

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEURE ET DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE 8 MAI 1945 GUELMA

FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE ET SCIENCES DE LA  
TERRE ET DE L'UNIVERS

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE



## Mémoire de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Biologie

Option: Qualité des Produits et Sécurité Alimentaire

### Thème

---

**Effet de la température sur la qualité des jus de fruit.**

**(Cas du jus d'orange)**

---

Présenté par : ALAMA Fatima

BEN ZENACHE Manal

Membres de jury :

Président: Dr. BENYOUNES A.

Maître de Conférences

Examineur : Mr. MOKHTARI AH.

Maître Assistant

Encadreur : Dr. SOUIKI L.

Maître de Conférences

**Juin 2013**

## *Remerciements*

*Nous remercions d'abord le bon dieu, pour le courage qu'il nous donné pour surmonter toutes les difficultés durant nos années d'étude.*

*Nous faillirons à la tradition si nous n'exprimons pas ici notre, gratitude envers tous ceux qui ont collaborés de près ou de loin à l'exécution de ce mémoire :*

*Nous remercions Dr. BENYOUNES.A : Maître de Conférences d'avoir si complaisamment accepté de participer à notre jury et être le président.*

*Nous remercions Mr MOKHTARI.AH : Maître Assistant participer à examiner ce travail (Examineur), et nous tenons à lui exprimer notre profonde gratitude d'avoir contribuer de très près à la réussite et à la réalisation de ce mémoire.*

*Nous remercions très vivement notre encadreur Mme SOUIKI.L : Maître de Conférences qui nous a guidés tout au long de notre travail et sans qui on n'aurait pas pu le terminer.*

*Nous admirons sincèrement votre dévouement et votre sens de la recherche.*

*Ainsi qu'à tous ceux qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de notre travail.*

## Sommaire

### Synthèse bibliographique

Introduction Général .....	p1
----------------------------	----

### Matériel et Méthodes

1. Matériel et Méthodes .....	p9
1.1. Matériel .....	p9
2. Méthode d'analyse.....	p9
2.1. Contrôle de la qualité organoleptique .....	p12
2.2. Contrôle physico-chimique.....	p12
2.3. Le contrôle microbiologique.....	p12
2.3.1. Technique d'analyse microbiologique .....	p13
2.4. Etude qualitative et quantitative (Recherche,comptage,Identification).....	p15
2.4.1. Etude Quantitative .....	p15
1. Recherche et numération de la flore mésophile aérobie totale .....	p15
2. recherche et numération des entérobactéries .....	p17
2.1. Recherche et numération des coliformes totaux .....	p18
2.2. Recherche et numération des coliformes fécaux .....	p20
3. Recherche et numération des streptocoques fécaux .....	p21
4. Recherche et numération de Staphylococcus aureus .....	p24
5. Recherche et numération Des levures et moisissures .....	p25
6. Recherche et numération des aérobies sulfito-réducteurs (Clostridium).....	p27
2.4.1. Etude Qualitative .....	p29
1. Isolement.....	p29
2. Identification.....	p29
2.1. Examen macroscopique de caractères cultureux .....	p29
2.2. Examen microscopique de caractères morphologiques .....	p29
2.3. Identification biochimique.....	p31

### Résultats et discussion

3. Résultats et discussion .....	p34
----------------------------------	-----

3.1. Caractérisation des paramètres organoleptique .....	p34
3.2. Variation des paramètres physico-chimiques .....	p34
3.2. Variation des paramètres microbiologiques .....	p38
3.2.1. Développement des Germes de contamination Fécale .....	p38
3.2.1.1 les Germes totaux.....	p38
3.2.1.2. Les coliformes totaux.....	p42
3.2.1.3 Confirmation des Coliformes totaux .....	p43
3.2.1.4 les Coliformes fécaux .....	p43
3.2.2. Développement des Germes pathogènes .....	p43
3.2.2.1. Les staphylocoques .....	p43
3.2.3.2 les levures et moisissures.....	p49
3.2.2.3 confirmation des levures et moisissures .....	p49
3.2.2.4 les Clostridium .....	p49
Conclusion .....	p55
Résumés .....	p57
Références bibliographiques.....	p58

## INTRODUCTION GENERAL

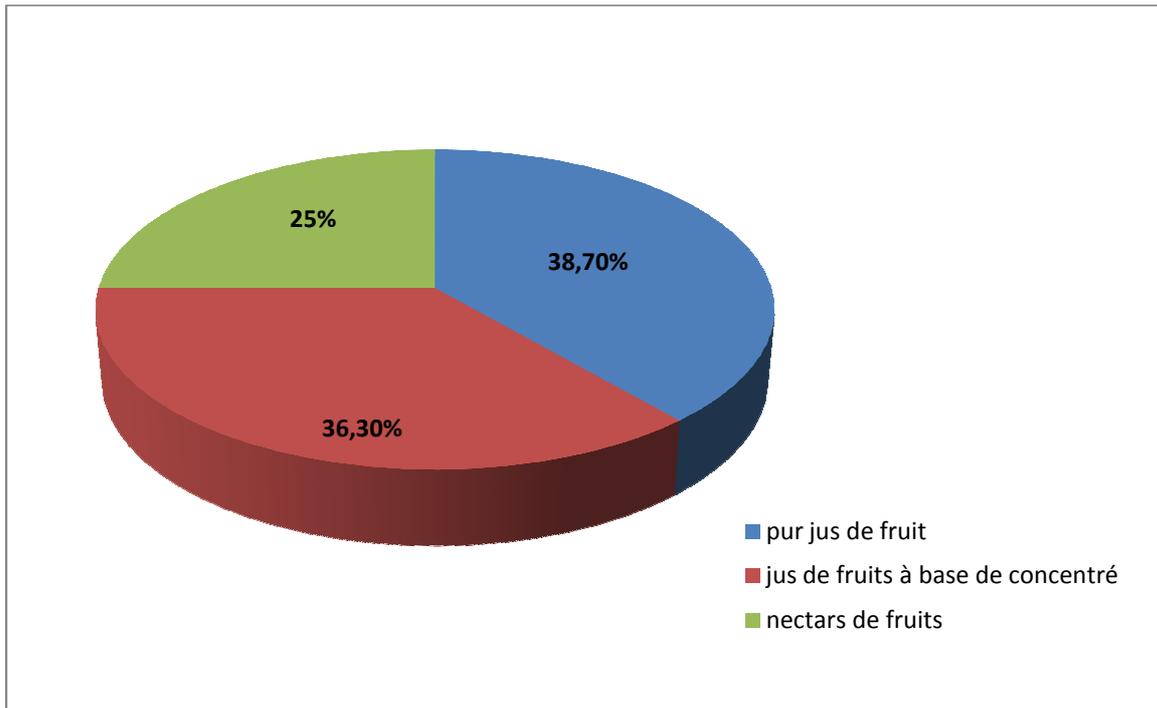
Tous les êtres vivants, y compris les Hommes, sont dépendants de la nature pour obtenir leur alimentation. La consommation des fruits et légumes a un effet sur la santé reconnu qui a pu être associé à leur potentiel antioxydant, ils contribuent à renforcer l'organisme par des pluri-substances nutritives telles que les glucides, les protéines, des graisses et les vitamines, les minéraux, les oligo-éléments et des fibres. D'après le codex alimentarius (2005) Les jus de fruits contiennent essentiellement les caractéristiques physiques, chimiques, organoleptiques et nutritionnelles que les fruits dont ils sont constitués. C'est à travers leur composition complexe que les jus de fruits sont des véritables aliments, sources de vie et donc de vitalité. Ce ne sont pas de simples boissons mais des aliments à boire. Ils sont à la fois sources de nutriments énergétiques et de nutriments non énergétiques de phyto-micro constituants [1]. En outre, les jus de fruits sont classés en trois catégories : jus de fruits, jus de fruits à base de concentré et nectar (Cendre, 2011), (Kim *et al.*, 2003).

Les catégories des jus de fruits les plus consommées sont présentées au marché sous trois formes (fig1).

- Les purs jus de fruits qui représentent 38.7% des volumes consommés.
- Les jus de fruits à base de concentré (100% teneur en fruits) représentent 36.3% des volumes de consommés.
- Les nectars des fruits représentent 25% des volumes des consommés [2]

Le codex alimentarius qui définit le jus de fruits comme le liquide non fermenté, mais fermentescible, tiré de la partie comestible de fruits sains, parvenus au degré de maturation approprié et frais ou conservés dans des conditions saines conformément à la commission du Codex. Il est obtenu par des procédés adaptés qui conservent les caractéristiques physiques, chimiques, organoleptiques et nutritionnelles essentielles du fruit dont il provient (Codex, 2005).

Il ya plusieurs types de jus les purs jus de fruits ou les 100% pur jus de fruits sont obtenus à partir d'une extraction sous pression dont le liquide subit un traitement de chaleur avant d'être conditionné. Pour être qualifiés dans cette catégorie, les jus ne doivent contenir aucun sucre ajouté, ni additifs, ni conservateurs (Claveau, 2009).



**Figure 1** : Les catégories les plus consommées des jus de fruits [2]

Par contre les Jus de fruits obtenus à partir d'un concentré sont des produits fabriqués avec des jus concentrés auxquels a été ajoutée la même quantité d'eau que celle extraite lors de leur concentration. Ils ne contiennent ni colorant ni conservateur conformément à la réglementation. Les concentrés de jus de fruits peuvent contenir des substances aromatiques

En outre le nectar de fruits est le produit non fermenté, mais fermentescible, obtenu en ajoutant de l'eau, avec ou sans adjonction de sucres, de miel et/ou de sirops), et/ou d'édulcorants parmi ceux énumérés dans la norme générale pour les additifs alimentaires (NGAA), aux produits obtenus (jus de fruits, jus de fruits à base de concentré, jus de fruits concentré et déshydraté), à de la purée de fruits ou à un mélange de ces produits (CODEX Alimentarius, 2005). Cependant, Parmi les freins à la consommation de ces produits, leur prix élevé, leur saisonnalité, leur fragilité, leur faible durée de conservation sont les raisons couramment évoquées par les consommateurs (Benamara, 2003).

Parmi tous les jus de fruits, le jus d'orange reste toujours le jus de prédilection au monde, avec une consommation de 11,8 litres par personne en 2007 et, Plus de 55 milliards de litres de jus d'orange sont bus chaque jour dans le monde suivi du jus de pomme à raison de 6,0 litres par personne c'est-à-dire 21 litres par personne par an. Cela représente 1744 litres de jus d'orange bus chaque seconde. 90 % des jus d'orange sont les plus consommés de tous les jus de fruit [6].

Les jus de fruits sont des denrées alimentaires d'origine végétale, périssables, ayant subi un traitement (pasteurisation, parfois stérilisation) en vue d'en assurer une conservation limitée. Elles sont conditionnées en récipients étanches aux liquides, et doivent être stockées dans des conditions de température conforme au codex alimentarius. Elles comportent une date limite de consommation, mais, en tout état de cause, une date de fabrication. La qualité des jus de fruits dépend largement des propriétés des fruits utilisés dans la fabrication (Hendrix, 1995).

L'obtention de jus de fruits prêts à consommer nécessite une succession d'opérations unitaires qui doivent être optimisées pour assurer un niveau de production suffisant sans nuire ni à la qualité, ni à la sécurité afin de préserver des qualités organoleptiques et nutritionnelles (Cendres, 2011).

L'altération des jus de fruits est un phénomène d'importance qui occasionne des pertes économiques considérables dans le secteur d'activité des jus. Ces produits sont sujets à la

détérioration par des bactéries tolérantes aux milieux acides, des levures et des moisissures acidophiles. La prolifération de ces derniers s'explique par le manque d'hygiène dans les industries (défaut de conservation, défaut de conditionnement des changement des pratiques au niveau de l'agriculture, défaut de fabrication) l'exposition à la lumière, l'oxygène (l'air), l'humidité, et la chaleur) (Prescott et *al.*, 2003).

L'altération des jus de fruits intervient sous la prolifération et le développement des micro-organismes provoquent des modifications organoleptiques et nutritionnelles des jus. Cette action s'effectue par des principales bactéries lactiques (lactobacilles, Les Leuconostocs), bactéries Alicyclobacillus levures et moisissures les plus souvent impliquées dans l'altération des jus de fruits [3]. Les jus de fruits doivent être exempts des microorganismes qui peuvent présenter un danger pour la santé.

La lutte contre les microorganismes est ainsi indispensable pour assurer la qualité sanitaire et microbiologique des jus, en assurer la stabilité et prolonger leur durée de consommation (Cendres, 2011).

Selon Lazano (2006), la destruction des éléments nutritifs des fruits (et donc les jus de fruits) sont dues:

- Aux opérations technologiques;
- A leur sensibilité au pH, à l'oxygène de l'air, la lumière et la chaleur (T°).
- A l'action des enzymes ou action non enzymatique (Réaction de Maillard).

La dégradation de la vitamine C dans les jus de fruits provoque une perte de qualité nutritionnelle mais aussi l'apparition de composés volatils odorants à impact négatif et la formation de composés bruns responsables d'une modification dans le jus, la vitamine C peut donner naissance à différentes formes de réductones par deux voies soit aérobie en présence de l'oxygène ou dégradation anaérobie qui à été observée dans les jus d'orange au cours de leur stockage (Rdriguez et *al.*, 1991).

D'après (Sizer et *al.*, 1988) la température et la durée du stockage semblent être les facteurs les plus critiques favorisant la dégradation de la vitamine C. La pasteurisation à un effet néfaste sur la composition organoleptique du jus où elle présente un effet négatif sur la fraction aromatique du jus (Moshonas, 2000). Par ailleurs l'oxydation de l'acide ascorbique est favorisée par la température, la présence d'ions métalliques (fer et cuivre), et la teneur en oxygène dissous (Khan, 1967).

Le brunissement des jus d'orange est l'une des réactions qui influe le plus sur les changements de qualité pendant le stockage prolongé des jus d'agrumes. Cette modification de couleur, tout comme la modification du goût, constitue un frein incontestable à sa consommation (Rodriguez et *al.*, 1991).

Les pigments des jus de fruits (caroténoïdes) sont hautement sensibles à l'action de l'oxygène de l'air et à la lumière, particulièrement en présence de métaux tels que le fer, le cuivre. Mais aussi, ils peuvent être détruits pendant les opérations de traitement et le stockage des fruits et leurs produits. Il a aussi été suggéré que les acides organiques peuvent réagir avec les sucres réducteurs pour produire des pigments bruns (Lozano, 2006).

**a- Altération de l'aspect ou de la texture :**

- Pigmentation anormale (rose pour *Serratia*, noire ou verdâtre pour les moisissures).
- Film visqueux ou irisé (dû aux bactéries aérobies strictes dans les aliments conservés à l'état libre).
- Dégagements gazeux anormaux.
- Viscosité anormale (gélification par des bactéries capsulées ou par production de dextrine à partir de saccharose par *Leuconostoc*)

Ces altérations peuvent ne pas provoquer de toxicité mais rendent le produit peu appetissant ou inventable.

**b- Altérations du goût et de l'odeur :**

- odeur de moisi (moisissures)
- Goût de rance (par *Leuconostoc*)
- Présence de H<sub>2</sub>S ou d'indole (Entérobactéries)
- goût aigre (bactérie lactique ou acétique)
- odeur et goût de beurre (bactérie lactique)

**c- Altérations des qualités nutritives :**

- Par l'apparition de substances toxiques

- Par dégradation de molécules nutritives (acides aminés essentiels) d'où une diminution de la valeur nutritive de l'aliment [3].

La contamination des jus de fruits par voie physique se fait par L'oxygène entraîne une oxydation des composés de jus, une destruction de la vitamine C, un rancissement des corps gras (altération des corps gras conduisant à une modification désagréable de leur odeur et de leur saveur), ainsi que l'effet de la température et la lumière (les conditions environnementales) sur la qualité organoleptique qui génèrent également des changements de la couleur, goût, et d'odeur (Berlinet, 2006).

La conservation des aliments vise à préserver leur comestibilité et leurs propriétés gustatives et nutritives, chimiques et physiques et leurs propriétés fonctionnelles. Elle implique notamment d'empêcher la croissance de microorganismes et de retarder l'oxydation des graisses qui provoque le rancissement. Ces méthodes ont pour objectif d'allonger la durée de vie des produits alimentaires (pasteurisation et stérilisation, séchage, déshydratation osmotique, réfrigération et congélation).

La Pasteurisation est un traitement thermique destiné à détruire les microorganismes pathogènes non sporulés et réduire significativement la flore végétative présente dans le jus de fruit. Les températures utilisées dans cette opération comprises entre 60 et 100°C. [3] ce traitement thermique doit être suivi d'un brusque refroidissement pour ralentir le développement des germes encore présents. Les aliments pasteurisés sont ainsi habituellement conservés au froid (+4°C) (Benamara, 2003).

Dans les jus de fruits, les acides organiques les plus utilisés comme des conservateurs chimiques sont l'acide benzoïque, l'acide sorbique, l'anhydride sulfureux (SO<sub>2</sub>), les sulfites, et les sels de l'acide sulfureux. L'ajout d'un tel agent dans les jus de fruits permet de diminuer les risques d'émettre sur le marché un produit impropre à la consommation. (Claveau, 2009).

Le froid est une technique de conservation des aliments qui arrête ou ralentit l'activité cellulaire, les réactions enzymatiques et le développement des microorganismes. Il prolonge ainsi la durée de vie des produits frais, végétaux et animaux (laits, jus de fruits, boissons, viande, fruits ...etc.) en limitant leur altération. Le froid ne détruit ni les toxines ni les microorganismes éventuellement contenus dans les aliments. On distingue deux procédés qui utilisent cette technique :

### **a-Congélation :**

Méthode de conservation des jus de fruits consiste à maintenir la température au cœur du jus jusqu'à  $-18^{\circ}\text{C}$ . Provoque la formation d'une quantité moyenne de cristaux de glace de taille relativement importante par rapport à celles des cellules du produit [3].

### **b-Surgélation:**

Lorsque le jus peut soumis brutalement à une température plus basse que la congélation environ  $-40^{\circ}\text{C}$ , afin que le cœur du produit atteigne très vite la température de  $-18^{\circ}\text{C}$  à maintenir (c'est une congélation plus rapide "surgélation" dont la formation des la formation [3].

