



BIOLOGIE  
TECHNIQUE

Collection dirigée par  
Joël Cnokaert – IA IPR Biochimie – Génie biologique  
Françoise Guillet – IGEN Biotechnologies et secteur médico-social

*OPÉRATIONS UNITAIRES  
EN GÉNIE BIOLOGIQUE*

**.2.**

**LA PASTEURISATION**

Pascal Chillet  
Professeur agrégé de Biochimie - Génie biologique

# SOMMAIRE

## **PARTIE 1. Aspects technologiques**

<b>1. Objectifs et définition de la pasteurisation</b>	<b>10</b>
1.1. Objectifs	10
1.2. Définition	10
<b>2. Cinétique de destruction des micro-organismes</b>	<b>10</b>
2.1. Facteur temps	10
2.1.1. Courbe de survie	10
2.1.2. Temps de réduction décimale $D_0$	11
2.1.3. Taux de réduction décimale	12
2.1.4. Détermination graphique de $D_0$	12
2.2. Facteurs de variation de la thermorésistance	12
2.3. Facteur température	12
2.3.1. Droite de résistance thermique	12
2.3.2. Facteur d'inactivation thermique $z$	14
2.3.3. Exemples de valeurs de $D_0$ et $z$	14
2.3.4. Notion de barème	14
2.4. Valeur pasteurisatrice	14
2.4.1. Définition	14
2.4.2. Choix de la valeur pasteurisatrice	16
2.4.3. Intérêt de la valeur pasteurisatrice	16
2.4.4. Calcul de la valeur pasteurisatrice	17
<b>3. Cinétique de dégradation du produit</b>	<b>18</b>
<b>4. Détermination d'un barème de pasteurisation</b>	<b>20</b>
<b>5. Pasteurisateur : description et fonctionnement</b>	<b>20</b>
5.1. Sections du pasteurisateur	20
5.2. Échangeurs	20
5.2.1. Définition	20
5.2.2. Principe	20
5.2.3. Les catégories d'échangeurs	24
5.2.4. Problèmes d'exploitation	28
5.3. Conditionnement	28
5.3.1. Produits traités en vrac	28
5.3.2. Traitement après conditionnement	28

## **PARTIE 2. Applications**

<b>1. Applications industrielles</b>	<b>32</b>
1.1. Pasteurisation en industrie	32
1.2. Pasteurisation du lait	32
1.2.1. Bactéries du lait	32
1.2.2. De la collecte à la pasteurisation	32
1.2.3. Traitements de pasteurisation	32
1.2.4. Dégradation des constituants du lait	32
1.2.5. Place de la pasteurisation dans un exemple de procédé	33
1.2.6. Contrôles microbiologiques	34
1.3. Pasteurisation des jus de fruits	36
1.3.1. Traitements de pasteurisation	36
1.3.2. Place de la pasteurisation dans un exemple de procédé	36
1.4. Pasteurisation de la bière	36
1.5. Pasteurisation des ovoproduits	36

<b>2. Mise en œuvre à l'échelle pilote</b> .....	<b>38</b>
Activité 1 - Étude d'un pasteurisateur pilote .....	39
Fiche 1.1 - Identification des différents éléments du pilote de pasteurisation .....	40
Fiche 1.2 - Étude du plan de l'installation .....	42
Fiche 1.3 - Étude d'une documentation technique .....	44
Activité 2 - Fonctionnement et mise en œuvre d'un pilote de pasteurisation .....	47
Fiche 2.1 - Mise en route, mise en œuvre de la pasteurisation et arrêt du pilote .....	48
Fiche 2.2 - Étude d'une documentation technique .....	50
Activité 3 - Vérification de l'efficacité de la procédure de désinfection d'un pilote .....	51
Fiche 3.1 - Mise en œuvre de la procédure de désinfection en vue d'un contrôle microbiologique des eaux de rinçage .....	52
Fiche 3.2 - Réalisation des contrôles microbiologiques .....	53
Fiche 3.3 - Étude de cas .....	54
Activité 4 - Détermination du temps de réduction décimale et du facteur d'inactivation thermique d'un micro-organisme dans une denrée alimentaire .....	57
Fiche 4.1 - Mise en œuvre des pasteurisations d'un lait artificiellement contaminé par <i>S. aureus</i> à 55 °C, 60 °C et 65 °C .....	58
Fiche 4.2 - Réalisation des analyses microbiologiques en vue de la détermination de D et z de <i>S. aureus</i> dans le lait .....	59
Fiche 4.3 - Étude de cas .....	60
Activité 5 - Détermination de l'efficacité et de la valeur pasteurisatrices .....	63
Fiche 5.1 - Mise en œuvre de la pasteurisation d'un lait artificiellement contaminé par <i>E. faecalis</i> .....	64
Fiche 5.2 - Détermination de l'efficacité pasteurisatrice .....	65
Fiche 5.3 - Calcul de la valeur pasteurisatrice atteinte .....	66
Fiche 5.4 - Étude de cas .....	68
Activité 6 - Pasteurisation d'une denrée alimentaire .....	75
Fiche 6.1 - Mise en œuvre de la fabrication de lait pasteurisé à partir de lait cru .....	76
Fiche 6.2 - Réalisation du contrôle microbiologique : dénombrement des <i>Enterobacteriaceae</i> d'après ISO 21528-1:2004 .....	77
Fiche 6.3 - Recherche de l'activité phosphatase alcaline d'après ISO 3356:2009 - FIL 63:2009 .....	79
Fiche 6.4 - Comparaison des méthodes de détermination de l'activité de la phosphatase alcaline .....	81
Fiche 6.5 - Étude de cas .....	83
<b>Éléments de correction des exercices et des études documentaires</b> .....	<b>88</b>
<b>Annexes</b> .....	<b>99</b>
Annexe 1 - Schémathèque de génie chimique .....	99
Annexe 2 - Fiche de prise en charge, de fonctionnement et de libération du pilote .....	100
Annexe 3 - Fiche de fabrication et de contrôle .....	102
Annexe 4 - Taux de létalité. D'après ALINORM 95/13 .....	103
Annexe 5 - Indices NPP et limites de confiance à 95 %. Table de Mac Grady .....	104
<b>Bibliographie</b> .....	<b>105</b>
<b>Crédits</b> .....	<b>109</b>



# **PARTIE 1**

## **ASPECTS TECHNOLOGIQUES**

Entre 1860 et 1864, Pasteur démontra que la flore non désirable du moût de raisin pouvait être éliminée par un chauffage de quelques secondes à 55–65 °C. Il donna son nom à ce procédé qui fut utilisé un peu plus tard pour allonger la durée de conservation du lait.

