

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou

Faculté des Sciences Biologiques et Sciences Agronomiques

Département des Sciences Agronomiques



Mémoire

Pour l'obtention du diplôme de Master en

Agroalimentaire et Contrôle de Qualité

Thème

**Evaluation de l'effet antibactérien du lactosérum en vue de
son application dans la bioconservation des aliments**

Réalisé par :

Khouali Célia et Kloul Sadia

Soutenues le 26-06-2019 devant le jury composé de :

Président :	M^f	SADOUDI R.	M.C.	U.M.M.T.O.
Examineurs:	M^f	BENGANA M.	M.C.	U.M.M.T.O.
	M^{me}	REMANE Y.	M.A.	U.M.M.T.O.
Promotrice:	M^{lle}	LAMMI S.	M.C.	U.M.M.T.O.

Année Universitaire 2018/2019

Remerciements

Nous tenons d'abord à remercier Dieu qui nous a donné la force et la patience d'accomplir ce modeste travail.

En second lieu, nous tenons à remercier notre encadreur M^{lle} LAMMI Sarah., maitre de conférences à l'UMMTO, pour ces conseils judicieux, son jugement critique et son appui tout au long de cette étude. Votre sérieux, votre compétence et votre sens du devoir nous ont énormément marqués.

Nous remercions vivement les membres de ce jury :

Monsieur SADOUDI Rabah, maitre de conférences à l'UMMTO, nous sommes très honorés que vous ayez accepté la présidence du jury de ce mémoire, merci pour l'effort et le temps consacré à évaluer notre travail.

Monsieur BENGANA Mohamed, maitre de conférences à l'UMMTO, merci d'avoir accepté de faire partie du jury, et pour le temps consacré à évaluer notre travail.

Madame REMANE Yakout, maitre assistante à l'UMMTO, merci d'avoir accepté de faire partie du jury de ce mémoire, et pour l'intérêt que vous portez à notre travail.

Ainsi, nous tenons à remercier profondément le gérant du laboratoire de contrôle de qualité OVO LAB qui nous a aidé à accomplir ce travail.

Nous remercions également tous ceux qui ont contribué de loin ou de près à la réalisation de ce travail.

Merci à nos familles qui nous ont soutenues et aidées à accomplir ce travail.

Merci.

Dédicaces

Célia

Je dédie cet événement marquant de ma vie

A ma très chère mère

Quoi que je fasse ou que je dise, je ne serai point te remercier comme il se doit. Ton affection me couvre, ta bienveillance me guide et ta présence à mes cotés a toujours été ma source de force pour affronter les différents obstacles.

A mon très cher père

Aucune dédicace ne peut exprimer ma gratitude et ma considération pour les sacrifices que vous avez consentis pour mon instruction et mon bien être.

A mes chers frères, Mouloud et Noureddine

Puisse dieu vous donne santé, bonheur, réussite et vous gardes à mes cotés.

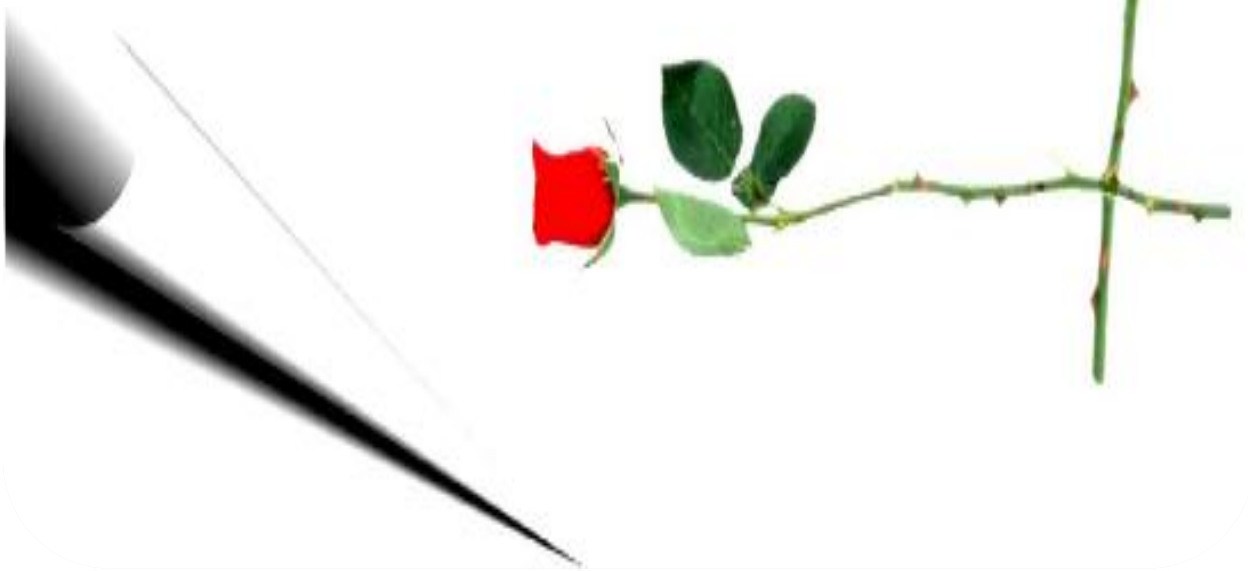
Je vous aime tellement

A mes amis

Qui m'ont toujours encouragé, et à qui je souhaite beaucoup de succès.

A mon binôme Tina

Pour son soutien moral, sa patience et sa compréhension tout au long de ce projet.



Dédicaces

Tina

Je dédie cet événement marquant de ma vie

A ma très chère mère

Quoi que je fasse ou que je dise, je ne serai point te remercier comme il se doit. Ton affection me couvre, ta bienveillance me guide et ta présence à mes cotés a toujours été ma source de force pour affronter les différents obstacles.

A mon très cher père

Tu as toujours été à mes cotés pour me soutenir et m'encourager.

Que ce travail traduit ma gratitude et mon affection.

A mes frères, Yanis et Lamine, à ma sœur unique Lyli

Puisse dieu vous donne santé, bonheur, réussite et vous gardes à mes cotés.

Je vous aime tellement

A Amar

Qui a partagé avec moi tous les moments d'émotions lors de la réalisation de ce travail, il m'a chaleureusement supporté et encouragé tout au long de mon parcours.

A mes amis

Qui m'ont toujours encouragé, et à qui je souhaite beaucoup de succès.

A mon binôme Célia

Pour son soutien moral, sa patience et sa compréhension tout au long de ce projet.





Sommaire

SOMMAIRE

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

INTRODUCTION 1

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Lactosérum	2
1.1. Définition	2
1.2. Source industrielle	2
1.2.1. La fromagerie	2
1.2.2. La beurrerie	2
1.3. Production industrielle	2
1.4. Types de lactosérum	4
1.4.1. Lactosérum acide.....	4
1.4.2. Lactosérum doux	4
1.5. Composition	5
1.5.1. Lactose	6
1.5.2. Protéines	6
1.5.3. Minéraux	6
1.5.4. Vitamines	6
1.5.5. Acide lactique	7
a. Définition	7
b. Production.....	7
c. Utilisation	8
1.6. Production	9
1.6.1. Production dans le monde	9
1.6.2. Production en Algérie.....	9
1.7. Rejet du lactosérum	9
1.8. Valorisation	10
1.8.1. Domaine biotechnologique	10
1.8.2. Domaine médical	11
1.8.3. Domaine énergétique	12

1.8.4. Emballage	12
1.8.5. Domaine alimentaire	13
2. Altération des aliments	14
2.1. Généralités	14
2.2. Types d'altération des aliments	14
2.2.1. Altération physique	14
2.2.2. Altération chimique	15
2.2.3. Altération microbienne	15
2.2.3.1. Origine de la flore microbienne des aliments	16
2.2.3.2. Microorganismes de contamination	16
a. Contamination par les manipulateurs	16
b. Contamination par l'environnement.....	17
c. Contaminants industriels	17
3. Principales bactéries d'altération	18
3.1. <i>Escherichia coli</i>	18
3.1.1. Généralités	18
3.1.2. Habitat	18
3.1.3. Résistance aux antibiotiques	19
3.1.4. Transmission de la bactérie	19
3.1.5. Conséquences sur le consommateur	20
3.2. <i>Staphylococcus aureus</i>	20
3.2.1. Généralités	20
3.2.2. Habitat	21
3.2.3. Résistance aux antibiotiques	21
3.2.4. Transmission de la bactérie	22
3.2.5. Conséquences sur le consommateur.....	23

PARTIE EXPERIMENTALE

Matériel et méthodes

Objectif du travail	24
Présentation de l'unité d'accueil	24
1. Matériel	24
1.1. Source du lactosérum	24
1.2. Matériel biologique	25
1.3. Matériel inerte	25
2. Démarche expérimentale	25
2.1. Prélèvement	25
2.2. Analyses physicochimiques du lactosérum.....	25
a. pH	27
b. Acidité Dornic	27
c. Teneur en matière grasse selon la méthode de GERBER	28
d. Extrait sec total	28
e. Densité	29
2.3. Analyses microbiologiques du lactosérum.....	29
2.4. Evaluation de l'effet antibactérien du lactosérum.....	30
2.4.1. Préparation des pré-cultures bactériennes	31
2.4.2. Antibiogramme	33

Résultats et discussion

1. Analyses physicochimiques du lactosérum.....	35
1.1.pH et acidité Dornic	36
1.2. Extrait sec total	36
1.3. Teneur en matière grasse	36
1.4.Densité	37
2. Analyses microbiologiques	37
3. Suivi de l'évolution du pH et de l'acidité Dornic des échantillons utilisés pour l'antibiogramme	38
4. Evaluation de l'effet antibactérien du lactosérum.....	39
4.1. Résultats des témoins	39
4.2. Effet antibactérien des agents testés	42
4.2.1. Effet du lactosérum sur <i>E. coli</i>	42
4.2.2. Effet du lactosérum sur <i>S. aureus</i>	43
Conclusion et perspectives	47

Références bibliographiques

Annexes

Résumé

Abstract

LISTE DES ABREVIATIONS

°C : degré Celsius.

