

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de L'enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Zian Achour de Djelfa
Faculté des Sciences de la Nature et de la vie
Département de Biologie

Mémoire de Fin d'Etudes en Vue de l'Obtention du Diplôme
Magister en Biologie

Option : Contrôle de la Qualité et Analyses alimentaires

Thème

**Contrôle de la qualité microbiologique et chimique des boissons
rafraichissantes sans alcool commercialisées dans la wilaya de
Djelfa**

Présenté par:

Mme CHENOUF Amal

Devant le jury

- Pr. CHOUKRI Ali, Professeur, Université Ziane Achour, Djelfa, Président
- Pr. YOUSFI Mohamed, Professeur, Université Amar Telidji, Laghouat, Examineur
- Dr. HAKEM Ahcène, Maître de Conférences (A), Université Ziane Achour, Djelfa, Examineur
- Pr. LAHRECH B. Mokhtar, Professeur, Université Ziane Achour, Djelfa, Rapporteur
- M. YABRIR Benalia, Maître-assistant (A), Université Ziane Achour, Djelfa, Co-Rapporteur

Promotion: 2011-2012

Dédicace

Je dédie se présent travail à:

Mes parents

Mon Mari

Ma petite

Mes sœurs et mes frères

Ma famille

Mes amis

Remerciement

Je tiens en premier à remercier Dieu le tout puissant pour la volonté, la santé et la patience qu'il m'a données durant la période d'étude.

Le travail a été effectué sous la direction de monsieur LAHRECH B. M.; professeur à l'université Zian Achour à Djelfa, je tiens à exprimer mon sentiment de gratitude et de dévouement à monsieur YABRJR B. Maître Assistant à l'université Zian Achour à Djelfa pour les conseils qu'il n'a cessés de me donner jusqu'à l'achèvement de mon travail.

Je tiens à remercier Mr CHOUKRJ A. d'avoir accepté de présider le jury, Mr YOUSFJ M., Mr HAKEM A. d'avoir accepté d'examiner ce travail.

J'exprime ma profonde gratitude à Mr KHJTRANJ A. enseignant associé à l'université Zain Achour pour son aide, Mr KHADDACH A. chargé du laboratoire de microbiologique et Mme ZEROUAL S. chef de département des analyses fines au laboratoire régional de CAQCE Alger.

Je tiens à remercier Mr BENMAJLOUD A. et CHENOUF N.

Sommaire	Page
Liste des abréviations.....	I
Liste des figures.....	III
Liste des tableaux.....	IV
Introduction	1
 Partie bibliographique	
Chapitre I Les boissons	
1- La filière en Algérie.....	3
2- Structure de la filière.....	3
3- Boissons Rafraîchissantes Sans Alcool.....	4
3-1 Les Boissons Gazeuses.....	5
3-1-1 Les limonades.....	5
3-1-2 Les boissons aux fruits carbonatées ou gazeuses.....	6
3-1-3 Les sodas.....	6
3-2 Les Boissons Plates.....	6
3-2-1 Boissons aux fruits.....	6
3-2-2 Boissons aromatisées.....	7
3-2-3 Sirops.....	7
3-2-4 Boissons énergétiques.....	7
3-2-5 Boisson à base de lait.....	7
3-3 Technologie des boissons.....	7
4- Jus de fruits.....	10
4-1 Les Pur Jus, obtenus à partir de fruits.....	10
4-2 Les Pur Jus, obtenus à partir de concentré.....	10
4-3 Les Jus de fruit concentré.....	11
4-4 Les Jus de fruits déshydratés.....	11
4-5 Les Nectars de fruits.....	11
4-6 Technologie des jus.....	11

4-7 Caractéristiques des jus de fruit.....	14
5-Etiquetage des BRSA.....	14
6- Composition et valeur nutritionnelle des jus.....	15
7- Aspects réglementaire.....	18
7-1 Norme française NF V 76-005 juillet 1986.....	18
7-2 Directive 93/77/CEE du conseil du 21 septembre 1993.....	19

Chapitre II Les édulcorants

1- Additif Alimentaire.....	20
2- Édulcorants.....	21
3- Classification des édulcorants.....	22
3-1 Les édulcorants nutritifs.....	22
3-2 Les édulcorants intenses (non nutritifs).....	23
3-2-1 Les édulcorants intenses d'origine naturelle.....	24
3-2-1-1 Edulcorants de nature peptidiques.....	24
3-2-1-2 Edulcorants de nature glucidiques.....	24
3-2-1-3 Édulcorant de structure diverses.....	25
3-2-2 Les édulcorants intenses d'origines chimiques (synthétiques).....	27
3-2-2-1 La saccharine.....	28
3-2-2-2 L'acésulfame de potassium.....	28
3-2-2-3 Cyclamate.....	29
3-2-2-4 L'aspartame.....	29
4- Les risques liés aux édulcorants.....	29
4-1 Notion de DJA.....	31
4-2 Evaluation du risque.....	31
4-3 Limites maximales d'utilisation des additifs alimentaires.....	31
4-4 Sécurité d'utilisation.....	31
4-5 Problème soulevés par l'emploi d'édulcorants intenses en alimentation humaine.....	32
4-5-1 La saccharine	32

4-5-2 Cyclamate.....	33
4-5-3 Aspartame.....	33
4-5-4 Risques pour les femmes enceintes.....	33
5- Réglementation des édulcorants.....	34
5-1 Textes réglementaires régissant les édulcorants.....	34
5-2 Bonnes Pratiques de Fabrication (BPF).....	35
5-3 Composition et procédures du Comité.....	37

Partie expérimentale

Chapitre III Matériel et méthodes

1- Objectifs.....	38
2-Echantillonnage.....	38
3-Protocole expérimental.....	39
4-Réactifs et produits chimiques	40
5-Milieus de culture.....	41
6-Appareillage et équipements.....	41
7- Analyses physicochimiques.....	43
7-1 Analyses qualitative et quantitative des édulcorants (Aspartame, acésulfame, saccharine et cyclamate).....	43
7-1-1 Principe.....	45
7-1-2 Préparation de l'échantillon.....	45
7-1-3 Procédure.....	45
7-2 Méthode de confirmation de présence de cyclamate.....	47
7-2-1 Principe.....	47
7-2-2 Préparation de l'échantillon.....	47
7- 2-3 Défécation.....	47
7-2-4 Dérivatisation.....	47
7-2-5 Conditionnement de la colonne.....	48
7-2-6 Préparation de standard.....	48
8- Analyse microbiologique.....	48

8-1 Préparation des dilutions.....	48
8-2 Recherche et dénombrement des (Coliformes totaux et fécaux)	48
8-2-1 But.....	49
8-2-2 Principe.....	49
8-2-3 Mode opératoire.....	49
8-2-3-1 Test de présomption.....	49
8-2-3-2 Test de confirmation.....	50
8-2-3-3 Lecture et interprétation.....	50
8-3 Recherche et dénombrement des Streptocoques fécaux.....	52
8-3-1 But.....	52
8-3-2 Principe.....	53
8-3-3 Mode opératoire.....	53
8-3-3-1 Test de présomption.....	53
8-3-3-2 Test de confirmation.....	53
8-3-3-3 Lecture et interprétation.....	54
8-4 Recherche et dénombrement des Anaérobies Sulfito-Réducteurs.....	55
8-4-1 But	55
8-4-2 Principe.....	55
8-4-3 Mode opératoire.....	55
8-4-4 Lecture et interprétation.....	56
8-5 Recherche et dénombrement des Levures et Moisissures.....	56
8-5-1 But.....	56
8-5-2 Principe.....	56
8-5-3 Mode opératoire.....	57
8-5-4 Lecture et interprétation.....	57
8-6 Interprétation et réglementation.....	58
9-Analyses statistiques.....	58
9-1 Analyses descriptives univariées.....	58
9-2 Analyse inférentielle.....	58

9-3 Analyses exploratoires multivariées.....	58
--	----

Chapitre IV Résultats et discussions

1- Qualité chimique des boissons rafraichissantes	60
1-1 Composition moyenne des boissons rafraichissantes.....	60
1-2 L'acésulfame K.....	61
1-3 L'aspartame.....	63
1-4 La saccharine.....	65
1-5 Le cyclamate.....	67
1-6 Conformité des échantillons.....	68
2- Qualité microbiologique des boissons rafraichissantes.....	69
3- Profils chimique et microbiologique de boissons rafraichissantes.....	75
Conclusion	83

Références bibliographiques

Annexe

Liste des abréviations

ACP:	Analyse en Composante Principale
AFNOR:	Association Française de Normalisation
Ala:	Alanine
ASP:	Aspartame
AUFS:	Absorbance Units Full Scale
BPF:	Bonne Pratique de Fabrication
BRSA:	Boissons Rafrâchissantes Sans Alcool
CE:	Communauté Européenne
CRP:	Centre Romand de Pasteurisation
Da:	Dalton
°Brix:	Degré Brix
°F:	Degré Faraday
DES:	Dose Sans Effet
DJA:	Dose Journalière Admissible
DLUO:	Date de Limite d'Utilisation Observée
DNA:	Désoxyribonucléique Acide
EDTA:	Ethylène Diamine Tétra Acétique
E:	Europe
e:	échantillon
EFSA:	Autorité Européenne de Sécurité des Aliments
E.P.E.I:	Eau Peptoné Exempte d'Indole
FAO:	Food and Agriculture Organisation
CLHP:	Chromatographie Liquide Haute Performance
INRA:	Institut Nationale d'Agronomie
ISO:	Organisation internationale de Standardisation
J.E.C.F.A:	Joint Expert Comitée for Food Additives
JORA:	Journal Officiel Algérien
JORUE:	Journal Officiel de l'Union Européenne
JORT:	Journal Officiel Tunisien
Kcal:	Kilos Calories
KJ:	Kilos Joule
LMR:	Limite Maximale de Résidus
NF:	Norme Française
N.P.P:	Nombre Plus Probable
OGA:	Oxytétracycline Gélose Agar
OMS:	Organisation Mondiale de Santé
PEEK:	Polyetheretherketone
Phe:	Phénylalanine
pH:	potentiel d'Hydrogène
ppm:	Partie par million
SCF:	Comité Scientifique de l'Alimentation
SM:	Spectre de Masse
Sm:	Solution mère
ST:	Solution Standard
T.H.F:	Tetrahydrofurane
TSE:	Trypton Sel Eau
U:	Unité
Ufc:	Unité formant colonies

UE: Union Européenne
UV: Ultraviolet
μ: Micro
VF: Viande Foie
VRBL: Bouillon Lactosé Bilié au Vert Brillant

Liste des figures	Page
Figure 1: Structure de la filière boisson.....	4
Figure 2: Technologie des boissons.....	9
Figure 3: Exemple d'organigramme simple pour la transformation du jus.....	13
Figure 4: Structure chimique des édulcorants intenses.....	23
Figure 5: Schéma du protocole expérimentale.....	39
Figure 6: Photo de l'HPLC utilisées.....	44
Figure 7: Répartition des valeurs de l'acésulfame K dans les BRSA.....	61
Figure 8: Diagramme de distribution de l'acésulfame dans les différents échantillons.....	62
Figure 9: Répartition des valeurs de l'aspartame dans les BRSA.....	63
Figure 10: Diagramme de distribution de l'aspartame dans les différents échantillons.....	64
Figure 11: Répartition des valeurs de la saccharine dans les BRSA.....	65
Figure 12: Diagramme de distribution de la saccharine dans les différents échantillons.....	66
Figure 13: Répartition des valeurs du cyclamate dans les BRSA.....	67
Figure 14: Diagramme de distribution du cyclamate dans les différents échantillons.....	68
Figure 15: Conformité des BRSA.....	69
Figure 16: Qualité microbiologique des échantillons.....	73
Figure 17: Représentation des cinq variables actives sur le premier plan de l'ACP..	76
Figure 18: Projection des boissons BRSA sur le plan factoriel (1x2).....	77
Figure 19: Dendrogramme de la classification hiérarchique des boissons.....	78
Figure 20: Projection des individus de la classe 1.....	79
Figure 21: Projection des individus de la classe 2.....	80
Figure 22: Projection des individus de la classe 3.....	81
Figure 23: Projection des individus de la classe 4.....	82

Liste des tableaux	Page
Tableau 1: Produits BRSA en Algérie	5
Tableau 2: Compositions et valeurs nutritionnelles et énergétiques moyennes de quelques boissons gazeuses pour 100 ml	16
Tableau 3: Valeurs nutritionnelles moyennes de boissons à base de fruits et de légumes pour 100 ml	16
Tableau 4: Propriétés des principaux polyols.....	23
Tableau 5: Les édulcorants intenses naturels	26
Tableau 6 : Les édulcorants intenses chimique (synthétique).....	27
Tableau 7: Pouvoir sucrant, DJA des édulcorants intenses autorisés dans l'UE	30
Tableau 8: Limites d'utilisation des édulcorants (mg/l)	36
Tableau 9: Limites d'utilisation des édulcorant CEE.....	36
Tableau 10: Composition moyenne des BRSA.....	60
Tableau 11: Résultats des analyses microbiologiques effectuées.....	70
Tableau 12: Etude des corrélations.....	77
Tableau 13: Caractéristiques des classes des boissons issues de la classification hiérarchique.....	78

Introduction

Avec le développement de la population, la demande en denrée est plus importante et c'est pour cela que le secteur industriel de l'alimentaire est en constante expansion notamment dans le secteur des boissons. En effet, malgré que l'eau soit le seul liquide indispensable à notre organisme, d'autres boissons telles que les jus de fruits et les sodas permettent d'associer besoins en eau et plaisirs.

Les fabricants de boissons non alcoolisées s'emblent monter en flèche et innover à tout bout de champ. Qu'il s'agisse d'eaux minérales gazeuses ou non gazeuses, d'eaux contenant des arômes supplémentaires, de mélanges de jus de fruits-eau minérales gazeuses, de variantes de jus de fruits, de boissons énergétiques, de cocas, de sirops, de tisanes aux herbes ou aux fruits, ou encore de thés glacés, de boissons saisonnières pour enfants, de boissons au soja ou à base de petit lait, la variété des produits et par conséquent aussi celle des goûts sont apparemment sans limite.

Les boissons gazeuses, les boissons aux fruits et les jus de fruits contiennent tous des quantités semblables de glucides, ou de sucre. Ils peuvent tous fournir une somme considérable de calories s'ils sont consommés en grandes quantités. La différence, c'est l'avantage que procurent le lait et le jus sur le plan de la nutrition par rapport aux boissons gazeuses et aux boissons aux fruits.

Les boissons gazeuses et les boissons aux fruits ont peu de valeur nutritive. Dans trop de cas, elles remplacent, dans le régime alimentaire, des boissons meilleures pour la santé telles que l'eau, le lait et les jus de fruits à 100 % purs.

Il est en croissance constante. La consommation de boissons gazeuses, dans tous les pays augmente. L'engouement pour cette forme de rafraîchissement est dû à son goût unique, aux bulles générées par l'ajout de CO₂ (gaz carbonique) et à la promotion massive et internationale faite par les grandes marques. Par ailleurs, la demande est importante en goûts nouveaux.

Le consommateur cherche toujours un produit sain, de bonne qualité chimique et microbiologique; une boisson édulcorée doit respecter les normes dans les doses et dans la qualité d'édulcorant utilisé qui doit être autorisé. Elle doit respecter les normes aussi dans les autres caractéristiques physicochimiques (acidité, teneur, l'extrait sec...).

Ce travail permet d'étudier la qualité des boissons édulcorées, la qualité chimique par analyse qualitative et quantitative des édulcorants par une chromatographie liquide haute performance.

La qualité microbiologique qui permet de dénombrer les coliformes et les coliformes fécaux, les streptocoques fécaux, les anaérobies sulfitoréducteurs, levures et moisissures.

Les édulcorants posent un grand problème à la santé des consommateurs, les mauvaises utilisations de ces substances cause le développement des maladies cancérogéniques, notre analyse permet de voir une idée sur les risques, qui peuvent toucher notre consommateur et d'étudier le degré de respects des conditions hygiéniques au niveau des industries des boissons.

Ce travail est scindé en deux parties:

La première partie de la recherche bibliographique

- Chapitre 1 les boissons édulcorées qui portera sur les différents types de boisson édulcorée
- Chapitre 2 sur les édulcorants; classification et intérêt d'utilisation

La deuxième partie de matériel et méthodes

- Chapitre 3 sur la méthode utilisée pour analyser le produit, chimiquement par (CLHP) et microbiologiquement, plus une partie d'étude statistique par la méthode d'analyse en composante principale (ACP).
- Chapitre 4 sur les résultats les interprétations de ces analyses.

Chapitre I

Les boissons

1- La filière en Algérie

Selon BOUDRA (2010) La filière des boissons gazeuses et jus de fruits algérienne confirme sa bonne santé, avec un bilan 2008 encourageant pour le secteur de l'agroalimentaire. Le secteur a produit près de 20 millions d'hectolitres, et réalisé un chiffre d'affaire de 45 milliards de DA. Selon un expert présent à la réunion mercredi d'Optimexport et d'Algex pour promouvoir les produits algériens à l'international, "la filière se porte bien et dispose d'un réel potentiel à l'exportation". Les boissons gazeuses représentent 41% de la production nationale, au même titre que les eaux minérales et eaux de sources qui représentent également 41%, alors que les jus de fruits ne constituent que 6% de cette production. La consommation moyenne des boissons rafraîchissantes sans alcool (BRSA) sur le marché national est passée de 35 litres par habitant et par an en 2005 à 49l/hab/an en 2007. "La marge de progression des jus de fruits et des boissons plates est la plus importante, en terme de chiffre d'affaires, avec une hausse annuelle de 30%, suivie des eaux embouteillées avec 15% et les boissons gazeuses de 2 à 5%". Par ailleurs, l'Algérie reste le plus grand marché, en terme de volume, représentant près de 43% du marché maghrébin".

2- Structure de la filière

La filière Boissons est classée par les spécialistes comme fournissant des «produits alimentaires d'accompagnement», et appartenant au secteur des industries de deuxième transformation. Si cette filière est marquée par une forte intensité capitaliste, elle dégage aussi des marges brutes d'exploitation très positives. Cette forte intensité capitaliste est due en grande partie au processus d'embouteillage, étape clé de la chaîne de valeur de la filière. Il est en outre le seul point commun aux différentes sous filières. La recherche et développement (R&D) et l'adaptation constante et continue des produits à l'évolution des goûts des consommateurs constituent aussi des facteurs distinctifs de la filière dans le cadre de la branche des Industries Agroalimentaires. Les sous filières les plus sensibles à ce facteur de création et d'innovation dans les nouveaux produits ou de nouvelles caractéristiques de produits sont les suivantes:

- les Boissons Gazeuses
- les Jus et Nectars de Jus

- les Boissons Alcoolisées (Bières et Vins) (figure 1).

Chacune de ces sous filières est représentée par des couples produit-marché d'une part, mais aussi par des facteurs exogènes comme les réglementations, qui en font toute l'homogénéité, mais qui les rendent également très peu dépendantes des autres sous filières (BODIN *et al.*, 2005).

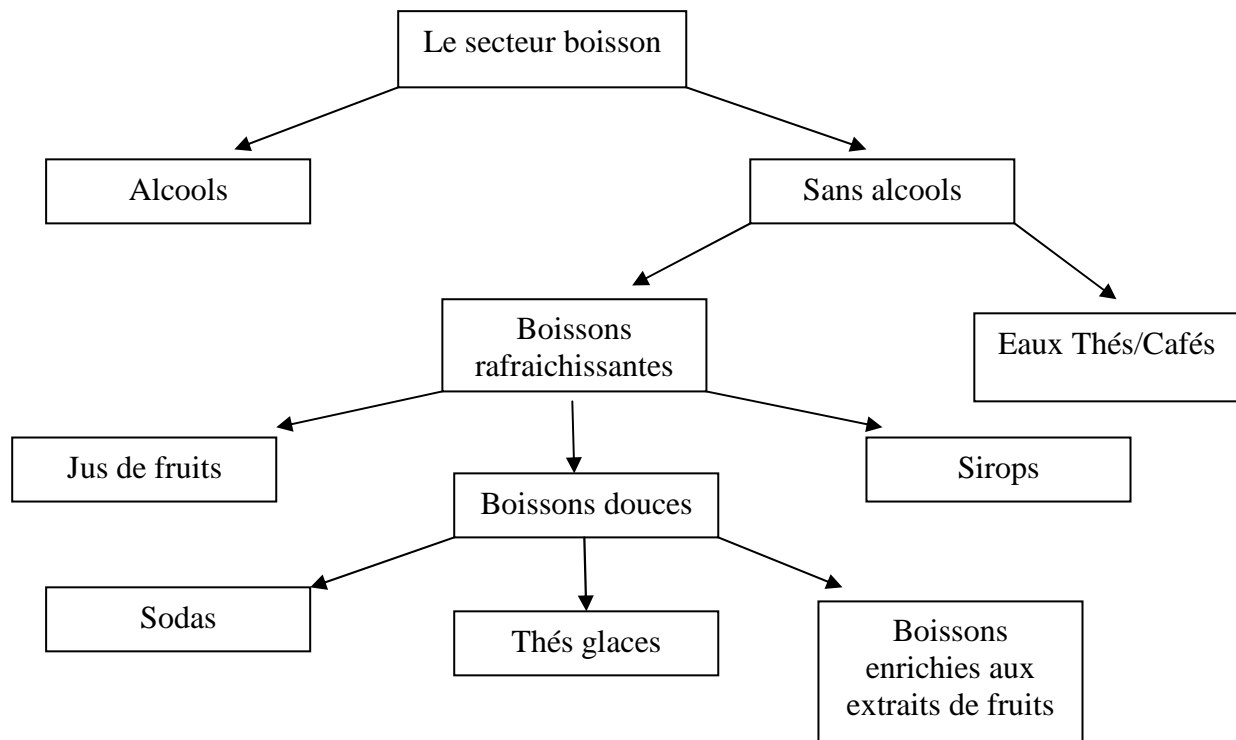


Figure 1: Structure de la filière boisson (GOUDOT et LAKHDARI, 2003).

3- Boissons Rafraîchissantes Sans Alcool

Sur le plan technico-commercial, en se basant sur les pratiques et les typologies internationales, nous pouvons distinguer 4 types de produits pour les boissons rafraîchissantes sans alcool (BRSA):

Les boissons gazeuses, les jus de fruits, les boissons plates et les eaux embouteillées (BOUDRA, 2007).

Le tableau suivant tente d'établir les correspondances entre la nomenclature algérienne des activités et les appartenances usuelles des différents produits de la catégorie BRSA (selon les standards de la profession dans le monde).

Tableau 1: Les produits BRSA en Algérie

Classes	Classe 15.3.1: préparation de jus de fruit et légumes	Classe 15.9.6: Industrie des eaux de table	Classe 15.9.7: Productions de boissons rafraîchissantes
Produits de la catégorie BRSA	<ul style="list-style-type: none"> -Les pur jus, obtenus à partir de fruits -Les pur jus, obtenu à partir de concentrés -Les jus de fruits concentrés -Les nectars de fruits -Les jus de fruits déshydratés 	<ul style="list-style-type: none"> -Les eaux embouteillées -Les eaux minérales naturelles -Les eaux de sources -Les eaux ne respectant pas les caractéristiques des eaux de source et eaux minérales <p>Cette catégorie n'est pas encore instituée par la réglementation qui se limite aux eaux minérales et eux de sources</p> <ul style="list-style-type: none"> -Les eaux aromatisées sont fabriquées par adjonction d'arome de fruit à base d'essence sans sucre. 	<p>Cette catégorie regroupe :</p> <ul style="list-style-type: none"> a)- Les boissons gazeuses -Les limonades -Les boissons aux fruits carbonatées ou gazeuses (type Orangina et N'GAOUS) -Les sodas : les colas, les tonics, les bitters b)- Les boissons plates -Boissons aux fruits -Boissons aromatisées -Sirops -Thés glacés -Boissons énergétiques -Boissons à base de lait

Source (BOUDRA, 2007).

3-1 Les Boissons Gazeuses

Les boissons gazeuses font partie des boissons non alcoolisées, non fermentées ou ne comportant pas, à la suite d'un début de fermentation, de traces d'alcool supérieures à 0,5 % (BOUDRA, 2007). On retrouve dans cette famille :

3-1-1 Les limonades

D'après BOUDRA (2007) l'appellation limonade est réservée aux boissons gazéifiées, sucrées, limpides et incolores, additionnées de matières aromatiques ou sapides provenant du citron et éventuellement d'autres hespéridés, acidulées au moyen des acides citriques, tartriques ou lactiques. L'emploi de sucre et de sirop de glucose comme édulcorants ainsi que d'acides ascorbiques et phosphoriques sont autorisés.

La limonade à la caféine ne doit pas présenter une teneur en caféine supérieure à 150mg par litre. La limonade à la quinine ne doit pas présenter une teneur en quinine supérieure à 80mg par litre, calculée en hydrochlorure de quinine (JORT, 2006).

3-1-2 Les boissons aux fruits carbonatées ou gazeuses

Ce sont des boissons préparées à partir d'eau potable et de jus de fruits, jus de fruits concentrés, fruits ou un mélange de ces composants dans une proportion égale ou supérieure à 10 % et inférieure à 25% de jus (BODIN *et al.*, 2005).

3-1-3 Les sodas

La dénomination est réservée aux boissons gazeuses constituées d'eau et de gaz carbonique additionnés de jus de fruits ou concentré de fruits ou pulpe de fruits ou extraits naturels de fruits et généralement de sucre (FREDOT, 2005). Le même auteur (2005), les classe en trois groupes:

- **Sodas colas** : ils subissent l'adjonction d'extraits de plantes. Ils existent avec caféine (15 mg/100 ml) ou sans caféine. Le colorant utilisé est le caramel. Exemples: Coca-cola, Pepsi-Cola.

- **Sodas tonics** : ils sont fabriqués à partir d'eau gazéifiée, d'huiles essentielles d'agrumes ou d'extraits de végétaux. Exemples : Fanta, Sprite.

- **Sodas bitters** : bitter signifie amer en anglais, ils sont fabriqués à partir de jus d'agrumes ou d'extraits d'agrumes ou de végétaux. Exemples: Schweppes.

3-2 Les Boissons Plates

Traditionnellement incluses, en Algérie, dans la famille des jus de fruits, les boissons plates intègrent les boissons aux fruits ne respectant pas les caractéristiques des jus de fruits. Sont compris dans cette classe les boissons aux fruits, les boissons aromatisées; ainsi que les

sirops, les thés glacés, les boissons énergétiques et les produits à base de lait (BOUDRA, 2007).

3-2-1 Boissons aux fruits

La dénomination est réservée aux boissons préparées à partir d'eau potable et de jus de fruits, jus de fruits concentrés, fruits ou un mélange de ces composants dans une proportion égale ou supérieure à 25% de jus (BOUDRA, 2007).

3-2-2 Boissons aromatisées

Cette dénomination est consacrée aux boissons ne comprenant pas de jus de fruits. Elle est composée d'eau, sucre, émulsion, arôme naturel ou artificiel, antioxydant, conservateur, colorants, acide, épaississant...

Cette catégorie est, de par sa composition et les besoins nutritifs, plus proche des sodas (sans gaz) ou des mélanges eau + sirop, que des jus de fruits. L'absence de réglementation et le manque de maturité du marché entretiennent jusqu'à présent ces confusions (BOUDRA, 2007).

3-2-3 Sirops

Ce sont des solutions concentrées et aromatisées obtenus par dissolution de matière glucidiques dans de l'eau. Leur forte teneur en sucre (600 g/l) diminue l'activité de l'eau et assure ainsi une longue conservation. Leur reconstitution se fait de la manière suivante: un volume de sirop pour 7 volumes d'eau soit 10 à 15 % de glucides une fois reconstitué. Ils peuvent contenir :

- des colorants;
- des extraits naturels de fruits ou de plantes (ex : menthe);
- des additifs (ex : l'acide citrique) (FREDOT, 2005).