La pasteurisation est un traitement thermique destiné à détruire des micro-organismes par la chaleur. Contrairement à la stérilisation qui détruit tous les micro-organismes susceptibles de se développer dans un produit par l'application d'une température supérieure à 100 °C, l'objectif principal de la pasteurisation est de détruire la flore pathogène non sporulée et la majorité de la flore non pathogène d'altération des aliments.

Ces deux procédés permettent d'allonger la durée

de conservation des produits : ainsi, les aliments pasteurisés présentent une date limite de consommation de quelques jours avec une conservation à une température de + 4 °C alors que les produits stérilisés se conservent plusieurs mois, voire plusieurs années, à température ambiante.

Le choix du traitement thermique à appliquer dépend ainsi des objectifs souhaités tant au niveau de la réduction biologique que des qualités nutritionnelles et organoleptiques à obtenir et du coût du procédé à mettre en œuvre.

Différentes technologies sont utilisées pour pasteuriser les produits agroalimentaires. Le tableau 1 présente des exemples d'aliments pasteurisés et des exemples de traitements réalisés.

## 1. OBJECTIFS ET DÉFINITION DE LA PASTEURISATION

### 1.1. Objectifs

La pasteurisation est une technique utilisée très fréquemment en agroalimentaire. L'objectif est d'allonger de façon significative la durée de conservation des aliments. La pasteurisation réduit au maximum les activités biologiques d'un produit tout en évitant de modifier ses caractéristiques organoleptiques et nutritionnelles.

Les activités biologiques détruites ou inactivées par la pasteurisation sont :

- les flores non pathogènes d'altération des aliments ;
- les flores pathogènes et toxigènes (*Salmonella*, *Brucella*, *Listeria*, etc) ;
- les enzymes endogènes comme la lipoxygénase du soja (oxygénase qui catalyse l'oxygénation des acides gras polyinsaturés) ou la plasmine présente dans le lait (protéase dont le spectre d'action est assez large) ;
- les enzymes intracellulaires nuisibles.

La pasteurisation, comme tout traitement thermique, doit permettre :

- de préserver l'aspect nutritionnel du produit tel que la non-destruction des vitamines ;
- de ne pas modifier ses qualités organoleptiques telles que l'absence de brunissement, de décoloration, de goûts de cuit, de rupture de l'émulsion, de coagulation des protéines, etc.

La pasteurisation présente donc un inconvénient majeur : elle ne détruit pas les flores sporulées.

### 1.2. Définition

La pasteurisation est un traitement thermique à des températures comprises entre 60 et 100 °C ayant pour but de détruire la totalité des micro-organismes pathogènes non sporulés et de réduire significativement la flore végétative présente dans un produit. C'est un procédé de conservation limité pour lequel le produit doit être conditionné hermétiquement (avec ou sans atmosphère modifiée ou sous vide) et réfrigéré (le produit pasteurisé peut être en effet conservé à +4 °C de quelques jours à quelques semaines).

## 2. CINÉTIQUE DE DESTRUCTION DES MICRO-ORGANISMES

### 2.1. Facteur temps

#### 2.1.1. Courbe de survie

On détermine à différents temps le nombre de micro-organismes survivants suite à l'exposition à une température létale constante.

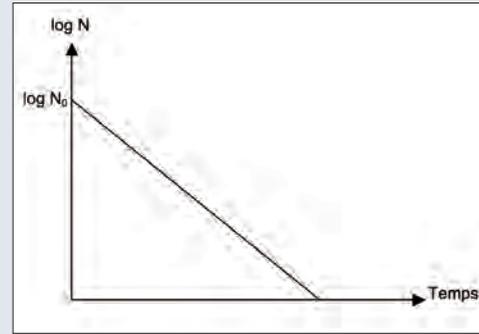
La figure 2 montre l'allure de la courbe :

$$\log N = f(t)$$

t	Temps d'exposition des micro-organismes à la chaleur
N <sub>0</sub>	Nombre de micro-organismes avant traitement thermique, donc à l'instant t = 0
N	Nombre de micro-organismes survivants à l'instant t

EXEMPLES D'ALIMENTS	EXEMPLES DE MODES DE PASTEURISATION
Lait	Pasteurisateur à échangeur à plaques (15 s à 72 °C).
Crèmes	Pasteurisateur à échangeur à plaques (15 s à 82 °C).
Jus de fruits	Pasteurisateur à échangeur tubulaire (10 s à 97 °C).
Purées de fruits, concentrés de tomates	Pasteurisateur à échangeur à surface raclée (90-95 °C).
Bière	Traitement après conditionnement en tunnel de pasteurisation (20 min à 65 °C).
Ovoproduits	Pasteurisateur à échangeur tubulaire (2 - 6 min à 57-65 °C).

1 Exemples d'aliments pasteurisés et de modes de pasteurisation



2 Influence du temps sur le nombre de micro-organismes survivants à une température létale  $\theta$  constante

La relation  $\log N = f(t)$  est appelée *courbe de survie* ou *cinétique de destruction microbienne*. Cette relation est linéaire, autrement dit, les micro-organismes exposés à une température létale constante, suivent une loi de destruction d'ordre 1 en fonction du temps. Le temps nécessaire pour détruire une fraction de la population est donc indépendant de la concentration initiale en micro-organismes.

Plus le nombre initial de micro-organismes ( $N_0$ ) est important, plus le temps de pasteurisation doit être long. De même, plus les micro-organismes sont thermorésistants, plus la durée de pasteurisation doit être grande.

### 2.1.2. Temps de réduction décimale $D_\theta$

$\theta$	Température létale d'exposition à la chaleur
$k_\theta$	Constante de vitesse
$D_\theta$	Temps de réduction décimale

La cinétique de destruction microbienne étant d'ordre 1, alors :

$$-\frac{dN}{dt} = k_\theta \times N$$

et en séparant les variables :

$$-\frac{dN}{N} = k_\theta \times dt$$

Cette équation s'intègre entre l'instant initial  $t = 0$  et l'instant  $t$ , ce qui correspond aux valeurs  $N_0$  et  $N$  :

$$\int_{N_0}^N -\frac{dN}{N} = \int_0^t k_\theta \times dt \quad \Rightarrow \quad \ln\left(\frac{N_0}{N}\right) = k_\theta \times t$$

En utilisant le logarithme décimal, on obtient :

$$\log\left(\frac{N_0}{N}\right) = t \times \left(\frac{k_\theta}{2,303}\right)$$