°D : degré Dornic.

µl : microlitre.

AFNOR : Association Française de Normalisation.

ATCC : *American Type Culture Collection*.

A_w : *Activity of Water* (activité de l'eau).

Ca : calcium.

CO₂ : dioxyde de carbone.

E. coli : *Escherichia coli*

ECC : milieu chromogène sélectif pour le dénombrement de *E. coli* et coliformes.

EST : extrait sec total.

FAO : *Food and Agriculture Organisation* (organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture).

g/l : gramme par litre.

h : heure.

Kg : kilogramme.

Kt : kilotonne.

L : litre.

mg : milligramme.

MG : matière grasse.

MH : Mueller Hinton.

ml : millilitre.

mm : millimètre.

Mt/ an : million de tonnes par an.

OECD : organisation de coopération et de développement économique.

OGA : agar glucose à l'oxytétracycline.

ONU : Organisation des Nations Unies.

P : phosphore.

pH : potentiel d'hydrogène.

PLP : protéine liant la pénicilline.

PPM : Partie Par Million (1 ppm = 1mg/kg ; 1 ppmv = 1µl/L).

S. aureus : *Staphylococcus aureus*.

SARM : *Staphylococcus Aureus* Résistant à la Méricilline.

UE : Union Européenne.

VRBL : milieu lactosé bilié au cristal violet et au rouge neutre.

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Différents types de lactosérum.....	5
Tableau 2 : Composition moyenne des différents types de lactosérum.....	5
Tableau 3 : Teneur en vitamines du lactosérum.	6
Tableau 4 : Activité biologique des protéines et des peptides du lactosérum.....	11
Tableau 5 : Analyses microbiologiques du lactosérum.	30
Tableau 6 : Résultats d'analyses physicochimiques.	35
Tableau 7 : Résultats d'analyses microbiologiques.	37
Tableau 8 : Suivi du pH et acidité du lactosérum.	38
Tableau 9 : Diamètre des zones d'inhibition en fonction de la concentration en lactosérums utilisés sur les deux souches bactériennes.	44

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Voies technologiques permettant l'obtention des principaux types de lactosérums issus de la première transformation du lait.....	3
Figure 2 : Les deux structures isomères d'acide lactique L(+), D(-).	7
Figure 3 : Schéma technologique d'obtention du lactosérum issu de la fabrication du fromage à pâte pressée au niveau de la fromagerie Pâturage d'Algérie, Tizi-Ouzou	26
Figure 4 : Schéma montrant les principales étapes entreprises pour l'évaluation de l'effet antibactérien du lactosérum.....	31
Figure 5 : Schéma descriptif de la préparation de la suspension bactérienne.	32
Figure 6 : Schéma illustratif de l'antibiogramme.	35
Figure 7 : Effet des témoins sur <i>E. coli</i>	40
Figure 8 : Effet des témoins sur <i>S. aureus</i>	40
Figure 9 : Photo montrant l'activité antibactérienne du lactosérum conservé à 6°C pendant 24h contre <i>E. coli</i>	42
Figure 10 : Photo montrant l'activité antibactérienne du lactosérum conservé à température ambiante pendant 24h contre <i>E. coli</i>	42
Figure 11 : Photo montrant l'activité antibactérienne du lactosérum conservé à 6°C pendant 24h contre <i>S. aureus</i>	43
Figure 12 : Photo montrant l'activité antibactérienne du lactosérum conservé à température ambiante pendant 24h contre <i>S. aureus</i>	43



Introduction

Introduction

Le lactosérum, sous-produit liquide issu de la production du fromage et de la caséine, est l'une des plus grandes sources de protéines alimentaires et de lactose, qui est encore peu exploitée en alimentation humaine (Anonyme 1, 1995).

La production annuelle du lactosérum dans le monde est estimée à 165 million de tonnes (Macwan *et al.*, 2016), en Algérie, elle est estimée à 14 millions de litres de 2013 à 2017 (FAO-ONU, 2017). Bien que le développement de nouvelles approches pour l'utilisation du lactosérum ait été apporté, environ la moitié du lactosérum produit est rejetée, ce qui constitue non seulement une perte importante de source protéique, mais également un problème de pollution pour l'environnement. En effet, le lactosérum présente une forte demande biochimique en oxygène (DBO) de 30000-50000 ppm (Marwaha et Kennedy, 1988 ; Tango et Ghaly, 1999). La tendance actuelle suscite un intérêt de plus en plus croissant au lactosérum considéré autrefois comme « déchet ». Le développement de nouvelles technologies pour la valorisation du lactosérum est nécessaire, surtout que les quantités produites ne cessent d'augmenter.

L'acide lactique, un des composants du lactosérum, est un acide organique utilisé dans l'industrie alimentaire à des fins de conservation. Bien qu'il soit présent en grandes quantités dans le lactosérum, vu qu'il est produit par les bactéries lactiques dans le lait fermenté, actuellement, une grande part de celui-ci est produite par des procédés chimiques, malgré que son utilisation dans les produits alimentaires n'est pas sans risque en raison d'éventuelles pathologies qu'il peut provoquer chez les consommateurs à long terme, telles que le cancer (Gouget, 2011). De plus, de nos jours, le consommateur est de plus en plus soucieux pour sa santé et exigeant en terme d'alimentation « bio ». Dans cette optique, l'activité antimicrobienne de l'acide lactique a fait l'objet de plusieurs recherches, où elle a montré son efficacité sur une vaste gamme de souches microbiennes pathogènes ou de détérioration de produits alimentaires (Eklund, 1989 ; Schnürer et Magnusson, 2005 ; Chenjie *et al.*, 2015).

Le but du présent travail consiste d'une part, à évaluer l'activité antibactérienne du lactosérum envers deux souches bactériennes pathogènes impliquées également dans l'altération des denrées alimentaires, en vue d'une éventuelle substitution de conservateurs chimiques et une bioconservation des aliments, d'une autre part, réduire le taux du lactosérum dans l'environnement ainsi que son impact polluant.

Partie
Bibliographique



1. Lactosérum

1.1. Définition

Appelé autrefois petit lait, le lactosérum est un coproduit de l'industrie fromagère et de la préparation des caséinates (Jouan, 2002). C'est un produit découvert il y a plus de 3000 ans avant Jésus-Christ, par des Bédouins lors du transport de lait.

Le terme lactosérum se rapporte au liquide translucide et jaune verdâtre qui se sépare du caillé (Heslot, 1996), après séparation des caséines par coagulation acide ou par processus enzymatique au moyen de la présure ou de la chymosine (Jouan, 2002).

L'acidification et la coagulation par la chaleur provoquent la formation d'une phase liquide au-dessus d'un caillé de lait (De Witt, 2001). Le lactosérum représente 90 % du volume original de lait utilisé en fromagerie et en est le principal sous-produit (Moletta, 2002).

Le lactosérum contient environ 50 % des nutriments du lait de départ : protéines solubles, lactose, vitamines et minéraux (Anonyme 1, 1995).

1.2. Sources industrielles

1.2.1. La fromagerie

C'est l'ensemble des procédés qui conduisent à la fabrication des fromages à partir du lait, ce dernier subit les processus de coagulation et de synérèse, aboutissant à une phase solide le « fromage » et une phase liquide « le lactosérum » (Laplanche, 2004).

1.2.2. La beurrerie

C'est l'ensemble des procédés qui conduisent à la fabrication du beurre à partir du lait. Après écrémage de ce dernier, suivi d'une extraction de la caséine par précipitation, on obtient du « lactosérum écrémé » (Laplanche, 2004).