3-2-4 Boissons énergétiques

Ces boissons sont constituées d'eau, de sucre, de vitamines (C, B1, B2), de caféine, d'acides aminés (L-Phénylalanine) (BOUDRA, 2007).

3-2-5 Boisson à base de lait

Ces boissons sont constituées de lait écrémé en général, de sucre, de stabilisant, d'aromatisant et de fruits (BOUDRA, 2007).

3-3 Technologie des boissons

L'eau potable doit subir en premier temps une déminéralisation et une étape de polissage, le produit doit être aromatisé par l'addition des concentrés aromatiques, on peut ajouter dans cette étape l'acide citrique ou des colorants. Une étape d'édulcoration est importante où elle se fait soit par l'ajout de vrai sucre le saccharose sous forme de sirops, ou par l'addition des édulcorants synthétiques (l'acésulfame K, l'aspartame...). Pour assurer une longue durée de conservation de ce produit, il doit subir une flash pasteurisation à une température de 70°C pendant 30 secondes. Ensuite le produit doit être refroidi à une température de 11°C. La gazéification doit se réaliser à une pression de 275-550 KPa. Enfin l'embouteillage se fait en verre ou en plastique, en assurant le respect de l'étiquetage des boissons avec toutes les informations nécessaires (la date de péremption, la composition et les noms des additifs utilisés, le nom de fabricant...). Le produit peut être entreposé à une température ambiante. Les étapes de cette technologie sont résumés par le diagramme de fabrication illustré par la figure suivante.

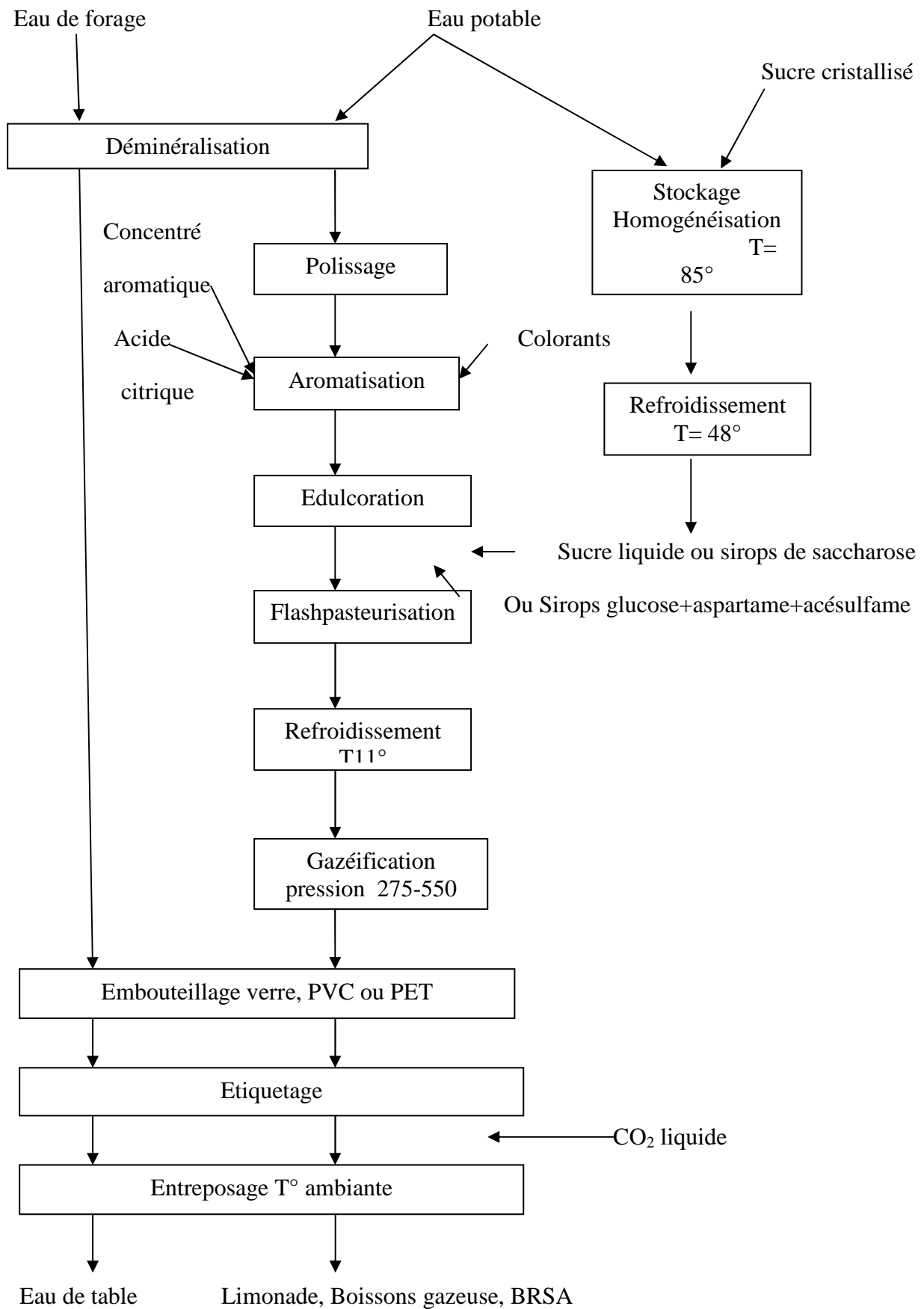


Figure 2: Technologie des boissons (CIIA, 2010).

4- Jus de fruits

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

Certains jus peuvent être obtenus à partir de fruits comprenant des pépins, graines et peaux qui ne sont pas habituellement incorporés dans le jus, bien que des parties ou composants de pépins, de graines et de peaux impossibles à retirer par des bonnes pratiques de fabrication (BPF) soient acceptés. Le jus est obtenu par des procédés adaptés qui conservent les caractéristiques physiques, chimiques, organoleptiques et nutritionnelles essentielles des jus du fruit dont il provient. Le jus peut être trouble ou clair et peut contenir des substances aromatiques et des composés volatils restitués, à condition qu'ils proviennent des mêmes espèces de fruits et soient obtenus par des moyens physiques adaptés. De la pulpe et des cellules obtenues par des moyens physiques adaptés à partir du même type de fruits peuvent être ajoutées.

Un jus simple est obtenu à partir d'un seul type de fruit. Un jus mélangé est obtenu en mélangeant deux ou plusieurs jus ou jus et purées obtenus à partir de différents types de fruits (CODEX STAN 247, 2005).

Dans la sous filière des Jus de fruits, on retrouve 5 familles:

4-1 Les Pur Jus, obtenus à partir de fruits

C'est un jus obtenu à partir de fruits par des procédés mécaniques, fermentescibles mais non fermenté, possédant la couleur, l'arôme et le goût caractéristiques du fruit dont il provient. Les jus de fruits frais ne subissent pas de traitement thermique (BODIN *et al.*, 2005).

4-2 Les Pur Jus, obtenus à partir de concentré

Le produit est obtenu en remettant dans le jus de fruits concentré l'eau extraite lors de la concentration, en restituant les arômes et, le cas échéant, les pulpes et les cellules.

L'eau ajoutée doit présenter des caractéristiques appropriées, notamment du point de vue chimique, microbiologique et organoleptique, de façon à garantir les qualités essentielles du jus. Le produit ainsi obtenu doit présenter des caractéristiques organoleptiques et analytiques

au moins équivalentes à celles d'un type moyen de jus obtenu à partir de fruits de la même espèce (JORCE, 2001).

4-3 Les Jus de fruit concentrés

C'est le produit obtenu à partir de fruits, par l'opération de l'élimination physique d'une quantité déterminée de l'eau de constitution. Lorsque le produit est destiné à la consommation directe, la concentration est d'au moins 50%.

4-4 Les Jus de fruits déshydratés

C'est le produit obtenu à partir de jus de fruits par élimination physique de la quasi-totalité de l'eau de constitution. La restitution des composants aromatiques est obligatoire (BODIN *et al.*, 2005).

4-5 Les Nectars de fruits

C'est le produit non fermenté mais fermentescible, obtenu par addition d'eau et de sucres au jus de fruits concentré, à la purée de fruit concentrée ou à un mélange de ces produits, et dont la teneur minimale en jus, éventuellement en purée, et l'acidité minimale sont fixés à :

- 25 à 50 % de teneur minimale en jus

- 4 et 9 g/l d'acidité (exprimé en acide tartrique) (BOUDRA, 2007).

4-6 Technologie des jus

Trois étapes sont essentielles dans la technologie des jus (figure 3):

La première étape est la préparation des fruits, les fruits utilisés doivent être propres et exempts de pourriture. Les salissures peuvent être lavées avant le broyage, pour autant que le pressoir ne soit pas équipé d'un système de lavage. Les fruits déclassés ou abîmés convenant encore au pressurage seront brièvement stockés dans des emballages rigides (pas de sacs) et dans un endroit le plus frais possible (CRP, 2000).

Ensuite le fruit doit subir un pressurage. Différentes conceptions de pressoirs existent sur le marché. Elles entraînent des résultats variables au niveau du rendement en jus et de la rapidité du pressurage. Chaque installation nécessite, pour un bon fonctionnement, une quantité minimale de fruits. Cette nécessité obligera parfois de mélanger la récolte de plusieurs fournisseurs de fruits pour une pression. Dans tous les cas, les fruits sont broyés et la pulpe est pressée afin d'en extraire le jus (CRP, 2000).

Enfin vient étape importante de la conservation des jus, pour laquelle, la plupart des jus sont:

- soit pasteurisés ou soumis à un traitement qui produit une élévation de la température préjudiciable aux éléments fragiles;
- soit simplement mis en vitrine réfrigérée avec une date limite de vente plus courte mais ils sont alors susceptibles d'engendrer des fermentations néfastes au goût et à la santé.

Dans les deux cas, la dénomination «jus de fruit frais» ou «pur jus de fruit» ne correspond pas à la qualité réelle du produit proposé (BENAICHE, 2000).

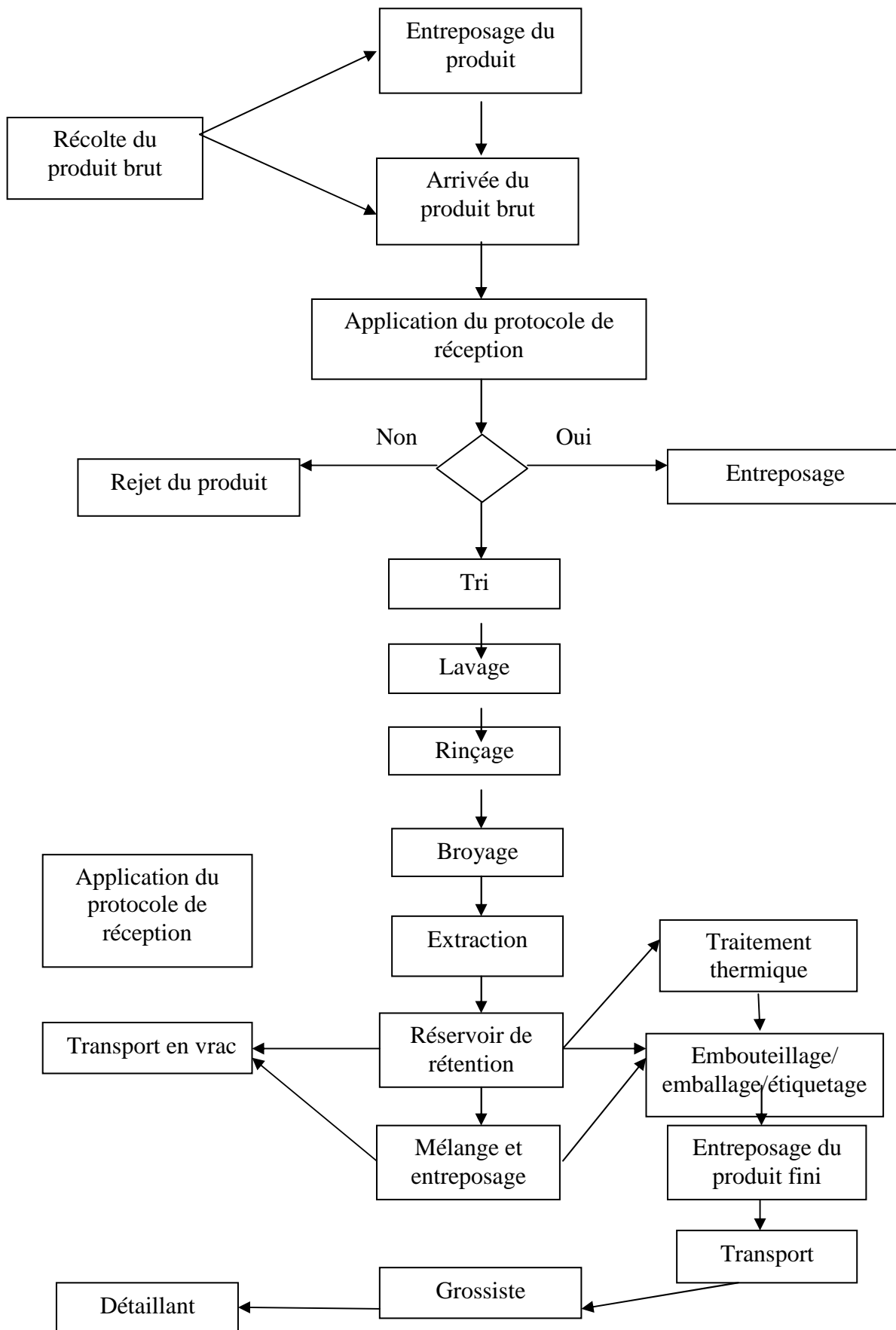


Figure 3: Exemple d'organigramme simple pour la transformation du jus (JACKSON, 2001)

4-7 Caractéristiques des jus de fruit

Le jus de fruits doit avoir les caractéristiques essentielles de composition et de qualité suivantes:

- l'ajout d'un ou plusieurs des sucres solides est autorisé et, dans le cas de jus reconstitué, d'autres sucres peuvent être utilisés. Cet ajout ne doit pas dépasser 100 g/kg, sauf pour certains fruits très acides pour lesquels une proportion de 150 g/kg est autorisée. L'addition de sucres n'est pas autorisée quand le jus a été acidifié;

- La teneur en matière sèche soluble du produit, à l'exclusion des sucres d'ajout, ne doit pas être inférieure à la valeur correspondant à la teneur en matière sèche soluble du fruit mur déterminée par réfractomètre à 20 °C sans correction pour l'acidité, exprimée en °Brix;

- La teneur en éthanol ne doit pas dépasser 5 g/kg;

- Le produit doit présenter la couleur, l'arôme et la saveur caractéristiques du fruit à partir duquel le jus est obtenu. Les constituants volatils naturels peuvent être restitués à tout jus obtenu du même type de fruits que celui auquel les constituants volatils naturels ont été enlevés;

- L'addition de vitamines et de minéraux peut être autorisée conformément à la législation en vigueur et il est aussi permis de mélanger différents jus ou purées de fruits (JORT, 2006).

5- Etiquetage des BRSA

Outre les dispositions générales relatives à l'étiquetage mentionnées dans la réglementation en vigueur, l'étiquette doit comporter les indications spécifiques suivantes:

Le nom et la nature de boisson « boisson gazeuse », « aromatisée » ou « jus »

Le nom du produit à déclarer sur l'étiquette doit être « jus de x » ou « jus pulpeux de x », où x représente le nom courant du fruit à partir du quel le jus a été obtenu.

La dénomination spécifique d'un jus de fruits constitué de plusieurs espèces de fruits doit en faire ressortir clairement la nature des fruits utilisés.

Les noms de fruits doivent être cités dans la dénomination selon l'ordre pondéral décroissant.

Les dénominations «jus de fruits» ou toute autre dénomination contenant ces mots peuvent être accompagnés de l'un des qualificatifs suivants:

* « Frais », si le jus n'a subi aucun traitement physique ou de stabilisation tel que filtration, collage ou pasteurisation.

* « Pur », si le jus n'a subi aucune addition d'une matière quelconque autorisé.

* « Sucré», Si la quantité du sucre (s) d'ajout est supérieure à 15 gramme/kilogramme,

l'expression « additionné de x » doit figurer bien en évidence à côté du nom du produit, où « x » représente le(s) nom(s) du (des) sucre(s) d'ajout ou l'expression « sucré(s) » (JORT, 2006).

6- Composition et valeur nutritionnelle des BRSA

Chez l'homme, le besoin en eau est un besoin vital puisque la diète hydrique maximale supportée par l'organisme est de 7 jours. En moyenne, nous perdons 2.5 à 3 L d'eau par jour ce qui nous oblige pour conserver notre poids et nos fonctions vitales à en consommer au moins autant (FREDOT, 2005).

Les apports nutritionnels conseillés en eau sont par conséquent de 2.5 à 3 L par jour et les boissons participent à plus de la moitié dans la couverture de ce besoin indispensable (soit 1 à 1.5 L par jour). Les autres sources en eau correspondent à l'eau que nous consommons par l'intermédiaire des aliments (qui représente environ 1L par jour) et celle produite par notre organisme au travers de différentes réactions chimiques (soit environ 0.3 L par jour).

Les boissons permettent donc d'étancher la soif mais on les consomme aussi pour:

-leur gout: sucré, acidulé...;

-leur qualité thermique: chaleur, fraîcheur;

-leurs qualités visuelles: limpidité, clarté, brillance;

-leurs apports en minéraux: les boissons participent à la couverture de certains minéraux tels que le calcium, le fer, le magnésium, le fluor ou le cuivre (FREDOT, 2005).

Les jus de fruits frais et les purs jus de fruits sont exclusivement obtenus par des moyens mécaniques et sont donc des aliments qui contiennent tous les éléments nutritifs des fruits excepté les fibres qui sont le plus souvent en teneur réduite. Les boissons et les jus apportent donc l'eau, les glucides, les vitamines, les minéraux et les constituants « non nutritifs » des fruits (polyphénols, caroténoïdes, flavonoïdes, limonènes, terpènes,...) (tableaux 2 et 3) (LECERF, 2001).

Tableau 2: Composition et valeurs nutritionnelle et énergétiques moyennes de quelques boissons gazeuses pour 100 ml.

Composants	Limonade	Soda au cola	Soda au cola aux édulcorants	Soda aux fruits
Eau	90.5	90	99.8	89
Protéines (g)	-	-	-	-
Lipides (g)	-	-	-	-
Glucides (g)	9.5	10	-	11
VE(KJ)	160	170	1	190
Na (mg)	3	9	5	10

- : négligeable

Source (FREDOT, 2005).

Tableau 3: Valeurs nutritionnelles moyennes de boissons à base de fruits et de légumes pour 100 ml

Composants	Jus de fruits	Jus de fruits à base de concentré	Nectar de fruits	Jus de légumes
Protéines(g)	N	N	N	N
Lipides(g)	N	N	N	N
Glucides(g)	12	10	20	5
VE(KJ)	200	170	220	85
Na (mg)	1	1.5	2.5	160
K (mg)	35	150	85	250

Ca (mg)	10	10	5	20
Vitamine (mg)	5-50	20	10	10
Carotène (mg)	15-330	20	70	6015

N : Négligeable

Source (FREDOT, 2005).

Le seul apport énergétique est représenté par les glucides dont la teneur varie de:

- 10 à 17% pour les jus de fruits;
- 20% pour les nectars;
- 10 à 12% pour les autres boissons aux fruits;
- 5% pour les jus de légumes.

Les sucres ajoutés sont du glucose, du fructose ou du saccharose selon le pouvoir sucrant recherché.

Les jus de fruits sont aussi source de:

- Vitamine C: les teneurs sont variables d'autant plus si les boissons sont à teneur garantie en cette vitamine;
- Potassium;
- Carotènes: là encore, les teneurs sont très variables selon le jus concentré;
- Calcium;
- Acide folique (FREDOT, 2005).

Un excès de consommation de boisson sucrée peut avoir des conséquences fâcheuses.

C'est pourtant ce que nous pouvons observer chez les jeunes qui, d'ailleurs confondent souvent jus d'orange avec boisson aux fruits. Cette confusion est peut-être le fruit d'une mauvaise information, mais également celui de l'impact médiatique des aliments santé. Chez les jeunes en particulier, la première conséquence et la plus évidente est l'obésité. Cependant pour des consommations raisonnables le risque d'obésité n'est pas démontré même

pour du soft drink. Le risque de caries dentaires est lui aussi attribué à la consommation de boissons sucrées même si les aliments solides ont plus tendance à adhérer à la dent et donc à générer ce type de problème.

L'abondance dans ces boissons de fructose et de saccharose a un effet inducteur sur les enzymes hépatiques de la lipogénèse. A long terme, leur consommation abondante aggraverait

L'hypertriglycéridémie et l'hypercholestérolémie. Le syndrome d'hyperactivité chez l'enfant avec trouble de l'attention est souvent attribué à une consommation excessive de sucre et aussi d'aspartame. A l'heure actuelle aucune étude ne le démontre. La diarrhée bénigne du nourrisson peut être attribuée à la consommation excessive de boisson contenant un excès de fructose (GRANDAZZI, 2002).

7- Aspects réglementaires des boissons

S'agissant de la réglementation on peut noter:

- La faiblesse, voire même l'absence pour certains segments d'activité, de réglementation des conditions et des normes d'hygiène dans les processus de fabrication, d'étiquetage et de conservation des produits; ce qui impliquent des dangers pour la santé des consommateurs;
- L'insuffisance de normes nationales et de références professionnelles sur les producteurs couvrant la fabrication des boissons (particulièrement les boissons aux fruits plates et gazeuses et les eaux fruitées) et pénalisant les véritables fabricants professionnels;
- L'insuffisance du contrôle des conditions de ventes (nature des ingrédients utilisés, emballages – étiquetage, prix pratiqués, etc.);
- Le non respect par un grand nombre d'entreprises de la filière des normes alimentaires (Process de production et qualité des produits). Les normes minima d'hygiène et de sécurité alimentaires non respectées (BODIN *et al.*, 2005).

7-1 Norme française NF V 76-005 juillet 1986

Cette norme comprend de nombreuses généralités sur les jus de fruits dont seuls les critères Importants, parmi lesquels sont mentionnés ci-dessous:

Le jus d'orange est un liquide non concentré, non dilué et non fermenté, obtenu par l'expression du fruit frais "Citrus sinensis";

Le jus d'orange est un liquide obtenu, même partiellement à partir de jus d'orange concentré, conformément à la réglementation en vigueur et commercialisé sous l'appellation "jus d'orange à base de jus concentré";

Les oranges destinées à la fabrication des jus d'orange doivent être fraîches, saines, correctement lavées, leur état de maturité doit être tel qu'il permette d'obtenir des jus répondant aux caractéristiques fixées par la présente norme;

Le jus ne doit provenir que de l'endocarpe : il doit être exempt de fragments d'écorce, de parties d'albédo, de débris de pépins et de particules noires.

Il faut savoir que cette norme française NF V76-005 juillet 1986 a été remplacée par la norme NF 76-005 janvier 1995 spécifiant que la teneur en vitamine C doit être de 200 mg/l jusqu'à la fin de la DLUO (date de limite d'utilisation observé)... sachant que pour un jus d'orange frais, les teneurs sont en moyenne de 500 mg/l.

7-2 Directive 93/77/CEE du conseil du 21 septembre 1993

Les jus d'orange sont réglementés par le décret du 23 Novembre 1978, complété et précisé par la Directive 93/77 du 21 septembre 1993 dont les passages importants sont stipulés ci-dessous elle définit le fruit et les différents types de jus.

On entend par fruit: le fruit frais conservé par le froid, sain, exempt de toute altération, privé d'aucun de ses composants essentiels des jus et parvenu au degré de maturité approprié (à titre indicatif, une orange mûre a un brix de 12.1° minimum)

On entend par jus de fruit:

-le jus obtenu à partir de procédés mécaniques, fermentescible mais non fermenté, possédant la couleur, l'arôme et le goût caractéristique des jus de fruits dont il provient. Dans le cas des agrumes, le jus de fruit provient obligatoirement de l'endocarpe (THOMAS *et al.*, 2005).

Chapitre II

Les édulcorants

1- Additif Alimentaire

Substance ajoutée en petites quantités à une denrée alimentaire dans un but technologique précis (ADRIAN *et al.* 1995). Selon ALAIS et LINDEN (1994) le terme additif désigne toute substance qui n'est pas un constituant normal des aliments et dont l'addition intentionnelle au cours de la fabrication de ceux-ci a un but qui peut être de type: technologique; organoleptique et ou nutritionnel.

L'utilisation d'additifs alimentaires ne se justifie que si elle comporte un avantage, ne présente pas de risque appréciable pour la santé des consommateurs, n'induit pas ceux-ci en erreur, remplit une ou plusieurs des fonctions technologiques énoncées par le CODEX STAN 192 (1995) et répond aux besoins énoncés aux alinéas a) à d) ci-après, et uniquement si ces objectifs ne peuvent pas être atteints par d'autres moyens économiquement et technologiquement applicables:

- a) Préserver la qualité nutritionnelle de l'aliment; une réduction délibérée de la qualité nutritionnelle de l'aliment n'est justifiée que dans les circonstances visées à l'alinéa b) ainsi que dans d'autres cas où l'aliment ne constitue pas un élément important du régime alimentaire ordinaire;
- b) Introduire les ingrédients ou composants nécessaires dans des denrées alimentaires manufacturées destinées à certains groupes de consommateurs ayant des besoins diététiques particuliers;
- c) Améliorer la conservation ou la stabilité d'un aliment ou ses propriétés organoleptiques, à condition de ne pas en altérer la nature, la substance ou la qualité de façon à tromper le consommateur;
- d) Servir d'adjuvant dans la fabrication, la transformation, la préparation, le traitement, l'emballage, le transport ou l'entreposage de l'aliment, à condition que l'additif ne soit pas utilisé pour masquer les effets de l'utilisation de matières premières de mauvaise qualité ou de méthodes ou techniques indésirables (y compris le manque d'hygiène).

L'étude des additifs conduit au besoin de procéder à leur classement. Celui qui prévaut généralement est le regroupement par catégories fonctionnelles. C'est ce type de classification qui a été choisi en France, dans l'Union Européenne (UE) et au Codex alimentarius.

La directive communautaire du 21 décembre 1988 établit 24 catégories:

1-Colorant; 2-Conservateur; 3-Antioxygène; 4-Emulsifiant; 5-Sel de fonte ; 6-Épaississant; 7-Gélifiant; 8-Stabilisant; 9-Exhausteur de goût; 10-Acidifiant; 11-Correcteur d'acidité; 12-Antiagglomérant; 13-Amidon modifié; 14-Edulcorant; 15-Poudre à lever; 16-Antimoussant; 17-Agent d'enrobage; 18-Agent de traitement de la farine; 19-Affermissant; 20-Humectant; 21-Séquestrant; 22-Enzyme; 23-Agent de charge; 24-Gaz propulseur et gaz d'emballage.

En ce qui concerne la numérotation, chaque substance sera précédée de la lettre E suivie de 3 ou 4 chiffres.

Dans l'Union européenne, chaque emploi étant spécifiquement autorisé, il faut se rapporter à la réglementation en vigueur ; il s'agit du principe de « Liste positive ». En 1979, le Codex alimentarius a adapté la terminologie « auxiliaire technologique » pour les substances n'ayant dans l'aliment qu'un effet passager afin de les différencier des additifs ayant une fonction permanente dans la denrée alimentaire (ALAIS et LINDEN, 1994).

2- Édulcorants

Le mot «édulcorant» vient du latin *edulcorare*, donner du doux. Les édulcorants peuvent être nutritifs ou non (COUTIN et LIGNON, 2009).

