3
17	2	1	3	1	2	3	1	3	2
18	1	2	3	3	1	2	2	1	3
19	1	2	3	1	2	3	1	2	3
20	1	2	3	1	2	3	2	1	3

F : Formule

III. 3.1. Couleur

Les résultats de pourcentage de classement des trois formules relatifs au critère couleur sont portés dans la figure (21).

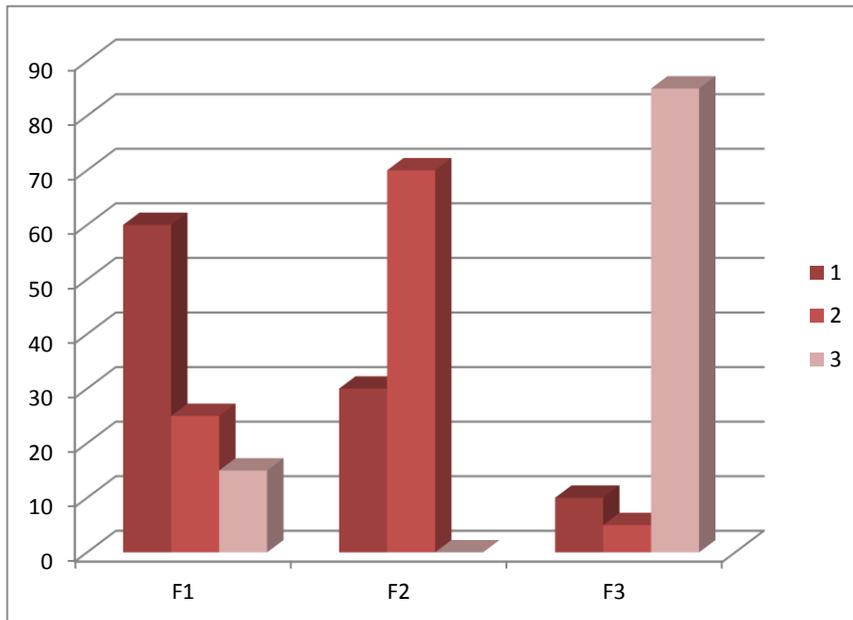


Figure 21 : classement des trois formules relatif au critère couleur.

La formule 1 est de couleur jaune verdâtre qui est préférée par la majorité des dégustateurs (60%) et ils trouvent qu'elle est acceptable pour une boisson. Mais par contre la majorité de ces dégustateurs n'ont pas aimés la couleur de la troisième formule dont 85% l'ont classé en 3ème classe.

III. 3.2. Odeur

Les résultats de pourcentage de classement des trois formules relatifs au critère odeur sont portés dans la figure (22).

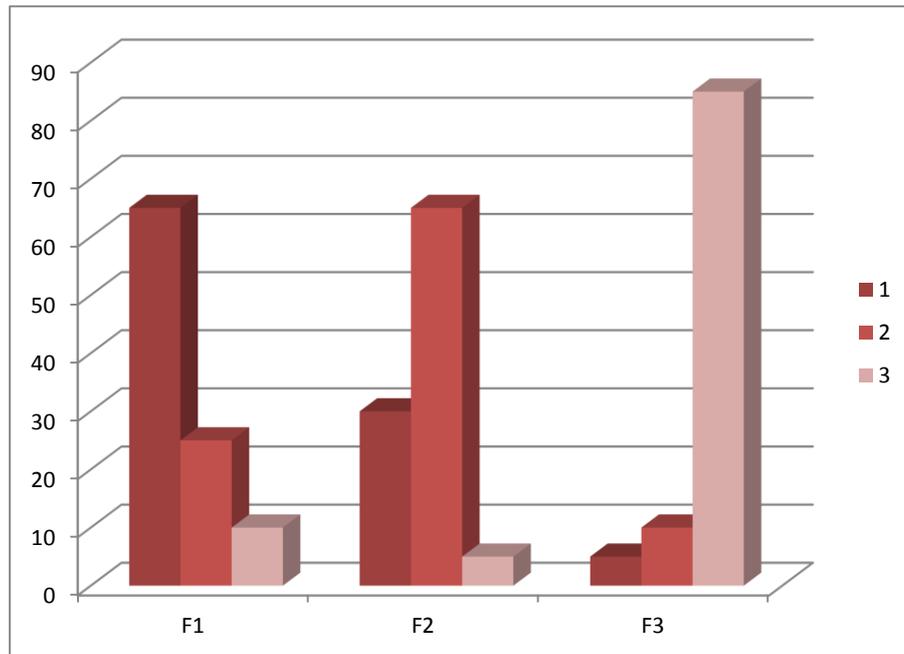


Figure 22 : classement des trois formules relatif au critère odeur.

A chaque fois qu'on augmente la dose de la spiruline son odeur caractéristique augmente.

Les résultats de dégustation montrent que les trois formules présentent une bonne odeur, mais la majorité des dégustateurs (65%) ont préféré la formule 1 que les deux autres formules.

III. 3.3. Goût

Les résultats de pourcentage de classement des trois formules relatifs au critère goût sont portés dans la figure (23).

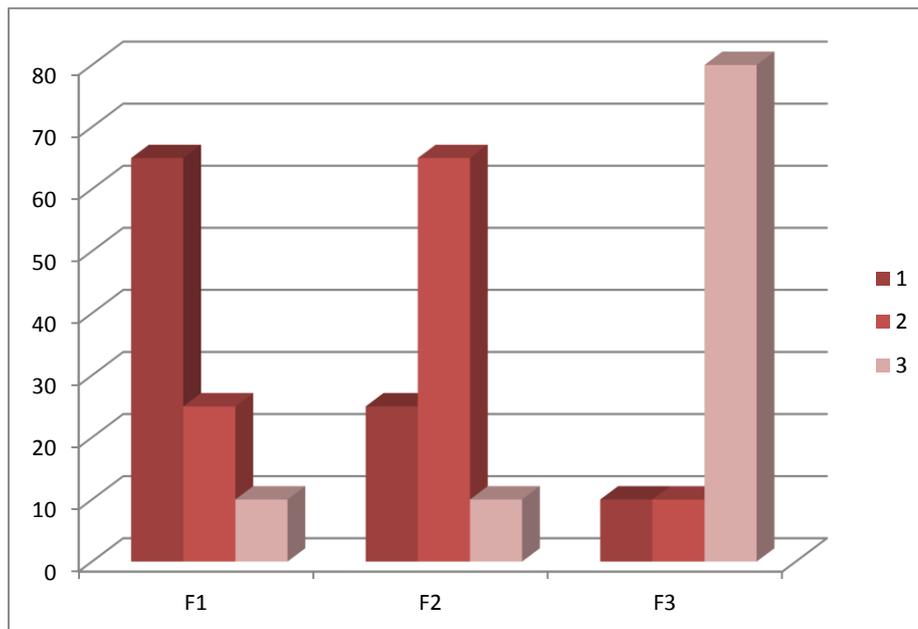


Figure 23 : classement des trois formules relatif au critère goût.

Les résultats de la dégustation montrent que la majorité des dégustateurs (65%) ont préféré le goût de la formule 1 que les deux autres formules.

Les résultats obtenus pour l'ensemble des analyses sensorielles montrent que la première formule 0.5g/l de la spiruline est la meilleure formule d'après les dégustateurs.

La saveur forte de la spiruline est hélas parfois difficilement acceptée par certains consommateurs (Anonyme, 2012).

III.3.4. Résultats des analyses sensorielles de test de stabilité de produit fini enrichi en spiruline

Les résultats des analyses sensorielles de produit fini enrichi en spiruline après 4 semaines sont montrés dans le tableau (21).

Tableau 18 : Résultats des analyses sensorielles de produit fini enrichi en spiruline après 4 semaines.

Critères sujets	Formule 1			Formule 2			Formule3		
	Couleur	Odeur	Gout	Couleur	Odeur	Gout	Couleur	Odeur	Gout
1	RAS	RAS	RAS	RAS	RAS	RAS	RAS	RAS	RAS
2	RAS	RAS	RAS	RAS	RAS	RAS	RAS	RAS	RAS
3	RAS	RAS	RAS	RAS	RAS	RAS	RAS	RAS	RAS

RAS : Rien à signaler.

Les résultats de tableau ci-dessus montrent que les trois formules sont restés stables et qu'aucun changement de couleur ni d'odeur ou de goût n'a été survenue. Ce qui affirme qu'elles sont de bonne qualité organoleptique.

En comparant nos résultats avec une autre étude qui a été faite sur un jus de raisin enrichi en spiruline, un test de dégustation a permis de conclure qu'un jus enrichi en 0.5g/l de spiruline est jugé le plus apprécié par rapport aux autres jus dont les concentrations sont (0.1 ; 0.3 et 0.7 g/l), ainsi qu'après 4 semaines, le teste de dégustation n'a révélé aucun changement au niveau de la qualité sensorielle (Bon gout, bonne odeur avec une excellente couleur caractéristique au jus de raisin) (Anonyme, 2014).

Deuxième partie

III. 4. Résultats de l'étude toxicologique

❖ Test de toxicité aigue

Les signes cliniques et de mortalité apparus chez les souris de chaque lot ont été suivis continuellement pendant une heure après l'administration orale de la spiruline.

Cette observation a été étendue le long de la durée d'étude de la toxicité aiguë (14 jours), pour déceler les effets retardés de la spiruline.

Les résultats sont résumés dans le tableau suivant :

Tableau 19: L'effet toxique de la spiruline sur le comportement des animaux et le taux de mortalité.

Lot N° : dose (g/Kg)	Sexe	Mort	Comportement
Lot 1 : 0 (témoin)	Male	0/3	Normal
	Femelle	0/3	Normal
Lot 2 : 0.5	Male	0/3	Normal
	Femelle	0/3	Normal
Lot 3 : 4	Male	0/3	Normal
	Femelle	0/3	Normal
Lot4 : 8	Male	0/3	Normal
	Femelle	0/3	Normal
Lot 5 : 15	Male	0/3	Normal
	Femelle	0/3	Normal

Le lot témoin (0g/kg), contenant les souris gavées par l'eau distillée, n'a montré aucun signe de toxicité immédiat ou de mortalité.

Aucun comportement anormal ni décès n'a été constaté chez les souris traités par voie orale quel que soit la dose administrée de la spiruline, ce qui n'a pas permis la détermination de la DL 50. Donc la DL 50 par voie orale de la spiruline pour les souris est supérieure à 15000 mg/Kg de P.C.

Par rapport à notre étude, les études précédentes sur la toxicité aiguë de l'ensemble d'*Arthrospira platensis* ont révélé que :

- la forme sèche de cette microalgue jusqu'à 3,5 g /kg de P.C, 800 mg/kg de P.C, et 10 g /kg de P.C est non toxique pour les oiseaux domestiques (Krishnakumari et Venkataraman 1981 cités par Krishnakumari *et al.*, 1981) , les rats (Krishnakumari *et al.*, 1981) , et les souris (Hutadilok- Towatana *et al.*, 2008), respectivement.
- L'extrait aqueux au méthanol de *A.platensis* à 6 g/Kg de P.C n'est pas toxique pour les souris (Hutadilok- Towatana *et al.*, 2009).