Soit  $D_\theta = \frac{2,303}{k_\theta}$ , alors :

$$\log\left(\frac{N_0}{N}\right) = \frac{t}{D_\theta} \quad \frac{N_0}{N} = 10^{\frac{t}{D_\theta}}$$

$N_0$	Nombre (ou concentration) de micro-organismes avant traitement thermique	Nombre de micro-organismes ( $\cdot L^{-1}$ )
$N$	Nombre (ou concentration) de micro-organismes survivants à l'instant $t$	Nombre de micro-organismes ( $\cdot L^{-1}$ )
$t$	Temps d'exposition des micro-organismes à la chaleur	s ou min
$D_\theta$	Temps de réduction décimale	s ou min

Si  $t = D_\theta$ , alors :  $\log\left(\frac{N_0}{N}\right) = 1$  et  $\frac{N_0}{N} = 10$

Ainsi,  $D_\theta$  est la valeur que prend  $t$  pour  $\frac{N_0}{N} = 10$

$D_\theta$  est donc le temps permettant de détruire 90% des micro-organismes initiaux. En d'autres termes, c'est le temps nécessaire pour réduire d'un facteur 10 la concentration en micro-organismes à la température  $\theta$ .

### 2.1.3. Taux de réduction décimale

Le taux de réduction décimale (ou nombre de réductions décimales) appelé aussi *efficacité pasteurisatrice* ( $E$ ) à la température  $\theta$  est :

$$n = \log\left(\frac{N_0}{N}\right) \quad \text{ou} \quad E = \log\left(\frac{N_0}{N}\right)$$

Une réduction décimale  $n$  correspond à un taux de survivants  $\frac{N}{N_0} = 10^{-n}$

L'équation précédente peut alors s'écrire :

$$n = \frac{t}{D_\theta} \quad \text{ou} \quad E = \frac{t}{D_\theta}$$

La durée du traitement est :  $t = n \times D_\theta$ .

n ou E	Taux de réduction décimale ou nombre de réduction décimale ou efficacité pasteurisatrice	
$N_0$	Nombre (ou concentration) de micro-organismes avant traitement thermique	Nombre de micro-organismes (.L <sup>-1</sup> )
N	Nombre (ou concentration) de micro-organismes survivants à l'instant t	Nombre de micro-organismes (.L <sup>-1</sup> )
t	Temps d'exposition des micro-organismes à la chaleur	s ou min
$D_\theta$	Temps de réduction décimale	s ou min

### 2.1.4. Détermination graphique de $D_\theta$

La courbe de survie  $\log N = f(t)$  permet de déterminer  $D_\theta$ . L'inverse de la pente de cette droite est  $D_\theta$  (figure 3).

Sur une représentation graphique en coordonnées semi-logarithmiques, la détermination de  $D_\theta$  se réalise par interpolation (figure 4).

#### Exercice 1

À partir des courbes de survie en échelle semi-logarithmique de la figure 5 obtenues pour le même micro-organisme, déterminer le paramètre  $D_\theta$  aux trois températures de traitement différentes.

#### Exercice 2

Un échantillon contaminé avec  $3.10^3$  *Enterococcus faecalis*.L<sup>-1</sup> est pasteurisé pendant 10 min à 72°C. On détermine la quantité de micro-organismes survivants (N) après différents temps de traitement thermique (t).

t (min)	0	2	4	6	8	10
N (micro-organismes.L <sup>-1</sup> )	$3.10^3$	$7.10^2$	$2.10^2$	$6.10^1$	10	3

Tracer sur papier millimétré la courbe  $\log N = f(t)$ . En déduire graphiquement le temps nécessaire pour passer de  $10^3$  à  $10^2$  micro-organismes.L<sup>-1</sup>. Ce temps est le temps de réduction décimale  $D_{72}$ .

## 2.2. Facteurs de variation de la thermorésistance

$D_\theta$  dépend du micro-organisme considéré, de son état physiologique, de la température et du milieu dans lequel il est présent. Ainsi,  $D_\theta$  caractérise la thermorésistance d'un micro-organisme dans des conditions physico-chimiques bien définies.

Les micro-organismes sont plus facilement détruits lorsqu'ils se trouvent en phase exponentielle de croissance. Il existe deux types de flores :

- les micro-organismes détruits par un traitement à 63°C pendant 30 min (ou par un traitement équivalent) = flore thermosensible ;
- les micro-organismes résistants à un traitement à 63°C pendant 30 min (ou par un traitement équivalent) = flore thermorésistante.

La thermorésistance des micro-organismes varie en fonction des caractéristiques physico-chimiques de l'aliment telles que le pH, l'activité de l'eau (l'Aw quantifie dans un aliment la disponibilité de l'eau mobilisable pour les réactions biochimiques) et la teneur en lipides :

- plus le pH de l'aliment est éloigné de la neutralité, plus les micro-organismes sont sensibles à la chaleur ; c'est pourquoi les aliments sont classés selon leur pH en trois classes.

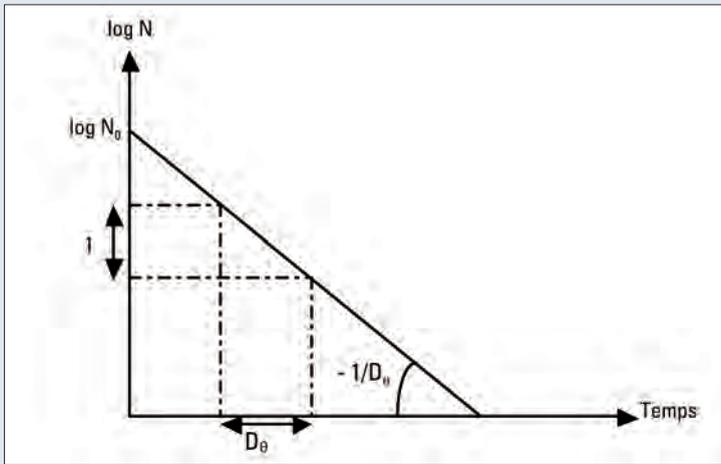
Aliments acides	pH < 4,5
Aliments modérément acides	4,5 < pH < 5,3
Aliments peu acides	pH > 5,3

- plus l'Aw de l'aliment est faible, plus les micro-organismes sont thermorésistants et donc plus le traitement par la chaleur est inefficace ;
- plus l'aliment est gras, plus les micro-organismes seront résistants à la chaleur car les lipides sont de médiocres conducteurs de la chaleur.

