

Liste d'abréviations

VRBL: Violet Red Bile Agar

PCA: Plate Count Agar

FMAT : Flore Mésophile Aérobie Totale

TTC : Chlorure de Triphényl Tétrazolium

A_w : Activité de l'eau (water activity)

AFNOR : **French national organization for standardization**

GVB: Gélose au Vert Brilliant

TSN: Tryptone Sulfite Néomycine

DLC : Date Limite de Consommation

Liste des figures et tableaux

Tableau 1 : Fiche technique de la société AL HANINI	2
Tableau 2 : Diversification de production AL HANINI.....	4
Tableau 3 : Ingrédients pâte feuilletée et leurs quantités	5
Tableau 5 : Ingrédients de la mantiquella et leurs quantités	9
Tableau 4 : Ingrédients de la crème de fourrage et leurs quantités	7
Tableau 6 : Ingrédients de la crème de garnissage et leurs quantités	10
Tableau 7 : Dénombrement de la flore mésophile totale (30°C) dans la mille-feuille complet	20
Tableau 8 : Dénombrement des coliformes dans la mille-feuille complet avec les critères de jugement.....	22
Tableau 9 : Dénombrement des Entérobactéries dans la mille-feuille complet avec les critères de jugement.....	23
Tableau 10 : Dénombrement des Staphylocoques aureus dans la mille-feuille complet avec les critères de jugement.....	24
Tableau 11 : Dénombrement des Aérobie sulfite réducteurs dans la mille-feuille complet avec les critères de jugement.....	25
Tableau 12 : Dénombrement des salmonelles dans la mille-feuille complet avec les critères de jugement.....	26
Tableau 13 : Evolution des FMAT au cours de jours de conservations de mille-feuilles	27

Figure 1 : Organigramme de la société ALHANINI.....	3
Figure 2 : Malaxeur de la pâte.....	6
Figure 3 : Technique de mettre le beurre au centre de la pâte	6
Figure 4 : Technique de répartition de beurre avec un rouleau à pâtisserie.....	6
Figure 5 : Minoire de feuilletage	7
Figure 6 : Manière de piquer la pâte par un pique vite	7
Figure 7 : Cuiseur par chaudière pour les crèmes	8
Figure 8 : Batteur malaxeur.....	9
Figure 9 : Dénombrement de la FMAT à 30 °C.....	17
Figure 10 : Dénombrement des coliformes thermotolérants à 44 °C	17
Figure 11 : Dénombrement des staphylocoques présumés pathogènes	18
Figure 12 : Dénombrement des salmonelles.....	19
Figure 13 : Courbe de la croissance des FMAT en fonction des jours de conservation de mille-feuilles	27

Sommaire

Introduction Erreur ! Signet non défini.

I. Bibliographie2

A. Présentation de la société « ALHANINI » Erreur ! Signet non défini.

1. Historique: Erreur ! Signet non défini.

2. Fiche technique : Erreur ! Signet non défini.

3. Organigramme de la société : Erreur ! Signet non défini.

4. Produits de la société : Erreur ! Signet non défini.

B. Pâtisserie Millefeuille Erreur ! Signet non défini.

1. Présentation : Erreur ! Signet non défini.

C. Fabrication des Millefeuilles : Erreur ! Signet non défini.

1. Pâte feuilletée : Erreur ! Signet non défini.

2. Crème de fourrage 7

3. Crème blanche (Mantequilla) Erreur ! Signet non défini.

4. Crème de garnissage Erreur ! Signet non défini.

5. Préparation des mille feuilles : Erreur ! Signet non défini.

D. Déterminer la date limite de consommation pour millefeuille (DLC) Erreur ! Signet non défini.

1. Définition de (DLC) : Erreur ! Signet non défini.

2. Description de mille-feuille : Erreur ! Signet non défini.

3. Études complémentaires éventuelles : Erreur ! Signet non défini.

E. Micro-organismes contaminants en pâtisserie industrielle Erreur ! Signet non défini.

1. Germes témoins du niveau d'hygiène Erreur ! Signet non défini.

a. Microorganismes aérobies mésophiles (ou 30°C) Erreur ! Signet non défini.

b. Coliformes totaux et coliformes fécaux Erreur ! Signet non défini.

c. Levures et moisissures Erreur ! Signet non défini.

2. Germes pathogènes Erreur ! Signet non défini.

a. *Staphylococcus aureus* Erreur ! Signet non défini.

b. Anaérobies sulfite-réducteurs (46°C) Erreur ! Signet non défini.

c. *Salmonella* (Salmonelles) Erreur ! Signet non défini.

II. Matériel et Méthodes Erreur ! Signet non défini.

A. Matériel de laboratoire : Erreur ! Signet non défini.

B. Méthodes : Etude microbiologique Erreur ! Signet non défini.

1. Germes recherchés.....	Erreur ! Signet non défini.
C. Protocole d'analyse	Erreur ! Signet non défini.
0.1. Préparation de la solution mère et des dilutions	Erreur ! Signet non défini.
0.2. Dénombrement des germes	Erreur ! Signet non défini.
a- Dénombrement de la flore mésophile aérobie totale FMAT à 30°C (NF V 08-051).....	Erreur ! Signet non défini.
b- Dénombrement des coliformes fécaux (NF V 08-060).....	Erreur ! Signet non défini.
c- Dénombrement des staphylocoques présumés pathogènes (NF V 08-057-1).....	Erreur ! Signet non défini.
d- Dénombrement des anaérobies sulfito-réducteur.....	Erreur ! Signet non défini.
(XP V 08- 061).....	Erreur ! Signet non défini.
e- Dénombrement des Salmonelles (NF V08-013)	19

III. Résultats et discussions 20

A- Résultats des analyses microbiologiques de mille-feuille :..... 20

1. Présentation des résultats.....	20
a. Flore mésophile aérobie totale à 30°C (FMAT)	20
b. Coliformes :.....	22
c. Entérobactéries:.....	Erreur ! Signet non défini.
d. <i>Staphylococcus aureus</i> :.....	Erreur ! Signet non défini.
e. Bactéries sulfite réductrices :	Erreur ! Signet non défini.5
f. <i>Salmonella</i> :	Erreur ! Signet non défini.

2-Evolution microbienne.....27

Conclusion.....29

Références bibliographiques.....

Introduction

Les mille-feuilles comme produits de l'industrie de pâtisserie par excellence représentent dessert vendu dans les marchés d'une façon exponentielle dû à son extrapolation avec le désir du consommateur qui, séduit par le goût sucré et la structure croustillante que lui offrent les différents étages de la pâte feuilletée.

Les millefeuilles sont sensibles de point de vue qualité et sécurité microbiologique. La pâte qui constitue les mille-feuilles est de nature très sèche. Alors que les crèmes (pâtissière, blanche et chocolat) qui représentent presque 60% du produit, sont très mouillées et principalement grasses sucrées ou pour les mille feuilles de chocolats (milieu idéale à la prolifération des micro-organismes).

Soucieux de la qualité des produits finis et leur santé, les consommateurs recherchent des informations plus transparentes sur les produits notamment **les dates limites de consommation**.

L'objectif de ce stage effectué au sein de la société ALHANINI, était la validation de la date limite de consommation (DLC) pour le mille-feuilles, c'est-à-dire ils ont choisi une date limite de consommation.

Ce stage a pour but de faire des tests pour valider ou pas la date choisie par ALHANINI.

L'intérêt du contrôle était de réaliser une quantification de certaines bactéries et moisissures dont la présence se traduit par une pathogénicité du produit ; dans ce but, des analyses ont été effectuées en dehors de la firme pour s'assurer si le délai de la DLC (1 mois et demi) indiqué sur l'emballage était largement suffisant pour la consommation du produit de manière saine et sans des dégâts sur la santé du consommateur.

