



Année Universitaire : 2012-2013

**Master Sciences et Techniques : CMBA
Chimie des Molécules Bio Actives**



MEMOIRE DE FIN D'ETUDES
Pour l'Obtention du Diplôme de Master Sciences et Techniques

**Recherche de la viabilité des probiotiques dans un
produit laitier**

Présenté par:

Mlle. CHAHID Asmae

Encadré par:

**-Pr: N.IDRISSI KANDRI (FST)
-Mr: J.EL ALLAM (CHERGUI)**

Soutenu Le 19 Juillet 2013 devant le jury composé de:

- Pr : N.IDRISSI KANDRI (FST)**
- Pr : H.MISBAHI (i...)**
- Pr : H.TOUZANI (FST)**

Stage effectué à : Société CHERGUI au Domaine Douiet.



Mémoire de fin d'études pour l'obtention du Diplôme de Master Sciences et Techniques



Nom et prénom: CHAHID Asmae

Année Universitaire : 2012/2013

Titre: Recherche de la viabilité des probiotiques dans un produit laitier.

Résumé

Les produits laitiers ont toujours été perçus auprès des consommateurs comme des produits nutritifs et constituent une partie importante du régime alimentaire. Depuis quelques années, l'incorporation de bactéries probiotiques comme additifs alimentaires a donné lieu à une consommation de plus en plus importante des produits laitiers. L'efficacité de bifidobactéries dépend de leur viabilité qui doit être maintenue au cours du processus technologique, de stockage et de conservation.

Lors de cette étude, nous avons énuméré les bactéries lactiques probiotiques livrées dans deux yaourts CHERGUI commercialisés en tant que « produits probiotiques ». Ainsi l'effet de la température, de l'air et du pH sur la viabilité des probiotiques bifidus ont été examinés par la fabrication d'un yaourt aux probiotiques à l'échelle laboratoire.

Les résultats obtenus lors de notre étude ont montré que la température de stockage, le pH et l'oxygène présent dans l'air ont un effet négatif sur la viabilité et la stabilité des bifidobactéries.

Mots clés: Probiotique, viabilité, bifidobactéries.



Figure	Titre	N° page
Figure 1	<i>Organigramme du Département des Produits Laitiers</i>	3
Tableau	Titre	N° page
Figure 2	<i>Évolution de la production annuelle de lait au Maroc entre 1969 et 2005</i>	5
Tableau 1	<i>Les différents types du lait</i>	7
Figure 3	Structures des acides aminés constituant la caséine	9
Tableau 2	<i>La composition nutritionnelle du lait pour un litre</i>	11
Figure 4	Structure des acides aminés liés par une liaison peptidique	9
Tableau 3	<i>La composition nutritionnelle de fromage pour 33g</i>	12
Figure 5	Structure du lactose	10
Figure 6	<i>Procédé de fabrication du yaourt brassé</i>	24
Tableau 4	<i>Suivi de bifidobacteries et du pH pour le yaourt Bifidus</i>	34
Figure 7	Dégradation du lactose	26
Figure 8	<i>Démonstration de la coloration de Gram</i>	33
Tableau 5	<i>Suivi de bifidobacteries et du pH pour le yaourt Bifidus</i>	33
Figure 9	<i>Suivi du pH du yaourt Muesli au bifidus pendant 21 jours</i>	34
Figure 10	<i>Suivi de BifidoBacterium (B.B) du yaourt Muesli au bifidus pendant 21 jours</i>	38
Figure 11	<i>Suivi du pH du yaourt nature au bifidus pendant 21 jours</i>	36
Tableau 7	<i>Résultats de bifidobacteries dans un milieu acide</i>	39
Figure 12	<i>Suivi du BifidoBacteries (B.B) du yaourt nature au bifidus pendant 21 jours</i>	36
Tableau 8	<i>Résultats de bifidobacteries du yaourt exposé à l'air</i>	39
Figure 13	<i>Evolution du pH pour les yaourts nature et Muesli</i>	37
Figure 14	<i>Suivi des BifidoBacteries (B.B) pour les yaourts nature et Muesli</i>	40
Tableau 9	<i>Suivi de bifidobacteries et du pH pour un produit de concurrence</i>	40
Figure 15	<i>Suivi du pH du yaourt au bifidus (produit de concurrence) pendant 21 jours</i>	40
Figure 16	<i>Suivi du BifidoBacterium (B.B) du yaourt au bifidus (produit de concurrence) pendant 21 jours</i>	41
Figure 17	<i>Suivi du pH du yaourt aux bifidus de Chergui et un autre de concurrence pendant 21 jours.</i>	41
Figure 18	<i>Suivi de BifidoBacteries du yaourt aux bifidus de Chergui et un autre de concurrence pendant 21 jours</i>	42



Liste des figures

Liste des abréviations

Introduction.....1

Présentation du domaine.....2

1-Activité.....2

2-Filière des produits laitiers.....2

Synthèse bibliographique

I-Industrie laitière.....4

1- Au niveau international.....4

2- Au niveau national.....5

II-Lait et ses dérivés.....6

1- Différents types de lait.....6

2- Composants du lait.....8

2-1- Eau.....8

2-2- Matière sèche.....8

a- Matière grasse.....8

b- Protéines.....9

c- Lactose.....10

d- Autres composants.....10

3- Valeurs nutritionnelles des produits laitiers.....10

4- Techniques de traitement du lait.....13

III-Les produits laitiers.....14

1- Beurres.....14

2- Fromage.....14

3- Crème.....14

4- Jus.....15

5- Leben.....15

6- Yaourt.....15

IV-Les probiotiques.....15

1- Découverte.....16

2- Terme "probiotique".....16

3- Caractéristiques.....16

4- Rôles et effets des probiotiques.....17

4-1- Mécanisme d'action des probiotiques.....17

4-2- Les principaux effets des probiotiques.....18

4-2-1- Soulagement de la constipation.....18

4-2-2- Digestion du lactose.....18

4-2-3- La durée de la diarrhée.....19

4-2-4- Diminution de l'allergie alimentaire.....19

5- Précautions à prendre avec les probiotiques.....19

V-Conditions d'utilisation des probiotiques.....20



VI-Les bifidobacterium.....	20
1- Définition.....	21
2- Caractéristiques.....	21
3- Isolement et dénombrement.....	22
Partie pratique	
I- Objectif.....	23
II- Chaîne de fabrication du yaourt brassé.....	23
1- Description de la chaîne de fabrication du yaourt brassé.....	25
a- De la traite à la laiterie.....	25
b- Standardisation.....	25
c- Pasteurisation.....	25
d- Ensemencement.....	26
e- Fermentation.....	26
2- Fabrication du yaourt à l'échelle laboratoire.....	27
III- Démarche suivie.....	28
1- Échantillonnage.....	28
2- Essais.....	28
3- Interprétation.....	28
IV- Essais de dénombrement des probiotiques.....	28
1- Isolement et dénombrement.....	29
1-1- Méthode de dénombrement.....	29
1-2- Milieu de culture.....	29
a- Composition.....	29
b- Préparation.....	30
c- Mode d'emploi.....	30
d- Lecture.....	30
12- Préparation des échantillons.....	30
2-1- Principe de dilution.....	31
2-2- Incubation.....	31
V- Résultats obtenus.....	32
1- Test de confirmation.....	32
a- Test macroscopique.....	32
b- Test microscopique.....	32
2- Résultats du suivi.....	33
2-1- Résultats du suivi pour le yaourt bifidus Muesli.....	34
a- Suivi pH.....	34
b- Suivi de bifidus.....	35
V-2-2- Résultats du suivi pour le yaourt bifidus nature.....	35
a- Suivi du pH.....	36
b- Suivi du bifidus.....	36



VI- Interpretation des resultants.....	38
A- Facteurs influançant la viabilité et la stabilité des probiotiques.....	38
a- Effet de la température de stockage.....	38
b- Effet du pH.....	38
c- Effet de l'oxygène.....	39
d- Le choix de la souche.....	40
1- suivi pH.....	40
2- Suivi de bifidus.....	41
Conclusion et recommandations.....	43

Introduction

L'industrie laitière est un secteur prometteur vu la demande croissante en produits laitiers, en effet cette matière contient les nutriments essentiels pour la croissance humaine.

Les produits laitiers ont toujours été perçus auprès des consommateurs comme des produits sains et constituent une partie importante du régime alimentaire. Depuis le 20^{ème} siècle, l'homme n'a cessé d'améliorer le goût du lait et de ses dérivés soit par le mode de préparation ou par l'ajout de divers arômes et fruits. Depuis quelques années, l'incorporation de bactéries probiotiques comme additifs alimentaires a renforcé les propriétés acclamées pour la santé et donné lieu à une consommation de plus en plus importante des produits laitiers. L'efficacité de ces probiotiques dépend de leur viabilité qui doit être maintenue au cours du processus technologique, de stockage et de conservation.



Le but de ce travail, réalisé au département de recherche et développement de la société "CHERGUI", est d'apporter des réponses sur l'utilisation de ces probiotiques dans les yaourts à deux niveaux :

- La concentration de cellules viables des bactéries utilisées pour l'ensemencement des yaourts probiotiques dans les produits finis.
- Les facteurs qui influencent la viabilité des ferments probiotiques utilisés pour la fabrication des yaourts.

Ce manuscrit décrit dans, une première partie, une synthèse bibliographique sur le lait et son industrie ainsi que les probiotiques et leurs intérêts d'utilisation. La deuxième partie sera consacrée aux différents essais et les résultats obtenus et leurs interprétations. Puis une conclusion générale avec les recommandations qui s'impose clôtura ce rapport.

Présentation des domaines agricoles

La société des domaines agricoles a été Créée en 1960. Elle regroupe plusieurs opérateurs dans les métiers de la production agricoles et agro-alimentaire. Elle est présente sur l'ensemble des régions agricoles du Maroc avec de nombreux sites de production.

Les Domaines disposent de plusieurs exploitations dont la plus célèbre est « Chergui » située tous près de Fès (DOUIET) et a été créée en 1997 afin d'élargir le champ de commercialisation et de viser une nouvelle clientèle.

A partir de l'année 2000, la société a mis en place le système HACCP qui identifie, évalue et maîtrise les dangers significatifs au regard de la sécurité des aliments. Sept ans plus tard, la société est certifiée " ISO 9001" et "ISO 22000" qui rentrent dans la satisfaction des clients et la sécurité des consommateurs.

1-Activités de l'entreprise



Les Domaines constituent l'un des principaux producteurs exportateurs de fruits et légumes au Maroc, leurs principales activités sont :

* **Activités agricoles** : La production d'aliment (fourrages et céréales), la production laitière (Élevage bovin laitier et caprin laitier) et la fourniture pour la parfumerie haut de gamme de plantes aromatiques et d'huiles essentielles.

* **Activités Agro-industrielle** : La transformation laitière, la conservation de fruits et le conditionnement de fruits et légumes.

* **Activités commerciales** : Le domaine assure la commercialisation de ses produits au Maroc et plus particulièrement dans les régions où l'entreprise est implantée.

2-Filière des produits laitiers

Cette filière a été créée en 1983 et a pour mission la production et la transformation des produits laitiers. Elle assure, actuellement, une production moyenne de 15000 litre par jour.

Pour une bonne gestion, ce département dispose de trois services (figure 1) :

- Laiterie / Fromagerie.
- Commercial.
- Contrôle qualité / Recherches et Développement.

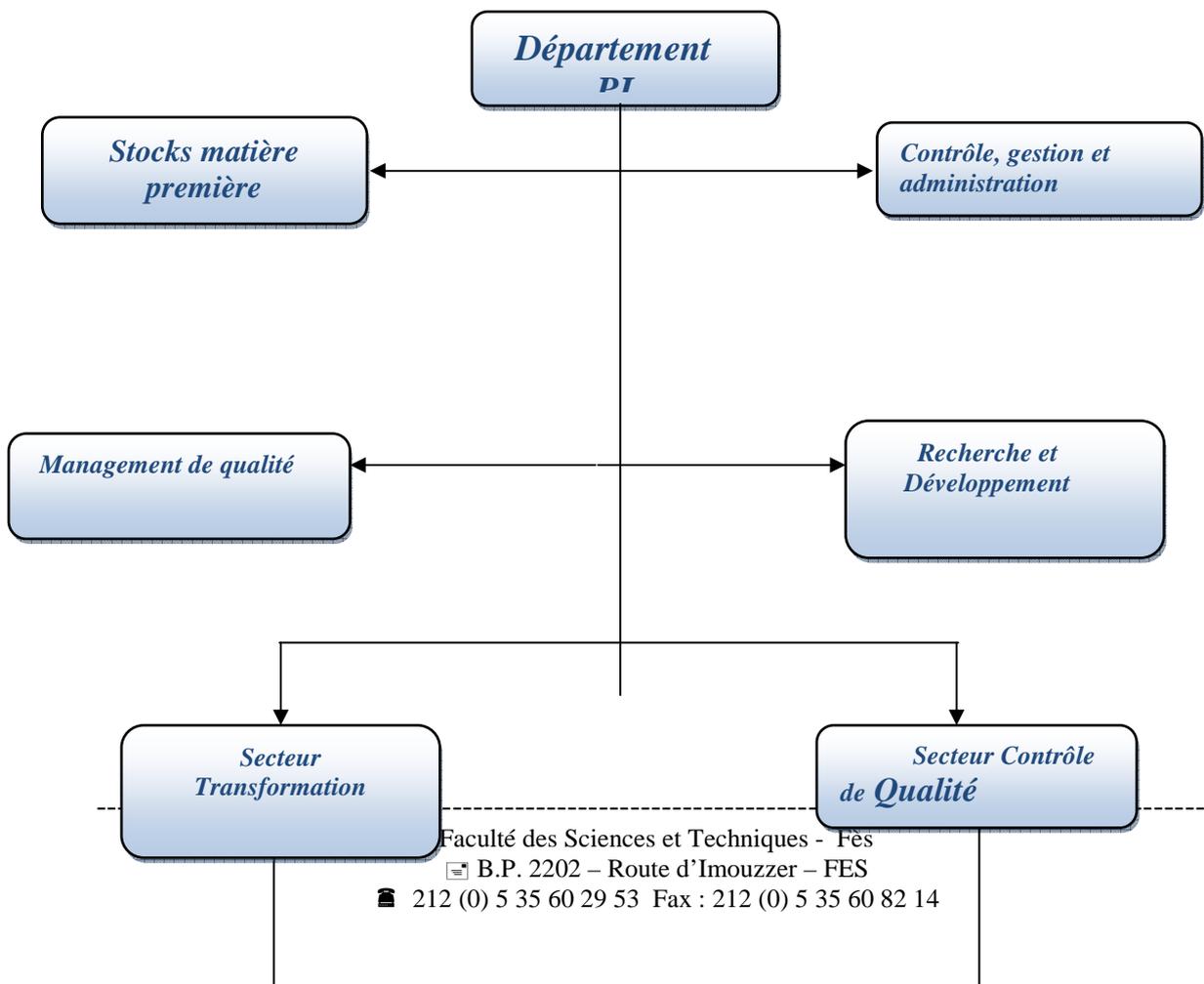




Figure 1 : Organigramme du Département des Produits Laitiers

Le lait fait partie de notre alimentation depuis que le monde est monde. Riche en éléments nutritifs, le lait a une longue, très longue histoire...