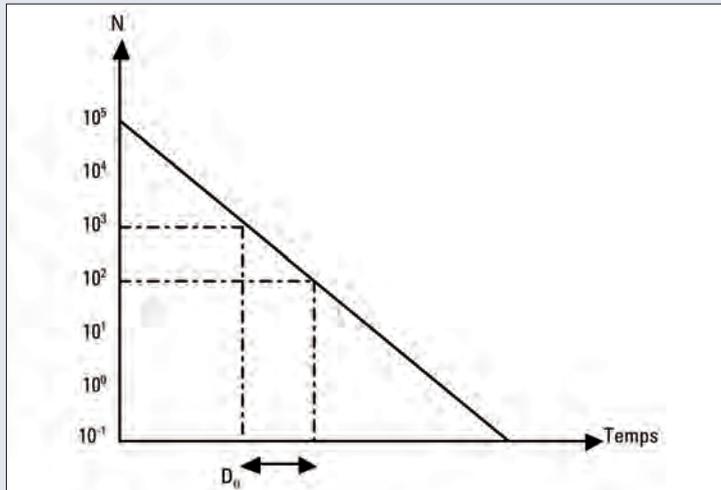
## 2.3. Facteur température

### 2.3.1. Droite de résistance thermique

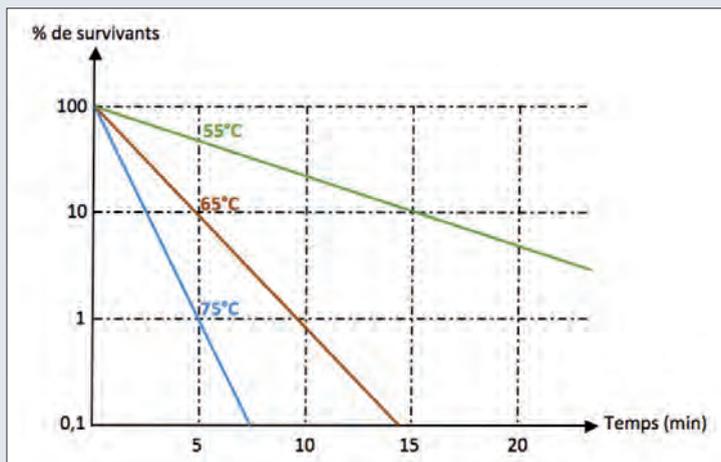
La figure 6 montre la relation existant entre le temps de chauffage et la température létale d'exposition à la chaleur permettant d'obtenir un taux de réduction donné.



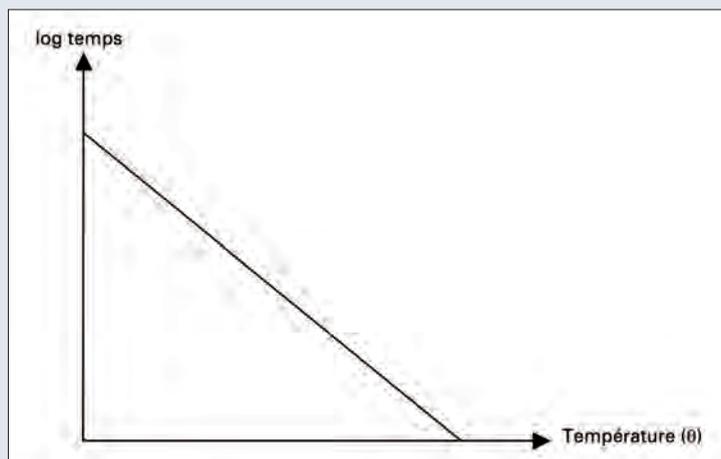
**3** Détermination de  $D_\theta$  à partir de la courbe  $\log N = f(t)$



**4** Détermination de  $D_\theta$  à partir de la courbe  $N = f(t)$



**5** Courbes de survie pour le même micro-organisme obtenues à 55 °C, 65 °C et 75 °C



**6** Étude de l'influence du temps de chauffage sur la température de traitement permettant d'obtenir un taux de réduction donné

### 5.2.3.2. Les échangeurs à spirale

Ils sont formés de deux canaux en acier inoxydable enroulés en spirale dans lesquels les liquides circulent à contre-courant (figures 22).

### 5.2.3.3. Les échangeurs tubulaires

Les liquides circulent dans des tubes en acier inoxydable (figure 23).

On distingue différents types d'échangeurs tubulaires (figure 24) :

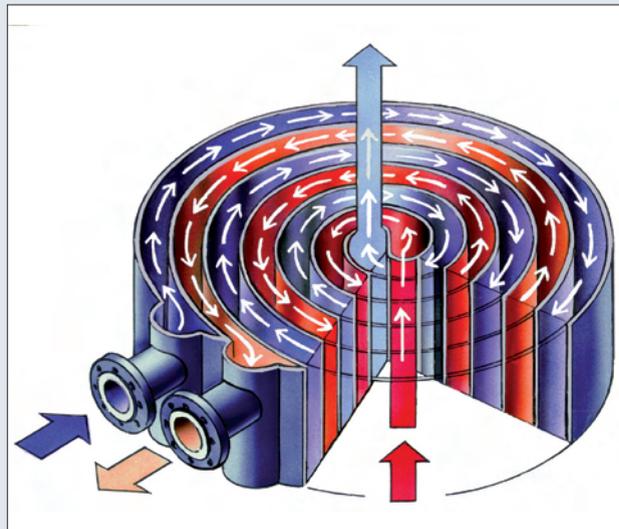
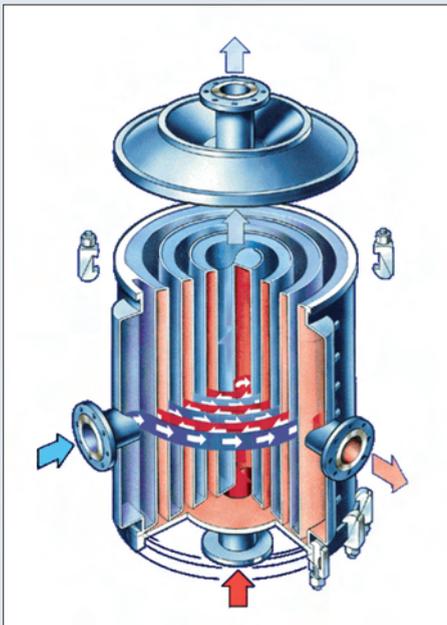
- les échangeurs monotube et multitube : le produit alimentaire circule dans un ou plusieurs tuyaux au centre et les fluides thermiques circulent dans la partie extérieure ;
- l'échangeur annulaire : le fluide thermique circule dans deux tuyaux, un central et l'autre annulaire externe ; le produit alimentaire est propulsé dans un canal annulaire intermédiaire.

