



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

*République Algérienne Démocratique et
Populaire*

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة الجيلالي بونعاما خميس مليانة

Université Djilali Bounaâma de Khemis-Miliana

Faculté des sciences de la nature et de la vie et des sciences de la terre

Département de :Biologie

Mémoire de fin d'étude

En vue de l'obtention d'un diplôme de

Master en

Sciences biologique

Spécialité: Microbiologie appliquée

Thème :

***Valorisation du lactosérum et recherche de
l'activité antimicrobienne des bactéries
lactiques isolées à partir du lactosérum***

Les membres de jury :

Mme LAISAOUI .A

Présidente

MCB

UDB Khemis miliana

Mme KELBAZA .K

Examinatrice

MCB

UDB Khemis miliana

Mr AMROUCHE. Z

Promoteur

MCB

UDB Khemis miliana

Présenté par:

Melle : Taibi Meryem

Melle : Zaoui Roufaïda

Année universitaire : 2019 / 2020

Remerciements

Nous tenons à remercier en premier lieu le DIEU de nous avoir permis d'accomplir ce travail. Nous tenons à exprimer nos plus vifs remerciements à notre encadreur Monsieur Amrouche Zoheir qui nous a guidés tout au long de l'élaboration de ce travail et pour ses précieux conseils.

Nos plus vifs remerciements s'adressent au personnel du laboratoire Microbiologique de la laiterie d'ARIB en particulier au responsable de laboratoire physicochimique, Nous vous remercions d'avoir enrichis nos connaissances et de nous avoir guidés durant toute la période du stage.

Nos remerciements vont aussi à nos enseignants qui ont assuré notre formation durant ces cinq dernières années et aux responsables de laboratoires de microbiologie de l'Université Djilali Bounaama de Khemis Miliana qui ont contribué à créer une ambiance de travail agréable et propice à la coopération et au partage d'expériences.

Et enfin, nous remercions nos parents qui nous ont soutenus, encouragé et surtout supporté tout au long de ce travail. Sans eux tout aurait été beaucoup plus difficile.

Roufaïda et Meryem.

Dédicace

Au nom de Dieu clément et miséricordieux.

Au prophète de la paix, de la miséricorde et de la lumière.

J'ai un grand honneur de dédier ce modeste travail :

*A celle qui était et qui restera mon soutien dans cette vie, à celle qui m'a enseigné comment aimer **DIEU** ; comment fait apparaître le succès et la prospérité au sein du mal et des problèmes... à toi **maman**, que **DIEU** te protège pour moi et te donne la guérissant.*

*A celui qui a été toujours mon support dans cette vie, celui qui me donne le courage éclatant pour continuer à chaque fois que j'ai l'impression de reculer... **papa** que **DIEU** te protège.*

A mes très chers frères.

A mes très chères belles sœurs.

A tous mes ami(e)s.

A tous ceux qui connaissent Roufaïda.

Dédicace

Au nom de Dieu clément et miséricordieux.

Au prophète de la paix, de la miséricorde et de la lumière.

*A la plus douce et la plus merveilleuse de toutes les mamans. A une personne qui m'a tout donné sans compter. Aucun hommage ne saurait transmettre à sa juste valeur, l'amour, le dévouement et le respect que je porte pour toi. Puisse Dieu tout puissant te protéger du mal, te procurer longue vie, santé et bonheur afin que je puisse te rendre un minimum de ce que je dois. Je t'aime **Mama***

*A celui qui m'a indiqué la bonne voie, le plus adorable et gentil, mon très cher défunt **Papa**, qui m'a tout donné sans rien recevoir en parallèle, pour ses encouragements et son soutien, et sur tout pour son sacrifice afin que rien n'entrave le déroulement de mes études. Tu as été et tu resteras toujours mon exemple à suivre pour tes qualités humaines, ta persévérance et ton perfectionnisme.*

A mon petit bout de miel mon neveu « Ahmed Yazen ».

A ma sœur et mes frères.

A tous mes amis et tous ceux qui me sont chers et proches.

Meryem

Résumé :

Le lactosérum est un sous-produit laitier riche en éléments nutritifs et en bactéries lactiques. Il possède un grand intérêt dans l'industrie agroalimentaire, le rejet de ce produit dans les effluents constitue une perte économique énorme. Ce travail a pour objectif de valoriser le lactosérum, et d'étudier le pouvoir antimicrobien des bactéries lactiques isolées et identifiées. Afin de déterminer la qualité du lactosérum provenant de la laiterie ARIB de la wilaya de Ain-Defla, des analyses physico-chimiques, microbiologiques et sensorielles ont été effectuées. En parallèle, un isolement et une identification des souches des bactéries lactiques ont été réalisés à partir de mêmes échantillons du lactosérum. Les analyses physico-chimiques de cinq échantillons du lactosérum issu de la fabrication du fromage frais montrent une qualité acceptable. De point de vue microbiologique, la recherche et le dénombrement des germes totaux et les coliformes révèlent une charge microbienne inférieure aux normes et indiquent que le lactosérum est de bonne qualité hygiénique. L'absence des germes pathogènes (Salmonelles) confirme l'efficacité des traitements thermiques et indique que ce lactosérum ne présente pas de risque pour la santé des consommateurs. A partir des échantillons du lactosérum, cinq souches de bactéries lactiques ont été isolées. L'identification microscopique et biochimique montre que ces souches possédant les caractères des bactéries lactiques (Lactobacilles et Lactocoques). L'étude de l'activité antimicrobienne des souches lactiques isolées, a montré que ces bactéries lactiques possèdent un effet inhibiteur contre les microorganismes pathogènes. La caractérisation physico-chimie et microbiologique a révélé que le lactosérum issu de la chaîne de fabrication dans laiterie d'ARIB est de qualité satisfaisante ; ainsi, la détection des bactéries lactiques productrices de substances antimicrobiennes offre la possibilité de l'utilisation technologique de ce produit laitier mal valorisé.

Mots clés : Lactosérum, produit laitier, bactéries lactiques, activité antimicrobienne, industrie agroalimentaire.

Abstract:

Whey is a dairy product rich in nutrients and lactic acid bacteria. It has a very interesting benefit in the food industry; the release of this product in the effluents constitutes a huge economic loss. This work aims to recover the whey, and to study the antimicrobial characteristics of lactic acid bacteria isolated and identified from whey. In order to determine the quality of the whey originating from the ARIB dairy industry in the wilaya of Ain-Defla, physico-chemical, microbiological and sensory analyzes were carried out. In parallel, lactic acid bacteria strains will be isolated and identified from the same samples of the whey. The results of physico-chemical analyzes of five whey samples obtained from the manufacture of fresh cheese show an acceptable quality of whey. In other hand, research and enumeration of total microorganism and coliforms reveals a microbial charge below the standards and indicates a good hygienic quality of whey samples. The absence of pathogenic bacteria (*Salmonella*) confirms the effectiveness of heat treatments and indicates that this whey does not present a risk to the consumer's health. From the whey samples, five strains of lactic acid bacteria were isolated, microscopic and biochemical identification shows that these isolates possess the characters of lactic acid bacteria (*Lactobacillus* and *Lactococcus*). The study of the antimicrobial activity has shown that these lactic acid bacteria have an inhibitory effect against pathogenic microorganisms. In conclusion, the physico-chemical and microbiological characterization revealed that the whey of the production line in the ARIB dairy industry has a satisfactory quality; thus, the detection of lactic acid bacteria producing antimicrobial substances offers the possibility of the technological use of this dairy product poorly recovered.

Keywords: Whey, dairy product, lactic acid bacteria, antimicrobial activity, food industry.

:

مصل اللبن هو منتج ثانوي من منتجات الألبان غني بالعناصر الغذائية و بكتيريا اللبنة. له أهمية كبير
الغذائية، هذا المنتج في النفايات السائلة يشكل خسارة اقتصادية ضخمة. يهد هذا العمل إلى ت
و دراسة القوة المضادة للميكروبات لبكتيريا اللبنة المعزولة والمحددة. من أجل تحديد جودة مص
عري في ولاية عين
وتحديد سلالات بكتيريا اللبنة من نفس عينات مصل اللبن. أظهرت اليل الفيزيائية والكيميائية لخمسة عينات من مص
كشف البحث وتعداد الجراثيم والبكتيريا الكلية عن وجود الكمية
ميكروبية أقل من وتشير إلى أن مصل اللبن ذو جودة صحية جيدة. يؤكد عدم وجود الجراثيم
(السالمونيلا) على فعالية المعالجات الحرارية ويشير إلى أن مصل اللبن لا يشكل خطراً على صحة المستهلكين.
بكتيريا اللبنة من عينات مصل اللبن. ظهر التحديد المجهرى والكيموحيوى أن هذه السلالات
بكتيريا اللبنة (العصيات اللبنة) أظهر
لها تأثير مثبت ضد الكائنات الحية الدقيقة . أظهر التحاليل الفيزيوكيميائية والميكروبيولوجي
ملبنة عريب مرضية وبالتالي بكتيريا اللبنة التي تنتج مواد مضادة
للميكروبات يوفر إمكانية الاستخدام التكنولوجي هذا .

الكلمات المفتاحية: بكتيريا اللبنة، الميكروبات، الغذائية.

Table des matières

Remerciements

Dédicace

Résumés

Abstract

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

Introduction 1

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE 1 : Généralités sur le lait

1. Lait de vache 3

1.1. Définition du lait 3

1.2. Composition nutritionnelle moyenne en % du lait de vache 4

1.3. Principales constantes physico-chimiques du lait de vache 4

1.3.1. pH 5

1.3.2. Acidité du lait 5

1.3.3. Densité 5

1.3.4. Point de congélation 5

1.4. Microbiologie du lait 5

1.4.1. Microflore du lait 6

CHAPITRE 2 : Lactosérum

2. Lactosérum 9

2.1. Définition 9

2.2. Types de lactosérum 10

2.2.1. Lactosérum acide 10

2.2.2. Lactosérum doux 11

2.3. Composition du lactosérum 11

2.3.1. Lactose.....	12
2.3.2. Minéraux	12
2.3.3. Protéines du lactosérum	13
2.3.3.1. β -lactoglobuline (β -LG)	13
2.3.3.2. Lactalbumine (-LA)	13
2.3.3.3. Sérum albumine bovine (BSA)	14
2.3.3.4. Immunoglobuline (Ig)	14
2.4. Techniques de récupération des principaux constituants du lactosérum	16
2.4.1. Extraction des protéines	17
2.4.1.1. Thermocoagulation.....	17
2.4.1.2. Ultrafiltration	17
2.4.1.3. Chromatographie d'échange d'ion	17
2.4.2. Extraction du lactose	18
2.4.2.1. Ultrafiltration.....	18
2.4.2.2. Cristallisation	18
2.5. Extraction des sels minéraux et des vitamines.....	19
2.5.1. Par filtration	19
2.5.2. Electrodialyse et chromatographie	20

CHAPITRE 3 : Valorisation du lactosérum

3. Valorisation du lactosérum.....	21
3.1. Introduction	21
3.2. Utilisation en alimentation humaine.....	21
3.3. Utilisation en alimentation animale	22
3.4Utilisation en biotechnologique	22

3.5. Dans le domaine médical	23
3.6. Exemple d'application de lactosérum et ses composés	24
3.6.1. Usage alimentaire	24
3.6.1.1. Compléments alimentaires comme Sels minéraux et vitamines	24
3.6.2. Application dans les domaines pharmaceutiques et cosmétiques	25
3.6.2.1. À partir du lactose	25
3.7. Pouvoir polluant du lactosérum	27

CHAPITRE 4 : Les bactéries lactiques et leur effet antimicrobien

4. Bactéries lactiques	28
4.1. Généralités sur les bactéries lactiques	28
4.2. Habitat	29
4.3. Utilisation des bactéries lactiques	30
4.4. Classification	31
4.4.1. Genre <i>Lactobacillus</i>	32
4.4.1.1. Les lactobacilles du groupe I (LBI)	32
4.4.1.2. Lactobacilles du groupe II (LBII)	32
4.4.2.3. Lactobacilles du groupe III (LBIII)	33
4.4.2. Genre <i>Lactococcus</i>	33
4.4.3. Genre <i>Leuconostoc</i>	33
4.4.4. Genre <i>Pediococcus</i>	33
4.4.5. Genre <i>Bifidobacterium</i>	34
4.5. Voies fermentaires des bactéries lactiques	35
4.5.1. Voie homofermentaire ou EMP	35
4.5.2. Voie hétérofermentaire ou voie des pentoses phosphate	36

4.6. Intérêt des bactéries lactiques	37
4.6.1. Dans l'industrie alimentaire	37
4.6.2. Dans le domaine thérapeutique	38
4.7. Propriétés inhibitrices des bactéries lactiques	38
4.7.1. Compétition nutritionnelle	39
4.8. Production de métabolites antimicrobiens	39
4.8.1. Métabolites antimicrobiens non peptidiques	40
4.8.1.1. Acides organiques	40
4.8.1.2. Peroxyde d'hydrogène	40
4.8.1.3. Dioxyde de carbone	41
4.8.1.4. Diacétyle.....	41
4.8.2. Métabolites antimicrobiens peptidiques	41
4.8.2.1. Bactériocines	41
4.8.2.2. Classification des bactériocines	42
4.8.2.3. Mécanisme d'action des bactériocines	43
4.8.2.4. Propriétés des bactériocines pour une application alimentaire	43
4.9. Microorganismes pathogènes	44
4.9.1. <i>Staphylococcus aureus</i>	44
4.9.2. <i>Escherichia coli</i>	45
4.9.3. <i>Pseudomonas</i>	46
4.9.4. <i>Candida albicans</i>	47

PARTIE PRATIQUE

MATERIEL ET METHODES

1. Problématique et objectifs d'étude.....	48
2. Lieu et cadre de l'étude	48

3. Echantillonnage	48
I. Caractérisation des échantillons du lactosérum	49
I.1. Contrôle physico-chimique	49
1.1. pH	49
1.2. Acidité titrable	49
1.3. Extrait sec totale (EST)	50
1.4. Matière sèche dégraissée (ESD)	50
1.5. Matière grasse (MG)	51
I.2. Le contrôle microbiologique	51
2.1. Traitement des échantillons	51
2.1.1. Solution mère	51
2.1.2. Préparation des dilutions décimales	52
2.2. Recherche et dénombrement des germes aérobies mésophiles totaux	52
2.3. Recherche et dénombrement des coliformes (en milieu solide).....	54
2.4. Recherche de <i>Salmonella</i>	56
2.5. Recherche de <i>Staphylococcus aureus</i>	57
2.6. Recherche et dénombrement des levures et moisissures	59
II. Isolement et identification des bactéries lactiques	60
1. Milieux et conditions de cultures	60
2. Technique d'isolement et purification des bactéries lactiques	60
2.1 Isolement sur milieu MRS	60
2.2 Purification des souches isolées	60
3. Conservation à court terme	61
4. Identification des souches des bactéries lactiques	62
4.1- Examen macroscopique	62
4.2- Examen microscopique	62

4.3-Recherche de la catalase.....	62
4.4 -Test de croissance en différentes températures	63
4.5 -Croissance en présence de différentes concentrations de NaCl	63
4.6-Croissance à pH 4 et 9,6	63
Thermorésistance	64
4.7. Tests biochimique	64
Type fermentaire	64
Fermentation des sucres.....	64
III. Recherche de l'activité antimicrobienne des bactéries lactiques	65
1. Revivification et vérification de la pureté des souches.....	65
2. Mise en évidence de l'activité antibactérienne	67
2.1 Méthode de Tagg et Mc Given (1971) - Méthode des puits AWDA -	67
2.2 Mesure de diamètre des zones d'inhibition	68
3. Recherche d'activité antifongique	69
3.1. Préparation de suspension monosporale	69
3.2. Méthode de confrontation	69
3.3. Méthode des puits	69
RESULTATS ET DISCUSSION	
I. Paramètres physico-chimique du lactosérum brut	70
II. Résultats de la caractéristique microbiologique du lactosérum brut	70
1. Recherche et dénombrement des germes aérobies mésophiles totaux	70
2. Recherche et dénombrement des autres microorganismes	72
2.1. Coliformes	72
2.2. <i>Staphylococcus aureus</i>	73
2.3. Salmonelles	73
2.4. Levures et moisissures	74
III. Résultats de l'identification des bactéries lactiques	74

IV. Recherche de l'activité antimicrobienne des bactéries lactiques77

Conclusion.....79

Liste des références

ANNEXES

Liste des figures

Figure 01	Image du lactosérum	9
Figure 02	Les techniques de récupération des différentes fractions de lactosérum	16
Figure03	Méthode de l'ultrafiltration	18
Figure04	Allure des courbes de solubilité pour sel cristallisable par refroidissement et par évaporation	19
Figure 05	Valorisation indirecte du lactosérum	23
Figure06	Propriétés idéales des excipients	25
Figure 07	<i>Lactobacillus</i> et <i>Leuconostoc</i> observé au microscope électronique à transmission	32
Figure 08	Arbre phylogénétique des principaux genres de bactéries lactiques et des genres Associés, obtenu par analyse des ARNr 16S	34
Figure 09	Représentation schématique des principales voies de fermentation des hexoses chez les bactéries lactiques	37
Figure 10	Séquence et structure de lantibiotiques de type A (Nisine), B (Mersacidine) et d'un lantibiotique « two-peptides » (Lacticine 3147 A1 et A2)	42
Figure 11	<i>Staphylococcus aureus</i>	45
Figure 12	<i>Escherichia coli</i>	46

Figure 13	<i>Escherichia coli</i> , vue au microscope électronique à balayage et colorée artificiellement	47
Figure 14	<i>Candida albicans</i> vue au microscope électronique et colorée	47
Figure 15	Mesure de pH par pH mètre	49
Figure 16	Mesure de l'acidité titrable par la méthode titrimétrique	50
Figure 17	Mesure d'extrait sec totale par le dessiccateur.	50
Figure 18	Mesure de la matière grasse par la méthode acido-butyrométrique	51
Figure 19	Préparation des dilutions décimales	52
Figure 20	Recherche et dénombrement des germes aérobies mésophiles totaux à 30°C	54
Figure 21	Recherche et dénombrement des coliformes en milieu solide	55
Figure 22	Recherche et dénombrement des <i>Staphylococcus aureus</i>	58
Figure 23	Isolement et purification des bactéries lactique	61
Figure 24	Revivification et vérification de la pureté des souches lactiques	66
Figure 25	Revivification et vérification de la pureté des souches pathogènes	67
Figure 26	Méthode de Tagg et Mc Given (1971) - Méthode des puits AWDA	68
Figure 27	Paramètres physico-chimiques du lactosérum brut.	70
Figure 28	Résultat d'incubation des germes aérobies	70

	mésophiles totaux.	
Figure 29	Résultat d'incubation des coliformes.	73
Figure 30	Résultat d'incubation des <i>Staphylococcus aureus</i> .	73
Figure 31	Aspect macroscopique des souches lactiques isolées sur milieu M17.	76
Figure 32	Aspect macroscopique des souches lactiques isolées sur milieu MRS.	76
Figure 33	Aspect microscopique des souches isolées sur milieu M17, après coloration de Gram (Grossissement x100).	76
Figure 34	Aspect microscopique des souches lactiques isolées sur milieu MRS après coloration de Gram (Grossissement x100).	76
Figure 35	Résultat d'antagonisme des bactéries lactiques.	77

Liste des tableaux

Numéro	Titre	Page
Tableau 01	Composition nutritionnelle moyenne en % du lait de vache	3
Tableau 02	Les principales constantes physico-chimiques du lait de vache	4
Tableau 03	La flore acidifiante du lait et son effet	7
Tableau 04	Différents types de lactosérum	10
Tableau 05	Composition moyenne du lactosérum doux et acide	11
Tableau 06	Acides aminés essentiels (g/100g)	15
Tableau 07	Application des protéines de lactosérum	21
Tableau 08	Activité biologique des protéines et des peptides du lactosérum	24
Tableau 09	Principaux produits issus de la fermentation des bactéries lactiques	30
Tableau 10	Métabolites antimicrobiens de faible masse molaire secrétés par les bactéries lactiques autres que les bactériocines.	39
Tableau 11	La répartition des sucres à tester dans chaque colonne.	65
Tableau 12	Résultats de dénombrement du GAMT dans les échantillons du lactosérum.	71
Tableau 13	Résultats de dénombrement des autres microorganismes.	72

Liste des abréviations

°C : Degré Celsius.

°D : Degré Dornic.

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADP : Adénosine diphosphate.

AFNOR : Agence Française de Normalisation.

ARN : L'acide ribonucléique.

ATP : Adénosine Triphosphate

AWDA : Méthode de puit sur gélose.

BSA : Bovin sérum albumine.

CO₂: Dioxyde de carbone

DBO : La demande biochimique en oxygène

DCLa : Désoxycholate de sodium

DHAP : Dihydroxyacétone phosphate

EMP: Embden-Meyerhof-Parnas

ESD : Extrait sec dégraissé.

EST: Extrait sec total.

FAO: Food and Agriculture Organization.

FBP: Fructose bisphosphate.

GAMT : Germe Aérobie Mésophile Totaux.

GAP : Le glycéraldéhyde-phosphate

GC: GiollitiContonii.

GLK: Glucokinase

Ig: Immunoglobuline.

IgA : Immunoglobuline classe A.

IgE : Immunoglobuline classe G.

IgM : Immunoglobuline classe M.

IgG : Immunoglobuline classe G.

ISO: Organisation International de Normalisation.

J.O.R.A : Journal Officiel de la république Algérienne.

Kcal: Kilocalorie.

KDa: Kilo Daltons.

Kg: Kilogramme.

MG : Matière grasse.

MH : Mueller Hinton.

MRS: Milieu de Man Rogosa et Sharp.

NaCl: Chlorure de sodium.

NAD⁺/NADH, H : Couple oxydant/réducteur du nicotinamide adénine dinucléotide.

NaOH: Hydroxyde de sodium.

PCA: Plate Count Agar.

pH : Potentiel hydrogène.

Pi : Phosphate inorganique.

°T : Température.

TPI : Triose phosphate isomérase.

TSE:Tryptone sel eau.

μ: Micron.

UFC : Unité Formant Colonie.

Introduction

Introduction

Le lait est un produit indispensable à l'équilibre de l'alimentation humaine. Il contient de nombreux nutriments bénéfiques pour l'organisme : protéines, glucides, lipides, sels minéraux, vitamines et oligo-éléments. Il représente un milieu biologique fortement altérable par voie microbienne en raison de sa forte teneur en eau, de son pH voisin de la neutralité et de sa richesse en composants biodégradables (lactose, protéines et lipides)(**Huyghebaert, 2006**).

L'industrie laitière s'intéresse à la transformation du lait comme matière première, ses produits sont nombreux, telle que le yaourt, fromage, petit lait et d'autre. La fabrication du fromage engendre une grande quantité de lactosérum, ce dernier est un sous-produit de l'industrie laitière, il est devenu une source intéressante de composés actifs et de nutriments bénéfiques. Le lactosérum présentant des propriétés incomparables, tant sur le plan nutritionnel par sa teneur en lactose, protéines solubles, vitamines hydrosolubles, matières grasses et les éléments minéraux, que sur le plan technologique par sa richesse en bactéries lactiques(**Benaissa.M, 2018**).

Afin de répondre aux exigences croissantes des consommateurs en produits alimentaires moins traités et exempts de conservateurs chimiques, les bactéries lactiques sont largement utilisées dans l'industrie alimentaire, en tant que starters dans les procédés de fermentations. Leurs apports bénéfiques consistent à l'amélioration de la qualité des produits fermentés en y développant certaines caractéristiques organoleptiques, sans altérer le goût ni l'odeur, et en augmentant leur durée de conservation(**Dortu and Thonart, 2009**).

Depuis longtemps, les bactéries lactiques sont reconnait par leurs propriété de produire des substances antibactériennes leur permettant de se développer préférentiellement dans divers milieux naturels et industriels. L'activité antagoniste des bactéries lactiques est due aux métabolites excrétés : l'acide lactique et autre acides organiques, peroxyde d'hydrogène, le dioxyde de carbone, Le diacétyl, La reutérine et les bactériocines (**Leveau et al., 1991**).

Malgré toutes ces caractéristiques utiles du lactosérum, il est mal valorisé et son utilisation dans l'industrie agro-alimentaire reste très limité, il est souvent jeter et éliminé après fin du procès de fabrication des fromages. C'est dans ce contexte que s'inscrit notre travail qui vise à mettre en évidence l'importance et la valorisation du lactosérum ainsi que d'étudier l'activité antimicrobienne des souches de bactéries lactiques isolées à partir du lactosérum.

Ce mémoire est décrit en deux parties :

- Une partie bibliographique construite en une synthèse et rappels sur la composition physico-chimique et bactériologique du lait et du lactosérum, ainsi que voie de l'incorporation et l'utilisation du lactosérum dans divers domaines agro-alimentaire, pharmaceutique et en biotechnologie ;
- Une seconde partie pratique qui énonce le matériel et les méthodes utilisés dans la caractérisation physico-chimique et microbiologique du lactosérum ainsi que l'isolement et l'identification des bactéries lactiques et de maitre en évidence leurs pouvoir antimicrobien. Cette partie se termine par la présentation et l'interprétation des résultats obtenus, une conclusion et des perspectives.

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE



1. Lait de vache :

1.1.Définition du lait :

Le lait destiné à l'alimentation humaine a été défini en 1908, lors du premier congrès international pour la répression des fraudes alimentaires, comme « produit intégral de la traite totale et ininterrompue d'une femelle laitière bien portante, bien nourrie et non surmenée. Il doit être recueilli proprement et ne pas contenir de colostrum » (**Larpen, 1997**).

En générale, le lait est sécrété par les glandes mammaires des femelles mammifères dont l'activité chez la vache commence à la mise bas et se poursuit pendant une dizaine de mois, tant que dure la traite (**Larpen, 1997**).

Le colostrum est le liquide sécrété par la glande mammaire dans les jours qui suivent la mise bas(**Boudier and Luquet 1981**).Légèrement bleuté ou jaunâtre selon la concentration en β -carotènes et en matière grasse, son odeur est peu marquée et un goût douceâtre(**Cniel, 2006**).Il contient de nombreux nutriments qui fortifient l'organisme : protéines, glucides, lipides, sels minéraux, vitamines et oligo-éléments (**Jensen, 1995**).

Le lait de vache possède des propriétés physicochimiques comme sa majeure composition en eau, son pH plus ou moins neutre, sa densité, qui lui confèrent une variabilité et une hétérogénéité dans sa nature biologique(**Larpen, 1997**).

1.2.Composition nutritionnelle moyenne en % du lait de vache :

Le lait de vache possède des propriétés physicochimiques comme sa majeure composition en eau, son pH plus ou moins neutre, sa densité, qui lui confèrent une variabilité et une hétérogénéité dans sa nature biologique(**Larpen, 1997**).

Tableau 1 : Composition nutritionnelle moyenne en % du lait de vache(**Alais, 1984; Amiot et al., 2002; Jensen, 1995**).

Protéines	3,4
Caséines	2,8
Lipides	3,7
Lactose	4,6
Minéraux	0,7
Eau(%)	87,5

Matière grasse%	3,7
Glucide(%)	4,6

1.3.Principales constantes physico-chimiques du lait de vache :

Tableau 2 : Les principales constantes physico-chimiques du lait de vache (FAO, 1990).

Energie (Kcal/litre)	705
Point de congélation (°C)	1,028 - 1,033
Densité du lait entier à 20°C	0,520 – 0,550
pH à 20°C	6,60 – 6,80
Acidité titrable (°D)	15 – 17
Tension superficielle du lait entier à 15°C	50
Conductivité électrique à 25°C (siemens)	45 ×10P
Indice de réfraction	1,45 – 1,46
Viscosité du lait entier à 20°C (centipoises)	2,0 – 2,2

1.3.1. pH :

Le pH renseigne précisément sur l'état de fraîcheur du lait. Un lait de vache frais a un pH de l'ordre de 6,7. S'il y a une action des bactéries lactiques, une partie du lactose du lait sera dégradée en acide lactique, ce qui entraîne une augmentation de la concentration du lait en ions hydronium (H_3O^+) et donc une diminution du pH (**Belarbi, 2015**).

1.3.2. Acidité du lait :

L'acidité de titration indique le taux d'acide lactique formé à partir du lactose. L'acidité du lait de vache reste assez stable durant la lactation. Elle oscille entre 0,16 et 0,17% d'acide lactique (Veinglou et al., 1982). L'acidité titrable, exprimé en degrés Dornic ($^{\circ}D$) est de 15 à 18 $^{\circ}D$. On distingue l'acidité naturelle, celle qui caractérise le lait frais, d'une acidité développée issue de la transformation du lactose en acide lactique par divers microorganismes(**CIPCLait, 2011**).

1.3.3. Densité :

La densité d'un liquide est une grandeur sans dimension qui désigne le rapport entre la masse d'un volume donné du liquide considéré et la masse du même volume d'eau. Elle oscille entre 1,028 et 1,034. Elle doit être supérieure ou égale à 1,028 à 20 $^{\circ}C$. La densité des laits de grand mélange des laiteries est de 1,032 à 20 $^{\circ}C$. La densité des laits écrémés est supérieure à 1,035. Un lait à la fois écrémé et mouillé peut avoir une densité normale(**Vierling, 2008**).

1.3.4. Point de congélation :

Le point de congélation du lait est l'une de ses caractéristiques physiques les plus constantes. Sa valeur moyenne, si l'on considère des productions individuelles de vache, se situe entre -0,54 $^{\circ}C$ et - 0,55 $^{\circ}C$ (Mathieu, 1998). La mesure de ce paramètre permet l'appréciation de la quantité d'eau éventuellement ajoutée au lait. Un mouillage de 1% entraîne une augmentation du point de congélation d'environ 0,0055 $^{\circ}C$ (**Goursaud, 1985**).

1.4. Microbiologie du lait :

Le lait est par sa composition, un aliment de choix, il contient des matières grasses, lactose, protéines, sels minéraux, des vitamines et de 87% d'eau. Son pH est de 6,7, il va être un substrat très favorable au développement des microorganismes (**Guiraud, 1998**).

I.4.1. Microflore du lait :

Dans de bonnes conditions d'hygiène normale, le lait cru renferme de nombreux germes constituant la flore originale. Cette microflore est représentée essentiellement par des Lactobacilles et des streptocoques lactiques commensaux provenant du pis et des canaux galactophores(Hermier et al., 1997).