L'opération de concentration consiste à éliminer environ 80 % de l'eau contenue dans le jus, en altérant le moins possible les pulpes ainsi que les composés d'arôme. Le procédé le plus couramment utilisé est la concentration par les effets combinés de la chaleur et du vide (évaporation) dans des échangeurs thermiques qui séparent les vapeurs formées du produit liquide concentré. Les concentrateurs sont équipés de récupérateurs des constituants aromatiques des jus (constituants volatiles et huiles essentielles) (Berlinet, 2006). Les arômes des jus stockés à  $4^{\circ}\text{C}$  peuvent aussi être utilisés dans les boissons ou d'autres produits alimentaires (Vierling, 2007). Ce procédé présente deux intérêts principaux : l'activité de l'eau du produit ainsi traité atteint des valeurs suffisamment basses pour inhiber le développement des microorganismes et stopper les réactions enzymatiques ; la diminution du poids et du volume est une économie importante pour le conditionnement, le transport et le stockage [3].

L'emballage (conditionnement) alimentaire est une technique essentielle pour préserver la qualité des aliments, minimiser les risques de pertes et réduire l'utilisation des additifs. L'emballage joue un rôle important pour envelopper les aliments, les protéger des dommages chimiques et physiques et servir de support aux informations pour le consommateur. Plusieurs types d'emballage concernant les jus de fruit tel que le carton, le verre et le plastique. Ce pendant le verre et le carton sont considérés des emballages inertes et présentes une image valorisante pour le consommateur, en plastiques [4].

Les emballages en plastique sont en augmentation car ils présentent un certain nombre d'avantages. Ils sont légers, résistants et pour une partie d'entre eux transparents ce qui permet d'apprécier la couleur du jus. Financièrement de nombreuses résines sont moins chères que le verre (Hrebicek, 2003).

Les techniques de conditionnement possibles pour les jus ambiants sont le conditionnement à chaud et le remplissage aseptique à froid. Le conditionnement à chaud est utilisé pour les bouteilles en verre et pour certaines briques ou bouteilles de Polyéthylène

téréphtalate (PET) fortement cristallisées résistantes à 80°C. La température du liquide assure la stérilité de l'emballage car les jus sont soutirés à chaud. Le remplissage aseptique à froid nécessite un refroidissement du produit avant conditionnement. Les emballages doivent être nettoyés et stérilisés avant le remplissage. Le peroxyde d'hydrogène et l'acide péracétique sont les produits de nettoyage les plus couramment utilisés pour la décontamination des emballages plastiques utilisés par les procédés aseptiques (Berlinet, 2006).

L'emballage et le conditionnement des jus de fruits jouent un rôle très important surtout dans l'aspect qualitatif

Notre objectif consiste à étudier l'effet de la température sur les caractéristiques organoleptiques, physicochimiques et microbiologique des jus de fruits emballés dans trois types de matériaux : verre, carton et plastique et l'estimation des risques probables sur la santé des consommateurs afin d'obtenir des moyens préventifs. Cette recherche est structurée en trois parties :

- 1- Une introduction générale.
- 2- Matériel et méthode expliquant les outils utilisés pour le dénombrement bactériens et la physicochimie.
- 3- Résultat et discussion.

## **1- 1Matériel et méthodes**

### **1-1 Matériel**

Notre étude a été effectuée sur trois échantillons de jus d'orange conditionné dans trois types d'emballages différents (plastique, brique et verre) achetés du marché. La marque des jus n'est pas prise en considération dans cette étude.

- **Dispositif expérimental**

Notre expérience est réalisée en utilisant un dispositif en bois de forme cube, sa dimension est de 50 cm de hauteur sur 50 cm de largeur avec une porte coulissante. Le plafond de ce dispositif est équipé d'un Nyon de 60 W comme source lumineuse (fig. 2). L'incubation des jus est effectuée dans le dispositif expérimental.

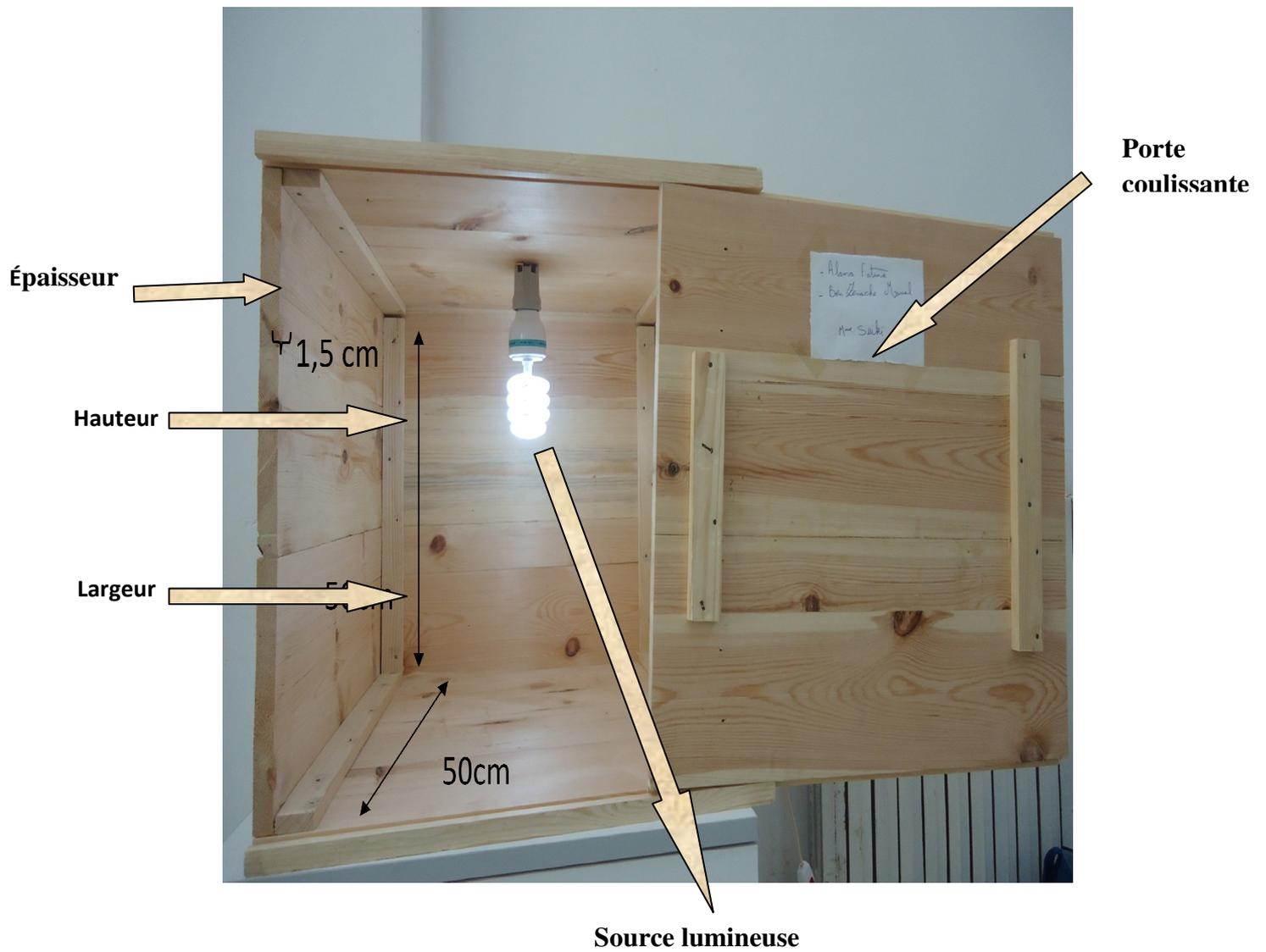
### **2- Méthodes d'analyse**

Avant toute analyse de qualité organoleptique, physicochimique et microbiologique, le protocole appliqué est comme suit:

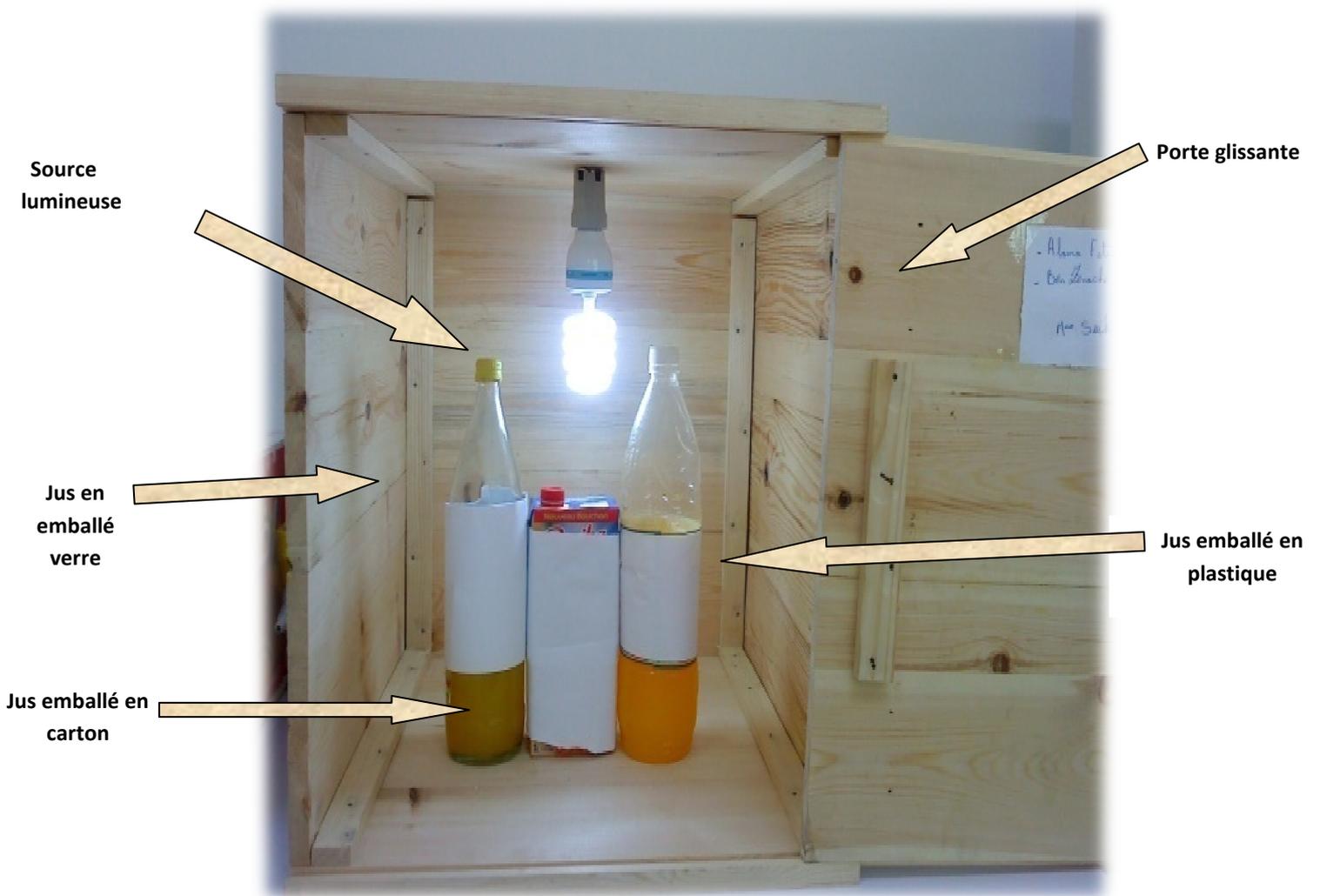
- Mettre le jus pour les trois gammes d'emballage à l'intérieur de la cuve exposée à la source lumineuse (Nyon).
- Enregistrer les modifications probables pendant [2h, 4h, 6h, 12h, 24h, 48h, 72h] (fig.3).

Le contrôle organoleptique de jus de fruits est vérifié sur trois caractéristiques (gout, couleur et l'odeur). Le contrôle physico-chimique consiste à étudier trois paramètres (pH, température, viscosité). L'analyse, microbiologique de jus de fruits consiste à rechercher les microorganismes pathogènes qu'elle peut contenir à savoir :

- les germes totaux
- les germes indicateurs de contamination fécales : les coliformes totaux, coliformes fécaux les streptocoques fécaux et les spores des anaérobies sulfite-réducteurs.
- L'identification d'éventuels germes pathogènes.



**Figure 2 : Dispositif expérimental**



**Figure 3.** Mode opératoire d'analyses de jus

## **2-1 Contrôle de la qualité organoleptique**

Avant tout contrôle microbiologique d'un aliment un pré-contrôle visuel souvent indispensable se réalise qui permet d'assurer la salubrité et la qualité hygiénique de cet aliment. L'inspection visuelle des échantillons permet de mettre en évidence un trouble anormal, un dépôt, un dégagement de gaz ou même le développement de moisissures surtout pour les aliments acides (Jean, 2007). Le contrôle organoleptique de jus se traduit par des modifications chronologiquement détectables visuellement bien après l'apparition des changements au niveau d'aspect, de texture ou de flaveur (odeur et saveur)

Ces modification sont liés par:

- Prolifération des microorganismes grâce aux conditions favorables dans le jus (glucides, protides et lipides).
- Changement des composés de jus dû à la lumière, paramètres de conservation (T°).

La totalité des ces modification sont souvent défavorables.

## **2-2 Le contrôle physicochimique**

Trois paramètres essentiels (pH, Température, Viscosité) jouent un rôle important pour la qualité gustative et microbiologique de nos jus de fruits qui doivent être vérifiés. Cependant dans notre cas la viscosité n'est pas déterminée mais théoriquement sa valeur est comprise entre 1,030 (Citron) et moins à 1,055 (raisin) et plus. Pour les jus d'agrumes et d'ananas, la densité est voisine de 1,040.

- **Détermination de l'acidité:**

L'acidité de jus est déterminée à l'aide d'un pH-mètre (digitale: HANN PH209).

- **Détermination de la température:**

La température est déterminée à l'aide d'une sonde thermique (digitale : 4891727100212)

## **2-3 Le contrôle microbiologique**

La qualité et la stabilité microbiologiques des jus de fruits, nectars et boissons aux fruits dépendent en particulier de la qualité des matières premières, des formulaires, des divers traitements technologiques (pasteurisation, présence de conservateurs chimiques, valeur finale du pH,...).

Les Critères microbiologiques retenus:

- Absence de germes pathogènes.
- Absence de germes témoignant d'une mauvaise hygiène des fabrications (les coliformes, *Escherichia coli*).
- Absence de microorganismes susceptibles de se développer dans les conditions normales de conservation.
- Respecter les seuils de microorganismes tolérés dans le jus de fruits.

En bactériologie alimentaire il n'est donc pas nécessaire de rechercher, de compter et d'identifier systématiquement toutes les bactéries, levures et moisissures présentes dans le produit. Il suffit souvent d'effectuer pour les jus de fruits :

- Etude quantitative de la flore totale (germes totaux = Flore Mésophile Aérobie Totale ou FMAT).
- Etude des germes de contamination fécale: coliformes fécaux (E. Coli, Streptocoques).
- Etude de Germes de contamination: levures et moisissures, Clostridium.
- Etude quantitative des Germes pathogènes: telles que Salmonella, Staphylococcus, Shigella,...etc [6]

Donc l'analyse microbiologique de nos jus d'orange est basée sur la recherche des germes indiqués dans le tableau suivant (tab.1) (JORA, 1998).

### **2-3-1 Techniques d'analyses microbiologiques**

Quelle que soit la nature initiale du produit, l'analyse microbiologique s'effectue toujours à partir d'une suspension. Après ouverture aseptique, l'échantillon sera "homogénéisé" (jus de fruit) dans un volume connu de diluant stérile (TSE ou eau physiologie, eau distillé) ce qui constitue en fait la première dilution. Au cours de la préparation des échantillons (et des dilutions) les microorganismes peuvent être inhibés ou même altérés par le changement du milieu lié à l'addition de diluant.

#### **a- Préparation des dilutions**

Toutes les manipulations sont à effectuer avec toutes les précautions d'asepsie exigées en microbiologie. 25 ml de l'échantillon prélevé (jus de fruit) sont additionnés à 225ml d'eau physiologique (9 g de NaCl dissous dans 1000 ml d'eau distillée). Ensuite la solution est homogénéisée et laisser 20 min avant chaque analyse. Le bécher contenant le liquide à diluer est agité (suspension de départ ou échantillon mère) considère comme la première dilution  $10^{-1}$ , On prélève stérilement 1 ml de ce liquide (dilution  $10^{-1}$ ) par une pipette stérile de 1ml,

**Tableau 1:** les germes à chercher et dénombrer dans le jus d'orange (JORA, 1998)

<b>Les bactéries Recherchées</b>	<b>Les normes (seuil limite des germes dans le jus)</b>	<b>Milieux de cultures</b>	<b>La température et la durée d'incubation</b>
Les Germes totaux (F.T)	Absence	Gélose TGEA	30°C pendant 72h
Les levures/moisissures	< 30	Gélose OGA	30°C pendant 3 à 5 j
Les staphylocoques	Absence	Gélose Chapman	37°C pendant 24h
Les streptocoques fécaux	Absence	Bouillon Rothe et Litsky	37°C pendant 48h
Les coliformes totaux	Absence	BLBV +cloche durham ou BCPL avec cloche	37°C pendant 48h
Les coliformes fécaux (E. coli, thermotolérants)	Absence	BLBV +cloche durham ou BCPL avec cloche et EPA et Kovacs (pour le test confirmatif).	44°C pendant 48h
Clostridium (ASR)	Absence	Gélose VF	37°C pendant 72h

Et on introduit dans un tube contenant 9 ml de diluant stérile (eau distillé) pour obtenir un tube de  $10^{-2}$  et ainsi de suite et avec la même méthode on termine jusqu'à la dilution  $10^{-3}$  (fig. 4). Ce protocole est souvent suivi pour tous les échantillons analysés avec les trois gammes d'emballage et dans chaque heure d'analyse.

## **2-4 Etude quantitative et qualitative des flores microbiennes (Recherche, comptage, identification des germes)**

En microbiologie alimentaire l'intérêt de l'étude à la fois quantitative et qualitative de la flore présente dans un aliment est considérable à travers de nombreuses techniques qui permettent d'évaluer des unités formant colonies (UFC) ou des unités formant troubles (UFT). Généralement l'analyse d'un aliment n'est pas systématique et elle peut reposer sur des présomptions. Le contrôle de la qualité sanitaire est basé sur la numération des germes totaux (Flore hétérotrophe aérobie mésophile totale) de l'aliment et sur la recherche de germes indicateurs de contamination fécale tels que les coliformes (souvent associés à des flores pathogènes comme les Salmonella ou les Shigella), les entérocoques, les phages fécaux actifs sur la flore intestinale, de germes indicateurs d'une contamination tellurique comme les anaérobies sulfite réducteurs (les Clostridium).

