

## Contrôle bactériologique et chimique des extraits de viande

par J. BILLON, M. CAZAILLET et R. CHEVALLIER

Note présentée par M. THIEULIN

Les extraits de viande sont largement utilisés par les industries alimentaires et entrent en particulier dans la préparation de divers potages en sachets ou de bouillons concentrés. Ils proviennent en général de viande de bovidés.

Les quantités importées sont variables selon les années :

1956 .....	579 tonnes
1957 .....	288 »
1958 .....	389 »

Le département de la Seine reçoit la quasi totalité de ces produits. L'examen bactériologique permet, seul, le contrôle de leur salubrité. L'analyse chimique assure le contrôle de leur qualité, que des examens macroscopiques et organoleptiques peuvent révéler en première approximation.

Dans cette note, nous présentons une méthode d'examen nous paraissant satisfaisante et, en ce qui concerne l'analyse bactériologique, nous soumettons aux critiques un barème d'appréciation.

Signalons que depuis les premières relations de PIETTRE (Inspection des viandes et des aliments d'origine carnée. 1921) les principes et les méthodes de préparation des extraits de viande ont peu varié et comportent :

- 1° Epuisements aqueux successifs des muscles parés.
- 2° Préconcentration par évaporation sous vide et par chauffage.
- 3° Filtration des jus en présence de sang coagulé par ébullition, utilisé comme adjuvant de filtration.
- 4° Concentration poursuivie jusqu'au stade final.

Ces traitements permettent d'obtenir un extrait blond, homogène, un peu granuleux au toucher, de goût et de saveur agréables, rappelant la viande.

## I. — EXAMEN BACTÉRIOLOGIQUE

Dans un tube à essais ou un ballon contenant 10 cm<sup>3</sup> d'eau peptonée nous introduisons un prélèvement d'au moins un gramme, et dont le poids nous est donné par pesée différentielle. Cette quantité se dissout après quelques secondes d'agitation. A partir de la solution, nous opérons une série de dilutions afin de rechercher :

a) La flore totale : numération en gélose ordinaire en boîtes de Petri placées à 30° ; lecture après 3 jours.

b) *Escherichia coli* : production d'indol et fermentation du lactose à 44°.

c) La flore anaérobie sulfito-réductrice, thermorésistante ; en portant des dilutions successives dans une série de tubes de gélose DIENERT, placés ensuite au bain-marie à 75° pendant 10' puis refroidis et incubés 48 heures à 37°.

d) La flore pathogène : la mise en évidence des staphylocoques pathogènes est réalisé au moyen du milieu de CHAPMAN STONE pour enrichissement à partir d'un gramme de produit ; les repiquages sont effectués sur gélose CHAPMAN. La recherche des entérobactéries pathogènes (salmonelles) s'effectue au moyen d'un milieu d'enrichissement : bouillon au sélénite de sodium, bouillon bilié au vert brillant. Les isolements sont pratiqués ensuite sur gélose S. S.

RÉSULTATS : 1) *Extraits de viande dont la fabrication datait de moins de six mois*

a) Flore totale : comprise entre 13 000 et 200 000 germes microbiens par gramme de produit.

(sur 18 examens réalisés, 15 ont donné un nombre variant entre 30 000 et 40 000).

b) *Escherichia coli* : absence dans 8 échantillons  
 6 fois — 10 par gramme de produit  
 3 » 100 » »  
 1 » 600 » »

c) Flore anaérobie sulfito-réductrice : absence dans la moitié du nombre des échantillons ; dans 5 échantillons la quantité rencontrée a été inférieure à 100 et, dans 4 autres, comprise entre 400 et 600 germes par gramme de produit.

d) Flore pathogène : absence dans tous les échantillons.

2) *Extraits de viande fabriqués depuis un temps variable.*

Chacun des nombres donnés dans le tableau suivant représente la moyenne trouvée pour 3 examens effectués à partir d'un même échantillon, les résultats étant rapportés à un gramme de produit.

Age de l'extrait examiné	Flore totale	<i>Escherichia coli</i>	Flore anaérobie sulfite-réductrice
1 an .....	61.500	absence	40
2 ans .....	54.000	absence	40
3 ans .....	294.000	absence	235
4 ans .....	196.000	absence	45
5 ans .....	125.000	absence	40
6 ans .....	70.000	absence	40
12 ans .....	10.000	absence	40
Plus de 12 ans .....	17.000	absence	30

— absence de flore pathogène dans tous les échantillons.