Le lait cru peut être contaminé par différents microorganismes avant, pendant et après la traite, ils peuvent être classés dans les flores suivantes :

➤ **Flore originelle ou indigène :**

Le lait contient peu de microorganismes lorsqu'il est prélevé dans de bonnes conditions à partir d'un animal sain (moins de 10^2 germes/ml)(Guiraud, 2003)Il s'agit essentiellement de germes saprophytes : microcoques, streptocoque lactique et lactobacilles(Larpen, 1997). Le lait cru est protégé contre les bactéries par des substances inhibitrices appelées lacténines, mais leur action est de très courte durée (1heure environ) (Guiraud, 2003).

D'autres microorganismes peuvent se trouver dans le lait lorsqu'il est issu d'un animal malade, ils sont généralement pathogènes et dangereux au point de vue sanitaire, Il peut s'agir d'agents de mammites(Guiraud, 1998),c'est-à-dire d'infections du pis : streptocoques pyogènes(Streptococcus), corynébctéries pyogènes, staphylocoques. Il peut s'agir aussi de germes d'infection générale qui peuvent passer dans le lait en l'absence d'anomalies du pis : *Salmonella*, *Brucella*, *Listéria monocytogene*, *Mycobacterium*,...et quelques virus (Guiraud, 2003).

➤ **Flore de contamination :**

Selon le mode de contamination cette flore est classée en :

La flore issue de contamination fécale qui est dangereuse pour le consommateur c'est le cas de :*Bacillus cereus*, *clostridium* ; *E.coli* et des représentants des genres *Brucella* et *Salmonella*.(Bourgeois et al., 1996).

Flores psychotrophes : Il s'agit essentiellement de : *Acinetobacter*, *Clostridium*, *Pseudomonas* et *Flavobacterium* qui se développent à une température de 3 à 7°C(Leveau et al., 1991).*Listeria monocytogenes* est capable de se multiplier à une température comprise entre 0°C et +10°C est qualifiée de ce fait de psychrotrophe(Rosset, 2001).

Equipement de traite et de stockage du lait : microcoques, levures et flore lactique avec lactobacilles, streptocoques (*Streptococcus*, *Enterococcus*), *Leuconostoc*, *Lactococcus*.

Cette flore est souvent spécifique d'une usine.

Manipulateurs : Staphylocoques dans le cas de traite manuelle, mais aussi germes provenant d'expectorations et de contaminations fécales.

Vecteurs divers (insectes en particulier) : flore de contamination fécale. Parmi ces micro-organismes, il en est d'inoffensifs, d'autres de dangereux du point de vue sanitaire, d'autres capables d'entraîner la détérioration du lait (Guiraud, 2003).

Tableau 3 : la flore acidifiante du lait et son effet (Guiraud and Galzy, 1980).

	Effet	
Bacillus	Responsables de l'acidification et la coagulation ou la protéolyse des laits de longue conservation.	
Clostridie	Provoquent le gonflement et l'altération des fromages et donne le goût rance et piquant très désagréable.	
	<i>Clostridium perfringens</i>	peut être dangereuse par ses toxines.
Staphylocoques	Provoquent par leur production de toxines thermostables des intoxications de gravité variable pouvant être redoutables chez l'enfant.	
Entérobactéries	Les salmonelles	Responsables de toxi-infections et des épidémies de fièvre typhoïde et paratyphoïde.
	Les coliformes	Fermentent le lactose, produisant, outre des acides, des gaz (hydrogène et gaz carbonique) qui font gonfler les fromages. Elaborent diverses substances conférant aux produits des goûts et des odeurs très désagréables. Certaines responsables d'infections gastro-intestinales.
	Les colibacilles	E. coli, certaines entéro-pathogènes, peuvent être responsables de graves toxi-infections

		La contamination par les bactéries coliformes est très fréquente ; même légère, elle présente un risque. Des coliformes banals absorbés en quantité massive peuvent déclencher des troubles gastro-intestinaux.
	bacille tuberculeux	Infections tuberculeuses.

2. Lactosérum :

2.1.Définition :

Le lactosérum est un sous-produit de la fabrication fromagère, est obtenu suite à la coagulation des caséines sous l'action de la présure (lactosérum doux), ou suivant l'acidification du lait (lactosérum acide)(Morr, 1989). La production de 10-20 Kg de fromage donne 80 à 90 Kg de lactosérum(Erdem et al., 2006).

Le lactosérum est un produit découvert depuis plus de 3000 ans avant Jésus-Christ, par des Bédouins lors du transport de lait (De Witt, 2001). C'est un liquide jaune verdâtre, contenant une quantité importante de protéines de lait environ 20% (6g/L) et riche en élément nutritif (Muller et al., 2003).

Il est cependant un produit intéressant par ses teneurs en protéines riches en acides aminés indispensables (lysine et tryptophane), en lactose et par la présence de nombreuses vitamines du groupe B comme la thiamine et la riboflavine(Veisseyre, 1975). Il représente essentiellement une source d'énergie et de carbone son teneur élevée (75% de la matière sèche) en lactose (Kennedy et al., 1985). D'autres éléments de valeur s'y retrouvent, dont les protéines (10% de la matière sèche), le calcium (0,45% de la matière sèche), le phosphore (0,40% de la matière sèche), et les vitamines hydrosolubles, sont les plus importants (Modler, 1988).



Figure 01 : Image du lactosérum

2.2.Types de lactosérum :

Le lactosérum doit être considéré comme un produit dérivé plutôt qu'un sous-produit de la fabrication des fromages, ou de la caséine. On distingue deux types de lactosérum : celui résultant de la coagulation des laits non acides, par la présure, et qu'on appelle " lactosérum doux" et celui résultant, de la fabrication des fromages à pâtes fraîches, à pâtes molles ou de la caséine lactique appelle " lactosérum acide(De la Fuente, 2002; Lairini et al., 2014).

Tableau 4 : Différents types de lactosérum (Adrian, 1991).

Degré d'acidité	Type	pH	Production
<18°D	Lactosérum doux	6,5 ± 6,7	-Fromagerie à pâte pressée - Fromagerie à pâte cuite - Caséinerie présure.
>18°D	Lactosérum acide	4,5 – 5,5	- Fromagerie à pâte fraîche - Fromagerie à pâte molle - Caséinerie acide

2.2.1. Lactosérum acide :

Obtenu après la coagulation du lait par précipitation des caséines à leur pH isoélectrique de 4.6 par ajout d'acide fort ou d'acide lactique(Violleau, 1999). La caséine est combinée à des sels de calcium, l'acidification entraîne sa déminéralisation qui fait passer dans le sérum une part importante d'élément minéraux, notamment le calcium et le phosphore (Sottiez, 1990).

Les lactosérums acides sont moins riches en lactose et plus riche en minéraux. Ils sont aussi plusensemencés en germes lactiques et moins sujets à des fermentations que les lactosérums doux (Moletta, 2002).

Les teneurs élevées en acide lactique et en minéraux posent des difficultés pour la déshydratation ; aussi les lactosérums acides sont souvent utilisés à l'état liquide alors que les sérums doux sont généralement déshydraté (Moletta, 2002).

Le lactosérum acide provient de la fabrication des pâtes fraîches et des pâtes molles, son pH varie entre 4.5 - 5 (Adrian, 1991).

2.2.2. Lactosérum doux :

Il est obtenu après la coagulation de la caséine sous l'action de la présure sans acidification préalable, on obtient alors un sérum doux, pauvre en sels minéraux et riche en lactose et en protéines. En plus des protéines solubles du lait, ce type de lactosérum contient une glycoprotéine qui provient de l'hydrolyse de la caséine Kappa par la présure (De la Fuente, 2002; Sottiez, 1990).

Lorsque le lactosérum de fromagerie n'est pas traité avec toutes les précautions nécessaires, la poursuite de la fermentation naturelle augmente son acidité. Le lactosérum doux issu de la fabrication de fromage à pâte pressée cuite ou non cuite (Emmenthal, Saint Paulin, Edam.....etc.), est de pH variant entre 5 et 6,3 (Morr and Ha, 1993).

2.3.Composition de lactosérum :

Selon le procédé de coagulation et la composition initiale du lait (donc la saison, la race des animaux, le type d'alimentation, etc.), la composition du lactosérum peut varier sensiblement (DAHACHE and MESSAOUDI, 2019).D'après ce tableau (tableau 5) on constate que les lactosérums sont riches en lactose et potassium. Dans le lactosérum acide une partie du lactose a été transformé en acide lactique; les lactosérums doux sont pauvres en calcium (reste dans le caillé pour participer à la coagulation des protéines), alors que les lactosérums acides sont riches en calcium (Morr and Ha, 1993).

Tableau 5 : Composition moyenne du lactosérum doux et acide (Linden and Lorient-Biochimie agro-industrielle, 1994; Morr and Ha, 1993)

Constituants	Lactosérum doux (%)	Lactosérum acide (%)
pH	6,3	4,6
Eau	93	93,5
Lactose	4,77	4,71
Protéines	0,82	0,75
MG	0,07	0,03

Acide lactique	0,15	0,55
Cendres	0,53	0,69
Calcium	0,05	0,13
Sodium	0,07	0,06
Potassium	0,13	0,15
Phosphore	0,06	0,09

2.3.1. Lactose :

Le lactose est le principal constituant du lactosérum, c'est un diholoside constitué par l'union d'une molécule de α -D-glucose et d'une molécule de β -D-galactose, ce qui est à l'origine de la présence de deux lactoses stéréo-isomères réducteurs (**Beerens et al., 1990**). Le lactose est caractérisé par :

- Une solubilité limitée.
- Un pouvoir sucrant faible. Sa seule source importante dans la nature est le lait et les produits laitiers (**Visser et al., 1988**).

2.3.2. Minéraux :

Selon certaines pratiques fromagères, il y'a ajout de sel, ce dernier avec toutes les matières minérales en solution dans le lait se retrouve dans le lactosérum. Les 8 à 10% des matières salines de l'extrait sec de sérum sont constitués pour plus de 50% de chlorures de sodium et de potassium et pour le reste de différents sels de calcium, principalement sous forme de phosphate de calcium (**Vrignaud, 1983**).

D'après (**Meréo, 1971**), ces sels minéraux constituent les éléments indésirables « de sérum ». En effet, il semblerait qu'une quantité relativement élevée constitue un obstacle à l'utilisation du lactosérum dans l'alimentation humaine et infantile. Mais il est utilisé pour la préparation de lactose pur et des protéines.

Il est donc avantageux de déminéraliser le sérum partiellement grâce à des techniques physico-chimiques, telle que l'électrodialyse (**Linden and Lorient-Biochimie agro-industrielle, 1994**).

2.3.3. Protéines du lactosérum :

Deux grandes familles de protéines entrent dans la composition du lait à savoir, la première famille est constituée de caséines qui représentent environ 80% des protéines totales du lait et la seconde est composée des protéines solubles constituées essentiellement de β lactoglobuline (β -LG), -lactalbumine (-LA)(Morr and Ha, 1993).

L'albumine sérique bovine (BSA), les immunoglobulines (Ig) et les protéases peptones (De Wit, 1981; De Wit and Hontelez-Backx, 1981; De Witt, 2001). A l'échelle industrielle, ces protéines solubles sont extraites à partir du lactosérum, ce dernier contient environ 1% de protéines (Morr and Ha, 1993).

2.3.3.1. β -lactoglobuline (β -LG) :

La β -lactoglobuline (β -LG) est la plus abondante des protéines du lactosérum, elle représente environ 2 à 4 g/L, ce qui correspond à 50% des protéines totales du lactosérum (Eugenia et al., 2006). Il s'agit d'une protéine globulaire de structure compacte, composée de 162 résidus d'acide aminés et dont la masse moléculaire relative est de 18,3 KDa. Jusqu'à présent, 9 variantes génétiques ont été identifiées dans cette protéine (Eugenia et al., 2006; Uchida et al., 1996).

Bien que le rôle physiologique de la β -lactoglobuline soit encore mal défini. Cette protéine est d'une très grande qualité nutritive grâce à son contenu élevé en acides aminés essentiels, notamment la leucine et la lysine. De plus, elle est riche en méthionine et en cystéine. Principales sources de soufre (Arthur et al., 1997; Hambling et al., 1992; Morr, 1989).

2.3.3.2. Lactalbumine (-LA) :

L' -lactalbumine est une protéine globulaire de structure primaire présentant de nombreuses homologies de séquences avec le lysozyme d'œuf de poule, avec 47 résidus d'acides aminés identiques sur 123, son poids moléculaire est de 14 KDa et se présente avec une concentration de 1 à 1,5 g/L de lactosérum (environ 20% des protéines totales de lactosérum) (Cheftel et al., 1985).

L' -lactalbumine est une autre protéine fonctionnelle très intéressante par sa composition riche en tryptophane, qui en fait une base de fabrication de peptides destinés à l'alimentation diététique ou médicamenteuse.

Cette protéine intervient comme cofacteur dans la biosynthèse du lactose, à partir du galactose et du glucose (**Brew and Grobler, 1992; Creamer and MacGibbon, 1996; De Wit and Hontelez-Backx, 1981; De Witt, 2001**).

2.3.3.3. Sérum albumine bovine (BSA) :

Sérum albumine bovine représente 0,1 à 0,4 g/L des protéines de lait, il est constitué de 582 acides aminés. Les liaisons des acides gras stabilisent la molécule de protéine contre la dénaturation par la chaleur.

Il est soluble jusqu'à 35% à température de 3 °C dans l'eau distillée, mais subit une précipitation extensive à la température ambiante dans la gamme de 40 à 45 °C (**Gumpen et al., 1979; Lin et al., 1976; Morr and Ha, 1993**).

2.3.3.4. Immunoglobuline (Ig) :

L'immunoglobuline se réfère à une famille hétérogène des glycoprotéines, ayant une activité d'anticorps (Eigel et al., 1984). L'immunoglobuline se compose de quatre classes : IgG1, IgG2, IgA, IgM, et IgE. Ceux-ci ont été identifiés dans le lait. Ces protéines sont des monomères de deux chaînes polypeptides de 20 KDa et deux chaînes polypeptides de 50 à 70 KDa qui sont liées par des ponts disulfures (**Brunner, 1977**).

Le lait de vache contient 0,6 à 1,0 g/L d'immunoglobuline, 80% c'est IgG. Cette protéine est caractérisée par un plus haut dévoilement thermique que l' α -lactalbumine et la β -lactoglobuline (**Eigel et al., 1984**).

Les protéines ne forment pas la fraction la plus abondante du lactosérum, mais elle est la plus intéressante sur le plan économique et nutritionnel qui est supérieure aux protéines du blanc d'œuf, prise comme protéine de référence (**Sottiez, 1990**). Selon (**Moletta, 2002**), la teneur moyenne du lactosérum en acides aminés est donnée par le (**Tableau 6**).

Tableau 6 : Acides aminés essentiels (g/100g)(Moletta, 2002).

Acide amine	Protéines de lactosérum	Caséines
Tryptophane	1,38	1,22
Lysine	10,9	8,81
Méthionine	1,95	3,07
Cystéine	1,35	0,57
Leucine	7,09	9,8
Isoleucine	4,06	4,8
Phénylalanine	3,47	5,18
Valine	5,54	3,55
Thréonine	5,03	4,7

2.4. Techniques de récupération des principaux constituants du lactosérum :

La mise en valeur du lactosérum passe par la séparation de ses différents constituants, La **figure 02** : illustre les principales techniques de séparation des fractions du lactosérum.

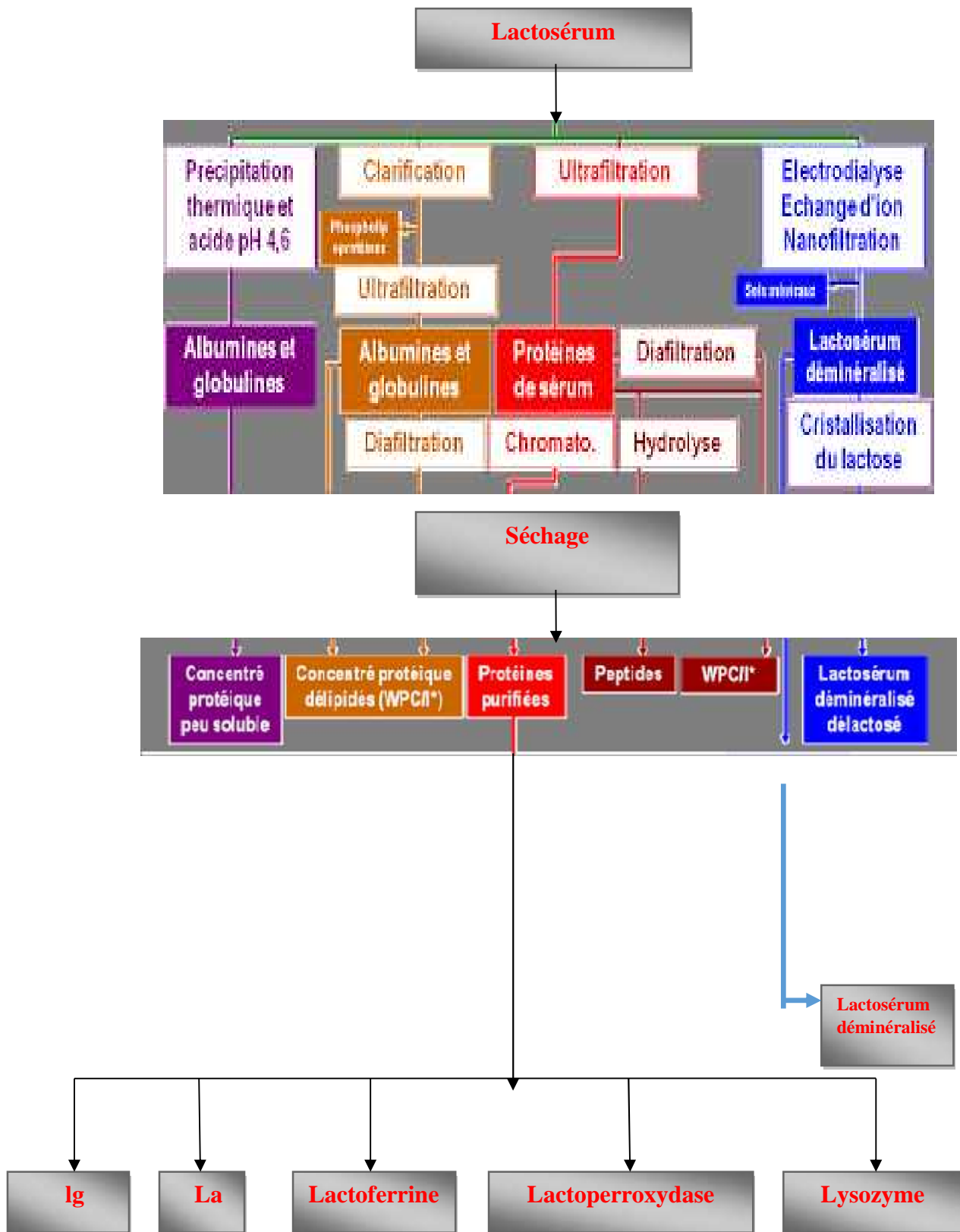


Figure 02: Les techniques de récupération des différentes fractions de lactosérum (Yee et al., 2007)

2.4.1. Extraction des protéines :

L'apport alimentaire en protéines est indispensable car il existe des acides aminés essentiels qui ne peuvent pas être synthétisés par l'organisme. De plus, elles possèdent des activités biologiques très variées (enzymatiques, hormonales, structurales et motrices). C'est pourquoi leurs extractions et purifications, visant à obtenir des concentrés, se révèlent utiles (Yee et al., 2007).

) Thermocoagulation :

Il s'agit du procédé le plus ancien. Il s'agit de porter à ébullition du lactosérum acidifié à pH 4,6-4,7 pour que les protéines précipitent. Leur récupération se fait par filtration ou décantation. La concentration finale du filtrat est environ de 88% pour les protéines. En revanche, les propriétés fonctionnelles des protéines sont altérées (Linden and Lorient-Biochimie agro-industrielle, 1994).

2.4.1.1.Ultrafiltration :

L'ultrafiltration permet de récupérer les protéines du lactosérum tout en éliminant le lactose et sels minéraux. Ces opérations assurent la rétention des protéines en amont de la membrane filtrante (retentât) et laissent apparaître un perméat constitué essentiellement d'eau, de lactose et sels minéraux. Ces procédés peuvent permettre d'obtenir des concentrés à 80% de protéines. De plus, ils n'altèrent pas la forme initiale de la protéine (Taddei et al., 1986).

2.4.1.2.La chromatographie d'échange d'ion :

Est utilisée pour la production industrielle de concentré (90% et plus). Dans le cas du lactosérum doux, le procédé retenu consiste à mettre en œuvre une colonne des phérosilchangeur d'anion (Sphérosil QMA) et une colonne de sphérosil échangeur decation faible (sphérosil C). En effet, au pH du lactosérum doux (pH=6,6) la plupart des protéines sont sous forme anionique et s'absorbent sur échangeur d'anion et une faible proportion (7 à 10%), essentiellement constitué d'immunoglobulines, est sous forme cationique et s'absorbent sur échangeur de cations (Linden and Lorient-Biochimie agro-industrielle, 1994).

2.4.2. Extraction du lactose :

2.4.2.1.Ultrafiltration :

L'ultrafiltration, dont le principe est expliqué précédemment, permet de séparer les protéines du perméat de lactosérum. On obtient alors d'un côté le perméat contenant le lactose et les sels minéraux, et de l'autre le rétentat où se trouvent les protéines (**Figure 03**). Cette technique est donc une méthode d'extraction du lactose, cependant elle ne permet pas d'obtenir du lactose dépourvu de sels minéraux(**Page et al., 1982**)

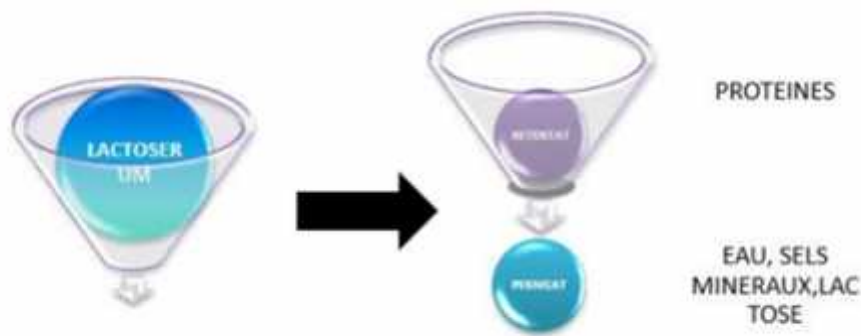


Figure03 : méthode de l'ultrafiltration.

2.4.2.2.Cristallisation :

L'extraction du lactose peut se faire par un procédé de cristallisation. Préalablement, il faut enlever les protéines (dénaturées ou non) du lactosérum car elles rendent ce procédé moins efficace. La cristallisation est une opération qui a pour but d'isoler un produit, ici le lactose, sous forme de cristaux. La première étape consiste à concentrer le lactosérum par évaporation. Une fois concentré, ce dernier est soumis à une cristallisation par refroidissement (**Génin, 1939**) Les cristaux de lactose obtenus sont séparés puis broyés (ils peuvent parfois être soumis à un raffinage).

La cristallisation se fait généralement en refroidissant la solution mais, pour le lactose, un simple refroidissement ne permet pas d'obtenir un bon rendement(**Yee et al., 2007**).

En effet, certains composés peuvent être cristallisés par refroidissement avec un rendement significatif (**Figure 04**, courbe rose), ce qui n'est pas le cas du lactose. Il faut donc le concentrer auparavant (**Figure 04**, courbe bleue).

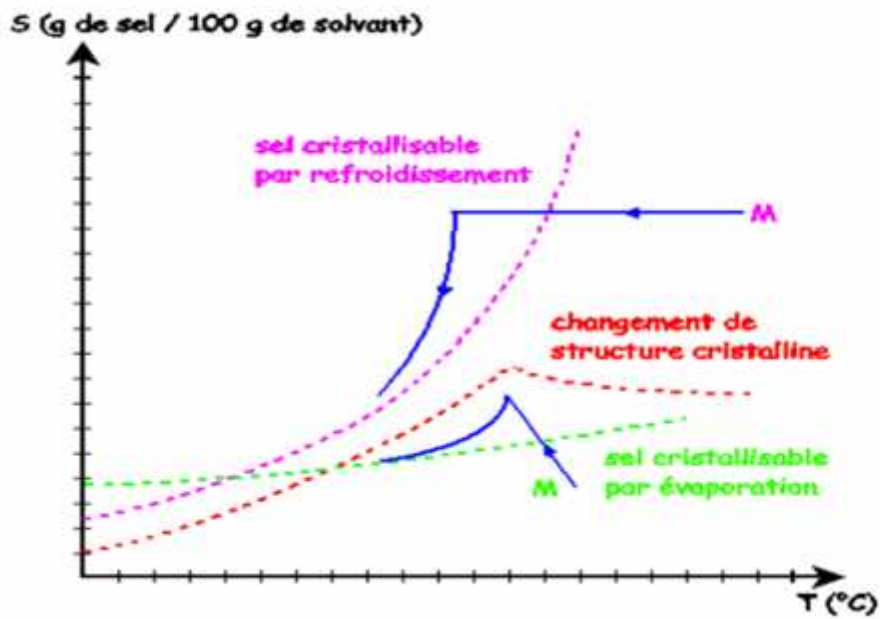


Figure04 : Allure des courbes de solubilité pour sel cristallisable par refroidissement et par évaporation(Yee et al., 2007).

2.5.Extraction des sels minéraux et des vitamines :

Il existe différents procédés, de nature stérique ou ionique, pour réaliser la séparation des sels minéraux des autres constituants du lactosérum.

2.5.1. Par filtration :

Premièrement, la nanofiltration permet d'isoler les sels minéraux des protéines et des molécules de lactose, on parle alors de déminéralisation du lactosérum. Elle nécessite l'emploi de membranes semi-perméables formées de polymères ou à base de céramique dont la taille des pores sont comprise entre 10^{-3} et 10^{-2} μm . L'application d'une pression de 20 à 40 bar permet de séparer le rétentat, retenu au niveau de la membrane, du perméat, qui passera la membrane. La différence de pression hydrostatique, créée au sein de ce système par l'association d'une pompe et d'une valve, est le moteur de la séparation. Le perméat sera donc uniquement constitué d'eau et de sels minéraux (Vrignaud, 1983).

Afin de pouvoir isoler complètement les sels minéraux de cette phase aqueuse, on peut ensuite réaliser une osmose inverse. Elle utilise une membrane dont les pores possèdent une taille de 10^{-4} à 10^{-3} μm et nécessite une pression de 30 à 60 bar. Le principe de cette séparation est

basé sur une différence de pression osmotique entre le rétentat et le perméat (**Linden and Lorient-Biochimie agro-industrielle, 1994**).

2.5.2. Electrodialyse et chromatographie :

L'électrodialyse est une autre technique qui permet de récupérer uniquement les espèces ioniques du lactosérum. Cette extraction implique un échange d'ions à travers des membranes sélectives implantées entre deux électrodes. La force motrice résulte d'un champ électrique. Deux types de membranes interviennent, les premières sont chargées positivement (anioniques) et les autres le sont négativement (cationiques).

Le lactosérum passe au niveau des enveloppes constituées des différentes couches de membrane tandis que de l'eau circule entre ces enveloppes. Les cations du lactosérum vont migrer vers la cathode et ses anions vers l'anode (**Violleau, 1999**).

3. Valorisation du lactosérum :

3.1.Introduction :

La valorisation du lactosérum en alimentation humaine et en industrie chimique est pharmaceutique est rendu possible grâce aux craquages pour obtenir, par fractionnement, des composée protéiques et glucidique(Moletta, 2002; Taddei et al., 1986).

3.2.Utilisation en alimentation humaine :

Les protéines, en particulier les albumines présentent un intérêt par leur propriétés fonctionnelles solubilité sur une large gamme de pH, pouvoir moussant ou texturant, capacité de rétention d'eau, aptitude à la gélification. En plus, de leur haute valeur nutritionnelle liée en particulier à la présence de protéines riche en acides aminés essentiels dont la lysine et le tryptophane (Tableau 07) (Morr and Ha, 1993).

Les propriétés nutritionnelles et fonctionnelles des protéines du lactosérum ont rendu son utilisation possible dans de nombreux domaines de l'industrie agroalimentaire, (Tableau 07)en particulier en tant que texturant, foisonnant ou ingrédient nutritionnel(Damodaran, 1997; Moletta, 2002).

Tableau07 :Application des protéines de lactosérum (Linden and Lorient-Biochimie agro-industrielle, 1994).

Produits	Fonctions
Produits de boulangerie-biscuiterie	Apport protéique, rétention d'eau, gélifiant, texture (interaction avec gluten)
Pâtes alimentaires	Apport protéique, texture
Pâtisserie (meringue, génoise)	Emulsifiant, moussant, rétention d'eau, gélifiant
Confiserie (caramel, nougats ...= Chocolat au lait	Emulsifiant, arôme, texture, dispersibilité
Potages, sauces	Epaississant (interaction avec amidon), émulsifiant
Plats cuisinés	Epaississant, émulsifiant, rétention d'eau
Farines lactées	Apport protéique, solubilité

Boissons lactées ou fruitées	Soluble à chaud ou / et pH acide Epaississant
Aliments diététiques et infantiles (alimentation entérale)	Apport protéique, solubilité, épaississant
Fromages naturels et fondus	Emulsifiant, épaississant, gélifiant
« imitationcheese,dip », pâtes à tartiner, coffee whitener, crèmes glacées	Emulsifiant, épaississant
Crèmes desserts, flans, yaourts	Emulsifiant, épaississant, gélifiant
Produits carnés (saucisse, pâtes, hamburgers)	Emulsifiant, épaississant, liant, gélifiant, rétention d'eau et de matières grasses

3.3.Utilisation en alimentation animale :

Les poudres de lactosérum sont utilisées dans les aliments d'allaitement pour veaux. Elles sont également employées, de même que les concentrés liquides, en mélange avec d'autres aliments (hachis de paille, farine,..) pour animaux d'élevage (bovins, porcins, volailles) (Rollema et al., 1989).