- En Égypte antique, le lait et d'autres produits laitiers étaient réservés à la royauté, les prêtres et les riches.
- En Europe, vers l'an 500, les vaches et les moutons étaient très prisés pour leur lait.
- Au 14e siècle, le lait de vache était devenu plus populaire que le lait de mouton.
- Les premières vaches laitières européennes sont arrivées en Amérique du Nord au début du 16e siècle.
- En 1862, Louis Pasteur, microbiologiste français, a effectué les premiers tests de pasteurisation du lait. Cette découverte a permis d'assurer la salubrité du lait et d'ouvrir la voie à la conservation et la distribution du lait à l'extérieur de la ferme.
- En 1884, la première bouteille de lait a vu le jour dans l'état de New York



- En 1895, les appareils pour la pasteurisation du lait sont mis sur le marché commercial.
- Depuis 1930, les boîtes de lait furent remplacées par des réservoirs de stockage sur la ferme et on inventa alors les premiers cartons de lait enduits de plastique, ce qui permit une meilleure distribution du lait frais.

I. L'industrie laitière

Suite au progrès enregistré dans ce domaine depuis le 19^{ème} siècle (travaux de pasteur), toute une industrie laitière a vu le jour et ne cesse de se développer, actuellement, on trouve plusieurs domaines dans ce secteur :

- Laiterie : Usine où l'on traite le lait, soit pour sa consommation en nature soit pour la fabrication de produits dérivés (beurre, fromage, lait en poudre, lait concentré).
- Fromagerie: Endroit où l'on fait, où l'on garde des fromages.
- Beurrerie: Industrie du beurre.

1-Au niveau international

La filière du lait présente, pour chaque région du globe, ses propres caractéristiques d'élevage, de rendements, de modèle économique.

La France est une terre de fortes traditions laitières. L'industrie du lait y est puissante, moderne, et rivalise avec les secteurs de la chimie et de la sidérurgie. Le pays compte 5 groupes laitiers classés parmi les 15 premiers groupes laitiers mondiaux.

Le reste du monde comprend notamment l'Asie et les continents américains, autres géants du lait. Ils sont marqués par de fortes disparités. L'histoire de la production de lait, les objectifs de production, les rendements et la taille des exploitations y sont très différents. L'Inde et la Chine se distinguent par le récent et exponentiel développement de leur économie laitière.

2-Au niveau national

La filière laitière occupe de plus en plus une place jugée appréciable dans l'industrie du fait de l'importance de ses produits dans l'équilibre nutritionnel de la population surtout que le lait et ses dérivés constituent pour l'homme l'aliment de base de part sa composition en protéine d'origine animale, en sucre et en sel, outre sa teneur en calcium, phosphore et vitamines. De même cette filière constitue une composante de plus en plus importante dans la transformation de l'agriculture marocaine et dans l'amélioration des conditions de vie rurale. Malgré la persistance de



nombreuses contraintes, ainsi que l'élevage laitier et la transformation industrielle de ses produits connaissent depuis le milieu des années 70, une croissance régulière.

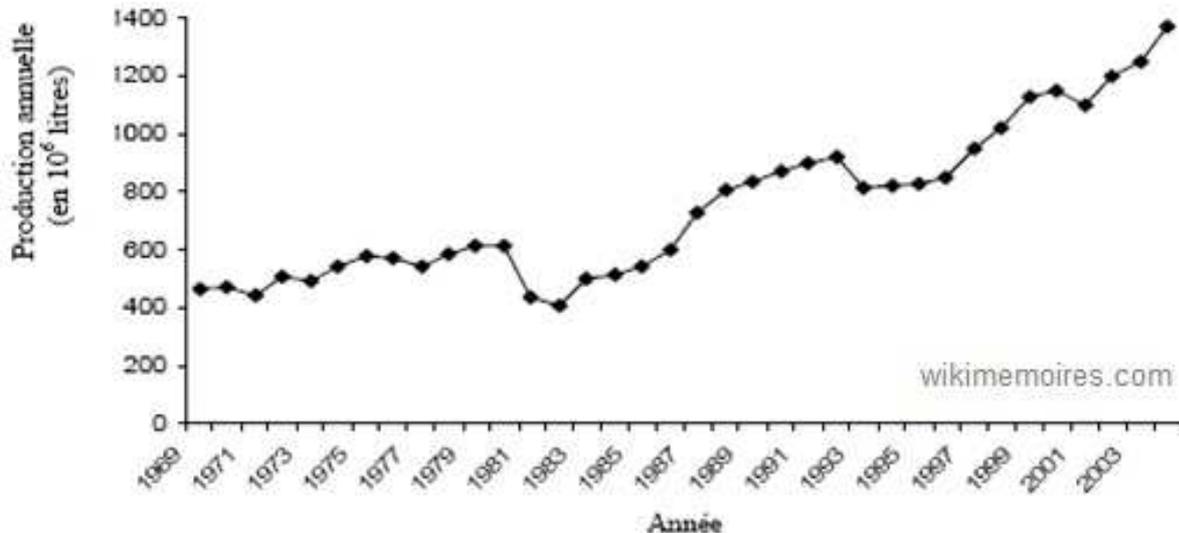


Figure 2 : Évolution de la production annuelle de lait au Maroc entre 1969 et 2005

II-Le lait et ses dérivées

Depuis la nuit des temps, le lait constitue une denrée de base et un aliment vital pour l'homme. Tous les peuples éleveurs produisaient et consommaient du lait, qu'il s'agisse de lait de vache, de chèvre, de brebis, de bufflesse, de chamelle, d'ânesse...

Par définition, le lait est un produit issu de la sécrétion mammaire normale chez les mammifères. Ainsi, on trouve plusieurs types de lait qui diffèrent par leurs constitutions selon chaque mammifère (tableau 1), obtenu à partir d'une ou de plusieurs traites par jour, sans rien y ajouter ou en soustraire. Il est destiné à la consommation comme lait liquide ou il va subir un traitement ultérieur.

1-Différents types du lait

Seule la production laitière de quelques espèces de mammifères présente un intérêt immédiat en nutrition humaine, même si le lait d'autres espèces animales possède des qualités



nutritives supérieures. Les quantités (rongeurs) ou l'inaccessibilité (porc) en font dans la pratique des aliments négligeables pour l'homme.

La vache assure de loin la plus grande part de la production mondiale (90 pour cent)' même en pays tropicaux (70 pour cent) (FAO, 1990). Ce lait est de tous le plus connu et les données qui le caractérisent sont sans doute les plus exactes. Il est logiquement aussi le produit laitier le plus consommé et étudié en nutrition humaine.

La dénomination « lait » sans indication de l'espèce animale de provenance est réservé au lait de vache.

Lait de femme : Le lait maternel est un aliment « complet » assurant tous les [besoins nutritionnels du bébé jusqu'à six mois](#) environ. La qualité des protéines et des lipides contribue à la solidité tout au long de la vie des tissus nobles comme le cerveau, la rétine ou les vaisseaux.

Lait de vache : c'est le [lait](#) produit par la [vache](#) pour alimenter son [veau](#). Il contient les trois nutriments principaux ([glucides](#), [lipides](#), [protéines](#)), des [sels minéraux](#) comme le [calcium](#) et le [phosphore](#), des [vitamines](#), ainsi que l'[hormone de croissance du veau](#). Les humains le consomment en abondance. Le lait de vache peut être plus ou moins [transformé](#), et forme la principale matière première de l'[industrie laitière](#).

Lait de chèvre: il est plus digeste que le lait de vache, car il est moins riche en lactose que le lait de vache ou que le lait humain : on le recommande donc pour les bébés et les personnes qui supportent mal le lait de vache. Le caillé est beaucoup plus fin et plus digeste. De plus, il est naturellement homogénéisé car il est dépourvu d'une protéine, l'agglutinine.

Lait de brebis : est nettement plus riche que le lait de vache. Sa teneur en matière sèche est de l'ordre de 200 g/l contre seulement 130 g/l pour le lait de vache. En moyenne, le lait de brebis renferme 75 g/l de matière grasse contre 40 g/l pour le lait de vache.

Lait de chamelle: il est légèrement plus salé que le lait de vache. Il est également trois fois plus riche en vitamine C et contient du fer, des acides gras non saturés et des vitamines B. C'est un aliment naturel et indispensable dans les régions qui manquent d'eau et de fourrage.



Lait de jument: c'est le lait produit par la jument pour alimenter son poulain afin de lui permettre de grandir et de se développer. Il contient beaucoup de lactose, peu de lipides et une bonne quantité de vitamine C. La jument en produit une grande quantité du premier au troisième mois qui suit la naissance de son petit, les quantités diminuant tandis que le poulain adopte son régime herbivore.

Constituants (g/l)	Vache	Humain	Chamelle	Jument	Chèvre	Brebis
Eau	900	905	880	925	900	860
Matière sèche	130	117	140	100	120	190
Protéines	30-35	12-14	35	20-22	35-40	55-60
Caséine	27-30	10-12	28	18-20	30-35	45-50
Lactose	45-50	65-70	50	60	40-45	45-50
Matières salines	8-10	3	8	6-9	7,7	10-12
Matières grasses	35-40	35	45	10-15	41	70-75

Tableau 1: Les différents constituants des différents types du lait

2- Composants du lait

Le lait est un liquide opaque de couleur blanche plus ou moins jaunâtre selon la teneur en β -carotène de sa matière grasse. Sa composition varie en fonction de l'alimentation, de la période de lactation, de la saison et de la race de l'animal. Sa saveur est douce et son odeur est faible mais identifiable.

Le lait est un mélange complexe constitué de 90 % d'eau et le reste (10%) comprend :

- Une solution homogène : sucre + protéines solubles + minéraux + vitamines hydrosolubles.
- Une solution colloïdale : protéines en particulier les caséines.
- Une émulsion : matières grasses.



2.1- Eau

L'eau représente environ 90 % du volume de lait. Il se trouve sous deux formes essentielles : *libre* à 96% de la totalité et *liée* à 4% présent dans la matière sèche.

L'eau libre par sa mobilité est très réactive. Elle autorise l'état de solution du lactose et d'une partie des minéraux et rend le milieu très favorable au développement des microorganismes.

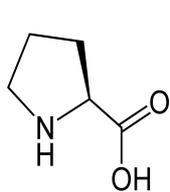
L'eau liée est fortement associée aux protéines, à la membrane des globules gras et à certains minéraux. Elle n'est pas affectée par les procédés classiques de transformation et n'intervient pas dans les réactions chimiques physiques ou enzymatiques.

2.2- Matière sèche total

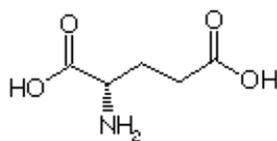
La matière sèche totale (extrait sec total) représente 125 à 130 g par litre, dont 35 à 45 g de matières grasses. Les autres composants principaux sont les composants organiques (glucides lactose, lipides, protides, vitamines) et les composants minéraux Ca, Na, K, Mg, Cl.

a- La matière grasse : C'est le constituant le plus variable du lait, constituée d'un mélange d'acides gras saturés et non saturés qui se trouvent en suspension dans le lait sous forme de minuscules gouttelettes (globules gras) et forme une émulsion. La concentration en lipides varie de 10 à 500 g/l suivant les espèces. Elles sont constituées essentiellement (99 %) de triglycérides.