En comparant nos résultats avec l'échelle de toxicité de Hodge et Sterner (voir tableau 3) on confirme que la spiruline n'est pas toxique.

Conclusion

D'après les résultats obtenus dans notre étude, on peut souligner les principales conclusions suivantes :

Les analyses physico-chimiques effectuées sur les matières premières (l'eau et concentré), le produit fini et produit fini enrichi en spiruline sont conformes aux normes exigées par l'unité de Vitajus et que l'ajout de la spiruline n'a pas d'effets sur les paramètres physico-chimiques.

A noter aussi que les résultats des analyses microbiologiques effectuées sur les matières premières (l'eau de process et concentré), le produit fini et produit fini enrichi en spiruline montrent que ces derniers présentent une bonne qualité microbiologique marquée par une absence totale des germes recherchés, ce qui est en conformité avec les normes de JORA (1998) et que la spiruline n'a pas contaminé notre produit.

D'après les résultats de test de dégustations des trois formules enrichi en spiruline on peut conclure que la formule 1 (0.5 g/l) est la plus acceptable par rapport aux deux autres formules qui sont moins acceptables (1 et 1.5 g/l).

Le teste de stabilité réalisé consiste à étudier l'évolution physico-chimique, microbiologique et organoleptique d'un pur jus 100% orange enrichi en spiruline au cours du temps pour estimer une date limite d'utilisation optimale, nous avons remarqué que ce jus est resté stable au cours des 4 semaines à une température ambiante de 22°C.

Le test de toxicité aigüe de la spiruline effectué sur les souris n'a pas permet la détermination de la DL50 qui est supérieure à 15000 mg/Kg de P.C ce qui confirme que la spiruline n'est pas toxique selon l'échelle de Hodge et Sterner (1943).

Compte tenu les résultats obtenus, notre travail reste préliminaire, donc nous proposons comme recommandations et perspectives :

- Elaborer de nouveaux produits avec l'introduction de la spiruline dans des produits alimentaires comme les yaourts, les fromages, les compotes, les biscuits et les pâtes.
- Faire une étude économique sur le cout de ces produits.
- Sensibiliser et encourager les agriculteurs à cultiver la spiruline.
- Faire des études de toxicité subaigüe et chronique sur les effets de la spiruline.

Références bibliographiques

- **Afnor, (1986).** Association Française de Normalisation. produits dérivés des fruits 2èmes Edition. AFNOR Tour Europe pp 81-85.
- **Anonyme, (2004).** **Gersende-Morgane, Stéphanie DOUMERC**, thèse pour le doctorat vétérinaire, Elevage et reproduction des rongeurs myomorphes domestiques en France. pp 265.
- **Anonyme, (2009).** **Virginie Moers**, Thèse pour l'obtention du grade de Docteur en Sciences, Contribution à l'étude de la fonction des facteurs BTBD6 et DMRT5 au cours du développement embryonnaire. Bruxelles pp 132.
- **Anonyme, (2012).** **Benahmed Djilali Adiba**. Thèse de doctorat, Analyse des aptitudes technologiques de poudre de dattes (phoenix-dactylofera.l) améliorées par la spiruline. Etude des propriétés rhéologique nutritionnelles et antibactériennes, pp118.
- **Anonyme, (2014).** **Fedad Redouane et Abdi Mohamed Amine**. Etude comparative entre deux boissons l'une enrichi par la spiruline et le suivi de sa stabilité. pp74.
- **Belay A., (1997).** Mass culture of *Spirulina platensis* - The Earth rise farms Experience In "Spirulina platensis (Arthrospira)" Ed. AvigadVonshak, Taylor & Francis, Londre, pp 131-158.
- **Belay A., (2007).** *Spirulina* (Arthrospira): production and quality assurance in *Spirulina*. In Gershuin ME et Belay A. Human Nutrition and Health. CRC Press pp328.
- **Benamara A et Agougou E., (2003).** production des jus alimentaire. Technologie des industries agro-alimentaires édition office des publications universitaire (OPU). Alger, pp 170.
- **Berlinet C., (2006).** Etude de l'influence de l'emballage et de la matrice sur la qualité du jus d'orange. Life Sciences. ENSIA (Agro Paris Tech).pp 227.
- **Borchers At., Belay A., Keen Cl., Gershwin Me., (2007).** *Spirulina* and Immunity In Gershwin & Belay (ed.) *Spirulina* in Human Nutrition and Health, pp177-193.
- **Bourgeois C.M., Larpent J.P. (1996).** Microbiologie alimentaire. volIII Aliments fermentés et fermentation alimentaire. (Ed).Lavoisier. Paris, pp 523.
- **Bruno De Reviere., (2003).** Biologie et phylogénie des algues, Volume 2, Belin, pp255.
- **Chamorro-Cevallos-G., (1980).** "Toxicologie Research on the Alga *Spirulina*". United Nations Organisation for Industrial Development, 24 Oct. 1980. Vienna pp177.
- **Chamorro, G., Salazar, M., Favila, L., and Bourges, H., (1996).** Farmacología y toxicología del alga *Spirulina*. RevInvest Clin. 48, pp389-399.
- **Charpy L., Jose Langlande M et Alliod R., (2008).** la spiruline peut-elle être un atout pour la santé et le développement en Afrique ? Vol 6, N°17. pp 16, 27.

Références bibliographiques

- **Chen X., Li D., (1999).** Food powder technology. Journal Food Eng Vol 94, pp 129.
- **Ciferri O., (1983).** Spirulina, the edible microorganism microbial, Rev 47: pp 551-578.
- **Clement G., (1975).** Production et constituants caractéristiques des algues Spirulina platensis et S.maxima Ann. Nutr. aliment N29, pp477-487.
- **Cruchot H., (2008).** La Spiruline, Bilan et Perspective. Thèse docteur en pharmacie. Université de France-Comite, pp 332.
- **Décret n° 2006/352 du 20 mars 2006,** publié au Journal Officiel du 25 mars 2006. In Charpy L., José Langlade M, Alliod R., 2008. La spiruline peut-elle être un atout pour la santé et le développement en Afrique ? Vol 6, N°17, pp31-41.
- **Delarras C., (2007).** Microbiologie pratique pour la laboratoire d'analyses, Tech et Doc, pp 476.
- **Derach., (1986).** Toxicologie et sécurité des aliments. Technique et documentation-Lavoisier, Aparia, Paris, pp 105-126, pp 299-321.
- **FAO/OMS, 1992 FAO/OMS. (1992). Codex Alimentarius. Vol 6. Jus de Fruits et Produits Dérivés.** Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture. Organisation Mondiale de la Santé. Codex Stan.45-1981, p: 3-5.
- **USFDA.1993 USFDA. (1993). Code of Federal Regulations. Title 21, part 146. 140.** United States Food and Drug Administration. p: 443-449. Washington, D.C
- **Farrar W-V., (1966).** Techuitlatl, A Glimpse of Aztec Food Technology. Nature, 211, pp341- 342.
- **Flaquet J. et Hurni J., (2006).** Spiruline : Aspects nutritionnels. Antenna technologies, pp41.
- **Fox R. D., (1999).** La spiruline: technique, pratique et promesse, EDISUD, aix de provence, pp 246.
- **Francis Lightfoot N., Maier E.A., (2002).** Analyses microbiologiques des aliments et de l'eau : Guide pour l'assurance qualité. Editions Contemporary Publishing International-GB Science Publisher, pp186.
- **Fredot E., (2006).** Connaissance des aliments-Bases alimentaires et nutritionnelles de la diététique, Tec et Doc, Lavoisier: 25 (397 pages).
- **Giraldine-Andreani C., (2005).** Spiruline, système sanguine, système immunitaire et cancer. Phytothérapie, pp 158-161.
- **Hayashi T., Hayashi K., Maeda M., Kojima I., (1996).** Calcium spirulan, an inhibitor of enveloped virus replication, from a blue-green alga Spirulina platensis. Journal of Natural Products 59, pp 83-87.

Références bibliographiques

- **Hodge H.C., Sterner J.H., (1943).** Determination of substances acute toxicity by LDB50B. Amer. IndustrialHyg. Assoc. 10: 93.
- **Hudson B.J.F., Karis I.G., (1974).** The lipids of the alga Spirulina. J. Sci. Food Agric 25, pp 759-763.
- **Hug C et Von Der Wied D., (2011).** La spiruline dans la lutte contre la malnutrition, Bilan et perspectives. Antenna Technologies, Genève, pp 30.
- **Hutadilok-Towatana N., Reanmongkol W., Panichayupakaranant P., Ritthisunthorn P., (2010).** Evaluation of the toxicity of Arthrospira (Spirulina) platensis extract. 22, pp 599–605.
- **Hutadilok-Towatana N., Reanmongkol W., Satitit S., Panichayupakaranant P., Ritthisunthorn P., (2008).** A subchronic toxicity study of Spirulina platensis. Food Sci Technol Res 14, pp 351–358.
- **ISO 6887-1 (1999).** Microbiologie des aliments - Préparation des échantillons, de la suspension mère et des dilutions décimales en vue de l'examen microbiologique - Partie 1: Règles générales pour la préparation de la suspension mère et des dilutions décimales.
- **Jaouen P., Lépine B., Rossignol N., (1999).** Clarification and concentration with membrane technology Technique Vol 13, pp 877-881.
- **Jean –Paul J., (2006).** Manuel de culture artisanale pour la production de spiruline pp 06.
- **JORA : Le journal officiel de la république algérienne N°35, Mai 1998.** pp 17-18.
- **Jordan J.P., (1999).** Cultivez votre spiruline : manuel de culture artisanal. Publication Antenna Technologies., Genève, Suisse, pp 129.
- **Kiet P.Q., Dubacq J.P., Demandre C., Mazliak P., (1994).** Comparative effects of exogenous fatty acid supplementations on the lipids from the cyanobacterium Spirulina platensis. Plant Physiology and Biochemistry 32, pp501-509.
- **Kiet P.Q., Durand-Chastel H., (2006).** Spirulina rich in AIDS-Antiviral Sulfo lipids. In Charpy et al. (ed.) International Symposium on Cyanobacteria for Health, Science and Development, pp111-117.
- **Krishnakumari M.K., Ramesh H.P., Venkataraman L.V., (1981).** Food safety evaluation: acute oral and dermal effects of the algae Scene desmusacutus and Spirulina platensis on albino rats. J Food Prot 44, pp 934-935.
- **Lapointe G., (2004).** Notions de Toxicologie. 2nd ed. Commission de la santé et de la sécurité du travail (Québec, Canada), pp 16-20.
- **Lauwerys R., (1999).** Toxicologie industrielle et intoxications professionnelles, Masson, Paris , pp 1-969.