Les résultats obtenus permettent d'éliminer les produits suspects ou contaminés et surtout d'améliorer la qualité de fabrication par élimination des points critiques.

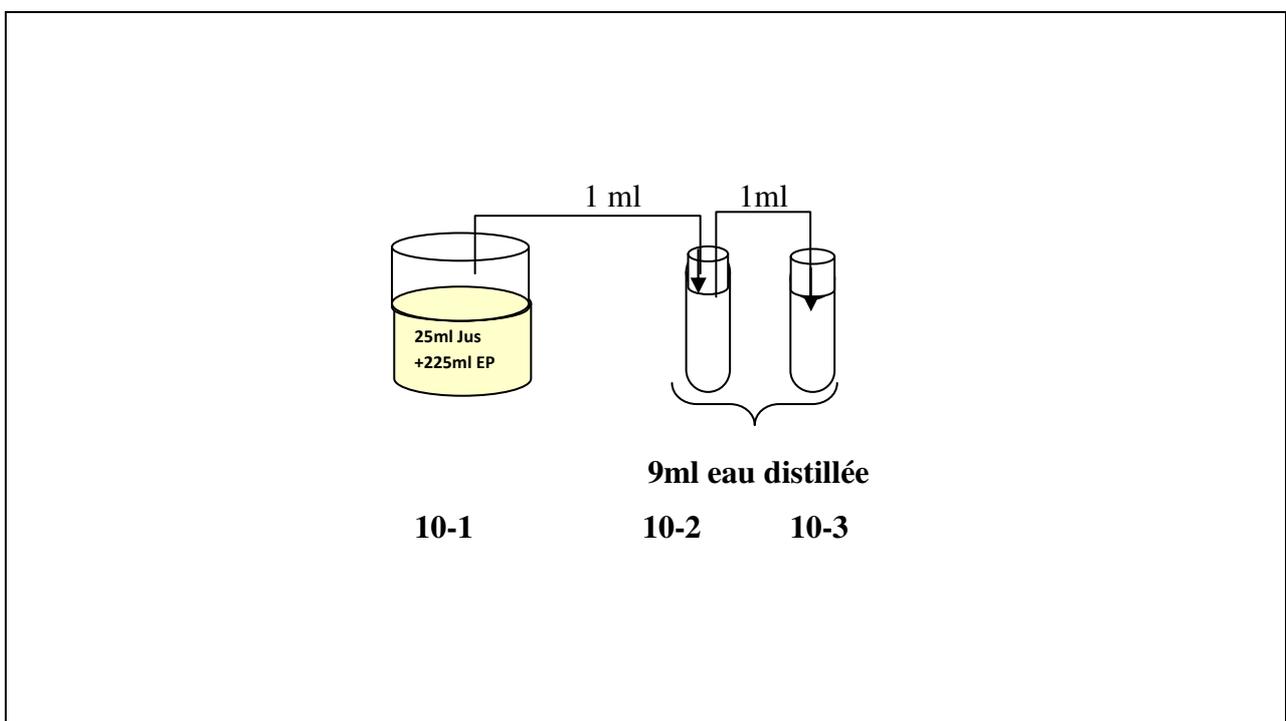
### **2.4.1 Etude quantitative**

#### **1- Recherche et numération de la flore totale**

La flore totale représente le nombre totale de germes qui forment des colonies visibles sur le milieu gélosé dans des conditions bien définies. La numération de ces germes correspond l'estimation de la flore aérobie mésophile totale revivifiable après 72 h d'incubation à  $30^{\circ}\text{C}$  dont permettra de juger de la qualité des opérations de production, transport, entreposage etc. Elle peut donner une idée comparative de la contamination microbienne et des pratiques d'hygiène appliquées pendant la manutention (Huss, 1988).

#### **Matériel**

- Des échantillons: la suspension mère plus la série des dilutions
- Milieux de culture: TGEA ou GN ordinaire
- Boîtes de Pétri
- Pipette de 1ml



**Figure 4:** Technique de préparation des dilutions décimales

## **Methodologie**

Prendre un 1 ml de la suspension mère et de ses dilutions à l'aide d'une pipette stérile et positionné dans des boîtes de Pétris de manière aseptique puis couler le milieu gélosé TGEA (15 ml de milieu en surfusion à 45-47°C). Etaler les boîtes préparées par des mouvements lents sous formes de huit afin d'assurer une répartition de l'inoculum avec la gélose. Il est également recommandé de laisser les boîtes jusqu'à leur solidification. Enfin, incuber dans une étuve les boîtes à 30°C pendant 72h (fig.5a)

### **Remarque:**

Il est recommandé de ne pas attendre plus de 15 minutes entre la préparation de la suspension mère et ses dilutions et le moment où la gélose est coulée.

### **La lecture des résultats:**

La lecture se fait après 72 heures d'incubation à 30°C. Elle se présente par la pousse des germes apparus sur la gélose puis on passe vers le comptage (fig. 5b).

Le comptage est effectué par:

- Le choix de la boîte de la plus forte dilution
- Division de la boîte en quatre portions égales puis on calcule le nombre des colonies trouvées dans 1/4 de la boîte.
- Le nombre obtenu multiplié par 4 et par le nombre de la dilution et enfin le volume de la suspension prélevé en ml (cc).

## **2- La recherche et la numération des entérobactéries (CT et C.fécaux "E. coli")**

Le dénombrement des coliformes totaux est considéré comme indicateur de contamination fécale, ainsi que les coliformes fécaux (ou thermotolérants) considérés comme des germes indicateurs de la qualité hygiénique de jus de fruit. Leur présence peut être un bon indice des mauvaises conditions de manipulation ou de traitement des aliments (pasteurisation insuffisante par exemple) ou le manque de remplissage aseptique.

La colimétrie, c'est à dire la numération des coliformes, peut être réalisée soit en milieu liquide qui repose sur une analyse statistique et fournit par calcul des nombres les plus probables (NPP) Méthode de Mac Grady [8].

Cette méthode présente certains avantages tels que la possibilité d'étudier un caractère biochimique du germe difficilement mis en évidence sur milieu gélosé comme la production de gaz (cloche) ou encore d'effectuer facilement la numération avec une phase de

revivification. Cette méthode repose sur le fait qu'un inoculum contenant au minimum 1 germe (UFT) donnera, après introduction dans un milieu liquide donné, une culture positive.

Cette numération se fait en deux étapes.

- Test présomptif → La recherche des coliformes totaux → Après incubation de 37°C/24 à 48h.
- Test confirmatif → La recherche des coliformes fécaux (E. coli, thermotolérants) → Après incubation de 44°C/24 à 48h.

## **2.1.La recherche et numération des coliformes totaux: test présomptif**

### **Matériel**

- Echantillons + eau physiologie
  - Tubes à essai + eau distillé
  - Séries de trois tubes BCPL pour chaque dilution
  - Pipette de 1ml
- } Pour effectuer les dilutions

### **Methodologie**

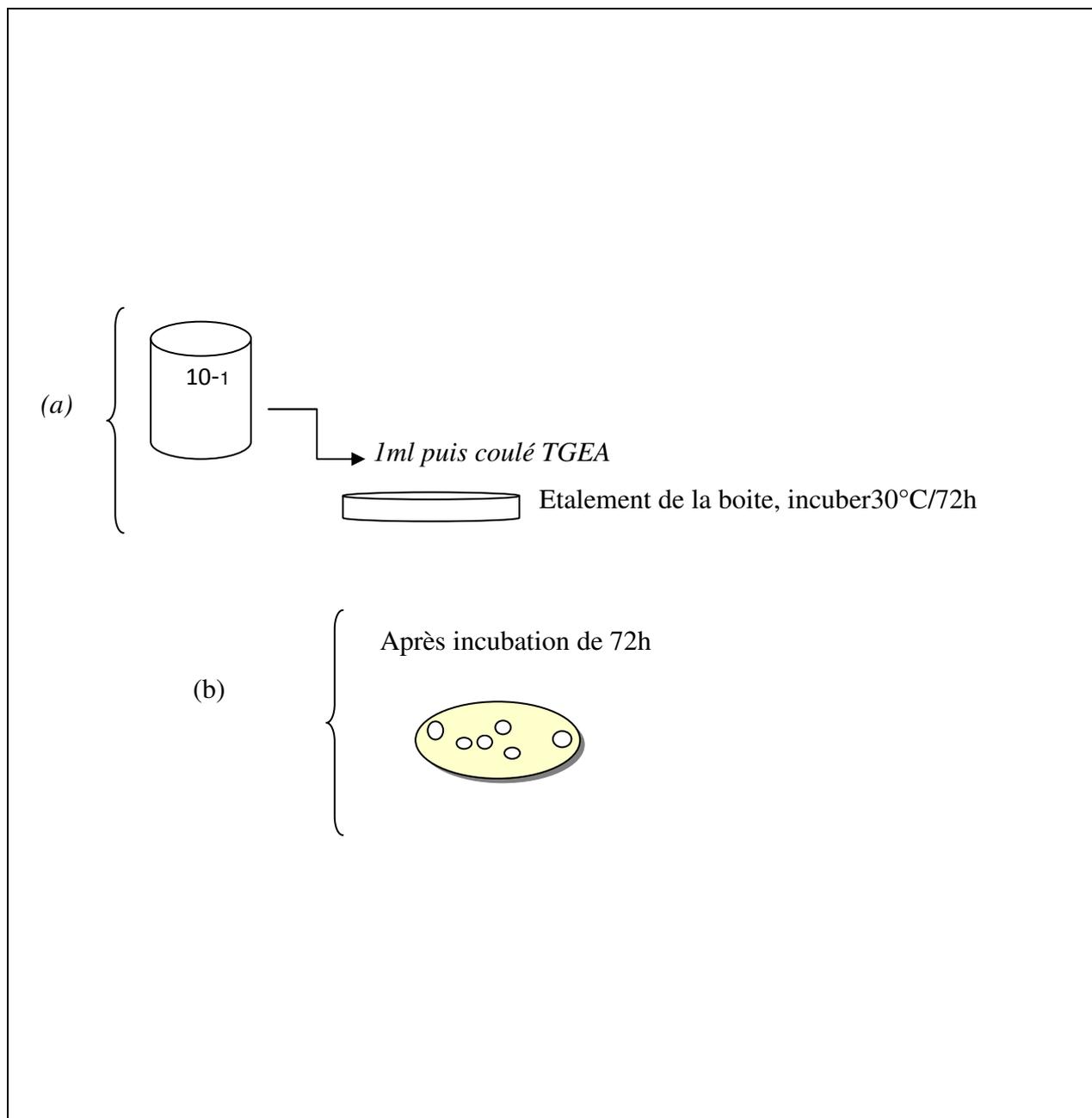
La numération des coliformes est réalisée par ensemencement de 1 ml de l'échantillon de jus de fruit (ou de sa suspension mère) et de ses dilutions dans un bouillon Lactosé au pourpre de bromocrésol(BCPL).Les essais sont effectués en triple et les résultats analysés par la méthode de Mac Grady

- Répartir à raison de 10 ml par tube avec cloche de Durham le BCPL (9 Tubes). Stérilisation à 115°C pendant 20 minutes.
- Prendre 1 ml de chaque dilution est ensemencé dans les trois tubes de BCPL/Dilution. Enfin trouver des tubes ensemencées de 10 ml.
- L'incubation s'effectue à une température voisine de 37°C/ 24h à48h (fig.6).

### **L'interprétation des résultats**

La lecture des tubes incubé à 37°C pendant 48h se lié par le nombre des tubes positifs ou négatifs. Les résultats acceptés sont considéré par le nombre des tubes positifs où la présence des coliformes est indispensable et se traduit par trois critères :

- Virage de couleur de violet vers le jaune;
- Troubles se traduit par la croissance de ces entérobactéries;
- Production notable de gaz (1/10 au moins du volume de la cloche).



**Figure 5.** Protocole d'ensemencement sur un milieu Gélosé TGEA (la technique de recherche et comptage de la flore totale "FMAT").

## L'interprétation des résultats

La lecture des tubes incubé à 37°C pendant 48h se lié par le nombre des tubes positifs ou négatifs. Les résultats acceptés sont considéré par le nombre des tubes positifs où la présence des coliformes est indispensable et se traduit par trois critères :

- Virage de couleur de violet vers le jaune;
- Troubles se traduit par la croissance de ces entérobactéries;
- Production notable de gaz (1/10 au moins du volume de la cloche).

Les résultats trouvés ont été déchiffrés par la table statistique de Mac Grady qui donne le NPP sur la dilution considérée.

### Remarque

- La manipulation se réaliser toujours dans les conditions aseptiques
- Si le tube est (+) = il y a au moins une bactérie / ml de la dilution considérée

Le tube positif se manifeste par:

- Un virage de couleur de violet vers le jaune:la dégradation de lactose
- Un aspect trouble
- Degagement de gaz: apparu au moins dans 1/10 de la cloche.

- Les tubes (-) distinguent l'absence des coliformes totaux et donc les coliformes fécaux

## 2.2. La recherche et numération des coliformes fécaux: test confirmatif

La numération des coliformes fécaux (ou *E. coli* présomptifs) est effectuée à l'aide d'un milieu spécifique(EPA) avec le même protocole mais après 48 heures d'incubation à 44°C.

### Matériel:

- Tubes positifs de l'analyse précédente
- Milieux de cultures: EPA (eau péptoné exempte d'indole)
- Pipette pasteur, pipette de 1ml
- Kovacs: réactif qui confirme la présence de l'indole microbienne à partir le tryptophane.

### Méthodologie:

- Prendre une goutte de tube positif pour chaque dilution et mettre dans un tube contenant 10 ml d'eau péptoné EPA.
- Puis incuber les tubesensemencés à 44°C pendant 48h
- L'ajout de quelque goutte de réactifs Kovacs après l'incubation (fig.7).

### **L'interprétation des résultats:**

- Si la présence d'un anneau rouge (Tube +) à la surface du milieu la présence E. coli, alors que l'absence de l'anneau rouge confirme l'absence d'E.coli.

### **3- Recherche et la numération des Streptocoques fécaux :**

Les streptocoques fécaux: sont des bactéries à Gram +, en forme de cocci oblongues et ovales, souvent associées par paires ou en chaînes courtes, qui forment des colonies totalement ou partiellement roses ou rouge foncé. Ils sont des aérobies et anaérobies aérotolérants (Carip *et al*, 2008).

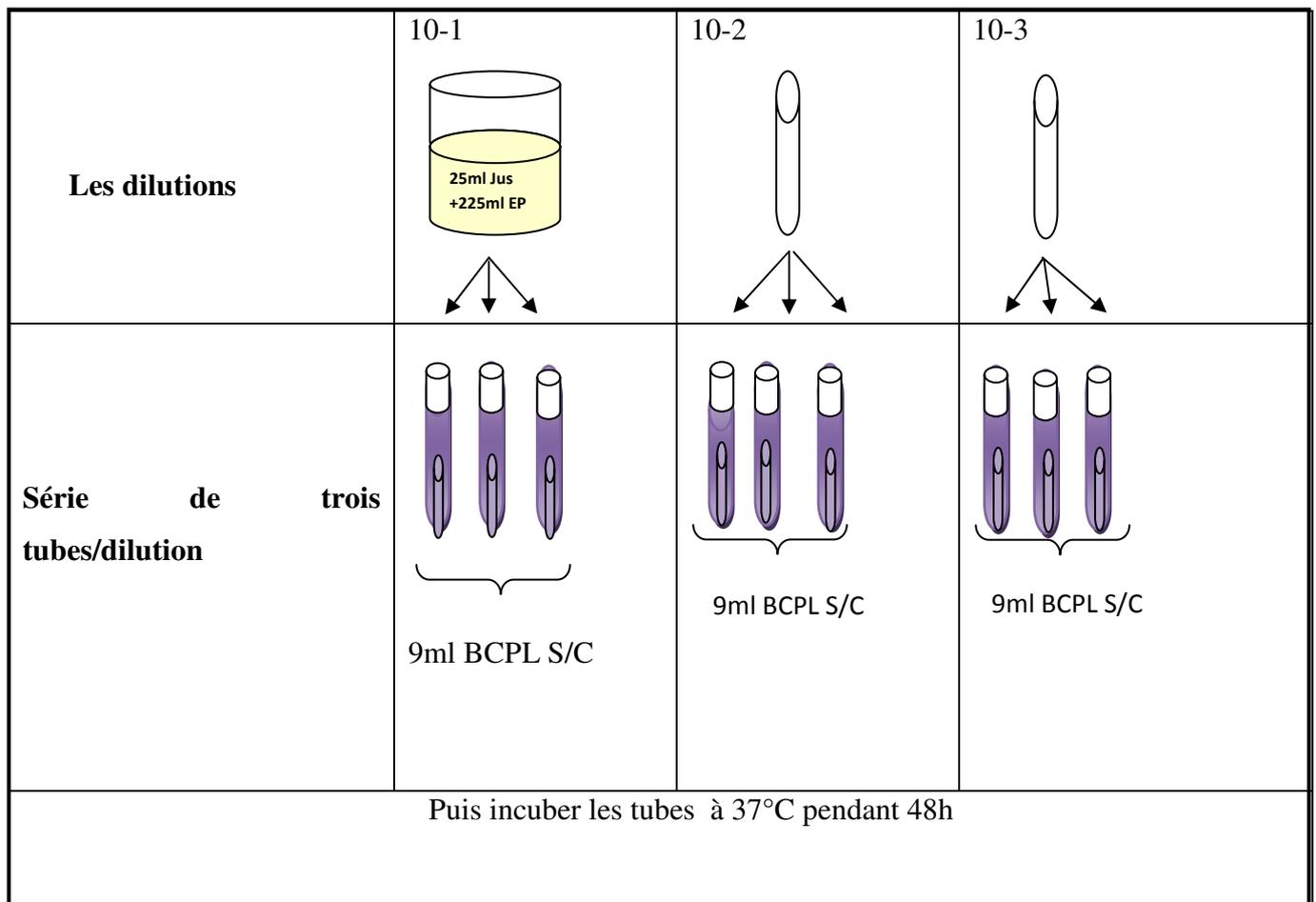
Leur présence peut donc indiquer une contamination d'origine fécale. Toutefois la différence d'E.coli et les streptocoques sont capable' de se multiplier dans l'environnement et leur présence n'indique pas seulement une contamination d'origine fécale mais aussi l'absence d'hygiène pendant la manutention et le traitement.