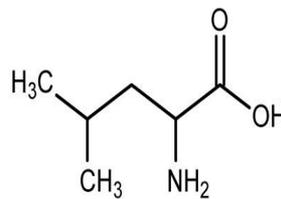
b- Les protéines : Les protéines de la caséine représentent 80 % des protéines totales du lait et qui sont des polypeptides complexes, résultats de la polycondensation de différents acides aminés, dont les principaux sont la leucine, la proline, l'acide glutamique et la sérine. Les 20% restantes représentent est constitué de protéines insolubles : lactalbumine, immunoglobuline...etc.



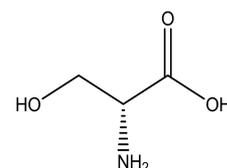
Proline



Acide glutamique



Leucine



Sérine

Figure 3 : Structures des acides aminés constituant la caséine

La condensation résulte de la réaction d'un groupe carboxyle d'une molécule d'acide aminé sur le groupe amino d'une autre molécule d'acide aminé, avec formation d'un groupe amido -CO-NH-, encore appelé liaison peptidique.

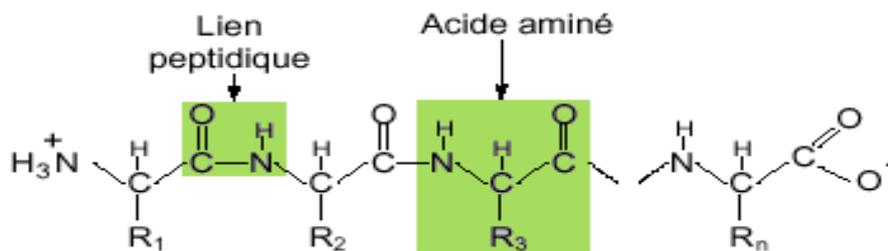
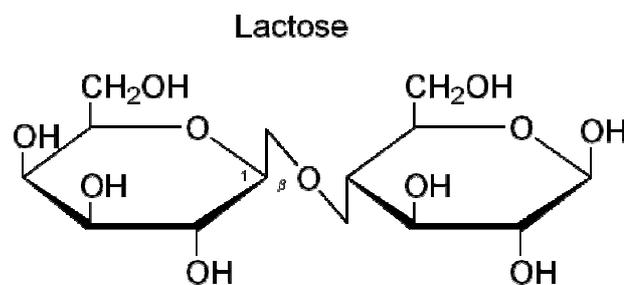


Figure 4 : Structure des acides aminés liés par une liaison peptidique

c- Le lactose : C'est un sucre disaccharide qui se présente sous forme de solution et qui est généralement le principal élément de la matière sèche. Son pouvoir sucrant est six fois plus faible que celui du saccharose.



β -D-galactopyranosyl(1 \rightarrow 4)D-glucopyranose

Figure 5 : Structure du lactose

d-Autres composants : dites aussi composants secondaires, ils sont constitués par les enzymes, les vitamines, les oligo-éléments et les sels. Les teneurs en sels de calcium et de phosphore font du lait un aliment très adapté à la croissance des jeunes enfants. Le phosphore y est fixé sous forme de phosphates. Le calcium s'associe au



phosphate et à la caséine pour donner le complexe phosphocaséinate de calcium et forme un colloïde. On trouve également du magnésium, du potassium et du sodium.

3- Valeur nutritionnelle des produits laitiers

Aucun aliment ne constitue la panacée et contient tous les nutriments nécessaires dans les quantités recommandées. Ce n'est pas le cas non plus des produits laitiers. Les produits laitiers contribuent de manière importante à l'apport en protéines de haute valeur, en calcium, en phosphore, en zinc, en vitamine B2 et B12 et ne sont pas faciles à remplacer en raison de leur composition nutritionnelle unique.

On indique la composition nutritionnelle pour un litre de lait (Lait entier, Lait demi-écrémé, Lait écrémé) (Tableau 2) et pour une tranche de fromage de 33g (Tableau 3).



	Lait entier	Lait demi-écrémé	Lait écrémé
Energie (Kcal/l)	633	460	340
Protéines (g/l)	33	33	33
Graisses (g/l)	35	16	1.33
Acides gras saturés (g/l)	220	10	1.33
Hydrates de carbone (g/l)	50	48	49
Fibres (g/l)	0.0	0.0	0.0
Sodium (mg/l)	440	373	420
Potassium (mg/l)	1560	1620	1593
Calcium (mg/l)	1180	1193	1160
Phosphore (mg/l)	880	933	1000
Magnésium (mg/l)	100	100	100
Fer (mg/l)	2	0	0
Zinc (mg/l)	0,8	0,8	0,6
Vit. A (µg/l)	360	220	13.33
Vit. B1 (mg/l)	0,4	0,4	0,4
Vit. B2 (mg/l)	1.73	1.8	1.8
Vit. B12 (µg/l)	4.73	2.73	2.33
Vit. C (mg/l)	10	20	20
Vit. D (µg/l)	4	0	0

Tableau 2 : La composition nutritionnelle du lait pour 1litre (1000g)



	Fromage
Energie (Kcal)	95
Protéines (g/)	5.0
Graisses (g/)	5.3
Acides gras saturés (g)	3.3
Hydrates de carbone (g)	7.1
Fibres (g)	0.0
Sodium (mg)	66
Potassium (mg)	234
Calcium (mg)	177
Phosphore (mg)	132
Magnésium (mg)	15
Fer (mg)	0.3
Zinc (mg)	0.8
Vit. A (µg)	54
Vit. B1 (mg)	0.06
Vit. B2 (mg)	0.26
Vit. B12 (µg)	0.71
Vit. C (mg)	1.5
Vit. D (µg)	0.6

Tableau 3 : La composition nutritionnelle du fromage pour 33g

4- Techniques de traitement du lait



Pour devenir lait de consommation, le lait cru subit des traitements purement physiques comme la standardisation (contrôle de la matière grasse), l'homogénéisation ou bien évidemment les traitements thermiques (Pasteurisation, stérilisation, séchage et Ultra-Haute température).

- Selon le taux de la matière grasse : la technologie de l'écémage sert à faire des produits laitiers de régime.

Le lait entier C'est un lait traité, sa teneur en matière s'élève à 3,50 % au minimum.

Le lait demi-écémé C'est un lait traité dont la teneur en matière grasse a été ramenée à un taux qui s'élève à 1,50 % au minimum et à 1,80 % au maximum.

Le lait écémé C'est un lait traité dont la teneur en matière grasse ne peut excéder 0,50 %.

- Selon le traitement thermique: Ce traitement sert à la conservation du lait la plus longue période possible.

Le lait pasteurisé c'est le lait obtenu par un traitement mettant en œuvre une température élevée pendant un court laps de temps.

Le lait stérilisé est le lait préalablement conditionné dans un emballage hermétique, puis chauffé pendant 15 à 20 minutes à une température de 115-120°C afin de détruire tous les germes susceptibles de s'y développer. Il se conserve à température ambiante, tant que l'emballage n'a pas été ouvert.

Le lait stérilisé UHT est un lait soumis à un procédé dit d'ultra haute température qui est un procédé de longue conservation qui permet d'écourter le temps de chauffage : les qualités gustatives du lait sont mieux préservées qu'avec la stérilisation simple. Il s'agit de porter rapidement le lait à la température de 135°C minimum pendant 2 à 4 secondes, puis de le conditionner dans une ambiance stérile.

Le lait en poudre (Lait totalement déshydraté) est un lait auquel on a enlevé la quasi totalité de son eau pour n'en conserver que l'extrait sec.

Il peut être fabriqué par atomisation ou le lait est projeté sous forme de fines gouttelettes dans un flux d'air chaud (150 à 300 C°) et sec ou par séchage sur cylindres ou le lait est versé en continu et en très fine couche sur des rouleaux tournants.



On peut distinguer différents types de laits en poudre selon le type du lait utilisé en ce qui concerne la matière grasse (lait en poudre 1% → lait écrémé, lait en poudre 26% → lait demi écrémé, lait en poudre 42% → Lait entier).

III- Les produits laitiers

Avec l'augmentation démographique dans le monde, le besoin en lait augmente aussi, ce qui a poussé les fermiers à penser à la création des vaches laitières dont leur seul but est la production du lait.

Selon les races, la quantité du lait issu des vaches laitières peut atteindre à certaines périodes plus de 30 litres par jour. La production d'une bonne vache laitière varie entre 4.000 et 7.000 litres de lait par lactation.

Cette disponibilité du lait, a débouché sur la découverte de nombreux produits dérivés, dans le but de le conserver sous forme des yaourts et de différents produits laitiers connus et qui occupent une place incontournable dans notre alimentation.

1- Beurres

Le beurre animale, contrairement au beurre végétal, est un produit totalement naturel, produit à partir du lait à l'état cru. Il peut être consommé nature, notamment en accompagnement du pain ou comme corps gras pour la cuisson des aliments, ou utilisé dans des préparations culinaires et notamment pâtisseries.

2-Fromages

Qu'ils soient frais ou fermentés, tendres ou dures, les fromages, autre variété des produits laitiers, ont vu le jour depuis il y a longtemps. Ils diffèrent par leurs modes de préparation (affinage, égouttage, pressage, cuisson...) et l'origine du lait utilisé (vache, brebis, chèvre...) en particulier sa composition en matières grasses.

3- Crème laitière

La dénomination crème est réservée au lait contenant au moins 30 % de matière grasse alors que la dénomination crème légère est réservée au lait contenant entre 12 % et 30 % de matière grasse.



L'obtention de la crème est le résultat d'un processus naturel (l'écémage). Lorsque le lait repose, les globules de la matière grasse, plus légers que l'eau, remontent à la surface et forment une couche de crème, qu'il suffit de récupérer.

4- Jus au lait

Pasteurisé et consommé de préférence frais, le Jus au lait est un mélange de plusieurs ingrédients (laits, poudre, texturants ...) homogénéisés et stabilisés par l'ajout de l'acide citrique.

5- Leben

Historiquement, LEBEN fait parti des premières dérivées laitières, C'est un lait fermenté caractérisé par son goût acide qui est dû à l'action continue des bactéries lactiques principalement les *lactobacillus acidophilus*.

Commercialisé sous forme de boisson, le produit présente une source nutritive et rafraîchissante pour les consommateurs marocains.

6- Yaourts

Le yaourt est le produit laitier le plus consommé, il en résulte de la fermentation du lait par deux bactéries lactiques thermophiles (*Streptocoques thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus*), cette fermentation conduit à la coagulation du lait.

Selon le procédé de fabrication on trouve diverses textures : ferme, brassée ou liquide.

IV- Les probiotiques

L'industrie laitière investie un grand chiffre dans le domaine de la recherche et de l'innovation afin d'augmenter sa gamme de produits tout en prenant en considération le bien être du consommateur. Parmi les produits les plus répons ces dernières années, une nouvelle variété de Yaourt a vu le jour. Il s'agit des **yaourts aux probiotiques** qui sont définis comme yaourtsensemencés par les habituels ferments lactiques en plus des bactéries ayant un effet probiotiques tel que les bifidobactéries.



1-Découverte

En 1899, une nouvelle bactérie était identifiée par l'Institut Pasteur : le *Bacillus bifidus* communis. En 1978, les Japonais utilisèrent les premiers cette bactérie dans les produits laitiers. La France fit de même en 1981 avec la commercialisation du premier lait fermenté au bifidus. Il existe aussi des laitsensemencés avec le *Lactobacillus acidophilus* (lait à l'acidophilus).

Aujourd'hui, on peut isoler plusieurs sortes de bactéries répondant au terme générique de **bifidus**. Les plus célèbres sont le *Bifidobacterium longum* et le *bifidum*, présentes dans l'intestin des nouveau-nés.

2-Terme « probiotique »

Le terme « probiotique » a bénéficié de plusieurs définitions qui ont évolué dans le temps en fonction des connaissances scientifiques et des avancées.

Une des premières définitions des probiotiques comme « *facteurs promoteurs de croissance produits par des microorganismes* » a été proposée par **Lilly et al** [1]. Plus tard, **Fuller** propose une définition très proche du sens actuel : « *supplément alimentaire microbien vivant qui affecte de façon bénéfique l'hôte en améliorant l'équilibre de sa flore intestinale* ». [2]

Récemment, les probiotiques se définissent comme « *des cultures microbiennes vivantes survivant le transit gastro-intestinale, où elles colonisent le système* » [3]. D'autre part selon **Margoles et al**, le terme probiotique se réfère à des « *cultures de microorganismes vivants qui, lorsqu'ils sont administrés à l'homme ou aux animaux (par le biais de cellules déshydratées ou des aliments fermentés), améliorent les propriétés de la microflore autochtone de l'hôte* ». [4]

Cependant, la définition la plus largement acceptée du terme est celle de la consultation mixte d'experts (**FAO/OMS**) qui redéfinit les probiotiques comme « *des microorganismes vivants qui, lorsqu'ils sont administrés en quantités adéquates (dans le cadre de l'alimentation), confèrent un bénéfice pour la santé de l'hôte* » [5]. Ce groupe a reconnu que les probiotiques doivent être capables d'exercer des prestations de santé sur l'hôte grâce à la croissance et / ou l'activité dans le corps humain.

3-Caractéristiques des probiotiques.