De ce fait le rapport comporte :

- ✓ Une présentation détaillée de la société de pâtisserie et de boulangerie AL HNINI au sein de laquelle ce stage a été effectué.
- ✓ Une étude bibliographique de la procédure de fabrication du produit mille-feuilles et sur les contaminants susceptibles de le menacer
- ✓ Une vue sur le côté pratique des analyses et du matériel et méthodes utilisés.
- ✓ Les résultats obtenus suite aux analyses pour conclure sur la conformité ou non de la qualité microbiologique du produit millefeuille afin de valider ou pas leurs DLC.

I. Bibliographie

A. Présentation de la société ALHANINI :

1) Historique :

ALHANINI, « société de boulangerie et de pâtisserie », opérant dans le secteur de l'industrie agro-alimentaire, a été créé en 1997. Depuis, ALHANINI n'a pas cessé d s'agrandir et de gagner des parts de marchés grâce à la diversité de ses produits (tableau 2), à la flexibilité de ses structures, aux services qu'elle offre à ses clients et surtout à la bonne maîtrise de son métier.

La société dispose actuellement d'une unité principale située à la zone industrielle Enammae, et occupe une superficie de 1200 m².

- **1997** : Création de l'entreprise familiale à l'Bhalil, formée d'une petite unité de mille feuilles et madeleines.
- **2003** : Installation de la société ALHANINI à Enammae Fès.
- **2008** : Obtention de l'agrément pour l'exportation vers l'Espagne.
- **2014** : Amélioration des structures de production (par robotisation).

Actuellement : les marques et les produits ALHANINI bénéficient d'une réputation de qualité et de compétitivité sur le marché local avec une clientèle satisfaite et fidélisée.

2) Fiche technique

Tableau 1 : Fiche technique de la société ALHANINI.

<i>Elément de désignation</i>	<i>Donnée correspondante</i>
Dénomination sociale	ALHANINI
Activité	Production et commercialisation des biscuits, pâtisseries, mille-feuille...
Siège social	Hay Enammae, Lot,335 Quartier industriel Bensouda Fès-Maroc.
Date de création	2003
Capital	2.200.000DH
Téléphone :	+212556553 :42/34 /35
Fax Marché	0535655328 Territorial, Espagne.
Employés permanents	520

3) Organigramme de la société

La société est constituée de différents services, gérés par une direction générale :

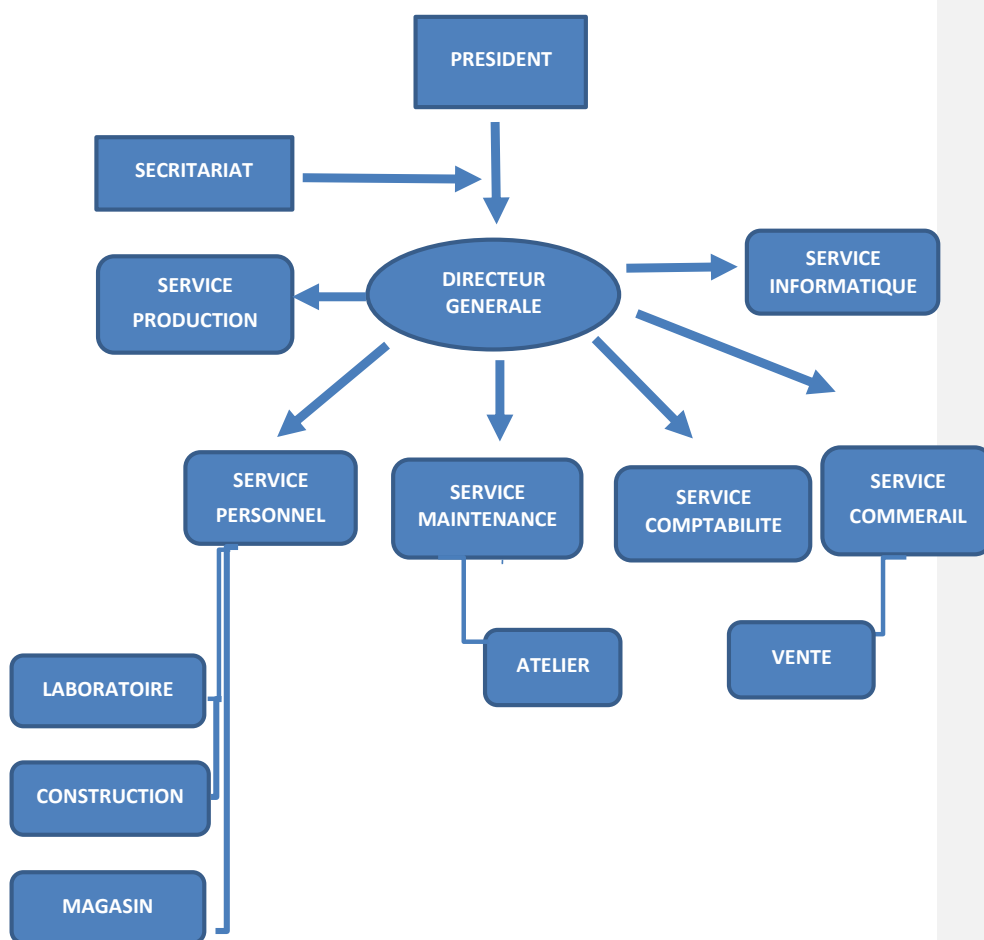


Figure 1 : Organigramme de la société ALHANI

4) Produits de la société :

Le tableau 2 présente quelques exemples parmi d'autres des différents produits de l'industrie AL HANINI de pâtisserie et de boulangerie

Tableau 2 : Diversification de production AL HANINI

Ma deleines	Maréchal 	Lamsila 	Wester 
Biscuits	Tomix 	Castro 	The bingo 
Mille-feuilles	A la crème de chocolat 	A la crème de pistache 	A la crème de fraise 



B. Pâtisserie Mille-Feuille :

➤ Présentation

Une mille-feuille ou millefeuille, comme la plupart des pâtisseries est d'origine européenne et a été créé par François Pierre de La Varenne qui le décrit dans son Cuisinier François en :

« C'est une pièce de pâtisserie faite de trois couches de pâte feuilletée et deux couches de crème pâtissière. Le dessus est glacé avec du sucre glace ou du fondant. On peut y ajouter de la confiture ou des fruits », (De La Varenne, 1651).

La crème pâtissière peut être remplacée par une caramélisation de sucre invertie appelée « crème de fourrage » et celle glacée par une autre fraîche huileuse au sein de la société AL-HANIN, pour avoir un produit fini de qualité.

Le nom français de cette pâtisserie fait référence au nombre élevé de feuillets de pâte qui le compose. Compte tenu de la méthode traditionnelle de préparation de la pâte feuilletée, en six étapes de pliages en trois, la mille-feuille comporte en réalité 729 paires de feuillets. L'adoption plus récente d'un pliage en deux par certains cuisiniers conduit à une mille-feuille comportant un nombre différent de feuillets, 2048 paires dans le cas de la recette d'André Guillot (fr.m.wikipedia.org/wiki/Mille-feuille).

C. Fabrication des mille feuilles :

1) Pâte feuilletée :

La pâte de cette mille-feuille, c'est une pâte feuilletée, croustillante et légère, obtenue par pliages successifs de couches de pâte et de matière grasse de même épaisseur ; elle peut être utilisée aussi pour des préparations salées (tartes, quiches...).

- **Composition :**

Le tableau suivant donne les quantités en Kg de matière première utilisée pour la fabrication de produit fini .