Les streptocoques fécaux du groupe D font partie de la flore intestinale de l'homme et des animaux ; leur nombre varie de 10<sup>5</sup> à 10<sup>7</sup> par g de matière fécale. Ces germes sont par ailleurs abondamment répandus dans la nature (végétaux etc...). La recherche et le dénombrement des Streptocoques fécaux fait appel à deux tests consécutifs à savoir, la numération se réalise sur un milieu liquide à travers la méthode de (NPP) par la table de Mac Grady :

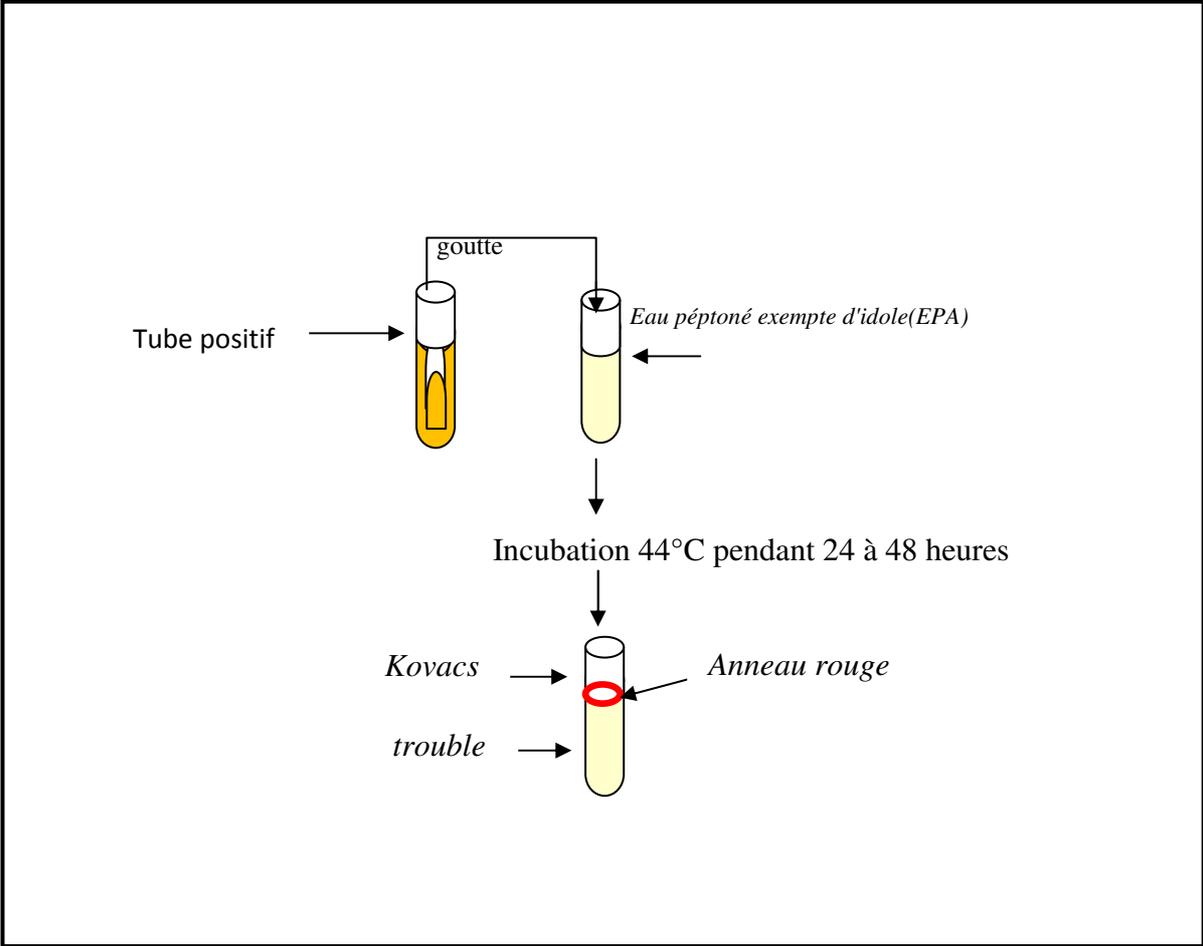
- **Le test de présomption** : à la présence du milieu Rothe
- **Le test de confirmation** : sur le milieu d'Eva Litsky réservé à la confirmation réelle des Streptocoques fécaux.

### **Matériels:**

- Echantillons(les dilutions)
- Tubes Rothe (9 tubes à essais remplir par Rothe de 10ml de chacun) sans cloche.
- Tubes Eva Litsky (9 tubes de 10ml de chacun).
- Pipettes Pasteur.
- Pipette de 1ml



**Figure 6:** Protocole de numération des coliformes totaux (test présomptif)



**Figure 7:** Recherche et dénombrement des coliformes Thermotolérants (*E. coli*)(test confirmatif)

### **Méthodologie:**

#### ◆ **Test présomptif:**

- Préparer les deux milieux de cultures Rothe et Eva Litsky.
- Remplir les tubes en raison de 10 ml par tube
- Préparer la série de NPP trois tubes pour chaque dilution (donc 9 tubes).
- Prendre un:
- 1 ml de la suspension mère (et de ses dilutions) estensemencé dans 10 ml de milieu. Rothe.
- Enfin on trouve 9 tubesensemencées
- Incuber à 37°C pendant 24h à 48h (fig.8a).

### **Interprétation des résultats:**

On considère comme positif tout tube présentant un louche bactérien où le trouble existe. Ces tubes sont soumis au test confirmatif.

#### ◆ **Test confirmatif:**

### **Méthodologie:**

- Choisir les tubes positifs de l'analyse obtenue précédemment
- .remplir les tubes par le milieu de cultures Eva Litsky 10ml pour chaque tube.
- agiter les tubes de Rothe positifs.
- Prélever une goutte de chacun de ces tubes positifs et repiquer dans un milieu Eva Litsky (Bourgeois, 1990).
- Incuber dans une étuve à 37°C pendant 48h.

### **Interprétation des résultats:**

- Tube positif → formation d'un culot violet → présence de streptocoques fécaux.
- Tube négatif → absence de trouble et culot violet → absence de streptocoques fécaux (fig.8b).

### **4- la numération et la recherche de Staphylococcus aureus:**

Les staphylocoques sont des Bactéries sphérique à Gram positif, catalase+, coagulase+, aérobie ou anaérobie facultative. Coagulasse +, et fermentent le glucose, quelques unes sont capable de produire des entérostomies qui ne fait pas donc partie de la flore normale. Staphylococcus aureus est une bactérie mésophile avec une température minimale de croissance de 6°C et une température maximale de 45-49°C. Leur présence dans les aliments indique la possibilité d'intoxication alimentaire. Le journal officiel de la

république algérienne recommande l'absence des staphylocoques dans le jus de fruits. Le pouvoir pathogène de *Staphylococcus aureus* est dû à la production, par certaines souches de cette bactérie, d'entérotoxines responsables d'intoxications alimentaires. On distingue 7 types de toxines staphylococciques : A, B, C1, C2, C3, D et E. La température minimale pour la production de toxines est de 8-10°C.

### **Matériels**

- Echantillons (dilutions)
- Milieu de culture Chapman
- Boîtes de Pétri
- Anse de platine / pipette Pasteur

### **Méthodologie**

- préparer le milieu de culture Chapman
- Le milieu, réparti à raison de 17 ml par boîte de Pétri et laisser de solidifié.
- Prélever 0,1ml (2 gouttes) à partir de la suspension mère (dilutions) et ensemencé en surface du milieu par la méthode des stries.
- Les boîtes incubées 24 h a 37°C.

### **L'interprétation des résultats**

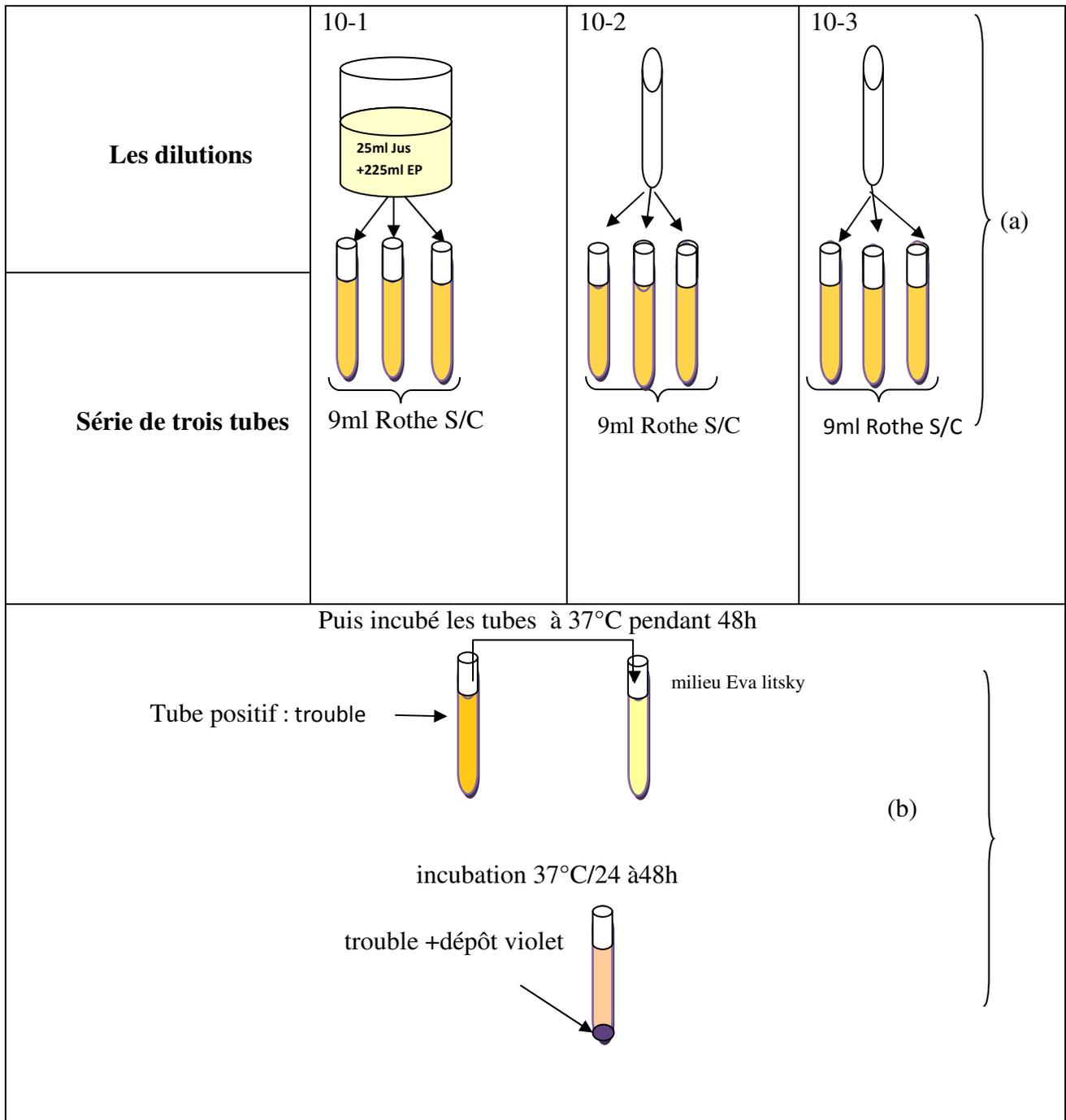
- Test positif —> Colonies jaune: présence de *Staphylococcus aureus*
- Test négatif —> Absence des colonies jaune: absence des staphylocoques

### **Remarque**

- Les colonies de *Staphylococcus*, sont rondes, régulières, bombées, opaques et pigmentées en jaune-doré, entourées d'un halo jaune correspondant à une acidification à partir du mannitol (mannitol +).
- Le milieu Chapman permet seulement une orientation pour l'identification de l'espèce *Staphylococcus aureus* mais des testes de confirmation est obligatoire
- Germe indicateur de contamination humaine (ou animale ou originelle) dans les aliments

### **5- La recherche et numération des levures et moisissures:**

Les levures et moisissures sont des agents importants de détérioration des aliments acides ou à faible activité d'eau, ces champignons microscopiques filamenteux du règne des mycètes sont pluricellulaires excréant les mycotoxines



**Figure 8:** Recherche et dénombrement des Streptocoques fécaux

La contamination des jus de fruits par des levures peut résulter en une formation de turbidité, production de CO<sub>2</sub>, dégagements de mauvaises odeurs et changements de couleur (Grinbaum et al. 1994). La recherche, l'isolement et le dénombrement s'effectue souvent sur un milieu gélosé OGA (contient des antibiotiques ou autres agents antibactériens) par l'étalement en surface d'un 0,1ml de la suspension mère et ses dilutions à l'aide d'un râteau stérile.

### **Matériel**

- Echantillons (dilutions)
- Milieu de culture OGA(Oxytétracycline Glucose Agar).
- Boîtes de Pétri
- Râteaux pour l'étalement
- Pipette Pasteur

### **Méthodologie**

- Préparer le milieu de culture OGA
- Couler 10 à 15 ml dans les boîtes de Pétri et laisser solidifier (44 à 47°C).
- Mettre 4 gouttes prélevées de chaque dilution en surface de la gélose.
- Etaler la surface de la gélose à l'aide d'un râteau pour assurer la distribution des levures et moisissures dans le tout de la surface.
- Incuber les boîtes à 25-30°C pendant 3 à 5 jours.

### **Interprétation des résultats**

Le nombre de levures et moisissures est évalué après 3 à 5 jours d'incubation à 25-30°C, Présence d'une pousse au niveau de la Gélose. Si la charge microbienne occupe une grande surface de la boîte on peut diviser la boîte en 4 quadrants afin de faciliter le dénombrement. Le nombre obtenu est multiplié par 4 pour trouver le nombre total des germes dans la boîte.

### **6- La recherche et la numération des Anaérobies Sulfito-Réducteurs (Clostridium)**

Ces bactéries anaérobies sulfito-réductrices sont des hôtes normaux de l'intestin de l'homme et des animaux, rencontre fréquemment dans la nature et en particulier dans le sol (bactéries telluriques) et dans les matières organiques en cours de putréfaction.ils sont très résistants en raison de leur caractère sporulé.

Ils sont souvent bactéries bâtonnet Gram + (bacille Gram+), se développant en 24 à 48 heures sur une gélose Viande Foie en donnant des colonies typiques réduisant le sulfite de sodium (Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>) qui se trouve dans le milieu, en sulfure qui en présence de Fe<sup>2+</sup> donne FeS (sulfure

de fer) de couleur noire. Les spores des ASR constituent généralement des indices de contamination ancienne.

Parmi les *Clostridium* sulfite- réducteurs:

- **Clostridium perfringens** : ce germe est très souvent à l'origine de toxi-infections d'origine alimentaire.
- **Clostridium botulinum** : provoque le botulisme (neurotoxines produites).
- **Clostridium tétanique** : provoque le tétanos

### Matériel

- Échantillons et ses dilutions.
- Tubes à essais (tubes à vises) + portoirs
- Pipettes à gradué de 5ml.
- Milieu de culture gélosé viande-Foie (VF).

### Additifs

- Sulfite de sodium ( $\text{Na}_2\text{SO}_3$ ) : réduit par les *Clostridium* au cours de leur multiplication en sulfure.
- Alun de fer ( $(\text{NH}_4)\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$ ) : mise en évidence de la réduction du sulfite de sodium (donne la coloration noire des colonies dans le cas de réduction de sulfite de sodium).

### Méthodologie

- Préparer le milieu gélose de F.V
- Prendre 5ml de l'échantillon (dilutions) à analyser et mettre dans un tube stérile.
- Chauffer ces tubes de l'ordre de 80°C pendant 8 à 10 minutes, dans le but de détruire toutes les formes végétatives des ASR éventuellement présentes.
- puis refroidir immédiatement les tubes par l'eau froide.
- Ajouter 4 gouttes d'Alun de fer et 20 gouttes (1cc) de sulfite de sodium à chaque tube
- Couler environ 18 à 20 ml de gélose Viande Foie, fondue puis refroidie à 45°C
- Agiter le mélange et incuber 37°C/72h tout en vérifiant chaque 24h la présence des colonies noires.

### Interprétation des résultats:

Tube positif —————> présence des colonies noires : présence des *Clostridium*

Tube négatif —————> absence des colonies noires : absence *Clostridium*.

## 2.4.2 Etude qualitative

L'identification où la détermination des microorganismes bénéficie depuis de nombreuses années déjà de l'existence de plusieurs méthodes et basé sur plusieurs caractéristiques (morphologique, culturaux, biochimiques...etc) :

- Galerie classique avec un nombre limité de caractères.
- Galerie API qui sont performantes (on utilise API 20E pour les coliformes, entérobactéries). Généralement ces techniques sont variées en fonction de la nature des germes isolés tel que: les entérobactéries, coliformes, levures moisissures.....etc.

Il s'agit de suivre des différentes étapes pour identifier les souches précédemment citées

### 1. Isolement

En vue des colonies des germes à identifier, les souches conservées à -20°C ont été régénérées dans un bouillon d'enrichissement, puis ensemencées sur la gélose Mac Conkey. L'incubation se fait à l'étuve à 37°C pendant 24 heures.

### 2. Identification

Se déroule dans la voie d'identification classique et galerie d'API à la fois pour les entérobactéries (coliformes),

#### 2.1 Examen macroscopique de caractères culturaux

Après ensemencement sur la gélose Mac Conkey et incubation à l'étuve à température convenable pour la croissance 37°C/24h, les caractéristiques qui peuvent être observées lors de la description macroscopique sont :

- **La taille**
- **La forme** bombée, plate, ondulée, dentellée, lobée, surélevées
- **L'aspect de la surface** lisse, brillant, rugueux.
- **La consistance** grasse, sèche, muqueuse.
- **La couleur** blanc, jaune, rose, orangé, vert, noire.
- **Le pigment** peut être soluble ou insoluble dans le milieu
- **L'odeur** présente ou absence (Guezlane., et al, 2008).

#### 2.2 Examen microscopique de caractères morphologiques

##### 2.2.1. Etats frais

##### Principe

L'examen direct à l'état frais permet d'apprécier la morphologie des bactéries, leur groupement, leur abondance et d'observer leur mobilité.

## **Technique**

L'examen se réalise en déposant sur une lame porte-objet une goutte de la suspension bactérienne recouvre par une lame couvre-objet ou prendre une colonie puis ajouter une goutte d'eau distillé entre une lame et lamelle puis on passe vers l'observation sous le microscope du grossissement  $\times 10$  puis  $\times 40$ .

## **L'interprétation des Résultats**

- L'observation microscopique à l'état frais permet de rencontre le type de mobilité ainsi que la forme des germes.
- Les entérobactéries et les coliformes sous présente sous formes de bacilles immobiles ou mobiles péritriches.