La différence avec un yogourt traditionnel, qui peut également présenter des bénéfices pour la santé, c'est que les ferments traditionnels ne sont pas supposés survivre à la digestion et arriver vivant dans le côlon. Par contre un probiotique doit répondre à certains critères tels que:

- Se présenter sous forme de cellules vivantes.
- Présenter une résistance à l'acidité gastrique et à la bile.
- Etre de qualité alimentaire.
- Etre stable et rester viable pendant la période de conservation de l'aliment.
- Exercer un effet bénéfique sur la santé de l'hôte.

4-Rôles et effets des probiotiques

Les bactéries probiotiques peuvent exercer leur rôle bénéfique de plusieurs manières. Certaines produisent des substances antimicrobiennes, d'autres entrent directement en compétition avec les bactéries pathogènes, d'autres encore modulent le système immunitaire de l'individu.

4-1-Mécanismes d'action des probiotiques

La transformation des aliments et les technologies de préparation alimentaire éliminent les bactéries bienfaisantes que nous tirons normalement des fruits et des légumes frais ainsi que des produits laitiers. De même, les antibiotiques tuent les microbes, mais ils peuvent également éliminer les microbes bienfaisants dont dépend notre santé digestive. Egalement, Les produits chimiques, la pollution et les mauvaises habitudes alimentaires ont un effet dévastateur sur les bactéries bienfaisantes présentes naturellement dans notre organisme.

Ces facteurs courants, voir quotidiens, appauvrissent la santé de la microflore (bactéries présents dans l'organisme) et peuvent compromettre **la fonction intestinale, la digestion, la réponse immunitaire et la résistance aux agents pathogènes infectieux.**

Aussi, plusieurs d'études scientifiques [6] indiquent que les [probiotiques](#) peuvent aider l'organisme à devenir plus résistant aux agents pathogènes en introduisant des bactéries bienfaisantes de la flore intestinale.



Compétition pour les nutriments : Pour croître et proliférer au sein de l'intestin, les bactéries bénéfiques vont utiliser les mêmes nutriments que celles pathogènes. La consommation de probiotiques aide à réduire le risque de développement de ces mauvaises bactéries.

Compétition pour les sites d'adhérence : La capacité d'adhérence de la bactérie sur la paroi intestinale est un élément essentiel pour garantir sa prolifération. Là encore une compétition s'opère entre les bonnes et mauvaises bactéries.

En effet, elles doivent être solidement «armées» pour résister au mouvement péristaltique produit par le passage des aliments. Une des fonctions importantes des bactéries probiotiques est de contribuer à prévenir ou de limiter la croissance des bactéries potentiellement pathogènes sur la paroi intestinale. Ces bactéries perturbent la digestion et freinent l'absorption des nutriments. Elles sont connues pour provoquer aussi des troubles intestinaux majeurs tels que la diarrhée ou le vomissement. Dans une microflore intestinale équilibrée, la prédominance de bonnes bactéries permet de limiter ces risques.

4-2- Les principaux effets bénéfiques sur la santé de l'hôte :

Les probiotiques ont pour but d'aider la flore microbienne naturelle de l'intestin, Il est important de mentionner que les effets de la promotion de la santé dépendent de la souche présente dans la formulation du produit, et qu'il n'y a pas une souche probiotique en mesure de fournir tous les avantages.

4.2.1. Soulagement de la constipation

Les lactobacilles peuvent avoir des effets sur la constipation (selles difficiles, dureté excessive des selles, transit intestinal lent) et permettent de réduire l'utilisation de laxatifs, qui ont l'inconvénient majeur d'éliminer différentes substances essentielles à l'organisme comme les acides aminés, les minéraux. [7]

4.2.2. Améliorer la digestion du lactose par l'organisme



L'un des effets des bactéries probiotiques qui a été le plus mis en avant et démontré chez l'Homme est celui qui concerne l'amélioration de l'intolérance au lactose. Chez les personnes souffrant d'intolérance au lactose, un déclin de la production de β -galactosidase est observé au delà de la petite enfance.

Plusieurs études ont montré que la β -galactosidase participait à la digestion du lactose dans l'intestin. En principe, le remplacement du lait par du yaourt conduit à une meilleure absorption et une meilleure tolérance chez les sujets présentant une intolérance au lactose. [8]

4.2.3. Prévention ou raccourcissement de la durée des diarrhées

Des études cliniques ont démontré que la diarrhée, diarrhée aux rotavirus, diarrhée associée aux antibiotiques comme celle causée par *Clostridium difficile*, peuvent être contrecarrées avec succès par l'utilisation de probiotiques tels que : *Lactobacillus rhamnosus*, *Bifidobacterium bifidum*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*. [9] **Cependant, ces effets ne sont pas universels et les probiotiques ne semblent pas efficaces en toutes circonstances.**

4.2.4. Diminution des allergies alimentaires

L'allergie alimentaire du nourrisson se traduit souvent par de l'eczéma atopique. Les traitements curatif et préventif de cette pathologie par des probiotiques ont été évalués lors d'une étude clinique sur 27 enfants nourris au sein et souffrant d'eczéma atopique. Il a été notamment observé qu'après deux mois de traitement avec une formule supplémentée en *Lactobacillus rhamnosus* et *Bifidobacterium lactis*, il y a eu une amélioration plus rapide de l'état atopique. [10] Les mécanismes ainsi que les processus régulateurs de l'allergie sont loin d'être tous connus.

Même si l'on dispose d'un certain nombre de preuves scientifiques montrant que la consommation de probiotiques peut-être bénéfique pour la santé, celles-ci ne concernent qu'une souche spécifiques et ne s'appliquent en aucun cas à l'ensemble des probiotiques.

D'ailleurs, En 2012, les autorités de santé européennes (EFSA, European Food Safety Authority et la Commission européenne) se sont prononcées sur certaines allégations santé des aliments et des compléments alimentaires contenant une très grande variété de probiotiques (de toutes espèces).



Après examen des données scientifiques, elles ont estimé que les produits qu'elles ont examinés ne peuvent **PAS** prétendre toutes les maladies mentionnées. (*annexe1*).

5- Précautions à prendre avec les probiotiques

En l'absence d'études spécifiques, les compléments riches en probiotiques ne devraient ni être pris par les femmes enceintes ou celles qui allaitent ni administrés aux enfants prématurés ou aux personnes souffrant d'un [déficit immunitaire](#), les probiotiques pouvant être responsables d'infections chez les personnes très immunodéprimées.

V- Conditions d'utilisation des probiotiques dans les produits laitiers

Dans les yaourts probiotiques, on utilise habituellement les mêmes souches bactériennes que celles qui servent à la fermentation du lait, c'est-à-dire les *Lactobacillus bulgaricus* et les *Streptococcus thermophilus*. Certaines souches de bactéries lactiques considérées comme étant probiotiques peuvent faire partie du processus de fermentation, alors que d'autres souches sont ajoutées par la suite dans le produit final et n'ont donc rien à voir avec la fermentation.

L'utilisation des probiotiques dans les produits laitiers nécessite une profonde modification de la technologie de sa préparation :

- ✚ Contrairement aux ferments qui peuvent s'ajouter indirectement, on doitensemencer les souches probiotiques directement dans le lait de fabrication.
- ✚ Il faut prendre en soin de bien répartir la culture probiotique dans le lait afin d'obtenir des niveaux d'acidification uniforme à travers la masse du caillé. En outre, il faut ajouter la culture le plus rapidement possible.
- ✚ Il faut respecter les recommandations des producteurs de cultures, les fiches techniques contiennent diverses recommandations sur la température de conservation, la sortie de réfrigérateur avant l'utilisation, la méthode d'ensemencement et la réhydratation.



-
- ✚ Les sachets ouverts ne peuvent pas être conservés très longtemps, la conservation diminue rapidement lorsque l'indice de disponibilité de l'eau s'élève à plus de 0.2.

Parmi les principales familles de bactéries reconnues comme probiotiques, il y a les bifidobactéries qui sont susceptibles de déclencher des effets bénéfiques pour la santé.

VI- Bifidobacterium :

Les bifidobactéries appartiennent à la famille des bactéries lactiques. Elles participent à la fermentation du lait dans le cadre de la fabrication de fromages et de yaourts. De plus, elles produisent de grandes quantités d'acide lactique, ce qui entraîne une baisse du pH qui leur est favorable et qui inhibe la croissance d'autres germes.

1- Définition

Bifidobacterium est un genre d'actinobactérie bifidobactériales. Ces bactéries sont constituées de bacilles de forme irrégulière, anaérobies stricts. La première, Bifidobacterium longum, est isolée en 1899 d'un nourrisson en bonne santé nourri au sein, par Henry Tissier, un chercheur de l'Institut Pasteur.

Il existe 32 espèces de Bifidobacterium, les plus connus :

- *Bifidobacterium breve* colonise le gros intestin des nourrissons.
- *Bifidobacterium dentium* rencontré dans les caries et les abcès dentaires.
- *Bifidobacterium lactis* augmente l'activité antimicrobienne et facilite le transit intestinal.
- *Bifidobacterium longum* retrouvé dans l'intestin de l'enfant et de l'adulte intervient dans l'équilibre de la flore intestinale.



- *Bifidobacterium bifidum* est l'espèce la plus abondante, elle prédomine dans l'intestin du nouveau-né.

2- Caractéristiques

Les bifidobactéries sont des bâtonnets aux formes variées (bifide ou ramifié) dont la caractéristique principale est une forme en Y. Les bifidobactéries sont Gram +, immobiles, non productrices de gaz, anaérobies et dont la composition de leurs peptidoglycanes est très variable. La température de croissance des bifidobactéries varie respectivement de **36** à **38**°C et de **41** à **43**°C et à des valeurs de pH comprises entre **6,5** à **7**. Les espèces les plus utilisées comme probiotiques sont *Bifidobacterium lactis* et *Bifidobacterium longum*.

Les bifidobactéries doivent également être technologiquement adaptés à interagir dans les produits alimentaires, tels qu'ils conservent à la fois la viabilité et l'efficacité dans les produits alimentaires (sur une échelle commerciale) pendant et après la consommation. Ces probiotiques doivent être capables de survivre aux applications industrielles (par exemple la transformation des produits laitiers).

2- Isolement et dénombrement

Le but des techniques de numération (ou dénombrement) est de déterminer la concentration en bactéries contenues dans une préparation initiale. Elles nécessitent une ou plusieurs dilutions décimales (au dixième).

Elles peuvent se réaliser :

- ✓ En milieu solide :
 - en surface
 - ou dans la masse
- ✓ En milieu liquide.

La gélose MRS (Man, Rogosa et Sharpe) est utilisée pour la culture et le dénombrement des bactéries lactiques dans les produits laitiers. C'est un milieu de culture dit **sélectif** qui permet



uniquement la culture de certains genres de micro-organismes en ajoutant des éléments qui inhibent la croissance des micro-organismes indésirables comme le chlorure de sodium à forte concentration, le thiosulfate de sodium, le cristal violet ou certain antibiotiques.

Les produits laitiers aux probiotiques appartiennent à la catégorie des produits laitiers fonctionnels qui ont montré une croissance impressionnante au cours de la dernière décennie.

Depuis 2006, on compte plus de 600 produits alimentaires aux probiotiques commercialisés par l'industrie laitière dans le monde (crèmes glacées, fromages, laits en poudre, desserts glacés, yaourts ...). Cependant, la viabilité et la stabilité de ces micro-organismes dans ces produits ne sont pas assez connues à nos jours, que ça soit avant ou après les dates limites de consommation de ces produits.

I- Objectif

Le but de cette étude est de contribuer à l'éclaircissement d'une partie de l'existence des probiotiques dans un produit laitier qu'est le YAOURT. Pour aboutir à cet objectif, nous avons travaillé sur deux volets :

1er volet : Suivi du pH et de son effet sur la croissance des bifidobacteries et leur viabilité pendant 21 jours dans un yaourt bifidus préparé à l'usine.



2eme volet : Etude des facteurs influençant la stabilité et la viabilité des bifidobacteries ensemencées dans un yaourt que nous avons préparé au laboratoire.

II- Chaîne de fabrication du yaourt

Afin de mener à bien cette étude, une description des étapes essentielles de la fabrication du produit fini est nécessaire.

Au niveau de la société, la chaîne de préparation des produits laitiers est composée de plusieurs étapes aussi importantes les unes que les autres, vu que la défaillance de l'une d'elles influe directement sur la qualité du produit fini. (Figure 5).