3.4.Utilisation en biotechnologique :

➤ Biotransformation de lactose :

A partir de lactose de lactosérum, on peut produire des solvants, des vitamines, des polysaccharides du méthane, des enzymes, des acides aminés et organiques et de nombreux autres composés(Rollema et al., 1989).

L'ensemble des procédés de fermentation du lactosérum montre que le système de production d'acide lactique est l'un des plus avantageux (Figure05).

➤ Substrat de fermentation :

Le lactosérum par sa composition biochimique possède d'intéressantes propriétés comme milieu de fermentation pour plusieurs microorganismes assimilant le lactose comme source de carbone et d'énergie (Alais, 1975) :

-) **Lesbactéries** : à titre d'exemple *Lactobacillus casei* pour la production d'acide lactique (Morabito, 1994).
-) **Lesmoisissures** : à titre d'exemple *Penicillium camemberti* producteur de protéases (Mechakra et al., 1999).

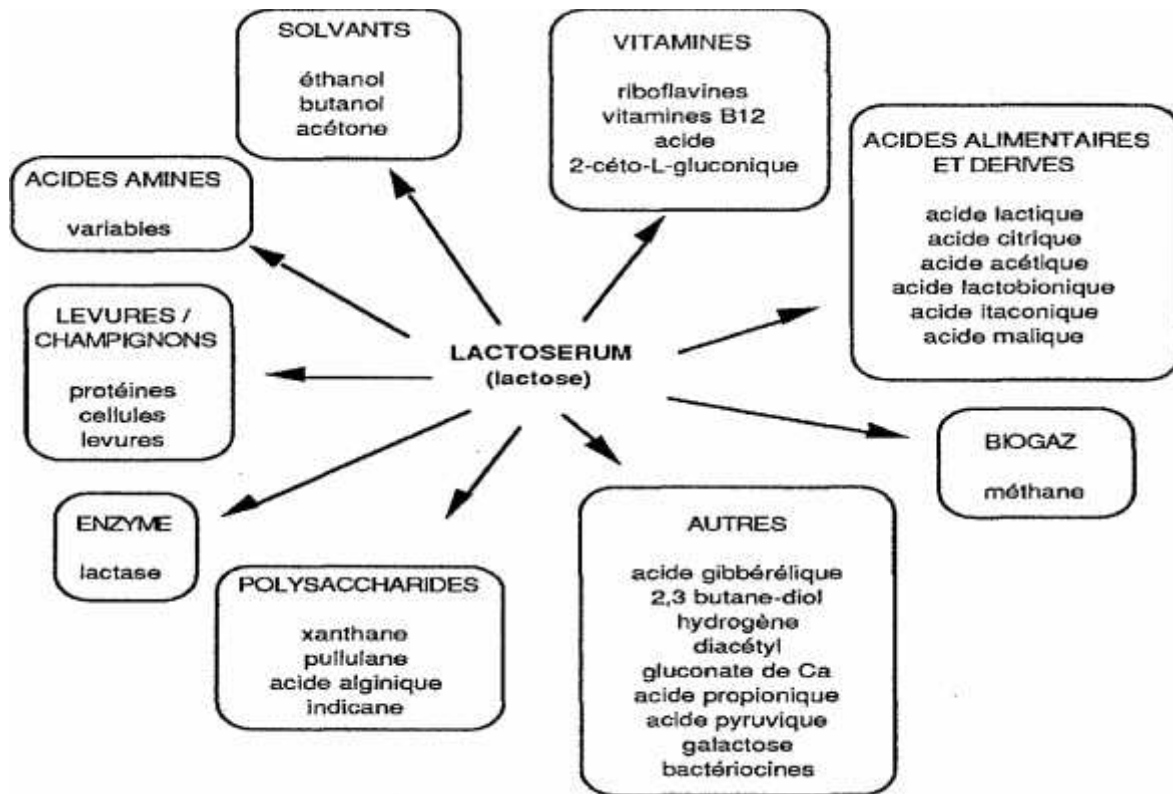


Figure 05 : Valorisation indirecte du lactosérum (Rollema et al., 1989).

3.5. Dans le domaine médical :

Les différents types de protéine ou peptide se trouvant dans le lactosérum peuvent être utiles lorsqu'on les applique dans l'alimentation humaine. Ils ont un effet bénéfique sur la santé. (Voir tableau 08) Comportant les protéines du lactosérum et leurs rôles (Berry, 2000).

Tableau 08 : Activité biologique des protéines et des peptides du lactosérum (Berry, 2000).

Protéine	Activité probable
Protéine du lactosérum brut	Anti-cancérogène Stimule le système immunitaire Prolonge la durée de vie Réduire le cholestérol
Beta lactoglobuline Beta lactorphine Alpha lactalbumine Alpha lactorphine	Facilite la digestion Augmente le contrôle de la douleur Anti-cancérogène Augmente le contrôle de la douleur
Lactoferrine Lactoferrine	Antimicrobien (antiviral/anti-B) Contrôle le transport du fer Stimule le système immunitaire Anti-inflammatoire Favorise la croissance cellulaire Anti-cancérogène Antimicrobien
Immunoglobuline	Immunité passive
Lactoperoxidase	Antibactérien
Sérum-albumine sérorphine	Augmente le contrôle de la douleur
Glucomacropéptide	Facilite la digestion

3.6.Exemples d'application de lactosérum et ses composés :

3.6.1. Usage alimentaire :

3.6.1.1.Compléments alimentaires comme Sels minéraux et vitamines :

Les sels minéraux recueillis à partir du lactosérum peuvent venir enrichir des préparations alimentaires où l'on désire obtenir un contrôle strict des quantités et des types de sels minéraux ajoutés. Par exemple, la plupart des sels minéraux sont stables dans les eaux minérales (**Debry and Feron, 1976**).

Les réutiliser dans la fabrication d'eaux minérales initialement faiblement minéralisée pourrait être éventuellement envisagé. Ils peuvent aussi être introduits dans les boissons destinées à la récupération du sportif où un apport contrôlé permettrait de combler les déficits en sels minéraux dus à l'effort prolongé effectué. Ces boissons contiennent surtout du sodium, du potassium et du magnésium. Les vitamines B et C sont aussi des composants majeurs de ces boissons énergétiques mais leurs bienfaits seraient contestés(**Vrignaud, 1983**).

3.6.2. Application dans les domaines pharmaceutiques et cosmétiques :

3.6.2.1.À partir du lactose :

Le lactose peut être utilisé directement, sans transformation, en tant qu'excipient dans le domaine pharmaceutique et plus particulièrement dans celui de la pharmacie galénique (mise en forme médicamenteuse(**Visser et al., 1988**).

Un excipient est un élément inerte qui donne une plus grande stabilité aux substances actives. Il a également des propriétés physiques qui confèrent leur forme, leur solubilité, leur dissolution correcte et ciblée aux comprimés. On retrouve ces caractéristiques propres à un bon excipient sur la **figure06**.

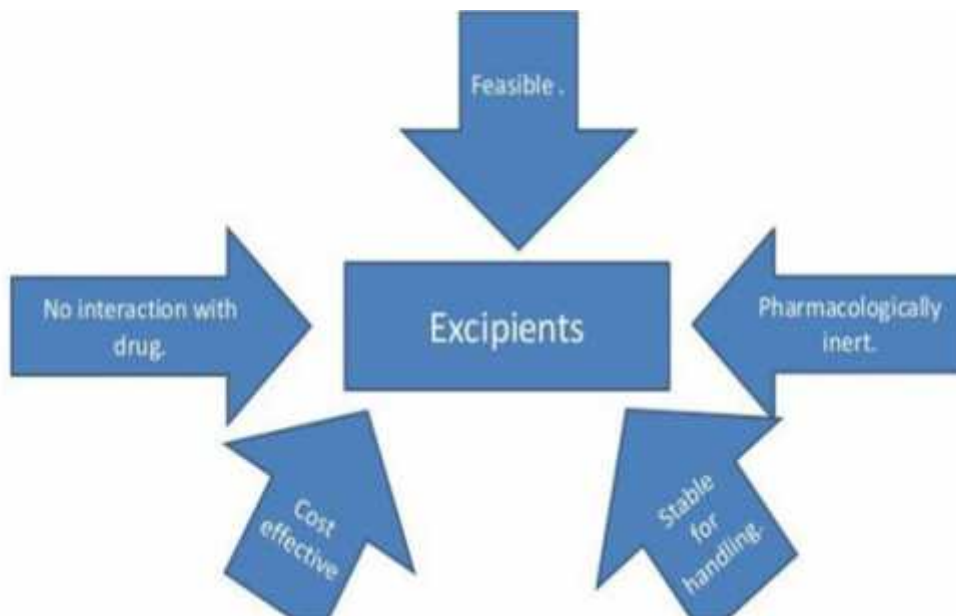


Figure06 : Propriétés idéales des excipients(Visser et al., 1988).

Utiliser le lactose comme excipient est économiquement intéressant car il est peu coûteux, compatible avec un bon nombre de substances actives, très stable et a une excellente solubilité avec l'eau. Il faut tout de même noter le fait qu'une partie non négligeable de la population est intolérante au lactose. En plus de sa valorisation directe, il existe des transformations du lactose qui aboutissent à des produits utilisés en pharmacie (Visser et al., 1988).

Le lactose permet d'obtenir, par isomérisation, le lactulose qui est fréquemment utilisé en tant que laxatif pour traiter la constipation et pour traiter des maladies telles que l'encéphalopathie hépatique (cirrhose du foie). A partir du lactose, il peut également y avoir obtention d'acide succinique ($C_4H_6O_4$). Il est actuellement majoritairement produit par l'industrie pétrochimique mais il est, de plus en plus, produit par des procédés biotechnologiques, notamment par la fermentation bactérienne du lactose. Actuellement, les deux meilleures souches bactériennes productrices d'acide succinique sont *Actinobacillus succinogenes* et *Mannheimia succiniciproducen*(Génin, 1939).

) Le procédé peut être séparé en plusieurs étapes,

Tout d'abord, la fermentation en elle-même puis la récupération de la molécule d'intérêt, sa concentration et sa purification. Pour cela, il existe plusieurs méthodes telles que l'électrodialyse (séparation des molécules par une membrane échangeuse d'ions), la précipitation sous forme de sels (suivi d'une filtration) et l'extraction à base d'amines tertiaires hydrophobes. L'acide succinique est utilisé particulièrement dans l'industrie

chimique (pour la production de polymères biodégradables, de solvants « verts », de surfactants et de détergents), dans l'industrie alimentaire, pharmaceutique, additifs pour stimuler la croissance des animaux et plantes (**Benaissa.M, 2018**). Dans l'industrie pharmaceutique, il est utilisé comme excipient et donc comme un stabilisateur tout comme le lactose. Il entre également dans la fabrication de certains antibiotiques, acides aminés et vitamines alimentaires (**Jacque, 2000**).

Il est possible de synthétiser l'acide lactobionique en oxydant le lactose. Cet acide dérivé du lactose est utilisé en cosmétique en tant qu'antioxydant, mais aussi en tant qu'excipient car il donne la texture et les propriétés physico-chimiques des produits cosmétiques. Il est également possible de synthétiser des esters de l'acide propionique servant à la fabrication de composant de parfum ou d'arôme. L'acide propionique est également employé dans la synthèse de médicaments, comme CALCIDOSE, vitamine D3 (**Génin, 1939**).

3.7. Pouvoir polluant du lactosérum :

Le lactosérum est un sous-produit de l'industrie fromagère, lorsqu'il est déversé dans une rivière ; il engendre des effets polluants : les bactéries et autres micro-organismes vivants dans l'eau, attaquent certains constituants du lactosérum (lactose principalement) en consommant l'oxygène de l'eau. Ce dernier manquera aux poissons et aux plantes aquatiques qui mourront d'asphyxie (**Yang et al., 1980**). Le rejet du lactosérum est considéré comme un polluant car il impose une forte demande biochimique en oxygène (DBO), de 30000-50000 ppm (**Marwaha and Kennedy, 1988**).

Ces torts causés à l'environnement pourraient être évités d'autant que le lactosérum est une matière noble dont il y a encore beaucoup à tirer.

4. Bactéries lactiques :

4.1. Généralités sur les bactéries lactiques :

Les bactéries lactiques, de très anciens micro-organismes, utilisés pour la fermentation des aliments depuis plus de 4000 ans, sans pour autant comprendre la base scientifique de leur utilisation (**Dridier and Prevost, 2009**). Ce n'est qu'à la fin du 19^{ème} siècle, époque des grandes découvertes de la microbiologie, que le groupe des bactéries lactiques ou bactéries de l'acide lactique a été défini, plus précisément en 1919 par Orla-Jensen. Il a réuni plusieurs genres caractérisés par leur capacité à fermenter les glucides en produisant de l'acide lactique (**Tredez, 2008**).

Ce sont des cellules vivantes, procaryotes, hétérotrophes et chimio-organotrophes. Les bactéries lactiques sont un groupe de bactéries à Gram positives, immobiles, asporulées, anaérobies mais aéro-tolérantes, dépourvues de catalase (certaines souches possèdent une pseudo catalase sur des milieux riches en hème) de nitrate réductase, et de cytochrome oxydase (**Atlan et al., 2008; Hélène, 2007**).

Ces bactéries forment un groupe relativement divers, ayant des caractéristiques physiologiques et métaboliques communes (**Schleifer and Ludwig, 1995; Stiles and Holzappel, 1997; Yang et al., 1980**).

Leur forme peut être coccoïde, coccobacillaire ou bacillaire, elles sont généralement mésophiles avec une température optimum de croissance entre 20°C et 30°C ou thermophiles entre 40°C et 45°. La majorité des souches se développent à pH 4.0-4.5, certaines sont en activité à pH 9.6 et d'autres à pH 3.2 (**Jozala et al., 2005**).

Les bactéries lactiques sont caractérisées par un métabolisme exclusivement fermentaire leur permettant, en utilisant des sucres fermentescibles tel le glucose, de produire principalement de l'acide lactique mais aussi d'autres acides organiques (acide acétique, acide formique.) (**Raynaud, 2006**).

Du point de vue nutritionnel, les bactéries lactiques se caractérisent par des exigences assez complexes, en ce qui concerne les acides aminés, les acides gras, les peptides, les vitamines, les glucides fermentescibles et les sels.

Ces bactéries servent à de très nombreux procédés, aussi bien dans la transformation du lait, que dans la fermentation des végétaux, dans l'œnologie et dans la production des produits

carnés fermentés(Guiraud, 1998), ce qui a conduit à la reconnaissance de leur statut GRAS (Generally Recognized As Safe) (Klaenhammer, 1993).

4.2. Habitat :

Les bactéries lactiques sont dit ubiquistes : Car on les retrouve dans différentes niches écologiques riches en nutriments comme le lait et les produits laitiers, les végétaux, la viande, le poisson, les muqueuses humaines et animales et dans le tractus digestif,(Mayo et al., 2010)Mais certaines espèces semblent s'adapter à un environnement spécifique et ne sont guère trouvées ailleurs que dans leurs habitats naturels (De Roissart, 1986).

Les espèces du genre *Lactococcus* sont isolées du lait ou des végétaux qui sont les réservoirs naturels de la plupart de ses espèces. L'espèce *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* est isolée pour la première fois à partir du lait fermenté par Lister en 1873 et reconnue comme agent primaire de l'acidification du lait caillé

Parmi les espèces du genre *Streptococcus*, *Streptococcus thermophilus* est isolée du lait pasteurisé, du matériel de laiterie et de levains artisanaux.

Les espèces du genre *Leuconostoc* sont isolées du lait, des produits laitiers, des fruits, des légumes (en particulier la betterave), des végétaux en fermentation (comme la choucroute), des produits de la panification et des solutions visqueuses de sucre dans les sucreries (Devoyod and Poullain, 1988).

Les espèces du genre *Pediococcus* sont présentes surtout dans les végétaux endécomposition, parfois dans les boissons alcoolisées, le lait, les différents fromages (Parmesan et autres fromages italiens) et les préparations culinaires (Saucisses, anchois salés ou sauce de soja)

Les espèces du genre *Lactobacillus* sont présentes dans plusieurs milieux différents : Dans le lait et les fromages (*Lb. Casei* subsp. *casei*, *Lb. plantarum*, *Lb. curvatus* et *Lb. brevis*), dans les laits fermentés (*Lb. kéfir*, *Lb. brevis* et *Lb. fermentum*), dans les produits végétaux fermentés, les marinades, l'ensilage, le vin et les viandes fraîche sou fermentées (*Lb. Brevis*, *Lb. Curvatus*, *Lb. Buchneri* et *Lb. San francisco*) (Desmazeaud, 1998).

4.3. Utilisation des bactéries lactiques :

L'utilisation de la fermentation par l'homme remonte à des temps très anciens. Les ferments lactiques, contenant une ou plusieurs cultures pures en proportions définies de différentes bactéries lactiques, sont largement utilisés en agroalimentaire (Holzapfel, 2002). Les bactéries lactiques interviennent dans de nombreuses transformations du lait (crème maturée, laits fermentés comme le yaourt, fromages frais et affinés), mais également dans la vinification (fermentation mal lactique), la fabrication des salaisons, la fermentation des végétaux (choucroute et ensilages) et en boulangerie traditionnelle (Desmazeaud, 1998).

Les bactéries lactiques ont plusieurs rôles dans la production de produits fermentés. Tout d'abord, les bactéries lactiques vont permettre de changer la saveur de l'aliment et sa texture. Ces changements sont dus notamment à l'acide lactique produit au cours de la croissance.

D'autre part, les bactéries lactiques produisent des peptides et des molécules comme l'acétoïne, l'acétaldéhyde, le di acétyle ou l'éthanol qui sont importants pour la flaveur des aliments.

Tableau 09: Principaux produits issus de la fermentation des bactéries lactiques (Penaud, 2006).

Genre	Substrat	Exemples de produits
<i>Bifidobacterium</i>	Lait	Laits fermentés
<i>Lactobacillus</i>	Viande Lait Végétaux Céréales	yaourts, laits fermentés, kéfirs, fromages saucissons secs, jambons secs, choucroute, olives, "yaourts" au lait de soja pain au levain, bières
<i>Lactococcus</i>	Lait	Fromages, kéfirs
<i>Leuconostoc</i>	Lait Végétaux	Choucroute, olives, vin fromages, kéfirs
<i>Pediococcus</i>	Végétaux Viande	Choucroute saucisses semi – séchées
<i>Oenococcus</i>	Végétaux	Vin
<i>Streptococcus</i>	Lait	Yaourts, laits fermentés, fromages

Dans les produits laitiers, il s'agit du domaine d'application le plus courant des fermentations lactiques. Les ferments lactiques naturels ou commerciaux interviennent dans l'élaboration de tous les produits laitiers fermentés (Pilet et al., 2005), ces Micro-organismes assurent plusieurs fonctions telles que la protéolyse pour donner aux fromages leurs caractères rhéologiques et la production d'agents épaississants pour améliorer la texture du fromage.

Les bactéries lactiques sont souvent utilisées en association par exemple le yaourt est obtenu par deux espèces lactiques :

Lactobacillus delbrueckii --sp. *Bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus*. Dans les produits carnés, les bactéries lactiques améliorent la qualité hygiénique et marchande en réduisant d'avantage les risques de croissance de microorganismes indésirables.

Les bactéries lactiques interviennent aussi dans la préparation de nombreux produits végétaux fermentés. L'exemple le plus connu est la choucroute, elle fait intervenir quatre espèces Lactiques: *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis* et *Pediococcus damnosus*.(Pilet et al., 2005)

4.4. Classification :

Selon la dernière édition de Bergey's manual of systematic bacteriology (2009), les bactéries lactiques sont classées dans le phylum des Firmicutes, la Classe des Bacilli et l'ordre des lactobacillales renfermant trente-cinq genres répartis sur six familles.

Parmi ces genres, seulement douze sont utilisés dans la biotechnologie alimentaire, à savoir *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Vagococcus*, *Tetragenococcus*, *Weissella*(Dridier and Prevost, 2009).

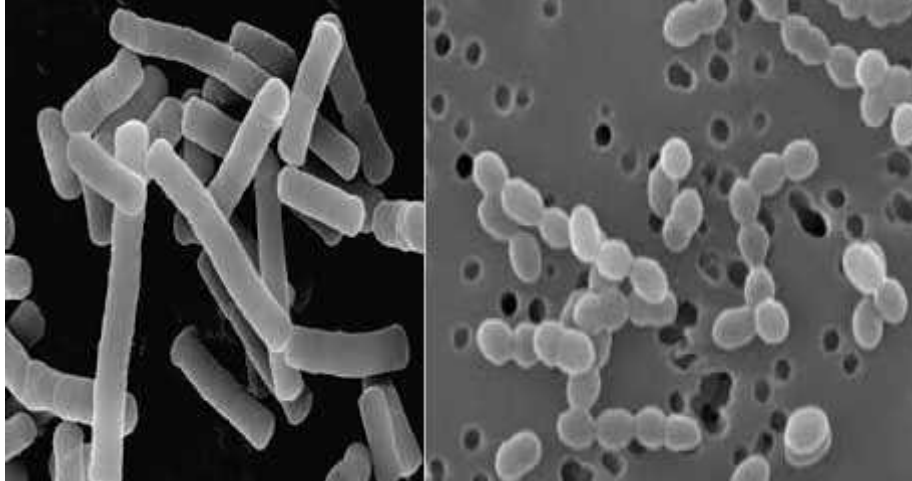


Figure 07 : *Lactobacillus* et *Leuconostoc* observé au microscope électronique à transmission (Lapointe-Vignola, 2002).

4.4.1. Genre *Lactobacillus* :

Les bactéries du genre *Lactobacillus* ont des aspects variés allant du bacille long et fin au Coccobacille en passant par la forme bâtonnet court ou légèrement flexueux. Ils sont Gram positif, non sporulés, fréquemment associés en chaînettes et habituellement immobiles. Les lactobacilles se montrent généralement plus résistants au stress acide que les lactocoques (Siegumfeldt et al., 2000).

Les lactobacilles se répartissent en trois groupes selon leur profil fermentaire, d'après la classification de (Schillinger and Lücke, 1987):

4.4.1.1. Les lactobacilles du groupe I (LBI) :

Ils comprennent les espèces homofermentaires obligatoires, c'est-à-dire produisant exclusivement de l'acide lactique à partir du glucose. Ce groupe est constitué d'environ 25 espèces, la plupart thermophiles (croissance à 45°C) dont *Lb. delbrueckii*, *Lb. Acidophilus* et *Lb. helveticus* (Schillinger and Lücke, 1987).

La plupart des espèces sont présentes dans le lait et les produits laitiers.

4.4.1.2. Les lactobacilles du groupe II (LBII) :

Ce sont les espèces hétérofermentaires facultatives, c'est-à-dire capables d'utiliser la voie hétérofermentaire dans certaines conditions comme une concentration en glucose limitante. Il est constitué d'une vingtaine d'espèces dont *Lb. casei*, *Lb. curvatus*, *Lb. Sakeet*

Lb. plantarum, majoritairement mésophiles (Federighi et al., 1998).

4.4.1.3. Les lactobacilles du groupe III (LBIII) :

Ils sont constitués des espèces hétérofermentaires obligatoires, c'est-à-dire utilisant la voie des pentoses phosphates pour la fermentation des hexoses et des pentoses. C'est un groupe qui rassemble des espèces relativement hétérogènes, surtout mésophiles, comme *Lb. brevis*, *Lb. kefir* et *Lb. sanfransisco*. Outre leur présence dans les produits laitiers et carnés, certaines espèces se développent dans le tube digestif de l'homme, et participent à l'équilibre de la flore intestinale (Federighi et al., 1998).

4.4.2. Le genre *Lactococcus* :

Ce genre est défini par (Schleifer et al., 1985) pour classer ce genre en fonction. Ils ont sur la base des critères physiologiques, Le genre *Lactococcus* comprend 5 espèces. (Teixeira et al., 1996). *Lactococcus garvieae*, *Lactococcus piscium*, *Lactococcus raffinolactis*, *Lactococcus plantarum* et *Lactococcus lactis*.

Les espèces de *Lactococcus* sont des coques, à Gram positif au métabolisme homofermentaire produisant exclusivement de l'acide lactique. Elles ont un optimum de croissance voisin de 30°C et ne poussent pas à pH 9,6 ou en présence de 6,5 % de NaCl., elles ne sont pas hémolytiques. (Teixeira et al., 1996).

4.4.3. Le genre *Leuconostoc* :

La famille des *leuconostocaceae*, se présentent sous forme de coque ovoïde, pouvant être allongés ou elliptique, disposés en paire ou en chaîne.

Elles ont un métabolisme hétérofermentaire, sont incapables de dégrader l'arginine et sont anaérobies facultatifs (Rodríguez-Figueroa et al., 2012).

4.4.4. Le genre *Pediococcus* :

Ce sont des coques formées de cellules groupées en paires ou en tétrades. Ils sont mésophiles homofermentaires. Ce genre contient sept espèces connues : *Pediococcus acidilactici*, *P. damnosus*, *P. dextrinicus*, *P. inopinatus*, *P. parvulus*, *P. pentosaceus* et *P. urinaequi* (Pilet et al., 2005).

4.4.5. Le genre *Bifidobacterium* :

Les cellules de *Bifidobacterium* se caractérisent par leur forme très irrégulière, souvent en V et Y. Elles se différencient des autres bactéries lactiques par la présence d'une enzyme, la fructose-6-phosphate phosphocétolase. Celle-ci leur permet de fermenter les hexoses en produisant de l'acide acétique et de l'acide lactique, ainsi qu'en moindre proportion de l'éthanol et d'autres acides organiques. Cette fermentation « lactique » a conduit à les rapprocher du groupe des bactéries lactiques.

Leur température optimale de croissance est comprise entre 37°C et 41°C. Elles se développent à pH supérieur à 5 (Federighi et al., 1998).

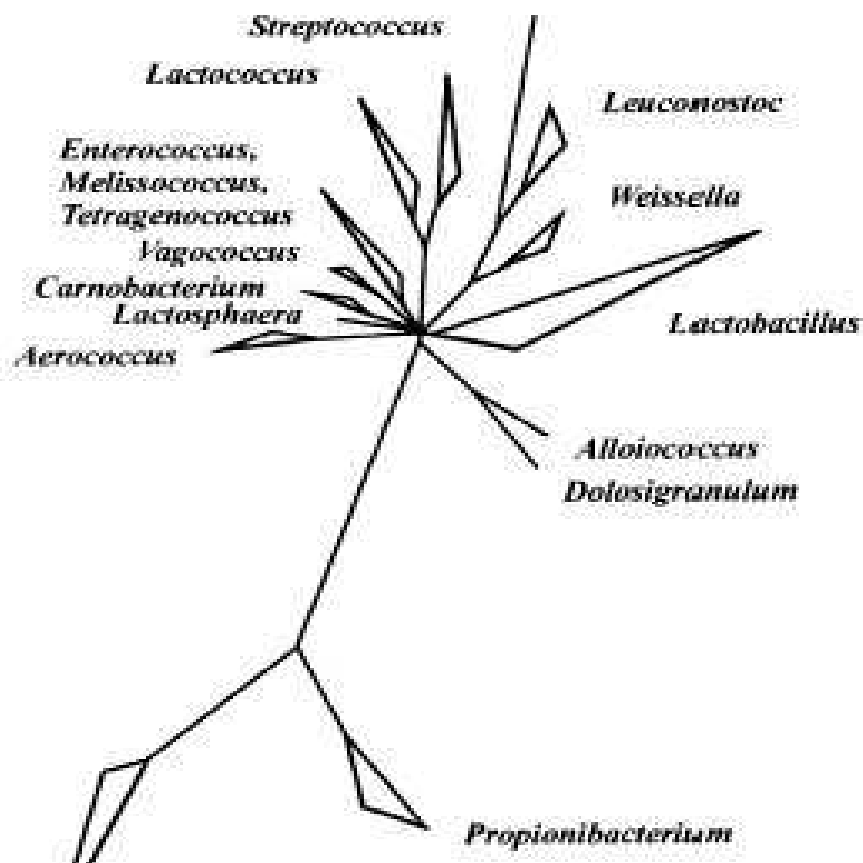


Figure 08 : Arbre phylogénétique des principaux genres de bactéries lactiques et des genres Associés, obtenu par analyse des ARNr 16S (Stiles and Holzapfel, 1997).

4.5. voies fermentaires des bactéries lactiques :

Selon les genres ou espèces, les bactéries lactiques utilisent principalement l'une des deux voies majeures du métabolisme des sucres.

Il s'agit des voies homofermentaires (Embden-meyerothof-parnas, EMP) et hétérofermentaire (voie des pentoses-phosphate) (Atlan et al., 2008).

Ainsi, les bactéries lactiques sont divisées en deux groupes principaux d'espèces homo ou hétérofermentaires selon la nature et la concentration des produits terminaux issus de la fermentation du glucose (Makhloufi, 2011).

4.5.1. Voie homofermentaire ou EMP :

Les bactéries lactiques homofermentaires comprennent les espèces de lactocoques, pédiocoques, ainsi que certains lactobacilles. Cette voie conduit dans des conditions optimales de croissance à la production de deux molécules de lactate et deux molécules d'ATP par molécule de glucose consommée (Thompson and Torchia, 1984).

Des sucres autres que le glucose peuvent également être fermentés via cette voie : monosaccharides, disaccharides, hexitols. Ces micro-organismes présentent un métabolisme de type homolactique lorsque le lactate représente plus de 90 % des produits de fermentation.

Dans certaines conditions de croissance (certains sucres, limitation carbone.), le métabolisme de ces bactéries se diversifie vers un métabolisme mixte avec production en plus du lactate, de formiate, de CO₂, d'acétate et d'éthanol (Cocaign-Bousquet et al., 1995).

La fructose-1,6-bisphosphate aldolase (FBA), est une enzyme clé présente chez toutes les espèces homofermentaires et indispensable au fonctionnement de la voie EMP.

Cette enzyme catalyse la réaction menant à partir du fructose-1,6-bisphosphate (FBP) à deux molécules à 3 carbones, le dihydroxyacétone-phosphate (DHAP) et le glycéraldéhyde-3-phosphate (GAP). (Thompson and Torchia, 1984)

4.5.2. Voie hétérofermentaire ou voie des pentoses phosphate :

Les bactéries lactiques qui fermentent le glucose en produisant, en plus de l'acide lactique (moins de 1,8 moles par mole de glucose), de l'acétate, de l'éthanol et du CO₂ sont dites hétérofermentaires (Thompson and Gentry-Weeks, 1994).