Les édulcorants sont des substances n'appartenant pas au groupe des hydrates de carbone et qui ont un pouvoir sucrant, parfois important par rapport à celui du sucre, mais qui, par rapport à leur pouvoir édulcorant, n'ont aucune valeur nutritive (très faible). Ils sont utilisés pour communiquer une saveur sucrée aux produits alimentaires et sont utiles dans les aliments allégés ou diététiques, comme pour les diabétiques (ELATYQY, 2011).

Les édulcorants sont utilisés pour:

- garder le plaisir du goût sucré;
- diminuer la charge énergétique;
- remplacer le saccharose;
- moduler l'index glycémique;

- proposer des préparations culinaires appréciables;
- une meilleure compliance au régime à long terme (MARCHAND, 2009).

Les principaux édulcorants sont des substances en principe non toxique. Les édulcorants naturels protéiques ont été récemment étudiés ; cette observation va à l'encontre de l'opinion longtemps admise que seules les petites molécules étaient sucrées. Il faut cependant préciser que le pouvoir sucrant disparaît lors de la dénaturation, surtout en milieu acide.

L'aspartame et la thaumatine semblent avoir les meilleures chances d'avenir. L'aspartame est l'exemple des effets du hasard (recherche sur la synthèse des hormones); à noter que les acides amines le constituant ne sont pas sucrés, et que le dipeptide semble désormais s'imposer: l'alitame (ALAIS et LINDEN, 1994).

3- Classification des édulcorants

Les substances douées d'une saveur sucrée peuvent être regroupées en 2 grandes catégories:

3-1 Les édulcorants nutritifs

Dont le pouvoir sucrant est inférieur ou voisin de celui du sucre (MASSIN et BELLISTE, 2007). Ils apportent 2.4 kcal/g (contre 4 kcal pour le saccharose). Ils sont utilisés dans les bonbons ou chewing-gum « sans sucre ». Ils ont un rôle dans la prévention de caries mais consommés à forte dose, ils peuvent entraîner des troubles intestinaux (COUTIN et MIGNON, 2009). Ils sont appelés aussi les édulcorants massiques, ils peuvent être incorporés dans des produits alimentaires pauvres en calories (ELATYQY, 2011). Parmi ceux-ci, on distingue des polyols tels que: sorbitol, mannitol, xylitol, isomalt...dont les propriétés figurent sur le tableau 4.

Les édulcorants de « charge » sont tous autorisés dans l'UE et bénéficient d'une DJA (Dose Journalière Admissible) non spécifiée, leur utilisation ne fait pas courir de risque aux consommateurs, ils ne présentent donc pas de risques toxicologique (MASSIN et BELLISTE, 2007).

Tableau 4: Propriétés des principaux polyols.

	Saccharose	Maltitol	Lactiol	Sorbitol	Mannitol	Xylitol	Isomalt *
Pouvoir sucrant (solution à 10%)	1.0	0.9	0.3	0.5	0.5	1.0	0.5
Hygroscopicité		+	-	+	-	+	-
Solubilité (g dans 100 ml d'eau à 25°C)	210		150	235	22	185	33
Chaleur de dissolution (J/g)	-17	-80	-50	-112	-121	-155	-38
Valeur énergétique (KJ/g)	17	12	8.5	17	17	17	8.5

*Isomalt : Glucose-Sorbitol + Glucose-Mannitol **Source (LINDEN et LORIENT, 1994)**

3-2 Les édulcorants intenses (non nutritifs)

Ils ont un pouvoir sucrant inférieur à celui du saccharose, cependant, la valeur énergétique apportée par ces substances est nulle (ELATYQY, 2011). Ces substances synthétiques, semi synthétiques ou d'origine végétale possèdent en commun une structure glucophore (figure 4).

Ils sont regroupés en 2 sous groupes:

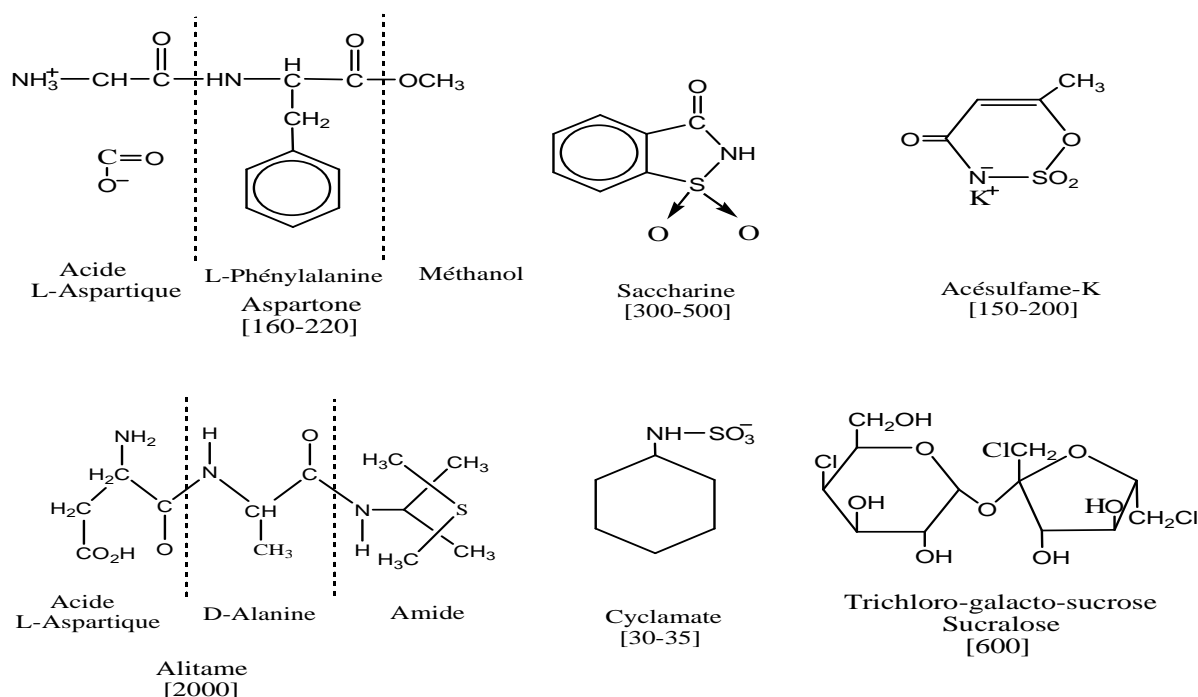


Figure 4 : Structure chimique des édulcorants intenses (LINDEN et LORIENT, 1994).

3-2-1 Les édulcorants intenses d'origine naturelle

Ils n'apportent aucune calorie. Parmi ces édulcorants le sucralose (Splenda) et le Rébaudioside A (Stévia), le Stévia est commercialisé depuis environ deux ans aux Etats-Unis et vient d'obtenir son autorisation de mise sur le marché en France (COUTIN et MIGNON, 2009).

3-2-1-1 Édulcorants de nature peptidique

La thaumatine est une protéine extraite du fruit du *Thaumatococcus Danielli*. Trois protéines sucrantes, appelées thaumatines 0, I et II, peuvent être extraites. Leur masse moléculaire est de 22 000 Da. Le mélange de thaumatine I et II est commercialisés sous forme de Talin. Le pouvoir sucrant du Talin est très élevé 1 500-2 500 fois celui du saccharose.

La monelline a été isolée de la baie de du Nigéria (*Dioscoreophyllum Cumensii*). Cette protéine (MM 10 000) qui porte deux noms: monelline pour les uns, unileverine pour les autres, a un pouvoir sucrant très élevé. Elle perd sa saveur sucrée à 60°C et pour un pH inférieur à 2. Les baies doivent être conservées à -20°C pour ne pas perdre leur saveur sucrée.

La miraculine est une glycoprotéine (MM 40 000) contenue dans les baies rouge d'une plante tropicale *Synsepalun Dulcificum*. Cet édulcorant est très fragile: il est détruit notamment par la chaleur, la trypsine.

L'alitame est un dipeptide de la série des composés L-alpha-aspartyl-D-alanine-amide. Cette molécule qui ressemble à celle de l'aspartame, présente toutefois un pouvoir sucrant 10 fois supérieur et une stabilité supérieure. La saveur sucrée de l'alitame de bonne qualité et sans arrière-goût. Cet édulcorant présente par rapport à l'aspartame un avantage évident pour les personnes souffrant de phénylcétonurie (LINDEN et LORIENT, 1994).

3-2-1-2 Édulcorants de nature glucidique

Le stéviolside moins connu, cet édulcorant est issu de la plante *Stevia Rebaudiana*. On le trouve dans certains épiceries, pharmacies et magasins d'aliments naturels. Son pouvoir sucrant est de 300 fois plus élevée que le sucre de table, ce qui en fait un substitut naturel potentiel aux édulcorants artificiels comme la saccharine et le cyclamate. Son utilisation comme additif alimentaire est toute fois interdite au Canada, aux Etats-Unis et dans les pays de l'union européenne, car certaines études laissent penser qu'il pourrait être cancérigènes (BEAUREGARD, 2009).

Le sucralose est un édulcorant non calorique dérivé du sucrose, il est 600 fois supérieur à celui du sucre. Il n'est pas dégradé par le corps. Le sucralose a un goût similaire à celui du sucre, une bonne solubilité dans l'eau et une excellente stabilité dans de nombreux aliments et boissons. Lorsqu'il est combiné à d'autres édulcorants intenses, il possède un effet synergétique. Comme le sucre, le sucralose est hydrolysé en solution, mais contrairement au sucre, l'hydrolyse du sucralose ne se produit qu'après une période prolongée dans des conditions extrêmes d'acidité et de température.

Le sucralose a été approuvé par le comité mixte FAO/OMS d'experts des additifs alimentaires (JECFA) et par le comité scientifique de l'alimentation humaine (SCF) de la commission européenne (2000), aujourd'hui l'autorité européenne de sécurité des aliments (EFSA).

Le sucralose est autorisé au sein de l'union européenne selon la directive 94/35/CE sur les édulcorants et est actuellement approuvé pour l'utilisation dans les produits alimentaires dans plus de 50 pays, y compris les Etats-Unis, le Canada, le Japon (FLOQUET, 2010).

D'après BEAUREGARD (2009) le sucralose est le dernier-né des édulcorants de synthèse est fabriqué à partir de sucre ordinaire et de chlore. Connu sous le nom «Splenda», on autorise son utilisation au Canada dans les céréales, boissons, desserts, confiserie, produits de boulangerie.

3-2-1-3 Édulcorant de structure diverses

La glycyrrhizine est extraite du rhizome de *Glycyrrhiza Glabra*, est une substance édulcorante relativement puissante cette saponine constituée par l'association de l'acide glycyrrhétique et de l'acide glycuronique, à un pouvoir sucrant 50 fois supérieur à celui du saccharose (Tableau 5). Cette substance est un bon exhausteur de goût et a en particulier le pouvoir de renforcer la saveur sucrée.

La phyllo dulcine est extrait des feuilles d'*Hydrangea Thunbergii*. Le pouvoir sucrant de la phyllo dulcine est établi à 400 environ. La saveur sucrée de cet édulcorant n'est pas pure, elle est associée à une après-saveur de type réglisse et elle n'apparaît pas immédiatement et persiste en bouche (LINDEN et LORIENT, 1994).

Tableau 5: Les édulcorants intenses naturels

Nom	N° CE	Source	Pouvoir sucrant (*)	Observations
-Naturel -1 Osidique Glycyrrhizine (ammoniaquée)	E 959	<i>Glycyrrhiza glabra</i> (réglisse)	50	-Toxicité à haute dose. -Améliorant des bières.
Dihydrochalcone (néohespéridine)		<i>Citrus aurantium</i> (orange)	1 000	-Goût sucré prolongé
Phyllodulcine		<i>Hydrangea macrophylla</i> (hortensia)	400	-Arrière-goûts -Après saveur réglisse
Stéviolside		<i>Stevia rebaudiana</i> (stevia)	300	-Toxicité -Interdit dans le nombreux pays -Antiandrogène
-2.Protéique Miraculine MM 42 000 Da		<i>Synsepalum dulcificum</i> (fruit miracle)		-Glycoprotéine -Modifie les goûts acides en goût sucré
Monelline MM 11 500 Da		<i>Dioscoreophyllum cumminsii</i>	2 500	-Instable en milieu acide
Thaumatococcos I et II MM 22 000 Da		<i>Thomatococcus danielli</i> (fruit miracle- Katamfe)	1 600	-Encore appelé Talin -Surtout employé comme exhausteur de goût, peu comme édulcorant.

(*) Saccharose

Source (ALAIS *et al.*, 2003)

3-2-2 Les édulcorants intenses d'origines chimiques (synthétiques)

Ils peuvent développer un arrière goût légèrement amer (COUTIN et MIGNON, 2009), parmi ces édulcorants l'acésulfame K(E950) (Tableau 6),

Tableau 6: Les édulcorants intenses chimique (synthétique).

Nom	N° CE	Pouvoir sucrant(*)	Observations
-Synthétique Acesulfame K	E 950	150	-DJA: 9 mg/kg/j
Alitame (L-Asp-D-Ala-amide)		1 500	-Plus stable que l'aspartame en milieu acide
Aspartame (L-Asp-L-Phe-méthyl ester)	E 951	160	-DJA: 40 mg/kg/j Contre indiqué pour les sujets phényl-cétonurique
Cyclamate de sodium	E 952	40	-Toxicité
Saccharine (Na)	E 954	300	-Arrière-gout amer -Toxicité

(*) Saccharose

Source: (ALAIS *et al.*, 2003)

Les édulcorants intenses sont largement utilisés depuis 50 ans sous forme de sucrettes, de sucre en poudre mais également en ajout dans des laitages, des boissons, des sucreries. Ils sont consommés par ceux qui souhaitent ou doivent limiter leur apport en sucre et/ou en calories, en particulier des sujets en surpoids ou obèses et des diabétiques (COUTIN et MIGNON, 2009).

Les principaux édulcorants intenses sont la saccharine, les cyclamates, l'acésulfame de potassium et l'aspartame. La réglementation française autorise l'incorporation de l'aspartame, de la saccharine et de l'acésulfame K aux denrées alimentaires. Les cyclamates sont vendus en pharmacie et l'incorporation dans les produits alimentaires reste interdite; la thaumatine

est autorisée à l'essai pour une période de 3ans (LINDEN et LORIENT, 1994). Depuis 2002, sont autorisés deux nouveaux édulcorants: le sucralose qui est fabriqué à partir de sucre ordinaire et de chlore, le second, qui est un mélange de deux édulcorants déjà autorisés (LAGNIER, 2003).

3-2-2-1 La saccharine

Comme le sucralose, elle est fabriquée à partir du sucre ordinaire et de chlore. Elle est encore présente dans certains médicaments et quelques boissons. La saccharine et les cyclamates (produits dérivés du benzène interdit aux États-Unis) sont à éviter (LAGNIER, 2003).

La saccharine est le 1,2-benzisothiazolin-3-one 1,1 dioxyde. La saccharine en solution aqueuse est relativement instable à la chaleur. Elle donne des sels (les sels de sodium, d'ammonium, de potassium ou de calcium). Son pouvoir sucrant est estimé à environ 700 fois celui du saccharose. Les saccharines commerciales ont un pouvoir sucrant en général estimé à 500 fois celui du saccharose. Une certaine amertume et un arrière goût métallique ont été attribués à la présence d'impuretés : des additifs, comme la glucono-delta-lactone sont utilisés pour masquer cet arrière-goût (LINDEN et LORIENT, 1994).

Selon BEAUREGARD (2009) la saccharine connue sous le nom commercial « Sweet'n low », son utilisation par l'industrie alimentaire en Canada est interdite, mais sa vente comme édulcorant de table est permise.

3-2-2-2 L'acésulfame de potassium

L'acésulfame est le 3,4-dihydro-6-méthyl-1,2, 3-oxo-thiazine-4-one- 2,2-dioxyde. Seul l'acésulfame K, c'est-à-dire le sel de potassium est commercialisé. L'acésulfame est préparé à partir de dérivés de l'acide acétoacétique qui interviennent soit comme produits de départ, soit comme produits intermédiaires au cours de la fabrication. Mélangé à d'autres substances à saveur sucrante, l'acésulfame K présente des effets de synergie. Le mélange de l'acésulfame K avec le saccharose ou le fructose donne un goût sucré très agréable. Lorsqu'on l'utilise comme édulcorant unique en vue d'obtenir un goût sucré très prononcé, une certaine amertume peut être observée. Dans le domaine des boissons, l'acésulfame K est très facile à utiliser, sous forme de mélanges d'édulcorants. Par exemple comme l'acésulfame K et l'aspartame ont un profil temps/intensité différent, il est possible en variant le taux de mélange d'équilibrer la courbe de saveur sucrante en fonction des diverses matières premières utilisées dans la fabrication de la boisson. Certains pays ont autorisé son emploi avec une

valeur limite (DJA est de 15 mg/kg aux U.S.A) et d'autres non (LINDEN et LORIENT, 1994). Il a un pouvoir sucrant 150 fois supérieur à celui du sucre de cuisine. Il est stable à la chaleur, et soluble dans l'eau. Mais il a un arrière-goût amer qui conduit à ne l'utiliser souvent qu'en association avec la saccharine ou l'aspartame (LAGNIER, 2003). Il est utilisé dans un éventail de produits alimentaires dont les boissons gazeuses diètes (BEAUREGARD, 2009).

3-2-2-3 Cyclamate

Son non commercial est le «Sugar twin», lui aussi est interdit d'être utilisé par les industries dans les aliments et boissons en Canada. Il peut toute fois être vendu comme édulcorant de table (BEAUREGARD, 2009).

3-2-2-4 L'aspartame

Il a été découvert en 1965. L'innocuité de l'aspartame a été évaluée par JECFA et SCF. Il est autorisé dans l'UE par la directive 94/35/CE (MASSIN et BELLISTE, 2007).

L'aspartame est un dipeptide de l'acide L-aspartique et de la L-phénylalanine sous la forme de son ester méthylique. Dès qu'il est absorbé l'aspartame se scinde en ses composants qui sont ensuite métabolisés comme les autres acides aminés contenus dans notre alimentation. Cet édulcorant fournit la même quantité d'énergie que les protéines. L'aspartame est aujourd'hui autorisé dans de nombreux pays. La DJA est comprise entre 40 et 50 mg/kg. L'élargissement de la gamme des produits concernant de l'aspartame augmente le choix des diabétiques ou des obèses tout en facilitant la prévention de la carie et de la prise de poids (LINDEN et LORIENT, 1994).

On le trouve dans les boissons sans alcool et dans les produits « lights»: laitages, desserts, glaces ; confiserie et produits de régime. Il a, lui aussi, un pouvoir sucrant 150 fois supérieur à celui du sucre de cuisine (LAGNIER, 2003).

Depuis sa mise en marché, Santé Canada analyse régulièrement les résultats de nombreuses études cliniques effectuées sur des sujets humains et portant sur la consommation d'aspartame (BEAUREGARD, 2009).

4- Les risques liés aux édulcorants

Les édulcorants intenses autorisés dans l'UE bénéficient tous d'une DJA spécifiée, à l'exception de la thaumatococcus (Tableau7). Ils font donc l'objet d'autorisations de mise sur le marché.

alimentaire par denrée alimentaire assortie de dose d'emploi maximale dans chaque denrée alimentaire. Ils ont un pouvoir sucrant qui peut être très largement supérieur à celui du sucre.

Le fait que tous ces édulcorants bénéficient d'une DJA spécifiée et de dose maximale d'utilisation amène à penser qu'ils ne présentent pas de risques toxicologiques pour l'homme. Cependant, l'innocuité d'un certain nombre d'édulcorants intenses fait l'objet à la fois d'attaque dans les médias mais aussi de réévaluation par les agents de sécurité alimentaire, parmi eux l'aspartame est le plus concentré (MASSIN et BELLISTE, 2007).

Tableau7: Pouvoir sucrant, DJA des édulcorants intenses autorisés dans l'UE.

Edulcorant	Code	DJA mg/kg pc/j
Acésulfame K	E 950	15 (JECFA 1991) 9 (SCF 2000)
Aspartame	E 951	40
Acide cyclamique et ses sels (Ca et Na)	E 952	7
Saccharine et ses sels (Na, K et Ca)	E 954	2,5
Thaumatine	E 957	Non Spécifiée
Néohespéridine Dihydrochalcone	E 959	5
Sucralose	E 955	15
Sel Aspartame/ Acésulfame	E 962	40 15
Néotame		0,3 (FDA 2002) 0,6 (Afssa 2004) 2 (JECFA 2003)

Source (MASSIN et BELLISTE, 2007).

4-1 Notion de DJA

La DJA est une estimation de la quantité d'un additif alimentaire, exprimé sur la base du poids corporel, qui peut être ingérée chaque jour pendant toute une vie sans risque appréciable sur la santé.

L'expression dose journalière admissible « non spécifiée » est utilisée dans le cas d'une substance alimentaire de très faible toxicité lorsque, au vu des données disponibles (chimique, biochimique...), l'ingestion totale d'origine alimentaire de cette substance découlant de son emploi aux concentrations nécessaires pour obtenir l'effet souhaité et de son niveau naturel acceptable dans l'aliment n'entraîne pas, de risque pour la santé. Il s'agit, en fait, d'une DJA qui n'est pas exprimée sous forme numérique. Cette expression a le même sens que l'expression « Dose journalière admissible (DJA) non limitée » ou « quantum satis ». Lorsqu'on a attribué une DJA « non spécifiée » à un additif alimentaire, on peut en principe l'utiliser dans les aliments en général sans limitations autres que celles indiquées par les bonnes pratiques de fabrication (BPF) (ELATYQY, 2010).

4-2 Evaluation du risque

Les édulcorants, comme tous les additifs alimentaires, font l'objet d'une évaluation du risque pour le consommateur avant d'obtenir une autorisation de mise sur le marché. L'étape ultime de la caractérisation du danger est la détermination de la DJA.

4-3 Limites maximales d'utilisation des additifs alimentaires

L'établissement de limites maximales pour les additifs alimentaires dans les différents groupes d'aliments vise essentiellement à garantir que la quantité d'additifs ingérés, toutes sources confondues, ne dépasse pas la dose journalière admissible (DJA).

Les additifs alimentaires visés par la norme CODEX STAN 192 (1995) et les limites maximales correspondantes sont fondés en partie sur les dispositions relatives aux additifs alimentaires de normes Codex de produits établies antérieurement ou sur les résultats d'une analyse effectuée à la demande des gouvernements visant à vérifier qu'une limite maximale d'utilisation proposée est compatible avec la DJA. L'évaluation de données sur la consommation alimentaire effective est également encouragée.

4-4 Sécurité d'utilisation

Les édulcorants sont soupçonnés d'être à l'origine de toutes sortes de maux, dont le cancer, et pourtant, avant de pouvoir être vendu comme édulcorant de table ou incorporés dans les

produits alimentaires, les édulcorants hypocaloriques doivent recevoir l'approbation de santé Canada. En effet, pour chaque substitut du sucre, santé Canada en évalue les effets sur la santé et les doses maximales pouvant être consommées par une personne sans qu'il y ait de risques possibles sur sa santé. Des règlements sont ensuite établis afin d'encadrer leur utilisation par l'industrie. Puisque certaines études ont soulevé des doutes sur l'innocuité de la saccharine et cyclamates, ces produits ne sont autorisés que comme édulcorants de table. Ils ne peuvent donc pas être utilisés par l'industrie comme substituts de sucre dans les aliments ou les boissons (BEAUREGARD, 2007).

En France l'emploi des édulcorants dans les aliments destinés aux nourrissons et d'enfants en bas âge «3ans» n'est pas autorisés sauf disposition spéciale. Sur les dizaines édulcorants intenses autorisés en France, l'aspartame, l'acésulfame K et leurs sels sont les plus utilisés. La liste des produits autorisés en Europe vient de s'enrichir de nouvelles molécules dignes d'intérêt, le rébaudioside A et le néotame.

-Le rébaudioside A: édulcorant intense (naturel) qui, avec un pouvoir sucrant de l'ordre de 300, vient d'être autorisés en alimentation humaine par l'Europe avec une DJA fixée à 2 mg/kg.

-le néotame: la structure chimique de néotame est très proche de celle de l'aspartame, il possède 2 avantages substantiels: une stabilité en milieu acide et à la chaleur que l'aspartame n'a pas et un pouvoir sucrant très supérieur puisqu'il est compris entre 7000 et 13000 fois celui du saccharose, ce qui en fait la molécule la plus sucrante connue à l'heure actuelle. Très récemment, par la directive 2009/163/UE de 22 décembre 2009, la commission européenne a ajouté à la liste des édulcorants autorisés dans l'union avec une DJA fixée 2mg/kg (FRANTINO, 2010).

4-5 Problèmes soulevés par l'emploi d'édulcorants intenses en alimentation humaine

Au-delà de leurs qualités organoleptique limitées, car pas toujours optimales du fait d'arrière goût de réglisse), l'emploi des édulcorants intenses en alimentation humaine soulève deux problèmes majeurs: leur éventuel risque toxicologique ou carcinogénique et le risque d'entretenir une préférence pour les produits sucrés et de favoriser ainsi la surconsommation calorique (FRANTINO, 2010).

4-5-1 Saccharine

Auparavant on pensait que la saccharine pouvait causer l'apparition d'un cancer de la vessie mais ont été licenciés. Des études démontrent que la saccharine réside dans les tissus fœtaux.

4-5-2 Cyclamate

Est considéré comme étant cancérigène et est banni aux USA et est a déconseillé à toutes personnes.

4-5-3 Aspartame

Les personnes atteintes de phénylcétonurie, ou ayant une hyper phénylalanine sont à risque par rapport à l'ingestion de cet édulcorant car ils sont incapable de dégrader la phénylalanine.

D'après BEAUREGARD (2009) l'aspartame n'est dangereuse que pour les personnes souffrant de phénylcétonurie, un trouble héréditaire du métabolisme ne permettant pas d'éliminer la phénylalanine de l'organisme, d'où son accumulation dans le sang des personnes souffrant de cette maladie.

Lorsqu'on consomme de l'aspartame, la phénylalanine se transforme en méthanol qui est un sous produit souvent pointé du doigt pour sa toxicité à une très forte concentration dans l'organisme.

L'aspartame est un composé excitateur ou toxique pour les cellules nerveuses. Il est également jugé comme étant cancérigène bien que ces propos soient jugés non pertinents par l'agence européenne de sécurité alimentaire. De plus une accumulation de phénylalanine pourrait nuire à la santé du bébé (ALLESSANDRA *et al.*, 2000).

Selon MOSER (1997) et TOLI (2008) il y a 92 symptômes prouvés de l'aspartame passant par le coma et allant jusqu'à la mort. La majeure partie d'entre eux sont d'ordre neurologique, car l'aspartame détruit le système nerveux. La maladie de l'aspartame est une des causes qui se cachent derrière les troubles de la santé apparus lors de l'opération « tempête de désert » en Irak.

4-5-4 Risques pour les femmes enceintes

La consommation quotidienne de boissons édulcorées chez les femmes enceintes pourrait augmenter le risque d'accouchement prématuré, néanmoins l'innocuité de leur consommation régulière reste toujours discuté (PUECH, 2011).

Pour les femmes enceintes, l'aspartame, l'acésulfame-potassium et le sucralose ne semblent pas présenter de risque pour la mère ou le bébé. Cependant, les cyclamates et la saccharine sont à éviter en raison d'effets indésirables possibles. C'est ainsi que les produits sucrés avec des substituts du sucre ne doivent pas être consommés de façon excessive et remplacer du même coup d'autre aliments nutritifs (BEAUREGARD, 2009).

5- Réglementation des édulcorants

5-1 Textes réglementaires régissant les édulcorants

A l'échelle internationale, la réglementation en matière des édulcorants est régie par les normes du codex alimentarius dans les principales normes sont :

*Norme générale codex pour les additifs alimentaires: Additifs dont l'utilisation est autorisée, dans des conditions spécifiées, dans certaines catégories d'aliments ou certaines denrées alimentaires.