Une étude récente a permis de mettre en place un système de contrôle HACCP qui évalue et maîtrise les dangers concernant la sécurité des produits laitiers et ce de la réception de la matière première jusqu'au produit fini. [11]

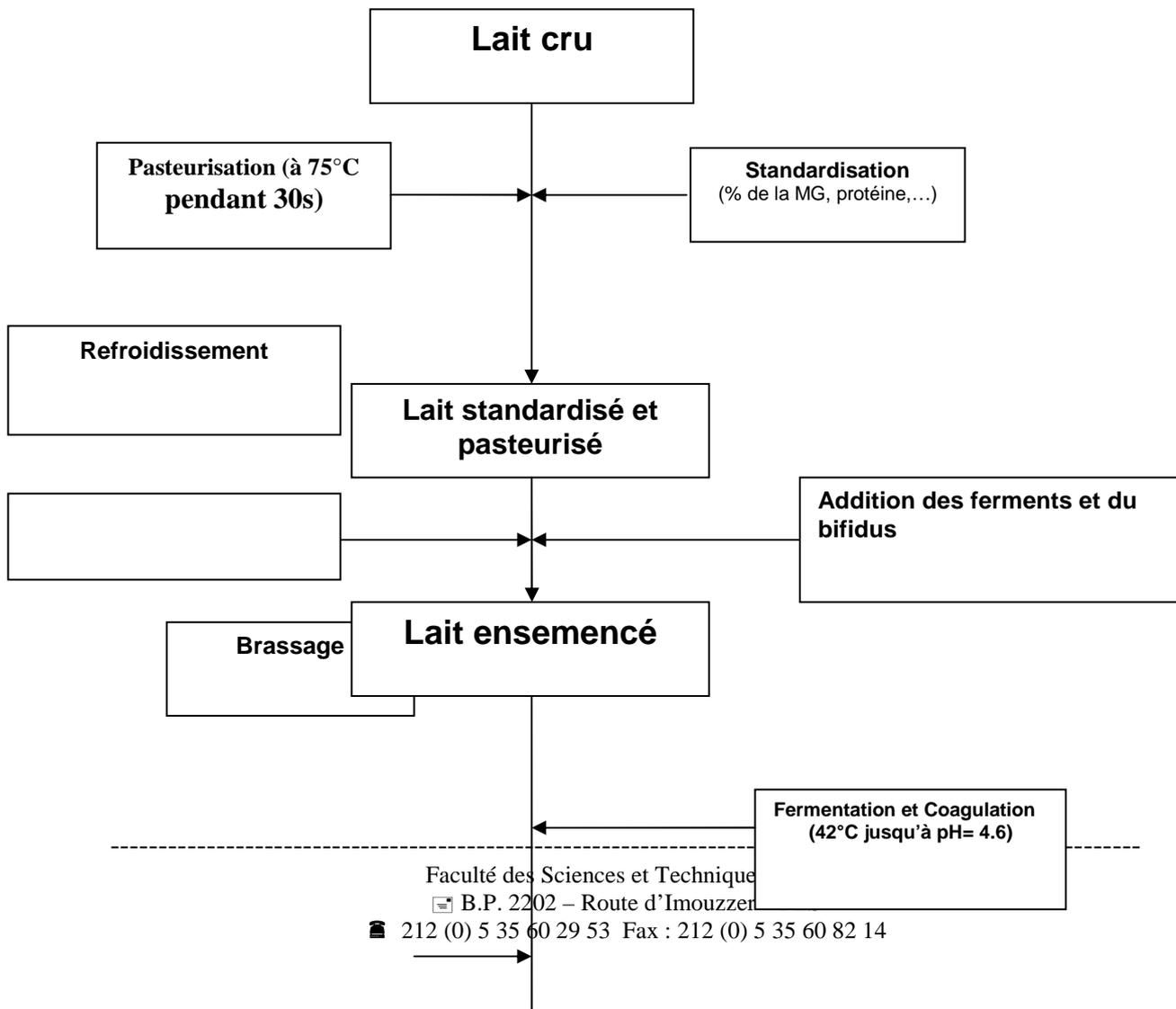




Figure 6 : Procédé de fabrication du yaourt brassé

1- description des étapes de fabrication

a- De la traite à la laiterie

La matière première du yaourt est le lait, comme pour tous les produits laitiers. Le traitement de cette matière première entre donc dans le cycle de fabrication du yaourt. Le lait nécessaire à la fabrication du yaourt est collecté dans des fermes laitières, où les vaches sont élevées et traitées, en respectant des règles d'hygiène strictes. Le lait ainsi collecté par camions-citernes isothermes prend ensuite la direction de laiterie, où il sera analysé pour vérifier sa qualité.

b-Standardisation

La standardisation peut se faire en cuvée ou en continu. Dans le premier cas, il s'agit de mélanger dans un réservoir du lait entier, du lait écrémé ou encore de la crème dans des proportions calculées pour arriver au pourcentage de matière grasse désiré dans le mélange.

Quant au procédé en continu, il peut être plus ou moins automatique. Ainsi, on peut, de façon contrôlée, injecter du lait écrémé dans le lait entier en direction vers la pasteurisation.

c-La pasteurisation

La pasteurisation est un traitement par la chaleur de certaines denrées alimentaires qui a pour but de détruire :

- **La totalité de la flore pathogène quand elle existe.**
- **La presque totalité de la flore banale.**



En même temps, ce traitement doit altérer le moins possible la structure physique de l'aliment, ses équilibres chimiques et les molécules fragiles telles que les vitamines.

Le chauffage doit être suffisant pour détruire les formes végétatives des germes pathogènes. Le germe pathogène le plus résistant à la chaleur dans le lait est le bacille tuberculeux.

Après ce traitement thermique, le lait doit être aussitôt refroidi à 40°C.

d- L'ensemencement

Avant d'être ensemencé, le lait est refroidi et maintenu à une température de 40°C, température à laquelle les enzymes présents dans les ferments lactiques effectueront au mieux leur tâche. L'ensemencement consiste ainsi à introduire des ferments lactiques spécifiques dans le lait, afin que celui-ci prenne une nouvelle consistance. Les règles de fabrication d'un yaourt sont ainsi strictes : pour faire un yaourt on doit introduire deux types de ferments lactiques, le *Lactobacillus bulgaricus* et le *Streptococcus thermophilus*.

e- Fermentation

En présence des ferments lactiques, qui secrètent la lactase, l'enzyme responsable de la fermentation lactique, le lactose subit une rupture par hydrolyse avec formation de glucose et galactose.

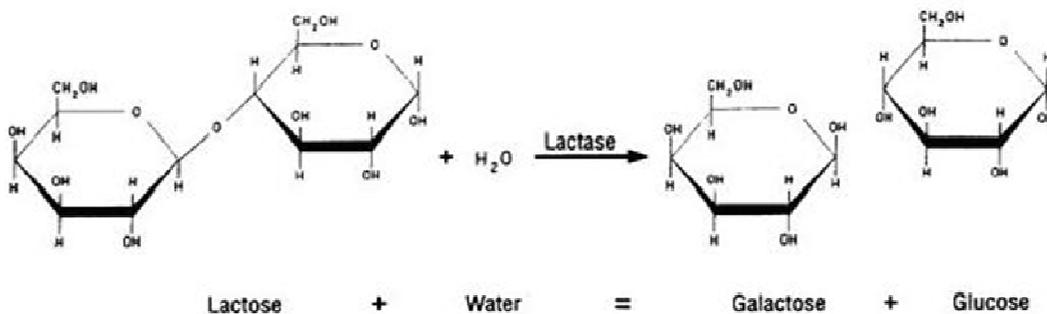
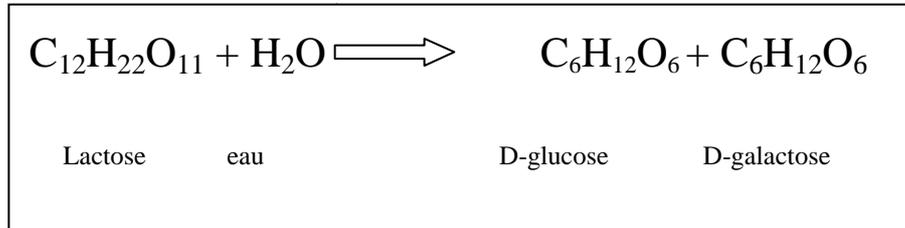


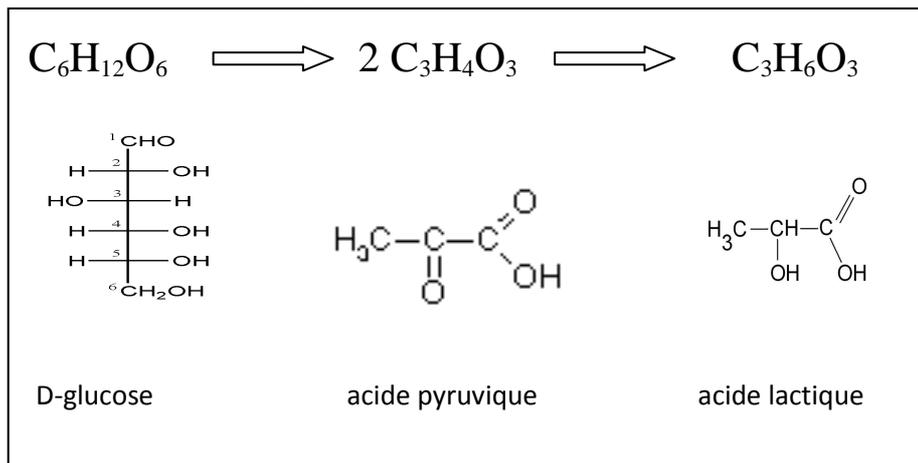


Figure 7 : Dégradation du lactose

Ces structures cycliques du glucose et du galactose ne diffèrent que par la configuration due à la position spatiale du groupe hydroxyle OH porté par l'atome du carbone 4.



Toujours en présence des enzymes de ces ferments, le glucose et le galactose sont transformés en plusieurs étapes en acide lactique.



Lors de la fermentation, la souche du bifidus transforme elle aussi le lactose en acide lactique et acide acétique.

2-Méthode de fabrication du yaourt bifidus au Laboratoire

Nous avons adopté le procédé de préparation utilisé à l'échelle industriel :

Ingrédients : lait entier, lait en poudre, crème, sucre et texturant (amidon).

Mode opératoire:

- Préchauffage du mélange lait et crème.
- Ajout du sucre, la poudre et le texturant.



- Pasteurisation du mélange à 72°C suivi du refroidissement jusqu'à 40°C (la température convenable pour la croissance des bactéries).
- Ajout de la quantité nécessaire de ferments et de probiotiques.
- Etuvage à 42°C jusqu'à l'obtention d'une valeur de pH de 4,6.
- Refroidissement à l'eau glacée afin d'arrêter l'activité des micro-organismes
- Conditionnement du produit fini (mise en pot et l'ajout de l'arome ou de fruits pour les yaourts fruités ou aromatisés).

III- Démarche suivie

Afin d'atteindre notre objectif, nous avons choisi la démarche ci après:

1- Echantillonnage

- Préparation du yaourt brassé au bifidus au laboratoire.
- Prélever un échantillonnage pour les deux types de bifidus préparés à l'usine.
- Cet échantillonnage concerne :
 - Produit après maturation (**Jour J**)
 - Produit fini: **J+1, J+7, J+14, J+21**.

2- Essais

- Suivi du pH.
- Analyses microbiologiques du produit fini.
- Isolement et dénombrement de bifidobactéries.

3- Interprétation des résultats

Faire un bilan de toutes ces analyses et donner une interprétation aux résultats obtenus afin de répondre à toutes les questions et présenter l'amélioration convenable pour chaque anomalie si c'est nécessaire.



IV- Les essais de dénombrements des probiotiques

Nous avons effectués des analyses microbiologiques sur nos échantillons (**annexe2**). Les résultats obtenus n'indiquent pas de contamination que ça soit par les coliformes fécaux, coliformes totaux, levures et moisissures.

Le milieu utilisé (**annexe 3**) est une gélose conservée à 37°C pour éviter de se solidifier.

L'ensemencement se fait en profondeur pour créer l'anaérobiose nécessaire pour la croissance des bifidobactéries.

1- Isolement et dénombrement

1-1- Méthode de dénombrement

La méthode de dénombrement des germes consiste à :

- Prélever un échantillon de culture ou de produit à examiner.
- Diluer l'échantillon en milieu aqueux.
- Cultiver une fraction de l'échantillon dilué sur un milieu agar MRS en conditions anaérobies.
- Dénombrer les colonies issues des germes sur le milieu.
- Calculer le nombre original en fonction du facteur de dilution.

1-2- Milieu de culture

La gélose MRS (Man, Rogosa et Sharpe) est utilisée pour la culture des bactéries lactiques dans les produits laitiers et les autres produits alimentaires ainsi que dans les produits destinés à l'alimentation animale. Ce milieu permet de cultiver des germes à croissance ralentie tels que *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* et *Streptococcus*.

a- composition

La gélose MRS est un mélange de plusieurs produits et sels qui jouent un rôle spécifique dans la culture de ce type de bactéries. Cette recette contient :

- La peptone, le glucose et les sels de manganèse et de magnésium apportent les éléments nutritifs indispensables à la croissance des lactobacilles.



- Le Tween 80, mélange d'esters oléiques, est une source d'acides gras nécessaires à la croissance de ces germes.
- Le phosphate dipotassique contribue à stabiliser le pH au cours de la croissance bactérienne.
- **Le citrate d'ammonium et l'acétate de sodium** constituent les substances inhibitrices du développement de la plupart des contaminants tels que les streptocoques et les moisissures.

b- Préparation du milieu de culture

- Mettre en suspension 60.2 g de milieu déshydraté dans 1 litre d'eau distillée ou déminéralisée.
- Porter lentement le milieu à ébullition sous agitation constante et l'y maintenir durant le temps nécessaire à sa dissolution.
- Répartir en tubes ou en flacons.
- Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes.

c- Mode d'emploi

- Refroidir et maintenir le milieu à 47°C.
- Ajouter, si nécessaire, les solutions antibiotiques souhaitées.
- Transférer 1 ml du produit à analyser et de ses dilutions décimales dans des boîtes de Pétri stériles.
- Couler 15 ml de milieu.
- Homogénéiser parfaitement.
- Laisser solidifier sur une surface froide.
- Incuber à 30 ou 37°C pendant 2 à 3 jours.

d- Lecture



Procéder au comptage des colonies pour chaque boîte contenant 300 colonies au maximum.
Réponse culturelle typique après 72 heures d'incubation en atmosphère CO₂.