Une variante de ce type d'échangeur a été mise au point : il s'agit des tubes à passage de courant

(TPC). Les parois du tube ne sont pas chauffées par un autre fluide mais par effet Joule. En effet, le tube est parcouru par un fort courant électrique sous basse tension produisant de la chaleur. Celle-ci est transférée directement entre la paroi interne du tube et le produit alimentaire. Ce système présente certains avantages tels que : montée en température linéaire, maîtrise de la régulation de la température plus fine, encombrement réduit...

### 5.2.3.4. Les échangeurs à surface raclée

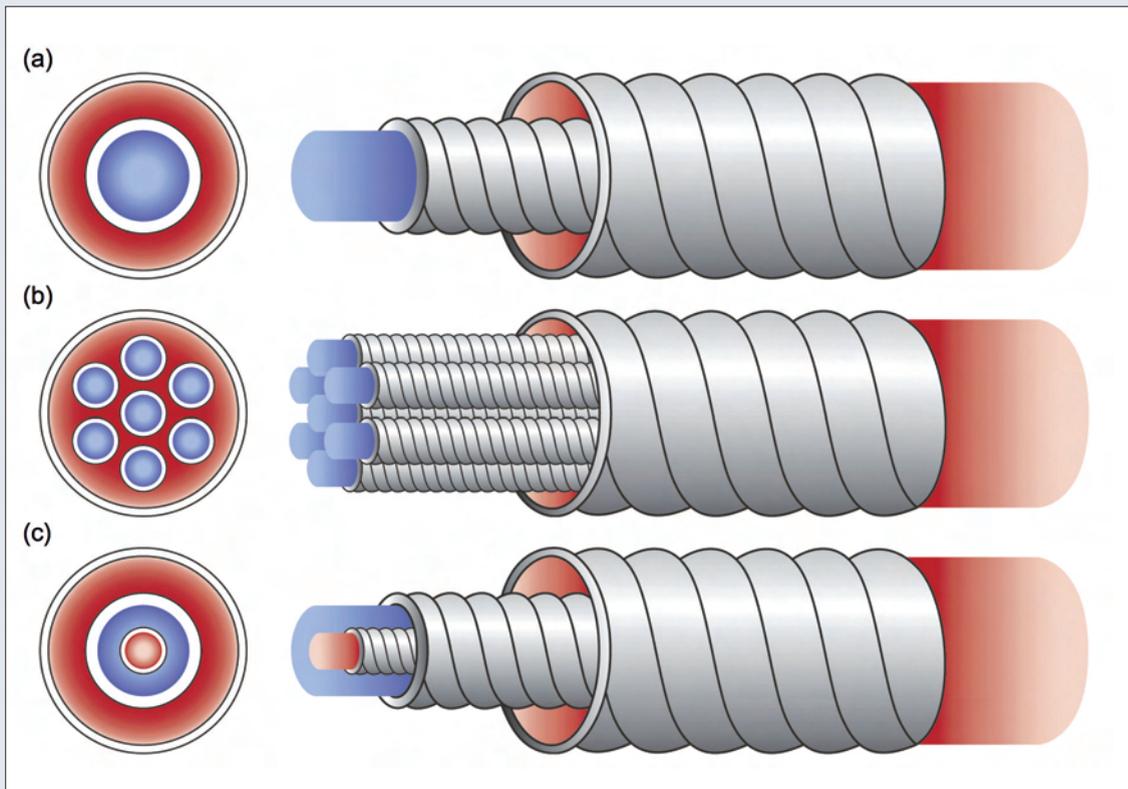
Ils sont utilisés lorsque le produit est visqueux et pâteux. Ce type d'échangeur est composé d'éléments tubulaires dans lesquels le fluide thermique circule dans l'espace annulaire et le produit dans l'espace central (figure 25). Le canal central est muni d'un rotor équipé de lames qui raclent continuellement la surface intérieure de transfert, évitant au produit de s'y déposer, et qui mélangent le produit chauffé ou refroidi (figure 26).



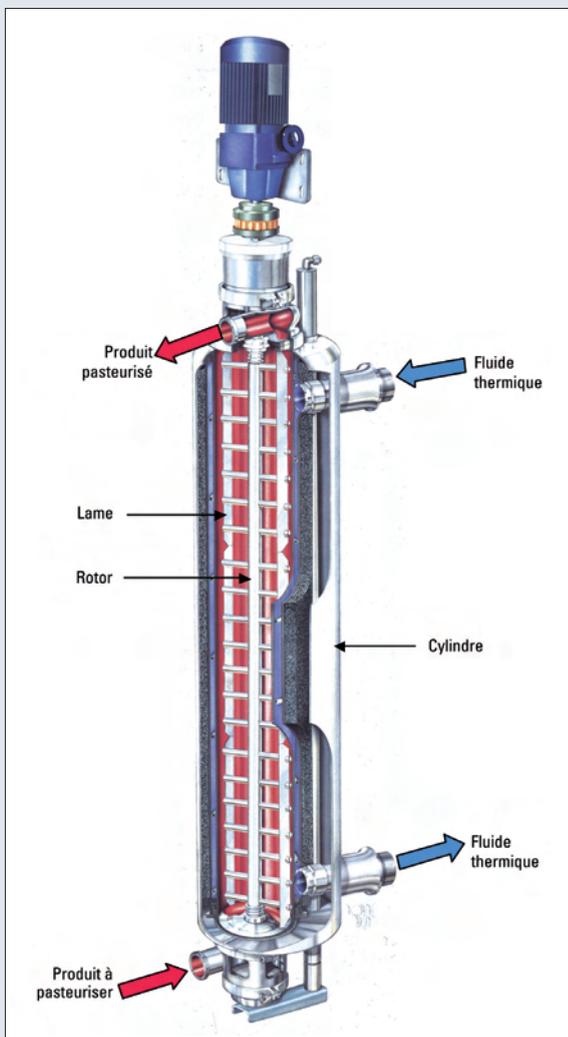
22 Circulation des fluides dans un échangeur à spirale



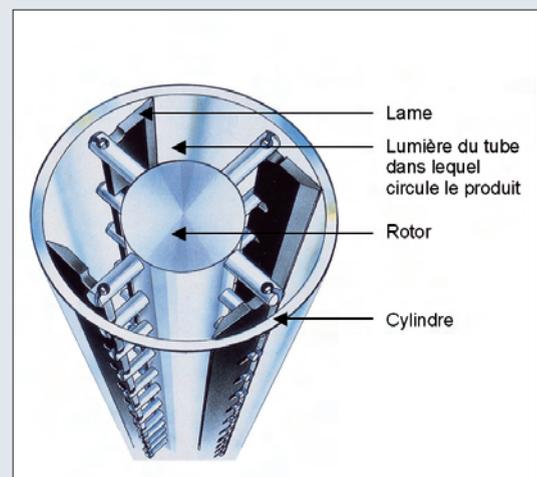
23 Schéma d'un échangeur tubulaire multitube



**24** Circulation des fluides dans les échangeurs tubulaires monotube (a), multitube (b) et annulaire (c)



**25** Coupe transversale d'échangeur à surface raclée



**26** Schéma montrant le canal central muni d'un rotor équipé de lames d'un échangeur à surface raclée



# **PARTIE 2**

## **APPLICATIONS**

Dans le lait, la présence d'espèces pathogènes pour l'homme présente un danger pour le consommateur. La présence de bactéries commensales est l'indice de souillures et compromet sa conservation.