1.3. Production industrielle

Le lactosérum est obtenu suite à la coagulation des caséines sous l'action de la présure (lactosérum doux), ou suite à l'acidification du lait (lactosérum acide) (Morr, 1989).

Traditionnellement, l'opération qui suit l'étape de coagulation consiste à séparer la

phase coagulée du reste du lait au cours d'une opération d'égouttage. La fraction liquide ainsi recueillie s'appelle le lactosérum. Le pH de ce dernier est compris entre 5 et 6,5.

Selon le procédé d'obtention, différents types de lactosérums peuvent ainsi être obtenus comme illustré sur la figure 1.

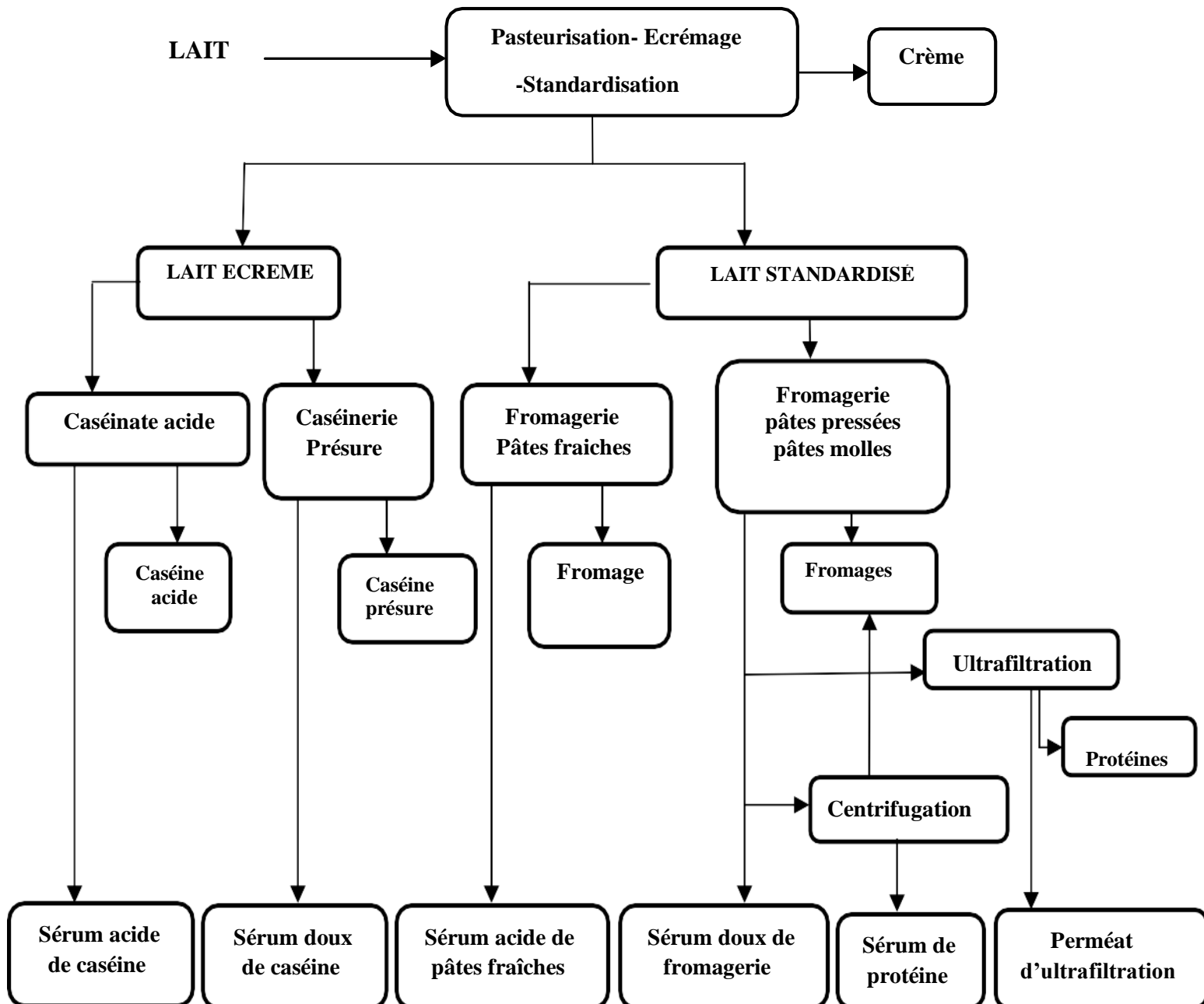


Figure 1 : Voies technologiques permettant l'obtention des principaux types de lactosérums issus de la première transformation du lait (Alais, 1984)

1.4.Types de lactosérum

Selon son degré d'acidité on peut distinguer 2 types de lactosérum : le lactosérum acide et le lactosérum doux (tableau 1).

1.4.1. Lactosérum acide

Il est 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 lactosérum une part importante d'éléments minéraux, notamment le calcium et le phosphore (Sottiez, 1990).

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

Le lactosérum acide provient de la fabrication des pâtes fraîches et des pâtes molles, son pH varie entre 3,8 et 4,6 (Moletta, 2002).

1.4.2. Lactosérum doux

Le lactosérum doux est obtenu après la coagulation de la caséine sous l'action de la présure sans acidification préalable, on obtient alors un lactosérum 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 (Sottiez, 1990).

Lorsque le lactosérum issu de la 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. Les lactosérums doux sont généralement déshydratés (Morr, 1989 et Moletta,2002).

Tableau 01 : Différents types de lactosérum(Adrian et *al.*, 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	- Fromagerie à pâte fraîche - Fromagerie à pâte molle - Caséinerie acide

1.5.Composition

La composition moyenne des différents types de lactosérum est résumée dans le tableau 2 :

Tableau 2 :Composition moyenne des différents types de lactosérum(Sottiez, 1990)

	Lactosérum doux		Lactosérum acide		
	Pâte pressée cuite (Emmental)	Pâte pressée non cuite (Edam)	Pâte fraîche	Caséine	Camembert
Teneur en eau(%)	93,50	95,00	94,00	94,00	93,50
Extrait sec en %	6,50	5,00	6,00	6,00	6,50
pH	6,70	6,50	6,00	4,60	6,10
Composition (g/l)					
Lactose	76,00	75,00	65,50	74,00	75,00
Protéines	13,50	13,50	12,00	12,00	12,00
Cendres	8,00	8,00	9,00	12,00	8,25
Acide Lactique	1,80	2,80	10,00	1,80	2,20
Matière Grasse	1,00	1,00	0,50	0,50	1,00
minéraux(%)					
Ca	0,60	0,65	1,90	1,80	0,70
P	0,60	0,65	1,50	1,50	0,70
Chlorure	2,50	2,50	2,50	7,50	2,50

1.5.1. Lactose

Le lactose est le principal constituant de l'extrait sec du lactosérum. En outre, le lactosérum doux est plus riche en lactose par rapport au lactosérum acide. En effet, dans ce dernier, une partie du lactose a été transformée en acide lactique (Sottiez, 1990).

1.5.2. Protéines

Deux grandes familles de protéines entrent dans la composition du lactosérum à savoir, les caséines et les protéines solubles constituées essentiellement de β - lactoglobuline (β - LG), α -lactalbumine (α -LA), l'albumine sérique bovine (BSA), les immunoglobulines (Ig) et les protéoses peptones (De Wit et Hontelez-Backx , 1981).

1.5.3. Minéraux

Les matières salines de l'extrait sec du lactosérum sont constituées de plus de 50 % de chlorures de sodium et de potassium et pour le reste de différents sels de calcium se retrouvent principalement sous forme de phosphate de calcium. En outre, selon certaines pratiques fromagères, il y'a ajout de sel de calcium (CaCl_2) (Vrignaud, 1983).

1.5.4. Les vitamines

Les vitamines du lactosérum sont hydrosolubles, comme indiqué dans le tableau 3, il contient des quantités importantes de riboflavine (B_2) qui donne la couleur jaune verdâtre du lactosérum, d'acide pantothénique (B_5), thiamine (B_1), de pyridoxine (B_6) et l'acide ascorbique (C) (Woo,2002).

Tableau 3: Teneuren vitamines du lactosérum(Vrignaud, 1983)

Vitamines	Concentration (mg/100g)
- Thiamine	4
- Riboflavine	43
- Acidenicotinique	0,85
- Acidepantothénique	45
- Pyridoxine	5,3
- Cobalamine	0,159
- Acideascorbique	2,2

1.5.5. Acide lactique

a. Définition

L'acide lactique est l'un des acides organiques les plus importants, produit par des bactéries lactiques, découvert par Scheel en 1780 dans le lait fermenté. Il est également un acide organique hydrosoluble, aliphatique et fortement hygroscopique et un produit chimique polyvalent, ayant un large champ d'applications (Reddy *et al.*, 2008).