2- Préparation des échantillons à dénombrer

Le but de la numération (ou dénombrement) est de déterminer la concentration en bactéries contenues dans une préparation initiale. Elles nécessitent une ou plusieurs dilutions décimales (au dixième).

2-1- Principe de dilution

Dilution d'un yaourt

- Homogénéiser la suspension microbienne à prélever (agitation par mouvements circulaires pendant 10 secondes environ ou à l'aide d'un vortex).
- Ouvrir et flamber l'ouverture du tube.
- Prélever 1 ml de suspension à l'aide de la pipette plastique stérile (ou pipette automatique). Ne pas introduire la pipette dans la suspension de plus de 1 cm.
- Flamber et refermer le tube. Il est conseillé de replacer le tube sur le portoir à une place montrant qu'il a déjà été prélevé (en retrait par exemple).
- Ouvrir le tube de 9 ml de diluant, flamber l'ouverture, y introduire le volume prélevé (sur la paroi sans toucher le liquide).
- Flamber et refermer le tube, jeter la pipette souillée dans le bac à eau de Javel.

Dilutions en série (ou successives) 10, 10², 10³, ...

Chaque dilution nécessite un tube de diluant de 9 ml et d'une pipette stérile de 1 ml. Ainsi, la réalisation d'une gamme de dilutions jusqu'à 10⁵ nécessite : 5 tubes et 5 pipettes. Exemple : la dilution 10⁵ sera effectuée en prenant 1 ml de la dilution 10⁴ préalablement homogénéisée qui sera introduit dans un tube contenant 9 ml de diluant.

2-2-Incubation

Les bactéries à dénombrer, présentes dans l'inoculum, sont introduites soit à la surface, soit dans la masse du milieu gélosé. Chaque bactérie isolée donne naissance à une colonie ou « unité formant colonie » (UFC).



Le dénombrement dans la masse s'effectue sur 1 ml de dilution.

- Homogénéiser la dilution à prélever.
- Prélever 1 ml et déposer la dilution dans le fond de la boîte en la répartissant en gouttes.
- Couler aseptiquement environ 15 ml de milieu gélosé légèrement refroidie (à une température pour laquelle le tube peut être tenu dans la main sans se brûler, permettant la survie des micro-organismes et pour laquelle la gélose ne prend pas en masse).
- Homogénéiser en imprimant à la boîte de Pétri fermée des mouvements circulaires (en dessinant des 8 sur la paillasse).
- Laisser refroidir la gélose sans la bouger.

V-Résultats

Après 72h d'incubation, nous sommes devant 2 types de colonies et par conséquent 2 types de bactéries, les lactobacillus (bactérie habituelle du yaourt) et les bifidobactéries (ensemencés pendant la fabrication).

La méthode la plus facile pour le dénombrement des bifidobactéries, est l'utilisation d'un antibiotique qui est le nafcilline qui va inhiber la croissance des lactobacillus. Mais à cause de la non-disponibilité de cet antibiotique, nous avons utilisé un test pour pouvoir différencier entre les deux bactéries et dénombrer notre bactérie.

1- Test de confirmation

Après l'obtention des colonies, ces dernières sont soumises aux principaux tests d'identification qui sont les suivants : examens macroscopique et microscopique.

a. Examen macroscopique

Ce test vise à apprécier la taille des colonies, leurs couleurs et leurs formes, si elles sont opaques ou translucides sur boîte de Pétri.

➔ Colonies circulaires grises-blanches : *Bifidus lactis*.

➔ Colonies lenticulaire : *Lactobacillus bulgaricus*.

b. Examen microscopique



L'examen microscopique est révélé par la coloration de Gram qui permet de mettre en évidence les propriétés de la paroi bactérienne, et d'utiliser ces propriétés pour les distinguer et les classer. Son avantage est de donner une information rapide sur les bactéries présentes dans un produit ou un milieu tant sur le type que sur la forme.

Voici les différentes étapes de cette coloration

- Coloration par le **crystal violet**. Laissez agir de 30 secondes à 1 minute et rincer à l'eau.
- Ajout du **lugol** : étalez le **lugol** et laissez agir le même temps que le cristal violet et rincez à l'eau
- Décoloration rapide à l'alcool est l'étape la plus importante de la coloration : versez goutte à goutte l'alcool ou un mélange alcool-acétone sur la lame inclinée obliquement, et surveillez la décoloration qui doit être rapide. Rincez abondamment avec de l'eau déminéralisée pour stopper la décoloration.
- Recoloration à la **fuchsine**. Mettez de l'eau distillée sur la lame et quelques gouttes de Fuchsine. Laissez agir de 30 secondes à 1 minute. Lavez doucement à l'eau déminéralisée. Séchez la lame sur une platine chauffante à 50°C.

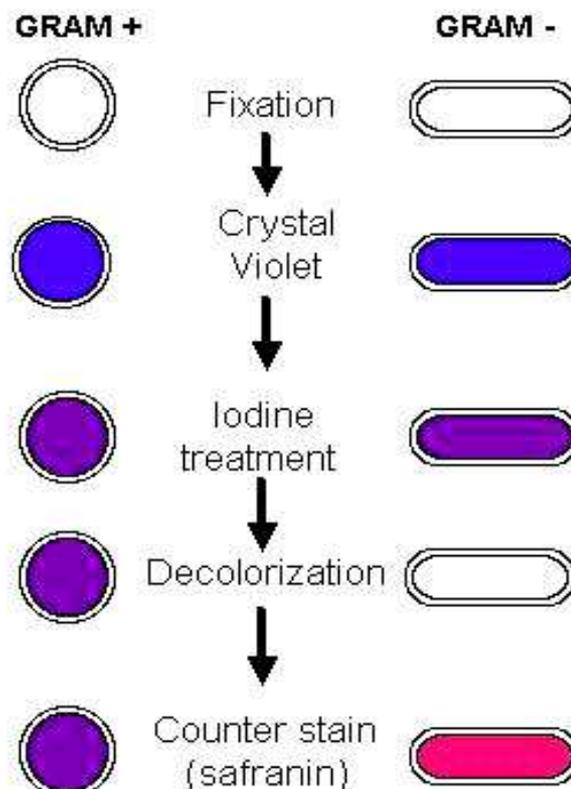




Figure 8 : Démonstration de la coloration de Gram

2- Résultats du Suivi

Une propriété très importante des cultures destinées à être utilisée comme probiotiques est qu'elles doivent demeurer viables pendant le stockage avant la consommation. Toutefois, de telles cultures alimentaires ne joueront pas un rôle efficace dans les produits biologiques, sauf si elles sont présentes en un nombre suffisant de cellules viables au moment de la consommation.

2-1-Résultats du suivi pour le yaourt bifidus Muesli

Nous avons fait un suivi pour le yaourt Muesli sur trois différentes fabrications pendant 21 jours.

	Jour J	J+1	J+7	J+14	J+21
Moyenne pH	4.55	4.52	4.40	4.28	4.23
Moyenne B.B	$19,66 \times 10^7$	$18,33 \times 10^7$	$15,33 \times 10^7$	11×10^7	$8,33 \times 10^7$

Tableau 4 : Suivi de bifidobacteries et du pH pour le yaourt Bifidus Muesli pendant 21 jours

a- Suivi pH

Dès la coagulation du lait, le pH atteint une valeur de 4.6, une fois conditionné et stocké à 4°C, le pH du yaourt doit normalement rester stable au cours de la conservation.



Mais on assiste à une diminution toujours dans les normes qui peut être due à l'ouverture momentanée des chambres froides.

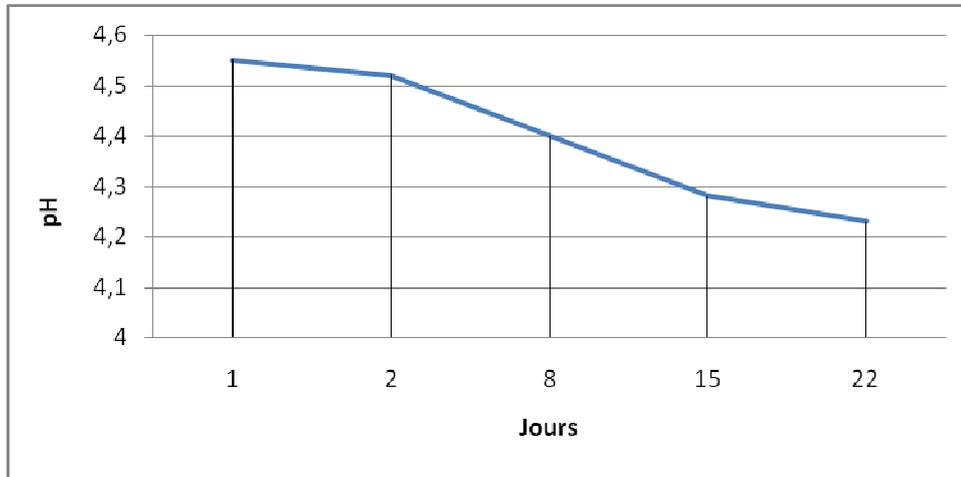


Figure 9 : Suivi du pH du yaourt Muesli au bifidus pendant 21 jours

b- Suivi de Bifidobacteries

Après l'ensemencement du bifidus, le lait est étuvé pour devenir yaourt, il résulte de cette coagulation la multiplication de ces bactéries probiotiques. La concentration du bifidus doit rester stable tout au long de la conservation.

Dans ce suivi, on remarque que le nombre du Bifidobacterium diminue après 21 jours de sa conservation.

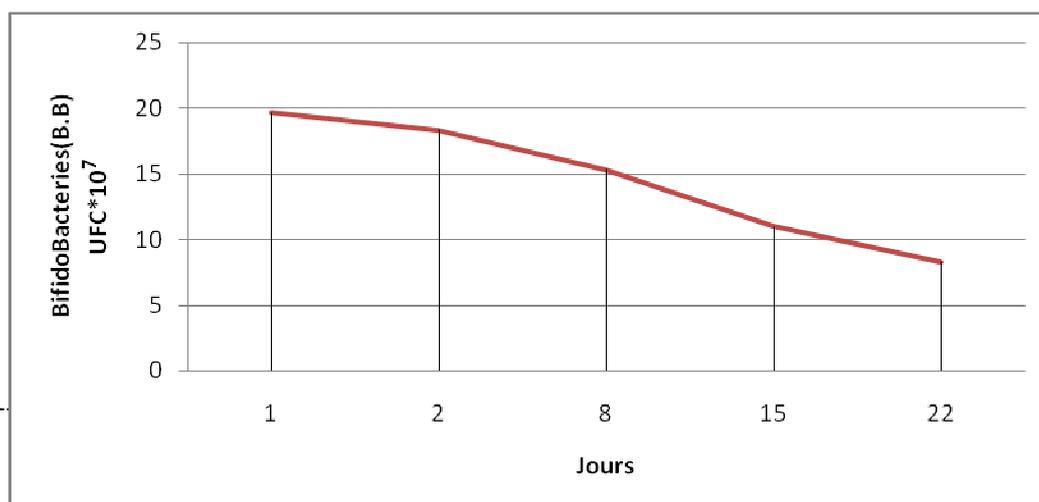




Figure 10 : Suivi du BifidoBacteruim (B.B) du yaourt Muesli au bifidus pendant 21 jours

2-2- Résultats du suivi pour le yaourt Bifidus nature :

Nous avons fait un suivi pour le yaourt Muesli sur trois différentes fabrications pendant 21 jours.

Tableau 5 : Suivi de bifidobacteries et du pH pour le yaourt Bifidus nature pendant 21 jours

a- Suivi pH

On assiste à une diminution du pH au cours des 21 jours qui est toujours dans les normes et qui peut être due aux conditions de stockage.

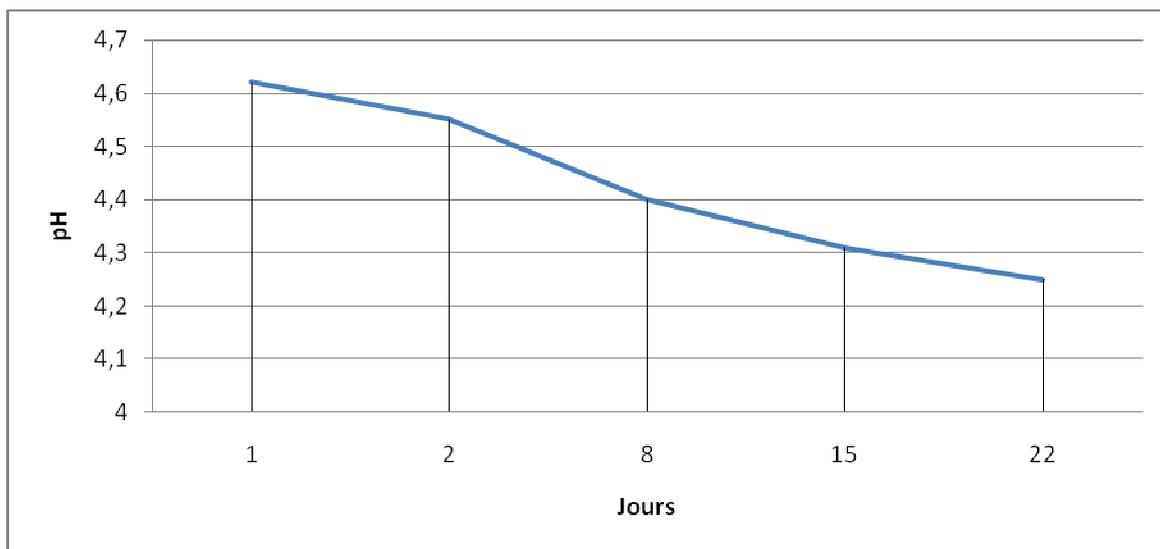


Figure 11 : Suivi du pH du yaourt nature au bifidus pendant 21 jours

b- Suivi de Bifidobacteries

Dans ce suivi, on remarque que le nombre du Bifidobacterium diminue de $23 \cdot 10^7$ à $10 \cdot 10^7$ après 21 jours de sa conservation.