Tableau 3 : Ingrédients de la pâte de mille feuilles :

Produits	Farine	Eau	Oeuf	Beurre	Sel
Quantité en kg ou plateau	50	13	4	7	0,400

- **Méthode :**

Pour élaborer cette pâte, plusieurs techniques sont utilisées :

- **Malaxage**

- On mélange tout à l'aide d'une machine pendant 15 min jusqu'à homogénéisation, et on presse avec les doigts pour tester la fragilité de la pâte.
- On met la pâte en boules de 2 kg.



Figure 2 : Malaxeur de la pâte

•Détrempage

- On met le beurre au centre de la pâte et on la replie.
- On tapote avec un rouleau pour répartir le beurre.
- On réalise un pliage successif de couches de pâte (6 fois) avec la minoire et un repos, chaque 2 fois (c'est à dire après chaque 2 pilage)

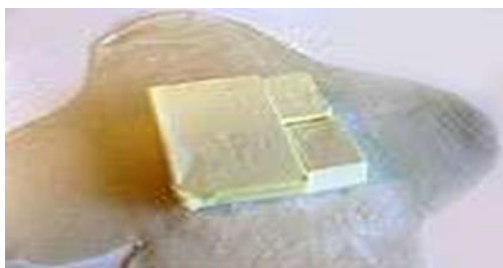


Figure 3 : Technique de mise du beurre au centre de la pâte



Figure4 : Technique de répartition de beurre avec un rouleau à pâtisserie



Figure 5 : Minoire de feuilletage

• **Cuisson**

- On fleure le plan de travail avec de la farine.
- On abaisse finement la pâte feuilletée.
- On la pique plusieurs fois pour qu'elle ne gonfle pas l'aide d'une "pique vite".
- On la dépose sur des plaques à pâtisserie.
- On la met dans un four à une T=265 °C pendant 20 min.



Figure 6 : Manière de piquer la pâte par un pique vite

2) Crème de fourrage :

• **Composition :**

Le Tableau suivant comporte les différents ingrédients de la crème de fourrage :

Tableau 4: Ingrédients de crème de fourrage

Produits	Eau	Sucre	Farine	Vanille	Sorbate
Quantités en kg/150 kg de crème	100	80,8	13,85	0,384	0,153

- **Méthode :**

- On solubilise dans l'eau, le sorbate et le sucre (tableau3).
- On ajoute 19,23Kg de sucre avec 13,85Kg de farine ; on mélange bien pour éviter la formation de granulation.
- On chauffe le mélange jusqu'à ébullition pendant une heure.
- On laisse 5,8 kg de sucre brûler, puis on ajoute 25 kg d'eau pour abaisser la T°C.
- Ce sucre brûlé donne la coloration brune.
- Après, on ajoute ce dernier au mélange, et on laisse cuire pendant 2 heures à une T=160°C.
- La cuisson de cette crème se fait dans des grands cuiseurs munis d'un système d'agitation, et qui fonctionnent avec une chaudière (vapeur) (figure 7).
 - ♦ On mélange les composants de la crème ;
 - ♦ On évite la brûlure du mélange car il reste toujours en rotation ;
 - ♦ On diminue la durée de cuisson ;
- Quand la crème devient visqueuse et de couleur brune, on additionne la poudre de vanille pour donner un goût et une odeur délicieuse, on ne chauffe pas la vanille car elle est volatile.
- On filtre le mélange à l'aide des filtres en inox pour éliminer toutes les impuretés macroscopiques et les brûlures ; après la crème passe dans un bassin d'où une pompe facilite le transfert de la crème vers des grandes citernes où le refroidissement se fera durant un jour, ce qui rend la crème de fourrage donc facile à être utilisée dans la suite de processus de fabrication.



Figure 7 : Cuiseur par chaudière pour les crèmes

3) Crème blanche (Mantequilla) :

- **Composition :**

Le tableau suivant comporte les différentes composantes de la crème de nappage :

Tableau 5 : Ingrédients de crème de nappage

Produits	Eau	Blanc d'oeuf	Sucre	Beurre	Vanille	Huile
Quantités en kg/22 kg de crème	3	3	6	6	0,100	4

- **Méthode :**

- On élabore cette crème par quatre tours ;
- Le 1^{er}, on frappe bien le blanc d'œuf pendant 10 min jusqu'à l'obtention de neige ;
- On chauffe l'eau et le sucre jusqu'à leur ébullition, et on fait le 2^{ème} tour par l'ajout du mélange d'eau et sucre chauffés on laisse peu à peu reposer 45 min jusqu'à ébullition ;
- On réalise le 3^{ème} tour par l'ajout de beurre ;
- Ensuite, on dépose la crème dans le réfrigérateur pendant 2 jours, pour éviter le développement de fractures pendant le procédé de fabrication.
- Enfin, le 4^{ème} tour se fait par l'ajout de l'huile pour donner la brillance
- La vanille pour l'aromatiser.



Figure 8 : Batteur malaxeur

4) Crème de garnissage

- **Composition :**

Le tableau suivant comporte les différents ingrédients de crème de garnissage

Tableau 6 : Ingrédients de chocolat de mille feuilles

Produits	Eau	Poudre cacao	Sucre	Sorbate	xanthane	sel	Amidon	Amidon de maïs	Acide citrique	Huile
Quantités en kg/100 kg de crème	44,65	8,93	41,67	0,15	0,01	0,07	0,298	1,04	0,18	1,48

- **Méthode :**

- On chauffe dans un cuiseur l'eau, le sorbate, le sel et l'acide citrique jusqu'à leur solubilisation
- On mélange bien le sucre, la poudre de cacao, le xanthane (insoluble dans l'eau) et l'amidon pour éviter la formation de granulations ;
- On laisse tout brûler pendant 10min jusqu'à ébullition ;
- Après, on additionne l'huile pour donner la brillance à la crème ;
- Enfin, on cuit le tout à 120°durant 45 min ;

5)Préparation des mille feuilles :

-Un mille-feuille est composé de trois feuilles, on met une couche de crème de fourrage entre chaque deux feuilles d'une masse égale à 910 g à l'aide d'une machine

-On couvre par un plateau, on presse bien durant un jour pour ne pas casser et pour bien coller les trois feuilles par la crème ;

-Après, on verse la crème blanche de 225 à 240g

-On lisse délicatement à la spatule métallique ;

-On place dans des moules de diamètre (16, 30, 66) ;

-On mélange 40 kg chocolat fruit et 20 kg de chocolat de millefeuille pour la décoration ;

-Les mille-feuilles sont conditionnés dans un carton.

D. Détermination de la date limite de consommation :

1.Définition de (DLC) :

La Date Limite de Consommation (DLC) est impérative. Elle s'applique à des denrées microbiologiquement très périssables, qui sont susceptibles, après une courte période, de présenter un danger immédiat pour la santé humaine. Pour certains produits comme par exemple les yaourts, les charcuteries fraîches ou les plats cuisinés frais et les pâtisseries et surtout le mille-feuilles, c'est la réglementation en matière de contrôle sanitaire qui fixe une durée de conservation. Elle s'exprime sur les conditionnements par la mention "A consommer jusqu'au...", suivie de l'indication du jour et du mois. Cependant la durabilité du produit et sa DLC fixées par la réglementation ou par le fabricant, dépendent de la température à laquelle la denrée a été conservée.

2.Description de mille-feuille :

❖ Compositions :

Farine, sucre, huile végétale, huile de palme, poudre de vanille, poudre de cacao, lécithine de soja, sorbate de potassium (E202), acide citrique (E330), propionate de sodium (E281), arôme chocolat

❖ Caractéristiques nutritionnelles :

Pour une portion de 150g de mille-feuille :

- Calorie : 353
- Lipides : 16 g
- Glucides : 45 g
- Protéines : 7g

❖ Caractéristiques bactériologiques :

Les types de micro-organismes pris en compte pour la détermination et la validation de la durée de vie doivent être recensés : agents pathogènes, micro-organismes d'altération. Les limites à ne pas dépasser en fin de durée de vie doivent être précisées.