Références bibliographiques

- **Leblanc G.A., (2010).** Acute toxicity. In: A Textbook of Modern Toxicology. 4th ed. John Wiley & Sons. Inc (Hoboken, New Jersey), pp 125-236.
- Lecerf J.M., Ragot B., (2006). Mieux nourrir mon enfant: Concilier plaisir, éducation et santé. Editions de l'Atelier, pp 253-254.
- **LI B., GAO MH., ZHANG XC., CHU XM., (2006).** Molecular immune mechanism of C-phycoyanin from *Spirulina platensis* induces apoptosis in HeLa cells in vitro. *Biotechnology And Applied Biochemistry* 43(3), pp 155-164.
- **Liang A.C., Chen L.I.H., (2001).** Fast-dissolving intraoral drug delivery systems : areview. *Expert. Opin. Ther. Patents.* Vol 11, pp 981-986.
- **Norme Codex Alimentarius, (2005).** Norme générale Codex pour les jus et les nectars des fruits. *Codex Stan 247*, pp 1-19.
- **Norme NF EN ISO 6222.** (juillet 1999) Qualité de l'eau – Dénombrement des micro-organismes revivifiables – Comptage des colonies par ensemencement dans un milieu de culture nutritif gélosé (Indice de classement : T90-401).
- **Norme NF T 90-411. (Octobre 1989)** Essais des eaux – Recherche et dénombrement des Streptocoques du groupe D. Méthode générale par ensemencement en milieu liquide (NPP) pp 726-735.
- **Norme NF T 90-415.** (octobre 1985) Essais des eaux – Recherche et dénombrement des spores de bactéries anaérobies sulfito-réductrices et de *Clostridium sulfito-réducteurs* – Méthode générale par incorporation en gélose en tubes profonds (In dice de classement : T90-415).
- **Norme NF T90-413.** (octobre 1985) Essais des eaux – Recherche et dénombrement des coliformes et des coliformes thermotolérants – Méthode générale par ensemencement en milieu liquide (NPP) (Indice de classement : T90-413).
- **Norme NF V 08-050.** (avril 2009) Microbiologie des aliments – Dénombrement des coliformes présumés par comptage des colonies obtenues à 30 °C (Indice de classement : V08-050).
- **Norme XP V 08-059.** (novembre 2002) Microbiologie des aliments – Dénombrement des levures et moisissures par comptage des colonies à 25 °C – Méthode de routine (Indice de classement : V08-059).
- **Norme NF V 08-060** (avril 2009) Microbiologie des aliments – Dénombrement des coliformes thermotolérants par comptage des colonies obtenues à 44 °C (Indice de classement : V08-060).

Références bibliographiques

- **Norme XP V 08-061.** (décembre 2009) Microbiologie des aliments – Dénombrement en anaérobiose des bactéries sulfito-réductrices par comptage des colonies à 46°C.(Indice de classement : V08-061).
- **Norme NF V08-057-2.** (Novembre 1994), Microbiologie alimentaire -Méthode de routine pour le dénombrement des staphylocoques à coagulase positive par comptage des colonies à 37 degrés Celsius. Partie 2 : technique sans confirmation des colonies. Indice de classement : V08-057).
- **Norme Tetra pak.** OM-BO248-0404 TBA/3 600V.
- **Ould Bellahcen T., Bouchabchoub A., Massoui M., El Yachioui M., (2013).** Qualité nutritionnelle de spirulina platensis en croissance dans les eaux usées domestiques. Larhyss Journal, ISSN 1112-3680, n°14, Juin 2013, Rabat, Maroc, pp. 123-129.
- **PASCAUD M., (1993)** - The essential polyunsaturated fatty acids of Spirulina and our immune response. Bulletin de l'Institut Océanographique 12 : pp 49-57.
- **Perez R., (1997).** Ces algues qui nous entourent : conception actuelle, rôle dans la biosphère, utilisations, culture. Editions IFREMER, pp 16-23.
- **Pietri A.M., (2011).** L'aliment le plus complet de la planète: L'algue bleu-vert A.F.A. Editions LANORE. Paris, pp 73.
- **Potelon J.L., Zysman K., (1998).** Le guide des analyses de l'eau potable, Edition, La Lettre du Cadre Territorial, Voiron, France, pp 253.
- **Qureshi M.A., Garlich J.D., Kidd M.T., (1996).** Dietary Spirulina platensis enhances humoral and cell-mediated immune functions in chickens. Immunopharmacology and Immunotoxicology 18, pp 465-476.
- **Rodier J., Bazin C., Broutin J. P., Champsaur H. et Rodi L., (2005).** L'analyse de l'eau. Eaux naturelles. Eaux résiduaires. Eau de mer. 8ème Ed. DUNOD. Paris, 1383 p.
- **Rodier J., Legube B., Merlet N., Brunet R., (2009).** L'analyse de l'eau. Eaux naturelles, eaux résiduaires, eau de mer.9e éd. DUNOD. Paris, pp 1600.
- **Roudaut H., Et Lefranq E., (2005).** Alimentation théorique, Edition Doin ScérÉn-CRDP d'aquitaine, pp 303.
- **Sall M., Dankoko B., Badiane M., Ehua E., Kuakuwi N. (1999).** La spiruline: une source alimentaire à promouvoir. Médecine d'Afrique Noire. Vol 46, pp 3.
- **Sguera S., (2008).** Spirulina platensis et ses constituants intérêts nutritionnels et activités thérapeutiques.
- **Sironval C., (1993).** La spiruline, une arme contre la malnutrition, histoire et perspectives. Bulletin de l'institut océanographique, Monaco, 12, pp 203-222.

Références bibliographiques

- **Tardet H.M., Beaudry J.P., (1995).** Chimie des eaux 4^{ème} trimestre, édition de Griffon d'argile. P175.
- **Trabelsi. L, Benouadah., Bassa.H., (2010).** activités biologiques des métabolites excrètent par les cyanobactéries filamenteuse arthrospira platensis, journal pharmacognosie. Tunisie. pp 282.
- **Vicnete, N., (2008).** Spiruline et développement in international symposium spirulina and development, pp 07.
- **Vierling, (2008).** Aliments et boissons technologies et aspects réglementaires. Doin éditeur, centre régional de documentation, 3^e édition, Paris, pp 44.
- **Wallace Hayes, A., (2008).** Principle and methods of toxicology. Ed Tayler & Francis, New York, pp 1134.
- **Xu C.W., (1993).** An instant algal noodle and its production method, Chinese Patent CN1077857A. Technol. Vol 3, N°2, pp 79–88.
- **Xue CH., Hu YQ., Saito H., Zhang ZH., Li ZJ., Cai YP., Ou CR., Lin H., Imbs AB., (2002).** Molecular species composition of glycolipids from Spirulina platensis. Food Chemistry 77, pp 9-13.
- **Yamaguchi K., (1997).** Recent advances in microalgal bio-science in Japan,with special refrence to utilization of biomass and metabolites : are view, Journal. Appl. Phycol. Vol 8 N°6, pp 487-502.
- **Yamamoto C., Nakamura A., Shimada S., Kaji T., Lee JB., Hayashi T., (2003).** Differential effects of sodium spirulan on the secretion of fibrinolytic proteins from vascular endothelial cells: Enhancement of plasminogen activator activity. Journal of Health Science 49, pp 405-409.
- **Zeng Z., Liang M.S., (1995).** Production of Spirulina drink (in Chinese). Food Sci. Vol 16 N°7, pp 39-412.

Annexe I

Verrerie et appareillage :

- Aéromètre.
- Autoclave.
- Agitateur.
- Bain marie.
- Balance analytique électronique.
- Bec bunsen.
- Béchers.
- Boîtes de pétri.
- Burette.
- Ciseau.
- Cloche de durham.
- Comparateur.
- Densimètre.
- Eprouvettes graduées.
- Etuve à incubation.
- Fiole conique (Erlen Meyer).
- Fioles jaugées.
- Flacons stériles.
- Mortier
- pH-mètre.
- Pince.
- Pipettes graduées.
- Pipettes Pasteur.
- Portoirs
- pro pipette.
- Réfractomètre.
- Réfrigérateur.
- Seringues.
- Sonde gastrique.
- Spatule.
- Thermomètre.
- Tubes à essais.

Annexe II

Milieux de culture et diluants :

➤ **Bouillon lactosé au vert brillant « BLBVBL ou VBL » :**

Composition (g/l) :

- Peptone 10
- Lactose 10
- Bile de bœuf déshydraté 20
- Vert brillant 0,0133
- Eau 1000 ml
- pH final 7.3 ± 0.2
- Autoclaver à 121°C pendant 15 minutes.

➤ **Bouillon lactosé à pourpre de bromocrésol « BCPL » double et simple concentration :**

Composition (g/l) :

	BCPL (S/C)	BCPL (D/C)
--	-------------------	-------------------

➤ **Eau peptonée exempte d'indole « EPEI » :**

Composition (g/l) :

- Peptone tryptique de caséine 10
- NaCl 5
- Eau permutée 1000 ml
- pH final: 7,2 ; autoclave à 120°C pendant 20 minutes

➤ **Gélose viande foie additif alun de fer et sulfite de sodium (en ampoules)**

« VF » :

Composition (g) :

- Extrait viande-foie 30
- Glucose 2
- Amidon 2

- Agar 12
- L'eau 1000ml
- pH final 7,6 à 7,8.

➤ **Milieu de Rothe double et simple concentration :**

Composition (g/l):

	Rothe (S/C)	Rothe (D/C)
• Hydrolysats tryptique de caséine	12,6	25,2
• Peptone bactériologique	8,0	16,0
• Chlorure de sodium	05	10
• Phosphate dipotassique	2,7	5,4
• Phosphate mono potassique	2,7	5,4
• Azide de sodium	0,2	0,4
• pH final 6.8 ±0.2		
• Autoclaver à 121°C pendant 15 minutes.		

➤ **Milieu de Schubert :**

Composition (g/l) :

• Tryptophane	0,2
• Acide glutamique	0,2
• Sulfate de magnésium	0,7
• Citrate de sodium	0.5
• Sulfate d'ammonium	0,4
• Chlorure de sodium	2,0
• Peptone	10
• Mannitol	7,5
• Phosphate disodique	4,0
• Phosphate mono potassique	0,6
• pH final 7.4 ± 0.2	
• Autoclaver à 115°C pendant 10 min.	

➤ **Milieu Eva Litsky :**

Composition (g/l) :

• Peptone	20
• Glucose	05
• Chlorure de sodium	05
• Phosphate dipotassique	2,7
• Phosphate mono potassique	2,7
• Azohydrate de sodium	0,3
• Ethyl-violet	0,0005

- pH final 6.8 ± 0.2
- Autoclaver à 115°C pendant 20 minutes.