L'acide lactique existe en deux stéréo-isomères optiquement actifs (Figure 2), le L(+) et D(-). Puisque les niveaux élevés de l'acide lactique D(-) sont nocifs aux humains, l'acide lactique L(+) est l'isomère préféré dans les industries alimentaires et pharmaceutiques (Zhang *et al.*, 2008).

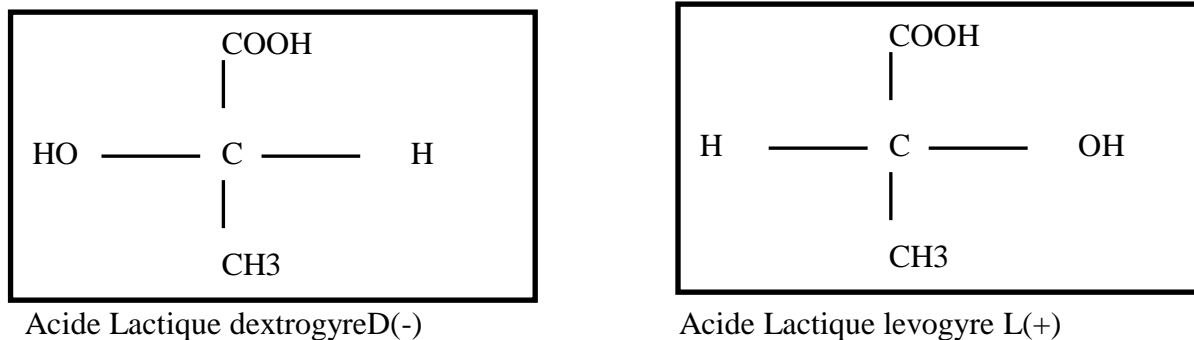


Figure 2 : Les deux structures isomères d'acide lactique L(+), D(-) (Reddy *et al.*, 2008)

b. Production

Environ 50% de la production mondiale de l'acide lactique provient des procédés de fermentation, la seconde moitié est assurée par des synthèses chimiques (Vicroy, 1985).

On entend par fermentation lactique la transformation de certains sucres tels que: sucre de lait (lactose), glucose, sucre de canne en un acide liquide et soluble dans l'eau, qui est l'acide lactique (Spinnler, 1998 ; Toumi, 2009).

La fermentation lactique concerne une part importante des produits alimentaires. On peut citer pour les produits animaux : les laits fermentés, les fromages et pour les produits végétaux : le vin, le pain au levain, la choucroute, les olives, etc. Cette fermentation met en jeu des bactéries lactiques qui sont de plus en plus souvent sélectionnées, produites par des industries spécialisées (Spinnler, 1998 ; Toumi, 2009).

La synthèse chimique est le résultat d'un acide lactique racémique D-L, tandis que la fermentation nous donne les formes stéréospécifiques L(+) et D(-) et un mélange D-L (Lin et Wang, 2007). L'avantage significatif que présente la production biologique par

rapport à la synthèse chimique réside dans l'utilisation des matières premières à bon marché telles que : petit lait, mélasse, betterave, amidon, sucre de canne et d'autres matériaux riches en hydrates de carbone (Reddy *et al.*, 2008).

Le marché mondial de l'acide lactique est en croissance chaque année, le niveau de production est aux alentours de 0,35 Mt/an (Wasewar *et al.*, 2004).

L'accroissement mondial de la production est pronostiqué par certains observateurs aux alentours de 12 à 15 % par an (Von Freiling et Schugerl, 1999).

c. Utilisations

En 1982, la production mondiale en acide lactique atteignait 24 à 28 Kt. Plus de la moitié de cette production était utilisée dans l'industrie agroalimentaire (comme acidifiant et conservateur). Presque un cinquième était utilisé pour produire le stearoyl-2-lactylate de calcium ou de sodium (levures), le reste était utilisé dans l'industrie pharmaceutique (coagulant de sang...) ou bien dans des applications techniques (plastiques biodégradables) (Lipinsky et Sinclair, 1986 ; Von Freiling et Schugerl, 1999).

Litchfield (1996) a résumé des applications alimentaires typiques pour l'acide lactique et leurs sels. Le marché de la consommation d'acide lactique est dominé par le secteur alimentaire et boissons depuis 1982. Plus de 50% d'acide lactique produit est employé comme un agent émulsionnant dans des produits de boulangerie. Il est utilisé comme agent acidulant ou inhibiteur de la détérioration bactérienne dans une large variété d'aliments traités tels que : sucre, pain, et produits de boulangerie, boissons non alcooliques, bière, mayonnaise, les œufs traités, produits laitiers, confitures, ainsi que d'autres acidulants. L'acide lactique ou ses sels sont utilisés dans la désinfection et emballage des carcasses, en particulier ceux de volaille et poissons. Les esters de calcium et les sels de sodium de lactate avec une longue chaîne des acides gras ont été développés en tant qu'excellents émulsifiants dans les produits de boulangerie (Datta *et al.*, 1995 ; Naveena *et al.*, 2004; Toumi, 2009).

Il possède aussi des applications non alimentaires particulièrement pour la fabrication de colorants, l'amélioration de la qualité des textiles ainsi que la synthèse d'insecticides. Il est largement utilisé aussi dans la production de produits cosmétiques comme une alternative à l'acide glycolique (Achour, 1994).

1.6. Production

1.6.1. Production dans le monde

La production annuelle du lactosérum dans le monde est estimée à 165 Mt (Macwanet *al.*, 2016). En 2009, selon la FAO, la production mondiale de lactosérum en poudre s'est élevée à plus de 100 Mt, les principaux fabricants sont l'UE et les États-Unis, avec respectivement 50 % et 20 % des fabrications mondiales de lactosérum. Ces deux entités sont aussi les principaux fournisseurs du marché mondial et représentent à elles seules, près de 75 % des volumes échangés en 2010. La demande internationale se situe principalement en Asie, tirée par la Chine, premier importateur mondial représentant 27 % des volumes échangés. Les autres principaux pays importateurs sont l'Indonésie (7 %), la Malaisie (6 %), le Japon (5 %) et la Russie (5 %). Entre 2000 et 2010, les importations de ces pays ont fortement augmenté, sauf sur le marché mature du Japon.

1.6.2. Production en Algérie

Depuis 2013, la production algérienne de fromage est estimée à 1540 tonnes, ce qui se traduit par une production d'environ 14 million de litre de lactosérum (FAO-ONU, 2017). Ces quantités massives font de la gestion du lactosérum un enjeu à la fois économique et écologique. Économique puisque la gestion de chaque kilogramme de produit (le terme produit inclut produits finis, coproduits et sous-produits) représente un coût pour le transformateur industriel et écologique puisque le lactosérum, s'il n'est pas géré correctement, représente un polluant majeur (Smithers, 2008).

1.7. Rejet du lactosérum

Selon la OECD-FAO (2011), la production mondiale de fromage a été estimée à 19670 kilo tonnes (Kt) en 2010, ce qui a engendré environ 177 028 Kt de lactosérum en tant que sous-produit. Le taux de croissance annuel est estimé à 1,64%, entraînant environ 211500 Kt de lactosérum en 2020. En moyenne, 9 L de lactosérum sont obtenus lors de la production à partir d'un kilogramme de fromage (Kosikowski, 1979 ; Panesar et Kennedy, 2012) et pour chaque 100 kg de lait utilisé pour faire du yogourt grec, seulement 33 kg sont utilisés dans le produit final. Les deux tiers restants constituent le lactosérum acide.

En raison de sa faible teneur en constituants du lait (environ 6-7% du résidu sec). Le lactosérum est considéré comme un rejet. Il présente une forte demande biochimique

en oxygène (DBO) et une forte demande chimique en oxygène (DCO) (environ 50 g/L et 80 g/L respectivement) (Marwaha et Kennedy, 1988).

Le perméat du lactosérum représente aussi un problème environnemental majeur puisqu'il retient la partie majeure du lactose et 70% du solide total de lactosérum. D'après Sienkiewicz *et al.*, (1992), le rejet de 100 tonnes de lactosérum correspondrait à une charge organique équivalente à celle rejetée par une ville comptant 55000 habitants.

Une fois libéré dans l'eau, par exemple, les rivières, les canaux d'irrigation, ou sur la terre, le lactosérum conduit à des problèmes environnementaux. En effet, il met en danger la structure physique et chimique du sol, diminue le rendement des cultures (Auliffe *et al.*, 1982) et réduit la vie aquatique par l'épuisement de l'oxygène dissous (Yang *et al.*, 1980).

1.8. Valorisation

Autrefois sous-produit valorisé uniquement sous forme liquide en alimentation animale (porcherie), le lactosérum est devenu un ingrédient laitier à part entière, toujours utilisé en alimentation animale (aliments pour veaux, bovins, porcins, volailles) mais aussi en alimentation humaine (poudre infantile, chocolaterie, plats préparés...). Ainsi, en Europe, près de 70 % du lactosérum disponible est encore utilisé en alimentation animale et 20 % pour la fabrication de lait infantile (Anonyme 2, 2013).