### Objectif

Afin de détruire la totalité des micro-organismes pathogènes et de réduire la flore végétative présente dans le lait pour allonger sa durée de conservation, on se propose :

- de produire du lait pasteurisé à partir de lait cru ;
- de réaliser les contrôles préconisés sur le produit fini<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> *Le contrôle microbiologique est réalisé selon la réglementation (CE) en vigueur concernant les critères microbiologiques applicables aux denrées alimentaires. Le règlement (CE) N° 1441/2007 a pour objectif de contrôler l'acceptabilité du procédé, de mettre en évidence l'origine d'un éventuel dysfonctionnement et de procéder à des actions correctives. Dans le cadre d'un lait pasteurisé, l'hygiène du procédé de pasteurisation est contrôlée par un dénombrement des Enterobacteriaceae en fin de procédé de fabrication par la méthode d'analyse de référence ISO 21528-1:2004.*

*La recherche de l'activité phosphatase alcaline permet de contrôler l'efficacité de la pasteurisation réalisée. En effet, l'activité phosphatase alcaline du lait disparaît après un traitement de basse pasteurisation. Le contrôle est réalisé par la méthode d'analyse de référence ISO 3356:2009 - FIL 63:2009.*

### Compétences

- Préparer le pilote dans le contexte de production de lait pasteurisé à partir de lait cru.
- Vérifier lors de la mise en route du pasteurisateur et avant la pasteurisation du lait cru que l'ensemble de l'installation ne présente pas de dysfonctionnement.
- Conduire la fabrication de lait pasteurisé.
- Effectuer les contrôles nécessaires à la validation du contrôle qualité.
- Comparer les méthodes de détermination de l'activité de la phosphatase alcaline.
- Réaliser les opérations de nettoyage et désinfection de l'installation.
- Effectuer l'arrêt et la mise en sécurité des installations.
- Présenter et ordonner les valeurs expérimentales. Exprimer des résultats.
- Analyser et interpréter les résultats.

### Tâches professionnelles

- |   |           |    |
|---|-----------|----|
| • Mettre en œuvre la fabrication.   | Fiche 6.1 | 76 |
| • Réaliser le contrôle microbiologique : dénombrement des <i>Enterobacteriaceae</i> . | Fiche 6.2 | 77 |
| • Rechercher l'activité phosphatase alcaline.   | Fiche 6.3 | 79 |
| • Comparer les méthodes de détermination de l'activité phosphatase alcaline           | Fiche 6.4 | 81 |

### Étude de cas

- |   |           |    |
|---|-----------|----|
| • Analyse d'une documentation technique, de protocoles et de résultats expérimentaux. | Fiche 6.5 | 83 |
|---|-----------|----|

### Documents ressource

- |  |           |     |
|--|-----------|-----|
| • Mise en route, mise en œuvre de la pasteurisation et arrêt du pilote.  | Fiche 2.1 | 48  |
| • Fiche de prise en charge, de fonctionnement et de libération de poste. | Annexe 2  | 100 |
| • Fiche de fabrication et de contrôle.                                   | Annexe 3  | 102 |
| • Indices NPP et limites de confiance à 95 % - Table de Mac Grady.       | Annexe 5  | 104 |

### Réactifs

- Lait cru : 20 L
- Produits nettoyants (soude, acide nitrique) et désinfectant du circuit produit

### Réalisation de l'opération unitaire

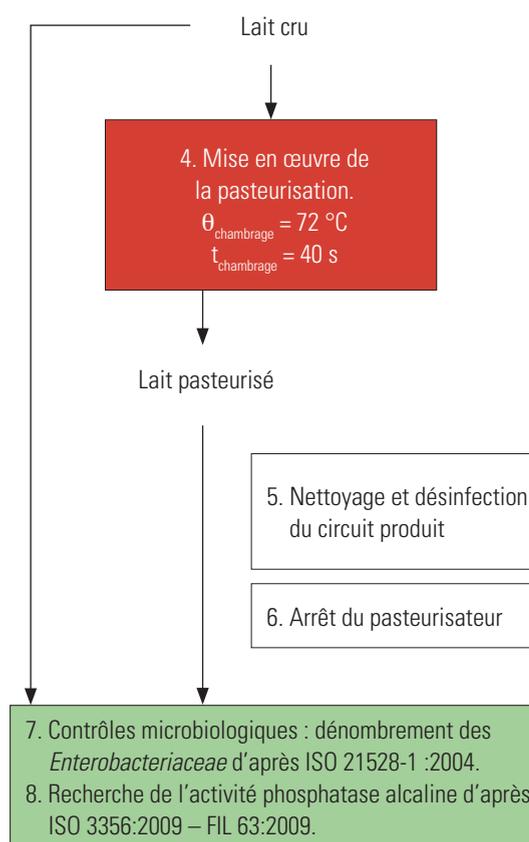
- Réaliser les opérations de mise en route du pasteurisateur (fiche 2.1).
- Mettre en œuvre la fabrication : haute pasteurisation à 72 °C pendant 40 s de 20 L de lait cru.
- Réaliser les opérations de mise en arrêt de l'installation.
- Remplir la fiche d'utilisation du pilote de pasteurisation au cours de la procédure (annexe 2).

#### Diagramme de procédure

1. Préparation des circuits de chauffe et de refroidissement

2. Préparation du circuit produit  
Zones de chambrage à déterminer  
Débit : 110-120 L.h<sup>-1</sup>

3. Nettoyage et désinfection du circuit produit



Réaliser un dénombrement des *Enterobacteriaceae* sur le lait cru et le lait en fin de procédé de fabrication selon la méthode d'analyse de référence (ISO 21528-1) à l'aide de la technique du NPP avec pré-enrichissement.