➤ **Tryptone sel eau « TSE » :**

Composition (g/L)

- Tryptone 0,1
- Na Cl (chlorure de sodium) 8,5
- pH final 7.3
- Autoclaver à 120°C pendant 15 minutes

➤ **Oxytétracycline gélose agar « OGA » :**

Composition (g/l) :

- Extrait de levure 5
- Agar 5
- Glucose 10
- pH final 6,3

➤ **Milieu Giolliti Cantoni « GC » :**

Pour 1 litre de milieu de base :

- Tryptone 10,0 g
- Extrait de viande 5,0 g
- Extrait de levure 5,0 g
- Glycine 1,2 g
- Mannitol 20,0 g
- Pyruvate de sodium 3,0 g
- Chlorure de sodium 5,0 g
- Chlorure de lithium 5,0 g

➤ **Gélose tryptone glucose à extrait de levure agar « TGEA » :**

Composition (g/l) :

- Lactalbumine hydrolysée 10
- Extrait de viande 5
- Extrait de levure 3
- Peptone de caséine 10
- Glucose 2
- Rouge de phénol 0,08
- Agar 18

➤ **Plate count Agar(PCA) :**

Composition (g/l) :

- Tryptone 5
- Extrait de levure 2.5
- Glucose. 4
- Agar 9

➤ **Gélose Chapman :**

Composition (g/l) :

- Extrait de viande 1
- Peptone 10
- Chlorure de sodium 5
- Mannitol 10
- Rouge de phénol 25
- Agar-agar 15

➤ **Gélose Sabouraud :**

Composition (g/l) :

- Peptone 10
- Glucose massé 20
- Agar-agar 15
- pH = 6,0

Annexe III

Réactifs et solutions :

- Acide sulfurique.
- Alcool.
- Alun de fer.
- Chromate de potassium.
- diethyl-p-phénylène diamine.
- Eau de JAVEL.
- Ethyle diamine tétra acétique.
- Hydroxyde de sodium.
- Méthyle orange.
- Nitrate d'argent.
- Noir d'ériochrome.
- Phénolphtaléine.
- Réactif de Kovacs.
- Sulfite de sodium.
- Téliurite de potassium.

Annexe IV :

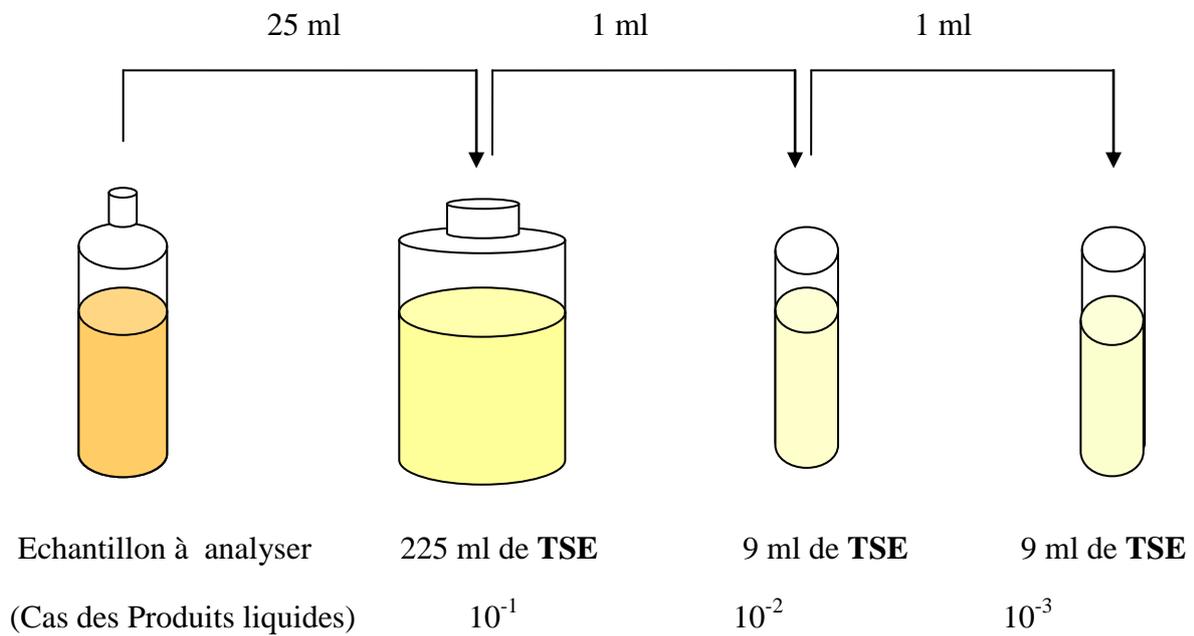


Figure 4 : Préparation de la solution mère et les dilutions décimales pour les produits liquides.

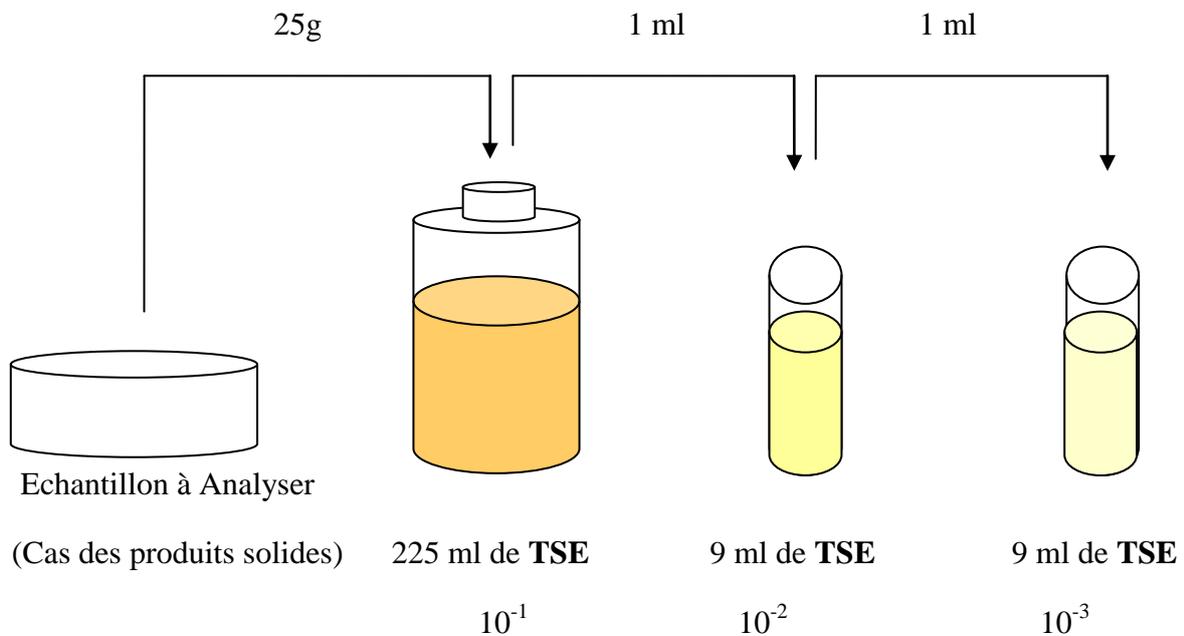


Figure 5: Préparation de la solution mère et les dilutions décimales pour les produits solides.

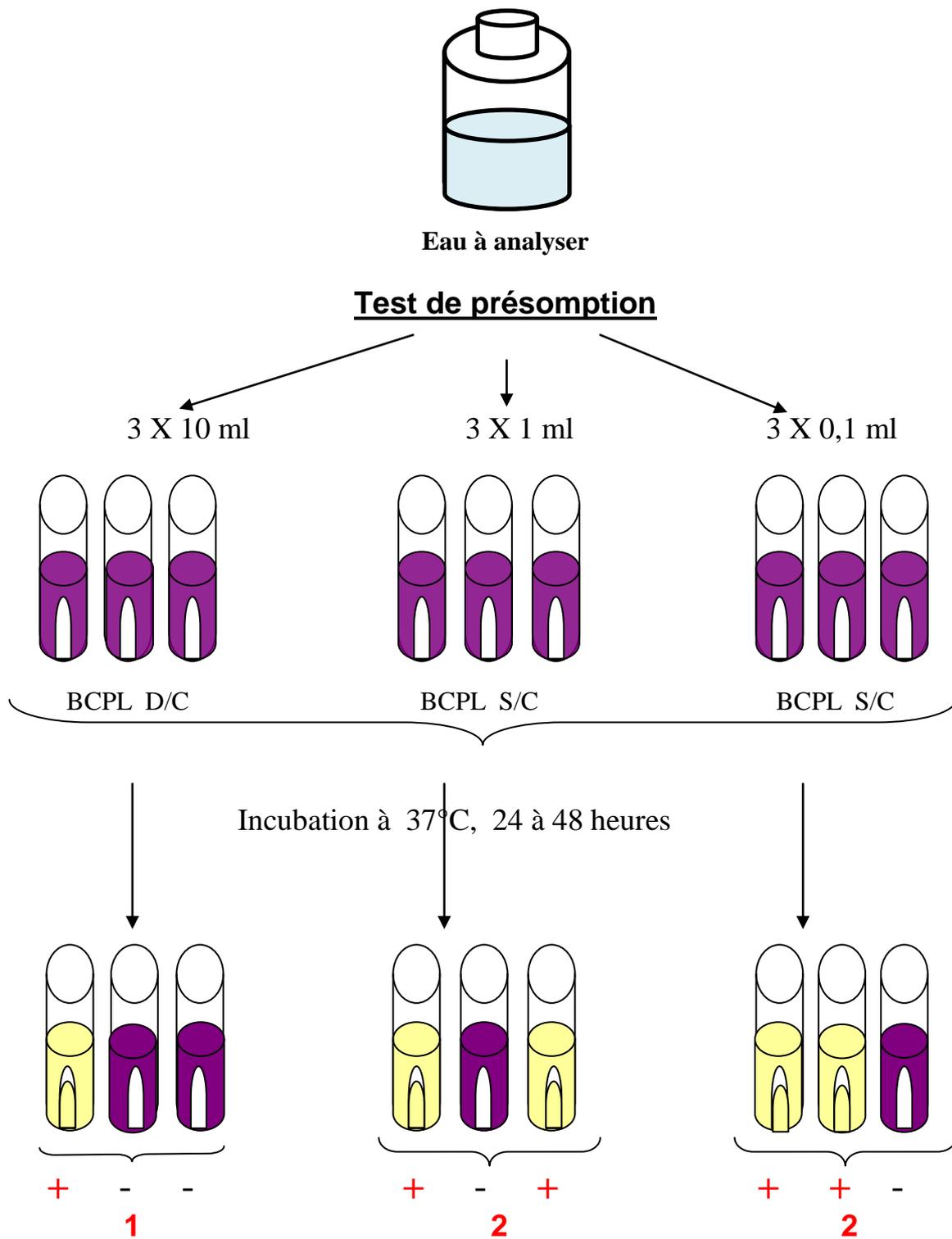


Figure 6 : Recherche et dénombrement des bactéries Coliformes et Escherichia coli en milieu liquide dans l'eau de process (test de présomption).