1.8.1. Domaine biotechnologique

Le lactosérum par sa composition biochimique en particulier le lactose, est principalement utilisé comme source de carbone et d'énergie pour les milieux de fermentation par plusieurs microorganismes assimilant le lactose. Il s'agit des levures de boulangerie telles que *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida kefyr* et *Kluyveromyces fragilis*, cette dernière est cultivée sur le lactosérum doux déprotéiné et enrichi par des facteurs de croissance dont le but est de produire de la biomasse (Gana et Touzi, 2001). Le lactose est un disaccharide formé par le galactose et le glucose, sa conversion en éthanol (bioénergie) ne peut être effectuée que par certaines levures appartenant aux genres *Saccharomyces* et *Kluyveromyces* ou des bactéries du genre *Zymomonas mobilis* qui sont capables de fermenter directement le lactose en éthanol (Tebbouche, 2012). Le lactosérum peut aussi être utilisé comme milieu de culture pour les moisissures. *Penicillium camembertii* permet la production des protéases acides, neutres et alcalines.

Ce sous-produit a été utilisé aussi comme milieu de base pour la production de la cellulase par la moisissure *Aspergillus niger*, mais déprotéiné (Leghlimi, 2004). Certaines espèces bactériennes comme *Lactobacillus bulgaricus* fermentent sur des milieux de cultures à base de lactosérum pour la production d'acides organiques et de différentes enzymes, comme de l'alpha-amylase par la moisissure *Rhizopusoryzae* (Ait Kaki, 2004).

1.8.2. 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 4 comportant les protéines du lactosérum et leurs rôles (Berry, 2000).

Tableau 4 : Activité biologique des protéines et des peptides du lactosérum (McIntoch, 1998 ; Berry, 2000)

Protéine	Activité probable
Protéine du lactosérum brut	Anti-cancérogène Stimuler le système immunitaire Prolonger la durée de vie Réduire le cholestérol
<i>Betalactoglobuline</i> <i>Betalactorphine</i> <i>Alpha lactalbumine</i> <i>Alphalactorphine</i>	Faciliter la digestion Augmenter le contrôle de la douleur Anti-cancérogène Augmenter le contrôle de la douleur
Lactoferrine	Antimicrobienne (antivirale/antibactérienne) Contrôler le transport du fer Stimuler le système immunitaire Anti-inflammatoire Favoriser la croissance cellulaire Anti-cancérogène Antimicrobienne
Immunoglobuline	Immunité passive
Lactoperoxydase	Antibactérienne
Sérum-albumine sérorphine	Augmenter le contrôle de la douleur
Glucomacropéptide	Contrôler la digestion

1.8.3. Domaine énergétique

La valorisation énergétique s'inscrit bien dans le cadre de la politique énergétique et de la lutte contre l'effet de serre. Deux filières sont envisageables : la production de biogaz et la production de bioéthanol (Fruteau de Laclos et Membrez, 2004).

L'analyse des consommations énergétiques d'une fromagerie suisse de taille moyenne a montré que la production de chaleur représentait la meilleure voie de valorisation du biogaz. En intégrant un stockage qui optimise de l'énergie, le biogaz produit à partir du petit-lait permet de substituer les 2/3 du mazout total consommé chaque année par la fromagerie.

La filière bioéthanol-carburant peut apporter une contribution significative à la réduction des émissions de CO₂ dues aux transports. Cette production, a pour objectif de remplacer la totalité de l'essence consommée par un mélange composé d'essence et de bioéthanol qui utilisera plusieurs matières premières : céréales, pommes de terre, mélasse de betteraves et petit-lait(Fruteau de Laclos et Membrez, 2004).

1.8.4. Emballage

Les recherches effectuées pendant plusieurs années ont permis de comprendre l'intérêt du lactosérum dans le développement d'emballages biodégradables. Ainsi, il a été démontré qu'une couche à base de protéine de lactosérum peut améliorer les propriétés de barrière à l'oxygène de la matière plastique d'un film compostable commercial, sans gêner sa biodégradabilité et sans affecter la qualité du compost (Cinelliet *al.*, 2014).

Le revêtement à base de protéines de lactosérum était appliqué sur un film commercial biodégradable certifié conforme aux exigences de la norme EN13432. Les propriétés de barrière à l'Oxygène ont été considérablement améliorées par la présence de la couche de protéines de lactosérum. Ce résultat est particulièrement important car les emballages biodégradables manquent généralement de propriétés de barrière et l'utilisation de matériaux non dégradables pour améliorer la barrière aux gaz et à la vapeur d'eau compromet le compostage de l'emballage final(Cinelliet *al.*, 2014).

1.8.5. Domaine alimentaire

La poudre de lactosérum (en particulier le lactose) est surtout utilisée en alimentation animale, dans les laits infantiles, pour les fromages fondus, ajoutée aussi comme additif dans la préparation du bœuf, des volailles, des saucisses, des ragouts et des soupes.

Le lactosérum est aussi utilisé pour remplacer partiellement le lait dans la chocolaterie et la biscuiterie industrielle. La matière grasse du lactosérum (la crème de sérum) peut être utilisée pour la fabrication de fromage à pâte fondue ou de beurre de second choix (Luquet et Boudier, 1990).

De plus, il constitue un ingrédient alimentaire à valeur ajoutée, utilisé pour enrichir les aliments ou les régimes pauvres en protéines ou encore utilisé dans une vaste gamme d'aliments et de boissons (Lowisfert, 1994 ; Dryer, 2001).

En pathologie, il est utilisé pour l'alimentation des diabétiques, des malades diabétiques ou des sujets souffrant de mal nutrition, et en alimentation de soutien, pour les sportifs, les personnes âgées (Dryer, 2001).

2. Altération des aliments

2.1. Généralités

Tous les produits alimentaires sont composés de matières premières biologiques. Les produits biologiques gâtés par nature, se détériorent au fil du temps. Cette détérioration et dégradation ne peuvent pas être complètement arrêtées, cependant, il est le désir des transformateurs d'aliments pour ralentir ce rythme de détérioration, autant que possible par la formulation, le traitement, le conditionnement, le stockage et la manutention. Pour traiter correctement ce problème de détérioration, il est d'abord important de comprendre ce que l'on entend par la détérioration des aliments et par quels différents modes peut-il avoir lieu (Singh et Anderson, 2004).

La détérioration des aliments peut être définie de plusieurs façons différentes. En général, un aliment est considéré comme altéré quand il n'est plus acceptable pour le consommateur. Le pire des cas de détérioration est quand il devient un problème de sécurité alimentaire, où le produit alimentaire peut causer la maladie des consommateurs ou même la mort. Cependant, les cas moins graves de la détérioration des aliments peuvent être simplement de la couleur, la saveur, la texture ou l'arôme de l'aliment est détériorée au point qu'il ne soit plus acceptable. Un autre cas de détérioration pourrait être des les éléments nutritifs (par exemple, la teneur en vitamine) où les aliments se sont détériorés au point que le produit alimentaire ne répond plus à sa valeur nutritive déclarée. Le temps qu'il faut pour un produit alimentaire pour atteindre une de ces conditions d'altération est généralement appelée durée de vie du produit (Singh et Anderson, 2004).

2.2. Types d'altération des aliments

Selon Singh et Anderson, (2004) les trois principaux types d'altération des aliments qui peuvent se produire sont : l'altération physique, l'altération chimique et l'altération microbiologique. Il y a des chevauchements entre ces trois altérations, et souvent un type d'altération peut promouvoir un autre.

2.2.1. Altération physique

Le premier type de détérioration qui peut se produire est dû à des changements physiques ou instabilité (Piazza et Masi, 1995 ; Kilcast et Subramaniam, 2000 ; Labuza et Szybist, 2001). Cela peut inclure des dommages suivants :

- Transfert d'humidité, et changement de l' a_w qui conduit à d'autres problèmes tels

que la dégradation microbienne ou chimique,

- La température accélère la maturation et la sénescence de la plupart des cultures, modifie la mobilité des produits alimentaires et provoque la croissance cristalline (cristaux de glaces dans les aliments congelés),
- Déstabilisation de l'émulsion peut se produire si elle est mal formée, par vibration extrême, par congélation partielle ou à des températures extrêmement élevées,
- Des blessures, changement de couleur, rupture de produits secs etc.

2.2.2. Altération chimique

La détérioration des aliments peut également se produire suite à des réactions de dégradation des composants chimiques de la nourriture, y compris ses protéines, lipides et glucides (Hug-Itenet *al.*, 1999 ; Bell et White, 2000 ; Hayes et Nielsen, 2000 ; Lievonen*etal.*, 2002). Parmi les détériorations chimiques auxquelles est exposé un aliment :

- La dégradation des protéines peut entraîner des réactions avec d'autres ingrédients,
- Le brunissement enzymatique cause l'oxydation et le rancissement de l'aliment,
- Le brunissement non enzymatique qui provoque un changement de couleur, texture et perte de la valeur nutritive,
- Oxydation des lipides, gélatinisation de l'amidon etc.