### Réactifs

#### Eau peptonée tamponnée (EPT)

Peptone	10,0 g
Chlorure de sodium	5,0 g
Phosphate disodique	9,0 g
Phosphate monopotassique	1,5 g
Eau	qsp 1 L

Bouillon tamponné à la bile, au vert brillant et au glucose : bouillon d'Enrichissement sélectif pour les *Enterobacteriaceae* (bouillon EE)

Peptone pancréatique de gélatine	10,0 g
Bile de bœuf	20,0 g
Glucose	5,0 g
Phosphate disodique	6,45 g
Phosphate monopotassique	2,0 g
Vert brillant	15 mg
Eau	qsp 1 L

Gélose glucosée biliée au cristal violet et au rouge neutre (gélose VRBG)

Peptone pepsique de viande	7,0 g
Extrait autolytique de levure	3,0 g
Glucose	10,0 g
Sels biliaires	1,5 g
Chlorure de sodium	5,0 g
Rouge neutre	30,0 mg
Cristal violet	2 mg
Agar agar bactériologique	13,0 g
Eau	qsp 1 L

#### Gélose nutritive

Extrait de viande	3,0 g
Digestat enzymatique de tissus animaux	5,0 g
Chlorure de sodium	5,0 g
Agar agar bactériologique	9,0 g
Eau	qsp 1 L

#### Gélose glucosée

Digestat enzymatique de caséine	10,0 g
Extrait de levure	1,5 g
Chlorure de sodium	5,0 g
Glucose	10,0 g
Pourpre de bromocrésol	15 mg
Agar agar bactériologique	9,0 g
Eau	qsp 1 L

#### Réactif à l'oxydase

Dichlorohydrate de <i>N, N, N', N'</i> -tétraméthyl- <i>p</i> -phénylène diamine	1,0 g
Eau	100 mL

## Protocole

### Étape 1

#### Pré-enrichissement en milieu non sélectif

- Une suspension mère (SM) est réalisée en ajoutant 10 mL de lait à 90 mL d'EPT.
- Introduire 10 mL de SM dans chacun des 3 tubes notés « 10<sup>0</sup> ».
- Introduire 1 mL de SM dans chacun des 3 tubes notés « 10<sup>-1</sup> » contenant 9 mL d'EPT.
- Ajouter 1 mL de SM dans 9 mL d'EPT et mélanger : on obtient la SM diluée au 1/10<sup>e</sup>.
- Introduire 1 mL de SM diluée au 1/10<sup>e</sup> dans chacun des 3 tubes notés « 10<sup>-2</sup> » contenant 9 mL d'EPT.
- Incuber 18 h ± 2 h à 37 °C.

### Étape 2

#### Enrichissement en milieu sélectif liquide

- Ensemencer chaque tube contenant 10 mL de bouillon EE avec 1 mL de chaque culture en EPT incubée.
- Incuber 24 h ± 2 h à 37 °C.

### Étape 3

#### Isolement et sélection pour confirmation

- Réaliser un isolement sur gélose VRBG à partir de chaque tube incubé.
- Incuber 24 h ± 2 h à 37 °C.
- Contrôler la présence de colonies présumées être des colonies d'*Enterobacteriaceae*.

### Étape 4

#### Confirmation biochimique

- À partir de chaque gélose, repiquer une colonie caractéristique sur gélose nutritive. Si aucune colonie caractéristique n'est présente, repiquer une colonie non caractéristique sur gélose nutritive ; en effet, certaines entérobactéries provoquent la décoloration du milieu ou de leurs colonies. Si la culture présente différents types de colonies, repiquer chaque type de colonies.
- Incuber 24 h ± 2 h à 37 °C.
- Pour chaque souche, rechercher l'oxydase. Si aucune coloration violette n'apparaît dans les 10 s, conclure le test oxydase négative.
- Pour chaque souche oxydase négative, mettre en évidence la fermentation du glucose : ensemencer la gélose glucosée par piqûre centrale et incuber 24 h ± 2 h à 37 °C. La souche utilise le glucose par voie fermentaire si le milieu est coloré en jaune.

### Étape 5

#### Interprétation statistique

#### Méthode du Nombre le Plus Probable (NPP)

- Un tube est considéré comme positif si la souche donne des colonies caractéristiques sur gélose VRBG, est oxydase négative et fermente le glucose.
- Déterminer le NPP :
  - . pour chaque dilution, affecter un chiffre de 0 à 3 correspondant au nombre de tubes positifs ;

- . former un nombre avec cette suite de 3 chiffres :
  - le 1<sup>er</sup> chiffre correspond à la dilution 10<sup>0</sup>,
  - le 2<sup>e</sup> chiffre correspond à la dilution 10<sup>-1</sup> et
  - le 3<sup>e</sup> chiffre correspond à la dilution 10<sup>-2</sup> ;
- . lire la valeur du NPP dans la table de Mac Grady (annexe 5).
- Calculer la concentration bactérienne :
  - . soit N en ufc d'*Enterobacteriaceae*.mL<sup>-1</sup>
  - . N = NPP/dilution correspondant au 1<sup>er</sup> chiffre
  - . N = NPP/10<sup>0</sup>

#### Données pour le dénombrement des *Enterobacteriaceae* dans le lait pasteurisé en fin de procédé de fabrication

- Plan d'échantillonnage
  - . nombre d'unités constituant l'échantillon : n = 5 ;
  - . nombre maximal de résultats pouvant présenter des valeurs comprises entre m et M, pour le nombre d'échantillons n réalisé : c = 2.
- Limites :
  - . critère fixé par arrêté : m < 1 UFC.mL<sup>-1</sup> ;
  - . seuil limite d'acceptabilité : M = 5 UFC.mL<sup>-1</sup>.
- Interprétations.

RÉSULTATS	QUALITÉ
Les valeurs des 5 unités de l'échantillon sont inférieures ou égales à m.	Satisfaisante
Les valeurs pour 1 ou 2 unités de l'échantillon sont comprises entre m et M et les valeurs pour les autres unités de l'échantillon sont inférieures ou égales à m.	Acceptable
Les valeurs observées pour 3 ou 4 ou 5 échantillons sont comprises entre m et M (c/n > 2/5).	Insatisfaisante
Au moins une valeur des 5 unités de l'échantillon est supérieure à M.	