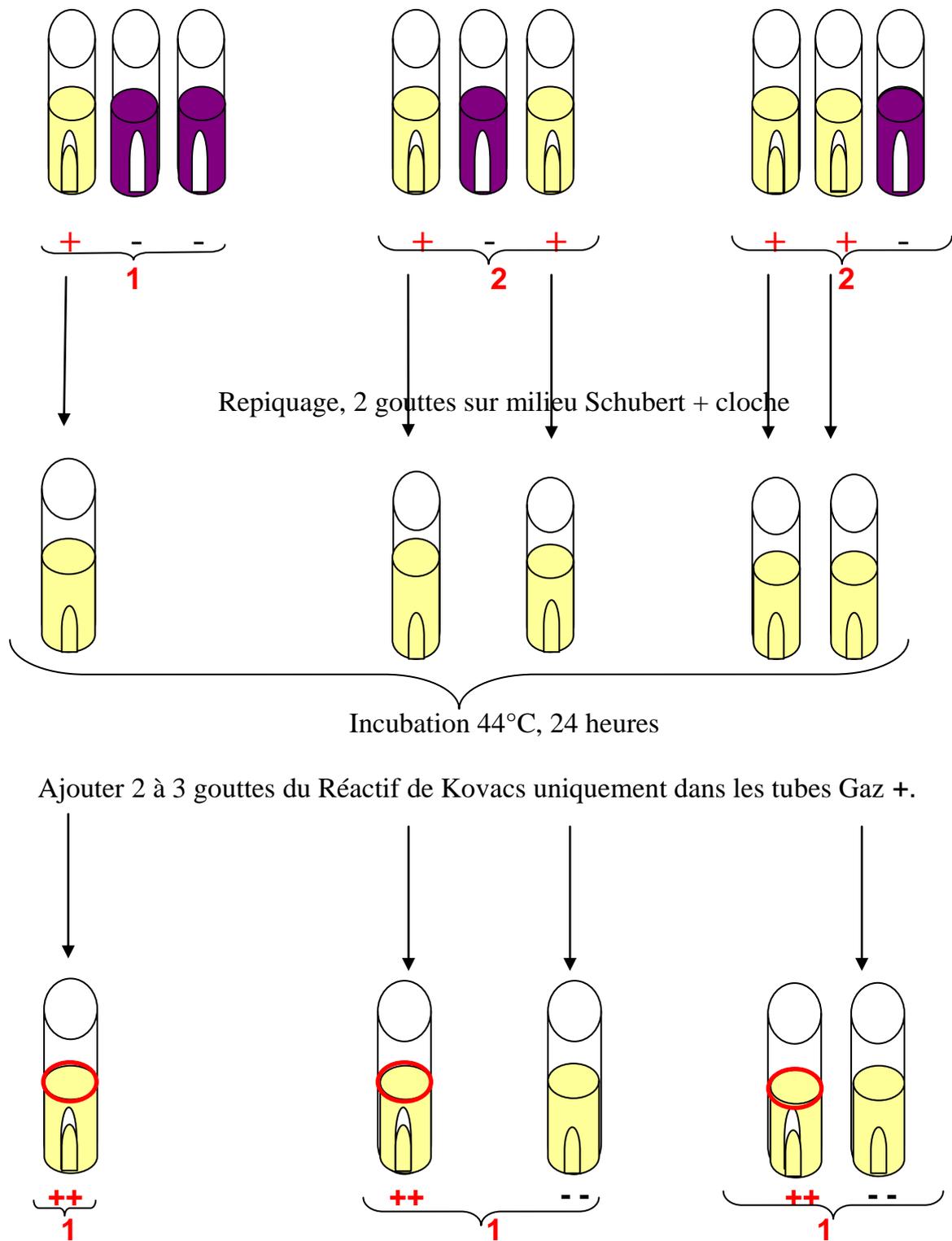


Figure 6* :Recherche et dénombrement des bactéries Coliformes et Escherichia coli en milieu liquide dans l'eau de process (test de confirmation).

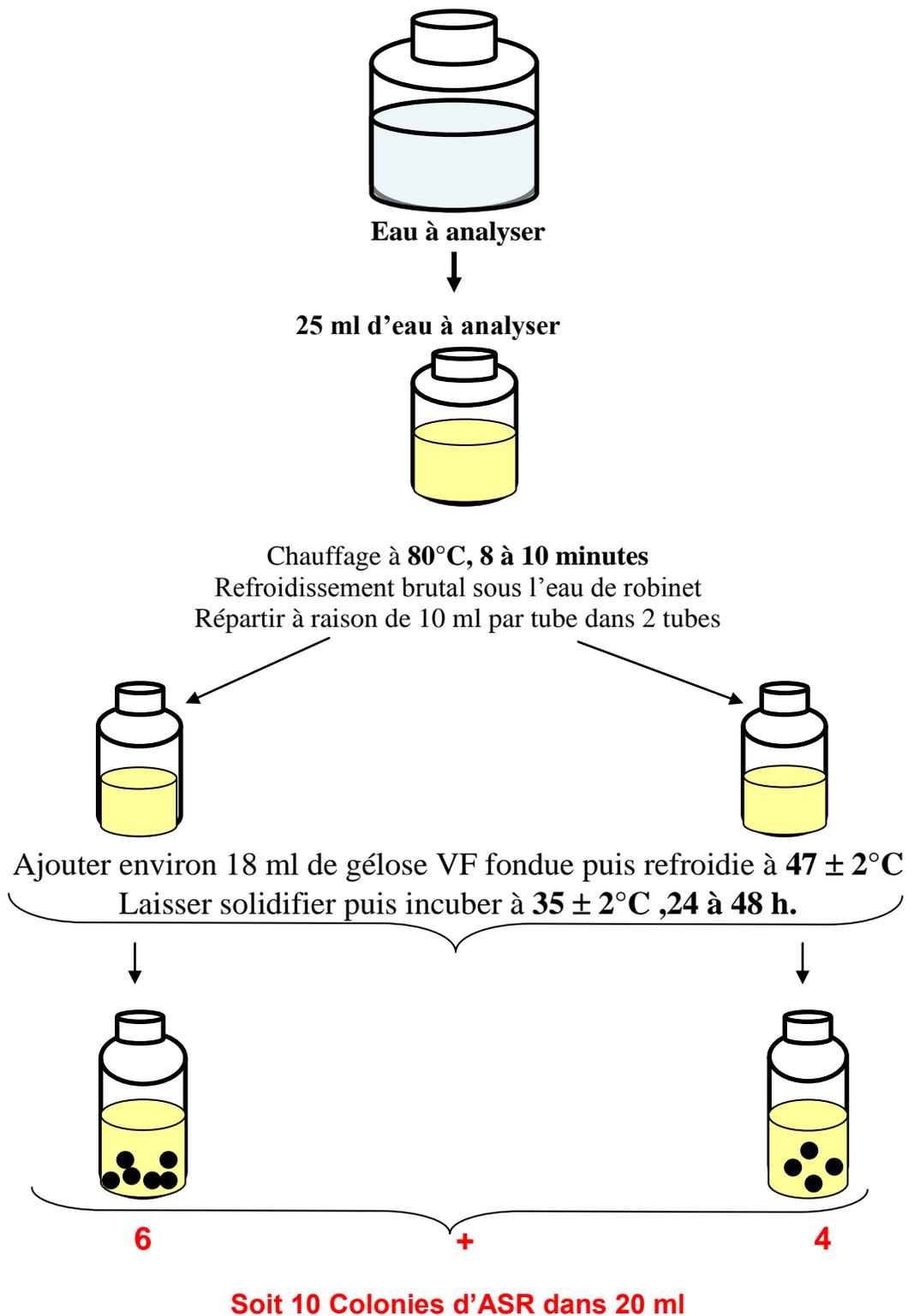
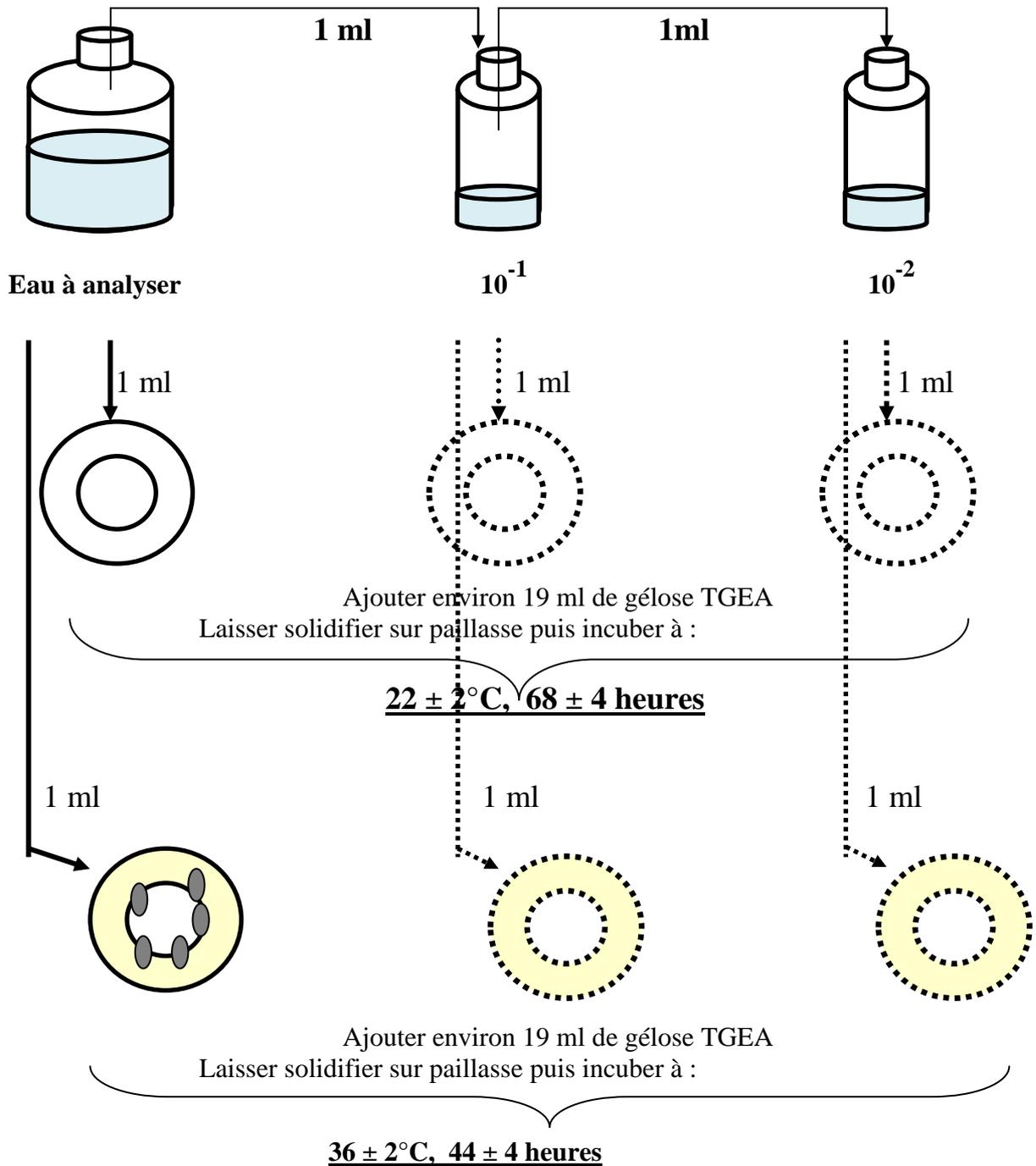


Figure 7 : Recherche et dénombrement des Spores de bactéries anaérobies sulfito-réductrices et de Clostridium sulfito-réducteurs dans l'eau de process.