Les groupes principaux des bactéries présentant ce type de métabolisme sont les leuconostocs et certains lactobacilles. Ces microorganismes sont dépourvus d'une FBA, d'une triose-phosphate isomérase (TPI) ainsi que d'un système PTS fonctionnel. (Schmitt, 2006)

Dans ces conditions, le glucose est accumulé par l'intermédiaire d'un transport actif puis subit une phosphorylation intracellulaire par le biais d'une glucokinase (GLK) ATP-dépendante. (Schmitt, 2006).

Le glucose-6-phosphate emprunte ensuite la partie oxydative de la voie des pentoses-phosphate qui conduit à la formation de xylulose-5- phosphate.

Le xylulose-5-phosphate est scindé en acétyl-phosphate et glycéraldéhyde-3- phosphate par la D-xylulose-5-phosphate phosphocétolase, enzyme spécifique à la voie hétérofermentaire.

Enfin, l'acétyl-phosphate est converti en éthanol ou en acétate, et le GAP qui rejoint la glycolyse est métabolisé en acide lactique.

Le métabolisme hétérofermentaire est deux fois moins énergétique que le métabolisme homofermentaire puisqu'une mole de glucose conduit à la production d'une mole de lactate, d'éthanol, de CO₂ et d'un seul ATP. (Schmitt, 2006)

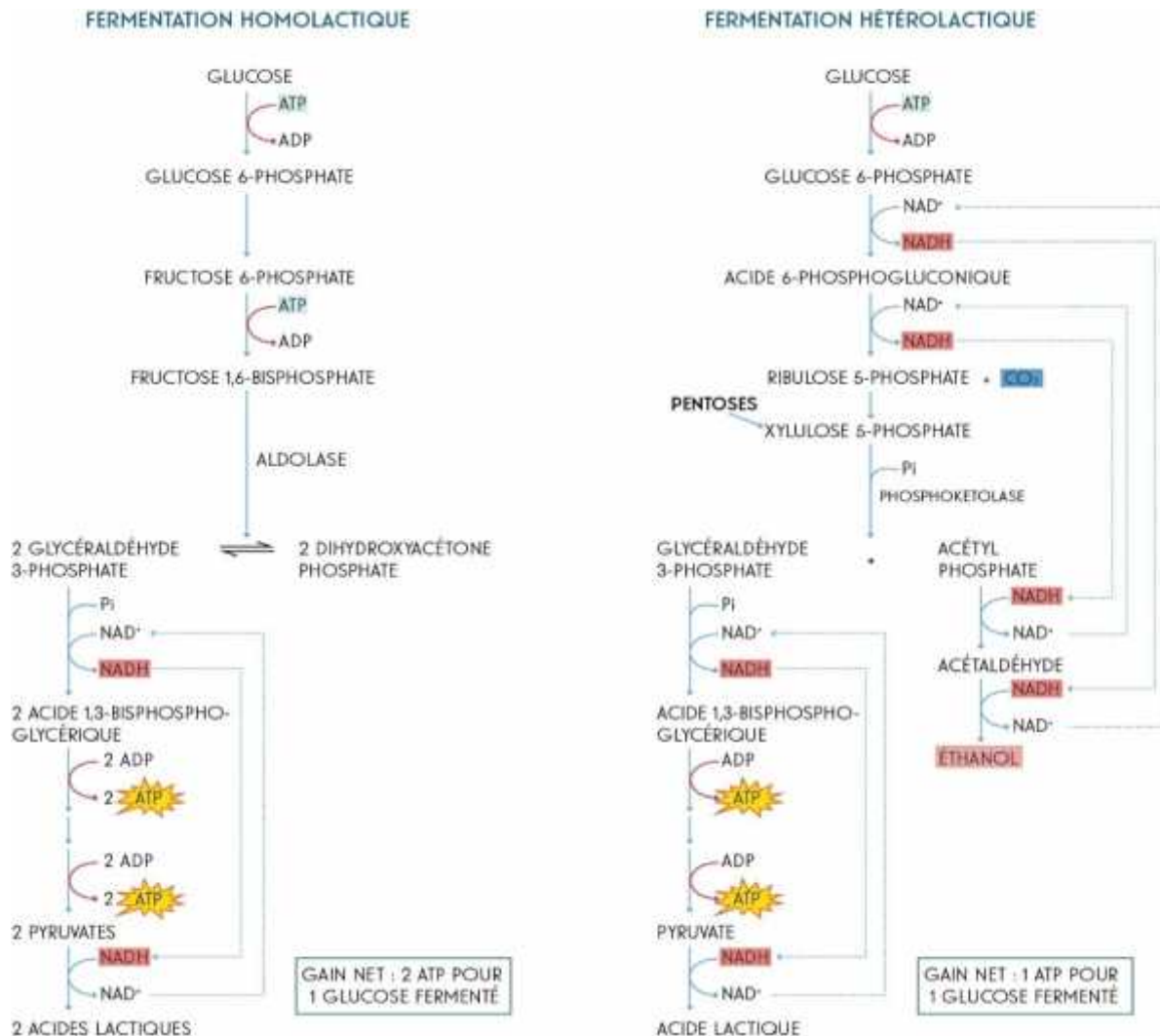


Figure 09: Représentation schématique des principales voies de fermentation des hexoses chez les bactéries lactiques (Makhloufi, 2011).

ATP : adénosine triphosphate. **ADP** : adénosine diphosphate. **Pi** : phosphate inorganique.

NAD⁺/NADH, H : Couple oxydant/réducteur du nicotinamide adénine dinucléotide.

4.6. Intérêt des bactéries lactiques :

Les bactéries lactiques jouent un rôle important que ce soit dans l'industrie alimentaire ou dans le domaine thérapeutique.

4.6.1. Dans l'industrie alimentaire :

Les bactéries lactiques sont impliquées dans la fermentation et la bio-conservation des différents aliments. Elles sont aussi utilisées pour la production du yaourt, des fromages et des laits fermentés (Yateem, 2008). Le vin, les poissons, les viandes, les charcuteries, le pain au

levain entre autres sont aussi des produits de fermentation par des bactéries lactiques (**Badis et al., 2005**).

L'utilisation de ces dernières a pour but l'amélioration des caractéristiques organoleptiques des produits fermentés et l'augmentation de leur durée de conservation sans l'utilisation des conservateurs chimiques grâce aux substances antimicrobiennes qu'elles secrètent (**Dortu and Thonart, 2009**).

Les souches utilisées en industrie alimentaire doivent répondre à certains critères : absence de pathogénicité ou activité toxique, capacité d'améliorer les caractéristiques organoleptiques, capacité de dominance, facilité de culture et de conservation, et maintenance des propriétés désirables durant le stockage (**Sachidanandam et al., 2001**).

4.6.2. Dans le domaine thérapeutique :

Étant des probiotiques, les bactéries lactiques apportent des bénéfices à l'hôte en conférant une balance de la microflore intestinale, et en jouant également un rôle important dans la maturation du système immunitaire. Différentes études ont démontrés le rôle préventif aussi bien que curatif de ces bactéries sur plusieurs types des diarrhées. (**Yateem, 2008**).

D'autres ont cité leur capacité de diminuer les allergies liées aux aliments grâce à leur activité protéolytique. Des souches sont utilisées sous forme des suppositoires pour empêcher la colonisation du vagin par les bactéries pathogènes et de prévenir ainsi les rechutes chez les femmes qui souffrent d'inflammations fréquentes et répétées de la vessie (**Yateem, 2008**).

4.7. Les propriétés inhibitrices des bactéries lactiques :

L'homme utilise depuis longtemps, consciemment ou non, les propriétés antibactériennes des bactéries lactiques. Ces propriétés se sont avérées être intéressantes pour la conservation des aliments dans lesquels cette flore se développe (**Jasniewski, 2008**).

Les bactéries lactiques inhibent le développement de certains micro-organismes grâce à la synthèse de molécules antibactériennes telles que des acides organiques, notamment l'acide lactique, du peroxyde d'hydrogène et des bactériocines (**Jasniewski, 2008**); ou par la compétition nutritionnelle et pour l'espace (**Léonard, 2013**).

Il est intéressant de noter que ces phénomènes d'inhibition causés par les bactéries lactiques peuvent également s'exercer contre de nombreux organismes étrangers à savoir les

staphylocoques, les streptocoques non lactiques et les bactéries coliformes (Juillard et al., 1987).

4.7.1. La compétition nutritionnelle :

Lorsque plusieurs souches sont mises en culture dans un même milieu, elles entrent nécessairement en compétition, si elles utilisent le même substrat. C'est ce qui se passe avec les bactéries lactiques utilisant le lactose (Juillard et al., 1987).

Du fait de leurs importantes exigences nutritionnelles, les bactéries lactiques envahissent complètement le milieu. Elles limitent alors la multiplication des autres colonisateurs (Dortu and Thonart, 2009). De plus, les cellules d'une même espèce possèdent des systèmes de communication. Lorsqu'une certaine densité cellulaire est atteinte (système de «QuorumSensing»), des signaux sont envoyés d'une cellule à l'autre pour réguler l'expression de certains gènes et orienter le métabolisme (Léonard, 2013).

4.8. La production de métabolites antimicrobiens :

L'activité antagoniste des bactéries lactiques est due à la synthèse de métabolites tels : les acides organiques, le Peroxyde d'hydrogène, Le dioxyde de carbone et les bactériocines (Tableau 1) (Belarbi, 2015).

Tableau 10 : Métabolites antimicrobiens de faible masse molaire secrétés par les bactéries lactiques autres que les bactériocines (Léonard, 2013).

Composé antimicrobiens	Souches productrices	Spectre antimicrobien
Acides lactique	Toutes les bactéries lactiques	Levures Bactéries à Gram+/-
Acide acétique	Bactéries lactiques hétérofermentaires	Levures Bactéries à Gram+/-
Diacétyle	<i>Lactococcus, Leuconostoc, Lactobacillus, pediococcus</i>	Levures Bactéries à Gram+/-
Peroxyde d'hydrogène	Toutes les bactéries lactiques	Levures Bactéries à Gram+/-
Dioxyde de carbone	Bactéries lactiques hétérofermentaires	La plupart des groupes taxonomiques de microorganismes

4.8.1. métabolites antimicrobiens non peptidiques :

4.8.1.1. Acides organiques :

Les acides organiques sont produits par les bactéries lactiques lors du processus de fermentation. Les principaux acides produits sont : l'acide lactique, l'acide acétique et propionique. Ces derniers permettent d'inhiber la croissance des levures et d'autres bactéries qui ne peuvent se développer à pH acide (**Mami, 2013**).

L'effet inhibiteur de ces acides organiques est principalement provoqué par les molécules non dissociées qui diffusent à travers les couches lipidiques des membranes des microorganismes provoquant ainsi un abaissement du pH dans le cytoplasme qui a pour conséquence la déstabilisation des cellules (**Mami, 2013**). Par contre, les bactéries lactiques possèdent un système de Tolérance à l'Acide (TA) (Acid Tolerance Response) qui leur permet de survivre et de continuer à faire fonctionner leur métabolisme (**Van De Guchte et al., 2002**).

Certaines bactéries lactiques hétérofermentaires dites propioniques sont capables de convertir le lactate en propionate et acétate accompagné d'une production de CO₂. Même si cette production d'acide propionique est à l'état de traces, l'effet inhibiteur a été démontré surtout contre la croissance des champignons et moisissures (**Léonard, 2013**).

4.8.1.2. Le peroxyde d'hydrogène :

Le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) présente un effet antimicrobien qui peut être expliqué par la production de radicaux libres tels que le groupement superoxyde (O₂) et le groupement hydroxyle (OH) capables d'endommager l'ADN bactérien.

En outre, le pouvoir inhibiteur du peroxyde d'hydrogène pourrait être dû à des réactions d'oxydation des groupes sulfhydriles provoquant une modification de la conformation des protéines et donc la perte de fonction des enzymes.

De plus, il peut engendrer la peroxydation des lipides membranaires, augmentant ainsi la perméabilité de la membrane du microorganisme cible (**Léonard, 2013**).

La production et l'accumulation du peroxyde d'hydrogène crée un environnement toxique pour les cellules non équipées de système de protection capable de dégrader ce composé, son accumulation est inhibitrice vis-à-vis des souches qui génèrent du peroxyde mais aussi vis-à-vis d'autres microorganismes (**Roissart and Luquet, 1994**).

4.8.1.3. Le dioxyde de carbone :

Le dioxyde de carbone (CO₂) est principalement formé pendant la fermentation des hexoses suivant la voie hétérofermentaire.

Le pouvoir antimicrobien du dioxyde de carbone produit par les bactéries lactiques, s'explique par la création d'une atmosphère anaérobie qui inhibe la croissance de certains microorganismes aérobies tels que la flore d'altération psychrophiles à Gram négatif. De plus, l'accumulation du dioxyde de carbone dans la membrane lipidique de la cellule cible pourrait modifier sa perméabilité (Léonard, 2013).

4.8.1.4. Le diacétyl :

Le diacétyl (C₄H₆O₂) est un composé aromatique produit par les bactéries lactiques (LAB) par fermentation du citrate. Cette molécule est caractérisée par une large activité antimicrobienne (Lanciotti et al., 2007). La production de diacétyl par les différentes souches de LAB dépend du milieu, du pH et de la température d'incubation.

Le mécanisme d'action du diacétyl n'est pas encore connu précisément, néanmoins il est possible qu'il interagisse avec les résidus arginine des enzymes fonctionnelles (Léonard, 2013).

4.8.2. Les métabolites antimicrobiens peptidiques :

4.8.2.1. Les bactériocines :

Différentes définitions des bactériocines ont été données au cours du temps. Cependant, la définition qui reste la plus largement acceptée est celle proposée par (Klaenhammer, 1988) qui considère les bactériocines comme des protéines, ou complexes de protéines, avec une activité bactéricide contre des espèces proches de la souche productrice (Dortu and Thonart, 2009), ou bien sont des peptides antimicrobiens, dont l'activité peut être bactéricide (entraînant la mort cellulaire) ou bactériostatique (entraînant un ralentissement de la croissance). Les bactéries productrices sont protégées de l'action de leurs propres bactériocines par un ou plusieurs protéines d'immunité (Drider and Prevost, 2009).

Les bactériocines sont synthétisées par voie ribosomique généralement par les bactéries à Gram positif appartenant au groupe des bactéries lactiques. Elles peuvent subir ou non des

modifications post-traductionnelles avant d'être excrétées dans le milieu extracellulaire (Jack et al., 1995; Jasniewski, 2008).

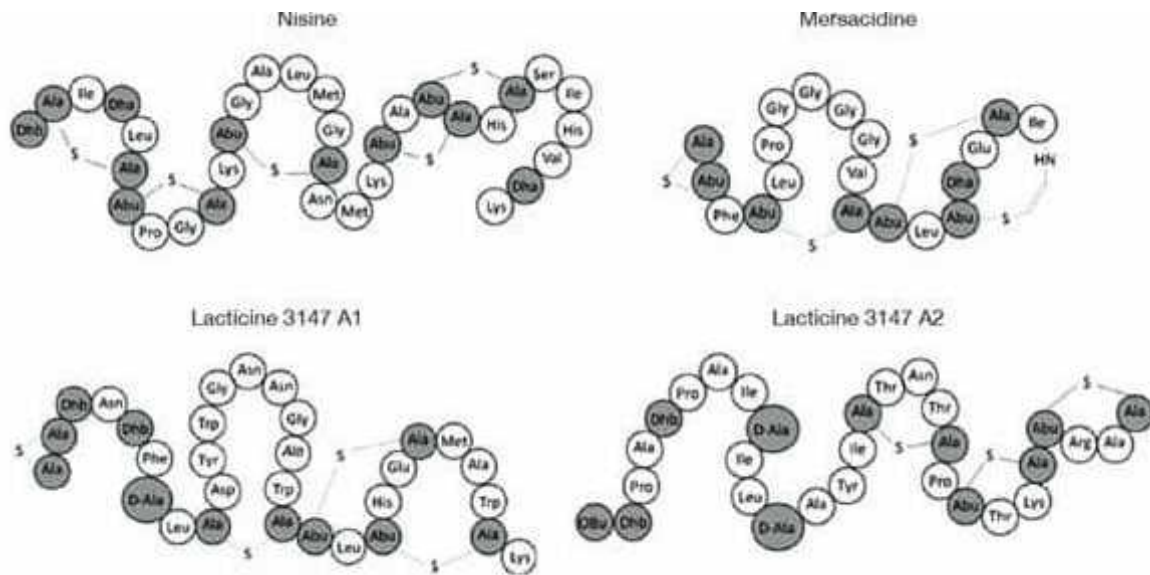


Figure 10: Séquence et structure de l'antibiotiques de type A (Nisine), B (Mersacidine) et d'un l'antibiotique « two-peptides » (Lacticine 3147 A1 et A2) (Makhloufi, 2011).

Les bactéries lactiques sont capables de synthétiser des bactériocines actives non seulement contre d'autres bactéries lactiques, mais également contre d'autres bactéries Gram+, et selon certains, contre certaines bactéries Gram -, parmi lesquelles on rencontre des entérobactéries et des germes pathogènes (Raimbault, 1995).

4.8.2.2. Classification des bactériocines :

La classification actuelle est fondée sur la taille et le fait que les bactériocines font l'objet ou non de modifications post-traductionnelles (classification proposée par **Klaenhammer** en **1993**, et révisée à la suite du 1er symposium mondial sur les bactériocines de bactéries lactiques, tenu en avril 1995 à Banff, Canada)(**Cenatiempo et al., 1996**). Elles sont réparties en quatre classes comme suit :

- **Classe I :** Les lantibiotiques.
- **Classe II :** Les péptides.
- **Classe III :** Les protéines à hauts poids moléculaires.
- **Classe IV :** les bactériocines complexes.

4.8.2.3. Mécanisme d'action des bactériocines :

Les bactériocines présentent des modes d'actions similaires dont le siège d'activité est la membrane cellulaire. Leur action se manifeste par adsorption sur la surface cellulaire suivie d'un effet létal. En effet, un pore se forme dans la membrane de la cellule cible, occasionnant une perméabilité de celle-ci et donc une dissipation de la force proton motrice, entraînant la mort cellulaire (**Kouakou et al., 2010**).

Les bactériocines peuvent avoir un effet bactériostatique ou bactéricide au cours duquel les bactéries meurent tout en gardant leur intégrité physique (pas de lyse cellulaire) et un effet bactériolytique qui conduit à une dissolution de la cellule bactérienne (**Makhloufi, 2011**).

4.8.2.4. Propriétés des bactériocines pour une application alimentaire :

Les bactériocines présentent des propriétés qui leur permettent une application dans le domaine agroalimentaire. Elles sont habituellement reconnues comme sûres, sensibles aux protéases digestives et ne sont pas toxiques pour les cellules eucaryotes (**Dortu and Thonart, 2009**) Elles ont une grande tolérance aux variations de pH et aux traitements thermiques. Leur spectre antimicrobien peut être large ou étroit, elles peuvent donc cibler sélectivement des bactéries pathogènes ou altérantes sans inhiber les bactéries indispensables et ont un mode d'action bactéricide (**Gálvez et al., 2007**). Les bactériocines doivent cependant être considérées comme un moyen de préservation complémentaire à ceux déjà existant (**Dortu and Thonart, 2009**)

4.9. Microorganismes pathogènes :

Les bactéries pathogènes sont des microorganismes microbiens à l'origine de diverses pathologies et intoxication alimentaires, et le pouvoir pathogène conditionne le type de maladie et va dépendre de l'espèce bactérienne responsable de l'infection (Carip, 2015) . Ces bactéries pathogènes peuvent faire partie ou non de la flore commensale de l'homme et il existe deux grands types de bactéries pathogènes, le premier type regroupe les bactéries nocives uniquement pour les personnes dont les barrières naturelles sont affaiblies. Par exemple, certaines souches de *Escherichia coli* causent des maladies intestinales chez les enfants et les personnes âgées (Carip, 2015).

Le deuxième type correspond aux bactéries contagieuses des personnes saines, et on peut citer *Yersinia pestis*, bactérie responsable de la peste et *Vibrio cholerae* qui est l'agent du choléra (Santo et al., 2010).

Pour inhiber la prolifération de ces bactéries pathogènes des traitements antibiotiques sont utilisés, ce qui a conduit à l'émergence du phénomène d'anti bio-résistance menaçant la santé de l'homme.

Les recherches scientifiques sont actuellement orientées vers l'exploitation de nouvelles alternatives aux antibiotiques entre autres des substances antibactériennes naturelles comme les bactériocines des bactéries lactiques (Dortu and Thonart, 2009).

4.9.1. *Staphylococcus aureus* :

Les staphylocoques sont des coques à Gram positif, groupés en amas, aéroanaérobies. Ils se développent volontiers dans les milieux légèrement sucrés ou salés.

Staphylococcus aureus appelé aussi staphylocoque doré est l'espèce la plus redoutée, responsable d'infections cutanées suppurées et d'infections hospitalières graves. Les souches entérotoxiques de *staphylococcus aureus* sont à l'origine d'intoxications alimentaires (Leyral et al., 1998).

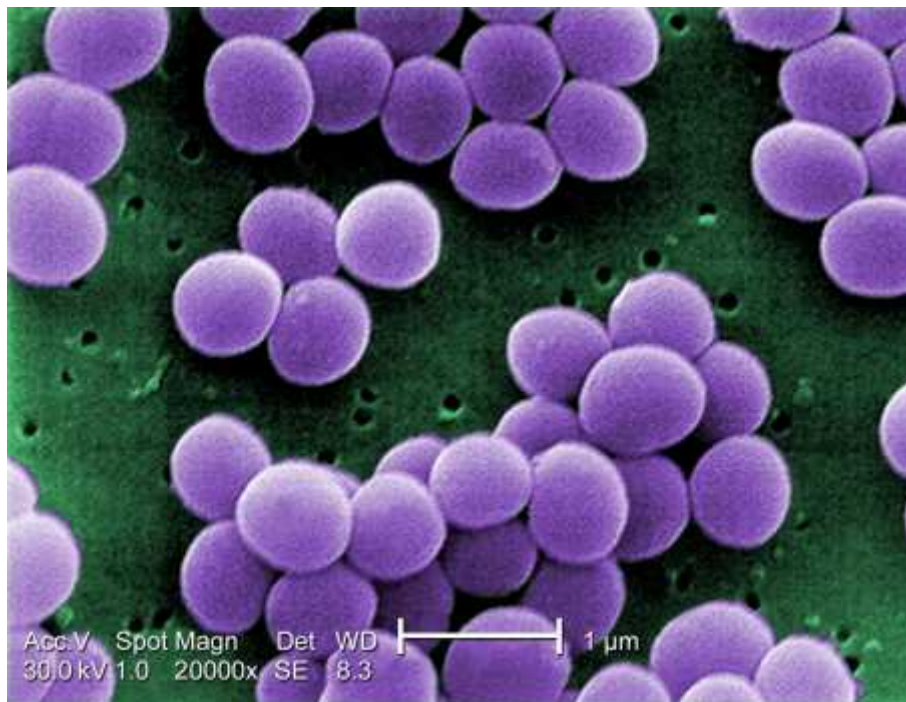


Figure 11 : *Staphylococcus aureus* (Schmitt, 2006).

4.9.2. *Escherichia coli* :

Escherichia coli ou colibacille forme un groupe de bacilles à Gram négatif mobiles ou immobiles, de la famille des *Enterobacteriaceae*.

Elles peuvent se multiplier à des températures comprises entre 4°C et 46°C, avec un optimum de croissance à 37 °C et à un pH compris entre 4,6 et 9,5 (Brisabois et al., 1997). *Escherichia coli* est l'hôte normale de l'intestin de l'homme et des animaux à sang chaud ; c'est un coliforme fécale, germe indicateur de contamination fécale dans les eaux et les aliments.

Les souches d'*Escherichia coli* responsables d'infection chez l'homme sont différentes de celles qui constituent l'espèce dominante de la flore intestinale aérobie des adultes et des enfants (Mihaila-Amrouche et al., 2004).

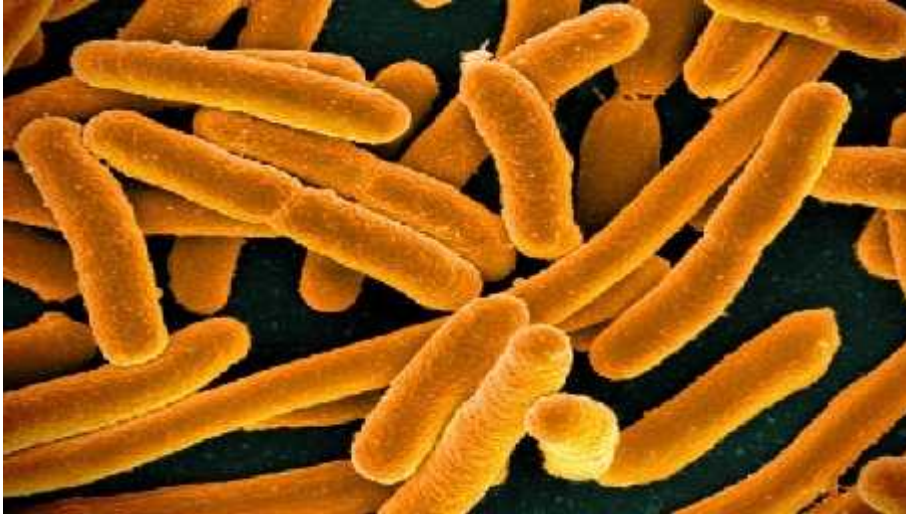


Figure 12 : *Escherichia coli*(Bouvier, 2011).

4.9.2. *Pseudomonas* :

Les bactéries du genre *Pseudomonas* sont des bacilles à Gram négative aérobies, non capsulés, non sporulés, mobiles (plusieurs flagelles polaires), mésophiles, producteurs de pigment fluorescents ou pas (Carip, 2015).

Les *Pseudomonas* vivent en saprophytes dans le sol, l'eau et les milieux humides, comme les eaux douces, les eaux thermales ; dans les robinetteries ou les réservoirs d'eau de pluie. Chez l'homme, *P.aeruginosa* se trouve dans la flore de la muqueuse nasale et comme flore de contamination sur la peau. Il peut également se trouver dans la flore intestinale (Carip, 2015).

Le germe est très souvent retrouvé aussi dans les hôpitaux et, du fait de sa résistance aux antibiotiques, est souvent incriminé dans les infections nosocomiales. Il est capable de synthétiser une entérotoxine et des enzymes pathogènes comme la phospholipase ou la collagénase (Carip, 2015).

Dans l'industrie agroalimentaire, les *Pseudomonas* peuvent parfois entraîner des altérations des aliments par protéolyse ou par lipolyse. La protéolyse peut dégager des amines volatiles et /ou de l'ammoniac qui confèrent une odeur désagréable au produit (viandes, charcuterie, poissons).la lipolyse modifie les propriétés technologiques et gustatives des graisses (gout de rance, oxydation des acides gras insaturés) (Carip, 2015).

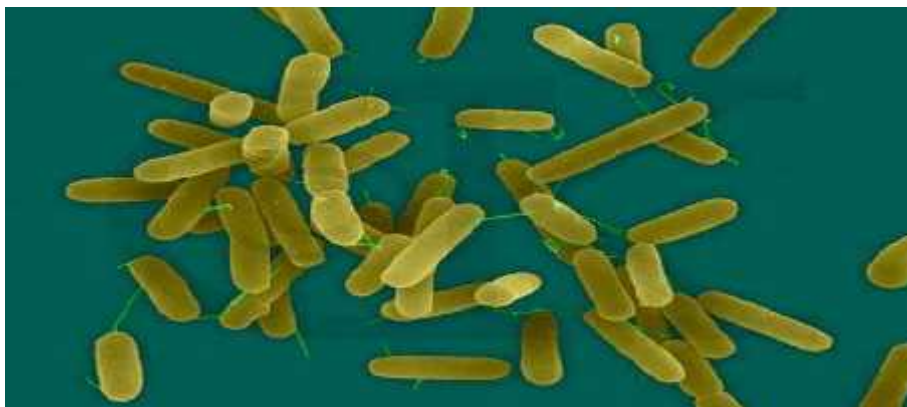


Figure 13 : *Pseudomonas*, vue au microscope électronique à balayage et colorée artificiellement (Delarras, 2007).

4.9.3. *Candida albicans* :

Est un champignon commensal de la peau et des muqueuses présentes à l'état physiologique dans la flore digestive et la flore vaginale et rarement retrouvé dans des niches environnementales comme le sol. *C. albicans* est une levure non pigmentée, non capsulée, arrondie ou ovalaire de 2 à 4 μm , à bourgeonnement multilatéral et capable de croître sous forme filamenteuse ou pseudo-filamenteuse. En culture, les colonies blanchâtres crémeuses apparaissent en 24 à 48 heures (Chardin et al., 2006).

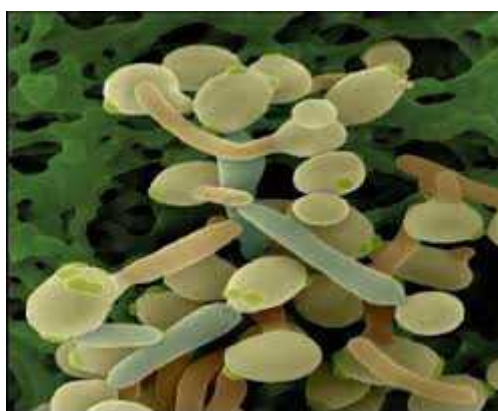


Figure 14: *Candida albicans* vue au microscope électronique et colorée (Delarras, 2007).

PARTIE PRATIQUE

MATÉRIEL & MÉTHODES



1. Problématique et objectifs de l'étude :

Le lactosérum est un produit issu de la production fromagère, il est riche en éléments nutritifs comme le lactose et les protéines, ainsi que les bactéries lactiques. Les bactéries lactiques contenues dans le lactosérum sont caractérisées par la production des substances inhibitrices des microorganismes pathogènes. Dans ce contexte que s'inscrit notre étude visant comme objectif principal la valorisation du lactosérum et l'étude de l'activité antimicrobienne des souches des bactéries lactiques isolé à partir du lactosérum.