### **2.2.2. Coloration simple**

Consiste la préparation d'un frottis (ensemble des colonies blanchâtres fixées).elle permet d'observé la forme et le regroupement des bactéries.

Technique:

- Préparer un frottis.(étalement de la colonie trempé dans une goutte d'eau distillé)
- Fixation du frottis par un passage rapide de la lame sur la flamme 3à 5fois (séchage)
- recouvrir le frottis par le bleu de méthylène et laisser agir pendant 10 minutes.
- Rincer la lame par l'eau de robinet.
- Sécher la lame à l'aide de bec Bunsen (flamme)
- Observer sous le microscope de l'objectif faible jusqu'à plus fort en utilisant l'huile de cèdre.

## **L'interprétation des Résultats**

Des colonies sous formes bacille, coccobacille regroupés en amas

### **2.2.3. Coloration de Gram**

C'est la coloration de base en bactériologie et elle permet de classifier les bactéries selon leur structure.

## **Technique**

La coloration de Gram se déroule en plusieurs étapes qui se consistent à:

- Préparer le frottis puis le fixer.
- Colorer le frottis par le violet de gentiane, laisser agir une minute.
- Rejeter l'excès de colorant et laver par l'eau.
- Recouvrir la préparation de lugol, laisser agir une minute.
- Rejeter le lugol puis laver à l'eau.

- Décolorer par l'alcool pendant 1min.
- Rincer la lame par l'eau puis recolorer ensuite avec la fuchsine diluée et laisser agir quelque seconde (30s).
- Séchage de la lame à la flamme et on passe vers l'observation microscopique  $\times 100$  en utilisant le huile de paraffine.

### **Interprétation des résultats**

De type de Gram obtenus:

- **Gram+** : Si les bactéries gardé la première couleur violet.
- **Gram –** : Si les bactéries sont colorés en rose.

### **2.3 Identification biochimique**

Il basé sur deux voies d'identification galerie classique et galerie d'API 20E au foie pour les entérobactéries (coliformes).

#### **2.3.1 L'API 20E**

Est un système standardisé pour l'identification des entérobacteriaceae et autres bacilles à Gram négatif, comprenant 21 tests biochimiques. La liste complète des bactéries qu'il est possible d'identifier avec ce système est présente dans le tableau d'identification en fin de notice.

#### **Principe**

La galerie API 20 E comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés.

Les microtubes sont inoculés avec une suspension bactérienne qui reconstitue les tests. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition des réactifs.

La lecture de ces réaction se fait à l'aide du tableau de lecture et d'identification est obtenue à l'aide du catalogue analytique ou d'un logiciel d'identification.

#### **Technique**

- **Préparation de la galerie**

Réunir fond et couvercle d'une boîte d'incubation et répartir de l'eau dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide.

Déposer stérilement la galerie la boîte d'incubation.

- **Préparation de l'inoculum**

Faire une suspension bactérienne, dans une ampoule de Suspension Medium ou dans un tube d'eau distillée stérile, d'opacité légère avec une seule colonie prélevée sur un milieu gélosé.

- **Inoculation de la galerie**

Remplir les tubes et les cupules des tests : CIT, VP, GEL avec la suspension bactérienne.

Remplir uniquement les tubes des autres tests.

Créer une anaérobiose dans les tests : ADH, LDC, ODC, URE, H<sub>2</sub>S en remplissant leur cupule d'huile de paraffine.

Refermer la boîte d'incubation et la placer à 35-37°C pendant 18 à 24 heures.

- **Lecture**

Après incubation, la lecture de la galerie doit se faire en se référant au tableau de la lecture.

Réaliser les tests nécessitant l'addition de réactifs : voir tableau de résultats.

### **Identification**

- **Avec le tableau d'identification**

Comparer les réactions notées sur la fiche de résultats avec celle du tableau.

- **Avec le catalogue analytique**

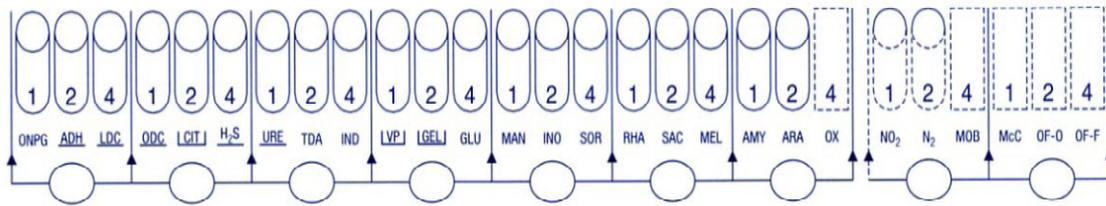
Les tests sont regroupés en groupe de 3, et une valeur (1,2 ou 4) est indiquée pour chacun.

Additionner à l'intérieur de chaque groupe les nombres correspondants aux tests positifs.

On obtient un nombre à 7 chiffres qui sert de code d'identification (fig.9).

- **Avec un logiciel d'identification**

**api<sup>®</sup> 20 E**



Le code n°:

Ident.

**Figure 9:** Système d'identification l'Api 20

### **3- Résultats et discussion**

#### **3-1 Caractérisation des paramètres organoleptiques**

Les paramètres organoleptiques sont représentés dans le tableau 2. Les changements observés sur nos échantillons avec les trois emballages (plastique, verre et brique) reflètent un métabolisme excessif des micro-organismes (Bactérie, levures et moisissures) qui ont mené au virage du goût et de la couleur des jus vers un goût désagréable, une couleur foncée et la formation des odeurs indésirables ainsi qu'un gonflement de l'emballage en carton (en brique) provoqué par la production du dioxyde de carbone et de l'hydrogène. Ces observations peuvent être confirmées par les variations constatées des paramètres physico-chimiques et microbiologiques.

#### **3-2 Variation des paramètres physico-chimiques**

##### **3-2-1 Variation de pH**

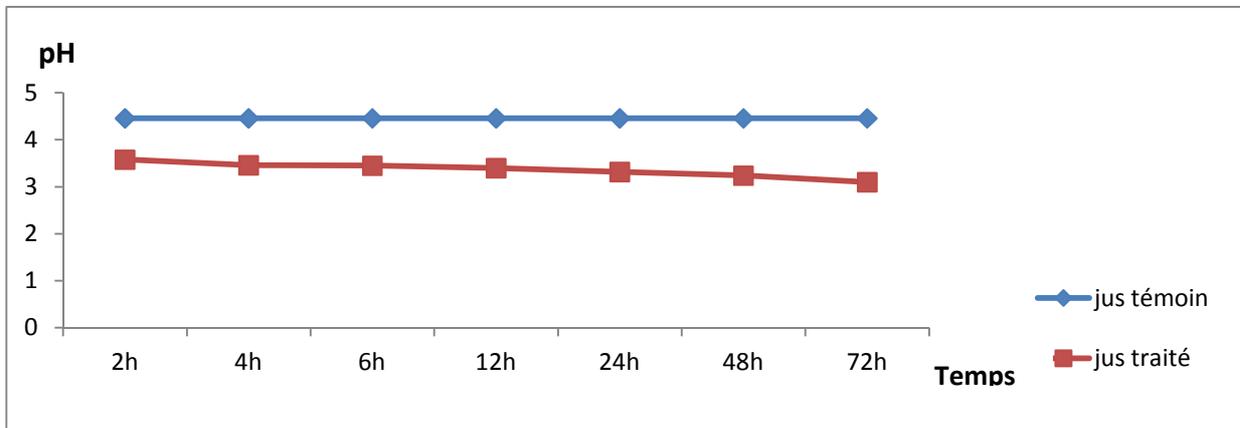
Les résultats trouvés de pH pour les trois emballages sont illustrés dans les figures 10, 11, et 12. Le pH est l'un des facteurs limitant la croissance microbienne où la vitesse de leur croissance est dépendante du pH du milieu. Les variations de pH pour l'emballage en plastique sont comprises dans l'intervalle [3,10 et 3,58] avec une moyenne de 3,36. En ce qui concerne l'emballage en verre les résultats de pH varient entre 3 et 4 avec une moyenne de 3,51. Pour l'emballage en brique les valeurs de pH sont limitées dans l'intervalle [3 et 3,80] avec une moyenne de 3,36. L'acidité observée dans les trois jus peut confirmer la synthèse de métabolites libérés par les germes qui se sont développés dans le milieu. En plus, les valeurs obtenues de pH dans les trois emballages (plastique, verre et brique) sont inférieures aux valeurs témoins qui sont respectivement : 4,46 ; 4,87 ; 4,89. Ces constatations démontrent une mauvaise conservation des jus utilisés dans leurs points de vente du fait que la valeur normale de pH établie par AFNOR (2008) est de 3,70.

##### **3-2-2 Variation de la Température**

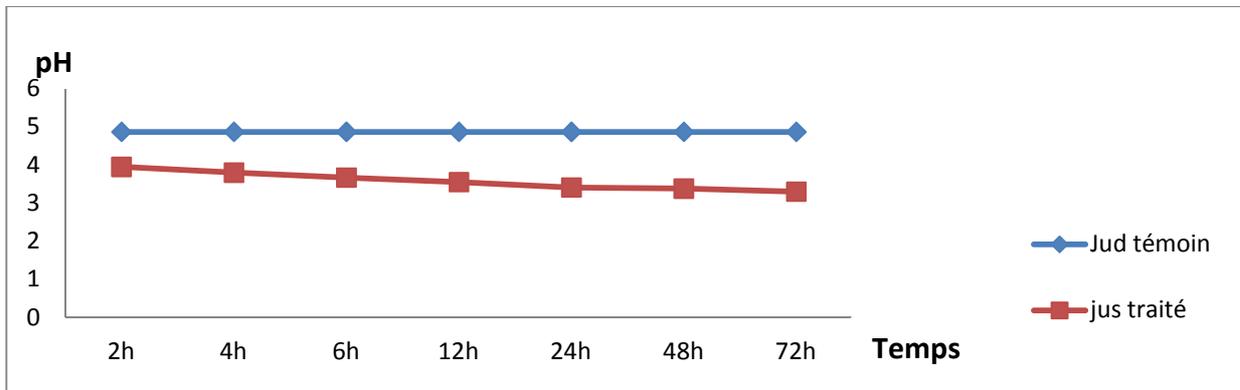
La température des jus est variable au cours de notre expérimentation durant : 2h, 4h, 6h, 12h, 24, 48h et 72h. Les résultats obtenus des températures des jus des trois emballages (plastique, verre et brique) sont représentés respectivement dans les figures 13, 14 et 15.

**Tableau 2 :** Paramètre organoleptique de jus de fruit emballé dans le plastique, verre et brique.

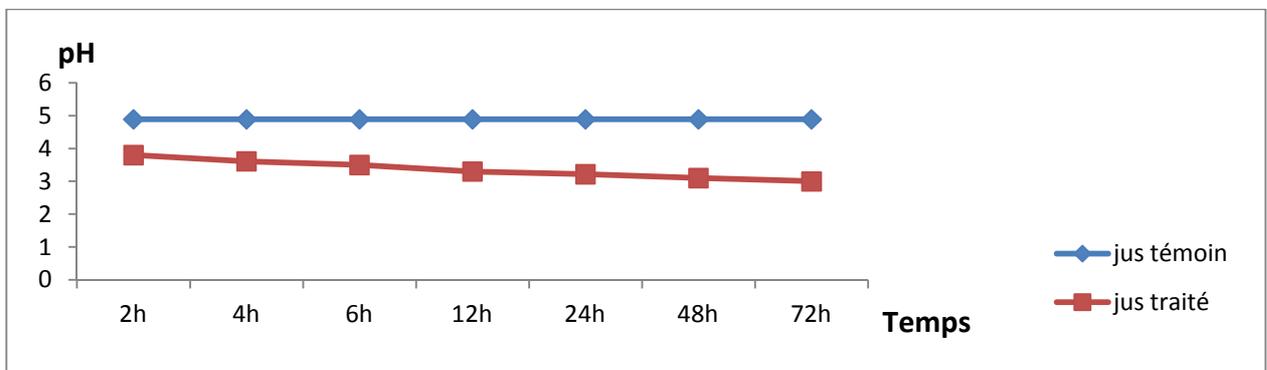
Échantillons	Paramètres organoleptiques			
	Gout	Odeur	Couleur	Texture
Jus témoin	Désirable	Agréable	Acceptable	Consistance normal
Jus traité	Indésirable rance	Désagréable	Plus foncé	Normale



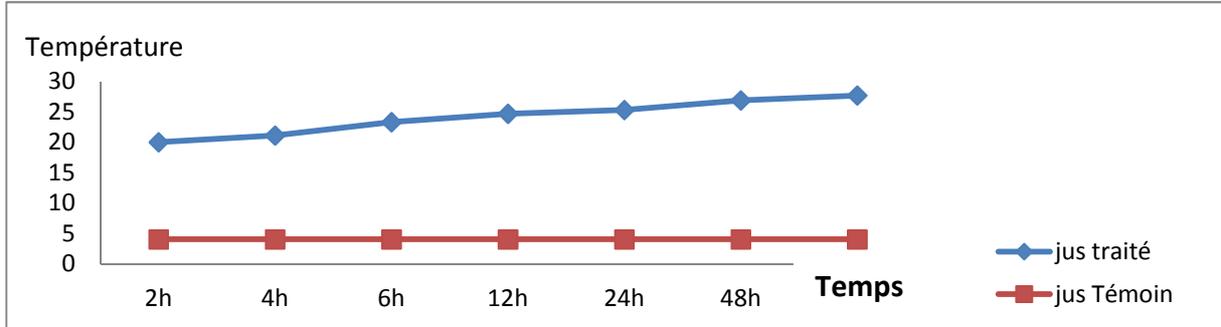
**Figure 10:** La Variation de pH de jus traité et de jus frais emballé en plastique



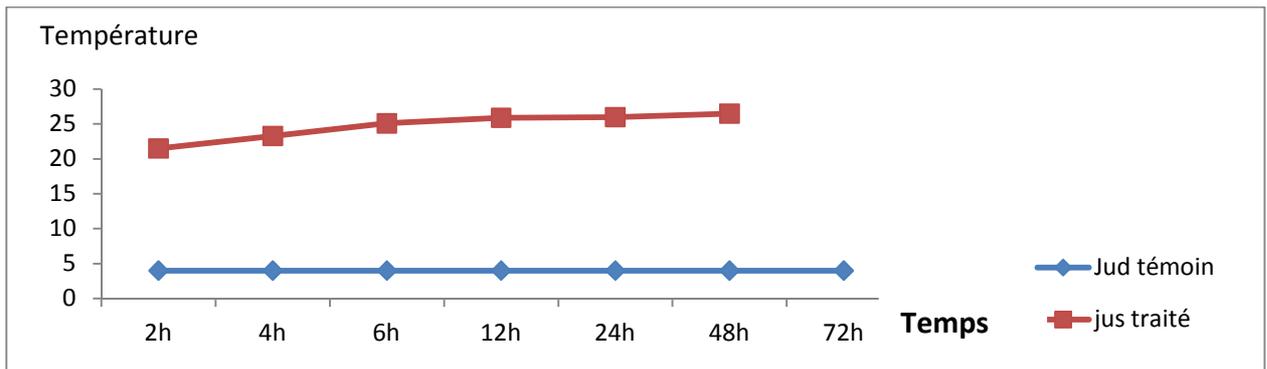
**Figure 11 :** La Variation de pH de jus traité et jus frais emballé en verre.



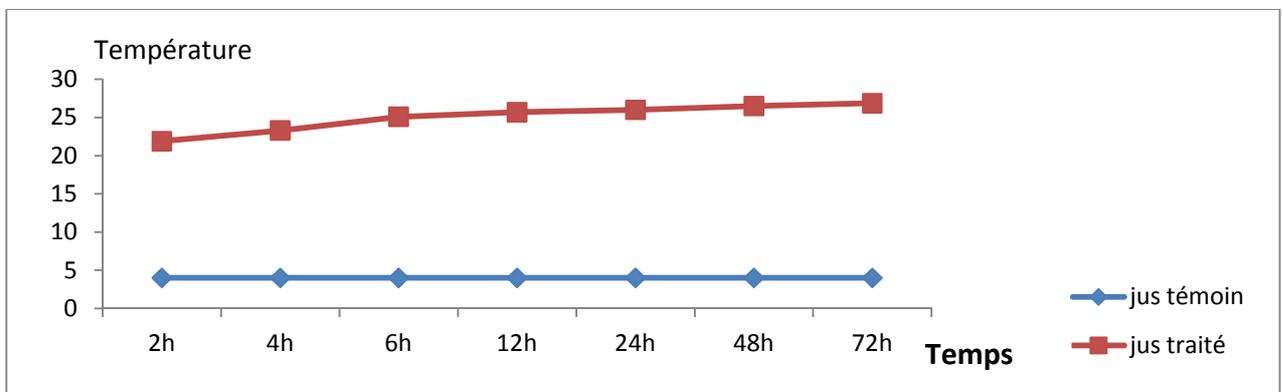
**Figure 12:** La Variation de pH de jus traité et jus frais emballé en brique.



**Figure 13:** La variation de la température de jus traité et de témoin emballé en plastique.



**Figure 14:** La variation de la température de jus traité et de témoin emballé en verre.



**Figure 15:** La variation de la température de jus traité et de témoin emballé en brique.

La température augmente la vitesse de l'ensemble des réactions dont il est le siège (anabolisme, catabolismes) plus la température augmente plus la croissance des germes augmente. Les résultats obtenus des températures pour l'emballage en plastique varient de 20°C à 27,7°C avec une moyenne de 24,14°C. Pour l'emballage en verre, la température est comprise entre 21,5°C et 26,9°C avec une moyenne de 25°C. En ce qui concerne l'emballage en brique, les valeurs trouvées sont entre 22°C et 26,87°C avec une moyenne de 25°C. L'exposition des jus à la température du système au cours du temps induit probablement une accélération des réactions métaboliques des différents organismes qui s'installent dans le milieu. Dans notre cas la relation de la température et du pH est étroite ; cependant les deux facteurs influent la prolifération des germes ainsi que la modification des paramètres organoleptiques.

### **3-3 Variation des paramètres microbiologiques**

Les résultats de la recherche microbiologique sont illustrés dans le tableau 3.