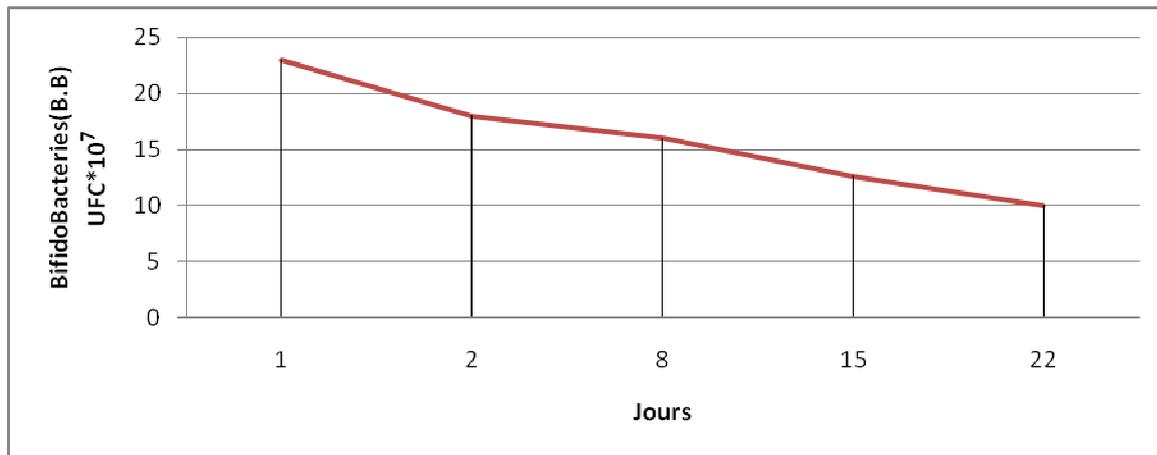


Figure 12 : Suivi du BifidoBacteries (B.B) du yaourt nature au bifidus pendant 21 jours

Conclusion :

- Le pH a connu presque les mêmes valeurs que ça soit pour le yaourt nature ou le yaourt fruité.

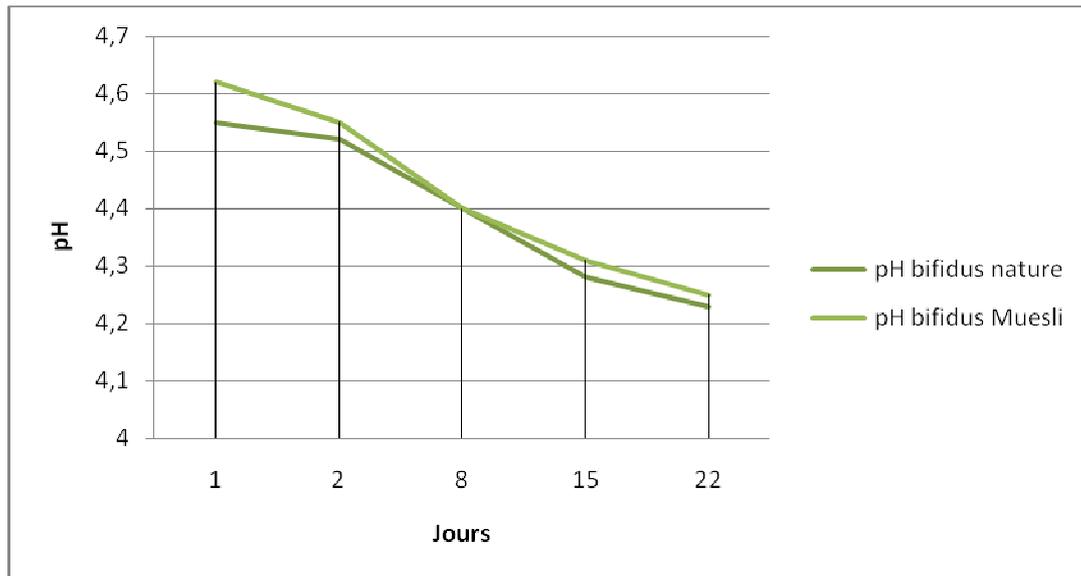


Figure 13 : Evolution du pH pour les yaourts nature et Muesli

- Le dénombrement du BifidoBacterium, lui aussi, a donné les mêmes concentrations pour le yaourt nature que le yaourt fruité.

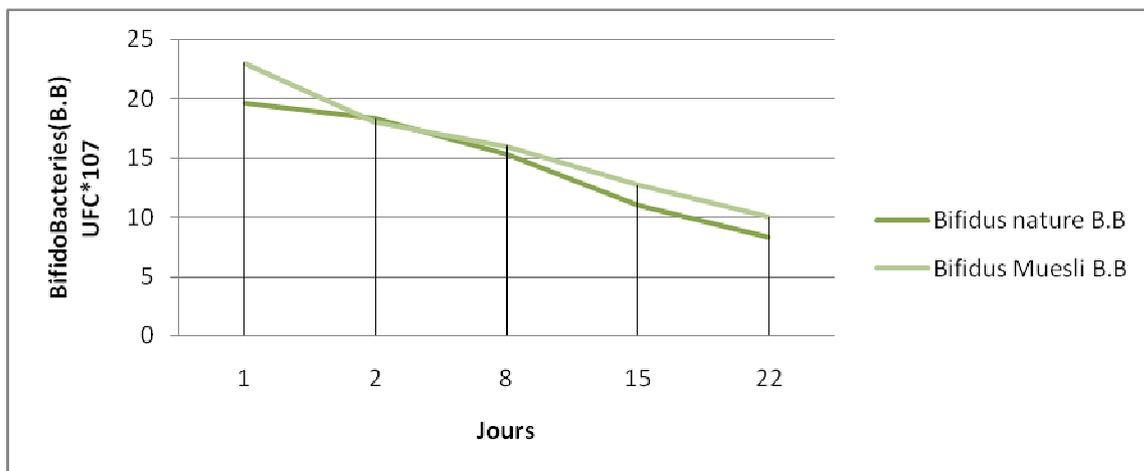


Figure 14 : Suivi des BifidoBacteries (B.B) pour les yaourts nature et Muesli

- ⇒ Le fruit n'a aucune influence sur la valeur du pH ou sur la viabilité du bifidus.

VI-Interprétations des résultats



A-Facteurs influençant la viabilité et stabilité des microorganismes

Pour exercer leur effet bénéfique sur la santé, les probiotiques doivent survivre en grand nombre au procédé de fabrication, et à la période d'entreposage au froid qui s'ensuit. Il est en effet généralement admis qu'un nombre minimal de 10^9 de cellules viables par ml de produit est nécessaire pour exercer un effet probiotique [12]. Cependant, la stabilité physique et génétique des cellules ainsi que toutes les propriétés nécessaires pour exercer leurs bienfaits sur la santé doivent également être assurées. De plus, ces souches devraient être viables sans se multiplier pour ne pas provoquer d'effet indésirable sur le goût ou l'arôme du produit ni augmenter l'acidité.

1- Effet de la température

Le stockage du produit fini est parmi les importants facteurs qui puissent influencer la concentration et la viabilité des bifidobactéries parce que leur stabilité nécessite une température appropriée. C'est pour cela, nous avons préparé un yaourt au bifidus et nous l'avons stocké à température ambiante. (26°C).

Analyse à j+7	A 26°C	A 4°C
Bifidus	8×10^7	16×10^7
pH	4,20	4,4

Tableau 6 : Résultats de bifidobactéries et du pH à température ambiante à J+7

On remarque que la concentration des bifidobactéries est diminuée à moitié à cause de la température qui n'est appropriée ni à la croissance ni à la stabilité de ces bactéries.

2- Effet du potentiel d'hydrogène

La diminution du pH durant la période de conservation du yaourt n'est pas remarquable et qui est toujours dans les normes.

Mais il ne faut pas oublier que le pH est parmi les principaux facteurs qui puissent influencer directement sur la viabilité du bifidus.

C'est pour cela, nous avons préparé un yaourt au bifidus et nous avons baissé son pH à une valeur inférieure à 4.



Analyse à j+7	à pH=3,80	à pH=4,4
Bifidus	10×10^7	16×10^7

Tableau 7 : Résultats de bifidobactéries dans un milieu acide à j+7

On remarque que le pH a un effet sur la viabilité du bifidus, mais la diminution de la concentration n'est pas très remarquable par rapport aux analyses réalisées dans les conditions normales de stockage. Ce qui montre que ces bactéries présentent une résistance à l'acidité.

3- Effet de l'oxygène

Au cours de la production de yaourt, l'O₂ présent dans l'air peut facilement envahir et se dissoudre dans le lait. L'oxygène peut également pénétrer dans le produit à travers les matériaux d'emballage pendant le stockage. L'oxygène affecte les cultures probiotiques de deux façons :

- Premièrement, il est directement toxique pour les cellules, certaines cultures probiotiques sont sensibles à l'oxygène et meurent en sa présence.
- Deuxièmement, dans la présence d'oxygène, certaines cultures produisent le peroxyde.

C'est pour cela, nous avons fabriqué un yaourt aux bifidus et nous l'avons exposé à l'air et voilà les résultats obtenus :

Analyse à J+7	Yaourt ouvert	Yaourt fermé
Bifidus	0.58×10^7	16×10^7

Tableau 8 : Résultats de bifidobactéries du yaourt exposé à l'air à J+1

Donc, En comparant les résultats de cette analyse et les résultats obtenus dans les conditions normales à J+7, on remarque que la concentration des bactéries a connu une forte diminution lors de l'exposition du yaourt à l'air.



4- Le choix des souches

Il est important que la viabilité de la souche et la stabilité des caractéristiques souhaitables soient maintenues pendant la production commerciale, ainsi que dans le produit fini.

Nous avons travaillé sur un produit de concurrence qui estensemencé par le *Bifidus actiregularis*.

	Jour J	J+1	J+7	J+14	J+21
pH	4,62	4,60	4,53	4,39	4,25
B.B	22×10^7	21×10^7	18×10^7	10×10^7	7×10^7

Tableau 9 : Suivi de bifidobacteries et du pH pour un produit de concurrence pendant 21 jours

a- Suivi du pH

On remarque une diminution du pH au cours des 21 jours qui est toujours dans les normes et qui peut être due aux conditions de stockage.

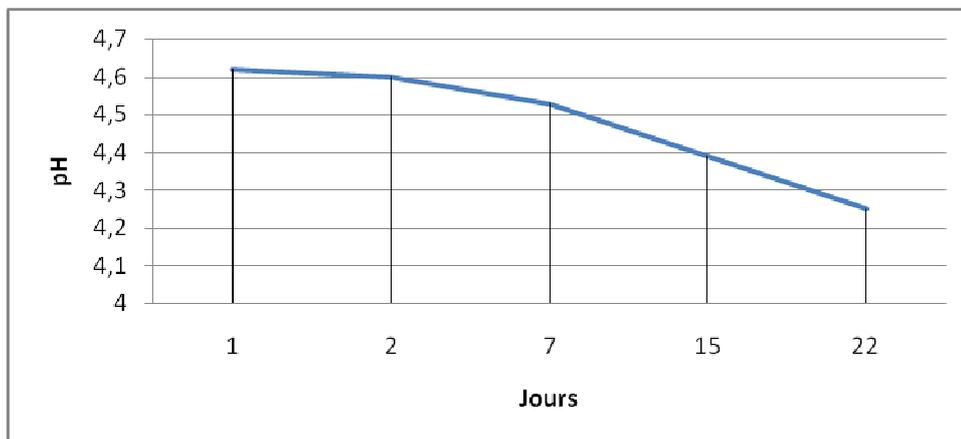


Figure 15 : Suivi du pH du yaourt au bifidus (produit de concurrence) pendant 21 jours

b- Suivi des Bifidobacterium



Dans ce suivi, on remarque que le nombre du Bifidobacterium diminue après 21 jours de sa conservation.