Les objectifs détaillés de cette étude se résument comme suit :

-) Caractérisation physico-chimique et microbiologique du lactosérum ;
-) Isolement et identification des bactéries lactiques à partir du lactosérum ;
-) Etude de l'activité antimicrobienne des bactéries lactique vis-à-vis d'autres microorganismes.

2. Lieu et cadre de l'étude :

Cette étude comporte deux parties, la première partie concerne la caractérisation physico-chimique et microbiologique du lactosérum ainsi que l'isolement et l'identification des bactéries lactiques présentes dans le lactosérum. Les essais pratiques de cette première partie ont été réalisés au niveau du laboratoire de laiterie ARIB et le laboratoire de microbiologie de l'université Khemis-Miliana durant la période allant de février à mars 2020. La deuxième partie concerne l'étude de l'activité antimicrobienne des bactéries lactiques isolées et identifiées. Cette partie n'a pas été faite à cause de la crise sanitaire Covid-19. Les résultats de la première partie seront présentés et discutés. Par contre, pour la deuxième partie, aucun résultat n'a été obtenu, nous limitons notre discussion par une présentation des études précédentes qui focalisent sur l'effet antimicrobien des bactéries lactiques du lactosérum.

3. Echantillonnage :

Dans cette étude, cinq échantillons du lactosérum industriel ont été prélevés et analysés.

Les prélèvements destinés aux analyses microbiologiques doivent s'effectuer aseptiquement à partir du robinet disposé à la partie inférieure de la citerne iso thermique. Pour chaque échantillon un volume de 250ml de lactosérum a été prélevé dans un flacon stérile. Le robinet est flambé au préalable ; puis les premiers jets sont éliminés et le flacon est rempli au 2/3 de sa capacité. Les prélèvements sont aussitôt refroidis dans un réfrigérateur à 4°C, jusqu'au moment de l'analyse.

I. Caractérisation des échantillons du lactosérum :

I.1. Contrôle physico-chimique :

Le contrôle physico-chimique aura pour rôle de vérifier la structure de la molécule et d'établir ses propriétés physiques et chimiques. Pour cela, plusieurs paramètres ont été déterminés :

1.1. pH:

Par définition, le pH « pouvoir hydrogène » s'exprime en fonction de la concentration en ions hydrogènes. Il est mesuré par la méthode potentiométrique à l'aide d'un pH mètre.

Les valeurs de pH sont obtenues par immersion de l'électrode du pH mètre dans l'échantillon(**Figure15**).



Figure15 : Mesure de pH par pH mètre.

1.2. Acidité titrable :

L'acidité titrable est déterminée par la méthode titrimétrique où l'acide lactique est neutralisé par le NaOH(N/9). La présence de phénolphtaléine comme indicateur coloré indique la limite de la neutralisation par changement de couleur vers le rose pâle.

L'acidité est exprimée en degré Dornic (°D) où 1°D représente (0,1 g/l d'acide lactique dans lactosérum) (**Figure16**).

➤ Mode opératoire :

- Dans un bécher, on introduit 10ml du lactosérum prélevé à l'aide d'une pipette ;
- Ajouter 2 à 3 gouttes de la solution de phénolphtaléine à 1% ;
- Titrer par la solution d'hydroxyde de sodium (N/9) jusqu'au virage au rose pâle, facilement perceptible par comparaison au témoin constitué du même lactosérum ;

-1ml de NaOH versé correspond à 0,1 g /l de l'acide lactique, et le résultat est exprimé en(°D)
où °D= 0,1 g d'acide lactique par litre du lactosérum ;

➤ **Lecture :**

$$AT=V \times 10(D^\circ)$$

AT: Acidité titrable

V: le volume en ml correspond à la chute de la burette.



Figure16 : Mesure de l'acidité titrable par la méthode titrimétrique.

1.3. Extrait sec totale (EST) :

L'extrait sec total a été déterminé à l'aide d'un dessiccateur à infrarouge. Le principe repose sur la dessiccation par évaporation de l'eau du lactosérum et la pesée du résidu sec(**Figure17**).
(AFNOR, 1980).

➤ **Mode opératoire:**

- Dans une plaque de dessiccateur séchée et tarée, à l'aide d'une pipette peser 1g du lactosérum homogénéisé sous forme de gouttelettes bien répartie ;
- Introduire la plaque dans le dessiccateur infrarouge réglé à 105 °C ;
- Laisser chauffer pendant 20 minutes ;
- L'extrait sec est lu directement sur l'afficheur du dessiccateur ;
- Le résultat est multiplier (**x10**) pour obtenir le poids net en **g /l**.

$$EST=E1-T/E*100$$

1.4. Matière sèche dégraissée (ESD) :

La matière sèche dégraissée est obtenue par différence entre la matière sèche totale et la matière grasse (DAHACHE and MESSAOUDI, 2019).

$$\text{ESD} = \text{EST} - \text{MG}$$

ESD : extrait sec dégraissée.

EST : extrait sec total.

MG : matière grasse.



Figure17 :Mesure d'extrait sec totale par le dessiccateur.

1.5.Matière grasse (MG) :

La teneur en matière grasse est déterminée par la méthode acido-butyrométrique(**méthode de Gerber**).Le principe de cette méthode est basé sur la dissolution du produit à doser (excepté la matière grasse) par l'acide sulfurique, sous l'influence d'une force centrifuge et grâce à l'adjonction de l'alcool iso-amylique, la matière grasse se sépare en couche claire dont la graduation du butyromètre révèle le taux en MG(**Figure18**).

➤ Mode opératoire :

- Introduire 10ml d'acide sulfurique(H_2SO_4) ($d=1,83$) dans le butyromètre de GERBER pour la dissolution des constituants du lactosérum ;
- A l'aide d'une pipette, prélevé 11 ml du lactosérum à analyser, puis les versé dans le butyromètre sans mouiller le col de celui –ci ;
- On ajoute 1ml d'alcool iso amylique pour la dissolution de la matière grasse ;
- Bien boucher le butyromètre, agiter et retourner afin de bien dissoudre les protéines ;
- Placer immédiatement le butyromètre dans la centrifugeuse 5minute à1200 tours/mn ;
- Maintenir verticalement le butyromètre, ajuster le bouchon pour amener la colonne de matière grasse dans la zone de l'échelle .Lire le résultat ;

-La teneur en matière grasse est exprimée en g/l.

Expression des résultats :

La teneur en matière grasse est exprimée en g/l est obtenu par la lecture de la graduation sur le butyromètre. Maintenir le bouchon vers le bas et ajuster devant le repère la plus proche, puis lire rapidement.

$$MG (g/l) = (B-A) \times 100$$

A : la valeur correspondant au niveau inférieur de la colonne grasse.

B : la valeur correspondant au niveau supérieur de la colonne grasse.



Figure18 : Mesure de la matière grasse par la méthode acido-butyrométrique.

I.2. Contrôle microbiologique :

La composition des milieux de culture est portée en (**Annexe A**).

Les analyses microbiologiques concernent la recherche, le dénombrement et l'identification des microorganismes, la liste de ces microorganismes est fixée par la législation dans le journal officiel de la république algérienne N° 39 du 2 juillet 2017 (**Annexe 3**). Ces microorganismes sont :

- Z Des germes d'altérations ;
- Z Des germes potentiellement pathogènes pour le consommateur (Salmonelles, Staphylocoques à coagulase +).
- Z Des germes de contamination fécale (habituellement les coliformes et les streptocoques fécaux). Ainsi que les coliformes totaux
- Z Des levures et des moisissures.

2.1. Traitement des échantillons :

2.1.1. Solution mère :

Le lactosérum est un produit liquide entièrement correspond à la solution mère.

La première dilution est préparée comme suit

On introduit aseptiquement 1ml du lactosérum dans un tube contenant 9ml de diluant TSE (Tryptone sel eau), et bien agité au vortex. Cette suspension constitue alors la dilution 10^{-1} .

On introduit aseptiquement 1ml du lactosérum dans un tube contenant 9ml de diluant TSE (Tryptone sel eau), et bien agité au vortex. Cette suspension constitue alors la solution mère. (ISO, 2017).

2.1.2. Préparation des dilutions décimales :

La dilution est un processus qui consiste à réduire la concentration d'une substance dans une solution. Dans ce but, des dilutions décimales sont ensuite réalisées en cascade jusqu'à la dilution 10^{-9} (Begloul, 2012).

➤ Mode opératoire :

On introduit ensuite aseptiquement à l'aide d'une pipette graduée et stérile 1ml de la solution mère, dans tube à vis stérile contenant au préalable 9ml du même diluant (TSE) : cette dilution sera alors au 1/100 ou 10^{-2} .

Introduit par la suite 1ml de la dilution 10^{-2} dans un tube à vis stérile contenant au préalable 9ml du même diluant : cette dilution est sera alors au 1/1000 ou 10^{-3} (Figure19).

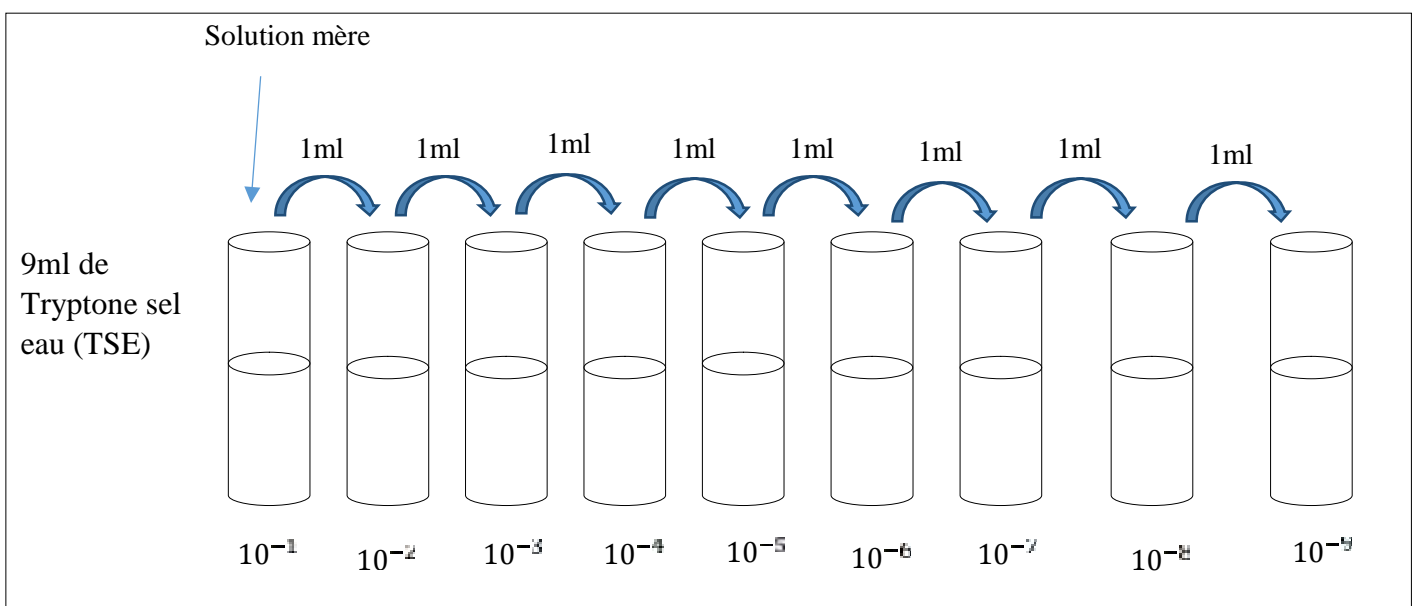


Figure19 : Préparation des dilutions décimales.

2.2. Recherche et dénombrement des germes aérobies mésophiles totaux :

Les microorganismes aérobies et aérobies anaérobies facultatifs se développent dans un milieu nutritif gélosé défini non sélectif incubé à 30°C pendant 72 heures. Ils apparaissent sous forme de colonies de formes lenticulaire qui poussent dans la masse. Des levures et des moisissures peuvent également se développer, ces dernières peuvent être différenciées.

➤ Mode opératoire :

A partir des dilutions décimales allant de 10^{-3} jusqu'à 10^{-1} , porter aseptiquement 1ml dans une boîte de Pétri vide préparée à cet usage et numérotée.

Compléter ensuite avec environ 15 ml de gélose PCA fondue puis refroidie à 44°C le choix des milieux dépendent de la nature des denrées à analyser.

Faire ensuite des mouvements circulaires et de va-et-vient en forme de « 8 » pour permettre à l'inoculum de se mélanger à la gélose utilisée.

Laisser solidifier sur paillasse, puis rajouter une deuxième couche d'environ 5 ml de la gélose blanche. Cette double couche a un rôle protecteur contre les contaminations diverses. (Figure20)

➤ Incubation :

Les boîtes seront incubées couvercle en bas à 30°C pendant 72 heures avec :

- Première lecture à 24 heures,
- Deuxième lecture à 48 heures,
- Troisième lecture à 72 heures.

Les colonies des G A M T (des germes aérobies mésophiles totaux) se présentent sous forme lenticulaire en masse.

➤ Lecture des résultats et calcul :

Les boîtes contenant plus de 300 colonies et moins de 30 colonies sont écartées. Le calcul du nombre de microorganismes par millilitre se fait selon la formule pour tous les autres microorganismes recherchés (Guiraud, 1998).

$$[N] = \frac{\sum c}{(n_1 + 0.1 n_2 + 0.0 n_3)d} \quad \text{UFC/ml}$$

C : est la somme des colonies comptées dans la première dilution.

V ml : volume de solution déposé

N : nombre totale des colonies dans toutes les boîtes.

n1 : Nombre de boîtes comptées dans la première dilution.

n2 : Nombre de boîtes comptées dans la seconde dilution.

n3 : Nombre de boîtes comptées dans la troisième dilution.

d : facteur de dilution à partir duquel les premiers comptages ont été obtenus.

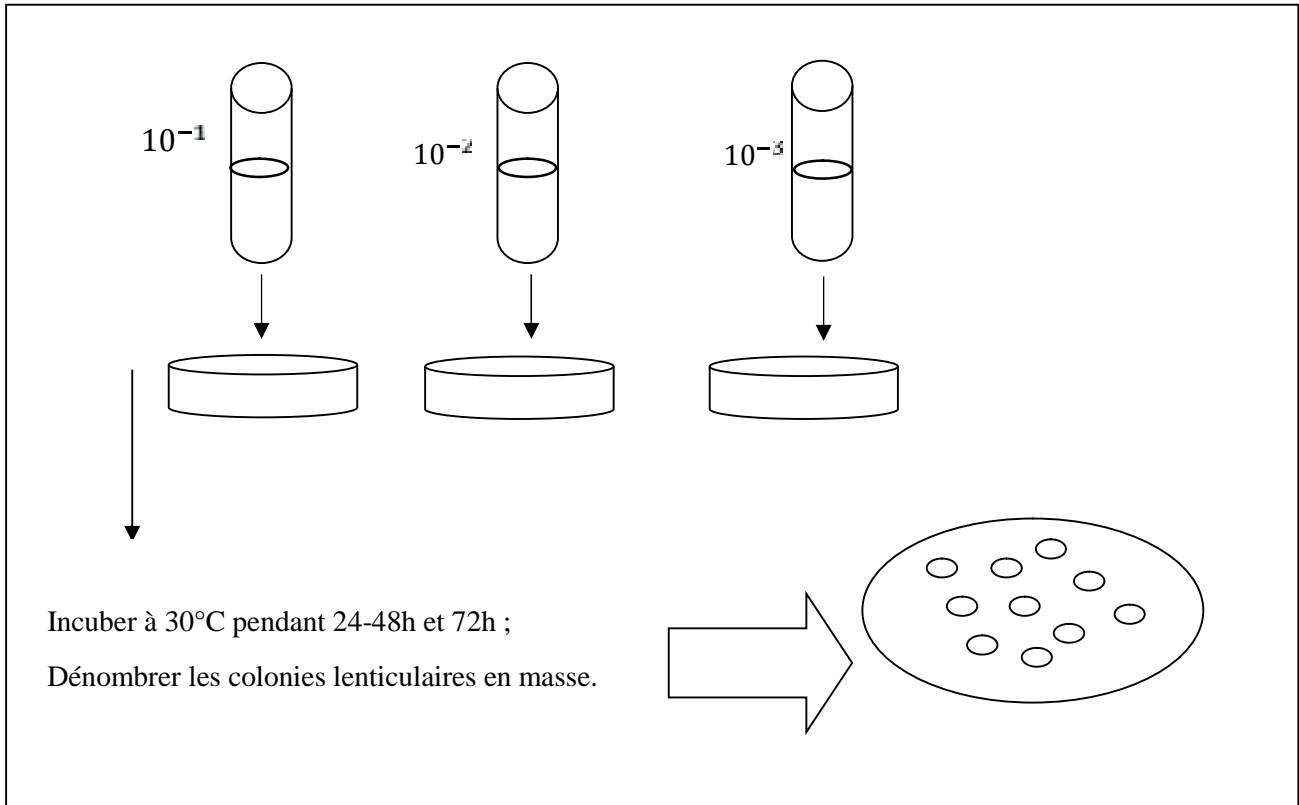


Figure20 : Recherche et dénombrement des germes Aérobie Mésophile Totaux à 30°C.

2.3. Recherche et dénombrement des Coliformes (en milieu solide) :

Les coliformes sont des entérobactéries qui dégradent le lactose à 37°C avec ou sans production de gaz.

Les coliformes fécaux se distinguent des coliformes totaux par leur température de prolifération qui est de 44°C (Petrasxiene and Lapied, 1981).

➤ Mode opératoire :

Il est réalisé en six boîtes de pétri (trois boîtes pour chaque type de coliforme totaux et fécaux), chaque une estensemencée par 1ml de lactosérum dilué de 10^{-1} et jusqu'à 10^{-3} , environ 13ml de gélose désoxycholate de sodium (DCLA) préalablement refroidi et maintenue à 44 °C est ajoutée, puis homogénéiser parfaitement le contenu jusqu'à la solidification. (Figure21).

➤ **Incubation :**

Les boîtes destinées à la recherche des coliformes totaux sont incubés à 30 °C pendant 24 h.

Les boîtes destinées à la recherche des coliformes fécaux sont incubés à 44°C pendant 24h.

➤ **Lecture :**

Les colonies apparaissent en couleur rouge foncé de 0,5 mm de diamètre. Les colonies sont comptées et ramenées aux nombres de germes par ml en tenant compte de la dilution.

Le dénombrement s'agit de compter toutes les colonies ayant poussé sur les boîtes en tenant compte les facteurs suivants :

Ne retenir que les boîtes contenant entre 15 à 150 colonies. Calcul du nombre des colonies par millilitre. La moyenne de dénombrement est réalisée selon la formule suivante :

$$N = \frac{\sum c}{1,1} \quad \text{UFC /ml}$$

N : nombre de micro-organisme par ml ;

c : La somme des colonies comptées sur les deux boîtes retenues.

d : la dilution à partir de laquelle les premiers comptages ont été obtenus.

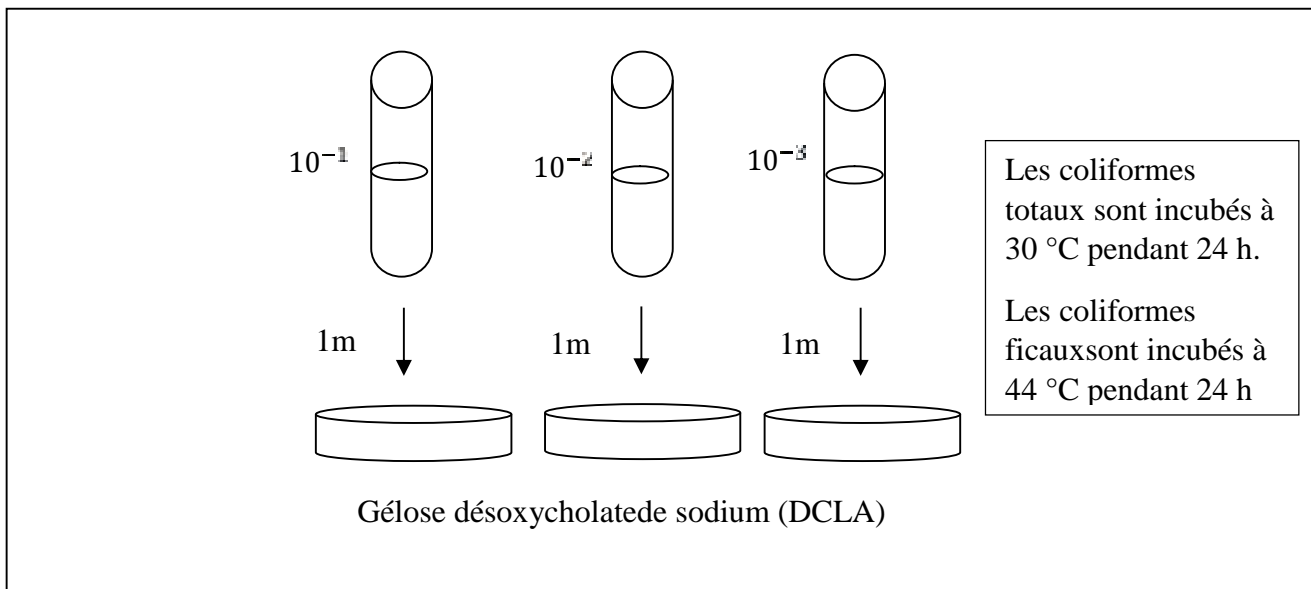


Figure21 : Recherche et dénombrement des coliformes en milieu solide.

2.4. Recherche de *Salmonella* :

Les Salmonelles appartiennent à la famille des *Enterobacteriaceae*, ils sont des Bacilles à Gram négatif, anaérobies facultatifs, habituellement mobiles grâce à une ciliature péritriche, mais *Salmonella enterica* est toujours immobiles, elles possèdent une catalase, réduisent les nitrates en nitrites, fermentent les glucose avec production d'acide et de gaz (**Bourgeois et al., 1996**).

➤ Mode opératoire :

Pré enrichissement non sélectif :

- Prendre 25ml et ajouter 255 ml de l'eau peptonné tamponnée. Mélanger jusqu'à ce que le produit soit complètement dispersé.

-Incubation à 37°C pendant 24 heures.

Enrichissement sélectif :

L'enrichissement doit s'effectuer sur :

- le milieu de Sélénite - Cystéiné réparti à raison de 100 ml par flacon.

L'enrichissement proprement dit, se fait donc à partir du milieu de pré-enrichissement de la façon suivante :

- 10ml en double pour les flacons de Sélénite Cystéiné.

- Le premier flacon de Sélénite sera incubé à 37°C, 24 h.

- Le deuxième flacon de Sélénite sera incubé à 42°C, 24 h.

➤ Isolement :

-Chaque tube et chaque flacon fera l'objet d'un isolement sur - le milieu gélosé Hektoen.

-Toutes les boites ainsiensemencées seront incubées à 37°C pendant 24 h.

➤ Expression des résultats :

Sont suspectées positives, les boites contenant des colonies vertes sur la gélose Héktoen.

2.5. Recherche de *Staphylococcus aureus* :

Les *Staphylococcus aureus* appartiennent à la famille de *Staphylococcaceae*. Ce sont des cocci à Gram positif, non sporulés, aéro-anaérobies facultatifs, immobiles, halophiles, se divisent en plusieurs plans en formant des amas irréguliers, coagulasse, protéase et catalase positives. (Bourgeois et al., 1996).

Il est moins fréquemment retrouvé mais il est pathogène, le nom d'espèce (*aureus* Signifie « or ») vient que sur gélose, les colonies de *S.aureus* sont pigmentées (couleur dorée) alors que les autres espèces forment des colonies blanches (Bourgeois et al., 1996).

➤ Mode opératoire :

Milieu utilisé : Bouillon Giolitti Cantoni et gélose Chapman.

Préparation des milieux d'enrichissement :

Au moment d'emploi, ouvrir aseptiquement le flacon contenant le milieu Giolitti Cantoni pour y ajouter une ampoule de solution de tellurite de Potassium , mélanger soigneusement , le milieu est prêt à l'emploi .

Ensemencement :

Préparer dans un portoir une série de 4 tubes contenant 15 ml de milieu Giolitti Cantoni à raison d'un tube par dilution.

A partir de solution mère et des dilutions décimales, porter aseptiquement 1ml par dilution dans un tube bien mélangé le milieu et l'inoculum.

➤ Incubation :

L'incubation se fait à 37°C pendant 24 à 48H

➤ Lecture :

Seront considérés comme positifs, les tubes ayant virés au noir. Pour s'assurer qu'il s'agit bien d'un développement de *Staphylococcus aureus* , ces tubes feront l'objet d'un isolement sur gélose Chapman préalablement fondue, coulée en boîte de pétri et bien séchés.

Les boîtes de Chapman ainsi ensemencées seront incubées à leur tour à 37°C pendant 24 à 48h. Après ce délai, les *Staphylococcus aureus* cultive facilement sur milieu solide, il forme des colonies bombées, luisantes et plus ou moins pigmentées en jaune. (Figure22)(Guiraud and Rosec, 2004).

On ne retint que les boîtes contenant plus de 15 colonies caractéristique et non caractéristique.

Le calcul du nombre de staphylocoques à coagulasse positive par ml :

$$N = \frac{\sum c}{V_m \times (n_1 + 0,1n_2)d_1}$$

N : nombre de micro-organismes par ml ;

: est la somme des colonies comptées sur les deux premières boîtes retenues successives ;

d : la dilution à partir de laquelle les premiers comptages ont été obtenus ;

V : volume ensemencé (ml) ;

n1 : nombre de boîtes retenus de la 1^{er} dilution ;

n2 : nombre de boîte retenus.

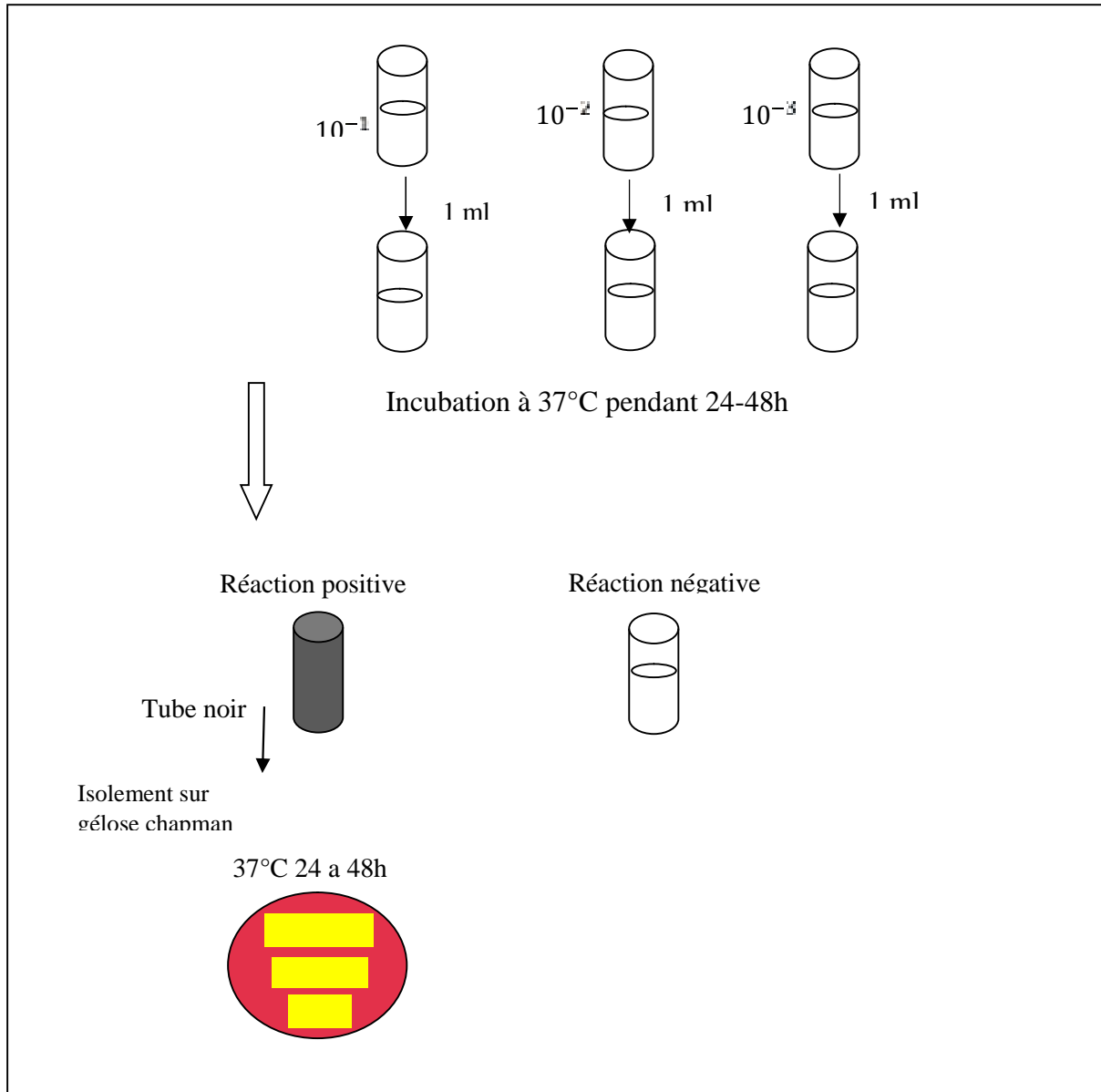


Figure22 : Recherche et dénombrement des *staphylococcus Aureus*.

2.6. Recherche et dénombrement des levures et moisissures :

Les levures et les moisissures sont des champignons hétérotrophes, organismes eucaryotes uni ou multicellulaires. La structure de la cellule est celle d'une cellule eucaryote.

Les levures sont des champignons unicellulaires qui constituent un groupe morphologique relativement homogène. Tandis que Les moisissures sont des champignons filamenteux uni ou multicellulaires (**Bourgeois et al., 1996**).

Les levures et moisissures cultivent à 25°C sur milieu Sabouraud et se retrouvent dans la nature(**Michel et al., 2006**).