Dénombrer les colonies lenticulaires ayant poussé en masse dans chacune des boites, puis calculer la valeur de N à 22°C puis celle de N à 36°C .

— Obligatoire
..... Facultatif.

Figure 8 : Recherche et dénombrement des Germes Aérobie Mésophile Totale dans l'eau de process.

Test de présomption

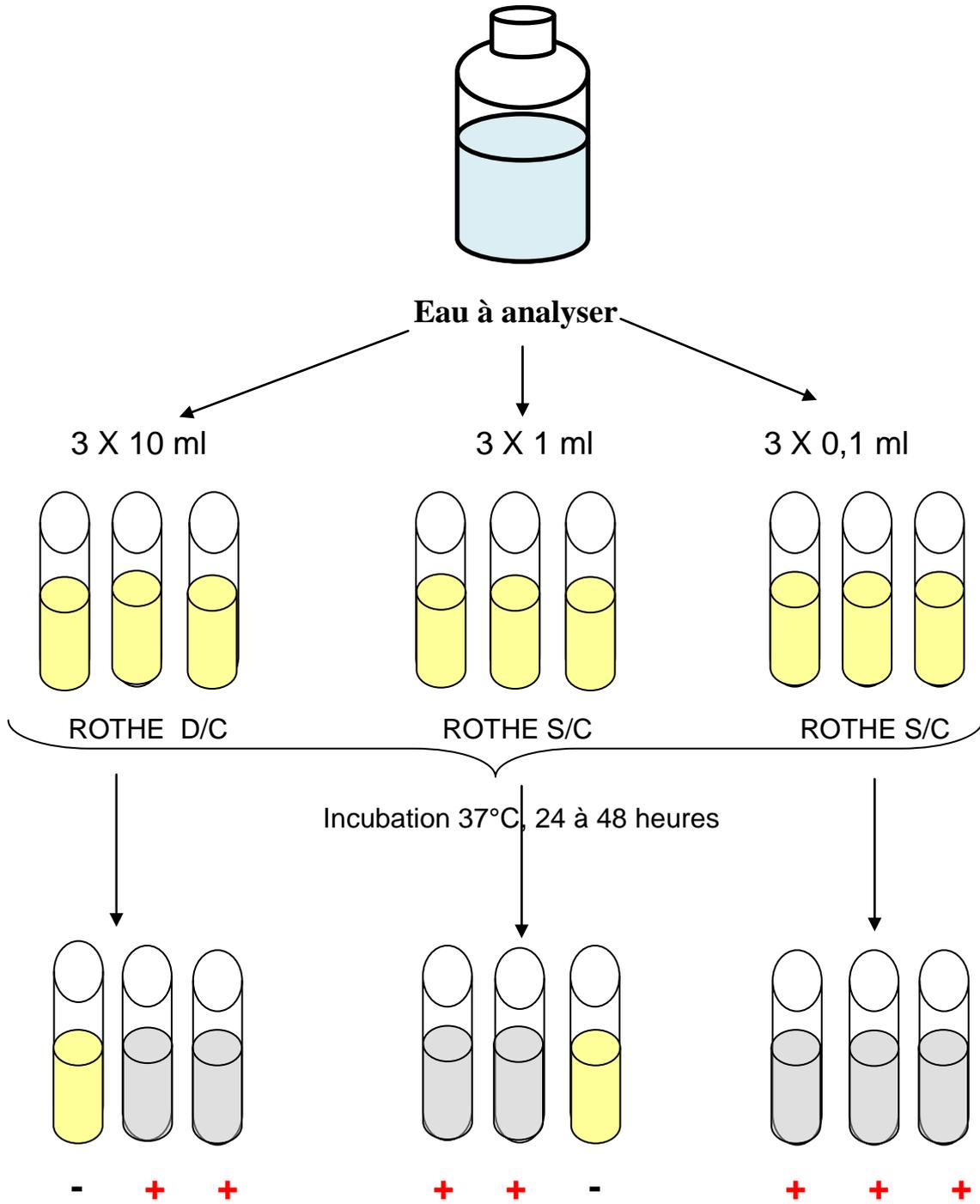


Figure 9 : Recherche et dénombrement des Streptocoques du groupe D dans l'eau de process (test de présomption).

Test de confirmation

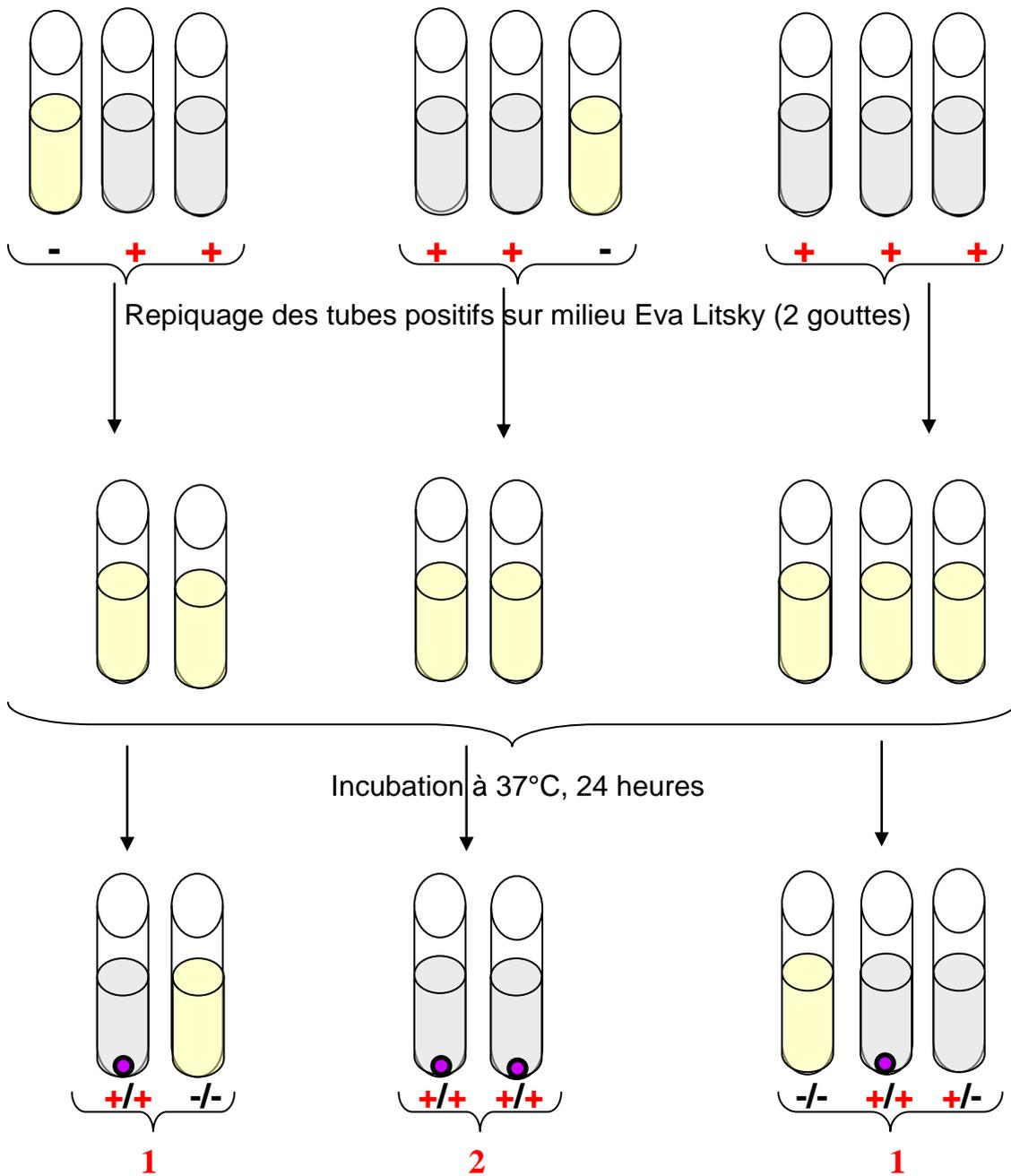


Figure 9* : Recherche et dénombrement des Streptocoques du groupe D dans l'eau de process (test de confirmation).

Test de Présomption

A partir des dilutions décimales

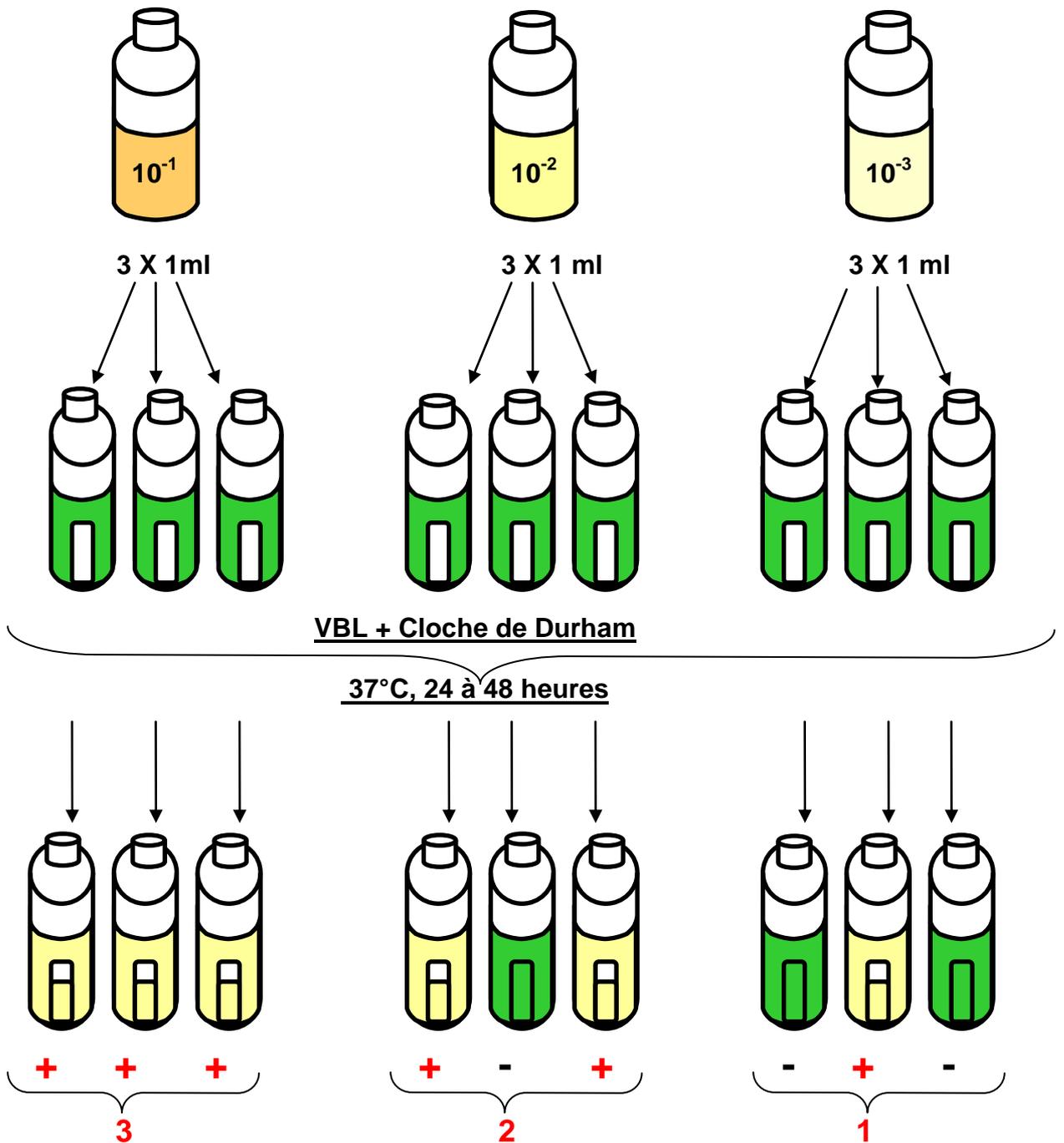


Figure 10: Recherche et dénombrement des Coliformes et Coliformes Thermo-Tolérants dans le concentré et le produit fini (test de présomption).