Il est curieux de noter que la présence du colibacille ne s'est pas manifestée dans les extraits ayant plus d'un an de conservation. Les extraits âgés semblent stabilisés : le taux de germes est inférieur à celui des extraits frais.

Notons également que la majeure partie des pollutions est constituée par des levures et des champignons fumagoïdes (*Pullularia pullulans*, *Clostridium*...) dont l'action bactéricide se fait sentir à la longue et qui entraînent un appauvrissement du milieu en acides aminés directement assimilables par les bactéries.

Quelles normes peuvent-elles être proposées pour définir la qualité bactériologique d'un extrait de viande ?

Il ne semble pas utile de s'attarder dans le décompte des champignons divers au cours de la numération de la flore totale : on envisagera seulement la quantité d'éléments microbiens décelables après culture sur gélose durant 72 heures à 30°.

La recherche des germes pathogènes est d'un grand intérêt, mais paraît entrer dans le cadre d'une expertise, plutôt que dans celui d'un examen de contrôle de série ; elle nécessite la mise en œuvre de techniques longues. Or le produit envisagé est destiné à subir un traitement thermique poussé, entraînant une véritable stérilisation : ce fait diminue l'importance de la recherche précitée pour les examens courants. La numération des germes signant une pollution de type fécal ou une fermentation putride est

intéressante, nous avons choisi parmi eux *Escherichia coli* et les clostridiales sulfito-réductrices.

Il nous paraîtrait judicieux d'envisager, comme suit, l'appréciation bactériologique d'un extrait de viande (Pour un gramme de produit) :

- Résultat favorable : Flore totale  $\leq 4 \times 10^4$   
absence d'*Escherichia coli* et de clostridiales sulfito-réductrices
- » passable : Flore totale  $\leq 10^5$  et  $> 4 \times 10^4$   
*Escherichia coli*  $\leq 10^2$   
Clostridiales sulfito-réductrices  $\leq 5 \times 10^2$
- » médiocre : Flore totale  $\leq 2 \times 10^5$  et  $> 10^5$   
*Escherichia coli*  $\leq 5 \times 10^2$  et  $> 10^2$   
Clostridiales sulfito-réductrices  $\leq 8 \times 10^2$  et  $> 5 \times 10^2$
- » défavorable : Flore totale  $> 2 \times 10^5$   
ou *Escherichia coli*  $> 5 \times 10^2$   
ou clostridiales sulfito-réductrices  $> 8 \times 10^2$   
ou présence d'une flore pathogène.

Nous considérons enfin que la recherche et le dosage de l'histamine se révèlent du plus haut intérêt au cours de l'examen sanitaire de ces denrées. Nous avons vu en effet, qu'un extrait vieux de plusieurs années pouvait se montrer bactériologiquement très acceptable. Or l'histamine d'origine microbienne signe une protéolyse qui peut être le résultat d'une pollution présente ou passée.

Il paraîtrait normal d'admettre pour les extraits de viande le même maximum de substances histaminiques, rapportées au produit desséché, que celui fixé par le Codex (premier supplément 1949) pour les préparations buvables d'extrait de foie : 300  $\mu$  g par g de produit.

L'étude de cette question fera l'objet de relations ultérieures.

## II. — EXAMEN CHIMIQUE

### 1° Examen organoleptique

L'examen de l'aspect, de l'odeur et du goût se fait de préférence sur une solution aqueuse à 1 %.

La dégustation est effectuée à la température de 60° C. environ.

### 2° *Dosage des matières sèches.*

Un à deux grammes d'extrait de viande, additionnés d'environ 20 ml d'eau, sont mélangés intimement avec environ 20 g de poudre de verre ou de sable dans une capsule plate en verre ou acier inox de 7 à 8 cm de diamètre et évaporés au bain-marie.

Au début de la solidification l'échantillon doit être bien remué avec une baguette de verre pesée avec l'extrait de viande, jusqu'à ce que la masse reste pulvérulente à chaud et ne s'agglutine plus.

Sécher ensuite à l'étuve à  $103^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  ou mieux à l'étuve à vide réglée à  $65^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$  jusqu'à poids constant.