❖ Les microorganismes recherchés afin de valider la (DLC) sont :

- ✚ Flore mésophile total (30°C) : 300000 UFC/g
- ✚ Coliformes totaux (30°C) : 1000-10000 UFC/g
- ✚ Escherichia Coli (44°C) : 1 -10 UFC/g
- ✚ Entérobactéries (37°C) :100-1000UFC/g

- ✚ Anaérobies sulfite réducteurs (46°C) : 10-100UFC/g
- ✚ Salmonelle à 25g : 0UFC/g

❖ Propriétés physico-chimiques :

- **Humidité :**

L'humidité d'un aliment c'est la quantité d'eau perdue par la substance, cette eau est constituée d'eau fixée par des liaisons hydrogènes.
Cet teneur en eau est exprimée en % de la masse rapportée soit à la masse de la matière sèche contenue dans l'échantillon, soit à la masse totale de la matière humide.

- **pH :**

Le potentiel hydrogène (ou pH) mesure l'activité chimique des ions hydrogènes (H^+) (appelés aussi couramment protons) en solution.
Plus couramment, le pH mesure l'acidité ou la basicité d'une solution. Ainsi, dans un milieu aqueux à 25 °C.

- **L'activité de l'eau :**

L'eau est présente dans tous les aliments. Elle revêt généralement deux formes :

- L'eau libre ou disponible.
- L'eau liée à différentes molécules comme les protéines et les glucides.

L'eau disponible est indispensable de la croissance des bactéries, levures et moisissures, ce qui peut nuire à la salubrité et la qualité des aliments.

L'activité de l'eau est un paramètre qui caractérise la disponibilité d'eau "libre" dans un produit alimentaire, elle est définie par le symbole a_w et sa valeur s'établit entre 0 (sécheresse absolue) et 1 (100% humidité relative).

❖ Type de traitement thermique :

Le rôle de la cuisson pour la pâte feuilletée : pour avoir une pâte craquante et grillée

- **Cuisson** : 260°C/18 min pour la pâte feuilletée.

Le rôle de la cuisson pour la crème de fourrage : pour diminuer les traces d'eau et aussi, la caramélisation de la crème.

- **Cuisson** : 160°C/2 heures pour la crème fourrage

Le rôle de la cuisson pour la crème de chocolat : pour mixer tout facilement les ingrédients de fabrication de chocolat et faciliter ainsi la décoration des mille-feuilles, et donner aussi une consistance légère.

- **Cuisson** : 160°C/1 heure pour la crème chocolat
- **Emballage** : La mise en carton, papier glacé
- **Condition et durée de conservation** : On met les mille-feuilles dans un lieu sec à l'abri de lumière pendant un mois et demi.

3. Études complémentaires éventuelles :

✓ Tests de vieillissement :

Les **tests de vieillissement** permettent d'évaluer la croissance des bactéries dans les **aliments naturellement contaminés**, conservés dans des conditions raisonnablement prévisibles. Ils peuvent être mis en œuvre dans le cadre de la **validation** ou de la **vérification** de la maîtrise de la qualité microbiologique en fin de durée de vie microbiologique. NF-V- 01- 003

✓ Tests de croissance :

L'évaluation de la cinétique de croissance ou de survie d'un germe précis se fait dans ou sur un aliment donné après inoculation artificielle à un niveau prédéterminé durant la conservation dans des conditions contrôlées pendant une durée prédéfinie. Utilisées plus particulièrement lorsqu'on étudie des microorganismes pathogènes qui ne sont pas détectables de façon habituelle dans l'aliment. NF-V-01-009

E Micro-organismes contaminants en pâtisserie industrielle :

Les analyses de qualité microbiologiques concernent en générale deux types de microorganismes : les germes témoins du niveau d'hygiène et les germes pathogènes.

1. Les germes témoins du niveau d'hygiène

a) Microorganismes aérobies mésophiles (ou 30°C) :

Ils représentent l'ensemble des microbes qui se développent en présence d'air et à une température moyenne allant de 20 à 40°C.

Ceux-ci se retrouvent un peu partout et en particulier dans l'air et dans la terre.

Leur présence en grand nombre sur un produit alimentaire peut avoir 3 causes :

- Séjour d'aliments dans un lieu sujet à des mouvements d'air ;
- Apport dans un aliment par une matière première chargée ;
- Stockage d'aliments à une température favorable à un développement microbien.

b) Coliformes totaux et coliformes fécaux :

Le dénombrement des Coliformes dans les aliments constitue un « test d'hygiène » ; il est révélateur de contaminations dues à des mauvaises manipulations environnement pollué, matériel sale, etc.

Les Coliformes totaux sont représentatifs des conditions générales d'hygiène au cours des préparations et du stockage, alors que les Coliformes fécaux sont plus spécifiques de

contaminations fécales (mauvais lavage des mains, viandes contaminées lors de l'abattage suite à l'éviscération) ou de contaminations telluriques (végétaux terreux).

Parmi les Coliformes fécaux, *Escherichia coli* est un germe spécifique de contaminations fécales (il appartient à la flore intestinale). Les Coliformes totaux et fécaux sont différenciés par leur température de culture au laboratoire (respectivement 30°C et 44°C). Les Coliformes fécaux appartiennent au groupe des Coliformes totaux.

c) Levures et moisissures :

Les levures et les moisissures sont largement répandues dans l'environnement. On les trouve, entre autres, dans l'eau, le sol, le bois en décomposition, les débris organiques, les excréments, sur les plantes et les produits de plante, la mousse de sphaigne, les grains, le fourrage, les fruits, les légumes et les noix, ainsi que sur le pelage des animaux...

Lorsqu'elles prolifèrent dans les aliments et que leurs populations atteignent des niveaux excessifs, les levures et les moisissures peuvent occasionner la détérioration des produits (goût, texture, apparence) et entraîner des pertes économiques importantes.

Certaines espèces de moisissures synthétisent des métabolites toxiques, les mycotoxines (aflatoxines, lactones, certains stéroïdes), dans certaines conditions, ce qui les rend potentiellement pathogènes pour l'homme. Des cas d'intoxication alimentaire ont été attribués à des mycotoxines.

2. Les germes pathogènes :

a. *Staphylococcus aureus* :

Staphylococcus aureus est un germe pathogène au sein de la famille des staphylocoques susceptible de provoquer une intoxication.

Celui-ci provient de contaminations d'origine humaine :

- par voie aérienne lors d'infection de la sphère rhinopharyngée du personnel (gorge, nez)
- par contact des mains avec les aliments lors des infections au niveau de la peau.

b. Anaérobies sulfito-réducteurs (46°C) :

Les anaérobies sulfito-réducteurs représentent un groupe de germes dont *Clostridium perfringens* fait partie. D'autres germes comme des *Bacillus*, des entérobactéries font aussi partie de ce groupe.

Clostridium perfringens est un germe pathogène susceptible d'engendrer des intoxications. Il est retrouvé dans l'intestin de l'homme et des animaux. Sa particularité est de former des spores résistantes à la température et donc à une cuisson normale ; seule la stérilisation permet de les détruire.

c. *Salmonella* (Salmonelles) :

Les salmonelles sont des germes pathogènes qui sont apportés par l'homme et les matières premières (volailles, œufs ...).

Il existe plusieurs milliers de salmonelles plus ou moins virulentes ; des maladies comme la typhoïde et la paratyphoïde sont dues à des salmonelles.



Les salmonelles les plus couramment rencontrées dans les intoxications alimentaires sont dans l'ordre : *salmonella enteritidis* et *salmonella typhimurium*.