On a utilisé plusieurs milieux de cultures pour la recherche des germes à contamination fécales (Les germes totaux, les coliformes totaux, les coliformes fécaux) et les germes pathogènes (Les staphylocoques, les levures et moisissures et Clostridium). Seuls les deux échantillons de jus de fruit non traité et emballés en verre et en brique ont présenté des résultats négatifs pour toutes les analyses, par contre les jus de fruits emballés en plastique, verre et brique traité ( exposé au lumière) ont présenter des différentes résultats ( négatifs et positifs).

#### **3-3-1 Développement des germes à contamination fécales**

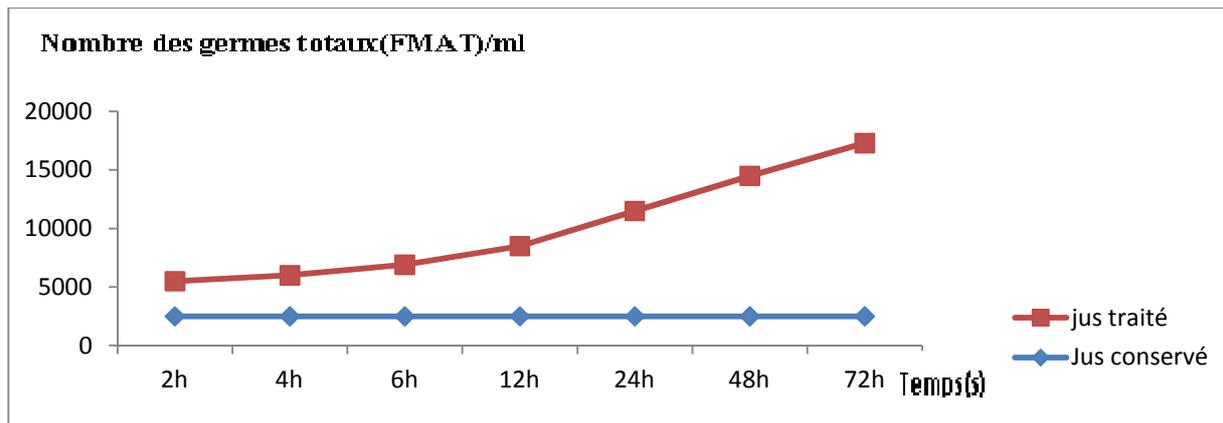
##### **3-3-1-1 Germes totaux**

Les résultats trouvés des germes totaux pour les trois emballages sont illustrés dans les figures 16, 17, et 18, 19. On constate qu'il y a une pousse des germes totaux dans le jus traité emballée en plastique durant 2h, 4h, 6h, 12h, 24h, 48h et 72h alors que les variations des germes sont comprises dans l'intervalle  $[35 \times 10^2 \text{ à } 148 \times 10^2]$  avec une moyenne de  $82,83 \times 10^2$  germe/ml. En ce qui concerne l'emballage en verre les résultats des germes varient entre  $8 \times 10^2$  et  $44 \times 10^2$  avec une moyenne de  $23,28 \times 10^2$  germes /ml. Par contre la pousse des germes dans le jus emballé en brique leurs valeurs sont limitées dans l'intervalle  $[3 \times 10^2 \text{ à } 25 \times 10^2]$  avec une moyenne de  $12,85 \times 10^2$  germes/ml.

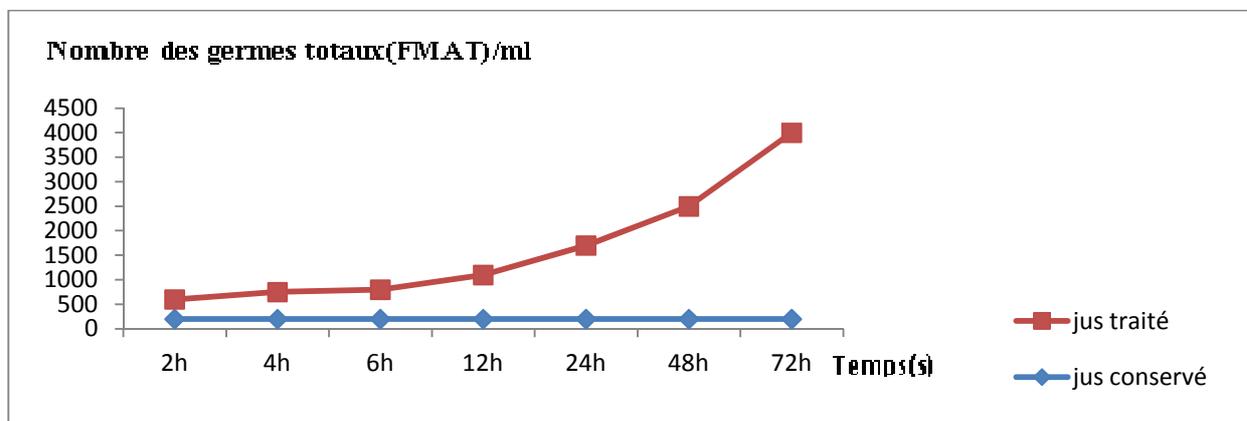
**Tableau 3 : Les résultats des germes recherchés dans le jus de fruit**

Échantillons Germes Recherchés	Jus en plastique		Jus en verre		Jus en carton	
	Jus traité	Témoin	Jus traité	Témoin	Jus traité	Témoin
<b>Germes totaux</b>	+	+	+	-	+	-
<b>Coliformes totaux</b>	+	-	+	-	+	-
<b>Coliformes fécaux</b>	-	-	-	-	-	-
<b>Streptocoques</b>	-	-	-	-	-	-
<b>Staphylocoques</b>	-	-	-	-	-	-
<b>Levures et moisissures</b>	+	+	+	-	+	-
<b>Clostridium</b>	+	-	+	-	+	-

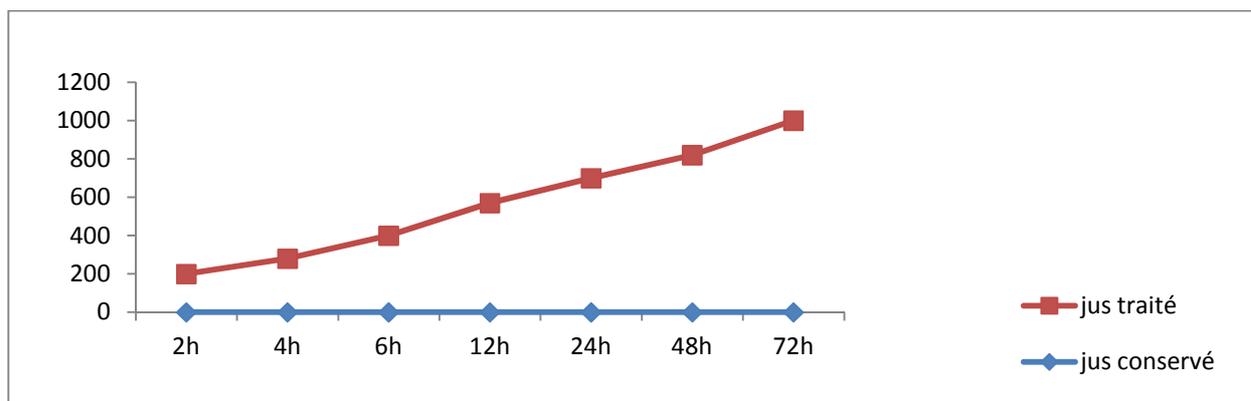
(+) : résultats positif (présence des germes)                      (-) : résultats négatif (absence des germes)



**Figure.16 :** Le développement des germes totaux dans le jus de fruit emballé en plastique.



**Figure.17:** Le développement des germes totaux dans le jus de fruit emballé en verre.



**Figure.18:** Le développement des germes totaux dans le jus de fruit emballé en brique.

Jus de fruit emballé en plastique



Jus non traité



Jus traité

Jus de fruit emballé en verre



Jus non traité



Jus traité

Jus de fruit emballé en brique



Jus non traité



Jus traité

**Figure.19** : La prolifération des germes totaux sur la gélose TGEA

Cependant il y a une pousse des germes avec une multiplication rapide surtout dans le jus de fruit emballé en plastique.

La présence de ces germes a un effet sur la santé humaine qui provoque des troubles gastro-intestinaux [9].

### **3-3-1-2 Coliformes totaux**

Les résultats obtenus des coliformes totaux des jus des trois emballages (plastique, verre et brique) sont représentés respectivement dans les figures 20, 21, 22 et 23.

Les résultats relatifs au test de dénombrement des coliformes totaux de jus de fruit traité et emballé en plastique ont montré qu'il y a une augmentation du nombre des coliformes leur valeurs sont limitées dans un intervalle [ $0,4 \times 10^2$  à  $1,6 \times 10^2$ ] avec une moyenne de  $0,67 \times 10^2$  germes/ml. De même la recherche des coliformes dans le témoin n'a révélée aucune présence de ces coliformes. Par contre la variation des valeurs des coliformes dans le jus de fruit traité et emballé en verre a enregistré avec une absence des coliformes dans les premières heures de traitement 2h, 4h et 6h. Une apparition des coliformes est observée à partir de 12 heures jusqu'à 72 heures. Les valeurs sont illustrées dans l'intervalle [ $0,1 \times 10^2$  à  $0,45 \times 10^2$ ] avec une moyenne de  $0,15 \times 10^2$  germes/ml. En outre le témoin de cet emballage n'a révélé aucune pousse des coliformes. En ce qui concerne le jus de fruit emballé en brique on constate qu'il y a une présence des coliformes mais à partir des 12 heures jusqu'à 72 heures. Les valeurs varient entre  $0,1 \times 10^2$  et  $0,93 \times 10^2$  germes/ml avec une moyenne de  $0,32 \times 10^2$  germes/ml. Par contre dans le témoin on obtient des résultats négatifs.

La présence des coliformes totaux peut être un bon indice des mauvais conditionnements, manipulation ou de traitements (pasteurisation insuffisante) ou bien de manque de remplissage aseptique.

L'effet de ces coliformes se manifeste le plus souvent par des troubles gastro-intestinaux (nausées, vomissements et diarrhée), habituellement de courte durée. Cependant, chez les personnes sensibles, telles que les bébés, les personnes âgées et les personnes présentant un déficit immunitaire, les effets peuvent être plus graves, chroniques (p. ex. lésions rénales) ou même mortels [9].

### **3-3-1-3 Confirmation des Coliformes totaux**

- **Identification macro et microscopique**

L'étude microscopique et macroscopique d'un germe prélevé du milieu BCPL cultivé sur un milieu spécifique BCP (Repiquage), permet de confirmer des colonies rondes, bombées, lisses avec un contour régulier, une couleur jaune qui est l'indice d'une réaction lactose positif l'une des caractéristiques des coliformes. Une deuxième identification consiste à la coloration de Gram qui révèle les autres caractères morphologiques des coliformes qui sont:

- Bactéries Gram négatif
- Bactéries sous forme bacilles et coccobacilles (fig.24)

- **Identification biochimique**

Elle repose sur l'ensemencement des Germes de BCPL dans les milieux de culture déshydratés de l'API, après une incubation de 37°C pendant 18 à 24h, les résultats constatés ont été mentionnés dans les figures (Fig.25).

### **3-3-1-4 Les coliformes fécaux**

Les analyses faites pour la recherche des coliformes fécaux ont enregistré des résultats négatifs pour les trois gammes d'emballage (plastique, verre et brique). (Fig.26).

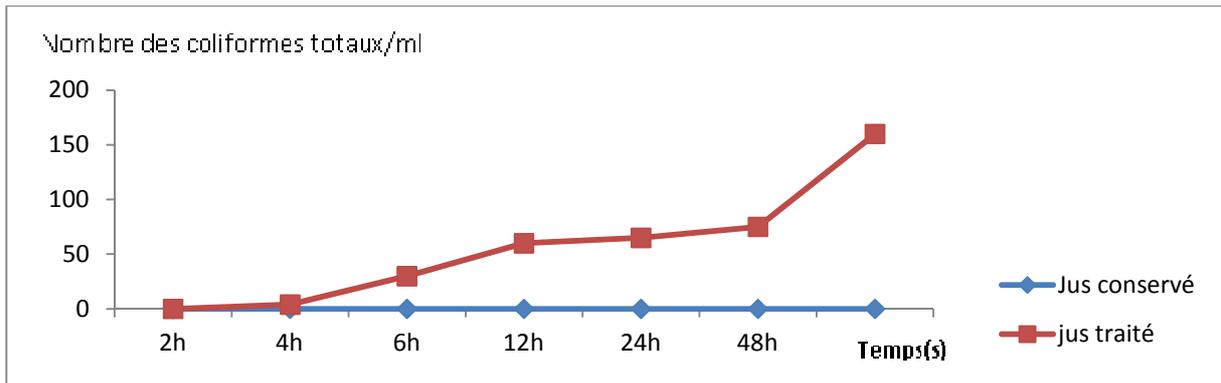
L'effet de l'exposition à ces coliformes à un effet néfaste sur la santé se manifeste par des troubles gastro-intestinaux (nausées, vomissements et diarrhée) [9].

### **3-3-2 Développement des germes pathogènes**

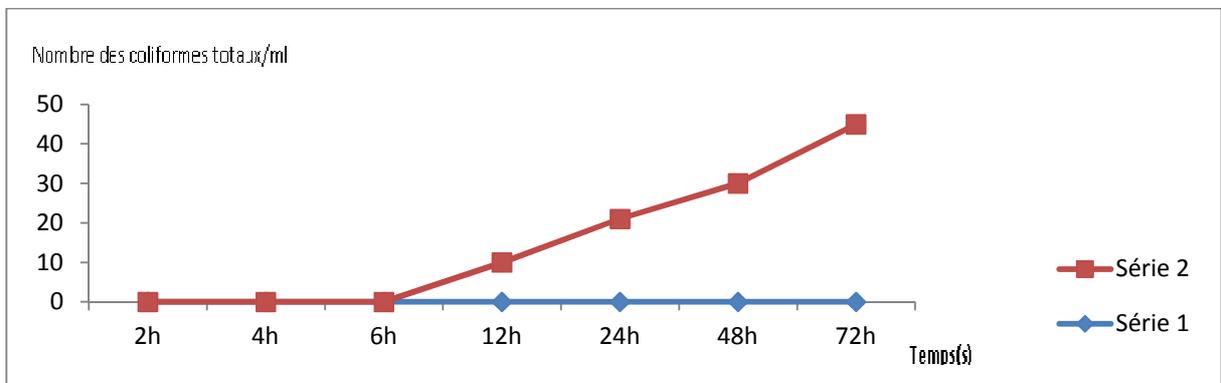
#### **3-3-2-1 Les staphylocoques**

Les résultats des analyses pour la recherche des staphylocoques dans le jus de fruits des trois emballages (plastique, verre et brique) sont négatifs et aussi pour les échantillons de jus de fruits non traité (Fig. 27).

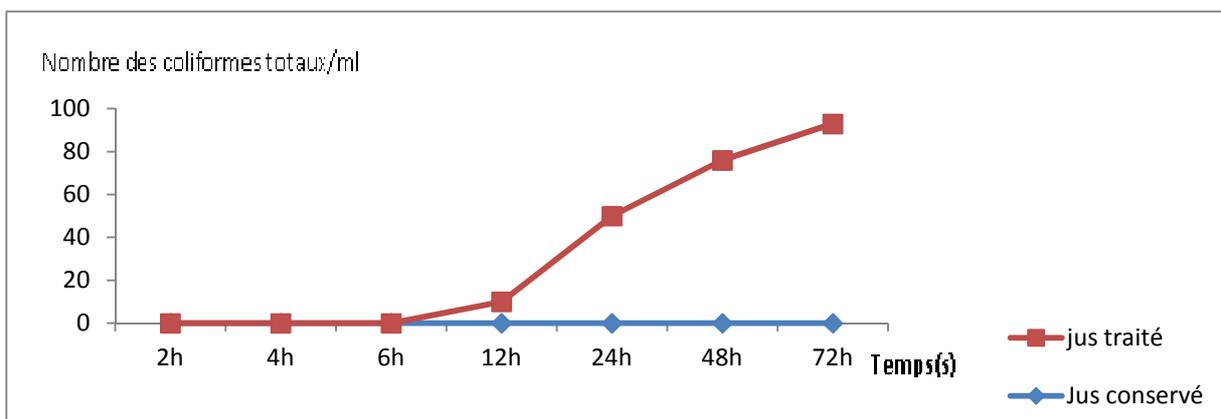
L'ingestion de ces entérotoxines libéré par les staphylocoques provoque, dans un délai court de 2 à 4 heures en moyenne (souvent les malades sont encore sur lieu de repas), des troubles digestifs, parfois violents. Il s'agit surtout de vomissement, diarrhée, douleurs abdominales, nausée et parfois de céphalées et de troubles neurologiques (prostration) [10].