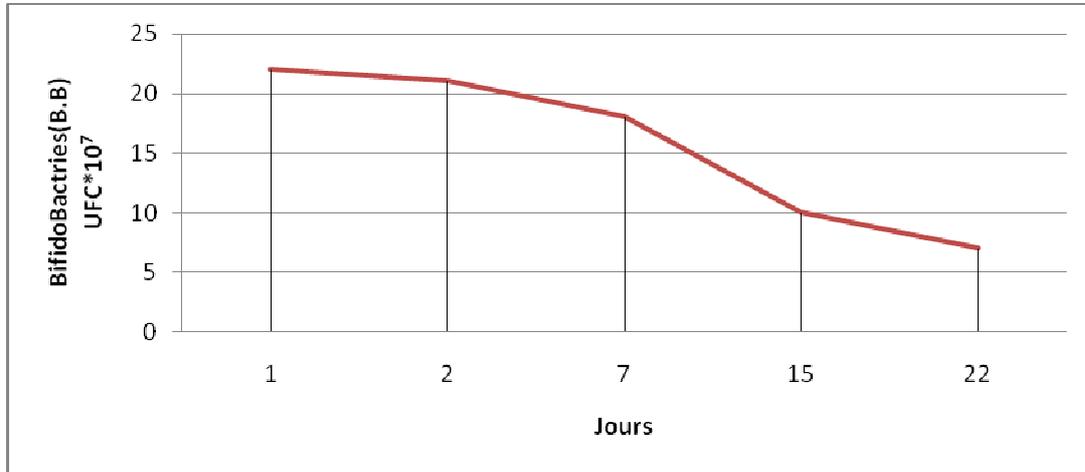


Figure 16 : Suivi du BifidoBacteruim(B.B) du yaourt au bifidus (produit de concurrence) pendant 21 jours

Conclusion :

Comparaison de l'évolution du pH du yaourt Chergui et un autre de concurrence

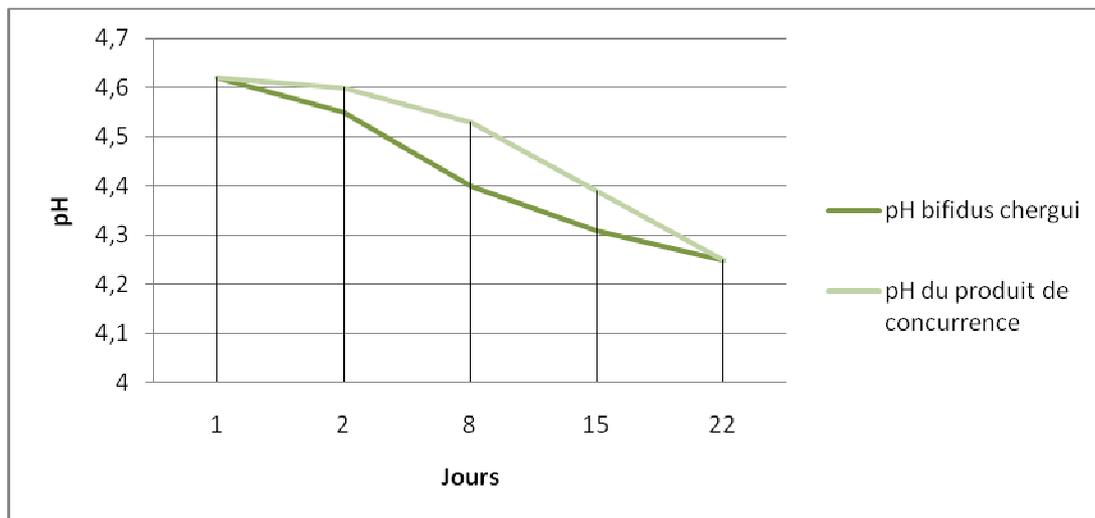


Figure 17 : Suivi du pH du yaourt aux bifidus de Chergui et un autre de concurrence pendant 21 jours.



Comparaison de la concentration des BifidoBacteries du yaourt Chergui et un autre de concurrence

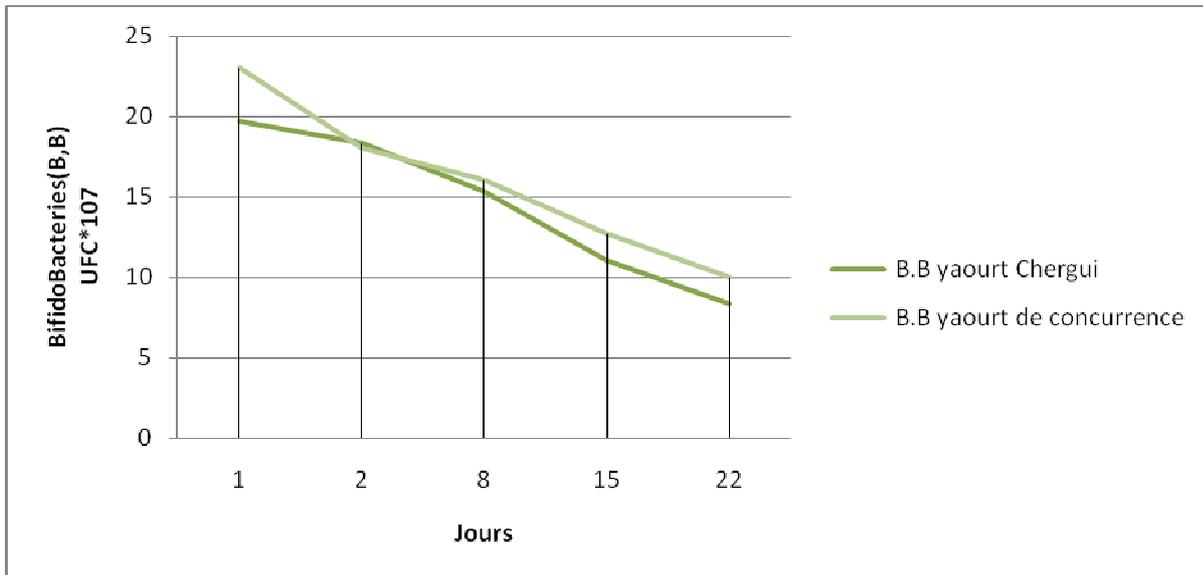


Figure 18: *Suivi de BifidoBacteries du yaourt aux bifidus de Chergui et un autre de concurrence pendant 21 jours*

On remarque qu'il n'y pas une grande différence entre les résultats obtenus dans les analyses des produits chergui et ceux obtenus dans l'analyse du produit de concurrence.



Conclusion & recommandations

L'efficacité des probiotiques dépend de leur viabilité qui doit être maintenue au cours du processus technologique, de stockage et de conservation. De plus, les souches probiotiques commercialisées doivent survivre dans l'environnement du tractus gastro-intestinal. La viabilité des probiotiques est par conséquent un facteur principal dans l'aptitude des souches commercialisées à fournir les effets désirés.

Nous avons énuméré les bactéries lactiques probiotiques livrées dans deux yaourts fabriqués à la société chergui commercialisés en tant que « produits probiotiques ».

L'effet de la température, de l'air et du pH sur la viabilité des probiotiques bifidus ont été examinés par la fabrication d'un yaourt aux probiotiques à l'échelle laboratoire.

Les résultats obtenus lors de notre étude ont montré que la température de stockage, le pH et l'oxygène présent dans l'air ont une influence sur la viabilité et la stabilité des bifidobactéries.

Les perspectives de poursuite de cette étude sont très larges, puisque la recherche sur les probiotiques représente un domaine qui intéresse les scientifiques, les législateurs, les industriels ainsi que les spécialistes du business et marketing. Nous nous contenterons de suggérer ici les recommandations les plus pertinentes aux résultats obtenus dans notre étude :

- *L'incubation du yaourt aux probiotiques à 37°C*

Les yaourts aux probiotiques nécessitent quelques changements dans le procédé de fabrication, et l'incubation est parmi les étapes qui ont une influence sur la viabilité des probiotiques.

Plusieurs recherches ont démontré que l'incubation des probiotiques à 37°C ont donné de très bons résultats par rapport à l'incubation à 42°C.

- *L'ajout des prébiotiques*



Les prébiotiques sont principalement des oligosaccharides et les plus connus incluent: inuline, fructo-oligosaccharides, lactulose, galacto-oligosaccharides et amidons modifiés.

L'association entre un probiotique et un prébiotique, nutriment qui lui est favorable, s'appelle un symbiotique. Cette association a pour objectif d'aider à améliorer la survie du probiotique et d'accroître ses propriétés biologiques. De plus en plus de couples probiotique-prébiotique sont actuellement expérimentés.

- *L'utilisation des capteurs d'oxygène*

La teneur en oxygène est un facteur important pour la viabilité pendant le stockage à froid. **L'acide ascorbique** (vitamine C) agit comme un capteur d'oxygène et est autorisé comme additif alimentaire. En outre, le lait et les produits laitiers offrent seulement 10-15% des besoins quotidiens en vitamine C. Ainsi, la fortification du yaourt avec de l'acide ascorbique pourrait augmenter sa valeur nutritive.

Références bibliographiques

[1] : Lilly D. M. and Stillwell R. H., 1965. Probiotics: Growth-Promoting Factors Produced by Microorganisms.

[2] : Fuller R., 1989. Probiotics in man and animals.

[3] : Saarela M., Lahteenmaki L., Crittenden R., Salminen S. and Mattila-Sandholm T., 2000. Gut bacteria and health foods: the European perspective.



- [4] : **Margoles A. and Garcia L., 2003.** Characterisation of a bifidobacterium strain with acquired resistance to cholera: A preliminary study. *International Journal of Food Microbiology*.
- [5] : **FAO/ OMS, 2001.** World Health Organization. Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria.
- [6] : **Da Cruz A.G., Adriano Gomes C., Jose de Assis F. F. and Susana Marta I. S., 2010.** High pressure processing and pulsed electric fields: potential use in probiotic dairy foods processing. *Trends in Food Science and Technology*.
- [7] : **Guarner F., Khan A., Garisch J., Eliakim R. and Gangl A., 2008.** Recommendation Pratique : Probiotique et prébiotiques. *Organisation mondiale de Gastroentérologie*
- [8] : **De Vrese M., Stegelmann A., Richter B., Fenselau S., Laue C. and Schrezenmeir J., 2001.** Probiotics – Compensation for lactase insufficiency. *American Journal of Clinical Nutrition*.
- [9] : **Wang M. F., Lin H. C., Wang Y. Y. and Hsu C. H., 2004.** Treatment of perennial allergic rhinitis with lactic acid bacteria.
- [10] : **Arvola T., Sutas Y., Moilanen E. and Salminen S., 2000.** Probiotics in the management of atopic eczema. *Clinical and Experimental Allergy*.
- [11] : **Bakri Imane, 2004-2005.** Harmonisation du système HACCP et suivi de sa mise en place dans la production du lait.
- [12] : **Jayamanne V. S. and Adams M. R., 2006.** Determination of survival identity and stress resistance of probiotic bifidobacteria in bioyoghurts.

Annexes



Annexe 2 : Analyses microbiologiques

Les analyses se font au niveau de tous les produits fabriqués et concernent les coliformes fécaux et totaux, les levures et moisissures et la flore mésophile aérobie totale.

a- Dénombrement des coliformes :

Les coliformes sont des entérobactéries qui proviennent de la contamination fécale, ils représentent un indice d'une contamination par défaillance technologique ou hygiénique.

Ils poussent facilement sur les milieux usuels en 24h à 37°C en aérobose et en anaérobose.

- Dénombrement des coliformes (indicateurs d'hygiène dans les produits) dans un milieu de culture approprié.
- Les coliformes totaux se multiplient à 30°C, alors que les coliformes fécaux, qui sont des thermorésistants, peuvent se multiplier à 44°C.

b- Dénombrement de la FMAT :

Dénombrement de la flore mésophile aérobie totale dans un milieu nutritif non sélectif (PCA) à 30°C pendant 72h et donnant des colonies de tailles et de formes différentes.

c- Dénombrement des levures et moisissures :

Dénombrement des levures et moisissures qui sont des micro-organismes formant des colonies à 25°C dans un milieu sélectif (YGC).

Annexe 3 : Milieu de culture

Historique



En 1960, de Man, Rogosa et Sharpe ont développé la formulation d'un milieu spécialement adapté aux cultures des lactobacilles provenant de produits laitiers, ceci sans rajouter de jus de tomate (ingrédient de composition très variable).

Formule-type

(Pouvant être ajustée de façon à obtenir des performances optimales)

Pour 1 litre de milieu :

- Polypeptone.....	10,00 g
- Extrait de viande	10,00 g
- Extrait autolytique de levure	5,00 g
- Glucose.....	20,00 g
- Tween 80.....	1,08 g
- Phosphate dipotassique	2,00 g
- Acétate de sodium.....	5,00 g
- Citrate d'ammonium.....	2,00 g
- Sulfate de magnésium.....	0,20 g
- Sulfate de manganèse.....	0,05 g
- Agar agar bactériologique.....	15,00 g

PH du milieu prêt-à-l'emploi à 25°C : $5,7 \pm 0,1$

Dédicace

Je souhaite dédier ce modeste travail

A mes chers parents, symbole de bonté et de sacrifice, en hommage à leur soutien, à leur sacrifice et à l'éducation qu'ils m'ont inculqué tout au long de notre vie.



A mes frères et sœurs, en leur souhaitant bonheur et succès dans leur vie personnelle et professionnelle.

A tous mes professeurs, source inépuisable de soutien et d'aide.

A tous les étudiants de la FST et plus particulièrement, les étudiants du master CMB.

Les abréviations

FAO= Organisation des Nations Unis pour l'Alimentation et l'Agriculture

g/l = gramme par litre

Ca = Calcium

Na = Sodium

K = Potassium

Cl = Chlore

µg = microgramme

Kcal = Kilocalorie

UHT = ultra haute température

MRS = Man, Rogosa et Sharpe

HACCP = Hazard Analysis Critical Control Point

MG = Matière grasse

B.B = Bifidobacteries

UFC =Unité formant colonie