2.2.3. Altération microbienne

L'action des micro-organismes est un moyen courant de la détérioration des aliments et la cause la plus fréquente de maladies d'origine alimentaire. La détérioration microbienne est une préoccupation majeure pour les aliments périssables tels que les fruits et légumes frais, les viandes, la volaille, le poisson, les produits de boulangerie, le lait et les jus (Banwart, 1989; Cousin, 1996; Robinson *et al.*, 2000; Jay, 2000).

Les micro-organismes d'altération alimentaire potentiels comprennent les bactéries, les champignons (levures et moisissures), les virus et les parasites. La croissance de la plupart des microorganismes peut être évitée ou ralentie en ajustant la charge microbienne initiale, en réglant la température de stockage, réduisant l'activité de l'eau, abaissant le pH, utilisant des agents de conservation et un emballage approprié.

Certains micro-organismes causent simplement la détérioration des aliments, tandis que d'autres peuvent causer des maladies ou même la mort. Cependant, pas toute

croissance microbienne est indésirable ; des micro-organismes sont utilisés et souhaités dans la production de nombreux produits alimentaires fermentés comme le fromage, la bière, le vin, la sauce de soja, et de la choucroute.

2.2.3.1. Origine de la flore microbienne des aliments

Les microorganismes sont présents dans les écosystèmes naturels comme l'air, le sol et l'eau. Ils sont également présents sur l'homme lui-même et sur tous les êtres vivants animaux et végétaux. De ce fait, tous les produits alimentaires transformés ou non peuvent être contaminés par des microorganismes. De plus, un apport microbien exogène est souvent inévitable (environnement, contact, manipulations, etc.) (Guiraud et Galzy, 1998).

La contamination des denrées alimentaires peut avoir un effet plus ou moins grave sur la qualité du produit et sur la santé du consommateur. Elle peut être à l'origine d'une altération du produit, lui faisant perdre ses caractéristiques organoleptiques et ou commerciales et parfois la cause d'intoxications ou toxi-infections graves.

Les animaux et les produits dérivés possèdent différentes types de flores commensales, les plus importantes sont :

- La flore de surface (microcoques, *listéria*, bactéries sporulés aérobies, etc....),
- La flore intestinale (entérocoques, bactérie sporulées anaérobies, etc....),
- La flore issue des plantes et dérivés,

Les végétaux ont une flore microbienne riche en levures et moisissures.

2.2.3.2. Microorganismes de contamination

Selon Guiraud et Galzy (1998), les microorganismes de contamination peuvent être apportés par les manipulateurs, l'environnement ou d'une origine industrielle :

a. Contamination par les manipulateurs

Les flores commensales et pathogènes de l'homme sont proches de celles des animaux. La contamination peut provenir aussi bien de personnes saines que malades ou guéries. Les contaminations par manipulation sont :

- Des contaminations de contact, essentiellement par les mains, dont les germes

incriminés (*Staphylococcus*, *Streptococcus*, contamination fécale, *Salmonella* etc....) sont surtout véhiculées par la peau saine ou par des plaies, abcès ou furoncles,

- Des contaminations aéroportées (toux éternuement),
- Des contaminations par les vêtements.

b. Contamination par l'environnement

L'air, l'eau et le sol sont riches en bactéries. Ils peuvent contenir :

- Bactéries : *Achromobacter*, *Enterobacter*, *Bacillus*, *Micrococcus*, etc.
- Moisissures : *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Penicillium* etc.
- Levures : *Saccharomyces*, *Torula*, etc.

c. Contaminants industriels

Le matériel industriel est une source de contamination, en particulier les surfaces poreuses (plan de travail) les outils et les machines, etc.

Lors de la préparation de produits à partir des matières premières diverses, les traitements technologiques peuvent induire ou favoriser la dispersion de la flore de contamination.

Les déchets industriels sont aussi une source potentielle de contamination.

3. Principales bactéries d'altération

Parmi les bactéries incriminées dans l'altération microbienne des produits alimentaires, les souches : *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*.

3.1. *Escherichia coli*

3.1.1. Généralités

Une bactérie du genre *Escherichia*, c'est un bacille à coloration de Gram négative, aérobie-anaérobie facultatif (AAF), possédant une nitrate réductase et une catalase, dépourvue d'oxydase et non halophile. *E. coli* est une bactérie immobile ou mobile avec une structure flagellaire péritriche et non-sporulée. Sa température optimale de croissance est de 37°C. Bactérie non exigeante, elle est capable de croître sur des milieux ordinaires tels que le milieu TSA (trypticase-caséine-soja). *E. coli* est capable de fermenter le lactose et de produire de l'indole et possède différentes enzymes telles que la lysine décarboxylase (LDC), l'ornithine décarboxylase (ODC) et la -glucuronidase (-Glu). La majorité des souches fermentent le sorbitol. La plupart des caractéristiques biochimiques sont partagées par l'ensemble des *E. coli* en dehors du sérotype O157:H7 qui ne fermentent pas le sorbitol, à l'exception de certains mutants qui ont la capacité de fermenter ce sucre (King *et al.*, 2014).

Enfin, l'espèce *E. coli* est une bactérie versatile qui comprend, à la fois, des bactéries commensales du tube digestif, des bactéries pathogènes et des bactéries adaptées à l'Environnement (Tenailon *et al.*, 2010).

3.1.2. Habitat

E. coli appartient à la microflore commensale de l'Homme et de nombreux animaux. C'est une bactérie colonisatrice du tube digestif des animaux à sang chaud (carnivores, omnivores, herbivores et oiseaux) mais également des reptiles (Gordon et Cowling, 2003). Le tractus digestif constitue son habitat primaire. Cette bactérie est présente principalement au niveau du colon et du cæcum à des concentrations environ $> 10^6$ UFC (Unité Formant Colonie) / g de contenu intestinal (Ducluzeau et Raibaud, 1985).

E. coli est rejeté dans l'environnement via les fèces à une concentration d'environ 10^8 UFC/ g de fèces (Smati *et al.*, 2013). Il se retrouve dans les eaux environnementales par le biais des effluents, tels que les eaux usées, les lisiers ou les

fumiers des animaux d'élevage ou par les déjections des animaux d'élevage ou des animaux sauvages.

3.1.3. Résistance aux antibiotiques

Le mécanisme de résistance le plus répandu chez *E. coli* est l'inactivation enzymatique. C'est le cas de la résistance à plusieurs antibiotiques qui sont utilisés en médecine humaine et vétérinaire, notamment, les aminoglycosides, céphalosporines, fluoroquinolones et sulfamides (Um, 2016).

Plusieurs gènes de résistance transférables sont détectés chez les *E. coli* isolées chez l'homme et chez l'animal. Des supports mobiles pouvant être impliqués dans la diffusion de ces gènes de résistance entre l'animal et l'homme ont également été clairement identifiés (Bouchardon et al., 2006; Madec et al., 2012).

3.1.4. Transmission de la bactérie

Escherichia coli est une bactérie qui s'établit dans le tube digestif de l'homme et des animaux à sang chaud. La majorité des souches de *E. coli* sont inoffensives, quelques-unes seulement sont pathogènes. C'est le cas des souches de *E. coli* dites entérohémorragiques (ECEH).

La transmission des *E.coli* pathogènes de type ECEH survient majoritairement lors de la consommation d'aliments contaminés. Les produits concernés sont généralement la viande crue ou insuffisamment cuite, les produits laitiers au lait cru, et plus rarement les produits végétaux crus. Le réservoir naturel des ECEH étant principalement le tube digestif des bovins, la contamination peut également survenir lors de la traite ou l'abattage de ces animaux. Les matières fécales des ruminants présents dans le sol, dans le fumier et dans l'eau (mares, ruisseaux) sont aussi une source possible de contamination. La transmission interhumaine de ECEH est également possible, mais elle survient plus rarement. Dans la majorité des cas, elle a lieu de l'enfant à l'adulte, par exemple lors de la toilette de nourrisson (Anonyme 4, 2018 ; Anonyme 5, 2018).

3.1.5. Conséquences sur le consommateur

Les ECEH produisent des shigatoxines (appelées shiga-toxines en raison de leur ressemblance avec celles produites par *Shigella dysenteriae* ou Bacille de Shiga) pouvant provoquer de graves maladies d'origine alimentaire.

Ces toxines produites par ECEH peuvent être à l'origine de toxi-infections alimentaires (TIA) graves, les symptômes provoqués par ECEH apparaissent entre 3 et 8 jours après l'infection. Il s'agit de douleurs abdominales et de diarrhées, lesquelles peuvent évoluer vers des formes sanglantes (colites hémorragiques). Des vomissements et de la fièvre peuvent aussi survenir.