Au lieu de peser directement l'extrait de viande, on peut aussi évaporer 10 ml d'une solution aqueuse contenant 20 grammes d'extrait de viande dans 200 ml.

Les capsules en verre ou acier inox contenant la poudre de verre (ou le sable) et la baguette de verre sont séchées préalablement à l'étuve, et redroidies dans un dessiccateur, avant d'être pesées.

Les résultats sont exprimés en pourcentage de l'extrait de viande avec 1 décimale.

Les teneurs en matières sèches sont de l'ordre de 75 à 85 %.

### 3° *Dosage des chlorures.*

La détermination de la teneur en chlorures de l'extrait de viande, exprimée en NaCl est effectuée par la méthode de CHARPENTIER VOLHARD après incinération.

Un à deux grammes d'extrait de viande, ou 10 ml d'une solution aqueuse contenant 20 g d'extrait de viande dans 200 ml sont bien séchés dans une capsule de platine au bain-marie, puis incinérés dans un four électrique à  $550^{\circ}\text{C}$  environ.

Les cendres sont dissoutes dans de l'eau distillée bouillante et filtrées. Le filtrat est amené à 100 ml.

Le dosage de CHARPENTIER VOLHARD est effectué sur une partie aliquote de cette solution.

Les résultats sont exprimés en pourcentage de l'extrait de viande, avec 1 décimale.

Les teneurs en chlorures, exprimées en NaCl sont de l'ordre de 3 à 5 %.

### 4° *Dosage de la créatinine.*

En étudiant la composition chimique d'un extrait de viande, CHEVREUL réussit à isoler une substance cristallisée nouvelle

qu'il nomme afin d'en rappeler l'origine : « 1 créatine », du grec : kreas, viande. La créatine est parmi les produits azotés non protéiques les plus abondants du muscle.

La créatine et la créatinine ne différant que par une molécule d'eau, il n'est par étonnant qu'elles se transforment facilement selon la réaction d'équilibre.



C'est dans le tissu musculaire qu'est localisée la presque totalité de la créatine (98 % environ). On conçoit ainsi l'importance du dosage de la créatine.

#### *Principe.*

Mesure à l'électrophomètre MEUNIER de la coloration donnée par la créatinine avec de l'acide picrique en solution sodique (réaction de JAFFE) et déduction de la « coloration de base » donnée dans ces mêmes conditions sur une prise d'essai identique où la créatinine a été préalablement détruite.

#### *Réactifs :*

Acide picrique .....	10,000	grammes
Eau q. s. p.....	1 000	ml
HCl .....	10	N
HCl .....	3	N
NaOH .....	3	N
NaOH .....	2,5	N

Solution pour courbe d'étalonnage renfermant 1 milligramme de créatinine par ml.

Chlorhydrate de créatinine ...	1,3224	g
Chlorure de zinc anhydre ....	1,6000	g
Acide chlorhydrique normal ..	100	
Eau distillée q. s. p. ....	1 000	

Cette solution est stable pendant plusieurs années.

#### *Mode opératoire.*

Développement de la réaction de JAFFE sur un volume constant égal à 6 ml.

Addition de 20 ml solution d'acide picrique à 1 % puis 10 ml solution de soude 2,5 N après transformation de la créatine en créatinine ou 6 ml de cette même solution de soude 2,5 N dans les autres cas.

Instant 0 compté à l'instant précis où la dernière goutte de solution de soude est tombée.

Instant 5 minutes (temps compté en chronomètre) fin de la réaction de JAFFE. On verse de l'eau distillée à cet instant précis puis l'on ajuste à 500 ml toujours avec de l'eau distillée et l'on remplit avec ce liquide ajusté à 500 ml la cuve à faces parallèles permettant l'examen d'une couche de liquide de 1 cm d'épaisseur.

Instant 8 minutes. Placer la cuve dans le chariot porte-cuve. Allumer l'électrophomètre. Régler les diaphragmes.

Instant 11 minutes. Lecture.

### *Courbe d'étalonnage.*

A partir de la solution de référence renfermant un milligramme de créatinine par ml, préparer une solution dite solution E (cette solution doit être préparée extemporanément).