*La norme codex csx/stan 192-1995 (Rév.2010) Norme générale pour les additifs alimentaires.

*La norme codex cac/gl 75-2010, directives sur les substances utilisées en tant qu'auxiliaires technologiques.

Pour l'union Européenne, plusieurs directives sont à la base de la législation en matière d'édulcorants, parmi elles on cite:

*Directive 94/35/CE du parlement européen et du conseil de 30/06/94 concernant les édulcorants destinés à être employés dans les denrées alimentaires modifiée par Directive 96/83/CE du parlement européen et du conseil (JOR UE, 1997).

*Directive 2008/60/CE de la commission du 17/06/2008 établissant des critères de pureté spécifiques pour les édulcorants pouvant être utilisés dans les denrées alimentaires (JOR UE, 2008).

Et pour protéger la fabrication de produits traditionnels, les états membres peuvent refuser l'usage des édulcorants dans certains produits.

Au plan national, la législation Algérienne a mis en place un arsenal juridique constitué de plusieurs textes réglementaires relatifs aux édulcorants, à savoir:

*Décret exécutif n° 92-25 du 13 janvier 1992 relatif aux conditions et aux modalités d'utilisation des additifs dans les denrées alimentaires (JORA, 1992).

-Arrêté interministériel du Dhou El Hidja 1422 correspondant au 14 février 2002 fixant la liste des additifs autorisés dans les denrées alimentaires (JORA, 2002).

-Arrêté interministériel du 6 Chaâban 1412 correspondant au 10 février 1992 relatif aux utilisations des édulcorants intenses dans quelques denrées alimentaires qui a été modifiée

par l'arrêté interministériel du 11 Moharem 1415 correspondant au 21 Juin 1994 (JORA, 1994).

-Un autre arrêté interministériel du 7 Ramadhan 1420 correspondant au 15 décembre 1999 relatif aux conditions d'utilisation des édulcorants dans les denrées alimentaires (JORA, 1999).

-Arrêté interministériel du 11 Moharem 1415 correspondant au 21 Juin 1994, complétant et modifiée l'arrêté interministériel du 10 Février 1992 relatif aux utilisations des édulcorants intenses dans quelques denrées alimentaires (JORA, 1994).

*Décret exécutif n°97-254 relatif aux autorisations préalables à la fabrication et à l'importation des produits toxiques ou présentant un risque particulier (JORA, 1997).

-Arrêté interministériel du 28 décembre 1997 fixant la liste des produits de consommation présentant un caractère de toxicité ou un risque particulier (JORA, 1997).

5-2 Bonnes Pratiques de Fabrication (BPF)

Tous les additifs alimentaires visés par les dispositions de la norme du CODEX STAN 192 (1995) doivent être utilisés conformément aux bonnes pratiques de fabrication, ce qui signifie que:

- a) La quantité d'additif ajoutée à l'aliment ne dépasse pas celle raisonnablement nécessaire pour obtenir l'effet voulu dans l'aliment;
- b) La quantité d'un additif qui, par la suite de son utilisation au cours des opérations de fabrication, de transformation ou d'emballage, devient un constituant de l'aliment et qui n'est pas destiné à produire un effet physique ou tout autre effet technologique dans l'aliment lui-même, est réduite dans toute la mesure raisonnablement possible; et
- c) L'additif est de qualité alimentaire appropriée et il est préparé et manipulé comme un ingrédient alimentaire.

Les tableaux 8 et 9 illustrent les limites d'utilisation des édulcorants selon le législateur Algérien, la réglementation européenne et les BPF.

Tableau 8: Limites d'utilisation des édulcorants (mg/l)

Désignation	Polyols	Acésulfame K	Aspartame	Saccharine
Boissons	-	350	600	80
Desserts et produits similaires	BPF	350	500-1000	100
Confiseries	BPF	500-2500	1000-6000	200-3000
Autres produits	BPF	350-1000	300-1000	100-320
Produits de boulangerie	BPF	-	-	-

Source (JORA, 1999)

Tableau 9: Limites d'utilisation des édulcorant CEE

Edulcorants	Utilisation	Limites (mg/kg)
Polyols	-Confiseries -Desserts	BPF
Thaumatine	-Confiseries -Desserts	50
Néohespéridine	-Boissons aromatisées -Confiseries -Desserts	50 100 50
Acésulfame K	-Boissons aromatisées -Confiseries	350 500-1000
Aspartame	-Boissons aromatisées -Confiseries -Chewing-gum	500 1000 5500
Cyclamate	-Boissons aromatisées -Confiseries	400 500
Saccharine	-Boissons aromatisées -Confiseries -Desserts	80 500 10

Source (CE n°96/83, 1996)

5-3 Composition et procédures du Comité

La FAO et l'OMS ont des fonctions complémentaires en matière de sélection des membres du JECFA. La FAO sélectionne les membres chargés de l'élaboration des normes d'identité et de pureté des additifs alimentaires et de l'évaluation des concentrations de résidus de médicaments vétérinaires dans les aliments et l'OMS, les membres qui s'occupent des évaluations toxicologiques des substances examinées. Les membres qui sont chargés d'évaluer les doses sont invités par les deux organisations. Ils ne sont retenus qu'après examen approfondi des compétences scientifiques des divers candidats, et l'équilibre entre les compétences scientifiques et l'expérience dans d'autres domaines est considéré comme essentiel. La FAO et l'OMS prennent à leur charge les frais de participation des experts aux réunions du JECFA.

Procédures du Comité

Pour les additifs alimentaires, les contaminants et les substances toxiques naturellement présentes dans les aliments, le Comité:

- i) élabore des principes pour l'évaluation de leur innocuité;
- ii) procède à des évaluations toxicologiques et établit des doses journalières admissibles (DJA) ou doses tolérables;
- iii) prépare des normes de pureté pour les additifs alimentaires; et
- iv) évalue les doses.

Pour les résidus de médicaments vétérinaires dans les aliments, le Comité:

- i) élabore des principes pour l'évaluation de leur innocuité;
- ii) établit des DJA et recommande des limites maximales de résidus (LMR);
- iii) établit des critères applicables aux méthodes appropriées d'analyse pour la détection et/ou le dosage des résidus dans les aliments (JECFA, 2001).

Chapitre III

Matériel et méthodes

1-Objectifs

L'objectif de notre travail consiste à étudier la qualité microbiologique et chimique des boissons rafraichissantes sans alcool (BRAS) commercialisées dans la wilaya de Djelfa.

* La qualité microbiologique sera estimée par des recherches/dénombrement des flores microbiennes diverses conformément à la réglementation en vigueur. Cette approche nous permet d'estimer le niveau de contamination du produit mis sur le circuit de commercialisation dans les conditions de présentation sur le marché. Les conséquences de cette qualité touchent la qualité marchande du produit d'une part et peut être préjudiciable à la santé des consommateurs.

* la qualité chimique sera évaluée par le risque sanitaire que manifeste la présence de certains édulcorants tel que le cyclamate (non autorisé) ou l'excès d'autres édulcorants tels que l'acésulfame K, la saccharine ou l'aspartame, lors de la consommation excessive des boissons qui en sont chargées.

2-Echantillonnage

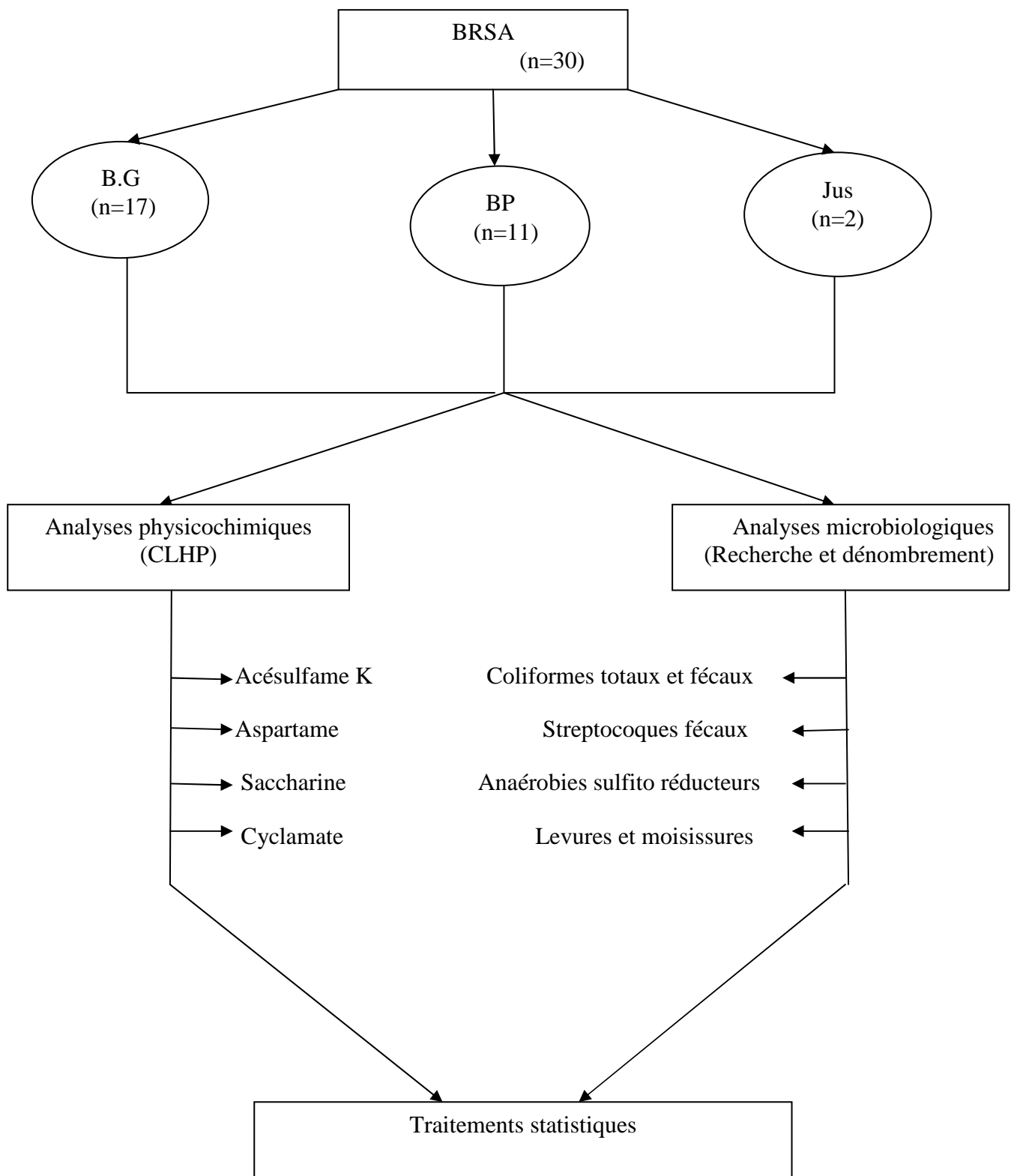
Au total 30 échantillons de boisson rafraichissantes sans alcool ont été prélevés au près du commerce dans la wilaya de Djelfa. Pour les analyses physicochimiques, les prélèvements ont été effectués selon les recommandations de l'arrêté du 23 juillet 1995 relatif à la quantité des produits à transmettre au laboratoire aux fins de son analyse physicochimique et ces conditions de conservation (JORA, 1996) et pour les analyses microbiologiques, les directives de l'arrêté interministériel du 27 mai 1998 relatif aux spécifications microbiologiques de certains denrées alimentaires (JORA, 1998) ont été respectées pour l'échantillonnage.

Les échantillons prélevés se repartirent comme suit:

- 17 échantillons pour les boissons gazeuses, ce qui représente un pourcentage de 56,67%;
- 11 échantillons pour les boissons plates et qui correspond à un taux de 36,67%;
- 2 échantillons pour les jus qui correspondent à 6,66%.

Les échantillons sont conservés dans une température basse (6°C) dans un temps de deux jours au maximum avant l'analyse.

3-Protocole expérimental



BG: boisson gazeuse, BP: boisson plate

Figure 5: Schéma du protocole expérimental

4-Réactifs et produits chimiques

- HexacyanoferrateII de potassium ($K_4(Fe(CN)_6)3H_2O$)99%;
- Sulfate de zinc ($ZnSO_4 \cdot 7 H_2O$) 99.5%;
- Acétonitrile pour CLHP;
- Tampon phosphate KH_2PO_4 ajusté à pH 3.50;
- EDTA (10 g/l);
- L'eau déminéralisée;
- Méthanol, pour CLHP;
- n-heptane;
- Sulfate de sodium anhydre; si nécessaire, laver au n-heptane afin d'éliminer les contaminants lipophiles;
- Solution de carbonate de sodium ($Na CO_3$) 50g/l;
- Solution d'hypochlorite de sodium (1.7% de chlore actif);
- Acide sulfurique (H_2SO_4) 80%;
- Solution de Carrez n°I: qui se prépare en dissolvant 15g d'hexacyanoferrateII de potassium ($K_4(Fe(CN)_6)3H_2O$) d'une pureté spécifiée d'au moins 99% dans l'eau et de compléter à 100ml;
- Solution de Carrez n° II: qui se prépare en dissolvant 30g de sulfate de zinc ($ZnSO_4 \cdot 7 H_2O$) d'une pureté spécifiée d'au moins 99.5% dans de l'eau et de compléter à 100ml;
- Phase mobile 1: 0.0125M KH_2PO_4 tampon (pH 3.5), acétonitrile (90+10), le tampon phosphate est fabriquée par 0.17 % KH_2PO_4 ajusté à pH 3.50 avec 5% d'acide phosphorique, le tampon et l'acétonitrile sont filtrés à travers un filtre de 0.45 μm , et dégazéifiés pendant 5min dans un bain ultrasonique, la phase mobile est conservé sous un pression bas pendant les analyses, elle se prépare chaque jours;
- Phase mobile 2: Mélanger 80 volumes de méthanol avec 20 volumes d'eau, filtrer sur un filtre à membrane approprié, par exemple de 0.45 μm de dimension de pores, et dégazer pendant 5 min dans un bain à ultrason;

-Solution de conditionnement pour CLHP, solution EDTA (10g/l), filtrée sur un filtre à membrane approprié par exemple de 0.45 μm de dimension de pores, et dé gazéifié pendant 5min dans un bain à ultrasons;

-Solutions standards: 1mg/ml de solutions aqueuses stockées, fabriqués pour l'acésulfame K; l'aspartame, saccharine, cyclamate de sodium;

5-Milieus de culture

-Tryptone Sel Eau;

-Milieu liquide VRBL (bouillon lactosé bilié au vert brillant);

-Eau peptonée exempte d'indole et réactif de kovacs;

-Milieu Rothe à concentration simple;

-Milieu Eva litsky;

-Milieu gélosé VF;

-Réactif alun de fer et sulfite de sodium;

-Milieu OGA

-Oxytétracycline (pour la composition des milieux voir annexe 1).

6- Appareillage et équipements

Appareillage pour CLHP:

-Chromatographie liquide haute performance modèle 420se composant d'une pompe (Kontron), d'un système d'injection d'échantillon manuelle (Rheodune) de 20 μl , d'un détecteur spectromètre à ultraviolets (UV) (pouvant fonctionner à une longueur d'onde de 220 nm) modèle ERC-7215 (Erma), avec enregistreur et intégrateur permettant de mesurer les hauteurs et aires des pics modèle 450 (Kontron);

-Colonne analytique de séparation en phase inversé μ Bondapak-C18(10 μm , 300 X 3.9 mm)avec :

*Une phase stationnaire RP C18;

*Une longueur de 220 nm;

*un diamètre inférieur de 4 mm;

*Une colonne de garde RP C18;

*Température de la colonne 25°C;

*Une valeur de débit de 0.8ml/min;

*DéTECTEUR de 0.2 AUFS.

(Lors de toutes indications d'interférence par le détecteur, il faut choisir une autre condition chromatographique pour déterminer le cyclamate par exemple choisir une deuxième longueur d'onde).

-Bain à ultrasons;

-Microfiltre moléculaire (porosité 0.45µm);

-Système de filtration muni d'un porte-filtre pour le microfiltre;

-Homogénéisateur;

-Bain d'eau (60°C);

-Centrifugeuse;

-Tubes à centrifuger;

-Ampoule à décanter (50ml, 100ml);

-Papier filtre plissé;

-Filtre de séparation de phase;

-Agitateur Vortex;

-Anse de platine;

-Pincés;

-Bec Bensen;

-Pipettes Pasteur;

-Porte tubes;

-Auto clave;

-Bain Marie;

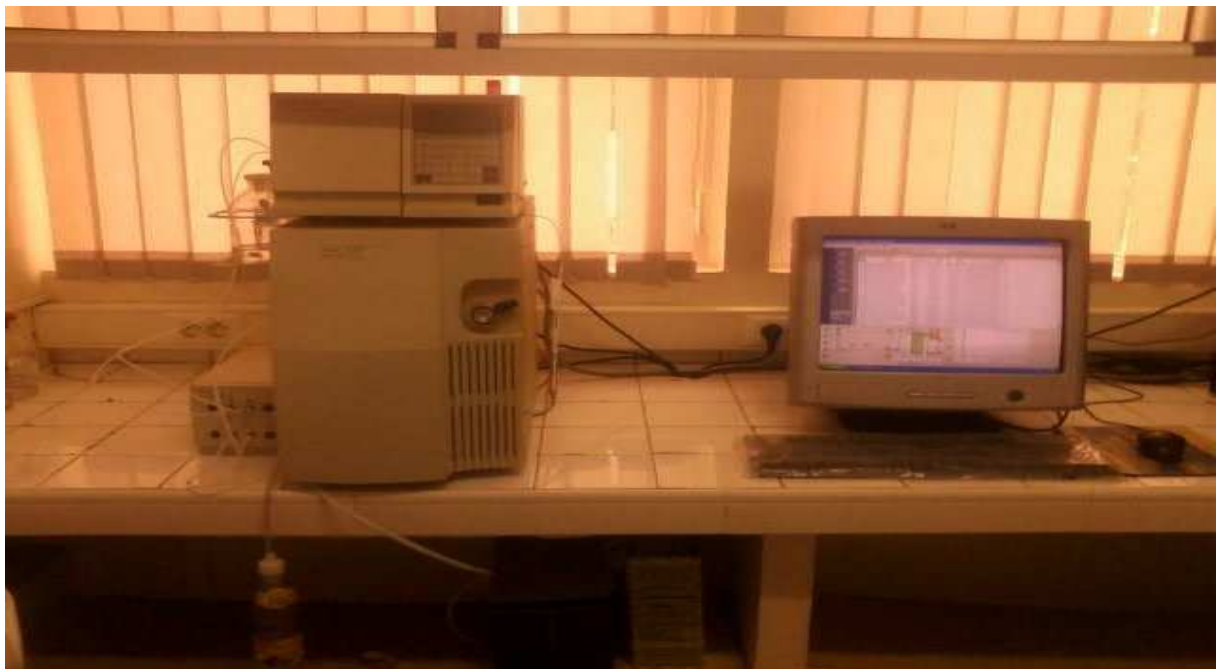
-Four de stérilisation;

-Etuve d'incubation: 25°C, 37°C, 44°C.

7- Analyses physicochimiques

7-1 Analyses qualitative et quantitative des édulcorants (Aspartame, acésulfame, saccharine et cyclamate)

La majorité des méthodes de détermination des édulcorants sont basées sur la CLHP, qui possède plusieurs avantages aux autres méthodes, elle ne demande pas des prétraitements adéquats de l'analyte, et est utilisée pour la séparation et la quantification des différents édulcorants au même temps. Les premières méthodes de CLHP décrites pour la détermination des édulcorants intenses sont : la chromatographie isocratique, chromatographie phase inversée avec le système de détection à l'UV (Figure 6). La chromatographie paire ion phase inversée est aussi utilisée pour la séparation des édulcorants. Les produits en paire ion sont ajoutés à la phase mobile pour activer la rétention des composés ioniques, et finalement améliorer la séparation des édulcorants (NOLLET, 2000). Cette méthode est simple, rapide, précise et sensible (PRODOLLIET et BRUELHART, 1993).



4

Figure 6: Photo de la CLHP utilisées (1: Les pompes, 2: Micropipette d'injection, 3: Injecteur, 4: Appareil CLHP).

7-1-1 Principe

L'analyse qualitative consiste à identifier les composés par leur temps de rétention qui pour des conditions données (solvant, débit, colonne etc.) est caractéristique de l'analyte. Il peut bien sûr arriver que deux composés différents mais très proches aient le même temps de rétention. On doit donc s'assurer préalablement qu'un pic donné correspond bien à un seul composé. C'est l'objet de toute la phase de mise au point des conditions opératoires utilisées.

On admet ici pour la suite que chaque pic correspond à un seul composé.

La détermination quantitative se fait par des méthodes standard externes avec l'utilisation de l'aire ou d'hauteur du pic (WOOD *et al.*, 2004).

La surface d'un pic est proportionnelle à la quantité injectée de l'analyte correspondant. On doit au préalable s'assurer que cette condition indispensable est bien remplie. Comme vu plus haut, le détecteur ne donne une réponse linéaire que pour une certaine gamme de concentration, on doit donc impérativement se placer dans cette zone de réponse linéaire et mettre au point les dilutions nécessaires de l'échantillon et des étalons pour qu'il en soit ainsi.

7-1-2 Préparation de l'échantillon

En général, la préparation de l'échantillon dépend de type de l'aliment. L'échantillon est injecté directement ou après un minimum de prétraitement (NOLLET, 2000). L'extraction et/ou la purification peuvent être nécessaires, et cela dépend de la complexité de l'échantillon, et dont le but est d'éliminer l'interférence (NOLLET, 2000), (PRODOLLIET et BRUELHART, 1993). Les matières les plus complexes nécessitent une étape de clarification par les solutions carrez. Ensuite l'extrait est analysé en chromatographie phase inversée (PRODOLLIET et BRUELHART, 1993).

Les boissons gazeuses doivent être premièrement dégazées par un bain d'ultrason, les jus de fruits et les cocktails peuvent subir une centrifugation ou une filtration avec un filtre de 0.45µm (NOLLET, 2000). Ensuite on doit faire la dilution: on prend 1ml de l'échantillon (et de standard) dans 9 ml de l'eau déminéralisée dans une fiole de 20ml, et on complète à 20ml.

7-1-3 Procédure

La procédure utilisée est la phase inversée; l'élution de la phase mobile se fait par le mélange de KH_2PO_4 (0.0125M) (pH 3.5) et l'acétonitrile (90+10) qui est le point fort de ce système, sous ces conditions l'acésulfame K se sépare bien de l'aspartame, saccharine et

autres additifs alimentaires, la phase stationnaire est de C18 colonne (μ Bandapak), la détection se fait par l'UV à 220 nm (PRODOLLIET et BRUELHART, 1993). Ce détecteur mesure l'absorption de la lumière ultraviolette ou visible par le composé à la sortie de la colonne. La sensibilité optimale est obtenue en utilisant le détecteur à la longueur d'onde où l'absorbance du composé d'intérêt est la plus grande.

Le détecteur monochromatique de base se compose:

-D'une source lumineuse au deutérium pour les longueurs d'ondes variant de 190 à 350 nm ou d'une source à vapeur de mercure pour la longueur d'onde non variable de 220 nm,

-D'un monochromateur pour isoler une bande passante étroite (généralement 10 nm) ou une raie particulière (comme par exemple 220 nm pour la lampe au mercure),

-D'une cellule à circulation d'un volume de quelques microlitres (d'un trajet optique de 0,1 à 1 cm),

-D'un moyen de détection optique (AUROUSSEAU, 2009).

Dans le cas de cyclamate, la détection se fait par la conductivité ou par un photomètre, une détection fluorimétrique ou par une dérivation des édulcorants sont utilisés pour augmenter la sensibilité et la sélectivité. Les composés sont identifiés par la comparaison du temps de rétention avec les standards (NOLLET, 2000). La même technique est appliquée pour la détermination de l'aspartame et les produits résultant de sa dégradation.

2 volumes de 20 μ l du standard et de l'échantillon sont injectés. Les résultats sont calculés par la formule suivante.

$$C_e \text{ (ppm)} = A_e \cdot C_s / A_s$$

C_e : la concentration du produit dans la solution d'échantillon (ppm);

A_e : l'aire du pic du produit dans la solution d'échantillon;

C_s : la concentration de l'édulcorant dans la solution standard (ppm);

A_s : l'aire du pic de l'édulcorant dans la solution standard.

Selon WOOD *et al.* (2004), l'identification de l'édulcorant est basée sur le temps de rétention (d'après le spectre de l'absorbance en fonction du temps de rétention), chaque édulcorant à un temps de rétention spéciale (l'aspartame \approx 9.4 min, la saccharine \approx 3.8 min, l'acésulfame \approx 3.5 min, le cyclamate \approx 5.3 min).

7-2 Méthode de confirmation de présence de cyclamate

7-2-1 Principe

Le cyclamate de sodium est extrait de l'échantillon avec de l'eau, converti en N, N-dichlorocyclohexylamine et dosé par chromatographie liquide haute performance sur colonne en phase inverse avec détection UV à une longueur d'onde de 200nm

7-2-2 Préparation de l'échantillon

7-2-3 Défécation

- On pèse 1.5g de l'échantillon dans une fiole de 100ml, puis on introduit successivement:
- 2ml de solution de l'hexacyanoferrate (II) de potassium (carrez I), et on agite
- 2ml de solution d'acétate de zinc (carrez II), on agite et on complète au trait de jauge avec de l'H₂O tout en mélangeant
- on laisse reposer 10 à 15min et on filtre avec papier plissé
- le filtrat doit subir une dérivatisation.

7-2-4 Dérivatisation

Dans une ampoule à décanter on verse:

- 20ml du filtrat;
- 1ml de H₂SO₄ (80%) ;
- 10ml de n-heptane ;
- 2.5 ml de solution d'hypochlorite de sodium (1.7%).

Puis on agite énergiquement pendant 1 min, on laisse les phases se séparer, on élimine la phase inférieure, on lave la couche de n-heptane avec 2.5ml de solution de carbonate de sodium NaCO₃ (50g/l), en agitant pendant 30 secondes, on élimine la couche inférieure, si la séparation est nette, on sèche la couche de n-heptane avec 1g de sulfate de sodium anhydre (étuvé à 105°C pendant 2h), en fin on filtre à travers papier filtre plissé ensuite avec le filtre 0.45µm.

7-2-5 Conditionnement de la colonne

-Rinçage avec l'eau pendant 10 min, puis avec l'EDTA pendant 30min, après avec l'eau pendant 10min.

-On met la phase mobile (80% MeOH, 20% H₂O), on travaille avec une seule pompe avec un débit de 1 ml/min.

-Temps d'analyse 15 min (EN 12857, 1999).

-Le temps de rétention de cyclamate est de 10 min après les traitements.

8- Analyses microbiologiques

8-1 Préparation des dilutions

L'analyse est effectuée sur 5 unités de chaque échantillon, conformément à l'arrêté interministériel du 27 mai 1998 relatif aux spécifications microbiologiques de certaines denrées alimentaires. Chaque unité constitue une solution mère (SM).

On introduit aseptiquement à l'aide d'une pipette en verre graduée et stérile, 1 ml de la SM, dans un tube à vis stérile contenant au préalable 9 ml de diluant TSE (Tryptone

Sel Eau): cette dilution constitue alors la dilution au 10⁻¹, mélanger soigneusement et doucement.

On change de pipette et on prend toujours aseptiquement 1ml de la dilution 10⁻¹, on l'introduit dans un tube à vis stérile contenant au préalable 9 ml du même diluant (TSE): cette dilution est alors au 10⁻², mélanger soigneusement et doucement.