Les salmonelles sont sensibles à la chaleur et leur présence résulte donc d'une contamination après cuisson.

Vue les moyens d'analyse disponibles dans le laboratoire interne de la société, on se limitera dans l'étude de la contamination par les germes témoins du niveau d'hygiène pour le produit mille-feuille.

II. Matériel et Méthodes :

A. Matériel de laboratoire :

Il s'agit du matériel classique utilisé dans les laboratoires de microbiologie alimentaire : balance, autoclave, four pasteur, bec Bensen, étuves, verreries diverses, boîtes de pétri, pipettes, milieux de culture, diluants et réactifs.

B. Méthodes : Etude microbiologique :

1. Germes recherchés :

Lors de l'analyse on recherche cinq germes :

- ✓ La flore mésophile aérobie totale (FMAT).
- ✓ Les coliformes fécaux.
- ✓ Les staphylocoques.
- ✓ Les anaérobies sulfito-réducteurs (ASR) et les salmonelles.

Les méthodes horizontales de dénombrement de la norme AFNOR ont été utilisées.

C. Protocole d'analyse :

01) Préparation de la solution mère et des dilutions :

✓ Préparation de la solution mère (NF V08-010)

On prélève de façon aseptique, 25 g de l'échantillon dans un sachet stérile. On y ajoute 225 ml d'Eau peptonée tamponnée (EPT) et on homogénéise au stomacher pendant 2 mn. La solution de 10^{-1} obtenue et appelée solution mère (SM). Elle servira à la préparation d'autres dilutions ou à ensemercer des milieux de cultures pour la recherche de germes après 30mn, temps nécessaire pour la revivification de ces derniers.

✓ Préparation des dilutions :

A partir de la solution mère à 10^{-1} des dilutions de plus en plus petites sont réalisées. Ainsi :

- La solution mère à $10^{-2} = 1$ mL de la solution à 10^{-1} dans 9 mL d'EPT ;
- La solution mère à $10^{-3} = 1$ mL de la solution à 10^{-2} dans 9 mL d'EPT ;
- La solution mère à $10^{-4} = 1$ mL de la solution à 10^{-3} dans 9 mL d'EPT ;

02) Dénombrement des germes :

a- Dénombrement de la flore mésophile aérobie totale FMAT à 30°C (NF V 08-051) :

La recherche se fait sur milieu solide : gélose PCA. Les ensemencements sont réalisés à partir des dilutions 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} .

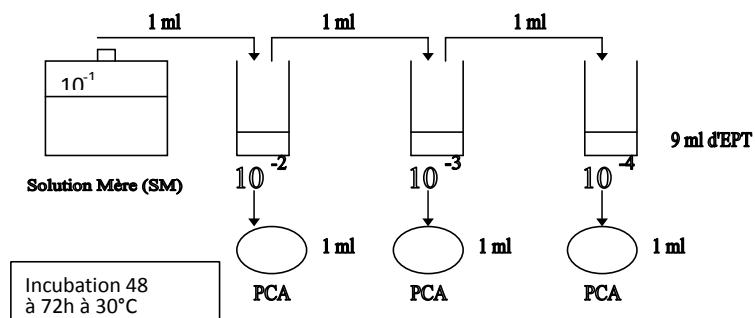


Figure 9 : Dénombrement de la FMAT à 30 °C

b-Dénombrement des coliformes fécaux (NF V 08-060) :

La recherche se fait sur milieu solide : gélose VRBL. Le dénombrement des colonies, qui apparaissent rose, s'effectue après incubation à 44°C pendant 24h. Seules les colonies ayant un diamètre supérieur à 0,5mm sont prises en compte.

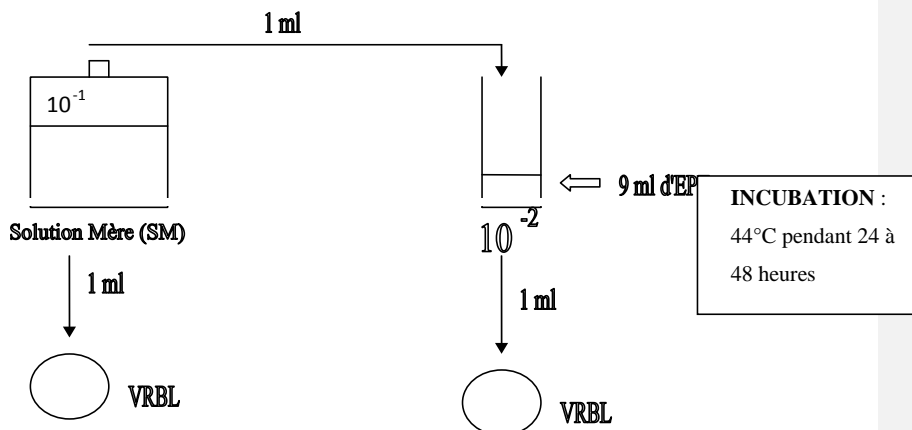


Figure 10 : Dénombrement des coliformes thermolétorant à 44°C

c-Dénombrement des staphylocoques présumés pathogènes (NF V

08-057-1) :

L'isolement se fait sur milieu solide de Baird Parker. L'identification se base sur le fait que les staphylocoques présumés pathogènes sont catalase + et coagulase +.

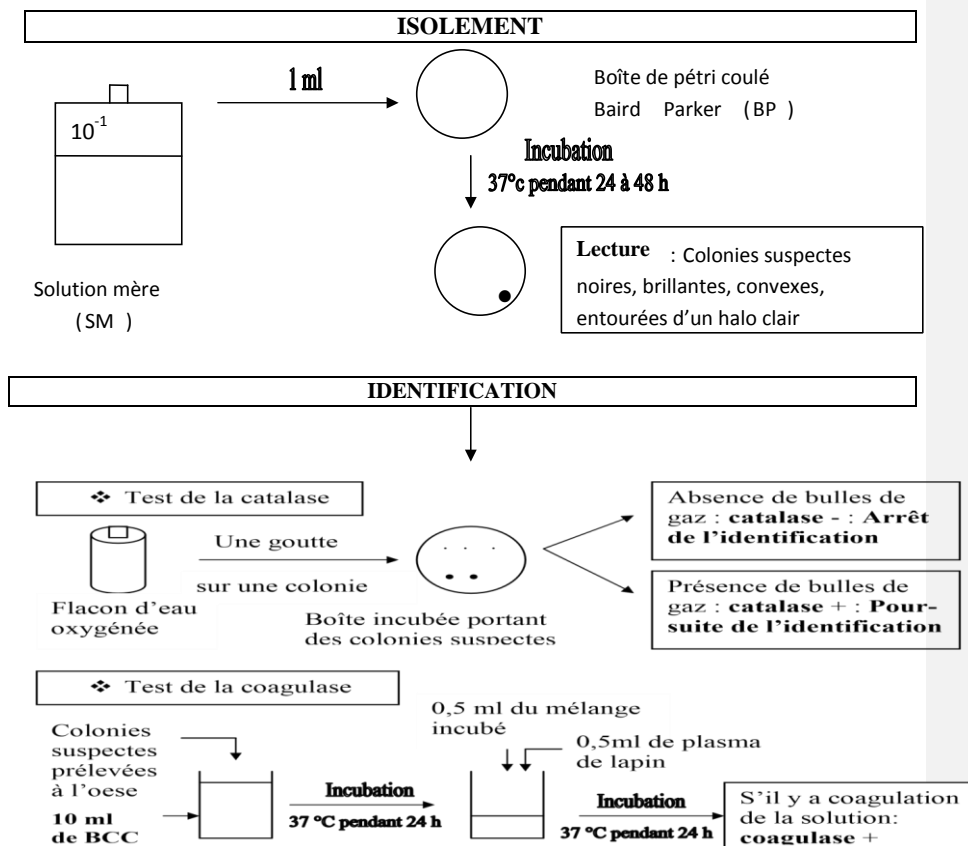
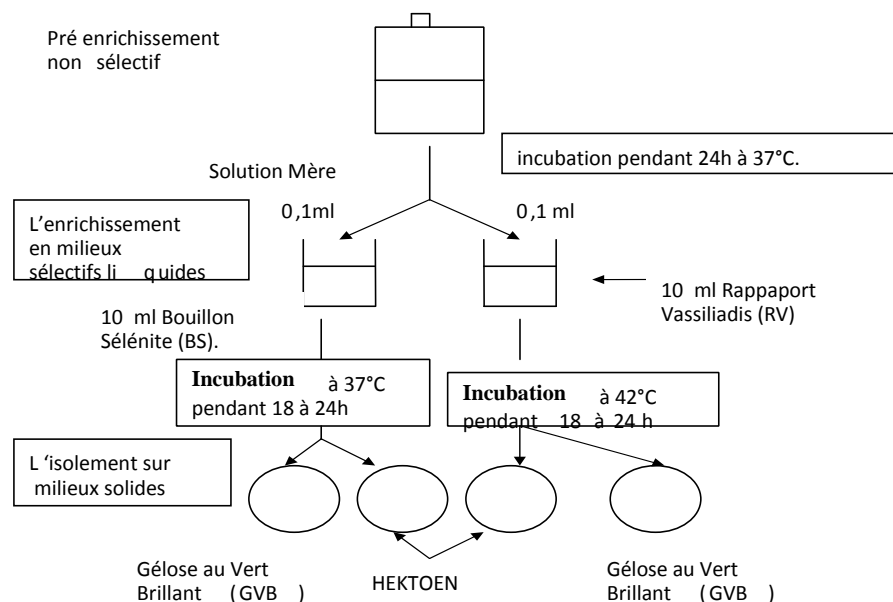