Solution E. : solution de référence,  
à 1 mg créatinine par ml ..... 20 ml  
Eau distillée q. s. p. .... 100 ml

Dans 6 fioles jaugées de 500 ml, préparer les prises d'essais suivantes :

Fioles n°	1	2	3	4	5	6
Solution E. ....	1 ml	2 ml	3 ml	4 ml	5 ml	6 ml
Eau distillée .....	5 ml	4 ml	3 ml	2 ml	1 ml	

Ces 6 fioles renferment respectivement :

0,2 - 0,4 - 0,6 - 0,8 - 1,0 - 1,2 milligramme de créatinine.

On déterminera la coloration des réactifs en développant, selon le mode opératoire, la coloration de JAFFE sur une prise d'essai de 6 ml d'eau distillée.

Soient respectivement les lectures à l'électrophomètre,

$L_1 - L_2 - L_3 - L_4 - L_5 - L_6$  pour les fioles de 1 à 6,

$L_0$  pour la coloration développée sur l'eau distillée.

On tracera la courbe d'étalonnage en portant en abscisse les concentrations en créatinine, en ordonnées les colorations,

$L_1 - L_0, L_2 - L_0, L_3 - L_0, L_4 - L_0, L_5 - L_0$  - et  $L_6 - L_0$ .

*Dosage de la créatinine totale*

Préparer une solution du produit de façon à ce qu'une prise d'essai de 5 ml renferme environ de 0,6 à 1,2 milligramme de créatinine. Soit C. cette solution :

a) *Hydrolyse directe :*

Solution C .....	5 ml
HCl 10 N .....	1 ml

Porter au bain-marie bouillant pendant 1 h. 30 (en munissant le ballon d'un entonnoir condenseur).

Au cours de cette hydrolyse, la créatine a été transformée en créatinine.

b) *Hydrolyse rétrograde :*

Solution C .....	5 ml
NaOH 3 N .....	1 ml

Porter au bain-marie bouillant pendant 2 heures. Au cours de cette hydrolyse, la créatine et la créatinine ont été détruites.

*Développement des Colorations sur les hydrolyses directes et rétrogrades.*

Après refroidissement des hydrolyses, développer les colorations comme suit :

*Hydrolyse directe.*

Ajouter :

20 ml acide picrique à 10 pour 100.

Temps 0 .....	10 ml NaOH 2,5 N
» 5 .....	Diluer et amener à 500 ml
» 11 .....	Lecture.

*Hydrolyse rétrograde.*

Ajouter :

1 ml HCl 3 N

20 ml Acide picrique à 10 pour 100

Temps 0 .....	6 ml Na OH 2,5 N
» 5 .....	Diluer et amener à 500 ml
» 11 .....	Lecture.

soient : L<sub>D</sub> la lecture pour l'hydrolyse directe,

L<sub>R</sub> » » rétrograde.

La lecture correspondant à la créatinine présente dans la prise d'essai est égale à :

$$L_D - L_R$$

Se reporter à la courbe d'étalonnage pour connaître la correspondance en créatinine.

*Calcul du pourcentage de Créatinine.*

Soient : P. La pesée de produit exprimée en milligrammes.

V. Le volume exprimé en ml auquel a été amenée la pesée P.

v. Les prises d'essais pour hydrolyses directes et rétrogrades ( $v = 5$  ml).

$L_D - L_R = a$  mg de créatinine (cf. lecture sur courbe d'étalonnage).

on a :

$$\frac{a \times V \times 100}{v \times P} = \% \text{ de créatinine.}$$

Exprimer les résultats en pourcentage de l'extrait de viande avec 1 décimale.

Les teneurs en créatinine totale sont de l'ordre de 7 à 9 %.

(Laboratoire des Services Vétérinaires Sanitaires de la Seine. Laboratoire de contrôle des Etablissements LIEBIG à la Courneuve, Seine).

N. B. — A la suite d'une réunion en date du 8 septembre 1959, des chimistes analystes des fédérations européennes de fabricants de potages, différentes autres méthodes d'analyse chimique sont en cours d'examen, et il en sera rendu compte ultérieurement.