**Figure.20:** Le développement des coliformes totaux dans le jus de fruit emballé en plastique.



**Figure.21:** Le développement des coliformes totaux dans le jus de fruit emballé en verre.



**Figure.22:** Le développement des coliformes totaux dans le jus de fruit emballé en brique

### Jus de fruit emballé en plastique

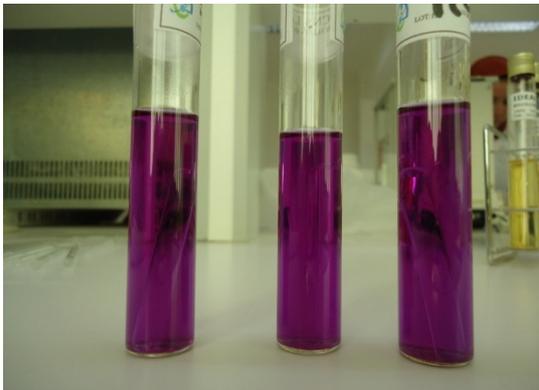


Jus non traité

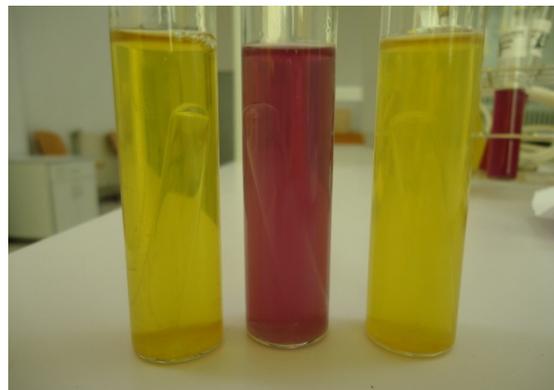


Jus traité

### Jus de fruit emballé en verre

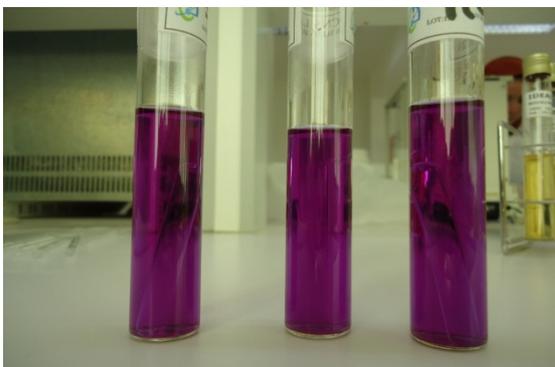


Jus non traité



Jus traité

### Jus de fruit emballé en brique

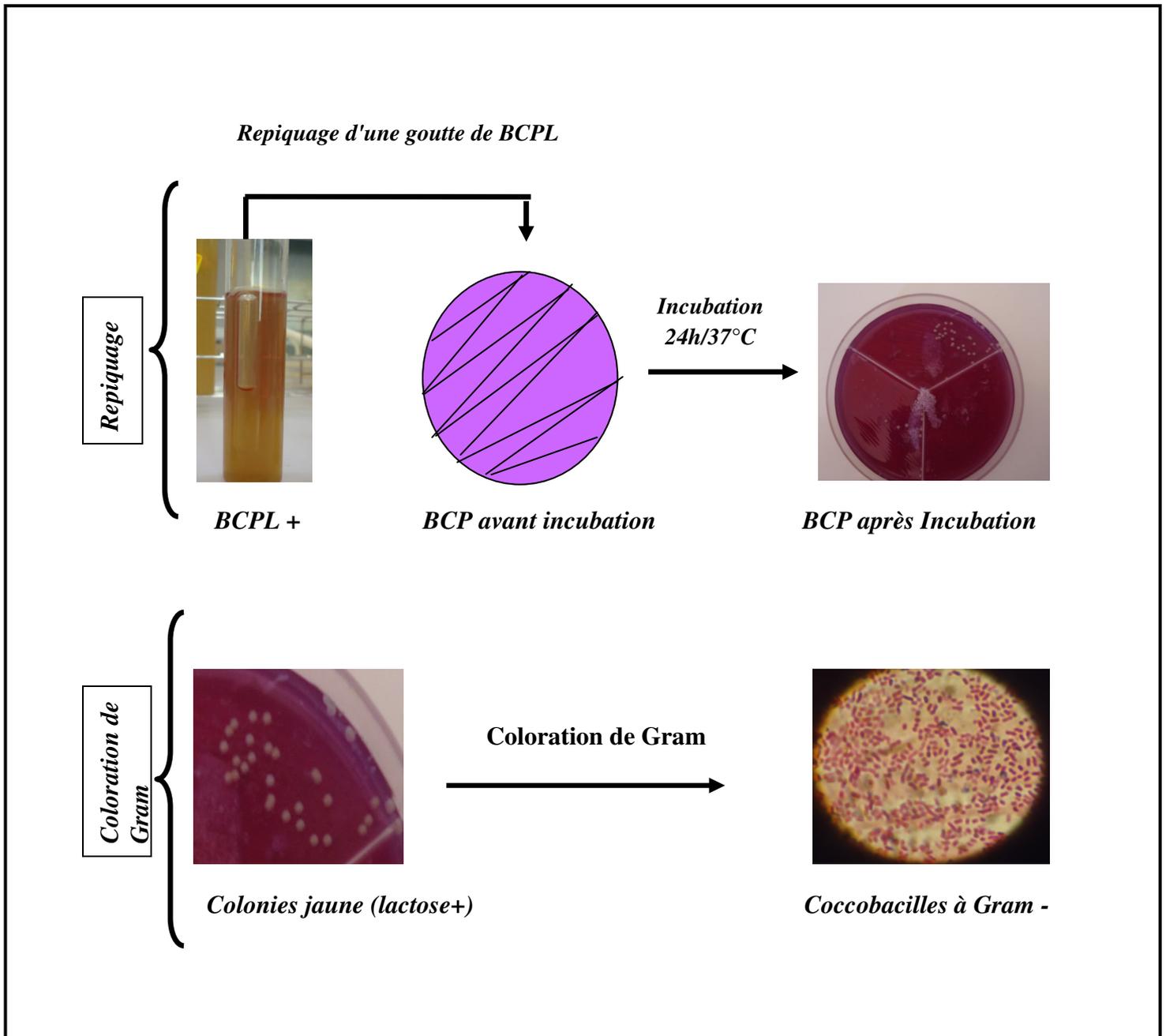


Jus non traité

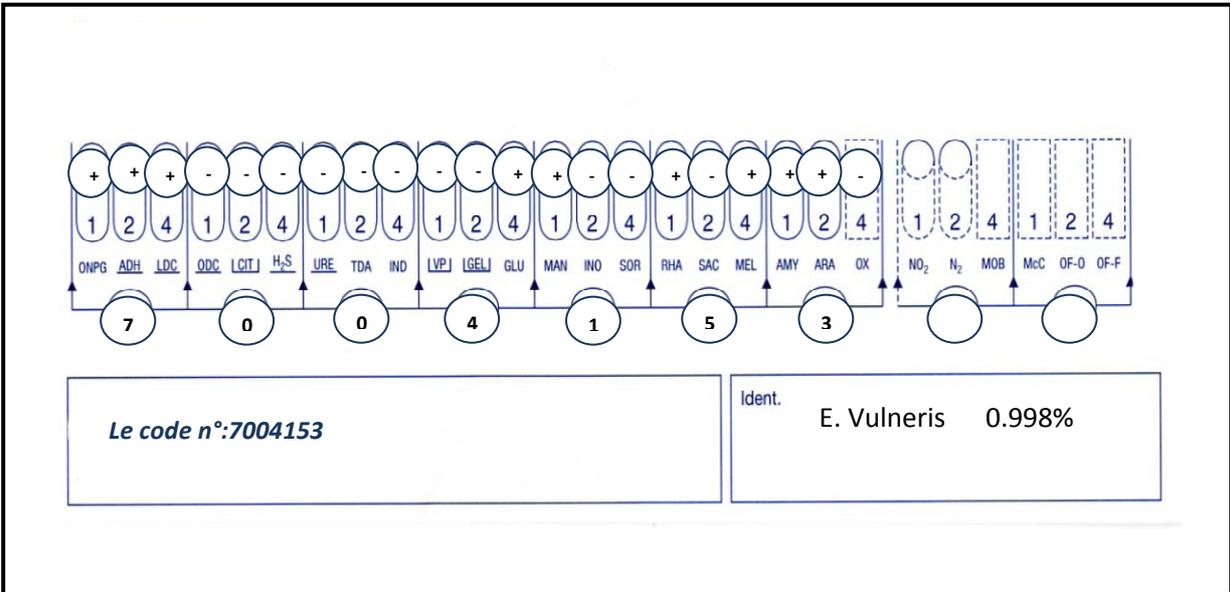


Jus traité

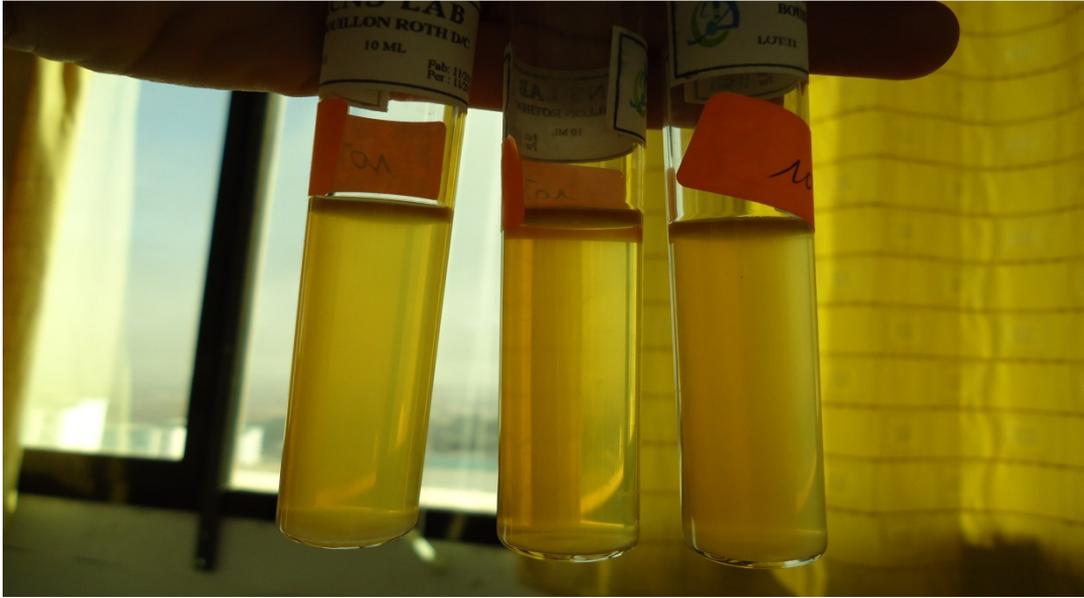
**Figure 23** : Résultat de la recherche des coliformes totaux sur le BCPL.



**Figure 24:** Résultats d'identification microscopiques des entérobactéries (coliformes totaux)



**Figure 25:** Résultats de confirmation des coliformes totaux par l'API 20E



**Figure 26 :** La recherche des coliformes fécaux sur le milieu Rothe.



**Figure 27 :** La recherche des staphylocoques sur le milieu Chapman.

### **3-3-2-2 Les levures et moisissures**

Contrairement aux staphylocoques, le test d'analyse des levures et moisissures à montré une présence de ces derniers. (Fig. 28,29 ,30 et 31).

Cette présence notable de nombre de levures et moisissures dans le jus de fruit traité et emballé en plastique est comprises entre  $[2,6 \times 10^2$  à  $43,2 \times 10^2]$  avec une moyenne de  $15,51 \times 10^2$  germes/ml et pour le jus non traité sa valeur est  $2,4 \times 10^2$  germes/ml. En ce qui concerne le jus traité et emballé en verre les résultats varient entre  $0,6 \times 10^2$  et  $5 \times 10^2$  avec une moyenne de  $2,21 \times 10^2$  germes/ml et pour le jus non traité (conservé), Le résultat est positifs avec  $0,4 \times 10^2$  germes/ml. Par ailleurs le jus traité et emballé en brique on constate qu'il y a une apparition des levures et moisissures est comprise dans un intervalle  $[0,4 \times 10^2$  à  $3,9 \times 10^2]$  avec une moyenne de  $1,61 \times 10^2$  germes/ml par contre le témoin on n'a pas trouvé aucune résultat positifs. D'après les résultats le nombre est plus élevé dans les jus traité que l'échantillon non traité et dans le jus emballé en plastique que les jus emballé en verre et en brique. Ce qui montre qu'il y a eu une prolifération des levures et moisissures.

Les effets toxiques des levures et moisissures sont très dangereux lorsqu'elles libèrent des métabolites toxiques, appelées mycotoxines, ce sont principalement les moisissures alimentaires qui provoque des sarcomes de la peau des troubles neurologiques et cardiaques, des problèmes rénale. [11]

### **3-3-2-3 Confirmation des levures et Moisissures**

- **Identification des levures et Moisissures**

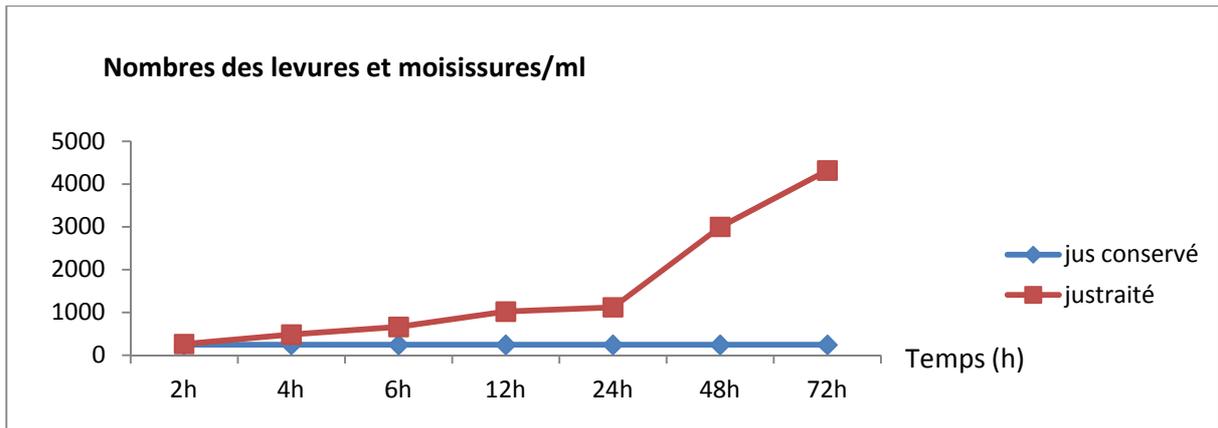
Après une observation microscopique à l'état frais d'une colonie prélevé à partir de l'OGA, on obtient les résultats suivants: Les moisissures des jus de fruits présentés sous forme des ramifications et bourgeonnement mentionnée dans la figure (Fig.32).

### **3-3-2-3 Les Clostridium**

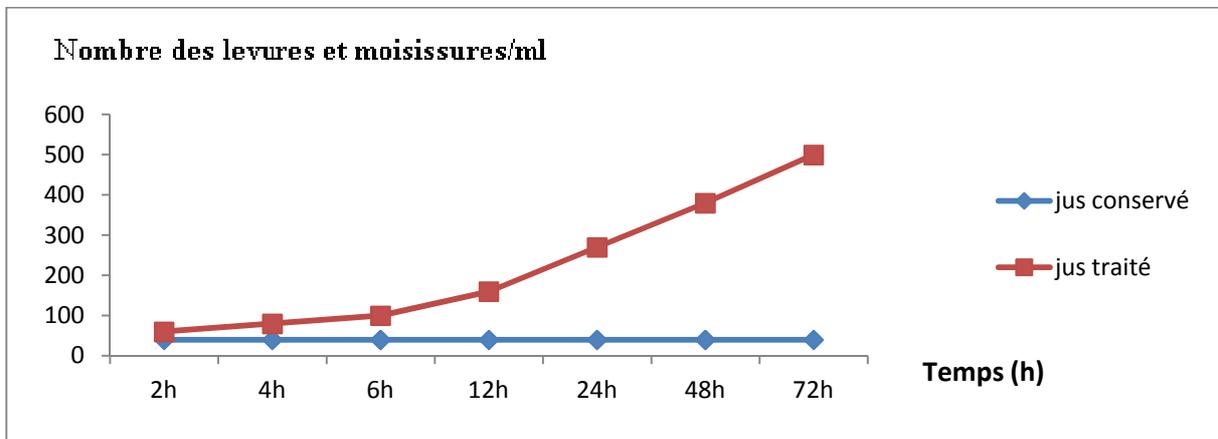
La recherche des bactéries pathogènes (*Clostridium*) à révélé également une absence de ces germes pour les jus de fruit traités et emballés en verre et brique et pour les témoins (jus non traité) par contre il y a eu une présence dans le jus de fruits traité et emballés en plastique mais juste dans les deux derniers tests qui corresponde à 48h et 72h. (Fig. 33). Leurs présences provoquent des toxi-infections humaines se manifestent par des douleurs

abdominales aiguës, de la diarrhée, des nausées, de la fièvre et parfois des vomissements. Ces symptômes apparaissent en général 8 à 12 heures après l'ingestion du repas contaminé. [10]

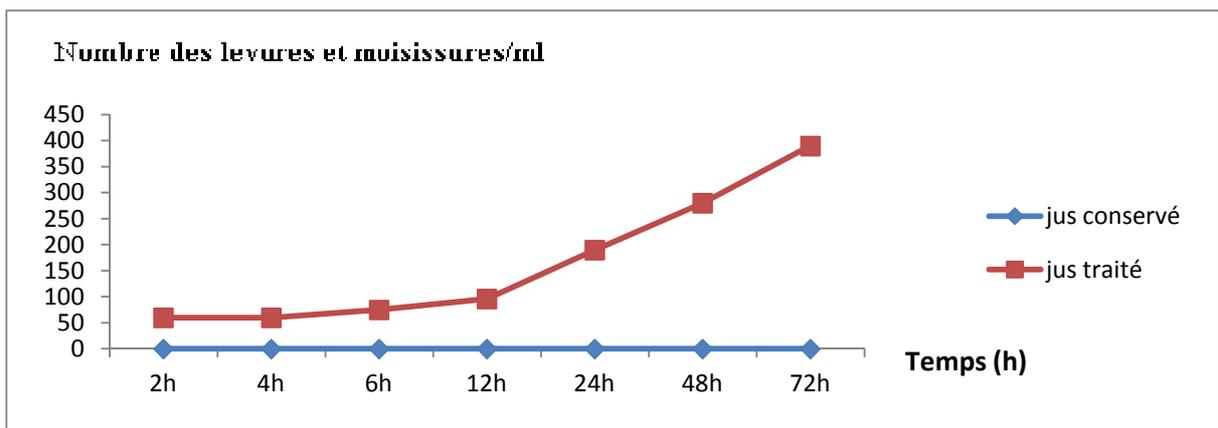
La maladie est rarement fatale bien que certains cas mortels aient été rapportés chez les personnes âgées et immunodéprimées. Dans les cas normaux, les symptômes disparaissent dans 12 à 48. Les signes cliniques sont essentiellement neurologiques : ce sont des paralysies flasques bilatérales et symétriques. Les troubles digestifs : nausées, vomissements, constipation. (Pierre et *al.*, 2003).