Figure 11 : Dénombrement des staphylocoques présumés pathogènes

d-Dénombrement des anaérobies sulfito-réducteur (XP V 08- 061) :

La recherche se fait sur milieu TSN. On prélève 1 ml de la dilution au dixième qu'on met dans la gélose TSN. On fait quelques rotations du tube à essai dans les deux sens. On laisse la gélose se solidifier et on ajoute un peu de paraffine qui permet d'assurer l'anaérobiose. Les colonies recherchées doivent apparaître noires.

c-Dénombrement des salmonelles (NF V08-013) :



Incubation à 37°C pendant 18 à 24h

Lecture : colonies suspectes sont rouges sur GVB et bleues sur **HEKTOEN**

Purification

Ensemencement des colonies suspectes sur GVB ou sur HEKTOEN sur gélose nutritive (GN), et incubation à 37°C pendant 24h.

Identification

Ensemencement de Galerie API 20 et lecture à l'aide de la grille de lecture.

Figure 12 : Dénombrement des salmonelles

**Les analyses microbiologiques sont faites dans un laboratoire en dehors de la firme.*

III. Résultats et discussions

A-Résultats des analyses microbiologiques de mille-feuilles :

1) Présentation des résultats :

Le stage que je viens d'effectuer au sein de l'industrie « AL HANINI », a comme objectif la validation de la date limite de consommation.

Les tableaux ci-dessous présentent les résultats obtenus au cours de la période de mon stage pour chaque contaminant au niveau des mille-feuilles comme produit fini de cette industrie destinée à la consommation directe par les consommateurs.

a_Flore mésophile aérophile totale à 30°C (FMAT) :

Les analyses ont été effectuées au laboratoire de l'ONSSA et les résultats obtenus sont résumés dans les tableaux suivants qui présentent le niveau de contamination par la flore aérobie mésophile (FMAT).

Tableau7 : Niveaux de contamination des mille-feuilles par la FMAT à 30°C :

<div>Contaminant</div> <div>Dates</div>	Flore aérobie mésophile 30°UFC/g					Critère de jugement
	(FMAT)					
15/04 /2018	1,2.10 ²	1,5.10 ²	2,5.10 ²	1.10 ²	1,3.10 ²	n=5 ;c=2 ; m=3.10 ⁵ ;M=3.10 ⁶
05/05/2018	2,2.10 ²	1,3.10 ²	2,3.10 ²	1,8.10 ²	2,0.10 ²	n=5 ; c=2 ; m=3.10 ⁵ ;M=3.10 ⁶
21 /05/2018	60	1,3.10 ²	90	1,6.10 ²	90	n=5 ; c=2 ; m=3.10 ⁵ ;M=3.10 ⁶

M = seuil limite d'acceptabilité : chiffre au-delà duquel les résultats ne sont plus considérés comme satisfaisant,

n : nombre d'unités constituant l'échantillon prélevé. Il varie en fonction de la nature de la denrée, il est **en général égal à 5**

c : nombre maximal de résultats compris entre m et M.

- ✓ Les résultats sont interprétés selon un plan de 3 classes qui se base sur des paramètres :
 - La qualité est **satisfaisante** si tous les résultats sont **inférieurs ou égal à m**
 - La qualité est **acceptable** si un maximum de c/n **entre m et M**.

- La qualité est **insatisfaisante** si plus de c/n ont un résultat compris entre m et M ou dès qu'un résultat est **supérieur à M** .

On a testé 5 échantillons avec la variation de la période de conservation du mille-feuille afin de suivre l'évolution des FMAT au cours d'un mois et demi.

Avec $n=5$ nombre d'échantillons et $m=3.10^5$ critère microbiologique pour déterminer la qualité de mille-feuilles et $M=3.10^6$ qui est le seuil limite d'acceptabilité au-delà duquel les résultats ne sont plus considérés comme satisfaisants.

➤ **Les résultats obtenus au cours de l'analyse des FMAT (tableau 7) :**

Le 15- avril on a : $n_1=1,2.10^2$; $n_2=1,5.10^2$; $n_3=2,5.10^2$; $n_4=1,0.10^2$; $n_5=1,3.10^2$ (UFC/g)

Le 05-Mai on a : : $n_1=2,2.10^2$; $n_2=1,3.10^2$; $n_3= 2,3.10^2$; $n_4=1,8.10^2$; $n_5=2,0.10^2$ (UFC/g)

Le 21-Mai on a : : $n_1=1,2.10^2$; $n_2=1,5.10^2$; $n_3=2,5.10^2$; $n_4=1,0.10^2$; $n_5=1,3.10^2$ (UFC/g)

- On remarque que tous les échantillons analysés au cours du mois et demi ont des valeurs inférieures à m qui est égal 3.10^5 ; ceci correspond aux normes d'acceptabilité par les critères de jugement ; donc ce mille-feuille ne présente pas de danger pour le consommateur car sa qualité est considérée **satisfaisants**.

b_ Les coliformes :

Le tableau suivant présente le niveau de contamination par les coliformes :

Tableau 8: Niveaux de contamination des mille-feuilles par les coliformes :

<div>Contaminant</div> <div>Dates</div>	Coliformes					Critère de jugement
	UFC/g					
15/04 /2018	< 10	< 10	<10	<10	<10	n=5 ; c=2; m=10 ³ ; M=10 ⁴
05/05/2018	< 10	< 10	<10	<10	<10	n=5 ; c=2; m=10 ³ ; M=10 ⁴
21/05/2018	<10	<10	<10	<10	<10	n=5 ; c=2 m=10 ³ ; M=10 ⁴

On a testé 5 échantillons avec la variation de la période de conservation de ces mille-feuilles afin de suivre l'évolution des coliformes au cours d'un mois et demi.