Teste de confirmation

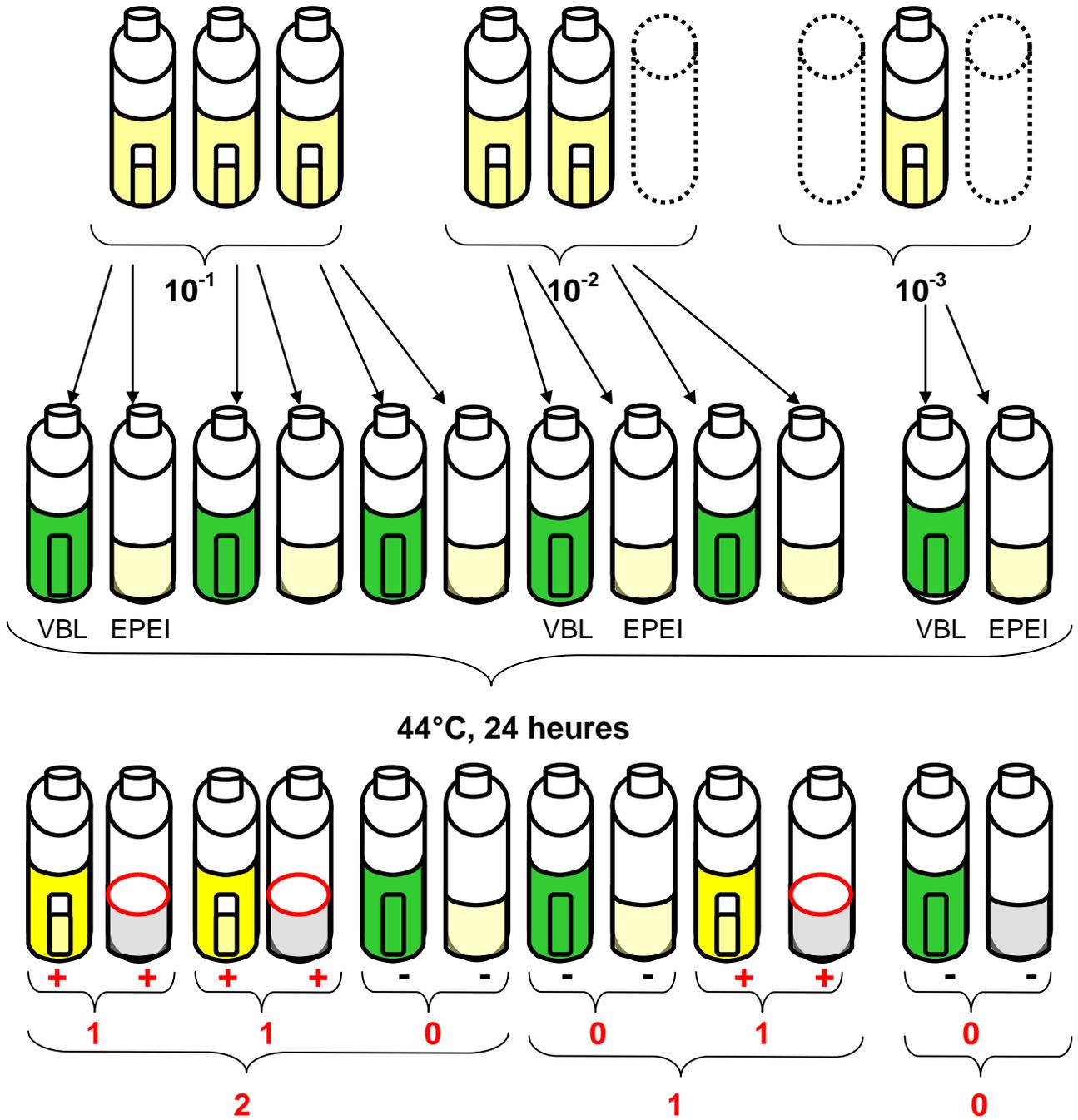


Figure 10*: Recherche et dénombrement des Coliformes et Coliformes Thermo-Tolérants dans le concentré et le produit fini (test de confirmation).

A partir de la suspension mère

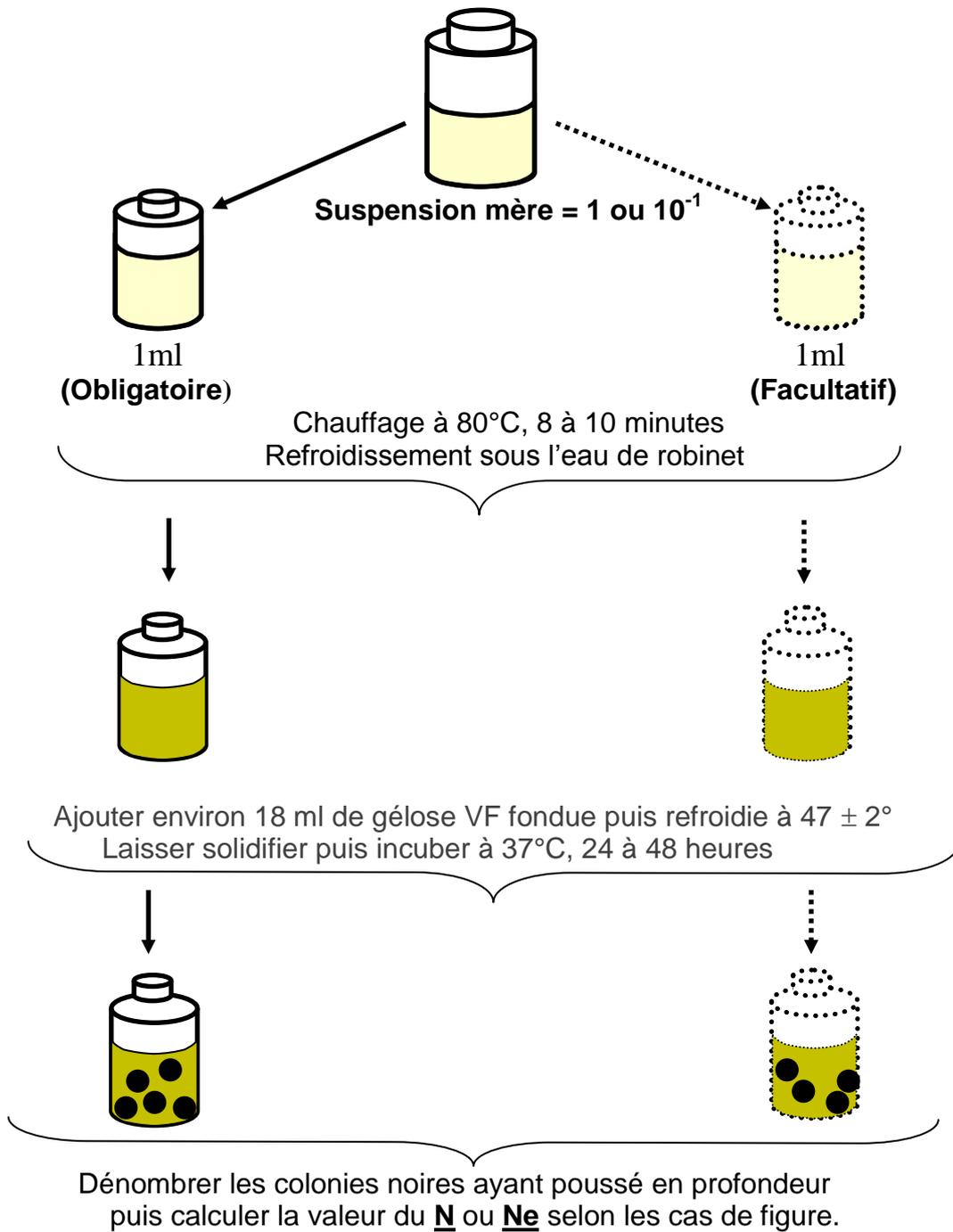
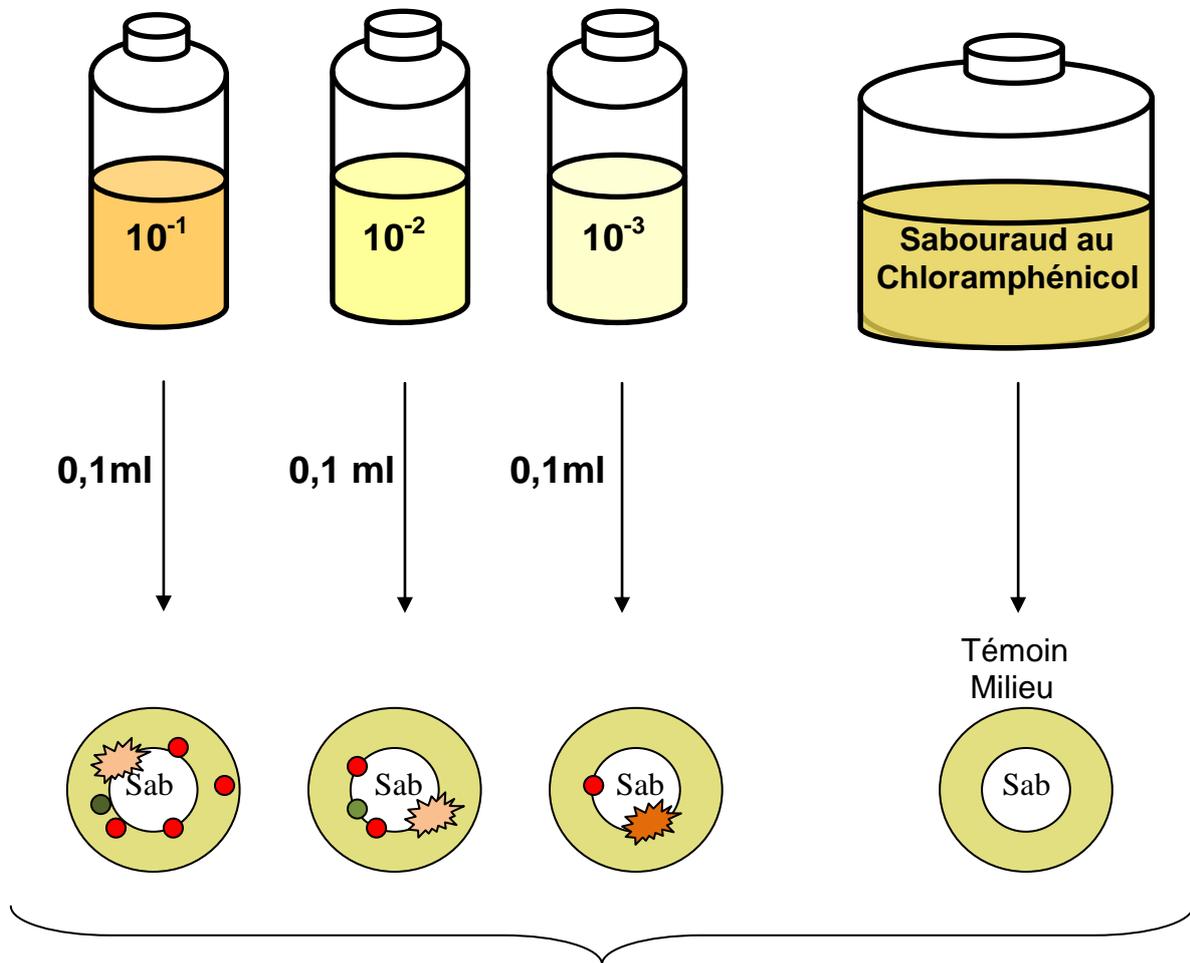