On change de pipette et prendre toujours aseptiquement 1ml de la dilution 10⁻², à introduire dans un tube à vis stérile contenant au préalable 9 ml du même diluant (TSE): cette dilution est alors au 10⁻³, mélanger soigneusement et doucement.

8-2 Recherche et dénombrement des Coliformes (totaux et fécaux)

Le terme "coliforme" regroupe toutes les entérobactéries ayant des caractères communs: bacilles à gram négatif, oxydase (-), non sporulés, aérobies ou anaérobies facultatifs, capable de se multiplier en présence de sels biliaires ou d'argents, capables en 48h de culture à une température de 30 à 37°C de fermenter le lactose avec de production d'acide et de gaz. Elles sont un facteur de mauvaise qualité et de mauvaise conservation leur dénombrement permet la mise en évidence d'une population fécale (SUTRA *et al.*, 1998).

8-2-1 But

Les techniques de colimétrie ont pour objectif le dénombrement et l'identification des coliformes d'une manière générale. L'intérêt de cette manipulation est de déterminer pour le produit testé une contamination fécale et d'en apprécier l'ampleur, car les coliformes sont des bactéries vivant principalement dans les intestins. De plus les coliformes thermotolérants survivant difficilement hors de l'intestin traduiront donc une contamination fécale récente.

8-2-2Principe

Toutes les techniques utilisent des milieux contenant du lactose, et, pour les milieux liquides, une cloche mettant en évidence la production du gaz. Un certain nombre de milieux utilisent des agents sélectifs, inhibiteurs des bactéries gram+ : vert brillant et désoxychlorate(JOFFIN et JOFFIN, 1999).

8-2-3 Mode opératoire

Par cette méthode, les Coliformes Totaux, Coliformes fécaux sont dénombrés en milieu liquide par la technique du NPP (nombre le plus probable) à l'aide du bouillon VRBL (bouillon lactosé bilié au vert brillant) réparti à raison de 10 ml par tube et muni d'une cloche de Durham.

Cette méthode fait appel à deux tests consécutifs à savoir: test de présomption suivi du test de confirmation.

8-2-3-1Test de présomption

On prépare dans un portoir une série de 9 tubes contenant le milieu sélectif (VRBL) à raison de trois tubes par dilution.

A partir des dilutions décimales 10^{-3} à 10^{-1} , on porte aseptiquement 1 ml dans chacun des trois tubes correspondant à une dilution donnée.

On élimine le gaz présent éventuellement dans les cloches de Durham et on mélange soigneusement et doucement le milieu et l'inoculum.

Incubation: l'incubation se fait à 37°C pendant 24 à 48 heures.

Lecture: Sont considérés comme positifs les tubes présentant à la fois :

-un dégagement gazeux (supérieur au 1/10 de la hauteur de la cloche) ;

-un trouble microbien, ce qui constitue le témoin de la fermentation du lactose présent dans le milieu.

Ces deux caractères étant témoins de la fermentation du lactose dans les conditions opératoires décrites (ISO 4831, 2006)

La lecture finale se fait selon les prescriptions de la table de Mac Grady qui se trouve en annexe2.

8-2-3-2 Test de confirmation

Les tubes de VRBL trouvés positifs lors du dénombrement des Coliformes totaux feront l'objet d'un repiquage à l'aide d'une à deux gouttes dans respectivement :

Un tube de VRBL muni d'une cloche, et sur,

Un tube d'eau peptonée exempte d'indole.

On éliminer le gaz présent éventuellement dans les Cloches de Durham et on mélange bien le milieu et l'inoculum.

Incubation : L'incubation se fait cette fois au Bain Marie à 44°C, pendant 24 heures.

Lecture: Sont considérés comme positifs, les tubes présentant à la fois :

*un dégagement gazeux dans les tubes de VRBL,

*un anneau rouge en surface, témoin de la production d'indole par *Escherichia coli* après adjonction de 2 à 3 gouttes du réactif de Kovacs dans le tube d'eau peptonée exempte d'indole (EPEI).

La lecture finale s'effectue également selon les prescriptions de la table de Mac Grady en tenant compte du fait qu'*Escherichia coli* est à la fois producteur de gaz et d'indole à 44°C(ISO 7251, 2005).

8-2-3-3 Lecture et interprétation

Le cas d'un test de présomption (Exemple):

Inoculum	VRBL Test de Présomption			Nombre Caractéristique
10^{-1}	+	+	-	2
10^{-2}	+	-	-	1
10^{-3}	+	-	-	1

Le nombre caractéristique est donc « 211 » ; ce qui correspond sur la table de Mac Grady au nombre 2.0.

Pour obtenir le nombre réel de Coliformes totaux, il faut multiplier ce nombre par l'inverse de la première dilution pour revenir à 1 soit :

$$2.0 \times 10 = 20 \text{ Coliformes totaux par gr de produit à analyser.}$$

Le tableau, ci-après illustre bien le cas d'un test de confirmation dépendant du test de présomption précédent:

En reprenant l'exemple précédent relatif au dénombrement des Coliformes totaux, cela suppose que nous avons 6 tubes à repiquer à savoir :

*2 tubes de la dilution 10^{-1}

*1 tube de la dilution 10^{-2}

*1 tube de la dilution 10^{-3}

Illustration et interprétation.

Inoculum	Test de Présomption VRBL.37° C	Nombre Caractéristique	Test de Confirmation		Nombre Caractéristique
			VRBL.44°C	E.P.E.I	
10 ⁻¹	+ + -	2	+ +	+ +	2
10 ⁻²	+ - -	1	+	-	0
10 ⁻³	- - +	1	-	-	0

Le nombre caractéristique relatif au dénombrement des Coliformes fécaux est donc « 200 », ce qui correspond sur la table de Mac Grady à 0.9 à la dilution 10⁻¹.

Mais pour revenir à 1, il faut multiplier ce nombre par l'inverse de la première dilution à savoir: 0.9X 10 = 9 Coliformes fécaux par gr de produit à analyser.

Le résultat final sera donc de:

20 Coliformes totaux / gr de produit

9 Coliformes fécaux / gr de produit

8-3 Recherche et dénombrement des Streptocoques fécaux

8-3-1 But

Les streptocoques fécaux sont des streptocoques des matières fécales. Ils appartiennent essentiellement au genre Enterococcus. Leur antigène de paroi les classe dans le groupe D de lancefield. Toutefois, des Streptococcus possédant le même antigène, comme *Streptococcus*

bovis, suis, equinus, sont aussi des hôtes normaux de l'intestin que l'on ne pourra distinguer des *Enterococcus* que par la culture en milieu hypersalé. Les hybridations de DNA ont permis la distinction de ces deux groupes, rassemblés autrefois sous le vocable de streptocoques fécaux ou streptocoques D.

8-3-2Principe

Le dénombrement se fait en milieu liquide sélectif. Le nombre de streptocoques étant en général peu élevé, on utilise dans un premier temps un milieu d'enrichissement relativement sélectif, le milieu de Rothe (azide N^{-3} ; agent sélectif). Un trouble microbien permet de conclure que dans les tubes correspondants a cultivé au moins un streptocoque fécal présumé provenant de l'inoculum. Pour vérifier si les bactéries qui ont cultivé sont des streptocoques. On utilise l'action de deux agents sélectifs, l'azide et l'éthyl-violet en repiquant une anse des tubes positifs dans le milieu Litsky (JOFFIN et JOFFIN, 1999).

8-3-3 Mode opératoire

Par cette méthode, les Streptocoques fécaux sont dénombrés en milieu liquide par la technique du NPP à l'aide de deux bouillons de culture (Milieu de Rothe et Milieu d'Eva Litsky).

Cette méthode fait appel à deux tests consécutifs à savoir: test de présomption suivi du test de confirmation.

8-3-3-1Test de présomption

On prépare dans un portoir une série de 9 tubes contenant le milieu sélectif de Rothe à raison de trois tubes par dilution.

A partir des dilutions décimales 10^{-3} à 10^{-1} , on porte aseptiquement 1 ml dans chacun des trois tubes correspondant à une dilution donnée, puis on mélange soigneusement et doucement le milieu et l'inoculum.

Incubation: l'incubation se fait à $37^{\circ}C$ pendant 24 à 48 heures.

Lecture: Sont considérés comme positifs les tubes présentant un trouble microbien. Ces derniers feront systématiquement l'objet d'un test de confirmation, il n'y a pas de dénombrement à ce niveau.

8-3-3-2Test de confirmation

Ce dernier consiste à repérer et à numéroter les tubes positifs sur milieu de Rothe qui feront l'objet d'un repiquage (2 à 3 gouttes) sur milieux Eva Lytski, qui seront à son tour, incubés à 37°C pendant 24 heures.

8-3-3-3 Lecture et interprétation

Seront considérés comme positifs, les tubes présentant à la fois :

*un trouble microbien,

*une pastille violette au fond du tube.

La lecture finale se fait selon les prescriptions de la table de Mac Grady.

Exemple:

Interprétation des résultats d'essai de Streptocoques en milieu liquide.

Dilutions	Test de présomption	Test de confirmation
10 ⁻¹	+	+
	+	-
	-	
10 ⁻²	+	-
	+	-
	-	
10 ⁻³	+	+
	-	
	-	
Nombre Caractéristique	/	101

Le nombre caractéristique sera de « 101 », ce qui correspond à 0,7 sur la table de Mac Grady.

On considère alors qu'il y a 0,7 Streptocoques fécaux à la dilution 10⁻¹. Mais tenant compte du facteur de dilution et pour revenir à 1, il faut multiplier ce nombre par l'inverse de la première dilution soit : 0,7 X 10 = 7.

Le résultat final sera donc de 7 Streptocoques fécaux par gr ou ml de produit à analyser.

8-4 Recherche et dénombrement des Anaérobies Sulfito-Réducteurs

8-4-1 But

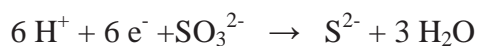
La recherche et le dénombrement des anaérobies sulfitoréducteurs sont réalisés dans deux buts différents :

- *Clostridium perfringens* de type A est recherché car parfois responsable d'intoxication alimentaires ;

- Les *Clostridium* sulfitoréducteurs (ou leurs spores), bactéries commensales de l'intestin ou saprophytes du sol, comme test de contamination fécale, éventuellement ancienne vu la résistance des spores à l'extérieur. *Clostridium perfringens* fait partie des *Clostridium* sulfitoréducteurs (JOFFIN et JOFFIN, 1999).

8-4-2 Principe

Clostridium perfringens et les *Clostridium* sulfitoréducteurs réduisent les sulfites en sulfures:



Après destruction des formes végétatives par chauffage à 80 °C, l'échantillon est incorporé à un milieu de base fondu, régénéré, additionné de sulfite de sodium et de sels de fer. La composition du milieu est établie pour tenir compte d'un volume déterminé d'eau incorporée. L'incorporation se fait dans un tube et non dans une boîte afin de limiter la surface de contact entre le milieu et l'air. Après solidification et incubation, la présence de germes sulfitoréducteurs se traduit par un halo noir autour des colonies.

8-4-3 Mode opératoire

Par cette méthode, les bactéries d'anaérobies sulfito-réducteurs sont recherchées et dénombrées, selon le protocole suivant:

Les dilutions: 10⁻¹, 10⁻² sont soumis:

D'abord à un chauffage à 80°C pendant 10 min puis à un refroidissement immédiat sous l'eau de robinet pour éliminer les formes végétatives.

A partir de ces dilutions, on porte aseptiquement 1ml de chaque dilution en double dans deux tubes à vis stériles.

On ajoute 15ml de gélose viande foie dans chaque tube fondue et ramenée à 45°C additionnée d'une ampoule d'Alun de fer et d'une ampoule de sulfite de sodium.

On laisse les tubes, solidifier pendant 30 minutes.

L'incubation des tubes se fait à 37°C pendant 72 heures. Il est considéré comme positif toute colonies noire et d'un diamètre supérieure à 0.5 mm(BONNEFOY et *al.*, 1998).

8-4-4 Lecture et interprétation

On retient les tubes de deux dilutions successives contenant moins de 30 colonies caractéristiques et/ou non caractéristiques. Il faut qu'un tube renferme au moins 15 colonies caractéristiques.

L'expression des résultats dépend du nombre de colonies dénombrées:

Entre 15 et 30 colonies (si 2 tubes retenus)

$$N = \frac{\Sigma c}{1,1 \times d \times D}$$

Où :

N: nombre de bactéries anaérobies sulfito-réductrices par g ou ml de produit.

Σc : somme des bactéries anaérobies sulfito-réductrices sur les deux tubes retenus.

d: taux de dilution du premier tube retenu.

D: taux de dilution de la suspension mère (D=1 pour les produits liquidesensemencés purs)

c: nombre de bactéries anaérobies sulfito-réductrices.

8-5 Recherche et dénombrement des Levures et Moisissures

8-5-1But

La présence de champignons indique des mauvaises conditions de conservation.

8-5-2 Principe

La méthode est basée sur l'utilisation d'un milieu sélectif de champignons +un agent inhibiteur de bactéries (un antibiotique).

8-5-3 Mode opératoire

Par cette méthode, les Levures et Moisissures sont recherchées et dénombrées, selon le protocole suivant:

A partir des dilutions décimales, 10^{-3} à 10^{-1} , on porte aseptiquement 0,1 ml dans une boîte de Pétri contenant de la gélose OGA + Oxytétracycline.

On étale les gouttes à l'aide d'un râteau stérile, puis on incube à 25°C pendant 5 jours, couvercle en haut.

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

On opère de la même façon et dans les mêmes conditions, avec le diluant (TSE), c'est-à-dire qu'il faut prendre 0,1 ml du diluant (TSE), les étaler avec un râteau à part et les incubés dans les mêmes conditions que les boîtes tests, cette boîte constitue le témoin diluant.

On incube telle quelle, une boîte du milieu utilisé à savoir OGA + Oxytétracycline. Cette dernière est incubée également telle quelle dans les mêmes conditions de température, elle constitue alors, le témoin du milieu.

Au moment de la lecture, on commence obligatoirement par les deux boîtes témoins, si l'une d'entre elles est contaminée, l'analyse est ininterprétable donc à refaire (ISO 21527, 2008).

8-5-4 Lecture et interprétation

On retenu les boîtes contenant entre 15 et 150 colonies, au niveau de deux dilutions successives.

Calculer le nombre N, de Levures à part et de Moisissures à part, dénombrés à 25°C dans 0,1 ml de produit en tant que moyenne pondérée, à l'aide de l'équation suivante:

$$N = \frac{\sum c}{1,1 \times d}$$

Où :

$\sum c$: est la somme des colonies comptées sur les deux boites retenues.

d : est le taux de dilution correspondant à la première dilution.

8-6 Interprétation et réglementation

L'interprétation des résultats des analyses microbiologiques est faite conformément à l'arrêté interministériel du 27 Mai 1998 relatif aux spécifications microbiologiques de certaines denrées alimentaires (JORA, 1998).

9- Analyses statistiques

L'analyse statistique est effectuée en trois phases (VILAIN, 1999):

- 1- une phase exploratoire descriptive (analyses descriptives univariées),
- 2- une phase confirmative (méthode inferentielle),
- 3- et une phase structurale descriptive par des analyses des structures multivariées (typologie).

Toutes les analyses sont réalisées à l'aide du logiciel statistica, version 6.1 édition 2003.

9-1 Analyses descriptives univariées

Cette phase consiste en la description des paramètres analysés les uns séparément des autres (moyenne, écart-type, minimum/maximum par paramètre et la répartition des valeurs) et à réaliser des tests de corrélation (corrélation de Pearson) pour analyser les liens entre les variables (paramètres).

9-2 Analyse inférentielle

Nous avons procédé à l'analyse de la variance (ANOVA) à un facteur: la classe des boissons issues de l'analyse en composante principale; et la comparaison des moyennes par le test de Newman et Keuls. Les différences ont été considérées significatives au seuil de 5 %.

9-3 Analyses exploratoires multivariées

Afin de voir comment se structurent nos variables (celles qui sont associées et celles qui ne le sont pas, celles qui sont dans le même sens des celles qui s'opposent) et pour voir la répartition de nos individus en matière de ressemblance ou de dissemblance, nous avons procédé à une analyse en composante principale (ACP) (PHILIPPEAU, 1986 et SAPORTA, 1990).

Suivi d'une classification automatique (classification ascendante hiérarchique "CAH") pour déterminer les classes de boisson, ce qui a permis la réalisation d'une typologie des boissons en tenant compte de l'ensemble de la qualité microbiologique et de la qualité chimique représentée par les édulcorants quantifiés.

Chapitre IV

Résultats et discussions

1- Qualité chimique des boissons rafraichissantes

Pour l'ensemble des échantillons analysés (n=30), les résultats obtenus sont présentés sous forme d'une moyenne encadrée par l'écart type calculé; les valeurs extrêmes (minimum et maximum) observées sont aussi données pour chaque paramètre dosé.

Entre autre, les résultats obtenus seront comparé par rapport aux normes Algériennes et celles du codex alimentarius. Ainsi, selon l'arrêté interministériel du 7 Ramadhan 1420 correspondant au 15/12/1999 relatif aux conditions d'utilisation des édulcorants dans les denrées alimentaires (JORA, 1999), La teneur en acésulfame ne doit pas dépasser 350 mg/l, l'aspartame 600 mg/l, la saccharine 80 mg/l pour les boissons aromatisées et 100 mg/l pour les boissons gazeuses, le cyclamate doit être absent dans les boissons. Le codex alimentarius (CODEX STAN192, 1995) prévoit les mêmes valeurs pour l'acésulfame, l'aspartame et la saccharine (cette dernière est estimée à 80 mg/l quel que soit la nature de la boisson) que la réglementation Algérienne. Cependant le codex tolère une teneur de 400 mg/l pour le cyclamate et ceci pour le nectar de fruit.

1-1 Composition moyenne des boissons rafraichissantes

La composition en édulcorants de quelques échantillons de boissons rafraichissantes sans alcools est illustrée par les chromatogrammes qui figurent en annexe 3.

En moyenne, les boissons rafraichissantes sans alcools renferment 83,73+/-69,84 mg/l d'acésulfame K, 204,62+/-172,85 mg/l d'aspartame, 33,02+/-54,90 mg/l de saccharine et 0,04+/-0,2 mg/l de cyclamate (tableau 10).

Tableau 10: Composition moyenne des BRSA

	Moyenne	Ecart type	Min	Max
L'acésulfame K	83,73	69,84	0,00	247,50
L'aspartame	204,62	172,85	0,00	532,57
La saccharine	33,02	54,90	0,00	190,00
Le cyclamate	0,04	0,20	0,00	1,10

1-2 L'acésulfame K

La teneur en acésulfame k des trente échantillons des BRSA varie de 0.00 à 247,50 mg/l avec une moyenne générale de 83,73 +/- 69,84. La répartition des valeurs (figure 7) montre l'homogénéité de la variance des échantillons et l'absence de valeurs extrêmement élevées ou

basses. 60% des échantillons ont une teneur inférieure ou égale à 100 mg/l et moins de 17% ont une teneur supérieure à 200 mg/l.

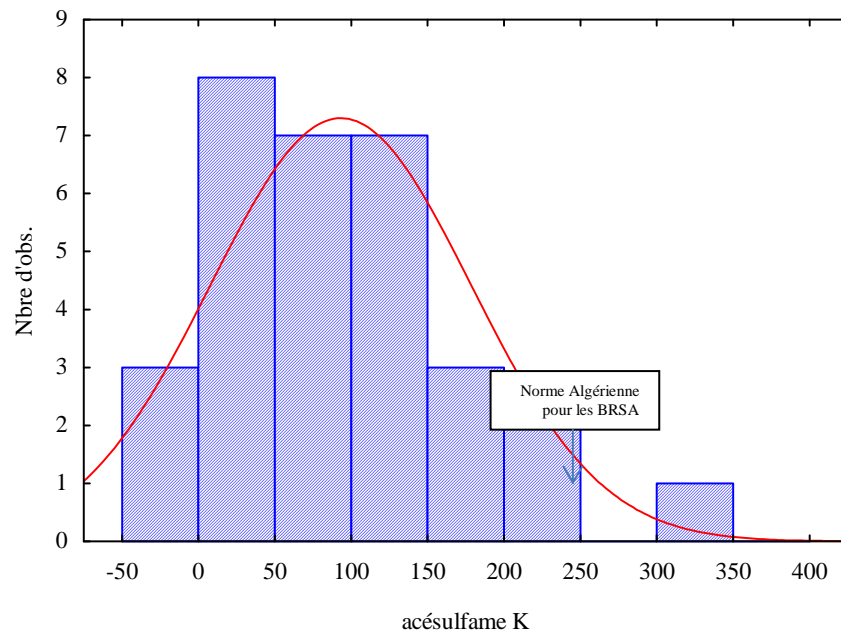


Figure 7: Répartition des valeurs de l'acésulfame K dans les BRSA

La teneur maximale en acésulfame est observée dans l'échantillon 8 (boisson gazeuse: soda Maleb) avec une concentration de 247.5 mg/l, une absence totale est remarquée dans les échantillons 17, 20, 28 (une boisson gazeuse, Badr et deux boisson plates aromatisées, Royal et Gousto). D'autres échantillons accusent des teneurs plus ou moins élevées en acésulfame, il s'agit en effet des échantillons 12, 13, 24 et 27 qui se répartissent équitablement entre les boissons gazeuses et les boissons aromatisées (deux boissons gazeuse, Coca cola et Nahla et deux boissons plates aromatisée, sweetlet et sami). Les teneurs observées sont toutes inférieures aux normes précitées (figure 8).

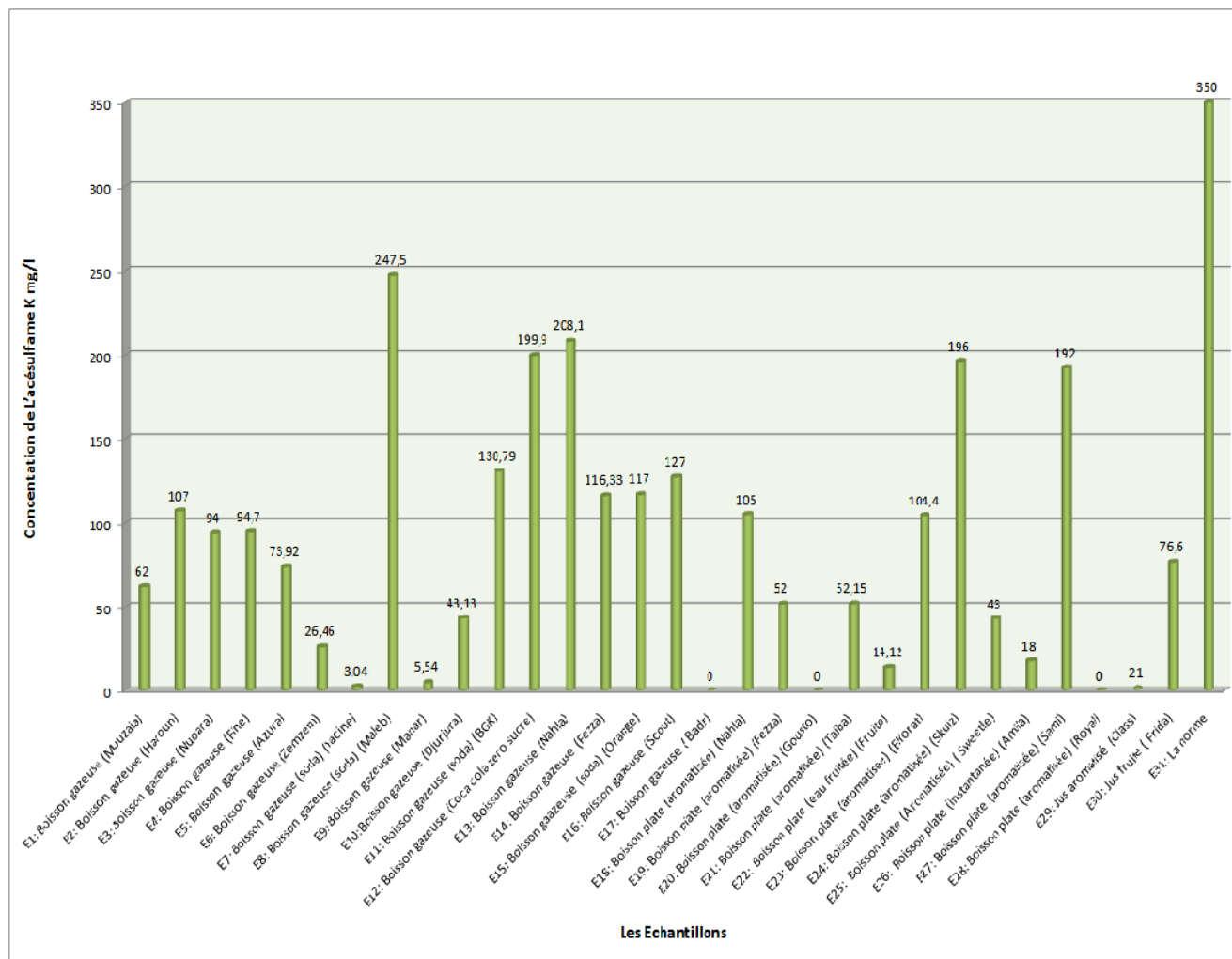


Figure 8: Diagramme de distribution de l'acésulfame dans les différents échantillons

La teneur moyenne en acésulfame de nos échantillons semble être supérieure à celle trouvée par ORAWAN et JAROON (2011) qui est estimée à moins de 3,6 mg/l dans les boissons en utilisant l'HPLC comme technique de dosage. BERGAMO *et al.* (2011) ont obtenu une teneur moyenne en acésulfame de 20 mg/l dans les boissons gazeuses analysées type «cola» en employant une méthode électro phorétique. Selon un rapport édité par l'INRA en 2012 (ANONYME, 2012) concernant des données sur le secteur des boissons rafraichissantes sans alcool pour l'année 2010, la teneur moyenne en acésulfame K des différentes boissons a été estimée à 58 mg/l. selon LINDEN et LORIENT (1994), l'emploi de l'acésulfame K est autorisé dans certains pays avec une valeur limite, dans d'autres sans limite suite aux résultats favorables des études d'innocuité pour la santé. MUKHOPADHYAY *et al.* (2000) ont montré l'absence d'effet génotoxique de l'acésulfame K en combinaison avec l'aspartame.

1-3 L'aspartame

Dans nos échantillons, la teneur en aspartame se trouve osciller entre 0 mg/l et 500 mg/l avec une moyenne estimée à 204,62 mg/l, sans toutefois dépassée les normes algériennes ou

celles du codex. Trente pour cent des échantillons ont une teneur en aspartame inférieure ou égale à 100 mg/l et plus de 43% ont une teneur comprise entre 100 et 300 mg/l. Le reste des échantillons (26,67%) ont une teneur qui n'excède pas les normes prédéfinie (600 mg/l) (figure 9).