Avec n=5 nombre d'échantillons et m=10³ critère microbiologique pour avoir déterminé la qualité des mille-feuilles et M=10⁴ qui le seuil limite d'acceptabilité.

Les résultats obtenus au cours de l'analyse des coliformes (tableau 8) sont suivants :

-Le 15- avril on a obtenu : n₁<10 ; n₂<10 ; n₃<10 ; n₄<10 ; n₅<10 (UFC/g)

-Le 05-Mai on a obtenu: n₁<10 ; n₂<10 ; n₃<10 ; n₄<10 ; n₅<10 (UFC/g)

-Le 21-Mai on a obtenu : n₁<10 ; n₂<10 ; n₃<10 ; n₄<10 ; n₅<10 (UFC/g)

On remarque que tous les échantillons analysés ont des valeurs inférieures à m qui est égal 10³; ceci correspond aux normes d'acceptabilités par les critères de jugement donc ce mille-feuilles ne présente pas de danger pour le consommateur , et la qualité de ce mille-feuille et considérée comme **satisfaisante**.

c_Les Entérobactéries :

Le tableau suivant porte la concentration microbienne de mille-feuille par les Entérobactéries :

Tableau 9: Niveaux de contamination des mille-feuilles par les Entérobactéries :

<div>Contaminant</div> <div>Dates</div>	Entérobactérie	Critère de jugement					
	UFC/g						
15/04 /2018	<table><tr><td><10</td><td><10</td><td><10</td><td><10</td><td><10</td></tr></table>	<10	<10	<10	<10	<10	n=5 ; c=2 ; m=1 M=10
<10	<10	<10	<10	<10			
05/05/2018	<table><tr><td><10</td><td><10</td><td><10</td><td><10</td><td><10</td></tr></table>	<10	<10	<10	<10	<10	n=5 ; c=2 ; m=1 M=10
<10	<10	<10	<10	<10			
21/05 /2018	<table><tr><td><10</td><td><10</td><td><10</td><td><10</td><td><10</td></tr></table>	<10	<10	<10	<10	<10	n=5 ; c=2 ; m=1 ; M=10
<10	<10	<10	<10	<10			

On a testé 5 échantillons avec la variation de la période de conservation de ce mille-feuille afin d'avoir l'évolution des Entérobactéries au cours d'un mois et demi.

Avec n=5 nombre d'échantillons et m=1 critère microbiologique pour avoir déterminer la qualité de mille-feuille et M=10 qui est le seuil limite d'acceptabilité au-delà duquel les résultats ne sont plus considérés comme satisfaisante

➤ Les résultats obtenus au cours de l'analyse les Entérobactéries (tableau 8) :

-Le 15- avril on a : $10 < n_1 < 1$; $10 < n_2 < 1$; $10 < n_3 < 1$; $10 < n_4 < 1$; $10 < n_5 < 1$ (UFC/g)

-Le 05-Mai on a : $10 < n_1 < 1$; $10 < n_2 < 1$; $10 < n_3 < 1$; $10 < n_4 < 1$; $10 < n_5 < 1$ (UFC/g)

-Le 21-Mai on a : $10 < n_1 < 1$; $10 < n_2 < 1$; $10 < n_3 < 1$; $10 < n_4 < 1$; $10 < n_5 < 1$ (UFC/g)

Les résultats des analyses effectués montrent que tous les échantillons analysés ont des valeurs qui sont incluses entre m= 1 et M=10 avec c=2 c'est le nombre d'erreur a n'est pas dépasser.

$M < n < m$ donc la qualité des mille-feuilles est **acceptables**.

d-Staphylococcus aureus:

Le tableau suivant présent la concentration microbienne de mille-feuille par staphylococcus aureus en UFC/g.

Tableau 10: Niveaux de contamination des mille-feuilles par staphylococcus aureus :

<div>Contaminant</div> <div>Dates</div>	Staphylocoque aureus					Critère de jugement
	UFC/g					
15/04 /2018	<10	<10	<10	<10	<10	n=5 ; c=2 ; m=10 ² M=10 ³
05/05/2018	<10	<10	<10	<10	<10	n=5 ; c=2 ; m=10 ² M=10 ³
21/05/2018	<10	<10	<10	<10	<10	n=5 ; c=2 ; m=10 ² M=10 ³

On a testé 5 échantillons avec la variation de la période de conservation du mille-feuilles afin d'étudier l'évolution des *staphylocoques aureus* au cours du stage.

Avec n=5 nombre d'échantillons et m=10² critère microbiologique pour déterminer la qualité de mille-feuilles et M=10³ qui est le seuil limite d'acceptabilité au-delà duquel les résultats ne sont plus considérés comme satisfaisants.

➤ **Les résultats obtenus au cours de l'analyse des staphylocoques aureus (tableau10) sont les suivants :**

-Le 15- avril on a : n₁<10 ; n₂<10 ; n₃<10 ; n₄<10 ; n₅<10 (UFC/g)

-Le 05-Mai on a : n₁<10 ; n₂<10 ; n₃<10 ; n₄<10 ; n₅<10 (UFC/g)

-Le 21-Mai on a : n₁<10 ; n₂<10 ; n₃<10 ; n₄<10 ; n₅<10 (UFC/g)

On remarque que tous les échantillons analysés donnent des valeurs inférieure a m qui est égal 10² ce qui correspond aux normes d'acceptabilités par les critères de jugement ; donc le mille-feuille est de qualité satisfaisante, et ne présente donc pas de danger pour la santé du consommateur.



e_Bactéries sulfite réductrices :

Le tableau suivant porte le niveau de contamination par les bactéries sulfite réductrice :

Tableau 11 : Niveaux de contamination des mille-feuilles par les Bactéries sulfite réductrices :

<div>Contaminant</div> <div>Dates</div>	Bactéries sulfite réductrices	Critère de jugement					
	UFC/g						
15/04 /2018	<table><tr><td><10</td><td><10</td><td><10</td><td><10</td><td><10</td></tr></table>	<10	<10	<10	<10	<10	n=5 ; c=2 ; m=10 M=10 ²
<10	<10	<10	<10	<10			
05/05/2018	<table><tr><td><10</td><td><10</td><td><10</td><td><10</td><td><10</td></tr></table>	<10	<10	<10	<10	<10	n=5 ; c=2 ; m=10 M=10 ²
<10	<10	<10	<10	<10			
21/05/2018	<table><tr><td><10</td><td><10</td><td><10</td><td><10</td><td><10</td></tr></table>	<10	<10	<10	<10	<10	n=5 ; c=2 ; m=10 M=10 ²
<10	<10	<10	<10	<10			

On a testé 5 échantillons avec la variation de la période de conservation de ce mille-feuille afin d'avoir l'évolution des bactéries sulfite réductrices au cours d'un mois et demi .

Avec n=5 nombre d'échantillons et m=1 critère microbiologique pour déterminer la qualité de mille-feuilles et M=10 qui est le seuil limite d'acceptabilité au-delà duquel les résultats ne sont plus considérés comme satisfaisants.

➤ **Les résultats obtenus au cours de l'analyse des Bactéries sulfite réductrices (tableau11) :**

-Le 15- avril on a : n₁<10; n₂<10 ; n₃<10 ; n₄<10 ; n₅<10 (UFC/g)

-Le 05-Mai on a : n₁<10; n₂<10 ; n₃<10 ; n₄<10 ; n₅<10 (UFC/g)

-Le 21-Mai on a : n₁<10; n₂<10 ; n₃<10 ; n₄<10 ; n₅<10 (UFC/g)

On remarque que tous les échantillons analysés comportent des valeurs inférieures à m qui est égal 10 ; ce qui correspond aux normes d'acceptabilité par les critères de jugement, donc ce mille-feuilles ne présente pas de danger pour le consommateur, et sa qualité est considérée **satisfaisante**.