#### Analyse du protocole et des résultats expérimentaux

[Une étude de cas est proposée fiche 6.5]

1. Schématiser le protocole opératoire du dénombrement des *Enterobacteriaceae* dans le lait pasteurisé selon la norme ISO 21528-1.
2. La suspension mère a été préparée en ajoutant 10 mL de lait à 90 mL d'eau peptonnée tamponnée. On obtient une dilution 10<sup>-1</sup>. Expliquer pourquoi les trois tubes dans lesquels on transfère trois volumes de 10 mL de cette dilution 10<sup>-1</sup> sont notés 10<sup>0</sup> (et non 10<sup>-1</sup>).
3. Expliquer l'intérêt de la mise en culture en bouillon EE.
4. Justifier l'utilisation du milieu VRBG pour le dénombrement des *Enterobacteriaceae*.
5. Présenter les résultats des dénombrements des *Enterobacteriaceae* dans le lait cru et dans le lait pasteurisé.
6. Interpréter les résultats du contrôle microbiologique.

Déterminer l'Activité Phosphatase Alcaline (APA) sur le lait en fin de procédé de fabrication selon la norme internationale (ISO 3356:2009 - FIL 63:2009).

### Principe

Le lait est incubé en présence d'un substrat de la phosphatase alcaline (PAL), le phénylphosphate disodique, en milieu alcalin. Si cette enzyme n'a pas été inactivée par le traitement thermique, la réaction libère du phénol. Après inactivation de l'enzyme et précipitation des protéines, on dose le phénol formé par le réactif de Gibbs (dibromo-quinone chlorimide) : la coloration bleue liée à la production de dibromo-indophénol est mesurée par photométrie à une longueur d'onde de 610 nm.

### Réactifs

NOM DU RÉACTIF	PRÉPARATION
Solution tampon de borate - hydroxyde de baryum pH 10,6 ± 0,1	A : dissoudre 25,0 g de $[\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8 \text{H}_2\text{O}]$ dans 500 mL d'eau distillée. B : dissoudre 11,0 g de $\text{H}_3\text{BO}_3$ dans 500 mL d'eau distillée. Chauffer A et B à 50 °C. Mélanger A et B puis refroidir rapidement à 20 °C. Ajuster le pH à 10,6 ± 0,1 par addition d'hydroxyde de baryum. Filtrer. Avant utilisation, diluer avec de l'eau distillée au 1/2.
Solution tampon de couleur I	Dissoudre 6,0 g de $\text{NaBO}_2$ (ou 12,6 g de $\text{NaBO}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ ) et 20,0 g de NaCl dans 1 L d'eau distillée.
Solution tampon de couleur II	Diluer au 1/10 <sup>e</sup> la solution tampon de couleur I.
Substrat tamponné	Dissoudre 0,1 g de $\text{Na}_2\text{C}_2\text{H}_5\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ dans 100 mL de solution tampon borate hydroxyde de baryum dilué.
Défécant zinc - cuivre	Dissoudre 3,0 g de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ et 0,6 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ dans 100 mL d'eau distillée.
Réactif de Gibbs : solution de 2,6-dibromoquinone chlorimide (BQC)	Dissoudre 40 mg ± 1 mg de $\text{C}_6\text{H}_2\text{Br}_2\text{ClNO}$ dans 10 mL d'éthanol à 96 % (v/v).
Solution de sulfate de cuivre	Dissoudre 0,05 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ dans 100 mL d'eau distillée.
Solution de NaOH à 0,5 mol/L	
Solutions étalons de phénol	Dissoudre 200 mg ± 2 mg de $\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}$ dans 100 mL d'eau. Diluer cette solution au 1/10 <sup>e</sup> . Utiliser cette solution pour préparer les solutions étalons de phénol contenant 2 µg, 5 µg, 10 µg et 20 µg de phénol par mL.

## Protocole

### Préparation de la gamme d'étalonnage

- Tous les tubes auront une composition comparable et seront traités de la même façon : 1 mL de solution étalon de phénol, 1 mL de solution de sulfate de cuivre, 5 mL de solution tampon de couleur II, 3 mL d'eau distillée et 0,1 mL de BQC.
- Mélanger. Laisser la coloration se développer 30 min à température ambiante.
- Mesurer  $A_{610}$  par rapport à un blanc réactif.

### Détermination

- Introduire 1 mL de lait dans deux tubes à essai. Utiliser l'un des deux tubes comme essai à blanc.
- Placer le tube à essai à blanc bouché dans l'eau bouillante pendant 2 min. Refroidir à température ambiante sous l'eau froide.
- Ajouter 10 mL de substrat tamponné dans chaque tube et incuber à 37 °C pendant 60 min.
- Placer les deux tubes dans l'eau bouillante pendant 2 min. Refroidir à température ambiante sous l'eau froide.
- Ajouter 1 mL de défécant zinc - cuivre dans chaque tube. Filtrer le contenu de chaque tube. Pipeter 5 mL de chaque filtrat dans un tube à essai.
- Ajouter dans chaque tube 5 mL de solution tampon de couleur I et 0,1 mL de solution BQC. Laisser la coloration se développer 30 min à température ambiante.
- Mesurer  $A_{610}$  de l'essai par rapport à l'essai à blanc.
- Si  $A_{610}$  de l'essai >  $A_{610}$  de la solution étalon de phénol la plus concentrée, recommencer la détermination en diluant l'échantillon de lait (utiliser comme diluant l'échantillon de lait porté à ébullition afin d'inactiver la PAL).

### Expression des résultats

- Calculer l'activité phosphatasique :  $a_p = 2,4 \times m \times fd$  avec :
  - $a_p$  : activité phosphatasique en  $\mu\text{g}$  de phénol par mL de lait ;
  - $m$  : masse de phénol en  $\mu\text{g}$  ;
  - $fd$  : facteur de dilution de l'échantillon pour essai.
- Exprimer le résultat d'essai à une décimale.

## Analyse du protocole et des résultats expérimentaux

[Une étude de cas est proposée fiche 6.5]

1. Écrire la réaction catalysée par la phosphatase alcaline.
2. Établir un tableau de préparation de la gamme étalon de phénol.
3. Retrouver le facteur 2,4 de la formule :  $a_p = 2,4 \times m \times fd$
4. Présenter les résultats obtenus.
5. Exploiter les résultats expérimentaux de la gamme d'étalonnage.
6. Convertir  $A_{610}$  de l'essai en  $\mu\text{g}$  de phénol en se référant à la courbe d'étalonnage.
7. Calculer l'activité phosphatasique en  $\mu\text{g}$  de phénol par mL de lait.
8. Interpréter le résultat de la détermination de l'APA.  
Donnée : limite supérieure acceptée pour le lait pasteurisé : 4  $\mu\text{g}$  de phénol par mL.
9. Conclure sur l'acceptabilité du procédé en prenant en compte les résultats du contrôle microbiologique et de la recherche de l'APA.