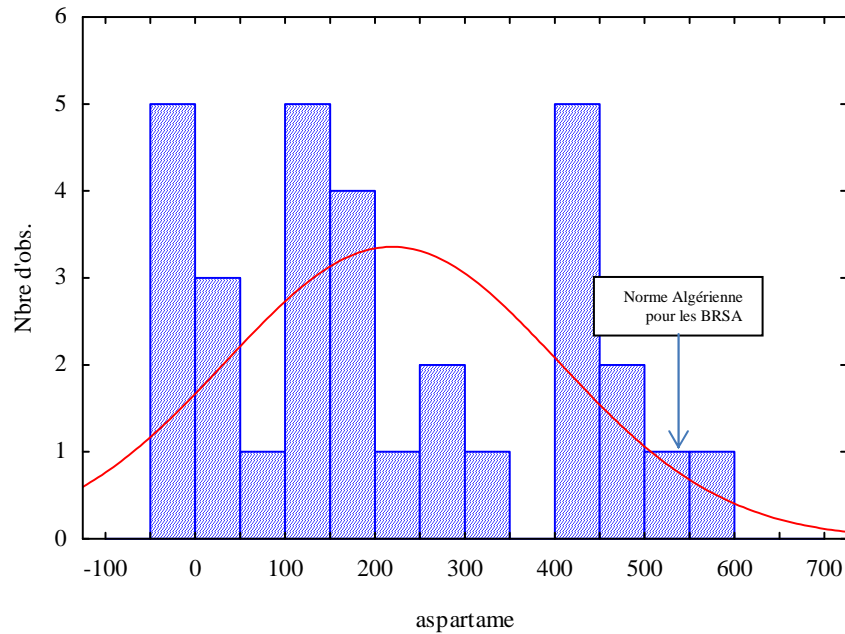


Figure 9: Répartition des valeurs de l'aspartame dans les BRSA

Cinq échantillons dont deux boissons gazeuses (Yacine et Badr) et trois boissons plates (Fruito, Royal et Sweetlet) sont exempt d'aspartame, par contre la teneur maximale est observée pour un seul échantillon (une boisson gazeuse, Elmanar) (figure 10). Aucun échantillon n'a dépassé la norme.

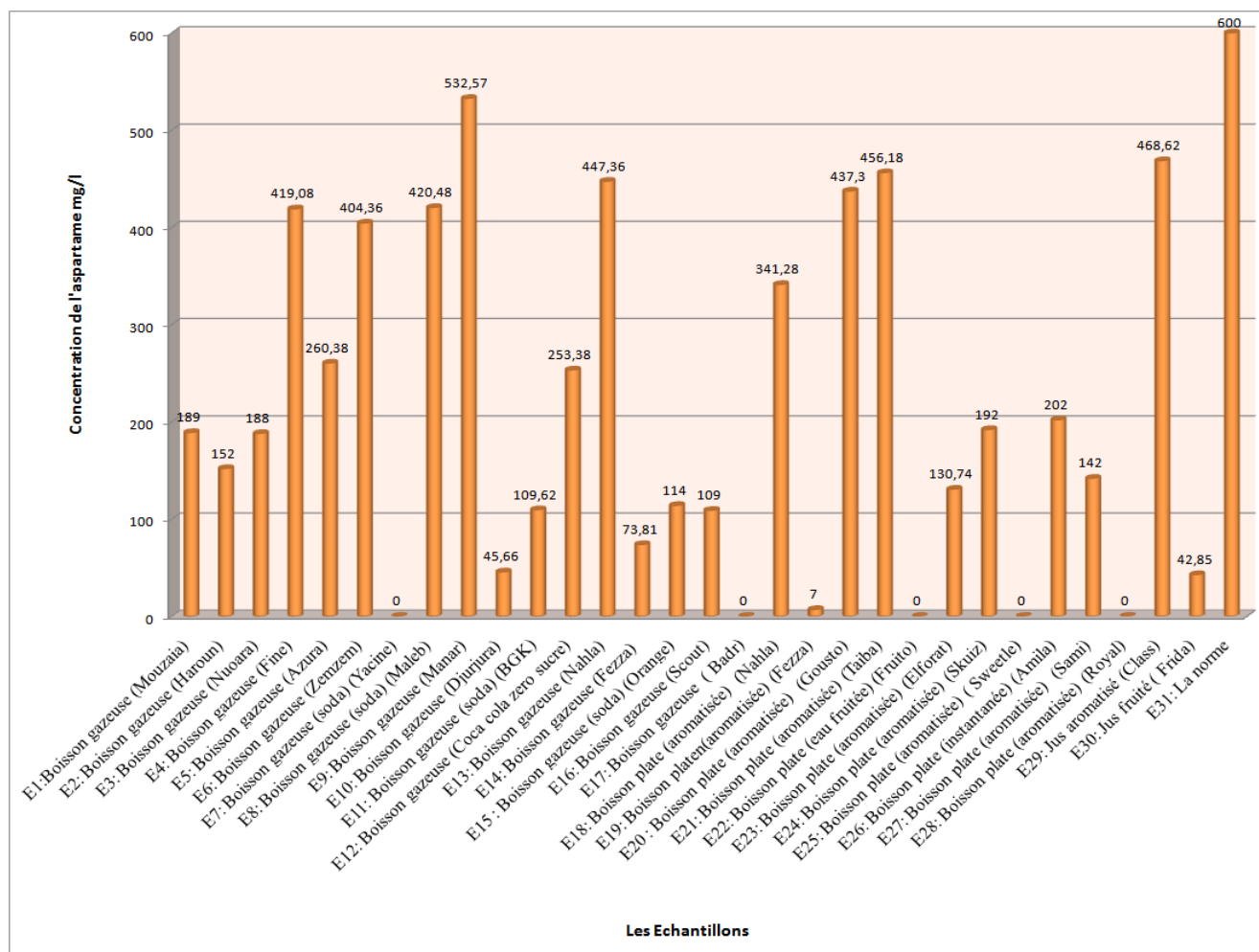


Figure 10: Diagramme de distribution de l'aspartame dans les différents échantillons

A l'exception de quelques échantillons (huit dont la teneur est inférieure à 50 mg/l), tous les autres boissons présentent des teneurs très élevées comparativement à plusieurs autres travaux. Ainsi, BERGAMO *et al.* (2011) ont estimé la teneur moyenne en aspartame dans les boissons gazeuses 20 mg/l; MAZUREK et SZOSTAK (2001) ont trouvé une teneur moyenne de 25.66 mg/l en analysant des produits édulcorée. En 2008 et en utilisant la CLHP comme outil d'investigation des édulcorants, MEDEIROS *et al.* (2008) ont trouvé une teneur moyenne de 66 mg/l pour les jus et 118 mg/l pour les boissons gazeuses. Une étude française qui a porté sur un échantillon de 763 BRSA (ANONYME, 2012) montre que la teneur moyenne en aspartame est estimée à 29 mg/l.

Les effets de l'aspartame sont étudiés par plusieurs auteurs. ALLEVA *et al.* (2011) ont décrit l'effet de l'aspartame comme étant un activateur de l'angiogenèse et qu'il provoque finalement la prolifération des cellules endothéliales. Des symptômes neurologiques peuvent être remarqués suite à la consommation de fortes concentrations d'aspartame. Les métabolites de l'aspartame peuvent partiellement inhiber l'activité des membranes des érythrocytes. Ils peuvent aussi diminuer l'activité enzymatique (TSAKIRIS *et al.*, 2006). L'ADA (Américain

Dietetic Association) confirme que l'aspartame n'est pas cancérigène et n'est pas associé à aucune conduite nerveuse (ADA, 2004). L'élargissement de la gamme des produits contenant de l'aspartame augmente le choix des diabétiques ou des obèses tout en facilitant la prévention de la carie et de la prise de poids, signale LINDEN et LORIENT (1994).

1-4 La saccharine

La saccharine est présente dans les échantillons des BRSA à des teneurs plutôt faible, voire nulle dans 17 échantillons (figure 11). Cette faiblesse s'explique par le respect des producteurs vis-à-vis de la réglementation en vigueur et qui limite l'utilisation de la saccharine à 80 mg/l pour les boissons aromatisées et 100 mg/l pour les boissons gazeuses. Ainsi, la teneur en saccharine varie de 0 mg/l à 200 mg/l avec une moyenne estimée à 33,02 mg/l. 80% des échantillons sont conformes, 20% non conformes.

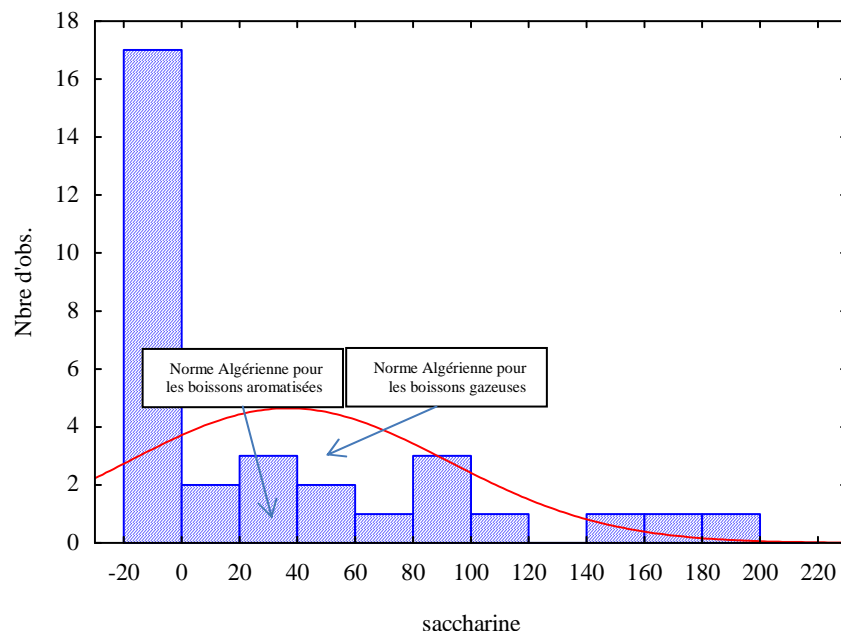


Figure 11: Répartition des valeurs de la saccharine dans les BRSA

Parmi les 20% d'échantillons non conformes, on distingue deux boissons gazeuses (Zemzem et Yacine) et trois boissons plates (Fezza, Fruito, Elforat) et un jus (Frida) (figure 12). Les échantillons exempts de saccharine se répartissent entre les boissons gazeuses (70,59%) et les boissons plates (29,41%).

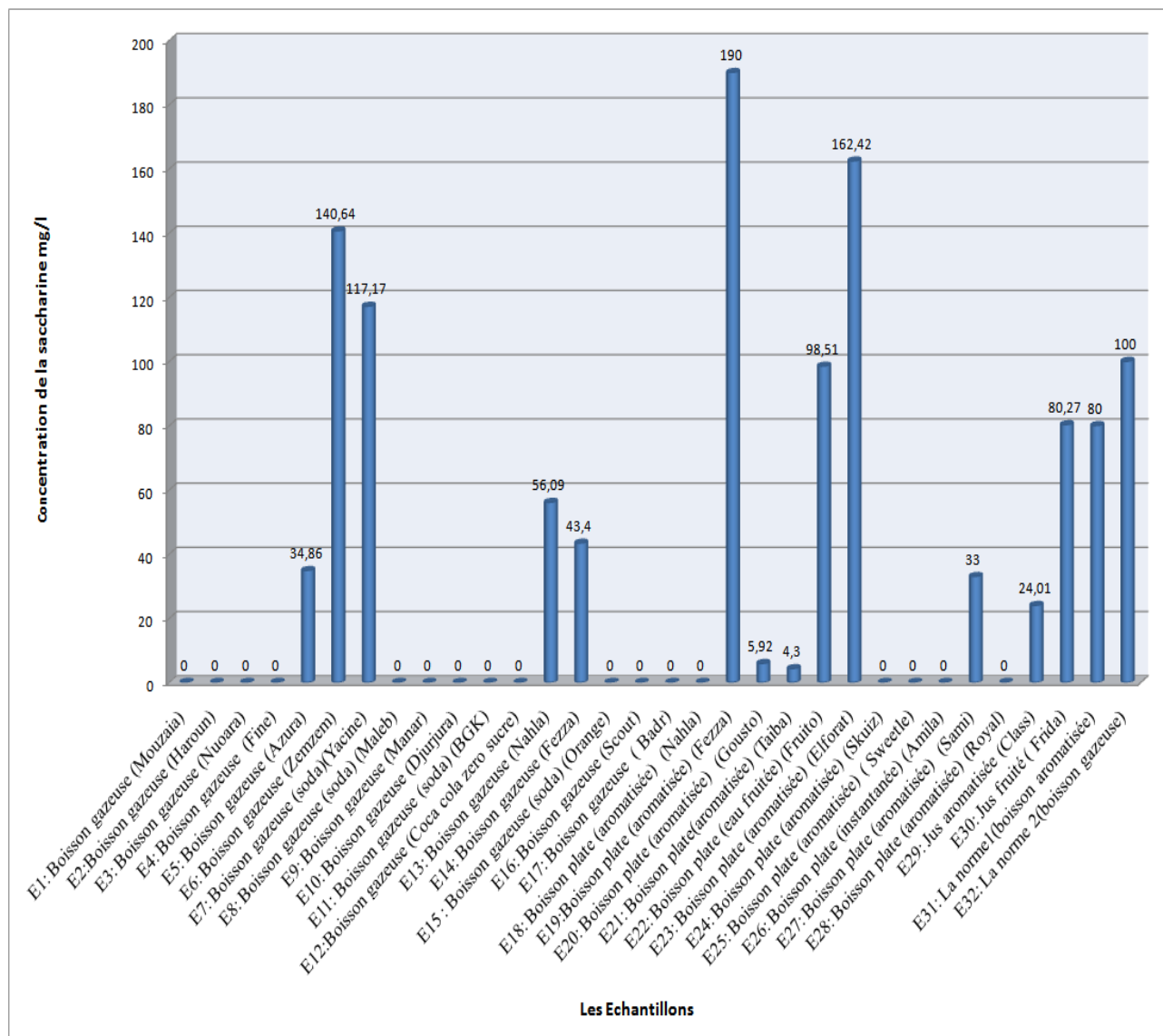


Figure 12: Diagramme de distribution de la saccharine dans les différents échantillons

La saccharine grâce à son pouvoir sucrant (500), présente un intérêt dans le secteur des boissons. Aux États-Unis d'Amérique, il est recommandé d'utiliser cet édulcorant avec prudence chez l'enfant et la femme enceinte (LINDEN et LORIENT, 1994), bien que les saccharines commerciales n'aient pas d'effet mutagène.

BERGAMO *et al.*, (2011) ont trouvé une teneur moyenne en saccharine dans les boissons gazeuses de l'ordre de 32 mg/l. Cette valeur se rapproche de la teneur moyenne de nos échantillons estimé à 33,02 mg/l. elle est bien supérieure à celle constatée par ORAWAN et JAROON (2011) qui est de 4.0 mg/l.

La consommation des boissons chargées en édulcorant déséquilibre le métabolisme qui cause finalement l'obésité (ANTON *et al.*, 2010). L'utilisation des deux édulcorants l'aspartame et la saccharine augmente rapidement le poids (MATOS *et al.*, 2012).

1-5 Le cyclamate

L'utilisation de cyclamate est prohibée par la réglementation Algérienne. Tous les échantillons des BRSA sont exempts de cyclamate à l'exception d'un seul cas (figure 13). La concentration moyenne est estimée à 0,04 mg/l.

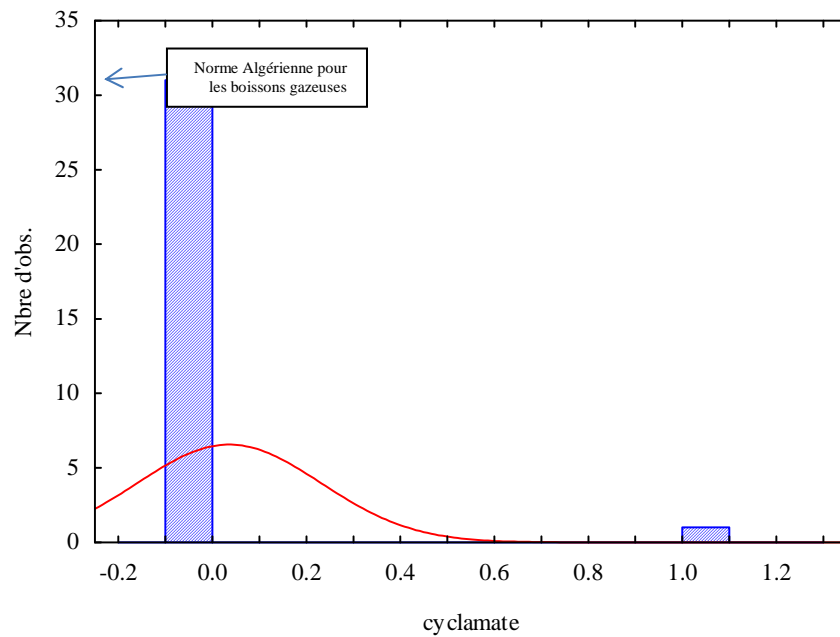


Figure 13: Répartition des valeurs du cyclamate dans les BRSA

Le seul cas de présence de cyclamate est une boisson plate aromatisée «sami» avec une teneur de 1,1 mg/l (figure 14).

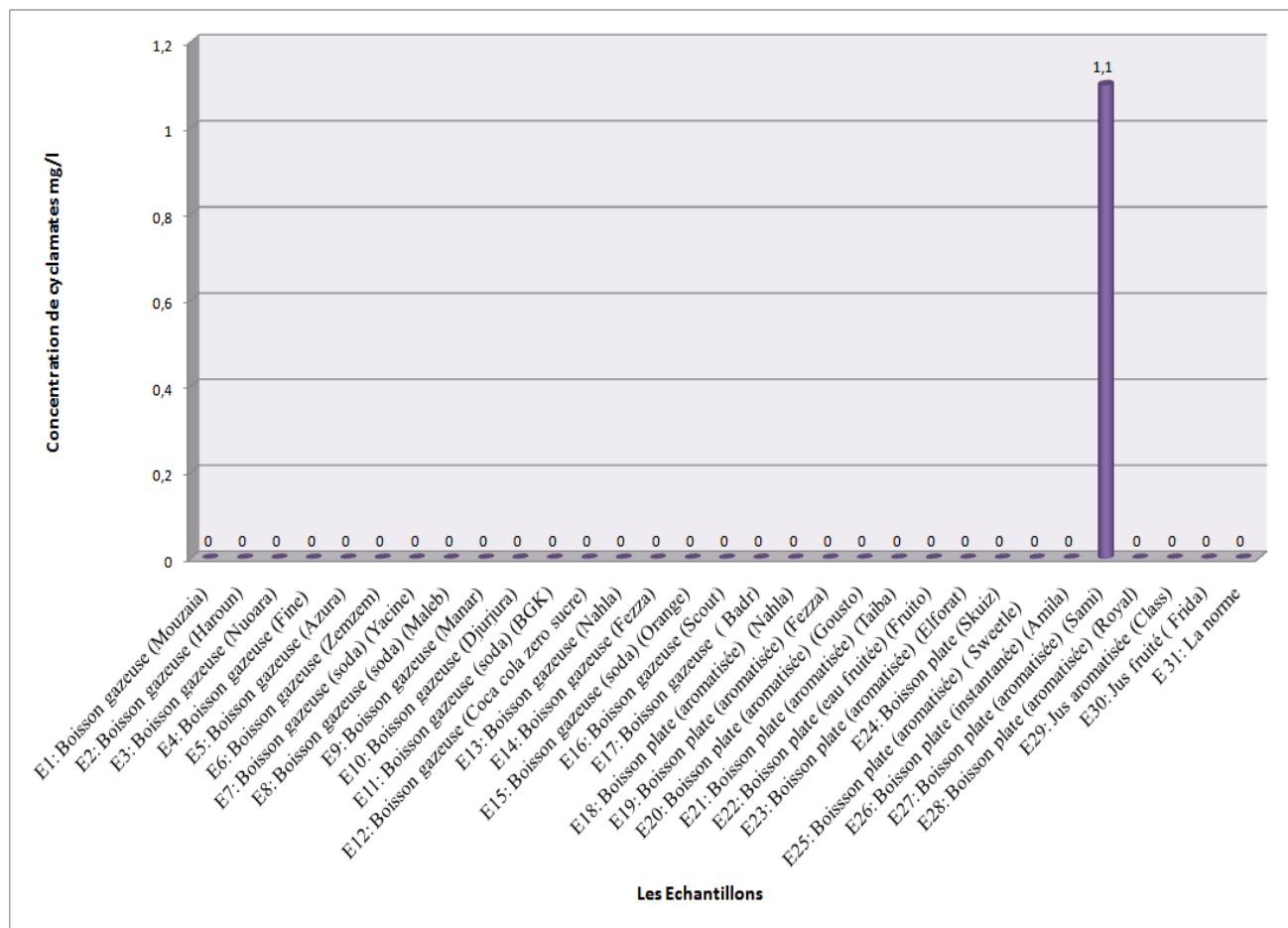


Figure 14: Diagramme de distribution du cyclamate dans les différents échantillons

Si le législateur Algérien interdit l'emploi de cyclamate dans les boissons, le codex alimentarius tolère une teneur de 400 mg/l dans les nectars de fruit. Les boissons analysées par BERGAMO *et al.* (2011) présentent une teneur moyenne de l'ordre de 30 mg/l. une teneur moyenne de 127 mg/l a été trouvée par SHENGBING *et al.* (2012) dans les jus de fruit en employant une chromatographie gazeuse. MEDEIROS *et al.*(2008) ont trouvé par CLHP des teneurs en cyclamate de 31.5mg/l dans les boissons et 122 mg/l dans les jus par contre HASHEMI *et al.*(2011) ont constaté une teneur de 115.33mg/l.

1-6 Conformité des échantillons

Sur les trente échantillons analysés, 76,67% sont révélés conforme à la réglementation en vigueur en matière des additifs alimentaires autorisés dans les denrées alimentaires, le reste c'est dire 23,33% sont non conformes à la dite réglementation (figure 15).

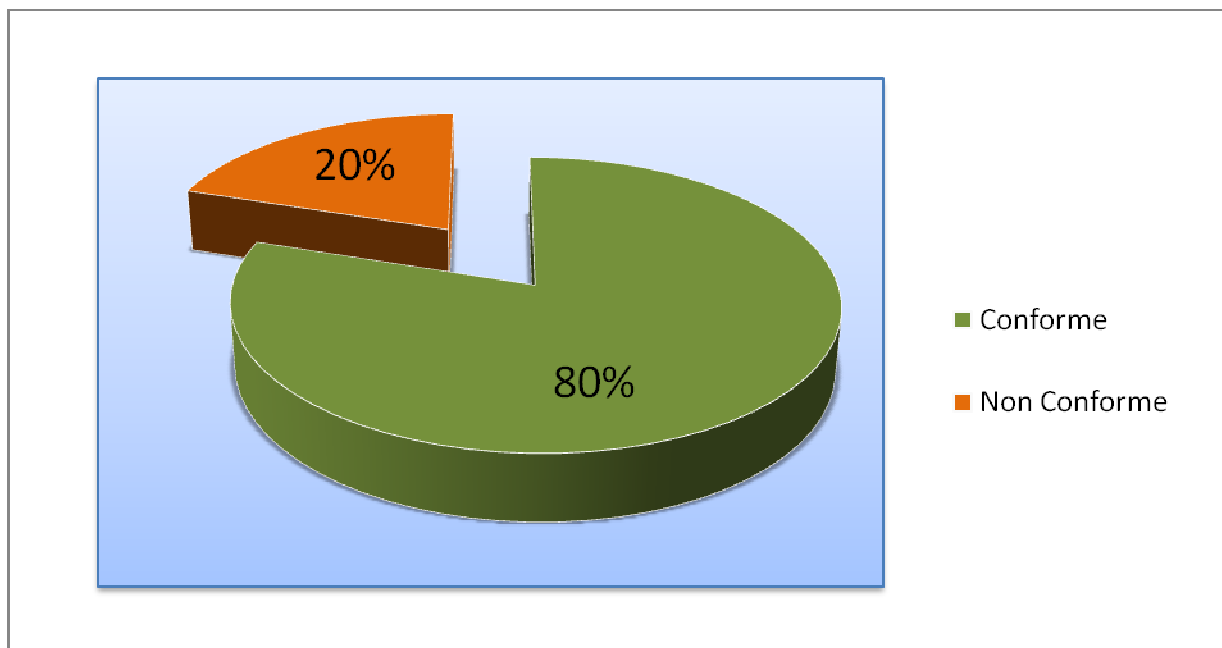


Figure 15: Conformité des BRSA

Cette non-conformité est due:

- A la présence de cyclamate dans un échantillon (boisson plate aromatisée «sami»)
- Taux dépassé pour la saccharine par deux boissons gazeuses (Zemzem «140,64 mg/l» et Yacine «117,17 mg/l») et trois boissons plates (Fezza «190 mg/l», Fruito «98,51 mg/l», Elforat «162,42 mg/l») et un jus (Frida «80,27»).

2- Qualité microbiologique des boissons rafraichissantes

La qualité microbiologique des boissons rafraichissantes sans alcool est interprétée conformément à l'arrêté interministériel du 24 janvier 1998 (JORA, 1998). Elle est estimée par le qualificatif satisfaisant ou non satisfaisant, en adoptant le plan à deux classes pour les paramètres coliformes fécaux, streptocoques D, clostridium sulfito-réducteurs et moisissures (dans le cas des boissons gazeuses sucrées), les paramètres coliformes et clostridium (dans le cas des jus et eaux fruitées) ou le plan à trois classes pour les paramètres coliformes et levures (dans le cas boissons gazeuses sucrées), les paramètres levures et moisissures (dans le cas des jus et eaux fruitées). Un paramètre faisant défaut conduit à la qualité non satisfaisante.

Ainsi, il ressort des résultats obtenus (tableau 11) que sur les trente échantillons analysés, seulement quatre (13.33%) sont de qualité non satisfaisante (figure 16). Il s'agit en effet de deux boissons gazeuses «Mouzaia et Haroun» et deux boissons aromatisées «Sami et Skuiz».