Commenté [LZ1]:

f_Salmonella :

Le tableau suivant renferme la concentration microbienne par UFC/g de mille-feuilles par les salmonelle

Tableau 12: Niveaux de contamination des mille-feuilles par salmonella

Contaminant Dates	Salmonella UFC /25g	Critère de jugement
09/04 /2018	Absence	n=5 ; c=0 ; m=Absence M=Absence
05/05/2018	Absence	n=5 ; c=0 ; m=Absence M=Absence
21/05/2018	Absence	n=5 ; c=0 ; m=Absence M=Absence

On a testé 5 échantillons avec la variation de la période de conservation de ce mille-feuilles afin d'avoir l'évolution des Salmonelles es au cours d'un mois et demi.

➤ **Les résultats obtenus au cours de l'analyse de salmonelle dans 25g (tableau 12) :**

-Le 15- avril on a : Absence

-Le 05-Mai on a : Absence

-Le 21-Mai on a : Absence

Les résultats obtenus sont conformes aux critères de jugement par la contamination de mille-feuilles par Salmonelle qui est considéré comme un agent pathogène ; leur présence rend le produit inconsommable et toxique pour le consommateur, c'est pourquoi les salmonelles doit être absents afin que le produit soit de qualité satisfaisante.

S'il y a présences de ces germes dans un échantillon analysé, la qualité diminue de manière rapide et devient insatisfaisante car on a C=0, nombre d'erreur adopté est zéro ;

c'est pourquoi on adopte le plan à deux classes pour déterminer la qualité et puisqu'il y a absence des salmonelles ; donc la qualité de millefeuilles est **satisfaisante**.

2- Evolution microbienne :

Afin de valider la DLC des mille-feuilles on doit suivre la croissance des FMAT, ce sont des germes très importants pour valider DLC puisqu'ils ont ubiquistes. Ces microorganismes se développant en présence d'oxygène à une température optimale de 30°C. Leur présence dans les mille feuilles indique une mauvaise conservation des mille-feuilles.

Pour étudier, l'évolution des microorganismes qui contaminants les mille-feuilles de ALHANINI, ont analysé des échantillons de 3 cartons de mille- feuilles pris au hasard et on a fait la moyenne des résultats obtenus qui sont résumés (**au tableau 13**). On y suit l'évolution de la croissance microbienne au cours de **j0, j21, j45**, des FMAT. Le tableau suivant présente la moyenne des résultats obtenu au cours de l'analyse des **FMAT** :

Tableau 13 : Evolution des FMAT au cours de jours de conservations de mille-feuilles ;

Les jours de conservation des mille feuilles	J ₀ 09/04	J ₂₁ 05 /05	J ₄₅ 21 /05
FMAT (UFC/g)	1,5.10 ²	1,6.10 ²	2.10 ²

Ce tableau montre la croissance des FMAT a j0 on a une contamination de 1,5.10²,et au cours de 21 jours on remarque une croissance léger jusqu'au 1,6.10²,puis atteinte une évolutions maximale de 2.10²UFC/g.

La courbe suivante montre l'évolution de la croissance des FMAT en fonction des jours de conservation de mille-feuilles.

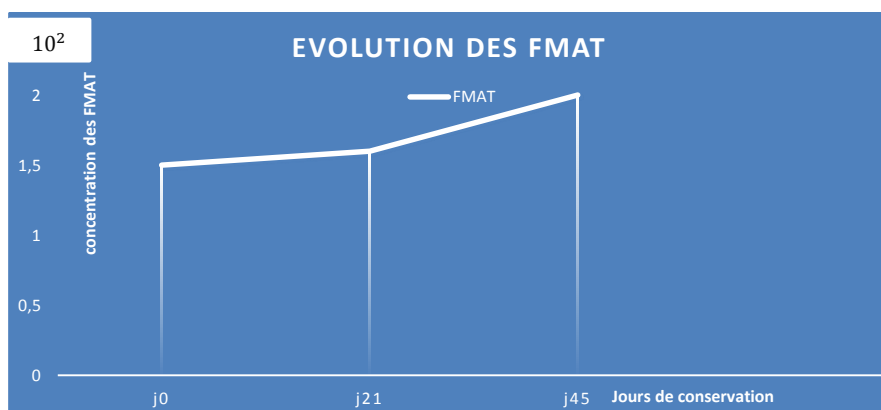


Figure 13 : Courbe de la croissance des FMAT au cours de 45 jours de mille-feuilles

A J₀ la contamination des mille- feuilles par les FMAT atteint $1,5.10^2$ UFC/g, à j₂₁ de $1,6.10^2$ UFC/g, et a J₄₅ on a 2.10^2 donc on constate l'une augmentation des germes des FMAT dans le mille-feuille au cours de 45 jours de conservation étudiés ; néanmoins selon les critères de jugement et on se basant sur m pour valider sa conformité qui est égale à 3.10^5 donc toutes les concentration des FMAT sont inférieures à m, donc les mille-feuilles analysée sont conformes et salubres pour les consommateurs. De ce fait, la durée de vie proposée pour le mille-feuilles est confirmée ainsi que la validation de la date limite de consommation de ce produit.

Conclusion

Pour conclure, en se basant sur le travail expérimental pratiqué dans le cadre du stage. Les résultats des analyses microbiologiques étaient :

* satisfaisantes selon les critères de jugement pour les coliformes, les FMAT, les *staphylocoques aureus* et les bactéries sulfito- réducteurs.

*acceptables pour les entérobactéries.

Ce qui nous permet de juger le taux de contamination conforme aux critères de validation de la Date Limite de Consommation.

Cela montre qu'il n'y a pas une contamination lors de la préparation ou lors du stockage associé à un développement microbien.

D'autre part la contamination par salmonelles (agents pathogènes) est totalement absente chose qui prouve la conformité des critères de jugement aux résultats obtenus, d'où l'importance de la détermination et la validation exacte de la date limite de consommation qui reste un point à ne pas dépasser pour garantir la sécurité sanitaire du consommateur.

Au cours de ce stage qui a duré un mois et demi j'avais pu établir le temps de conservation des mille-feuilles depuis leur production jusqu'à leur consommation, et de valider officiellement cette durée de vie (1mois et demi). Ces résultats valident la durée de vie du produit au cours du stockage pour la 1^{ère} fois au sein de la société AL HANINI.

De plus, ce stage m'a permis de mettre en pratique les connaissances théoriques acquises lors de mon cursus étudiantin, recenser la primordialité du monde professionnel et m'imprégner de l'esprit d'équipe et l'esprit de l'entreprise.

Références bibliographiques

-ALHANINI.com/présentation.php

De La Varenne. F.P (1651) Cuisinier François, Bibliothèque municipale de Lyon

-Bellec. J.F, Chaing. V, Drzewiecki. E, Dugast. A, Marcelino. V, (2009) la qualité dans la filière de pâtisserie, UPMC

-<http://www.jnsiences.org/agri-biotech/60-volume-41/317-validation-of-microbiological--life-tests-on-pre-cooked-dishes.html>

-NORME FRANÇAISE NF V01-003 : Lignes directrices pour la réalisation de tests de vieillissement microbiologique - Hygiène des aliments : aliments périssables et très périssables (AFNOR).

-<https://standards.globalspec.com/std/1173039/afnor-nf-v08-060>

-ARR.624-04.FR Normes Microbiologiques

-MICROBIOLOGIE ALIMENTAIRE - DIRECTIVES GENERALES POUR LE DENOMBREMENT DES COLIFORMES FECAUX ET D'*ESCHERICHIA COLI* (ANNEXE A NF V 08-015 ET NF V 08-016)