➤ Mode opératoire :

A partir des dilutions allant de 10^{-1} à 10^{-3} , porter aseptiquement 1 ml dans une boîte de pétri contenant la gélose Sabouraud solidifier ; Puis faire un étalement sur toute la surface de la gélose.

➤ Incubation :

Les boîtes sont incubées 25°C pendant 24h voire 5jours.

➤ Lectures :

La multiplication des levures et des moisissures se fait en surface ; Elle se traduit par des colonies blanches dont les levures ont une structure sphérique.

➤ Expression des résultats :

On utilise la formule mathématique suivante où le nombre de colonies dénombrées soit compris entre : **15 c 150**

$$N = \frac{\sum c}{V_m \times (n_1 + 0,1n_2)d_1}$$

N : nombre de micro-organismes par ml ;

c : est la somme des colonies comptées sur les deux premières boîtes retenues successives ;

d : la dilution à partir de laquelle les premiers comptages ont été obtenus ;

V : volume ensemencé (ml) ;

n1 : nombre de boîtes retenus de la 1^{er} dilution ;

n2 : nombre de boîte retenus

II. Isolement et identification des bactéries lactiques :

1. Milieux et conditions de cultures :

Afin d'isoler les bactéries lactiques, différents milieux de cultures sélectifs ont été utilisés afin de proliférer les germes désirés (**Annexe A**)

- Le milieu MRS avec un pH=6.4 + 0.2 ayant été utilisé pour l'isolement des Lactobacilles (**De Man et al., 1960**).
- Le milieu M17 avec un pH = 6.9 + 0.2 ayant été utilisé pour l'isolement des Lactocoques(**Terzaghi. et al., 1975**).

2. Technique d'isolement et purification des bactéries lactiques :

La solution mère (du lactosérum) (1ml) a été additionné à 9 ml Tryptone sel eau (TSE), et une série de dilutions décimales a été préparé (10^{-1} à 10^{-9}) et homogénéisé

2.1. Isolement sur milieu MRS

Une goutte (0.1ml) a été prélevée de la solution mère et ensemencé par étalement sur gélose MRS solide (pH 5,4 et pH 5,6), de la même façon on a ensemencé la gélose M17.

Une goutte (0.1ml) de la dilution 10^{-2} à été prélevée et ensemencée par étalement sur gélose MRS, à raison de deux boites par dilution (une boite de gélose MRS à pH 5,4 et l'autre boite de gélose MRS à pH 6,5), puis incubé pendant 24 à 72h à 30°C(**Cheriguene et al., 2007; Kacem et al., 2006**).

La même méthode d'isolement a été adoptée pour le reste des dilutions, ainsi sur gélose M17.

2.2 Purification des souches isolées

Les dilutions ayant données moins de 10 colonies par boites ont été retenues afin de suivre la purification.

La purification des souches isolées est réalisée par repiquages successifs sur gélose MRS et M17 par la méthode des stries. L'incubation a été réalisée à 30°C pendant 24 à 72h (**Cheriguene et al., 2007; Kacem et al., 2006**).

La pureté des souches est révélée par la présence sur gélose de colonies homogènes ayant le même aspect, la même couleur, la même taille et la même forme (**Guiraud and Rosec, 2004**).

La coloration de Gram a été faite pour confirmer la pureté des souches.

Les souches à Gram + et catalase - sont retenues pour la suite de l'étude.

3. Conservation à court terme

Les isolats purifiés ont été ensemencés sur gélose inclinée (MRS, M17) incubé pendant 18 h à 30°C (Lactocoques) et 37°C (Lactobacilles) et conservé à 4°. Le renouvellement des cultures se fait toutes les quatre semaines (Saidi et al., 2002).

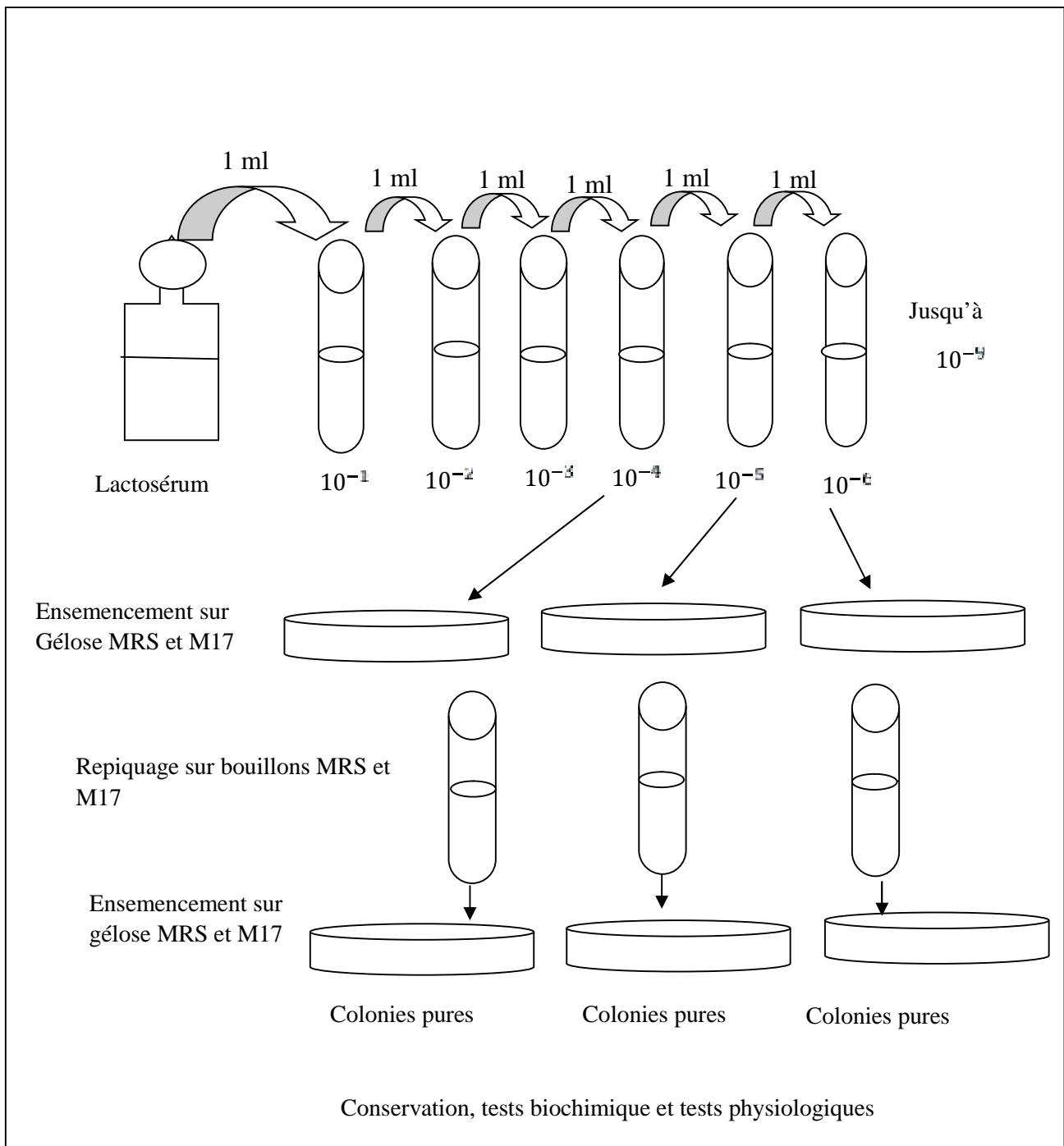


Figure23 : Isolement et purification des bactéries lactique.

4. Identification des souches des bactéries lactiques :

Après avoir obtenu des cultures homogènes, plusieurs tests ont été réalisés pour l'identification des souches :

- Les méthodes classiques d'identification des souches décrites par plusieurs auteurs tels que **Bourgeois et Leveau** se basant sur l'étude des caractères morphologiques et biochimiques, ont été reprises dans ce travail.

Il existe d'autres tests plus récents et plus précis où sont utilisées des techniques moléculaires et génétiques (**Marconi et al., 2000**).

L'orientation de l'identification est basée sur la détermination des caractères : morphologiques, phénotypique et biochimiques.

4.1. Examen macroscopique :

Ce test permet de mettre en évidence la morphologie de colonie obtenue sur des milieux solides MRS et M17, il s'agit d'une observation à l'œil nu qui consiste à déterminer les paramètres suivants (Taille, couleur et forme des colonies).

4.2 Examen microscopique :

On utilise le microscope optique pour déterminer par la suite la forme et la disposition des cellules bactériennes ; ainsi que leur type de Gram (Gram+ pour les bactéries lactiques).

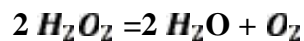
) Coloration de Gram : (Annexe02)

La coloration de Gram est effectuée sur frottis. Elle permet de distinguer deux types de bactéries, les bactéries Gram négatifs (G-) et les bactéries Gram positives (G+). Celles-ci diffèrent par la composition de leur paroi, notamment par l'épaisseur du peptidoglycane, par la présence d'une membrane externe (**Larpent and Larpent-Gourgaud, 1990**).

Les bactéries lactiques sont des bactéries à Gram positif, elles fixent le violet de Gentiane.

4.3. Recherche de catalase :

La catalase permet la décomposition de l'eau oxygénée selon la réaction :



L'activité catalytique permet la dégradation de l'eau oxygénée en oxygène et en eau. Elle est mise en évidence en déposant une à deux colonies de l'isolat de la souche à tester dans une solution fraîche d'eau oxygénée à 10 volumes sur une lame. Un dégagement gazeux abondant sous forme de mousse, traduit la décomposition de l'eau oxygénée (**Guiraud, 2003**).

Ce test a pour but de différencier les bactéries lactiques (catalase-) des autres bactéries. (Annexe 01)

4.4. Test de croissance en différentes températures :

L'aptitude est testée à 22°C, 37°C et à 45°C en ensemencant des tubes de bouillon M17 et MRS. Ce test est important car il permet de distinguer les bactéries lactiques mésophiles des bactéries lactiques thermophiles (Leveau et al., 1991). Les tubes sont examinés au bout d'un délai de 24 heures, la croissance est appréciée par l'apparition de trouble.

➤ Thermorésistance

Ce test permet d'isoler ou identifier les souches résistantes à une température de 60°C pendant 30 minutes.

Les souches sont inoculées en milieux liquides (MRS ou M17), la culture bactérienne doit être jeune et pure.

Les tubes sont introduits dans un bain marie à 60°C pendant 30 minutes, puis refroidis rapidement sous un jet d'eau de robinet, et incubés à 30°C durant 24 à 72 heures.

4.5. Croissance en présence de différentes concentrations de NaCl

Des tubes stériles ont été ensemencés avec du bouillon MRS à 2 %, 4%, 6.5% et 10 % de NaCl, l'incubation a été faite à 30°C pendant 24 heures (Guiraud and Galzy, 1980).

La croissance de ces bactéries se manifeste par un trouble du milieu en comparaison avec un tube témoin non ensemencé.

Les Lactococcus lactiques sont incapables de survivre dans ce milieu.

4.6. Croissance à pH 4 et 9,6

Ce test est réalisé sur bouillon MRS tamponné, dont le pH est ajusté à 4 et 9,6, et cela en ensemencant un tube stérile contenant 9ml du bouillon MRS à pH voulue avec une colonie prise de la gélose MRS (Guiraud and Galzy, 1980).

➤ La croissance à pH=9.6

Le but de ce test c'est de différencier entre *Enterococcus* et *Streptococcus thermophilus*. Après ensemencement dans le milieu MRS tamponné à pH=9,6. La culture est incubée à 37°C pendant 24h. La croissance se traduit par l'apparition d'un trouble dans le tube.

➤ La croissance à pH=4

Il permet d'identifier le genre *Lactobacillus*. On refait les mêmes étapes que celles décrites à pH=9,6. La croissance se traduit aussi par l'apparition d'un trouble dans le tube.

Un résultat positif se traduit par un trouble (De Roissart, 1986; Guiraud and Galzy, 1980).

Seules les souches thermophiles poussent, contrairement aux souches mésophiles qui sont incapables de se développer.

4.7. Tests biochimique :

4.7.1. Type fermentaire :

Ce test permet de différencier les bactéries lactiques homofermentaires de celles hétérofermentaires.

Il consiste à mettre en évidence la production du gaz (C_2). Des souches fraîches préalablement cultivées sur gélose MRS sont ensemencées dans des tubes stériles contenant du bouillon MRS sans citrate et une cloche de Durham. L'incubation est réalisée à 30°C pendant 24–48 heures.

Les souches homofermentaires produisent l'acide lactique à partir du glucose, par contre les souches hétérofermentaires produisent l'acide lactique et le C_2 à proportions égales (Guiraud, 2003).

➤ Fermentation des sucres

Les bactéries lactiques dégradent différemment les sources de carbone. L'étude de la fermentation des sucres est réalisée sur le bouillon MRS modifié (sans glucose et sans extrait de viande), additionné de rouge phénol comme indicateur de pH, le glucose du milieu est remplacé par le sucre à tester à raison de 0,1 (g/l) (Leveau et al., 1991).

Neuf sucres sont testés dont : l'Arabinose, le Glucose, le Maltose, le Mannose, le Sorbitol, le Mannitol, le Fructose, l'Adonitol et le Cellobiose.

Pour ce test 6 microplaques stériles sont utilisées, chaque microplaque stérile contient 96 puits dont 12 colonnes et 8 lignes chacune.

Tableau 11: La répartition des sucres à tester dans chaque colonne.

La colonne	Le sucre
1 ^{er} colonne	Glucose
2 ^{em} colonne	Arabinose
3 ^{em} colonne	Mannose
4 ^{em} colonne	Mannitol
5 ^{em} colonne	Sorbitol
6 ^{em} colonne	Fructose
7 ^{em} colonne	Maltose
8 ^{em} colonne	Adonitol
9 ^{em} colonne	Cellobiose
10 ^{em} colonne	Témoin (Bouillon MRS sans sucre + la souche à testé)

-Une couche d'huile de paraffine stérile est ajoutée.

-Après ensemencement des microplaques un résultat positif se traduit par un virage de l'indicateur coloré vers le jaune (Møller, 1955).

III. Recherche de l'activité antimicrobienne des bactéries lactiques :

1. Revivification et vérification de la pureté des souches :

Les souches de bactéries lactiques conservées dans la gélose MRS à 4°C, sont repiquées sur bouillon MRS. En moyenne 3 à 4 repiquages successifs sont réalisés pour s'assurer de la pureté des souches. L'incubation est réalisée à 30°C/48h(Figure24).

Les souches pathogène conservées dans le bouillon nutritif à 4°C, est repiquée sur le même milieu liquide et incubée à 37°C pendant 24h, puis ensemencée en stries sur gélose sélectif de la souche pathogène tel que décrit sur la (Figure25).

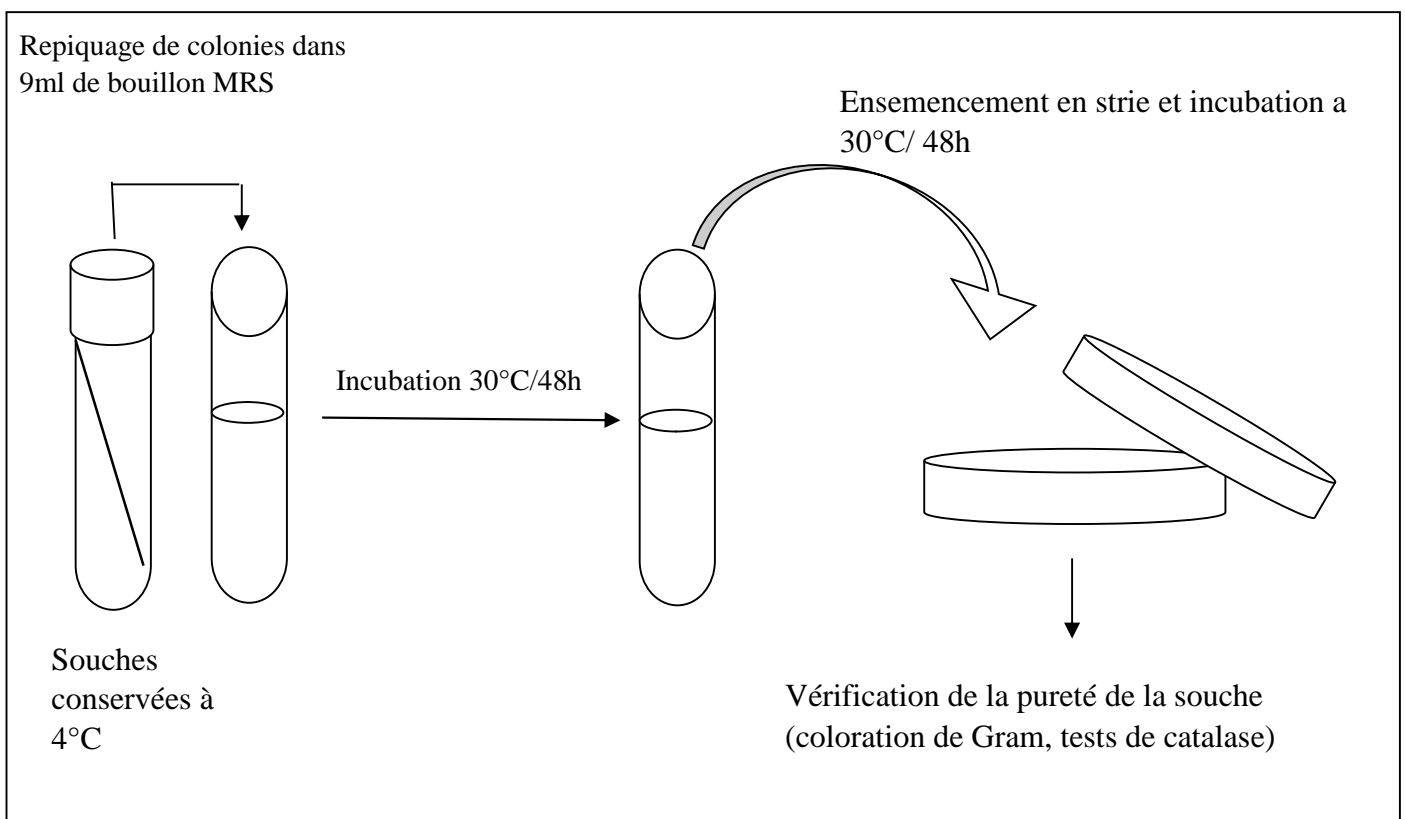


Figure24 : Revivification et vérification de la pureté des souches lactique.

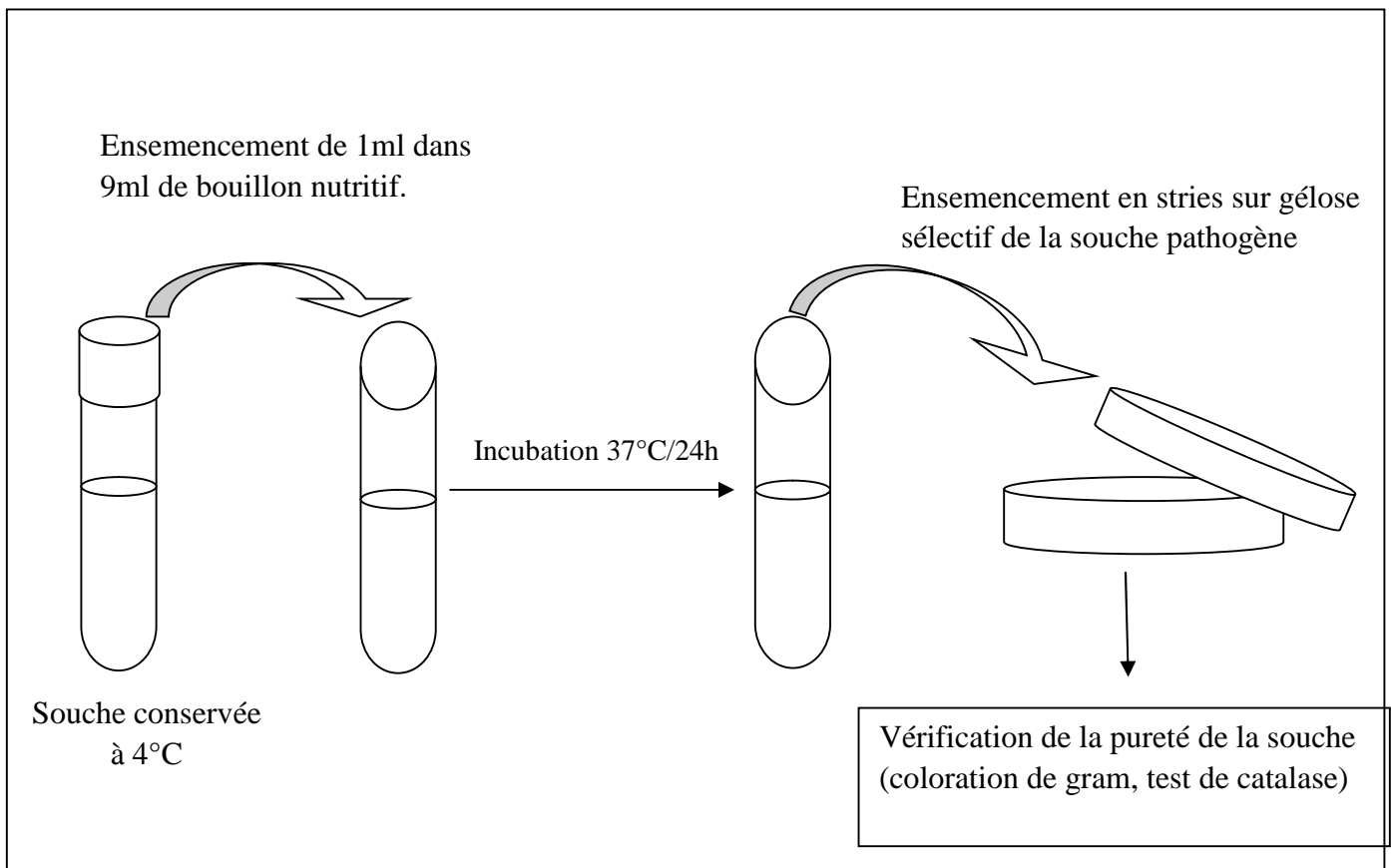


Figure25 : Revivification et vérification de la pureté des souches pathogènes.

2. Mise en évidence de l'activité antibactérienne et sélection des isolats :

La recherche d'une éventuelle production de substances inhibitrices secrétées par les bactéries isolées est réalisée selon l'effet antagoniste de ces isolats lactiques afin de mettre en évidence cette activité antibactérienne par la méthode des puits. Le milieu MH (Mueller-Hinton) avec un pH = 7,1 est utilisé pour les interactions entre les isolats lactiques et les bactéries pathogènes (Mami, 2013).

2.1. Méthode de Tagg et Mc Given (1971) - Méthode des puits AWDA - :

Cette étude est réalisée par la méthode indirecte des puits préconisée par (Barefoot and Klaenhammer, 1984).

Comme la (figure26) montre, La méthode consiste à mettre le surnageant de la souche lactique en contact avec la souche indicatrice pathogène. Les souches lactiques produisent des substances pouvant diffuser dans le milieu de culture solide.

Les bactéries lactiques sont repiquées dans le milieu MRS ou M17, tandis que la souche indicatrice est cultivée dans le bouillon nutritif et incubées pendant une période de 18h à 30°C et 37°C. Après incubation une centrifugation réfrigérée (4°C) est réalisée à 4000 tr /min pendant 15min. Des puits de 9mm de diamètre sont creusés stérilement à l'aide de pipette de Pasteur sur la gélose MH inoculé par la souche inductrice (pathogène). Les puits sont remplis de 100µl du surnageant de la culture lactique. Les boîtes de pétri sont mises à une température de + 4 °C /4h pour permettre la bonne diffusion de la substance antimicrobienne (Doumandji et al., 2010). Les boîtes sont incubées à 37 °C. La présence de zone d'inhibition formée autour des puits est examinée après 24h à 48 h d'incubation (Hwanhlem et al., 2011).

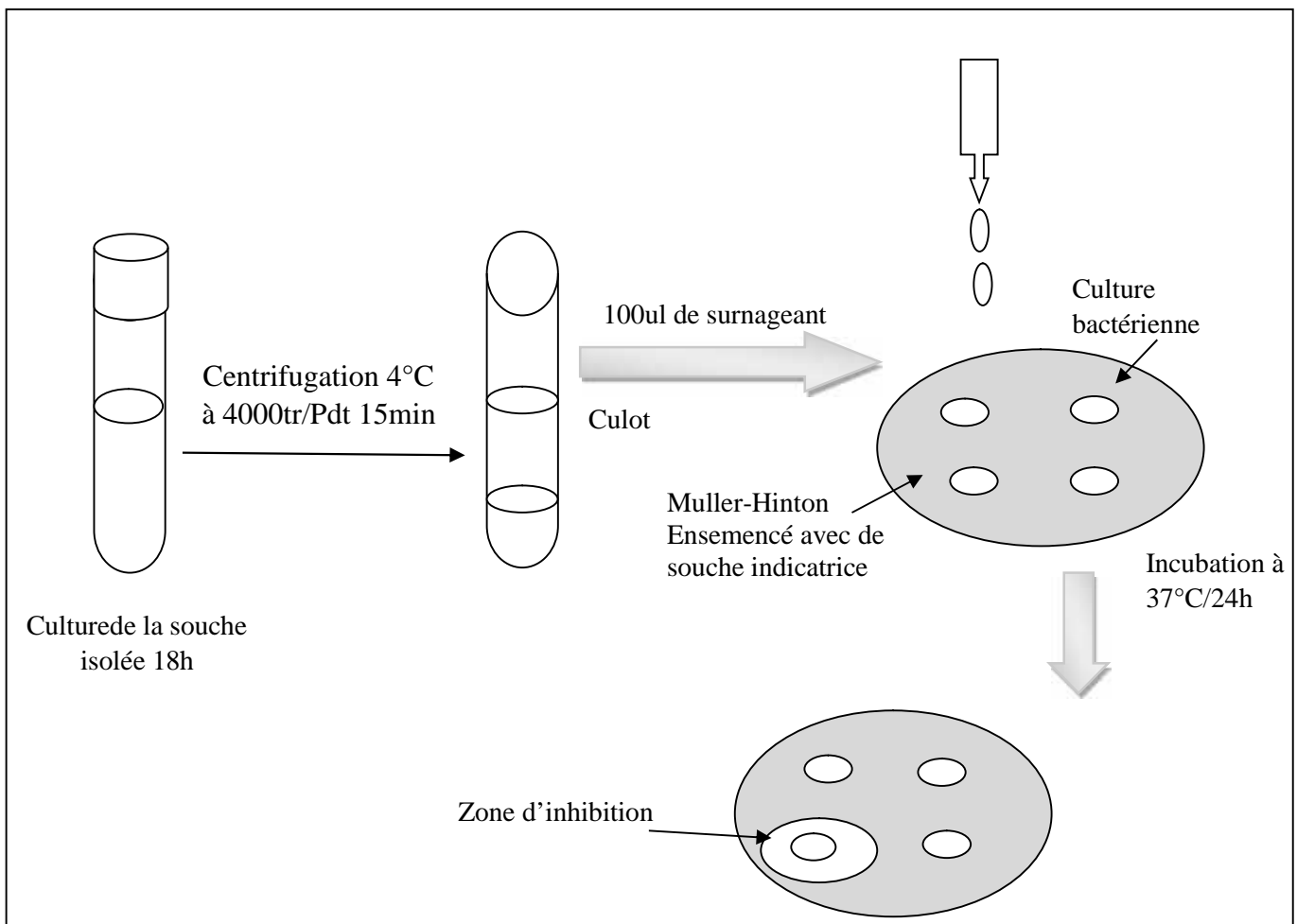


Figure26 : La méthode de (Tagg and McGiven, 1971)- Méthode des puits AWDA.

2.2. Mesure de diamètre des zones d'inhibition :

L'effet antibactérien des surnageant des lactobacilles isolées est mis en évidence par l'apparition d'une zone d'inhibition (zone claire) autour du puits. La lecture de l'activité inhibitrice se fait par la mesure du diamètre d'inhibition autour du puits (Zi), exprimée en mm (Allouche et al., 2010).

Une inhibition est considérée positive si le diamètre est supérieur à 2 mm (Thompson and Gentry-Weeks, 1994) cité par (Doumandji et al., 2010). La mesure du diamètre d'inhibition (Zi) est effectuée selon la formule suivante :

$$\text{Zi en (mm)} = \text{diamètre de la zone d'inhibition obtenue (mm)} - \text{diamètre de puits (9 mm)}$$

3. Recherche de l'activité antifongique :

3.1. Préparation de suspension monosporale :

Candida albicans est cultivé sur extrait de malt agar à 30°C pendant 5 jours, puis 10 ml d'eau distillée stérile sont versés sur la boîte, cette suspension est filtrée sur papier Wathmanet dénombrée par cellule de Malassez (Laref, 2014).

3.2. Méthode de confrontation :

Les isolats sont d'abord ensemencés en deux stries sur MRS ou bien dans toute la surface de la boîte, puis incubés à 30°C pendant 48h, ensuite une bouture de champignon est déposée au centre de la boîte et incubée à 30°C pendant trois jours, afin de mesurer le diamètre du champignon (Gerbaldo et al., 2012).

3.3. Méthode des puits :

Des puits sont réalisés en utilisant l'emporte-pièce sur la boîte de Pétri contenant 10 ml de MRS recouverts par 10 ml de milieu d'extrait de malt agar contenant la suspension monosporale (10^3 spores/ml), ensuite 100 μ de surnageant des bactéries lactiques sont déposés dans les puits [Les souches lactiques ont été cultivées dans un bouillon MRS à 30°C, après 18h d'incubation, les cellules ont été centrifugées à 8000 tr pendant 10 min. La filtration du surnageant sur filtre Millipore de 0.22 μ est nécessaire pour prévenir la croissance des cellules bactériennes]. Un témoin négatif contenant le milieu de culture non inoculé est réalisé. Après 72h d'incubation à 30°C, les zones d'inhibition sont évaluées autour de chaque puits (Laref, 2014).