Tableau 11: Résultats des analyses microbiologiques effectuées

Echantillon/ Micro-organisme	Coliforme /100ml	Coliformes fécaux /100ml	Streptocoques D/50ml	Spores anaérobies SR 46°C /20ml	Levure /ml	Moisissures /ml	Résultat
e1 : Boisson aromatisée «Nahla»	Abs dans les 5U	Abs dans les 5U	Abs dans les 5U	Abs dans les 5U	Abs dans les 5U	Abs dans les 5U	e de qualité microbiologique satisfaisante
e2 : Boisson aromatisée «Fezza»	Abs dans les 5U	Abs dans les 5U	Abs dans les 5U	Abs dans les 5U	Abs dans les 5U	Abs dans les 5U	e de qualité microbiologique satisfaisante
e3 : Boisson gazeuse «Mouzaia»	2.10 ² Dans 1U 3,4.10 ¹ dans 1U 2,8.10 ³ dans 1U Abs dans 2U	1,2.10 ⁰ dans 1U 1,5.10 ² dans 1U Abs dans les 3U	Abs dans les 5U	Abs dans les 5U	3,0.10 ³ dans 1U 2,5.10 ² dans 1U 1,9.10 ³ dans 1U Abs dans 2U	Abs dans les 5U	e de qualité microbiologique non satisfaisante
e4 : Boisson gazeuse «Haroun»	Abs dans les 5U	Abs dans les 5U	Abs dans les 5U	Abs dans les 5U	4,0.10 ³ dans 2U 1,8.10 ³ dans 1U 1,6.10 ² dans 1U <10 ⁴ dans 1U	2,4.10 ³ dans 1U Abs dans les 4U	e de qualité microbiologique non satisfaisante
e5 : Boisson gazeuse «Nuoara»	Abs dans les 5U	Abs dans les 5U	Abs dans les 5U	Abs dans les 5U	Abs dans les 5U	Abs dans les 5U	e de qualité microbiologique satisfaisante
e6: Boisson gazeuse édulcorée	Abs dans les 5U	Abs dans les 5U	Abs dans les 5U	Abs dans les 5U	Abs dans les 5U	Abs dans les 5U	e de qualité microbiologique satisfaisante

«Fine»							
e7: Boisson aromatisée «Gousto»	Abs dans les 5U	Abs dans les 5U	Abs dans les 5U	Abs dans les 5U	Abs dans les 5U	Abs dans les 5U	e de qualité microbiologique satisfaisante
e8: Boisson gazeuse «Azur»	Abs dans les 5U	Abs dans les 5U	Abs dans les 5U	Abs dans les 5U	Abs dans les 5U	Abs dans les 5U	e de qualité microbiologique satisfaisante
e9: Boisson gazeuse «Zemzem»	Abs dans les 5U	Abs dans les 5U	Abs dans les 5U	Abs dans les 5U	Abs dans les 5U	Abs dans les 5U	e de qualité microbiologique satisfaisante
e10: Soda «Yacine»	Abs dans les 5U	Abs dans les 5U	Abs dans les 5U	Abs dans les 5U	Abs dans les 5U	Abs dans les 5U	e de qualité microbiologique satisfaisante
e11: Boisson aromatisée «Taiba»	Abs dans les 5U	Abs dans les 5U	Abs dans les 5U	Abs dans les 5U	Abs dans les 5U	Abs dans les 5U	e de qualité microbiologique satisfaisante
e12: Soda «Maleb»	Abs dans les 5U	Abs dans les 5U	Abs dans les 5U	Abs dans les 5U	Abs dans les 5U	Abs dans les 5U	e de qualité microbiologique satisfaisante
e13: Eau fruitée «Fruito»	Abs dans les 5U	Abs dans les 5U	Abs dans les 5U	Abs dans les 5U	Abs dans les 5U	Abs dans les 5U	e de qualité microbiologique satisfaisante
e14: Boisson gazeuse «Elmanar»	Abs dans les 5U	Abs dans les 5U	Abs dans les 5U	Abs dans les 5U	Abs dans les 5U	Abs dans les 5U	e de qualité microbiologique satisfaisante
e15: Boisson aromatisée «Elforat»	Abs dans les 5U	Abs dans les 5U	Abs dans les 5U	Abs dans les 5U	Abs dans les 5U	Abs dans les 5U	e de qualité microbiologique satisfaisante
e16: Boisson gazeuse «Djurdjura»	Abs dans les 5U	Abs dans les 5U	Abs dans les 5U	Abs dans les 5U	Abs dans les 5U	Abs dans les 5U	e de qualité microbiologique satisfaisante
e17: Jus aromatisé	Abs dans les 5U	Abs dans les 5U	Abs dans les 5U	Abs dans les 5U	Abs dans les 5U	Abs dans les 5U	e de qualité microbiologique

instantanée «Amila»	les 5U	les 5U	les 5U	les 5U	les 5U	les 5U	µbiologique satisfaisante
e28: Boisson aromatisée «Sami»	Abs dans les 5U	Abs dans les 5U	Abs dans les 5U	Abs dans les 5U	1,0.10 ⁴ dans3U 3,0.10 ¹ dans1U 1,0.10 ¹ dans1U	Abs dans les 5U	e de qualité µbiologique non satisfaisante
e29: Boisson gazeuse «Badr»	Abs dans les 5U	Abs dans les 5U	Abs dans les 5U	Abs dans les 5U	Abs dans les 5U	Abs dans les 5U	e de qualité µbiologique satisfaisante
e30: Boisson aromatisée «Royal»	Abs dans les 5U	Abs dans les 5U	Abs dans les 5U	Abs dans les 5U	Abs dans les 5U	Abs dans les 5U	e de qualité µbiologique satisfaisante
La norme (arrêté interministériel, 1998)	<10	Absence	Absence	Absence	10	Absence	

U: unité, µ: micro, e: échantillon, Abs : Absence.

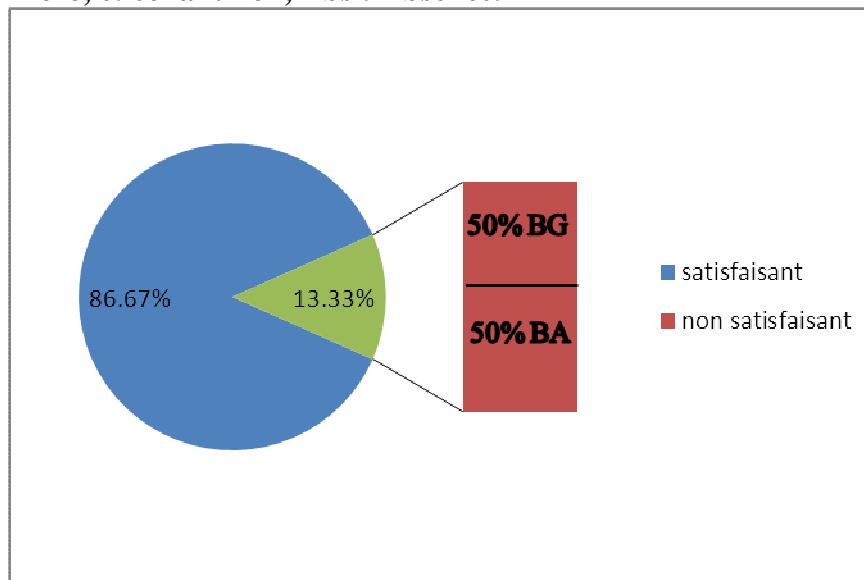


Figure 16: Qualité microbiologique des échantillons

La non-conformité de ces boissons est due:

- Uniquement aux teneurs élevées en levures pour les boissons aromatisées «Skuiz» et «Sami» pour lesquelles les cinq unités de «Skuiz» dépassent la norme estimée à 20

levures/ml (rapport c/n = 1>2/5) (Annexe 4) et quatre unités de «Sami» dépassent la norme (4/5>2/5).

- Aux levures et aux moisissures pour la boisson gazeuse «Haroun» dont toutes les unités ont des teneurs supérieures à la norme pour les levures (5/5>2/5) et une unité qui dépasse la norme pour les moisissures (1/5>0).
- Aux levures et aux coliformes (totaux et fécaux) pour la boisson gazeuse «Mouzaia» pour laquelle les premières dépassent la norme fixée à 10 levures/ml dans trois unités d'où un rapport de 3/5 supérieur à 2/5 et les seconds dépassent la norme fixée à 10 coliformes par 100 ml pour les coliformes totaux et absence dans 100 ml pour les coliformes fécaux dans trois unités (3/5>2/5) pour les coliformes totaux et dans deux unités (2/5>0) pour les coliformes fécaux.

Nous constatons ainsi que la qualité non satisfaisante des échantillons est due principalement aux levures, ensuite aux moisissures et aux coliformes. LARPENT et CHOUETTE (1997) soulignent que les levures sont les principaux agents d'altération des boissons. Il est à signaler que la flore originelle des boissons provient essentiellement des fruits et légumes qui en constituent la matière première (LEYRAL et VIEILING, 2007) et que d'autres contaminations sont apportées par le sucre et les sirops sucrés (levures osmophiles, moisissures), par le matériel utilisé pour la fabrication (levures et moisissures) et par les manipulations (germes de contamination fécale) (GUIRAUD, 1998). Ces altérations se manifestent par des modifications de l'aspect, de l'odeur et du goût comme elles se traduisent par l'augmentation de la pression dans les récipients (BOURGEOIS *et al.*, 1996) qui résultent des fermentations qu'elles soient rapides comme c'est le cas de *Saccharomyces cerevisiae* ou lente comme *Zygosaccharomyces bailii* (LARPENT et CHOUETTE, 1997). GUIRAUD (1998) signale que ces altérations sont peu dangereuses du point de vue sanitaire mais elles ont une grande importance du point de vue économique.

Plusieurs travaux révèlent une certaine constance dans la nature des espèces isolées à partir des boissons rafraichissantes sans alcool, avec toutefois des particularités importantes dans le cas des produits dans lesquels le saccharose est remplacé par des édulcorants (BOURGEOIS *et al.*, 1996). Les boissons rafraichissantes sont donc des produits sélectifs. Cette sélectivité est due à l'effet des agents du milieu, notamment du bas pH, de la forte concentration en CO₂ et de la forte pression osmotique due à la présence de sucre (LARPENT et CHOUETTE, 1997) et seuls les germes acidophiles et osmophiles pourront se multiplier (GUIRAUD, 1998). BOURGEOIS *et al.* (1996) stipulent que la microflore des boissons récemment

préparées peut être assez variée mais, dans les jours qui suivent le soutirage, de nombreuses espèces de microorganismes disparaissent sous l'effet des dits agents sélectifs.

Le taux de prévalence des coliformes est estimé à 3.33%. Ce taux est très largement inférieur à celui obtenu par AKNOD *et al.* (2009) en Bangladesh. Ces derniers ont détecté les coliformes totaux dans 68-100% et les coliformes fécaux dans 76-100% des échantillons analysés (225 échantillons de boissons gazeuses répartis équitablement entre neuf marques). Ces auteurs estiment aussi que 90% des échantillons sont en désaccord avec les directives de l'organisation mondiale de la santé de 1997 tant pour les coliformes totaux (en moyenne 5-213 Ufc/100 ml) que pour les coliformes fécaux (en moyenne 3-276 Ufc/100 ml).

Les coliformes ont aussi été détecté dans 48% des échantillons de boissons gazeuses type «Soda» aux états unis par WHITE *et al.* (2010) avec 11% contaminés en *E. coli*.

Dans notre étude les levures ont été détectée dans 13.33% des échantillons analysés et les moisissures dans seulement 3.33%. La flore fongique représente 23% des microorganismes isolés de 90 échantillons de boissons non alcoolisées en Nigeria par ORANUSI *et al.* (1994); 16% d'entre elles sont des levures identifiées comme étant *Saccharomyces cerevisiae* et 7% des moisissures représentées par *Aspergillus niger*. Selon ces mêmes auteurs *Aspergillus* est détecté à 100% dans la boisson «Soda» par contre *Saccharomyces* est décelé à 40% dans la boisson «Orange» et à 60% dans la boisson «Soda». D'autre part tous les isolats sont des saprophytes et non des pathogènes ce qui confirme l'hypothèse émise précédemment par GUIRAUD (1998).

3- Profils chimique et microbiologique de boissons rafraichissantes

L'ACP réalisée sur les 30 échantillons des boissons rafraichissantes sans alcool nous a permis de distinguer deux grands axes de variation qui forment le premier plan en rapportant 60,25% de la variabilité totale (figure17).

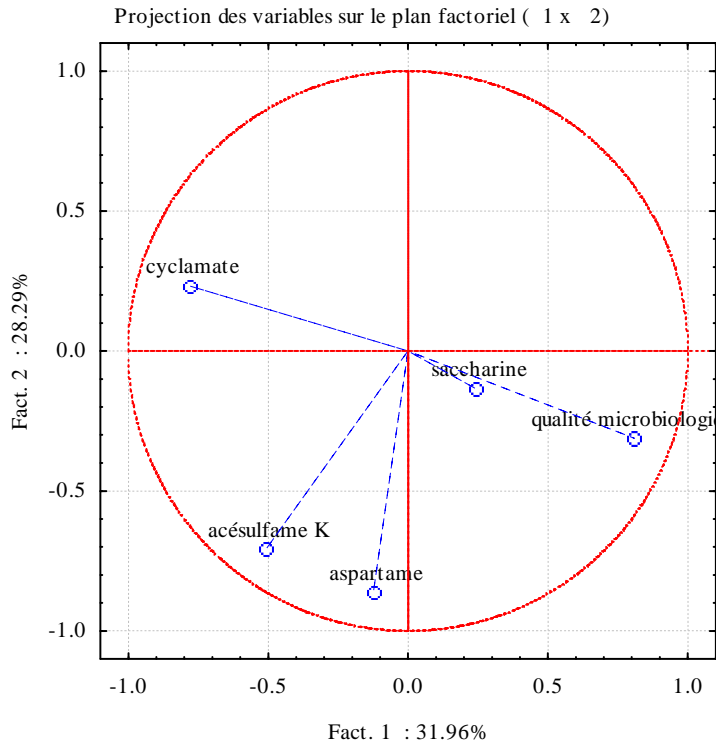


Figure 17: Représentation des cinq variables actives sur le premier plan de l'ACP

Le premier axe, en expliquant 31,96% de la variation totale, oppose la qualité microbiologique et la richesse des boissons en saccharine (liaison positive avec le premier facteur) à celles renfermant les cyclamates (liaison négative avec le premier facteur). Quant au deuxième axe, il représente 28,29% de la variation totale et traduit la qualité chimique des boissons liée aux variables acésulfame K et l'aspartame (les deux variables sont liées négativement avec le second facteur).

Les variables (qualité microbiologique, saccharine) et cyclamate sont diamétralement opposées, de ce fait elles sont corrélées négativement et varient de manière inversement proportionnelle. D'autre part, il faut signaler qu'il y'a un seul échantillon qui renferme de cyclamate, et que la qualité microbiologique est liée à la présence de saccharine. L'acésulfame K et l'aspartame sont plus ou moins corrélés positivement entre eux (tableau12).

Tableau 12: Etude des corrélations

Corrélations significatives marquées à $p < .05000$ N=30 (Observations à VM ignorées)

	acésulfame K	aspartame	saccharine	cyclamate
acésulfame K	1.00	0.14	-0.16	0.29
aspartame	0.14	1.00	-0.23	-0.07
saccharine	-0.16	-0.23	1.00	-0.00
cyclamate	0.29	-0.07	-0.00	1.00

La projection, réalisée sur les 30 échantillons des boissons rafraichissantes sans alcool et sur les deux normes, sur le plan factoriel (1x2) de l'ACP est représentée sur la figure 18.

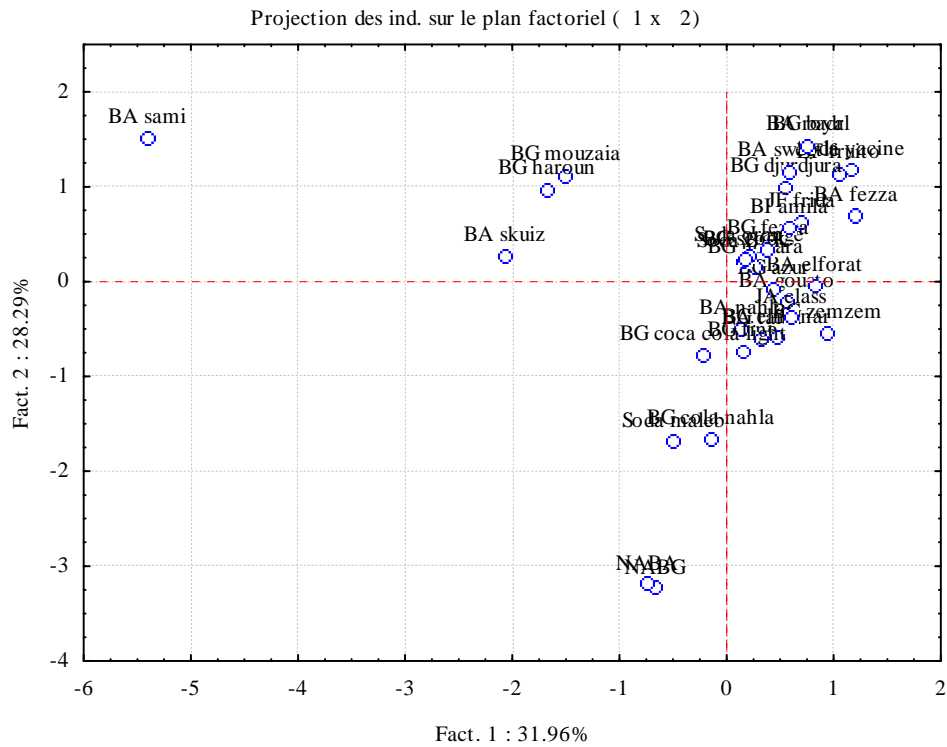


Figure 18: Projection des boissons BRSA sur le plan factoriel (1x2)

La classification hiérarchique issue de cette ACP a permis de distinguer quatre classes de boissons BRSA (figure 19) dont les caractéristiques sont précisées au tableau 13.

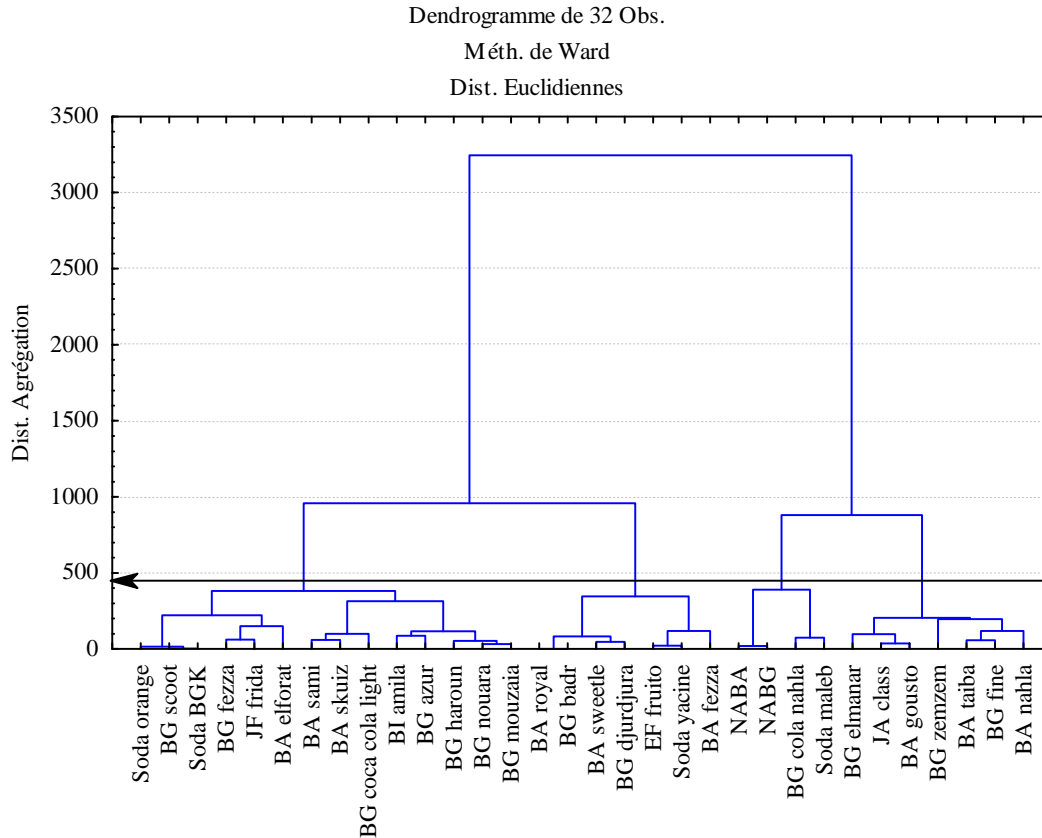


Figure 19: Dendrogramme de la classification hiérarchique des boissons

Tableau 13: Caractéristiques des classes des boissons issues de la classification hiérarchique

Classe des boissons	C1	C2	C3	C4	P*
Effectif	7	2	7	14	
acésulfame K	40.85	227.80	22.18	115.35	***
aspartame	437.06	433.92	7.52	154.20	***
saccharine	24.98	28.05	57.95	25.28	ns
cyclamate	0.00	0.00	0.00	0.08	ns
qualité microbiologique	100% S ^{°°}	100% S	100% S	71.43% S 28.57% NS	ns

[°] Signification statistique de l'analyse de variance : ns: non significatif, * significatif à 5%, ** significatif à 1%, *** significatif à 0,1%

^{°°} S: satisfaisante; NS: non satisfaisante

- Les boissons de la classe 1 (figure 20) renferment des teneurs moyennes en acésulfame K assez faibles (40.85 mg/l). Cependant, elle regroupe les boissons les plus chargées en aspartame (437.06 mg/l) et les moins chargées en saccharine (24.98 mg/l). Elle est caractérisée par une qualité microbiologique satisfaisante et absence totale de cyclamate.

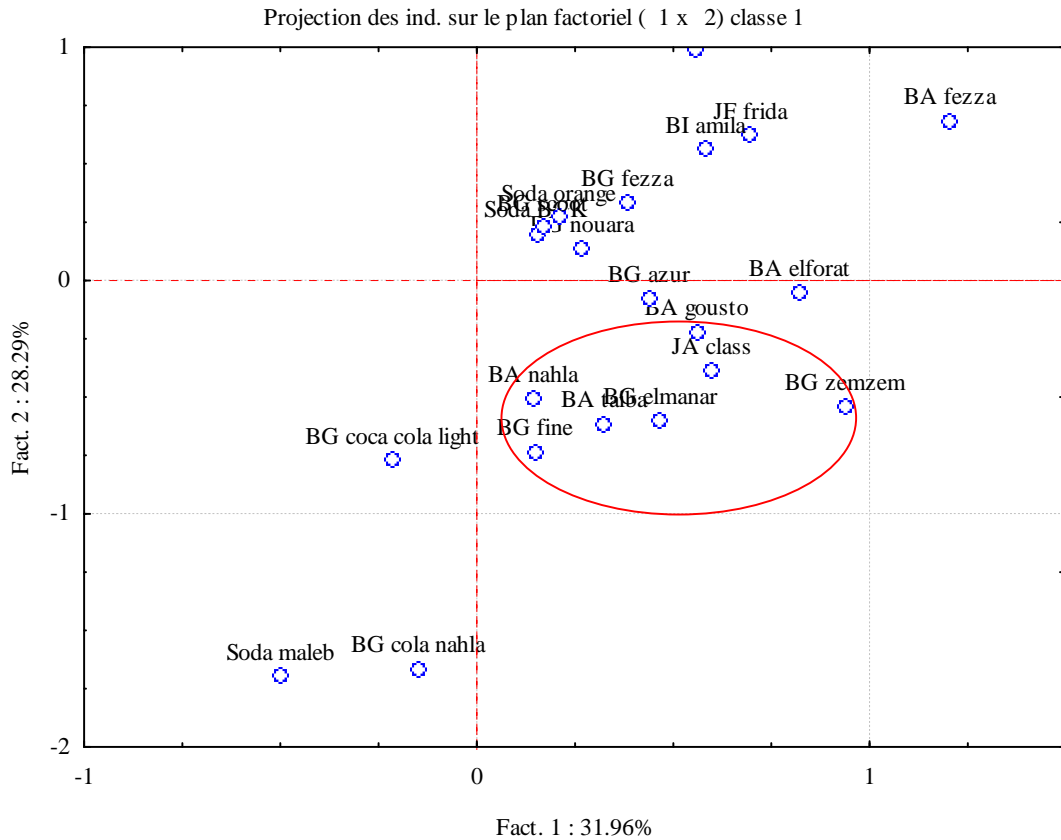


Figure 20: Projection des individus de la classe 1

- La classe 2 regroupe uniquement deux échantillons en plus des deux normes (figure 21), les plus chargés en acésulfame K (227.80 mg/l) et se rapproche de la classe 1 en matière de teneur en aspartame, estimée moyennement à 433.92 mg/l. ces deux boissons sont aussi exempt de cyclamate comme elles sont de bonne qualité microbiologique.

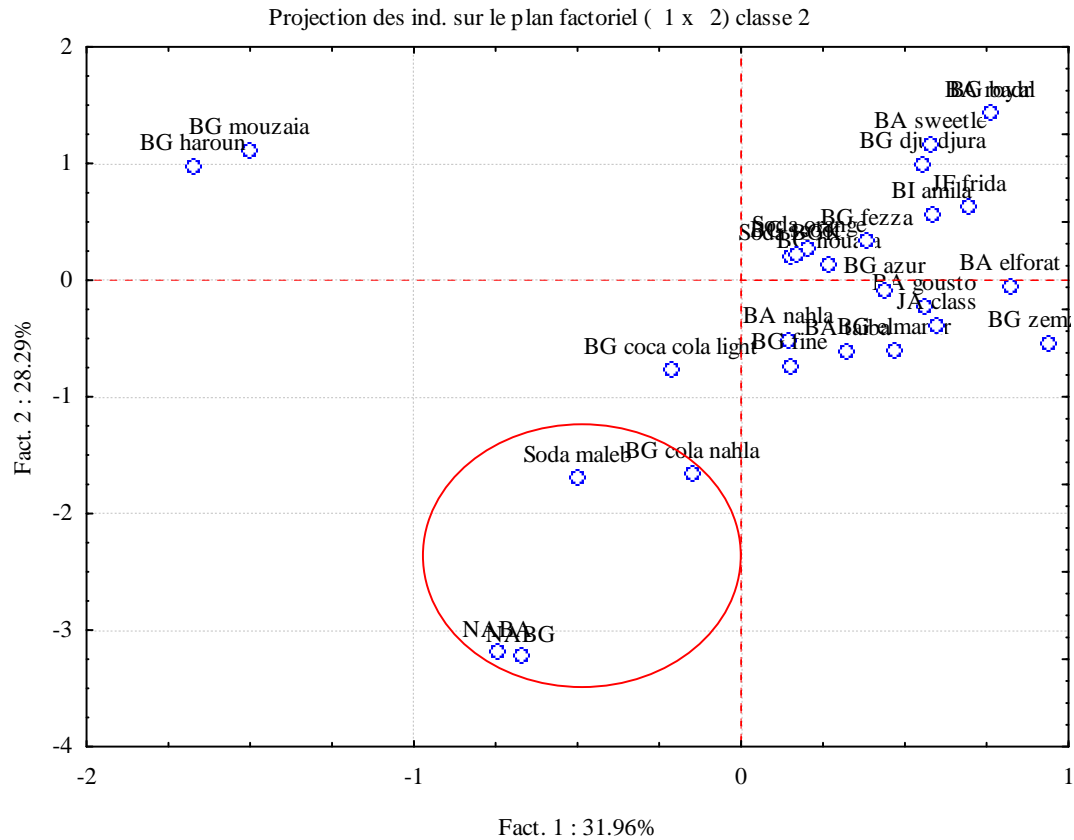


Figure 21: Projection des individus de la classe 2

- Les boissons de la classe 3 (figure 22) sont de meilleures qualités microbiologique (tous de qualité microbiologique satisfaisante) et chimique (les moins chargées en acésulfame K, 22.18 mg/l et de loin à teneur très faible en aspartame estimée à 7.52 mg/l) bien qu'elles soient plus riches en saccharine (57.95 mg/l) par rapport aux autres classes. L'absence de cyclamate est aussi notée dans cette classe.

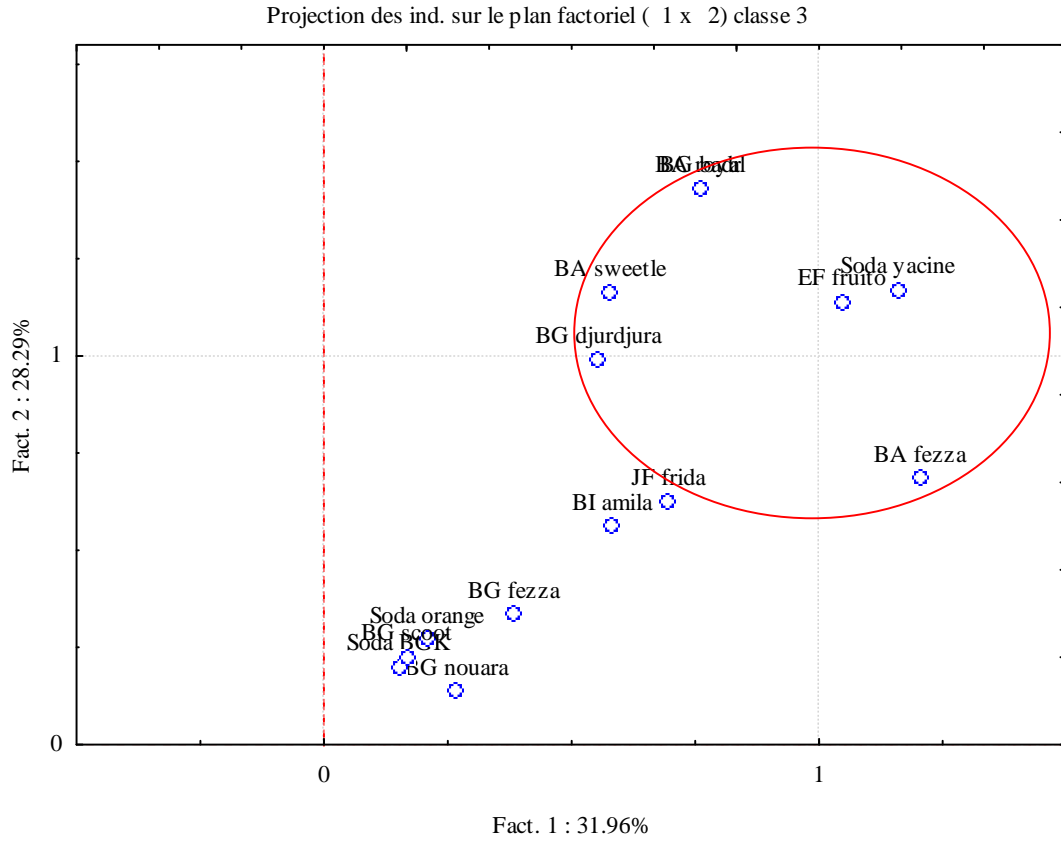


Figure 22: Projection des individus de la classe 3

- Plus de 46% des boissons appartiennent à la quatrième classe (figure 23), avec 28.57% des boissons sont de qualité microbiologique non satisfaisante et dont un échantillon qui accuse la présence de cyclamate. Cette classe renferme cependant des boissons à teneur intermédiaire en acésulfame K (115.35 mg/l) et en aspartame (154.20 mg/l) entre les trois autres classes.