Figure 11 : Recherche et dénombrement des anaérobies sulfite-réducteurs dans le concentré et le produit fini.

A partir des dilutions décimales :



22°C, 5 jours, avec lecture tous les jours.

Lecture préalable des boîtes témoins puis lecture des autres boîtes
Calculer la valeur **N** pour Levures à part et Moisissures à part.

Figure 12: Recherche et dénombrement des levures et moisissures dans le concentré et le produit fini.

A partir des dilutions décimales :

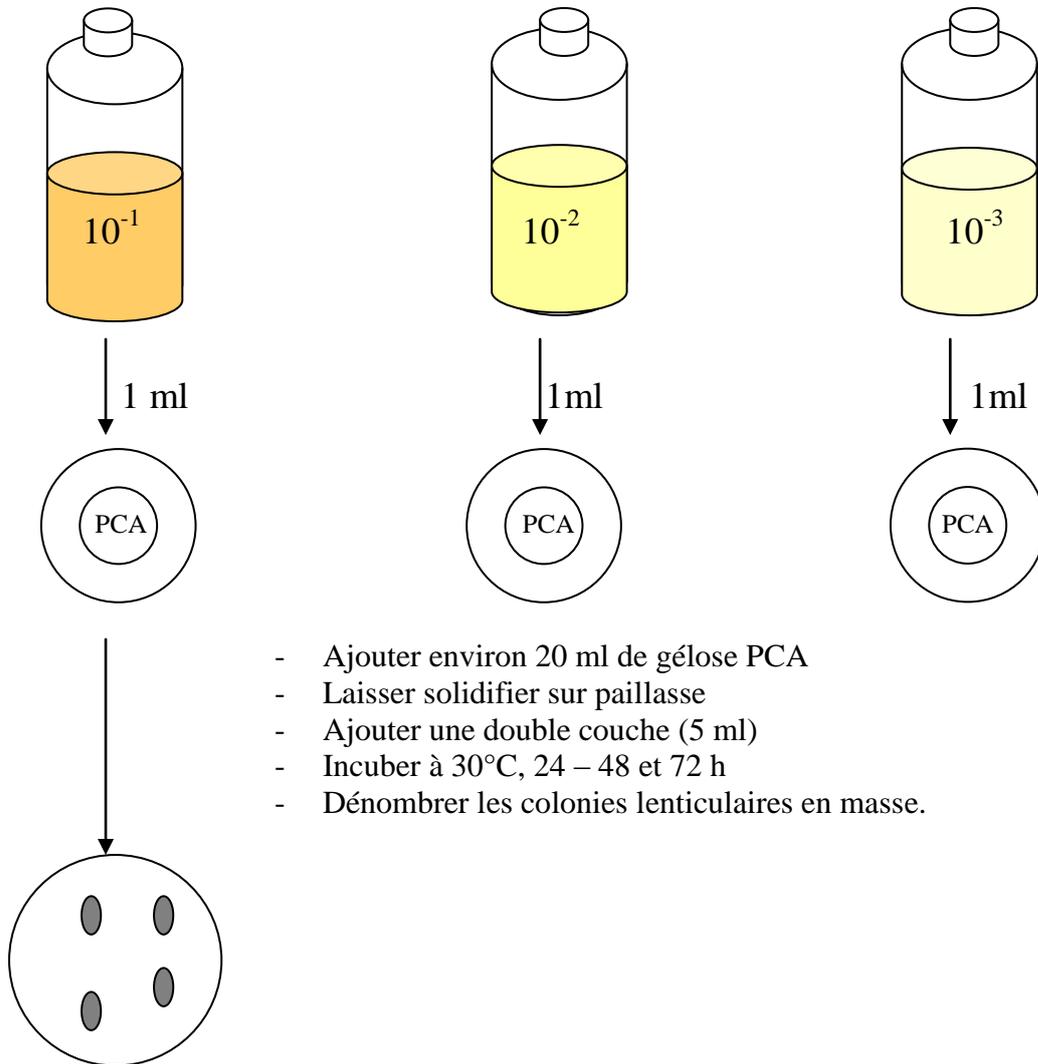


Figure 13 : Recherche et dénombrement des Germes aérobies mésophiles totaux à 30°C dans le concentré.

A partir des dilutions décimales :

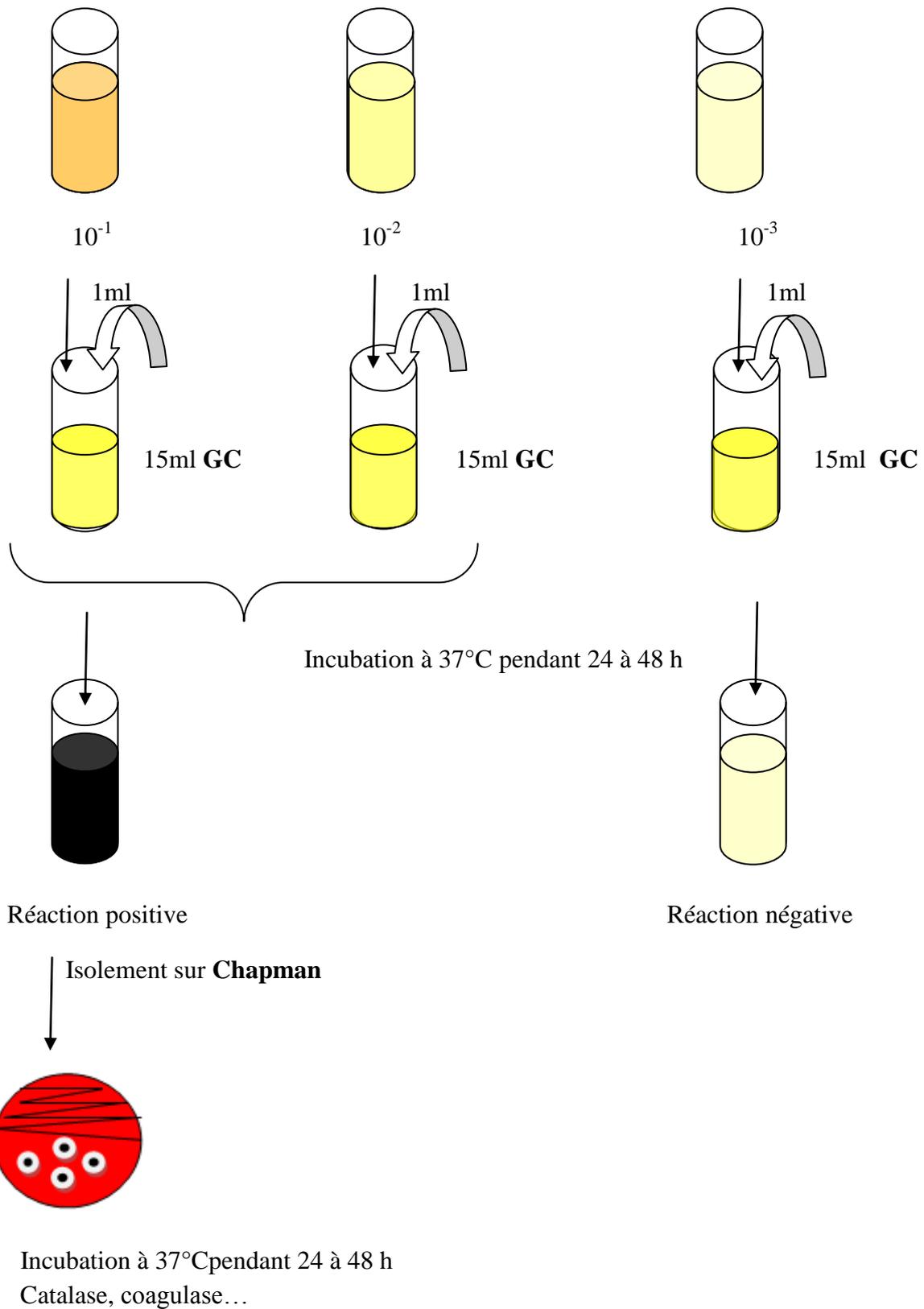


Figure 14 : Recherche et dénombrement de *Staphylococcus aureus* dans le concentré.

Annexe V :

TABLE DE MAC – GRADY ou Table NPP : “333”

Nombre Caractéristique	Nombre de Micro-organismes
000	0,0
001	0,3
010	0,3
011	0,6
020	0,6
100	0,4
101	0,7
102	1,1
110	0,7
111	1,1
120	1,1
121	1,5
130	1,6
200	0,9
201	1,4
202	2,0
210	1,5
211	2,0
212	3,0
220	2,0
221	3,0
222	3,5
223	4,0
230	3,0
231	3,5
232	4,0
300	2,5
301	4,0
302	6,5
310	4,5
311	7,5
312	11,5
313	16,0
320	9,5
321	15,0
322	20,0
323	30,0
330	25,0
331	45,0
332	110,0
333	140,0

Fiche de dégustation des jus enrichi en spiruline

Fiche de dégustation

Goutez chacun des échantillons de jus enrichi en spiruline et donnez une note allant de un (1) pour l'échantillon le plus acceptable à trois (3) pour le moins acceptable sans admettre d'égalités.

Les critères	Couleur	Odeur	Gout	Remarques
Les codes				
A				
B				
C				