RÉSULTATS & DISCUSSION



I. Paramètres physico-chimique du lactosérum brut :

Les échantillons de lactosérum obtenus, lors de la fabrication fromagère est doux avec une acidité et un pH qui égale à $17,8 \pm 0,2^{\circ}\text{D}$ et $6,8 \pm 0,5$, respectivement ; ces deux valeurs sont proches de celle trouvée par (Benaissa.M, 2018) qui a trouvé des résultats d'un caillage à la présure qui égale à 18°D pour l'acidité et 6.3 pour le pH.

Comme la (figure27) montre, la valeur de l'extrait sec total noté dans le lactosérum étudié est de $8,06\%$ est proche de la valeur $6,5\%$ énoncé par (Sottiez, 1990) et l'extrait sec dégraissé équivalent à $7,2\%$. Le taux de la matière grasse trouvé est de 8g/l .

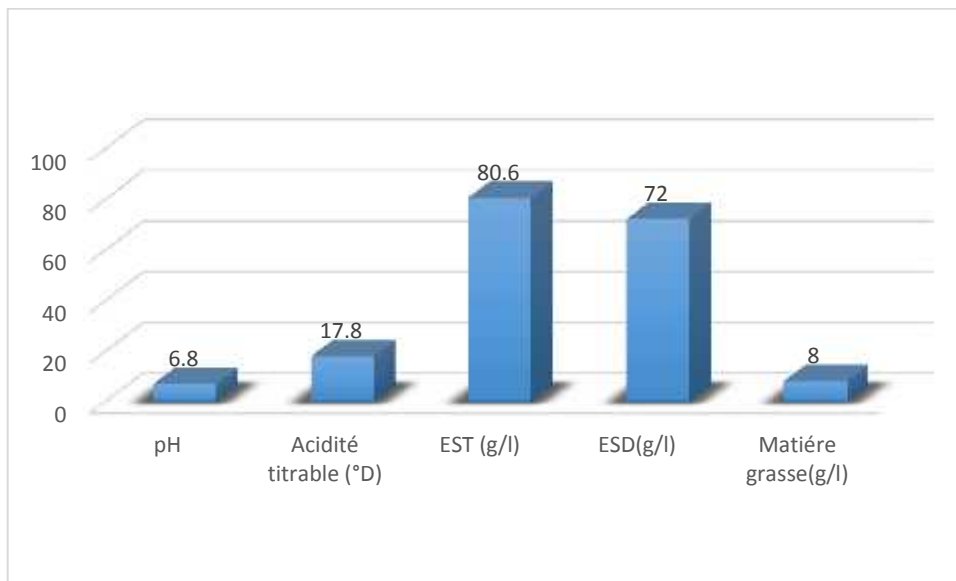


Figure27 : Les paramètres physico-chimiques du lactosérum brut.

II. Résultats de la caractéristique bactériologique du lactosérum brut :

Les résultats obtenus sont interprétés selon journal officiel de la république algérienne N° 39 du 2 juillet 2017.

1. Recherche et dénombrement des germes aérobies mésophiles totaux :



Figure28 : Résultat d'incubation des germes aérobies mésophiles totaux.

Tableau12 : Résultats de dénombrement du GAMT dans les échantillons du lactosérum.

Germe Echantillon	GAMT (UFC/ml)								
	10^{-1}			10^{-2}			10^{-3}		
	A 24h	A 48h	A 72h	A 24h	A 48h	A 72h	A 24h	A 48h	A 72h
1	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs
2	30	20	20	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs
3	20	33	30	Abs	Abs	Abs	28	Abs	Abs
4	Abs	23	33	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs
5	21	24	33	28	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs
Norme	$<3.10^6$								

Dans tous les prélèvements du lactosérum on note une charge globale microbienne (GAMT) variable et acceptable.

Une charge microbienne nettement inférieure aux normes peut s'expliquer par les bonnes pratiques d'hygiène lors de la traite et la manipulation du lactosérum (Jeantet et al., 2008). Donc, on conclut que la qualité du lactosérum destiné à l'analyse est acceptable. L'amélioration de l'hygiène de l'échantillonnage, de la collecte et la conservation rapide au froid permettraient de réduire la charge microbienne (Joint, 2004).

2. Recherche et dénombrement des autres microorganismes :

Tableau13 : Résultats de dénombrement des autres microorganismes.

Germe (UFC/ml) Echantillon	Les coliformes fécaux	Les coliformes totaux	Les salmonelles	<i>Staphylococcus aureus</i>	Les levures et moisissures
1	0.4	2	Abs	Abs	Abs
2	1.1	3.6	Abs	Abs	Abs
3	0	1	Abs	Abs	Abs
4	0.4	0.8	Abs	Abs	Abs
5	0	1.3	Abs	Abs	Abs
Norme	$<5.10^3/1\text{ml}$	$<10^2/1\text{ml}$	Abs	$<10^3/1\text{ml}$	Abs

2.1. Coliformes :

Le dénombrement après incubation sur chaque boîte, a donné le résultat suivant, ($3,2 \cdot 10^1 / 1\text{ml}$) pour les coliformes fécaux, un résultat inférieur à la norme qui est de ($<5 \cdot 10^3 / 1\text{ml}$), et de ($8,7 \cdot 10^1 / 1\text{ml}$) pour les coliformes fécaux et qui est également inférieur à celui de la norme ($10^2 / 1\text{ml}$).

La recherche de microorganismes indicateurs de la contamination d'origine fécale permet de juger l'état hygiénique d'un produit. Même à des niveaux faibles, ils témoigneraient de conditions hygiéniques dégradées lors de la traite ou au cours de transport.

La recherche et le dénombrement des coliformes fécaux dans le lactosérum permettent d'apprécier l'importance de contamination du lait et des produits laitiers (**Lapointe-Vignola, 2002**).

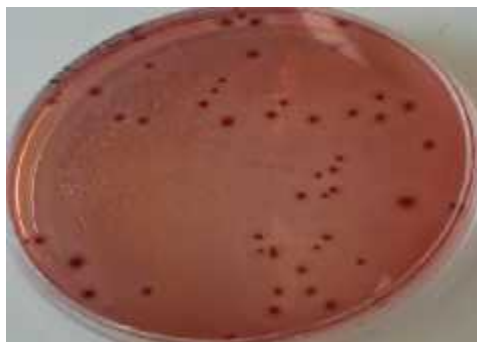


Figure29 : Résultat d'incubation des coliformes.

2.2. *Staphylococcus aureus* :

L'absence totale de ces germes représente un intérêt mutuel pour l'évaluation de la qualité sanitaire des produits alimentaires plus particulièrement, les produits laitiers. La recherche et le dénombrement des *Staphylococcus aureus* est en rapport avec l'état de santé des vaches et les conditions hygiéniques de la traite (**Lapointe-Vignola, 2002**).



Figure30 : Résultat d'incubation des *Staphylococcus aureus*.

2.3. Salmonelles :

L'absence totale dans tous les échantillons répond aux normes, ce qui indique que notre lactosérum est de bonne qualité microbiologique et hygiénique.

Les résultats précédents confirment :

- ✓ La bonne qualité microbiologique et hygiénique
- ✓ Le traitement thermique efficace.
- ✓ La technologie rigoureuse de la préparation (**Lapointe-Vignola, 2002**).

2.4. Levures et moisissures :

La présence dans le lait, le lactosérum et les produits laitiers en général de ces champignons pathogènes pour l'homme constitue un danger en puissance et peuvent constituer une flore d'altération (**Baaziz and Benghodbane, 2009**).

Donc l'absence des microorganismes pathogènes : salmonelles, *Staphylococcus aureus*, levures et moisissures nous renseigne sur la propreté de notre produit qui est de qualité microbiologique satisfaisante, suivant les normes fixées par le **J.O.R.A, 2017 n°39**, ceci confirme le respect des règles d'hygiène et de production.

Enfin, on peut dire que la combinaison d'un traitement thermique efficace, d'une bonne qualité microbiologique de matière première et d'une préparation dans des bonnes conditions

opératoires et hygiéniques offre une meilleure qualité microbiologique aux produits (Lapointe-Vignola, 2002).

Nous constatons que le produit analysé ne présente aucun risque pour la santé du consommateur en cas de valorisation en d'autres produits consommables car il ne contient aucune bactérie pathogène responsable d'intoxication.

Ces résultats indiquent que le lactosérum est de très bonne qualité de point de vue microbiologique.

III. Résultats de l'identification des bactéries lactiques :

Nos souches lactiques ont été isolées et purifiées sur milieu MRS(De Man et al., 1960) et M17 (Terzaghi. et al., 1975), milieux adaptés à la recherche spécifique des bactéries lactiques.

Les colonies suspectes ont été prélevées puis cultivées en milieu liquide MRS ou M17 selon leur provenance pour les enrichir et suivi par un repiquage plusieurs fois sur les mêmes milieux mais solide pour la purification.

Lors de cette étude nous avons identifié les souches isolées à partir du lactosérum par les procédures phénotypiques conventionnelles basées sur les tests morphologiques, biochimique. Les résultats du **test morphologique** obtenus sur la gélose, se traduisent par l'apparition des colonies bien visibles de 2 à 3mm de diamètre, de forme circulaire ou lenticulaire, bombées, de bords réguliers, de couleur blanchâtre ou laiteuse, avec une surface lisse.

Une deuxième forme de colonie irrégulière, érodée, de couleur crème et de 1 à 2mm de diamètre (**figures 31 et 32**).

L'étude microscopique :

Après la coloration de Gram, nous a révélé que les souches sont Gram positif. Cette étude nous a permis de distinguer également la morphologie des bactéries lactiques qui peut se présenter en forme coques et bâtonnets disposées en paires, en courtes chaînettes ou isolées (**figures 33 et 34**).

L'identification est complétée par la **recherche de catalase** ; les résultats qu'on a obtenus montrent que les souches possèdent une catalase négative.

Selon l'identification phénotypique, on a trouvé 5 groupes bactériens à partir des échantillons. Les 05 isolats possédant les caractères décrits par la littérature pour les bactéries lactiques, c'est-à-dire les bactéries sont :

- Gram positif ;
- Catalase négatif ;
- En forme de coques ou de bâtonnets disposées en paires ou en chaînes.



Figure31 : Aspect macroscopique des souches lactiques isolées sur milieu M17.

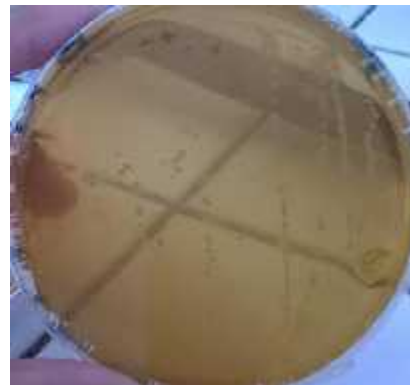


Figure32 : Aspect macroscopique des souches lactiques isolées sur milieu MRS.



Figure33 : Aspect microscopique des souches isolées sur milieu M17, après coloration de Gram (Grossissement x100).

Figure34 : Aspect microscopique des souches lactiques isolées sur milieu MRS après coloration de Gram (Grossissement x100).

IV. Recherche de l'activité antimicrobienne des bactéries lactiques :

Les résultats sont exprimés en (mm), par mesure de la distance entre la limite de la colonie bactérienne et le début de la zone d'inhibition de la souche pathogène. L'inhibition est notée positive lorsqu'elle est supérieure à 2mm(**Schillinger and Lücke, 1987**). L'action bactériostatique est exprimée par la réapparition des colonies dans la zone d'inhibition. L'absence des colonies indique une action bactéricide (**Thompson and Gentry-Weeks, 1994**).

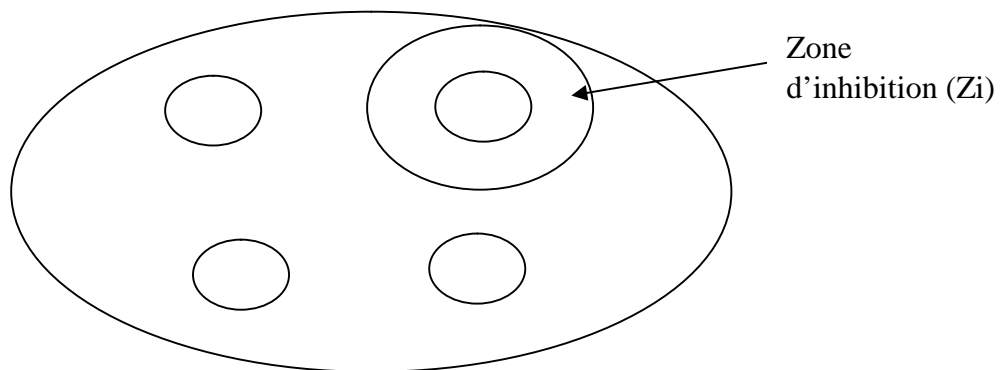


Figure35 : Résultat d'antagonisme des bactéries lactiques.

La détection des souches productrices de substances antimicrobiennes est réalisée par confrontation sur milieu solide et les souches lactique retenues ont montrées une activité Inhibitrice vis-à-vis des pathogènes.

Selon (**Piard and Desmazeaud, 1992**)et(**Casla et al., 1996**), les bactéries à pouvoir antibactérien peuvent avoir trois types d'effets : un effet bactériostatique qui se manifeste par un ralentissement ou arrêt de la croissance, ou bien un effet bactéricide qui se traduit par une perte de la viabilité avec une lyse cellulaire, ou alors un effet bactéricide sans lyse cellulaire.

L'effet inhibiteur des lactobacilles(**Barefoot and Klaenhammer, 1984; Saidi et al., 2011**) peut avoir deux origines : la première est la production d'acides organiques; en effet, les lactobacilles sont connus pour une grande résistance aux pH acides (jusqu'à un pH voisin de 3,5) contrairement aux autres genres de bactéries lactiques qui sont plus sensibles(**Adams and Hall, 1988; Benthin and Villadsen, 1995; Wilson et al., 2005; Wong and Chen, 1988**). La deuxième est que les lactobacilles produisent une autre substance inhibitrice (type bactériocine) active sur de nombreuses espèces (**Anderssen et al., 1998; Larsen et al., 1993; Oyetayo et al., 2003**).

La présence des zones d'inhibitions en cas d'utilisation d'une culture lactique entière peut être due au métabolisme du lactose en acide lactique qui abaisse le pH et crée un environnement

défavorable au développement des bactéries pathogènes (**Barefoot and Klaenhammer, 1984; Fleming et al., 1975**), au peroxyde d'hydrogène (**Barefoot and Klaenhammer, 1984**) ou aux bactériocines (**Klaenhammer, 1993**). Ceci suggère que les propriétés antimicrobiennes des bactéries lactiques fonctionnelles permettent de réduire le nombre d'autres micro-organismes indésirables dans les produits laitiers ainsi d'effectuer un rôle essentiel dans la préservation de produits destinés à la consommation humaine (**Joffraud et al., 2006**).

L'activité antibactérienne des souches lactiques peut être due à la production de plusieurs agents antibactériens. L'acide lactique et l'acidification du milieu inhibent plusieurs types de bactéries. Aussi, ces souches produisent aussi le diacétyl, qui possède aussi un pouvoir d'inhibition. L' H_2O_2 , libéré par les souches lactiques inhibe les bactéries qui ne possèdent pas des défenses contre le stress oxydatif (la catalase, par exemple) (**Ouwehand and Vesterlund, 2004**).

***CONCLUSION ET
RECOMMANDATIONS***

Conclusion et recommandations :

Le lactosérum comme un sous-produit fabrication fromagère est peu valorisé. Il représente un enjeu économique pour les industries laitières, et également un enjeu environnemental car trop polluant et ne peut être rejeté directement dans la nature.

Dans la perspective de contribuer aux divers études focalisant sur la caractérisation et la valorisation des produits naturels comme les sous-produits laitiers, que nous avons conduit cette étude. Malgré les contraintes et l'interruption de la partie pratique a cause de la crise sanitaire Covid-19, des résultats préliminaires ont été obtenus, interprétés été discutés ; et au terme de ce travail nous pouvons conclure que :

Les analyses physico-chimiques du lactosérum doux issu de la fabrication du fromage frais montrent que ce dernier est de bonne qualité et riche en matières nutritives. Les analyses microbiologiques indiquent que le lactosérum est de qualité microbiologique très satisfaisante et ne présente aucun risque pour la santé des consommateurs. En fait, le dénombrement de la flore aérobie mésophile totale et des coliformes a donné des charges microbiennes inférieures aux normes fixés par la législation en vigueur. En plus l'absence des germes pathogènes comme les Salmonelles et les Staphylocoques reflète l'efficacité des traitements thermique appliqués dans l'industrie laitière et montre les bonnes qualités hygiéniques du produit.

L'isolement et l'identification des bactéries lactiques effectué à partir de lactosérum a permis de mettre en évidence la présence d'une variété souches bactériennes possédant les caractéristiques des Lactobacilles, en totale cinq souches de bactéries lactiques ont été isolés et identifiés à partir des échantillons du lactosérum. L'étude de l'activité antimicrobienne des souches lactiques isolées, a montré que les bactéries lactiques possèdent une bonne activité antimicrobienne contre les microorganismes pathogènes. Cette activité est probablement due à la synthèse de substances inhibitrices tels que les acides organiques principalement l'acide lactique, le peroxyde d'hydrogène, le diacétyle et à l'excrétion des bactériocines, connues par leur pouvoir bactéricide ou bactériostatique contre de nombreuses microorganismes pathogènes.

Il est à noter que l'identification phénotypique basée sur les caractères morphologiques et biochimiques est très limitée. Cependant, l'application des techniques moléculaires reste sans doute le moyen le plus sûr pour une réelle affiliation des souches à leurs vrais taxons.

Nous recommandons que cette étude doive être complétée par d'autres travaux pour une identification plus profondément des souches des bactéries lactiques d'intérêt technologique

et de déterminer les substances inhibitrices sécrétées par ces souches. Autres, une meilleure valorisation ne doit pas être limitée aux essais de laboratoire, mais plutôt une varie utilisation et incorporation du lactosérum dans différents domaines tel que l'alimentation, les produits pharmaceutiques et la cosmétique.

Références bibliographiques

A

- Adams, M., Hall, C., 1988.** Growth inhibition of food-borne pathogens by lactic and acetic acids and their mixtures. *International Journal of Food Science & Technology* 23, 287-292.
- Adrian, R.J., 1991.** Particle-imaging techniques for experimental fluid mechanics. *Annual review of fluid mechanics* 23, 261-304.
- AFNOR, F., 1980.** Détermination de la matière sèche (méthode par étuvage). NF V04 282. Recueil de normes françaises. Laites et produits laitiers. Méthodes d'analyse, Afnor, Paris, France, 104-105.
- Alais, C., 1975.** Science du lait: principes des techniques laitières. Sep.
- Alais, C., 1984.** Science du Lait: Principes des Techniques Laitières. SEPAIC.
- Allouche, F.N., Hellal, A., Laraba, A., 2010.** Etude de l'activité antimicrobienne des souches de lactobacilles thermophiles utilisées dans l'industrie laitière. *Nature & Technology*, 13.
- Amiot, J., Fournier, S., Lebeuf, Y., Paquin, P., Simpson, R., 2002.** Chapitre 1: Composition, propriétés physicochimiques, valeur nutritive, qualité technologique et techniques d'analyse du lait; Vignola C, editor. *Science et Technologie du lait; transformation du lait*. C. L. Vignola, ed. Presses Internationales Polytechniques, Montréal, Québec, 1-73.2002.
- Anderssen, E.L., Diep, D.B., Nes, I.F., Eijsink, V.G., Nissen-Meyer, J., 1998.** Antagonistic activity of *Lactobacillus plantarum* C11: two new two-peptide bacteriocins, plantaricins EF and JK, and the induction factor plantaricin A. *Applied and Environmental Microbiology* 64, 2269-2272.
- Arthur, P., Archer, J., Herd, R., Richardson, E., Exton, S., Wright, J., Dibley, K., Burton, D. 1997.** Genetic and phenotypic variation in feed intake, feed efficiency and growth in beef cattle. In: *Proceedings of the twelfth conference association for the advancement of animal breeding and genetics*, 234-237.
- Atlan, D., Béal, C., Champomier-Verges, M., 2008.** Métabolisme et ingénierie métabolique. *Bactéries Lactiques—De la génétique aux ferments*, 271-509.

B

- Baaziz, S., Benghodbane, H., 2009.** Les maladies transmises par le lait. *Ecotoxicologie*, Université Badji Mokhtar, Annaba-biologie, 128p.

- Badis, A., Laouabdia-Sellami, N., Guetarni, D., Kihal, M., Ouzrout, R., 2005.** CARACTERISATION PHENOTYPIQUE DES BACTERIES LACTIQUES ISOLEES A PARTIR DE LAIT CRU DE CHEVRE DE DEUX POPULATIONS CAPRINES LOCALES " ARABIA ET KABYLE". Sciences & Technologie. C, Biotechnologies, 30-37.
- Barefoot, S.F., Klaenhammer, T.R., 1984.** Purification and characterization of the Lactobacillus acidophilus bacteriocin lactacin B. Antimicrobial agents and chemotherapy 26, 328-334.
- Beerens, H., Luquet, F.-M., Almudí, O., Mariátraductor, R., 1990.** Guía práctica para el análisis microbiológico de la leche y los productos lácteos/Guide pratique d'analyse microbiologique des laits des produits laitiers.
- Begloul, L., 2012.** Application des analyse physico chimique et microbiologique au niveau des laboratoires de laiterie de sidi saada en Algérie ; p42.
- Belarbi, M., 2015.** Etude comparative entre la qualité Microbiologique du lait cru de vache et le Lait de chèvre.
- Benaissa, M., 2018.** Valorisation du lactosérum par les bactéries lactique. thèse De doctorat Université D'Oran Ahmed Ben Bella, Université D'Oran Ahmed Ben Bella.
- Benthin, S., Villadsen, J., 1995.** Different inhibition of Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus by D-and L-lactic acid: effects on lag phase, growth rate and cell yield. Journal of Applied Bacteriology 78, 647-654.
- Berry, D., 2000.** What is halal? Dairy Foods 101, 36.
- Boudier, J.-R., Luquet, F.-M. 1981.** Dictionnaire laitier, 93-121.
- Bourgeois, C.-M., Mescle, J.-F., Zucca, J., 1996.** Microbiologie Alimentaire (volume 1). 2ème édition. Lavoisier, Tec Doc. Paris, p 274-275.
- Bouvier, M., 2011.** Mise au point de méthodes de détection des souches d'Escherichia coli productrices de Shiga-toxines (STEC).
- Brew, K., Grobler, J. 1992.** a-lactalbumin (Elsevier, London).
- Brisabois, A., Lafarge, V., Brouillaud, A., De Buyser, M., Collette, C., Garin-Bastuji, B., Thorel, M., 1997.** Les germes pathogènes dans le lait et les produits laitiers: situation en France et en Europe. Rev. sci. tech. Off. int. Epiz 16, 452-471.

Brunner, J., 1977. Milk Proteins, in" Food Proteins," ed. by JR Whitaker and SR Tannenbaum. AVI Publ. Co., Inc. Westport, CT, 175-189.

C

Carip, C., 2015. Microbiologie hygiène.

Casla, D., Requena, T., Gómez, R., 1996.Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from goat's milk and artisanal cheeses: characteristics of a bacteriocin produced by *Lactobacillus curvatus* IFPL105. *Journal of Applied Bacteriology*81, 35-41.

Cenatiempo, Y., Berjeaud, J., Biet, F., Fremaux, C., Hechard, Y., Robichon, D., 1996.Bactériocines de bactéries lactiques: données récentes sur leur structure, leur mode d'action et leurs déterminants génétiques. *Le lait*76, 169-177.

Chardin, H., Barsotti, O., Bonnaure-Mallet, M., 2006. Microbiologie en odontostomatologie. Maloine.

Cheftel, J.-C., Cuq, J.-L., Lorient, D., 1985. Proteines alimentaires; biochimie, propriétés fonctionnelles, valeur nutritionnelle, modifications chimiques.

Cheriguene, A., Chougrani, F., Bekada, A., El Soda, M., Bensoltane, A., 2007. Enumeration and identification of lactic microflora in Algerian goats' milk. *African Journal of Biotechnology*6.

CIPCLait 2011. Commission Interprofessionnelle des Pratiques Contractuelles. Avis relatif à la définition et aux méthodes d'analyse de l'acidité du lait n°2011-02.

Cniel, 2006. Produit laitier. . Maison de lait.

Cocaign-Bousquet, M., Garrigues, C., Novak, L., Lindley, N., Loublere, P., 1995. Rational development of a simple synthetic medium for the sustained growth of *Lactococcus lactis*. *Journal of Applied Bacteriology*79, 108-116.

Creamer, L.K., MacGibbon, A.K., 1996. Some recent advances in the basic chemistry of milk proteins and lipids. *International Dairy Journal*6, 539-568.

D

DAHACHE, N., MESSAOUDI, T., 2019. LA VALORISATION DU LACTOSÉRUM PAR INCORPORATION DANS DES PRODUITS LAITIERS.

Damodaran, S., 1997. Protein-stabilized foams and emulsions. *FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY-NEW YORK-MARCEL DEKKER-*, 57-110.

De la Fuente, M., 2002. Effects of antioxidants on immune system ageing. *European Journal of Clinical Nutrition*56, S5-S8.

- De Man, J., Rogosa, d., Sharpe, M.E., 1960.** A medium for the cultivation of lactobacilli. *Journal of Applied Bacteriology*23, 130-135.
- De Roissart, H., 1986.** Bactéries lactiques. In lait et produits laitiers: vache, brebis, chèvre. Tec et Doc. Lavoisier. Apria, 191-203.
- De Wit, J., 1981.** Structure and functional behaviour of whey proteins. *Netherlands Milk and Dairy Journal (Netherlands)*.
- De Wit, J., Hontelez-Backx, E., 1981.** Les propriétés fonctionnelles des protéines du lactosérum; conséquences des traitements thermiques. *La technique laitière*, 19-22.
- De Witt, J., 2001.** Manuel de l'Enseignant sur le Lactosérum et les Produits de Lactosérum, 1e éd. European Whey Products Association, Bruxelles, Belgique.
- Debry, G., Feron, R. 1976.** ÉVOLUTION DE LA CONSOMMATION HUMAINE DE PROTÉINES EN FRANCE AU COURS DES DIX DERNIÈRES ANNÉES (1965-1974). In: *Annales de la nutrition et de l'alimentation*, 161-173.
- Delarras, C., 2007.** Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle sanitaire.
- Desmazeaud, M., 1998.** Bactéries lactiques et qualité des fromages. Lab. de recherches laitières INRA, 1-3.
- Devoyod, J., Poullain, F., 1988.** Les Leuconostocs. Propriétés: leur rôle en technologie laitière. *Le lait*68, 249-279.
- Dortu, C., Thonart, P., 2009.** Les bactériocines des bactéries lactiques: caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*13, 349-356.
- Doumandji, A., Hellal, A., Saidi, N., 2010.** Purification de la bacteriocine a partir de *Lactobacillus acidophilus* 11. *Rev. Microbiol. Ind. San et Environn*2, 25-47.
- Drider, D., Prevost, H., 2009.** Bactéries lactiques: physiologie, métabolisme, génomique et applications industrielles. *Economica*.

E

- Eigel, W., Butler, J., Ernstrom, C., Farrell Jr, H., Harwalkar, V., Jenness, R., Whitney, R.M., 1984.** Nomenclature of proteins of cow's milk: fifth revision. *Journal of dairy science*67, 1599-1631.
- Erdem, ., Çiftçio lu, M., Harsa, ., 2006.** Separation of whey components by using ceramic composite membranes. *Desalination*189, 87-91.

Eugenia, L.-M., Alvarez, S., Menendez, C., Francisco, A., 2006. Riera, Alvarez Faculté des sciences exactes et des sciences de la nature et de la vie, Département des sciences de la nature et de la vie. Alimentation et nutrition. pp : 25-38.

F

FAO, 1990 Le lait et les produits laitiers dans la nutrition humaine. Collection
FAO/Alimentation et nutrition. 28.

Federighi, M., Sutra, L., Jouve, J.-L., 1998. Manuel de bactériologie alimentaire.
Polytechnica.

Fleming, H., Eтчells, J., Costilow, R., 1975. Microbial inhibition by an isolate of
Pediococcus from cucumber brines. *Applied Microbiology*30, 1040-1042.

G

Gálvez, A., Abriouel, H., López, R.L., Omar, N.B., 2007. Bacteriocin-based strategies for
food biopreservation. *International journal of food microbiology*120, 51-70.

Génin, G., 1939. Séparation du lactose et des protéines solubles contenues dans le sérum du
lait par extraction par l'alcool. *Le lait*19, 693-698.

Gerbaldo, G.A., Barberis, C., Pascual, L., Dalcero, A., Barberis, L., 2012. Antifungal
activity of two *Lactobacillus* strains with potential probiotic properties. *FEMS
microbiology letters*332, 27-33.

Goursaud, J., 1985. Composition et propriétés physico-chimiques. Dans *Laits et produits
laitiers vache, brebis, chèvre. Tome 1 : Les laits de la mamelle à la laitière.* Luquet
F.M. Edition Tec et Doc Lavoisier, Paris.

Guiraud, J.-P., Rosec, J.-P., 2004. Pratique des normes en microbiologie alimentaire. Afnor.

Guiraud, J., 1998. Microbiologie Alimentaire. Technique et Ingénierie, *Série Agro-
alimentaire.* Eds. Dunod Paris, 652.

Guiraud, J. 2003. Microbiologie Alimentaire. Edition DUNOD. Paris. Pp: 136-139 (H).

Guiraud, J., Galzy, P., 1980. Analyse microbiologique dans les industries alimentaires.
l'Usine Nouvelle.

Gumpen, S., Hegg, P.O., Martens, H., 1979. Thermal stability of fatty acid-serum albumin
complexes studied by differential scanning calorimetry. *Biochimica et Biophysica
Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism*574, 189-196.

H

Hambling, S.G., McAlpine, A., Sawyer, L., 1992. -Lactoglobulin. *Advanced dairy chemistry*1, 141-190.

Hélène, C., 2007. *Carnobacterium maltaromaticum* : caractéristiques physiologiques et potentialités en technologie fromagère. Thèse présentée en vue d'obtenir les grades de docteur de l'INPL et Docteur/PhD en procédés Biotechnologiques et Alimentaire. Université de Ngaoundere, Cameroun. P5.