**Figure 28:** Le développement des levures et moisissures dans le jus de fruit emballé en plastique.



**Figure 29:** Le développement des levures et moisissures dans le jus de fruit emballé en verre.



**Figure 30:** Le développement des levures et moisissures dans le jus de fruit emballé en brique.

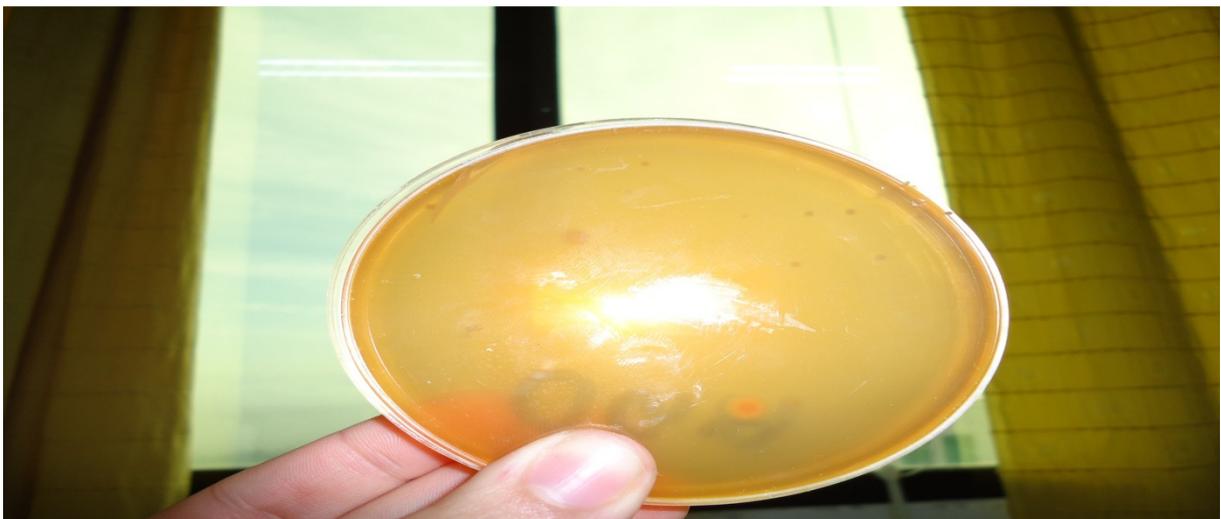
Jus emballé en plastique



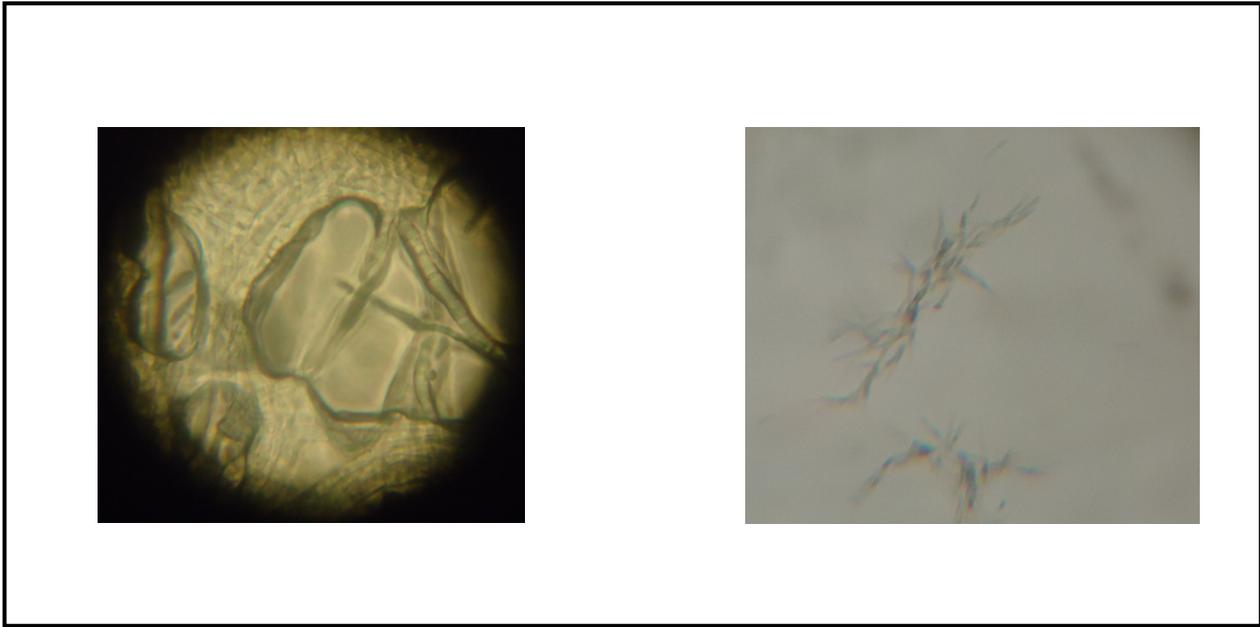
Jus emballé en verre



Jus emballé en brique

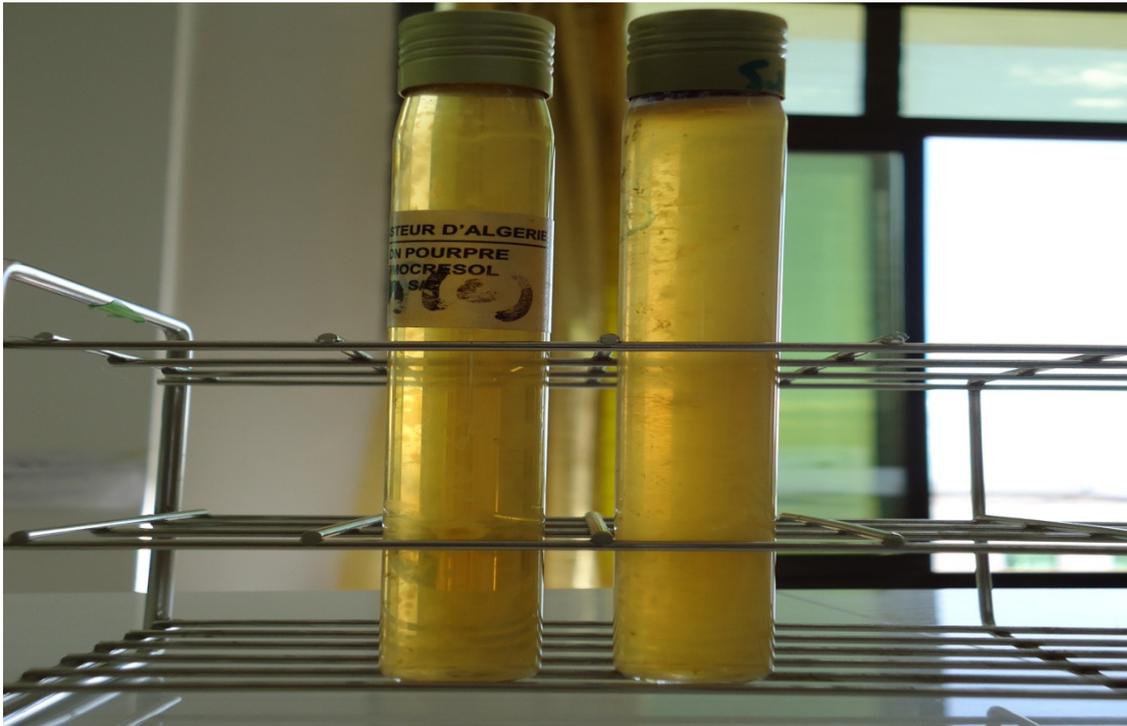


**Figure 31** : La recherche des levures et moisissures sur le milieu OGA.

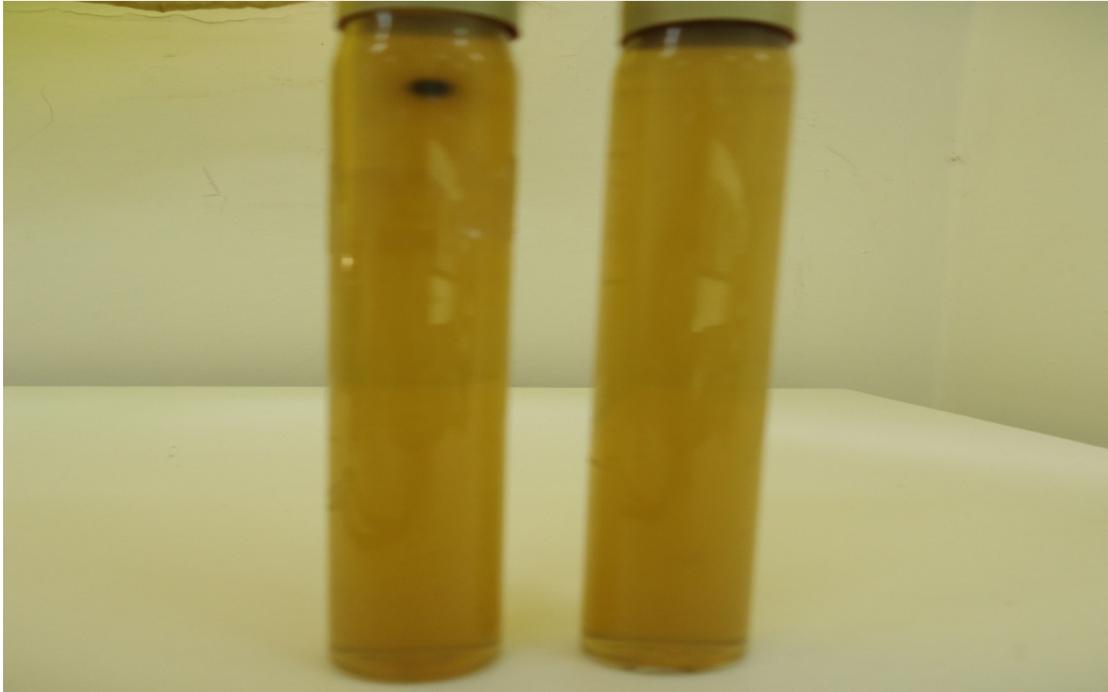


**Figure 32:**Résultats d'identification des levures et Moisissures à l'état frais.

Jus de fruits emballé en verre et en brique



Jus de fruit emballé en plastique



**Figure 33** : La recherche des Clostridium sur le milieu viande foie.

## Conclusion

L'altération des jus de fruits est un phénomène d'importance qui occasionne des pertes économiques, organoleptiques considérables dans le secteur d'activité des jus due aux conditions favorables de prolifération des microorganismes (l'effet de la température, la mal conservation, effet de soleil....etc). D'après les résultats obtenus, il s'avère que le pH du milieu et la température influent la qualité organoleptique des jus d'orange étudié avec le dispositif expérimental. Cependant dans la recherche des indicateurs à contamination fécale et pathogènes la prolifération des germes (Germes totaux, Coliformes totaux, les Levures et les moisissures, et les Clostridium) dans les jus traités est constaté considérable par rapport aux jus non traités. Elle est aussi pour les jus emballé en plastique que les jus emballés en verre et en brique. Les résultats sont négatifs pour les Coliformes fécaux et les Staphylocoques des jus traités et non traités pour les trois gammes d'emballages (plastique, verre et brique). Afin de diminuer les risques de contamination des jus de fruit en générale il est important d'appliquer les recommandations préventives suivantes :

- Améliorer les conditions dans lesquelles les jus de rue sont préparés et commercialisés.
- Renforcer les capacités des autorités locales pour le contrôle aussi bien de la matière première que des jus transformés.
- Entreprendre une recherche plus poussée sur le secteur des aliments vendus sur la voie publique: impact socioéconomique, cadre juridique et amélioration hygiénique et nutritionnelle des aliments.
- Améliorer les connaissances des vendeurs en matière d'assainissement et d'hygiène alimentaire, et leur enseigner la valeur nutritionnelle des jus par l'éducation et la formation.
- Partager les expériences et promouvoir la constitution de réseaux parmi les autorités locales et nationales au niveau régional pour diffuser les bonnes pratiques et promouvoir une stratégie commune.
- Et enfin, Sensibiliser les consommateurs aux aspects nutritionnels et hygiéniques des jus vendus dans les rues.

## **Résumé**

Les jus exposés à la température de façon permanente développent une contamination d'origine microbiologique considérable qui dépasse la norme d'hygiène alimentaire. Les variations qui touchent les jus d'orange étudié sont :

- Modification organoleptiques (goût, odeur, couleur...).
- Changement physicochimiques (pH, T°).
- Prolifération des microorganismes (modification de taux des germes).

D'après nos résultats, il ressort que les jus emballés dans le plastique sont plus vulnérable à la contamination que les jus emballés dans le verre. Et que ces derniers sont plus vulnérable que ceux emballés dans le brique (carton).

**Mots clés :** Jus de fruit, contamination, risque, effet de température, conservation, germes.

## Summary

Juices exposed to temperature permanently develop considerable microbiological contamination that exceeds the food hygiene norm. The variations that affect studied orange juice are: organoleptique changes (taste smell color), Physicochemical changes ( pH, T), proliferation of microorganisms (Modification of rate of germs). from our results it appears that juice packed in plastic are more vulnerable to contamination than juice packaged in glass. And that theses ones are more susceptible than those packaged in carton.

**Key words:** fruit juice, contamination, risk, temperature effect, preservation, germs.

## المخلص

ان تعرض العصير الى درجات حرارة بصفة دائمة يؤدي إلى تلوث ميكروبي ولوجي معتبر و الذي يتجاوز معايير النظافة الغذائية. التغيرات التي تطرأ على عصير البرتقال هي موضوع الدراسة تغيرات حسية ( ذوق رائحة لون) . و تغيرات فيزيوكيميائية (درجة الحموضة و درجة الحرارة) . تكاثر الكائنات الحية الدقيقة ( تزايد عدد جراثيم) . وفقا لنتائجنا نستخرج إن العصير المعبأ في العلب البلاستيكية هو الأكثر عرضة إلى التلوث من العصير المعبأ في القارورات الزجاجية و إن هذه الأخيرة هي أكثر عرضة للتلوث من العصائر المعبأة في علب الكرتون.

الكلمات الأساسية عصير الفواكه . تلوث . خطر . عامل حرارة . حفظ . جراثيم.

## Références Bibliographiques

Benamara S; Agougou ;M, 2003. Production des jus alimentaires, technologie agroalimentaire. Edition Office des Publications Universitaires, Alger (Algérie). 162p.

Berlinet C, 2006. Etude de l'influence de l'emballage et de la matrice sur la qualité du jus d'orange. Thèse en sciences alimentaires. L'Ecole Nationale Supérieure des Industries Agricoles et Alimentaires (ENSIA). 224p.

Bourgeois C.M ; Mescle J-F; Zucca J, 1990. Aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité des aliments: Microbiologie alimentaire. Tome 1.

Cendres A, 2011. Procédé novateur d'extraction de jus de fruits par micro-onde : viabilité de fabrication et qualité nutritionnelle des jus .thèse doctorat en biochimie, Université d'Avignon. 227p.

Claveau D, 2009. Activités antimicrobiennes de différentes préparations de ZnO, CaO ET MgO et leur potentiel comme agent de conservation dans les jus de fruits. Mémoire en science technologie des aliments, Université Laval. Québec. 127p.

Codex Stan 247-2005. Codex Alimentarius - Codex General Standard for Fruit Juices and Nectars.

Furia T.E, 1972. Handbook of food additives, second edition, CRC Press. 160p.

Guezlane A ; Kahlouche N; Athmani S, 2008. Microbiologie alimentaire. AFNOR, France, 134p.

Grinbaum A ; Ashkenazi I; Treister G; Goldschmied-Requven A; Block C.S, 1994. Exploding bottles : eye injury due to yeast fermentation of an uncarbonated soft drink. Br. J. Ophthalmol. 883p.

Hendrix C.M. ; Redd J.B, 1995. Production and Packaging of Non-Carbonated Juices and Fruit Beverages Chemistry and Technology of Citrus Juices and By-Products. In: Ashurst, P. R. Ed... Blackie Academic & Professional. 211p.

Hrebicek S, 2003. Les vitamines dans les boissons aux fruits. In Les vitamines dans les industries agroalimentaires/dir.Claude Bourgeois, Collection Sciences et techniques agroalimentaires. Paris. 386p.

Huss H.H, 1988. Le poisson frais: La qualité et altération de la qualité, collection FAO. Italie. 280p

Jean L, 2007. Microbiologie alimentaire : Contrôle microbiologique des aliments. Sciences et Technologies des Industries Alimentaires. Ed : 4<sup>ème</sup> éditions. Montpellier II .160 p.

Khan M.M; Martell A.E, 1967. Metal ion and metal chelate catalyzed oxidation of ascorbic acid by molecular oxygen. Journal of the American Chemical Society. 4185p.

Kim D.O ; Jeong S.W; Lee C.Y, 2003. Antioxidant capacity of phenolic photochemicals from various cultivars of plums. Food Chemistry. 326p.

Lazano E, 2006. Fruit manufacturing: scientific basis, engineering properties, and deteriorative reactions of technological importance. Edition Springer, United States of America. 157p.

Moshonas M.G; Shaw P.E, 2000. Changes in volatile flavor constituents in pasteurized orange juice during storage. Journal of Food Quality. 222p.

Pierre R ; Marie C, 2003. Bactériologie. Faculté de médecine. Université Paris. 132p.

Rodriguez M ; Sadler G.D ; Sims C.A ; Braddock R.J, 1991. Chemical changes during storage of an alcoholic orange juice beverage. Journal of Food Science. 493p.

Sizer C.E; Waugh P.L; Edstam S; Ackermann P,1988. Maintaining flavor quality of aseptic orange juice. Food Technology. 159p.

Vierling E, 2007. Aliments et boissons. Ed : 2<sup>ème</sup> éditions. Auradius. Pays-Bas. 234p.

## Sites web:

- [1] [www.jusdefruit.org/fichiers/63366940967\\_Jus\\_de\\_fruits\\_QualiteSecuriteVitalite.pdf](http://www.jusdefruit.org/fichiers/63366940967_Jus_de_fruits_QualiteSecuriteVitalite.pdf) (consulté le 11/01/2013, 10:15)
- [2] [www.unijus.org](http://www.unijus.org). (Consulté le 15/01/2013, 15:15)
- [3] [www.darinmoub.com](http://www.darinmoub.com) (consulté le 20/02/2013, 17:45)
- [4] [www.rayon-boissons.com](http://www.rayon-boissons.com) (consulté le 15/03/2013, 10:15)
- [5] <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/010/a0740f/a0740f01.pdf> (consulté le 02/03/2012, 10:15)
- [6] <http://fcorpet.free.fr/Denis/CoursHidaoaHaccpHygieneSécuritéQualiteAliments.html> (consulté le 10/03/2013, 15:10)
- [7] <http://fcorpet.free.fr/Denis/CoursHidaoaHaccpHygieneSécuritéQualiteAliments.html> (consulté le 20/03/2013, 10:00)
- [8] <http://www2.ac-lyon.fr/enseigne/biotech/macgrady.htm> (consulté le 11/04/2013, 23:25)
- [9] <http://www.bioservices.ca/interpretation/eau-potable/microbiologie/coliformes-fecaux-et-e-coli> (consulté le 18/05/2013, 21:00)
- [10] <http://www.azaquar.com/doc/infections-virales-origine-alimentaire> (consulté le 21/05/2013, 21:00)
- [11] <http://www.guide-des-aliments.com/dietetique/Information/Micro-organismes/Toxi-infections-alimentaires/AG-Intoxication-moisissure.html> (consulté le 22/05/2013, 11:00)