Parallèlement, les shigatoxines détruisent la paroi des vaisseaux sanguins et causent des problèmes de coagulation ainsi que d'hypertension artérielle. Chez 10 % des personnes infectées, la dissémination des Shigatoxines provoque un syndrome hémolytique et urémique (SHU), mortel dans 3 à 5 % des cas. Ce dernier est caractérisé par une atteinte de la fonction rénale et par une baisse de la concentration des cellules sanguines (globules rouges et plaquettes). Un quart des personnes souffrant de SHU développe aussi des complications neurologiques qui peuvent aboutir à un état de coma (Anonyme 4, 2018 ; Anonyme 5, 2018).

3.2. *Staphylococcus aureus*

3.2.1. Généralités

Staphylococcus aureus est une bactérie à coloration de Gram positive de 1µm de diamètre, donnant des colonies jaunes-dorées caractéristiques sur le milieu de culture Chapman due à la production de pigments caroténoïdes. A l'examen microscopique, elle apparaît sous forme de petites cocci en paires, petites chaînettes ou en amas donnant l'aspect de grappes de raisin (Bhunja, 2008).

S. aureus ne forme pas de spores et peut donc être facilement éliminé par traitement thermique. Cependant, dans les cas de fabrication de produits à partir de lait cru ou de cas de contaminations postérieures au traitement thermique, cette caractéristique ne permet pas de s'affranchir du risque lié à *S. aureus*.

S. aureus est une bactérie anaérobie facultative, mésophile, neutrophile et halophile. Son optimum de croissance se situe à une température d'environ 37°C avec un pH compris entre 6 et 7, mais elle est capable de se développer à des températures comprises entre 7 et 48°C et à des pH compris entre 4 et 10 (Charlier *et al.*, 2009). La croissance de *S. aureus* est possible dans des milieux présentant une activité de l'eau (A_w) très faible (0,83), avec un optimum quand l' A_w est supérieure à 0,99 (Bennett, 2001). La bactérie est aussi capable de supporter des concentrations en chlorure de sodium allant jusqu'à 20 % (Charlier *et al.*, 2009).

3.2.2. Habitat

Le réservoir naturel des staphylocoques est l'homme et les animaux à sang chaud. Sa niche écologique dominante est la partie antérieure du nez (Kluytmans *et al.*, 1997). Le taux de contamination nasal chez les sujets sains varie entre 20 % et 55 % selon la population étudiée (Nouwen *et al.*, 2001). Cette bactérie est parmi les microorganismes commensaux occasionnels ou permanents de la peau et des muqueuses de l'homme et des animaux qui semblent constituer le principal réservoir de ces germes, secondairement localisés dans la nature, vraisemblablement par les squames et les poils (Eyque *et al.*, 1998).

S.aureus possède des capacités d'adaptation et de résistance au stress importantes et il est capable de survivre dans un large éventail d'habitats environnementaux. La bactérie peut être isolée de façon sporadique dans le sol, l'eau douce, le sable de la plage, l'eau de mer, la surface des plantes. Concrètement, elle est largement présente dans les poussières dispersées dans l'air et les surfaces (Dworkin *et al.*, 2006).

3.2.3. Résistance aux antibiotiques

L'existence de bactéries multi résistantes aux antibiotiques constitue un problème considérable. Le SARM présente ce caractère très résistant à la plupart des antibiotiques. Plus des 90% du *Staphylococcus aureus* sont résistants à la pénicilline, nafcillin, oxacilline et méthicilline (Novick *et al.*, 2001).

3.2.4. Transmission de la bactérie

Les staphylocoques sont des bactéries impliquées dans des pathologies variées et de degrés de gravité divers. L'habitat naturel des staphylocoques est l'homme et l'animal. Il est important de noter que 30 à 50 % de la population est porteur sain du staphylocoque, c'est-à-dire que la bactérie est retrouvée au niveau de la peau ou des muqueuses externes sans qu'aucun symptôme ne soit développé. Cependant, des infections symptomatiques peuvent intervenir dans divers cas : blessure, intervention chirurgicale (la bactérie interne développe son pouvoir pathogène) et au cours de pathologies comme la diminution des défenses immunitaires et le diabète. Ces bactéries sont fréquemment retrouvées dans l'environnement (eaux non-traitées, sols, objets souillés) (Anonyme 3, 2016).

S. aureus peut être transmis d'aliments contaminés. Les aliments les plus à risque sont :

- les aliments recontaminés après un traitement thermique ou tout autre procédé éliminant la microflore banale. Plus l'aliment est manipulé, plus le risque est élevé. Ces aliments sont par exemple les viandes de volailles, les jambons cuits et tranchés, les salades composées y compris les salades de riz ou de légumes, les gâteaux à la crème et les plats cuisinés manipulés après cuisson,
- les aliments fermentés à acidification lente permettant la croissance de *S. aureus* durant la fermentation. Par exemple, certains fromages ou certaines salaisons fermentées, tels que des salamis.
- les produits séchés où la teneur en eau est réduite, dans lesquels la croissance de *S. aureus* a pu être favorisée à une des étapes de fabrication ou de stockage par une A_w réduite et une température favorable. Ces aliments sont par exemple le lait en poudre, les pâtes, les poissons séchés.

Les plats ayant nécessités des manipulations humaines (salades composées, plats cuisinés) et les produits laitiers sont les aliments les plus fréquemment associés aux intoxications à staphylocoques (Anonyme 3, 2016).

3.2.5. Conséquences sur le consommateur

Le staphylocoque doré (*Staphylococcus aureus*) est la souche de staphylocoque la plus fréquemment rencontrée en pathologie humaine et vétérinaire. Elle est également en tête des bactéries responsables d'intoxications alimentaires.

Les intoxications alimentaires staphylococciques ne sont pas des infections évolutives, mais elles sont dues à des aliments qui ont été en contact avec un staphylocoque produisant des entérotoxines (thermostables). Ces toxines sont donc retrouvées dans les aliments qu'ils soient crus ou cuits et provoquent chez le sujet qui les a ingéré des vomissements, des diarrhées et des crampes abdominales, qui disparaissent en général quelques heures après l'ingestion sans nécessiter de traitement spécifique (Anonyme 3, 2016).

Matériel
Et
Méthodes



Objectif du travail

Le présent travail a pour objectif de valoriser le lactosérum pour une éventuelle application dans la bioconservation des aliments. En effet, cette étude consiste à étudier l'activité antibactérienne du lactosérum issu de la fabrication du fromage, en vue de substituer les additifs chimiques utilisés à des fins de conservation, qui présentent de plus en plus de risques sur la santé des consommateurs.

La partie expérimentale de notre étude s'est déroulée au niveau du laboratoire de physicochimie de la fromagerie « LE FERMIER », ainsi qu'au laboratoire de microbiologie de la laiterie-fromagerie « Pâturage » de Tizi-Ouzou, où ont été prélevés les échantillons de lactosérum.

Présentation de l'unité d'accueil

La société «Pâturage d'Algérie» créée en 1998, portant le nom «La Montagnarde» était initialement implantée à 1200 mètres d'altitudes, en Kabylie (Ain El Hammam, Michelet). En 2002, suite à un incendie qui a touché son site de production, l'entreprise s'est installée à Tizi-Ouzou (Chef-lieu de la Wilaya), où elle a pris le nom de «Pâturage d'Algérie».

L'entreprise dispose aujourd'hui d'une capacité de production de 250 000 litres par jour, avec un nombre de salariés de 230. Pâturage d'Algérie a pu relever le défi d'arracher une part importante du marché local, et vise l'objectif de prendre l'avantage sur les produits importés d'Europe et d'ailleurs. C'est dans ce contexte que la société table sur l'innovation et la qualité de sa production : sa gamme de produits variés dépasse vingt produits, répartis en laits (pasteurisé, fermenté et caillé), fromages à pâte molle ou à pâte pressée et fromage de fonte. L'industrie laitière fonctionne essentiellement sur la base de poudre de lait importée à prix fort, ainsi que sur une quantité faible de production nationale laitière liquide, achetée auprès de l'Office National Interprofessionnel du Lait (ONIL).

1. Matériel**1.1. Source de lactosérum**

Le lactosérum utilisé est issu de la fabrication du fromage à pâte pressée de la laiterie-fromagerie « Pâturage ». Il est proprement recueilli dans une bouteille en plastique de 1L et acheminé au niveau du laboratoire de physicochimie de la fromagerie « LE FERMIER » dans une glacière à une température inférieure de 10°C, pour être analysé.

Le lactosérum utilisé pour contrôler la qualité microbiologique et la réalisation de l'antibiogramme est prélevé dans des tubes à essais stériles, en présence d'une flamme permettant de garder la zone de prélèvement stérile.