#### Discussion

M. GUILLOT. — J'ai été très intéressé par le résumé que M. THIEULIN vient de nous faire, car j'ai eu personnellement l'occasion, au Laboratoire de Microbiologie du Bureau Central de Recherches du Ravitaillement, d'examiner différents extraits de viande. Je dois dire que les résultats qui nous sont exposés aujourd'hui correspondent très exactement à ceux que j'avais moi-même observés, en particulier une flore banale de l'ordre maximum de 200 000 germes au gramme, absence presque générale d'« *Escherichia coli* », absence de germes pathogènes. Mais ces extraits sont riches en sel et je me permets de rappeler que l'examen bactériologique doit tenir compte de la quantité d'extraits à prélever pour les ensemencements, compte tenu de la quantité de sel qui peut être apportée aux milieux de culture utilisés. Je suppose, puisque vous n'avez pas donné le détail du travail, que les auteurs ont tenu compte de la teneur en sel de ces extraits.

M. THIEULIN. — Les auteurs s'intéressent en effet à la teneur en chlorures, 3 à 5 %.

M. GUILLOT. — Sur le plan chimique vous avez fait allusion au dosage de la créatinine. A ce propos, s'il n'y a pas, à ma connaissance, de normes officielles concernant les extraits de viande eux-mêmes, le décret du 19 novembre 1954 précise celles des *bouillons* et *potages*, en ce qui concerne leurs teneurs en azote aminé, en azote ammoniacal et en sel, ainsi que les conditions de vente de ces produits. Une lettre circulaire de la Répression des Fraudes du 18 février 1953 prescrit en outre que pour mériter la dénomination « de viande », la quantité de produit présentée comme propre à préparer un litre doit contenir un gramme d'*extrait de viande*, apportant au moins 5 cg de créatinine.

M. THIEULIN. — Il s'agissait dans le cas relaté de produits connus; il n'était pas question de dépister des denrées altérées et la teneur en créatinine a été de l'ordre de 7 à 9 %.

M. GUILLOT. — Je tiens enfin à souligner l'intérêt que les auteurs de la communication attachent au dosage de l'histamine. Il faudrait, en effet, que des recherches soient faites dans ce domaine.

M. THIEULIN. — Nous avons fait une relation d'analyses successives aux différents échantillons, mais il n'y a pas encore de conclusion concernant les analyses à pratiquer et des résultats qui pourraient être considérés comme des normes formelles.

M. PANTALEON. — La réduction progressive, dans les denrées de ce type, de la population microbienne, est à rapporter aux pouvoirs bactériostatique et bactéricide du chlorure de sodium sur les bactéries halosensibles. Ainsi que nous l'avons précédemment vérifié avec CAZAILLET et ROSSET, l'activité des solutions salines dépend étroitement des conditions thermiques : action bactériostatique entre 0 et + 2° ; action bactéricide croissante avec les températures plus élevées.

M. THIEULIN. — C'est pourquoi on a présenté une analyse bactériologique et une analyse chimique et non pas uniquement une analyse à caractère sanitaire qui n'a pas de sens s'il n'y a pas en même temps une analyse chimique.

M. HOUDINIÈRE. — Les auteurs savent-ils si ces extraits de viande entrent dans la confection des soupes desséchées que l'on vend maintenant et qui sont de plus en plus consommées ?

M. THIEULIN. — Les extraits en question sont en partie destinés à entrer dans ces compositions, mais il s'agit ici des extraits de viande eux-mêmes.

M. HOUDINIÈRE. — Je considère cette communication comme extrêmement importante étant donné l'ampleur considérable que prend la consommation de ces potages.

M. THIEULIN. — La question des potages pour lesquels on utilise des extraits de viandes et d'autres substances, constitue certainement un chapitre nouveau de l'inspection et j'espère qu'il en sera traité ici même prochainement.

---

M. le PRÉSIDENT. — La tendance à créer des normes est excellente, bien que ces normes ne puissent être que provisoires. Je pense, par exemple, à une réglementation que M. GORET connaît bien ; on a parlé l'autre jour du contrôle des eaux, c'est très bien, mais on n'a établi aucune norme d'une eau normale, d'une eau anormale, d'une eau suspecte. Alors, à quoi sert de faire des analyses en grande quantité si l'on ne vous dit pas : tel résultat est défavorable, tel résultat est favorable ? C'est pourquoi le fait de constituer des normes a pour moi une grande importance, sachant bien que ces normes pourront être modifiées dans quelques années.

---