Hermier, J., Lenoir, J., Weber, F., 1997. Rôle des bactéries lactiques dans la production des facteurs anti microbien, les groupes microbien d'intérêt laitier. Ed. Cepil. Paris. pp.960.

Holzappel, W., 2002. Appropriate starter culture technologies for small-scale fermentation in developing countries. *International journal of food microbiology*75, 197-212.

Huyghebaert, 2006. Stratégies des produits à base de lait cru.

Hwanhlem, N., Buradaleng, S., Wattanachant, S., Benjakul, S., Tani, A., Maneerat, S., 2011. Isolation and screening of lactic acid bacteria from Thai traditional fermented fish (Plasom) and production of Plasom from selected strains. *Food Control*22, 401-407.

I

ISO 2017. Microbiologie de la chaîne alimentaire — Préparation des échantillons, de la suspension mère et des dilutions décimales en vue de l'examen microbiologique — Partie 1: Règles générales pour la préparation de la suspension mère et des dilutions décimales. Disponible sur : <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:6887:-1:ed-2:v1:fr> (consulté en septembre 2020)

J

Jack, R.W., Tagg, J.R., Ray, B., 1995. Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Microbiological reviews*59, 171-200.

Jacque, P., 2000. Alimentation et santé. Paris : INRA, 540p.

- Jasniewski, J., 2008.** Étude des mécanismes d'action de bactériocines de la sous classe IIa. Institut National Polytechnique de Lorraine,
- Jeantet, R., Ducept, F., Dolivet, A., Méjean, S., Schuck, P., 2008.** Residence time distribution: a tool to improve spray-drying control. Dairy Science & Technology 88, 31-43.
- Jensen, R.G., 1995.** Handbook of milk composition. Academic press.
- Joffraud, J.-J., Cardinal, M., Cornet, J., Chasles, J.-S., Léon, S., Gigout, F., Leroi, F., 2006.** Effect of bacterial interactions on the spoilage of cold-smoked salmon. International journal of food microbiology 112, 51-61.
- Joint, F., 2004.** Codex alimentarius: food hygiene basic texts. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO).
- Jozala, A.F., de Lencastre Novaes, L.C., Cholewa, O., Penna, T.C.V., 2005.** Increase of nisin production by *Lactococcus lactis* in different media. African Journal of Biotechnology 4, 262-265.
- Juillard, V., Spinnler, H.-E., Desmazeaud, M., Boquien, C., 1987.** Phénomènes de coopération et d'inhibition entre les bactéries lactiques utilisées en industrie laitière. Le lait 67, 149-172.

K

- Kacem, M., Zadi-Karam, H., Karam, N., 2006.** Detection and characterization of a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* OL9 against *Erwinia chrysanthemi* strains Mu'tah Lil-Buhuth wad-Dirasat. Natural Applied Sciences Series (Jordan) 21, 159-171.
- Kennedy, J., Cabral, J., Woodward, J. 1985.** Immobilized Cells and Enzymes (IRL Press, Oxford).
- Klaenhammer, T.R., 1988.** Bacteriocins of lactic acid bacteria. Biochimie 70, 337-349.
- Klaenhammer, T.R., 1993.** Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. FEMS microbiology reviews 12, 39-85.
- Kouakou, P., Ghalfi, H., Dortu, C., Evrard, P., Thonart, P., 2010.** Combined use of bacteriocin-producing strains to control *Listeria monocytogenes* regrowth in raw pork meat. International Journal of Food Science & Technology 45, 937-943.

L

- Lairini, S., Beqqali, N., Bouslamti, R., Belkhou, R., Zerrouq, F., 2014.** Isolement des bactéries lactiques à partir des produits laitiers traditionnels Marocains et formulation d'un lait fermenté proche du Kéfir. *Afrique Science: Revue Internationale des Sciences et Technologie*10, 267-277.
- Lanciotti, R., Patrignani, F., Iucci, L., Saracino, P., Guerzoni, M.E., 2007.**Potential of high pressure homogenization in the control and enhancement of proteolytic and fermentative activities of some *Lactobacillus* species. *Food Chemistry*102, 542-550.
- Lapointe-Vignola, C., 2002.** Science et technologie du lait: transformation du lait. Presses inter Polytechnique.
- Laref, N., 2014.** L'étude de l'activité antifongique des lactobacilles et leur effet sur la croissance d'*Aspergillus*sp. Thèse doctorat. Département de Biologie. université d'Oran. p 35-36, 78.
- .
- Larpent, J.-P., Larpent-Gourgaud, M., 1990.** Mémento technique de Microbiologie. Technique et documentation-Lavoisier.
- Larpent, J., 1997.** Microbiologie Alimentaire: Technique de laboratoire, Technique et documentation. Londres, New York, Paris, Lavoisier.
- Larsen, A.G., Vogensen, F., Josephsen, J., 1993.** Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from sour doughs: purification and characterization of bavaricin A, a bacteriocin produced by *Lactobacillus bavaricus* MI401. *Journal of Applied Bacteriology*75, 113-122.
- Léonard, L., 2013.** Évaluation du potentiel bioprotecteur de bactéries lactiques confinées dans une matrice polymérique. Dijon,
- Leveau, J.-Y., Bouixmrielle, De Roissart, h. 1991.** La flore lactique, In: Bourgeois, C.M.L., J-Y (Ed.) *Technique d'analyse et de contrôle dans les industries agroalimentaire*. 152-155.
- Leyral, G., Joffin, J., Boineau, F., 1998.** Microbiologie technique 2. Documentation technique. Biologie Technique.
- Lin, C., Böttcher, W., Chou, M., Creutz, C., Sutin, N., 1976.** Mechanism of the quenching of the emission of substituted polypyridineruthenium (II) complexes by iron (III),

chromium (III), and europium (III) ions. *Journal of the American Chemical Society* 98, 6536-6544.

Linden, G., Lorient-Biochimie agro-industrielle, D. 1994. Valorisation alimentaire de la production agricole (MASSON Paris Milan Barcelone).

M

Makhloufi, K.M., 2011. Caractérisation d'une bactériocine produite par une bactérie lactique *Leuconostoc pseudomesenteroides* isolée du boza.

Mami, A., 2013. Recherche des bactéries lactiques productrices des bactériocines à large spectre d'action vis-à-vis des impliqués dans les toxi-infections alimentaires en Algérie. Thèse de doctorat de l'université d'Oran: 25, 77,

Marconi, E., Sorrentino, E., Mastrocola, L., Coppola, R., 2000. Rapid detection of meso-diaminopimelic acid in lactic acid bacteria by microwave cell wall hydrolysis. *Journal of agricultural and food chemistry* 48, 3348-3351.

Marwaha, S., Kennedy, J., 1988. Whey—pollution problem and potential utilization. *International Journal of Food Science & Technology* 23, 323-336.

Mathieu, J., 1998. Initiation à la physicochimie du lait. Lavoisier Tec & Doc.

Mayo, B., Aleksandrak-Piekarczyk, T., Fernández, M., Kowalczyk, M., Álvarez-Martín, P., Bardowski, J., 2010. Updates in the metabolism of lactic acid bacteria. *Biotechnology of lactic acid bacteria: Novel applications*, 3-33.

Mechakra, A., Auburger, B., Remeuf, F., Lenoir, J., 1999. Optimisation d'un milieu de culture pour la production d'enzymes protéolytiques acides par *Penicillium camemberti*. *Sciences des aliments* 19, 663-675.

Meréo, M., 1971. utilisations industrielles de serum de fromagerie. *Indus Aliment Agr.*

Michel, V., Hauwuy, A., Chamba, J., 2006. Gestion de la flore microbienne des laits crus par les pratiques des producteurs. *Renc. Rech. Rum* 13, 309-312.

Mihaila-Amrouche, L., Schlegel, L., Bouvet, A., 2004. Impact of susceptibility to antibiotics of streptococci & enterococci isolated from patients with infective endocarditis on antibiotic treatment. *Indian Journal of Medical Research* 119, 80.

Modler, H., 1988. Development of a continuous process for the production of Ricotta cheese. *Journal of dairy science* 71, 2003-2009.

Moletta, R. 2002. Procédés biologiques anaérobies (Lavoisier Tec et Doc).

Møller, V., 1955. Simplified tests for some amino acid decarboxylases and for the arginine dihydrolase system. *Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica* 36, 158-172.

- Morabito, D., 1994.** Production d'acide lactique par *Lactobacillus casei* sur lactoserum: études cinétiques, modélisation et simulation de procédé intégré.
- Morr, C. 1989.** In PF Fox (Ed.), *Whey proteins: manufacture. Development in Dairy Chemistry-4* (pp. 245–248) (New York: Elsevier Applied Science).
- Morr, C.V., Ha, E., 1993.** Whey protein concentrates and isolates: processing and functional properties. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*33, 431-476.
- Muller, A., Chaufer, B., Merin, U., Daufin, G., 2003.** Prepurification of α -lactalbumin with ultrafiltration ceramic membranes from acid casein whey: study of operating conditions. *Le lait*83, 111-129.

O

- Ouwehand, A.C., Vesterlund, S., 2004.** Antimicrobial components from lactic acid bacteria. *FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY-NEW YORK-MARCEL DEKKER*-139, 375-396.
- Oyetayo, V., Adetuyi, F., Akinyosoye, F., 2003.** Safety and protective effect of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* used as probiotic agent in vivo. *African Journal of Biotechnology*2, 448-452.

P

- Page, A., Miller, R., Keeney, D., 1982.** *Methods of soil analysis, part 2. Chemical and microbiological properties*2.
- Penaud, S., 2006.** Analyse de la séquence génomique et étude de l'adaptation à l'acidité de *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* ATCC11842. Université Paris Sud-Paris 11,
- Petransxiene, D., Lapied, L., 1981.** La qualité bactériologique du lait et des produits laitiers. *Technique & Documentation*.
- Piard, J., Desmazeaud, M., 1992.** Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria. 2. Bacteriocins and other antibacterial substances. *Le lait*72, 113-142.
- Pilet, M.F., Catherine, M., Federighi, M., 2005.** Bactéries lactiques In *Bactériologie alimentaire "compendium d'hygiène des aliments"*. Federighi M. *Économico*, pp: 219-242

R

- Raimbault, M., 1995.** Importance des bactéries lactiques dans les fermentations du manioc *Transformation Alimentaire du Manioc. Éditions ORSTOM*, 260-275.

- Raynaud, S., 2006.** Régulation métabolique et transcriptionnelle de l'autoacidification chez *Lactococcus lactis*. Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse,
- Rodríguez-Figueroa, J., González-Córdova, A., Torres-Llanez, M., Garcia, H., Vallejo-Cordoba, B., 2012.** Novel angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides produced in fermented milk by specific wild *Lactococcus lactis* strains. *Journal of dairy science*95, 5536-5543.
- Roissart, H.d., Luquet, F., 1994.** Bactéries lactiques. Aspects fondamentaux et technologiques. Uriage, Loriga605.
- Rollema, H., McKellar, R., Sorhaug, T., Suhren, G., Zadow, J., 1989.** Comparison of different methods for the detection of bacterial proteolytic enzymes in milk. *Milchwissenschaft*44, 491-496.
- Rosset, R., 2001.** Croissance microbienne et froid: cas particulier de *Listeria monocytogenes*: Chaîne du froid." *Revue générale du froid* (1935) 91(OCT): 39-44.

S

- Sachidanandam, R., Weissman, D., Schmidt, S.C., Kakol, J.M., Stein, L.D., Marth, G., Sherry, S., Mullikin, J.C., Mortimore, B.J., Willey, D.L., 2001.** A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. *Nature*409, 928-934.
- Saidi, N., Guessas, B., Bensalah, F., Badis, A., Hadadji, M., Henni, D., Prevost, H., Kihal, M., 2002.** Caractérisation des bactéries lactiques isolées du lait cru de chèvre des régions arides. *J. Alg. Reg. Arides*1, 01-11.
- Saidi, N., Hadadji, M., Guessas, B., 2011.** Screening of bacteriocin-producing lactic acid bacteria isolated from West Algerian goat's milk. *Global Journal of Biotechnology & Biochemistry*6, 154-161.
- Santo, C.E., Morais, P.V., Grass, G., 2010.** Isolation and characterization of bacteria resistant to metallic copper surfaces. *Applied and Environmental Microbiology*76, 1341-1348.
- Schillinger, U., Lücke, F.-K., 1987.** Identification of lactobacilli from meat and meat products. *Food microbiology*4, 199-208.
- Schleifer, K., Kraus, J., Dvorak, C., Kilpper-Bälz, R., Collins, M., Fischer, W., 1985.** Transfer of *Streptococcus lactis* and related streptococci to the genus *Lactococcus* gen. nov. *Systematic and Applied Microbiology*6, 183-195.

Schleifer, K.H., Ludwig, W., 1995. Phylogenetic relationships among bacteria. In Hierarchy of Life (eds Fernholm, B., Bremer, K. and Jörnvall, H.). Excerpta Medica, Elsevier Science Publishers BV, Amsterdam, The Netherlands, pp. 103–117.

Schmitt, R., 2006. Microbiologie Alimentaire ; Risques microbiologiques par des organismes pathogènes, HEVs, Susse 10-102.

Siegmund, H., Rechinger, K.B., Jakobsen, M., 2000. Dynamic changes of intracellular pH in individual lactic acid bacterium cells in response to a rapid drop in extracellular pH. Applied and Environmental Microbiology 66, 2330-2335.

Sottiez, P., 1990. Produits dérivés des fabrications fromagères in: lait et produits laitiers; vache, brebis, chèvre. Ed Lavoisier, Paris, 633p.

Stiles, M.E., Holzapel, W.H., 1997. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. International journal of food microbiology 36, 1-29.

T

Taddei, C., Aimar, P., Daufin, G., Sanchez, V., 1986. Etude du transfert de matière lors de l'ultrafiltration de lactosérum doux sur membrane minérale. Le lait 66, 371-390.

Tagg, J., McGiven, A., 1971. Assay system for bacteriocins. Applied Microbiology 21, 943.

Teixeira, L.M., Merquior, V.L.C., Vianni, M.d.C.E., Carvalho, M.d.G.S., Fracalanza, S.E., Steigerwalt, A.G., Brenner, D.J., Facklam, R.R., 1996. Phenotypic and genotypic characterization of atypical *Lactococcus garvieae* strains isolated from water buffalos with subclinical mastitis and confirmation of *L. garvieae* as a senior subjective synonym of *Enterococcus seriolicida*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 46, 664-668.

Terzaghi, E., B., Sandine, W.E. 1975. Improved Medium for Lactic Streptococci and Their Bacteriophages.

Thompson, J., Gentry-Weeks, C., 1994. Métabolisme des sucres par les bactéries lactiques. Bactéries lactiques. Lorica, Uriage, France, 239-290.

Thompson, J., Torchia, D., 1984. Use of ³¹P nuclear magnetic resonance spectroscopy and ¹⁴C fluorography in studies of glycolysis and regulation of pyruvate kinase in *Streptococcus lactis*. Journal of bacteriology 158, 791-800.

Tredez, M., 2008. Méta-analyse des effets protecteurs des probiotiques sur la cancérogenèse colorectale chez les rongeurs.

U

Uchida, Y., Shimatani, M., Mitsuhashi, T., Koutake, M. 1996. Process for preparing a fraction having a high content of α -lactalbumin from whey and nutritional compositions containing such fractions (Google Patents).

V

Van De Guchte, M., Serror, P., Chervaux, C., Smokvina, T., Ehrlich, S.D., Maguin, E., 2002. Stress responses in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*82, 187-216.

Veinglou, B., Baltadjieva, M., Kalatzopoulos, G., Stamenova, V., Papadopoulou, E., 1982. La composition de lait de chèvre de la région de Plovidiv et en Bulgarie et de Ioninna en Grèce. *Lait*. 65, 155-165.

Veisseyre, R., 1975. Technologie du lait: constitution, recolte, traitement et transformation du lait 3.

Vierling, E., 2008. Aliments et boissons filières et produits. 3^{ème} édition Biosciences et techniques.Paris.pp :15-16.

Violleau, D., 1999. Intérêt du fractionnement et de l'extraction des matières organiques naturelles d'eaux de surface pour l'étude de leurs propriétés structurales et de leur pouvoir complexant vis-à-vis du cuivre. Poitiers,

Visser, R., van den Bos, M., Ferguson, W., 1988. Lactose and its chemical derivatives. *Bull of IDF*233, 33-44.

Vrignaud, Y., 1983. VALORISATION DU LACTOSERUM. UNE LONGUE HISTOIRE.

W

Wilson, A., Sigeo, D., Epton, H., 2005. Anti-bacterial activity of *Lactobacillus plantarum* strain SK1 against *Listeria monocytogenes* is due to lactic acid production. *Journal of applied microbiology*99, 1516-1522.

Wong, H.-C., Chen, Y.-L., 1988. Effects of lactic acid bacteria and organic acids on growth and germination of *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology*54, 2179-2184.

Y

- Yang, S.Y., Jones, J.H., Olsen, F.J., Paterson, J.J., 1980.** Soil as a medium for dairy liquid waste disposal. *Journal of Environmental Quality*9, 370-372.
- Yateem, A., 2008.** Isolation of lactic acid bacteria with probiotic potential from camel milk.
- Yee, K.W., Wiley, D.E., Bao, J., 2007.** Whey protein concentrate production by continuous ultrafiltration: Operability under constant operating conditions. *Journal of Membrane Science*290, 125-137.

ANNEXES

ANNEXE A

Matériels pour analyses physico-chimiques :

1-Appareillage

|Balance analytique ;

|Centrifugeuse ;

|pH mètre ;

Acidimètre (Dornic) ;

Réfrigérateur ;

Thermomètre ;

Thermo-laco-densimètre (GERBER) ;

Dessiccateur.

2-Verrerie

Butyromètres à lait (4 %) (GERBER);

Éprouvette,

Spatule métallique ;

δ écher, Pipettes graduées (10ml, 11ml)

Flacons stériles avec fermeture hermétique,

fioles jaugées ;

Matériel pour l'analyse microbiologique :

1-Appareillage :

Bain Marie : pour liquéfier les milieux de culture.

Balance de précision : Pour peser des ingrédients de milieux de culture.

Etuve (MEMMERT) 44°C : Pour l'incubation des boîtes ensemencées.

Etuves (30 et 37°C) : Pour l'incubation des boîtes ensemencées.

Four Pasteur (POL-EKO-APARATURA SP.J.) : Pour la stérilisation (par la chaleur sèche: 180°C/20min) des équipements en verrerie (erlenmeyers, tubes dans des centaines).

L'Autoclave : Pour stérilisation (par la chaleur humide : T°120C/15min) des équipements en verrerie ainsi que des milieux de culture.

pH-mètre

Microscope Optique : observation des bactéries aux différents grossissements

Plaque chauffantes agitatrices : Faire agiter les milieux de culture durant leur préparation jusqu'à l'ébullition.

Réfrigérateur : Pour la conservation des milieux de culture.

Thermomètre

2-Equipements :

Anse de platine, bec Bunsen, boîtes de petri, papier absorbant, contenaires pour pipettes, papier aluminium, portoirs, seringues (10ml), spatules de laboratoire, pipettes pasteur.

3-Verreries :

Béchers à différents volumes, burette, erlenmeyers, flacons en verre (250ml), lames et lamelles en verre, tubes à essai, Pipettes Pasteur.

4-Réactifs :

Alcool, Eau distillée, Lugol, Solution d'eau oxygénée (30), L'huile à émersion, Solution NaOH.

-Eau physiologique

Chlorure de sodium 8.5 g

Peptone 0.5 g

Eau distillée 1000 ml

pH = 7

Autoclavage : 120 °C, 20 minutes.

Les compositions des milieux de cultures : en g/l

Milieux pour la qualité hygiénique :

Gélose Plate Count Agar (PCA)

Tryptone 5.0

Liofilchem).

Extrait autolytique de levure 2.5

pH du milieu prêt à l'emploi à 25°C : 7,0 ±

Glucose 1.0

0,2.

Agar : 12.0 (Biokar) - 15.0 (Difco -

Gélose Désoxycholate citrate lactose (DCLA)

Infusion de viande 9,5

Citrate ferrique ammoniacal 2,0

Peptone pepsique de viande 10,0

Rouge neutre 0,020

Lactose 10,0

Agar agar 13,5

Citrate de sodium 20,0

pH du milieu prêt à l'emploi à 25°C : 7,5 ±

Sodium désoxycholate 5,0

0,2

pH du milieu prêt à l'emploi à 25°C : 7,3 ± 0,2

Gélose Hektoen

Protéase peptone 12

Thiosulfate de sodium 5

Extrait de levure 3

Sels biliaries 9

Chlorure de sodium 5

Citrate de fer ammoniacal 1,5

Salicine 2

Lactose 12

Saccharose 12

Fuchsine acide 0,1

Bleu de bromothymol 0,065

Agar 14

pH final $7,5 \pm 0,2$

Bouillon Giolitti et Cantoni:

Tryptone: 10,0

Extrait de viande: 5,0

Extrait autolytique de levure: 5,0

Glycine: 1,2

Mannitol: 20,0

Pyruvate de sodium: 3,0

Chlorure de sodium: 5,0

Chlorure de lithium: 5,0

Tween 80: 1,0

Ajouter 0.1 ml (simple concentration) ou 0.2 ml (double concentration) par tube de 10 ml, d'une solution aqueuse de tellurite de potassium à 1% préalablement stérilisée par filtration. pH du milieu prêt-à-l'emploi à 25°C : $6,9 \pm 0,2$.

Gélose Chapman

Extrait de viande 1

Peptone 10

Mannitol 10

Chlorure de sodium 75

Rouge de phénole 0,025

Agar 15

Eau distillée 1000ml

pH=7,4 ; Autoclaver à 120°C /20 min

Solution de tellurite de potassium

Tellurite de potassium 100.0 mg

Eau distillée 10.0 ml

Gélose sabouraud

Digestat pancréatique de caséine 5.0

Digestat pepsique de viande 5.0

Glucose 40.0

Agar agar 15.0

pH du milieu prêt à l'emploi à 25°C : $5,6 \pm 0,2$

Les milieux d'isolement et d'identification : en g/l

Bouillon MRS

Polypeptone 10,00

Extrait de viande 10,00

Extrait autolytique de levure 5,00

Glucose 20,00

Tween 80 1,08

Phosphate dipotassique 2,00

Acétate de sodium 5,00

Citrate d'ammonium 2,00

Sulfate de magnésium 0,20

Sulfate de manganèse 0,05

pH du milieu : $5,7 \pm 0,1$

|

|Gélose MRS pH 6.5

Polypeptone 10,00

Extrait de viande 10,00

Extrait de levure 5,00

Glucose 20,00

Tween 80 1,08

Phosphate dipotassique 2,00

pH du milieu : $6.5 \pm 0,1$

Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes.

Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes

Acétate de sodium 5,00

Citrate d'ammonium 2,00

Sulfate de magnésium 2,00

Sulfate de manganèse 0,05

Agar agar bactériologique 15,00

|Gélose M17

Peptone de soja 5,00

Peptone de viande 2,50

Tryptone 2,50

Extrait de viande 5,00

Extrait de levure 5,00

pH du milieu : $6,4 \pm 0,1$

Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes.

Lactose 5,00

Acide ascorbique 0,50

Glycérophosphate de sodium 19

Sulfate de magnésium 0,25

Agar 20

Bouillon M17

Tryptone: 2,5 (Biokar)- 5,0 (Difco)

Peptone pepsique de viande 2,50

Peptone papainique de soja 5,0

Extrait autolytique de levure 2,5

Extrait de viande 5,0

Lactose 5,0

Sodium glycérophosphate 19,0

Magnésium sulfate 0,25

Acide ascorbique 0,5

pH du milieu prêt à l'emploi à 25°C: $7,1 \pm 0,2$ (Biokar) - $6,9 \pm 0,2$ (Difco).

Sélénite-Cystine

Tryptone: 5,0

Lactose: 4,0

Phosphate disodique: 10,0

Sodium sélénite: 4,0

L-Cystine: 0,010

pH du milieu prêt à l'emploi à 25°C: $7,0 \pm 0,2$.

Gélose Mueller-Hinton (MH)

Infusion de viande de bœuf 300 ml

Peptone de caséine 17.5g

Amidon de maïs 1.5g

Agar 17 g

Eau désilée 1000ml

Extrait de malt agar

Extrait de malt 30,0

Maltose 12,75

Dextrine 2,75

Glycérol 2,35

Peptone 0,78

Agar agar 15,0

Ajuster le pH à 4,5 par addition d'une solution stérile d'acide lactique à 10%

Annexe B

Tableau I : Caractéristiques différentielles des bactéries lactiques (Dérivée à partir de Axelsson, 1998 ; Leisner *et al*, 2000)

Caractéristiques	<i>Carnobacterium</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Arcoceus</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>Lactococcus</i> <i>Figaroceus</i>	<i>Leuconostoc</i> <i>Oenococcus</i>	<i>Pediococcus</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Tetragenococcus</i>	<i>Weizella</i>
Morphologie	bacilles	bacilles	coques	coques	coques	Coques ovales	coques	coques	coques	Coques/ bacilles
Formation des tétrades	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-
Газ à partir de glucose	-	±	-	-	-	+	-	-	+	+
Croissance à 10°C	+	±	+	+	+	+	±	-	+	+
Croissance à 45°C	-	±	-	+	-	-	±	±	-	-
Croissance 6.5% NaCl	ND	±	+	+	-	±	±	-	+	±
Croissance 18% NaCl	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Croissance à pH 4.4	ND	±	-	+	±	±	+	-	-	±
Croissance à pH 9.6	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-
Isomère d'acide lactique	L	D, L, DL	L	L	L	D	L, DL	L	L	D, DL
Hydrolyse d'arginine	+	±	ND	±	-	-	±	±	ND	-
mDAP	+	±	ND	-	-	-	-	-	ND	-

+ positive ; - négative ; * résultats variés selon l'espèce ; ND, non déterminé.

-Annexe 01 :

Teste de Catalase :

Déposer sur une lame une goutte d'eau oxygénée



(1)

Prélever dans la zone d'asepsie une colonie à l'anse de platine.
Déposer la colonie dans la goutte d'eau oxygénée.



(2)

Si il y'a apparition de bulles d'oxygène donc la souche est dite Catalase (+) le contraire est catalase (-)

Annexe 02 :

La coloration de gram :

-Préparation de frottis

Déposer une goutte d'eau physiologique stérile sur une lame bien propre ;

Prélever un échantillon de colonie et mélanger avec la goutte d'eau, strier et sécher par passage rapide sur la flamme d'un bec benzène ;

-Coloration

Déposer quelques gouttes de solution de violet de gentiane sur le frottis fixé, et laisser agir 1min puis jeter l'excès ;

Déposer quelques gouttes de lugol, laisser agir quelques secondes ;

Rincer à l'eau

Rincer immédiatement le frottis avec le mélange alcool - acétone en inclinant la lame et par goutte à goutte jusqu'à disparition complète de la coloration violette ;

Rincer à l'eau

Contre-colorer en déposant la Fushine pendant 1 minute ;

Rincer à l'eau ;

Laisser sécher à l'air ;

Déposer une goutte de l'huile à émersion ;

Observer au microscope optique ($G \times 100$), la forme, la disposition, et le Gram (Gram+ :

Couleur violette ; Gram- : couleur rose).

8 Chaoual 1438 2 juillet 2017		JOURNAL OFFICIEL DE LA REPUBLIQUE ALGERIENNE N° 39			13	
ANNEXE I						
Critères microbiologiques applicables aux denrées alimentaires						
I- Lait et produits laitiers						
Catégories des denrées alimentaires	Micro-organismes/ métabolites	Plan d'échantillonnage		Limites microbiologiques (ufc (1)/g ou ufc/ml)		
		n	c	m	M	
Lait cru	Germes aérobies à 30 °C	5	2	$3 \cdot 10^5$	$3 \cdot 10^6$	
	Staphylocoques à coagulase +	5	2	10^2	10^3	
	Coliformes thermotolérants	5	2	$5 \cdot 10^2$	$5 \cdot 10^3$	
	<i>Salmonella</i>	5	0	Absence dans 25 ml		
	Antibiotiques	1	—	Absence dans 1 ml		
	<i>Listeria monocytogenes</i>	5	0	100		
Lait pasteurisé et autres produits laitiers liquides pasteurisés	Germes aérobies à 30 °C	5	2	10^4	10^5	
	Enterobacteriaceae	5	0	10		
	<i>Salmonella</i>	5	0	Absence dans 25 ml		
Lait UHT et lait stérilisé	Germes aérobies à 30 °C	5	0	10/0.1ml		
Lait en poudre et lactosérum en poudre	Enterobacteriaceae	5	2	10	10^2	
	Staphylocoques à coagulase +	5	2	10	10^2	
	<i>Salmonella</i>	5	0	Absence dans 25 g		
Fromages au lait cru	<i>Escherichia coli</i>	5	2	10^4	10^5	
	Staphylocoques à coagulase +	5	2	10^3	10^4	
	<i>Salmonella</i>	5	0	Absence dans 25 g		
	<i>Listeria monocytogenes</i>	5	0	100		
Fromages à base de lait ayant subi un traitement thermique moins fort que la pasteurisation et fromages affinés à base de lait ou de lactosérum pasteurisés ou ayant subi un traitement thermique plus fort que la pasteurisation	<i>Escherichia coli</i>	5	2	10^2	10^3	
	Staphylocoques à coagulase +	5	2	10^2	10^3	
	<i>Salmonella</i>	5	0	Absence dans 25 g		
	<i>Listeria monocytogenes</i>	5	0	100		
Fromages à pâte molle non affinés (fromages frais) à base de lait ou de lactosérum pasteurisés ou ayant subi un traitement thermique plus fort que la pasteurisation	<i>Escherichia coli</i>	5	2	10^2	10^3	
	Staphylocoques à coagulase +	5	2	10	10^2	
	<i>Salmonella</i>	5	0	Absence dans 25 g		
	<i>Listeria monocytogenes</i>	5	0	100		
Crème au lait cru	<i>Escherichia coli</i>	5	2	10^2	10^3	
	Staphylocoques à coagulase +	5	2	10^3	10^4	
	<i>Salmonella</i>	5	0	Absence dans 25 g		
	<i>Listeria monocytogenes</i>	5	0	100		

Figure N°22 : Les normes microbiologiques selon le journal officiel selon l'arrêté interministériel du 2 juillet 2017