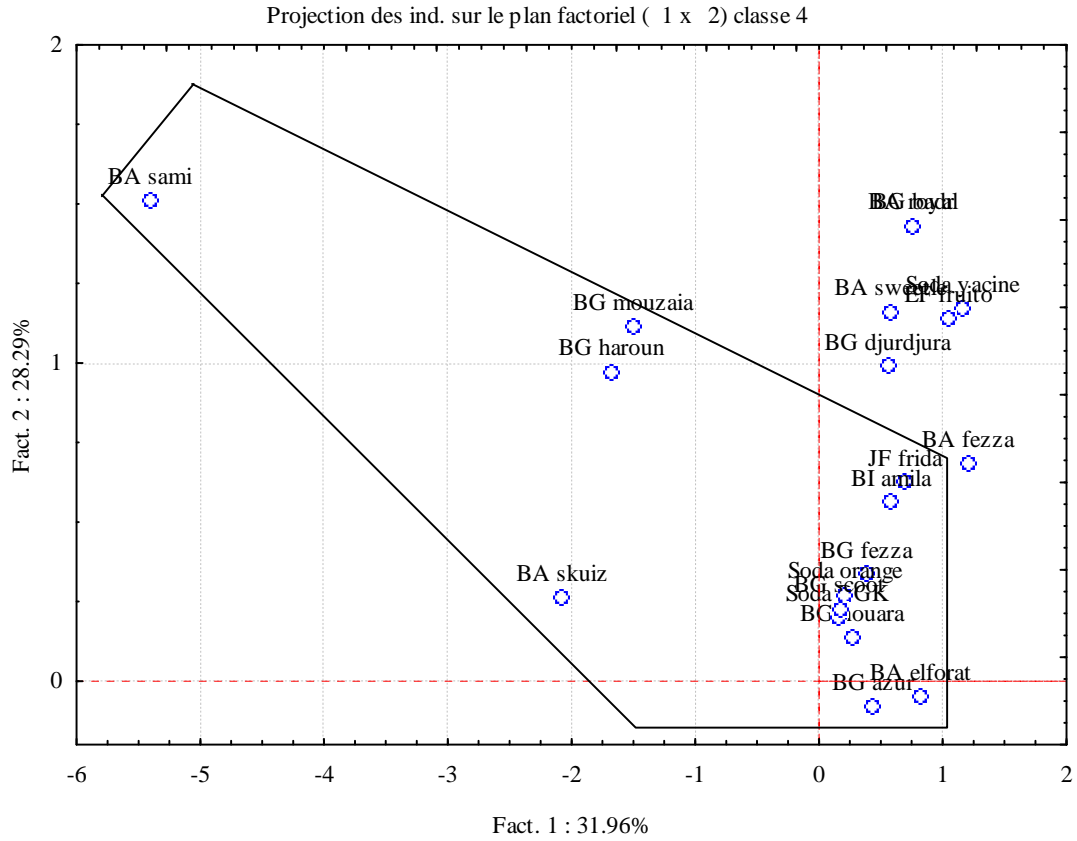


Figure 23: Projection des individus de la classe 4

L'analyse de la variance à un facteur (classe) (tableau 12) n'a montré d'effet que sur les variables acésulfame K et aspartame et au seuil de 0.1% (très hautement significatif). Les autres variables, saccharine, cyclamate et qualité microbiologique semblent être indifférents.

Conclusion

La présente étude nous a permis de contribuer à une meilleure connaissance de la qualité chimique et microbiologique de différents types de boissons rafraichissantes sans alcool de type boisson gazeuse, aromatisée, jus de fruits. Cette étude a été conduite dans la wilaya de Djelfa sur un échantillon de trente marques de boissons.

L'analyse chimique a été conduite dans le but de doser quatre types d'édulcorants comme préconisé par la réglementation Algérienne en vigueur, à savoir: l'acésulfame K, l'aspartame, le cyclamate et la saccharine en utilisant CLHP comme technique analytique. Les résultats obtenus montrent que 23.33% des échantillons sont non conformes. Cette non-conformité est due au dépassement des doses de la saccharine pour 20% des échantillons et à la présence d'un édulcorant non autorisé, le cyclamate dans un seul échantillon. Les échantillons incriminés sont de type boissons gazeuses (6.66%), boissons plates (13.33%) et jus (3.33%). L'emploi de la saccharine à de forte concentration se justifie par les fabricants à cause de son pouvoir sucrant élevé donc à finalité technologique (qualité organoleptique) et par son prix bas donc économique comparativement au saccharose.

L'étude microbiologie a révélé un taux de non-conformité estimé à 13.33%. Celui-ci est dû principalement à la flore fongique et plus particulièrement aux levures et secondairement aux coliformes. Ainsi les levures sont présents dans 13.33% des échantillons, les moisissures et les coliformes dans 3.33%. Les boissons les plus incriminées sont les boissons gazeuses (6.66%) et les boissons aromatisées (6.33%). Ce type de contamination trouve son origine dans la matière première utilisée dans le processus de fabrication (fruits et légumes, sucre et sirops sucrés) et au défaut d'hygiène lors des différents types de manipulation (matériels et manipulateurs).

L'analyse structurale descriptive de nos échantillons, conduite par ACP (analyse en composante principale), a permis de distinguer deux grands axes de variation en rapportant 60.25% de la variabilité totale. Le premier axe oppose la qualité microbiologique et la richesse des boissons en saccharine à celles renfermant les cyclamates; Quant au deuxième axe, il traduit la qualité chimique des boissons liée aux variables acésulfame K et l'aspartame. La classification hiérarchique issue de cette ACP a permis de distinguer quatre classes de boissons BRSA.

L'analyse de la variance à un facteur (classe) n'a montré d'effet que sur les variables acésulfame K et aspartame et au seuil de 0.1% (très hautement significatif). Les autres variables, saccharine, cyclamate et qualité microbiologique semblent être indifférents.

Il est à signaler qu'un nouveau texte réglementaire vient d'être publié dans le journal officiel de la République Algérienne. Ce texte s'intègre dans l'approche d'actualisation des données relatives aux additifs alimentaires et ajoute une nouvelle dimension en relation avec la religion (additifs Hallal) et l'agriculture biologique (édulcorants bio). Ce texte est matérialisé par le décret exécutif n° 12-214 du 23 Joumada Ethania 1433 correspondant au 15/05/2012 fixant les conditions et les modalités d'utilisation des additifs alimentaires dans les denrées alimentaires destinées à la consommation humaine, dont l'application est prévue une année après son publication dans le Journal Officiel de la République Algérienne Démocratique et Populaire (JORADP).

D'autres études sont à prévoir dans ce domaine, en élargissant le domaine d'investigation en matière d'échantillonnage, de l'amont de la filière jusqu'à son aval et en diversifiant les approches, en dosant à titre d'exemple les résidus des traitements phytosanitaires. Ces derniers avec les additifs alimentaires intentionnellement ajoutés amplifient les risques qu'encourt le consommateur. L'utilisation des édulcorants naturels pourrait être une alternative bio et un objet d'une autorisation réglementaire dans les boissons pour le futur.

Références bibliographiques

- ADA. (2004). Position of the American Dietetic Association: Use of Nutritive and Nonnutritive Sweeteners. Journal of the American dietetic association.
- ADRIAN J., POTUS J. et FRANGNE R. (1995). La science alimentaire de A à z, tec & doc Lavoisier, 2^e édition, Paris.
- AKOND M. A., ALAM S., HASAN S., MUBASSARA S., SARDER N. and MOMENA S. (2009). Bacterial contaminants in carbonated soft drinks sold in Bangladesh markets. International Journal of Food Microbiology journal homepage. Department of Botany, Jahangirnagar University, Dhaka-1342, Bangladesh.
- ALAIS C. et LINDEN G. (1994). Abrège biochimie alimentaire, 3^e édition Masson, paris.
- ALAIS C., LINDEN G. et MICLO L. (2003). Biochimie alimentaire, 5^e édition de l'abrégé Dunod, Paris.
- ALESSANDRA H., RAPHAEL B. et JASON C. (2000). Les édulcorants chez femmes enceintes.
- ALLEVA R., BORGHI B., SANTARELLI L., CARBONARI D., BRACCI M. and TOMASETTI M. (2011). In vitro effect of aspartame in angiogenesis induction. Toxicology in Vitro journal homepage. Department of Anesthesiology Research Unit, IRCCS Orthopaedic Institute Rizzoli, Bologna, Italy.
- ANTON S. D., MARTIN C. K., HAN H., COULON S., CEFALU W. T., GEISELMAN P. and WILLIAMSON D. A. (2010). Effects of Stevie, aspartame, and sucrose on food intake, satiety, and postprandial glucose and insulin levels. Appetite journal homepage. Pennington Biomedical Research Center, Baton Rouge, LA, United States.
- ANONYME. (2012). INRA. Etude du secteur des boissons rafraichissantes sans alcool. Oqali-Données. Section de l'observation de l'alimentation.
- AUROUSSEAU F. (2009). Aspects théoriques de la chromatographie en phase liquide à haute performance, Association universitaire CIBAC 2^{ème} édition IUT de Créteil département biologique, document technique.

- BEAUREGARD J. (2009). Encyclopédie visuelle des aliments, édition Québec Amérique, guide pratique de l'alimentation.
- BENAICHE E. (2000). Jus d'orange concentré ; extraction et conservation, technique de l'ingénieur, traité agroalimentaires.
- BERGAMO A.B., SILVA J. A. F. and JESUS D. P. (2011). Simultaneous determination of aspartame, cyclamate, saccharin and acesulfame-K in soft drinks and tabletop sweetener formulations by capillary electrophoresis with capacitively coupled contactless conductivity detection. Food Chemistry Journal homepage.

- BODIN M., ABTROUN A., BOUDRA A., JOLIBERT F., TIRARD A. et TOUAIBA H. (2005). Etude de la filière boissons, Euro développement pme Alger.
- BOONEFOY C., GUILLET F., LEYRAL G. et VERNE BOURDAIS E. (1998). Microbiologie et qualité dans les industries agroalimentaires, édition Doin, centre régional de documentation pédagogique d'aquitaine, France.
- BOUDRA A. (2007). Industries des boissons et de jus de fruits, Recueil des fiches sous sectorielles.
- BOUDRA A. (2010). La filière des boissons gazeuses et jus de fruits Algérienne. Recueil des fiches sous sectorielles.
- BOURJEOIS C.M., MESCLE J. F. et ZUCCA J. (1996). Microbiologie alimentaire, Tome 1: Aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité des aliments, 2^{ème} Ed. Techniques et documentations - Lavoisier. Paris. 672 p.

- CODEX STAN 192. (1995). Norme générale codex pour les additifs alimentaires.
- CODEX STAN 247. (2005). Norme générale codex pour les jus et les nectars de fruits.
- COUTIN F. et MIGNON L. (2009). Edulcorants, aliments light ou allégés : attention aux excès, AFDN association française des diététiciens nutritionnistes, contact presse bvconseil santé.
- CIIA. (2010). BRSA et boissons gazeuses, technologie clé de compétitivité dans l'activité.
- CRP. (2000). Guide pour l'élaboration et la pasteurisation des jus de fruits. Centre romand de pasteurisation.
- ELATYQY M. (2005). Additifs alimentaires. Azaquar. Com.
- EN 12857. (1999). Méthode d'analyse centrale pour les additifs alimentaires ; acésulfame, aspartame, cyclamate, journal officiel de grand-duché de Luxembourg n° 73 17/07/1999.

- FLOQUET M. (2010). Fact sheet, international sweeteners association, Bruxelles IFA1, quai du point du jour 92656 boulonge cedex France.
- FRANTINO M. (2010). Les édulcorants intenses, CHU et faculté de médecine de Dijon entretiens de bichât.
- FREDOT E. (2005). Connaissance des aliments, base alimentaire et nutritionnelles de la diététique. Institut de commerce et de gestion, édition médicale internationale tec & doc, Lavoisier Paris.
- GANDAZZI C. (2002). Synthèse bibliographique sur les jus d'oranges, diététique et contrôle des aliments à la faculté de pharmacie de chatenay malabry-Paris.
- GOUDOT S et LAKHDARI O. (2003). Etude d'une filière du secteur des boissons : Les sodas, université paris, rapport de projet tutoré de génie bio.
- GUIRAUD J. (1998). Microbiologie Alimentaire. Ed Dunod. Paris. 652 p.
- HASHEMI M., HABIBI A. and JAHANSHAHI N. (2011). Determination of cyclamate in artificial sweeteners and beverages using headspace single-drop microextraction and gas chromatography flame-ionisation detection. Food Chemistry journal homepage. Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran.

- ISO 7251. (2005). Norme internationale, 3^{ème} édition 01-02-2005, Microbiologie des aliments, méthode horizontale pour la recherche et le dénombrement d'Escherichia coli présumés, technique du nombre le plus probable.
- ISO 4831. (2006). Norme internationale, 3^{ème} édition 15-08-2006, Microbiologie des aliments, méthode horizontale pour les recherche et le dénombrement des coliformes, technique du nombre le plus probable.
- ISO 21527. (2008). Microbiologie des aliments, méthode horizontale pour le dénombrement des levures et moisissures.
- JACKSON E. (2001). Recommandation pour la production et la distribution de jus au Canada, Centre de recherches alimentaires et horticoles de l'atlantique, 32, rue main, fentville, nouvelle Ecosse (B4N 1J5).
- JECFA. (2001). Fiche d'information JECFA.
- JOFFIN C. et JOFFIN J. N. (1999). Microbiologie alimentaires, 5^{ème} édition, centre régional de documentation pédagogique d'aquitaine, 75 cours Alsace, lorraine, 33075 Bordeaux cedex, 213 p.
- JORA. (1992). Décret exécutif n° 92/25 du 13/01/1992 relatif aux conditions et aux modalités d'utilisation des additifs dans les denrées alimentaires.

Arrêté interministériel du 06 Chaaban 1412 correspondant au 10/02/1992 relatif aux utilisations des édulcorants intenses dans quelques denrées alimentaires qui à été modifié par arrêté interministériel du 11 Moharem 1415 correspondant au 21/06/1994.

•JORA. (1996). Arrêté du 25 Safar 1416 correspondant au 23 juillet 1995 fixant dans le cadre de la répression des fraudes la quantité des produits à transmettre au laboratoire aux fins de son analyse physicochimique et ces conditions de conservation N° 36 du 02/06/1996.

•JORA. (1997). Décret exécutif n° 97-254 relatif aux autorisations préalable à la fabrication et à l'importation des produits toxiques ou présentant un risque particulier. Arrêté interministériel du 28/12/1997 fixant la liste des produits de consommation présentant un caractère de toxicité ou un risque particulier.

•JORA. (1998). Arrêté interministériel du 27 mai 1998, journal officiel de la république Algérienne relatif aux spécifications microbiologiques de certaines denrées alimentaires.

•JORA. (1999). Arrêté interministériel du 7 Ramadhan 1420 correspondant au 15/12/1999 relatif aux conditions d'utilisation des édulcorants dans les denrées alimentaires.

•JORA. (2002). Arrêté interministériel du Dhou Elhidja 1422 correspondant au 14/02/2002 fixant la liste des additifs autorisés dans les denrées alimentaires.

•JORCE. (1997). Directive 94/35/CE du parlement européen et du conseil de 30/06/1994 concernant les édulcorants destinés à être employés dans les denrées alimentaires modifié par directive 96/83/CE du parlement européen.

•JORCE. (2008). Directive 2008/60/CE de la commission de 17 juin 2008, établissement des critères de pureté spécifiques pour les édulcorants pouvant être utilisés dans les denrées alimentaires.

•JORCE. (2001). Directive 2001/52/CE du la commission du 03/07/2001 modifiant la directive 95/31/CE établissant des critères de pureté spécifiques pour les édulcorants pouvant être utilisés dans les denrées alimentaires.

•JORT. (2006). Arrêté des ministres du commerce et de l'artisanat, de la santé publique, de l'industrie, de l'énergie et des petites et moyennes entreprise du 24 Aout 2006, relatif aux boissons non alcoolisées.

•LAGANIER M. (2003). Les édulcorants, patriciens agenda petites annonces forum livres, copyright alternative santé l'impatient.

•LARPENT et CHOUETTE (1997) *in* LARPENT J. P. (1997). Microbiologie alimentaire : Techniques de laboratoire. Ed. Techniques et documentations. Paris. 1073 p.

- LECERF J. (2001). Santé des enfants et jus de fruits, review médicale- édition 2001 institut Pasteur de Lille.
- LEYRAL G. et VIERLING E. (2007). Microbiologie et toxicologie des aliments. Hygiène et sécurité alimentaires. 2^{ème} Ed.Doin.
- LINDEN G. et LORIENT D. (1994). Biochimie agroalimentaire, Milan Barcelone ED Masson.
- MARCHAND M. (2009). Les édulcorants, maison IABD Wallonie picarde, maison de l'association Belge du diabète.
- MASSIN D. P. et BELLISTE F. (2007). Les édulcorants intenses, considérations toxicologiques et pondérales, Lettre scientifique de l'IFN, conférence, institut français pour la nutrition.
- MATOS F., BALLARD R., FOLETTO K. C., BATISTA B. A., NEVES A. M., RIBEIRO M. F. and BERTOLUCI M.c. (2012). Saccharin and aspartame, compared with sucrose, induce greater weight gain in adult Wistar rats, at similar total caloric intake levels. Appetite journal homepage, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Ramiro Barcelos 2400, CEP 90035-003, Bairro Rio Branco, 8 Porto Alegre, Brazil.

- MAZUREK S. and SZOSTAK R. (2001). Quantification of aspartame in commercial sweeteners by FT-Raman spectroscopy Food Chemistry journal homepage, Department of Chemistry, University of Wrocław, 14 F. Joliot-Curie, 50-383 Wrocław, Poland.

- MEDEIROS R. A., CARVALHO A. E., FILHO R. R. and FILHO F. O. (2008). Simultaneous square-wave voltammetric determination of aspartame and cyclamate using a boron-doped diamond electrode. Talantajournal homepage. Departmental de Química, Federal University de SP, Brazil.

- MOSER L. (1997). L'aspartame le tueur silencieux, conférence mondiale sur l'environnement, la fondation de la sclérose en plaques et la FDA (Food and Drug administration), le danger de l'aspartame, article en rapport avec aspartame en France.
- MUKHOPADHYAYI M., MUKHERJEEI A. and CHAKRABARTI J. (2000). In Vivo Cytogenetic Studies on Blends of Aspartame and Acesulfame-K. Centre for Advanced Food and Chemical Toxicology. India.
- NOLLET M. L. (2000). Food analysis by HPLC, second edition, revised and expanded, hogeschool gent, ghent, Belgium, marcel dekker, INC. New York.

- ORANUSI S. U., EZEUGU L. I. and OKOLO B. N. (1994). Microbial contaminants of commercially bottled non-alcoholic drinks produced in Nigeria. Technical Report. World Journal of Microbiology & Biotechnology.

- ORAWAN K. and JAROON J. (2011). Simultaneous determination of some food additives in soft drinks and other liquid foods by flow injection on-line dialysis coupled to high performance liquid chromatography. Article history: journal homepage Talanta, Thailand.

- PHILIPPEAU G. (1986). Comment interpréter les résultats d'une analyse en composantes principales ? Document conçu par ITCF, Paris. 493 p.

- PRODOLLIET J. and BRUELHART M. (1993). Artificial sweeteners, determination of acésulfame K in foods, journal of AOAC international vol 76 N°2, Nestec ltd, nestle researches centre.
- PUECH C. (2011). Edulcorants de synthèse chez la femme enceinte et risque d'accouchement prématuré, santé communauté.
- SAPORTA G. (1990). Probabilités, Analyses des données et statistique. Ed Tech. Paris. 493p.

- SHENGBING Y., ZHU B., FEN L., SHAOXIO L. and WEIXIONG H. (2012). Rapid analysis of cyclamate in foods and beverages by gas chromatography-electron capture detector (GC-ECD). Food Chemistry journal homepage. Center for Disease Prevention and Control of Guangdong Province, Guangzhou 510300, China.

- SUTRA L., FEDERICHI M. et JOUVE J-L. (1998). Manuel de bactériologie alimentaire, polytechnique, paris, 104 p.
- THOMAS D., FLORENCE G. et WOLFF E. (2005). Urban cola gestion de projet sur le marché des boissons non alcoolisées à base des jus de fruits, université de Reims champagne-ARDEME.
- TOLI L. (2008). L'aspartame ferait il grossir, santé et diététique.
- TSAKIRIS S., KARANTANA A. G., SIMINTZI I. and SCHULPIS K. H. (2006). The effect of aspartame metabolites on human erythrocyte membrane acetylcholinesterase activity. Pharmacological Research, Department of Experimental Physiology, Medical School, University of Athens, P.O. Box 65257, GR-154 01 Athens, Greece.

- VILAIN M. (1999). Méthodes expérimentales en agronomie. Ed. Tech et Doc, paris. 338 p.

- WHITE C., RENEE D., GODARD B., BELLING A., KASZA V., REBECCA I. and BEACH A. (2010). Beverages obtained from soda fountain machines in the U.S. contain microorganisms, including coliform bacteria. International Journal of Food Microbiology.

- WOOD R., FOSTER L., DAMANT A. and KEY P. (2004). Analytical methods for food additives. CRC, pred bacaraton bostan New York Washington, DC, first published. 234 p.

Annexe 1 : Composition des milieux de cultures utilisée

- **VRBL (bouillon Lactose)**

Usage

Dénombrement des coliformes

Composition :

Peptone.....7.0g
Extrait de viande.....3.0g
Lactose.....10.0g
Désoxycholate de sodium.....1.5g
Cristal violet.....2.0mg
Rouge neutre.....30.0mg
Chlorure de sodium.....5.0g
Agar.....15.0g

pH: 6.8

Préparation :

12g/l Autoclavage classique ne pas oublier d'ajouter une cloche dans ce tube.

- **Eau peptonée**

Usage

Recherche de l'indole.

Composition :

Peptone exempte d'indole10.0g
Chlorure de sodium.....5.0g
pH :7.2

Préparation

15g par litre, Stérilisation classique

Lecture

L'addition de réactif de Kovacs montre la production d'indole par un anneau rouge.

- **milieu de Rothe**

Usage:

Enrichissement en entérocoques (microbiologie alimentaire)

Composition :

Peptone.....20.0g.
Glucose.....5.0g.
Azide.....0.2g.
NaCl.....5.0g
Hydrogénophosphate de potassium 2.7g.
Dihydrogénophosphate de potassium 2.7g.
pH.....6.8.

Préparation

36.2g.dm⁻³ (simple concentration) ou 72.4 (double concentration), Auto clavage classique.

- **V.F Viande de foie (gélose)**

Usage

Détermination de type respiratoire des micro-organismes.

Composition

13 ase de viande foie.....30.0g.

Glucose.....2.0g.

Agar.....6.0g.

pH7.4.

Préparation :

38g par litre, Autoclavage classique

Conditionnement en tube long et fin.

- **OGA avec l'oxytétracycline**

Extrait autolytique de levure.....5,0 g.

Glucose.....20,0 g.

Oxytétracycline.....0,1 g.

Agar agar bactériologique.....15,0 g.

pH du milieu prêt à l'emploi à 25°C : 6,6 ± 0,2.

Préparation

Auto clavage classique. (JOFFIN et LEYRAL, 1997).

Annexe 2: Table du MAC GRADY

2 TUBES / DILUTION

3 TUBES / DILUTION

Nombre caractéristique	Nombre de cellules	Nombre caractéristique	Nombre de cellules
000	0.0	000	0.0
001	8.5	001	0.3
010	0.5	010	0.3
011	0.9	011	0.6
020	0.9	020	0.6
100	0.6	100	0.4
101	1.2	101	0.7
110	1.3	102	1.1
111	2.0	110	0.7
120	2.0	111	1.1
121	3.0	120	1.1
200	2.5	212	1.5
201	2.0	130	1.6
210	6.0	200	0.9
211	13.0	201	1.4
212	20.0	202	2.0
220	25.0	210	1.5
221	10.0	211	2.0
222	110.0	212	3.0
		222	3.5
		223	4.0
		230	3.0
		231	3.5
		232	4.0
		300	2.5
		301	4.0
		302	6.5
		310	4.5
		311	7.5
		312	11.5
		313	16.0
		320	9.5
		321	15.0
		322	20.0
		323	30.0
		330	25.0
		331	45.0
		332	110.0
		333	140.0

Annexe 3 : Interprétation microbiologique

Selon l'arrêté interministériel (1998) les résultats des examens microbiologiques permettant de fixer trois classes de contamination :

- celle inférieure ou égale au critère (m) ;
- celle comprise entre le critère (m) et le seuil (M) ;
- celle supérieure au seuil (M).

Les critères qualitatifs (m) et (M), sauf autre indication, expriment le nombre de germes présents dans un gramme (g) ou un millilitre d'aliment.

m: seuil au dessous duquel le produit est considéré comme étant de qualité satisfaisante. Tous les résultats égaux ou inférieurs à ce critère sont considérés comme satisfaisants ;

M : seuil limite d'acceptabilité au-delà duquel les résultats ne sont plus considérés comme satisfaisants, sans pour autant que le produit soit considéré comme toxique ;

M = 10 m lors du dénombrement effectué en milieu solide

M = 30 m lors du dénombrement effectué en milieu liquide

n : nombre d'unités composant l'échantillon ;

c : nombre d'unités de l'échantillon donnant des valeurs situées entre (m) et (M)

1- Les valeurs observées sont :

< 3 m lors d'emploi de milieu solide

<10 m lors d'emploi de milieu liquide → qualité satisfaisante

2- Les valeurs observées sont comprises :

Entre 3 m et 10 m (=M) en milieu solide, entre 10 m et 30 m (=M) en milieu liquide,

Et c/n inférieur ou égal au rapport fixé ; par exemple $c/n < 2/5$ avec le plan $n = 5$ et $c = 2$ (ou tout autre plan d'efficacité équivalente ou supérieure) → qualité acceptable

3- Lorsque c/n est supérieur ou égal au rapport fixé;

Tous les cas où les résultats obtenus sont supérieurs à M → qualité non satisfaisante

4- Le produit doit être considéré comme toxique ou corrompu lorsque la contamination atteint une valeur microbienne limite (S) qui est fixée dans le cas général à : $S = m \cdot 10^3$