1.2. Matériel biologique

Deux souches bactériennes sont utilisées pour ce travail. Il s'agit des bactéries *Escherichia coli* ATCC 25922 et *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, qui proviennent du laboratoire de Microbiologie au niveau du département des sciences agronomiques de l'Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou.

1.3. Matériel inerte

L'ensemble du matériel utilisé pour ce travail comprenant les instruments de laboratoire, les réactifs et milieux de culture est énuméré dans la partie Annexes (annexe 1).

2. Démarche expérimentale

2.1. Prélèvement

Le prélèvement des échantillons de lactosérum a été effectué au niveau de la laiterie-fromagerie «Pâturage» de Tizi-Ouzou, et transporté au laboratoire.

2.2. Analyses physicochimiques du lactosérum

Lors de la production du fromage à pâte pressée (EDAM), deux types de lactosérum sont obtenus en quantités importantes selon le processus industriel de l'unité «Pâturage» comme le montre la figure 3, le premier découle directement du caillé lors de l'opération du tranchage et le deuxième constitue un mélange de lactosérum avec de l'eau chaude utilisée pour le délactosage du caillé, celui-ci est évacué après le salage de la préparation.

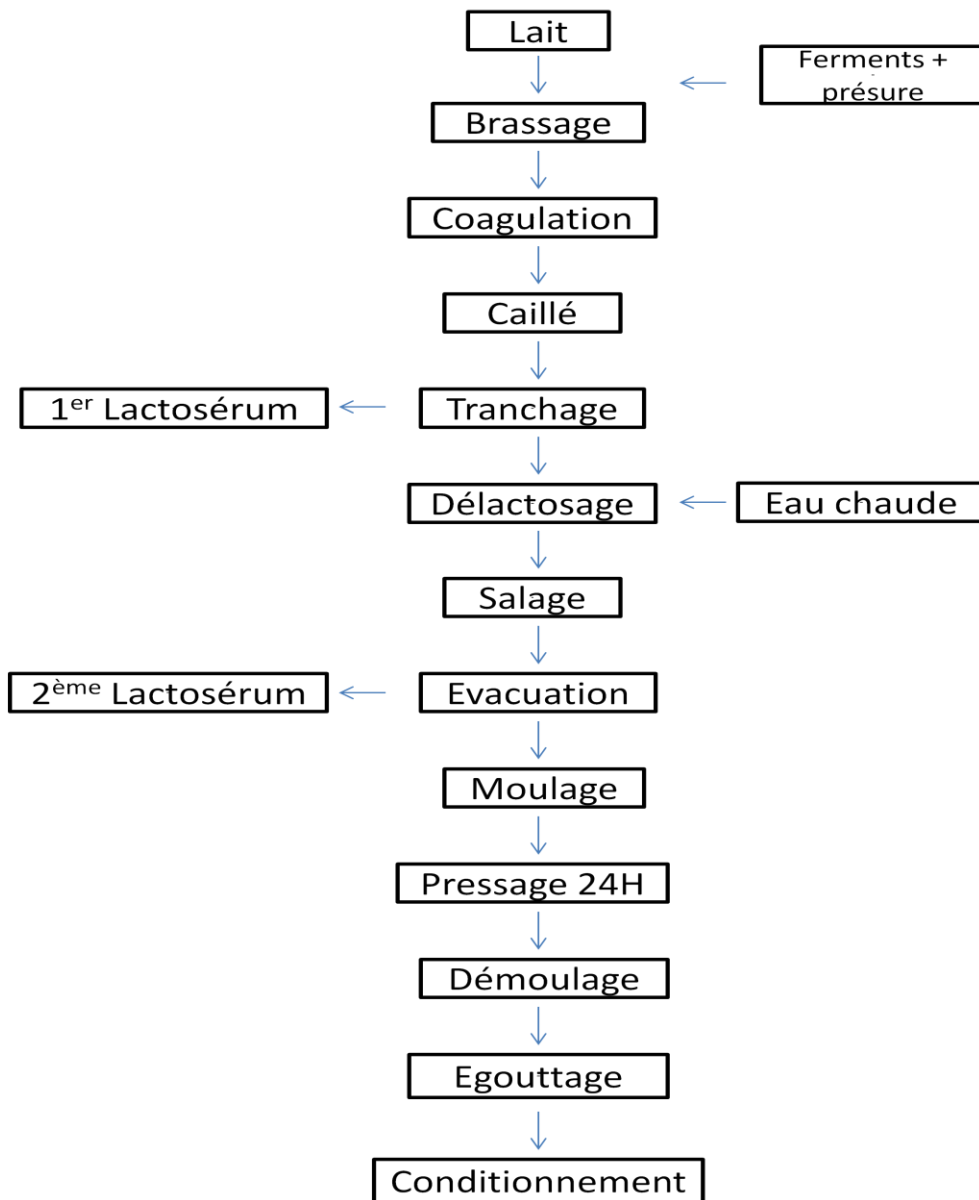


Figure 3 : Schéma technologique d'obtention du lactosérum issu de la fabrication du fromage à pâte pressée au niveau de la fromagerie Pâturage d'Algérie, Tizi-Ouzou

Les deux types de lactosérum sont prélevés pour effectuer les analyses physicochimiques afin de déterminer lequel utiliser pour l'étude de l'effet antibactérien.

Les analyses physicochimiques ont été réalisées au niveau du laboratoire d'analyses physicochimiques de la fromagerie « LE FERMIER » de Tizi-Ouzou. Elles permettent de déterminer les paramètres physicochimiques du lactosérum selon des techniques standards officielles, décrites dans l'ouvrage de référence AFNOR, édition 1986.

a. Détermination du pH**• Principe**

La mesure du pH se fait à l'aide du pH mètre. Le pH nous renseigne sur l'état de fraîcheur des produits, c'est une mesure de la concentration des ions H^+ dans une solution, dont le but est de déterminer quantitativement l'acidité ou la basicité de celle-ci (AFNOR, 1980).

• Mode opératoire

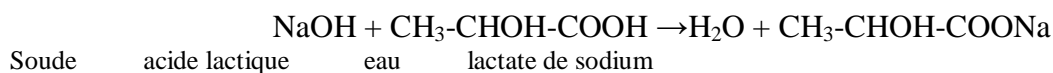
Le protocole consiste à effectuer d'abord l'étalonnage de l'appareil, il s'agit d'un ajustement du cadre de lecture du pH à l'aide d'une solution de pH connue (solution de pH étalon). Après étalonnage de l'appareil, l'électrode du pH mètre est introduite dans un bécher contenant un volume du lactosérum. La valeur du pH s'affiche sur l'écran de l'appareil.

b. Détermination de l'acidité**• Principe**

L'acidité du lactosérum est déterminée par titrage à l'hydroxyde de sodium NaOH (N/9), en présence d'un indicateur coloré « la phénolphthaléine » (AFNOR, 1980).

Cette acidité provient de la fermentation du lactose par les micro-organismes. Elle est exprimée en gramme par litre (g/l) ou en degré DORNIC ($^{\circ}D$).

La réaction chimique qui se déroule dans le lactosérum est comme suit :

**• Mode opératoire**

Un volume de 10 ml de solution à analyser est versé dans un erlenmeyer de 200 ml de capacité. Puis, une à deux gouttes de phénolphthaléine sont ajoutées. Par la suite, un titrage de mélange est réalisé sous agitation continue, par la solution de NaOH jusqu'à l'apparition d'une couleur rose pâle.

Le volume de soude utilisé pour obtenir le virage de la couleur au rose pâle est alors noté et les résultats sont exprimés en degrés Dornic suivant la relation :

$$\text{Acidité } ^{\circ}D = V_{\text{NaOH}} \cdot 10$$

Avec V_{NaOH} : volume moyen de la soude utilisé pour titrer 10 ml.

$$1^{\circ}D = 0,1 \text{ g/L d'acide lactique}$$

c. Détermination de la teneur en matière grasse**• Principe**

La détermination de la teneur en matière grasse a été effectuée selon la méthode acido-butyrométrique de GERBER. Le principe de la méthode est basé sur la séparation de la matière grasse du lactosérum dans un butyromètre après attaque des éléments du lactosérum (à l'exception de la matière grasse) par l'acide sulfurique.

Les matières grasses résistantes à l'action de l'acide sulfurique sont séparées par centrifugation à chaud en présence d'alcool isoamylique qui facilite l'opération et crée une séparation nette.

Nous pouvons ensuite lire sur l'échelle du butyromètre le taux de la matière grasse à $65^{\circ}\text{C} \pm 2$. La matière grasse se sépare en une couche jaune claire et transparente.

• Mode opératoire

Un volume de 10 ml d'acide sulfurique est introduit dans le butyromètre ensuite, 11 ml de lactosérum est rajouté au moyen d'une pipette en plaçant le point de celle-ci au contact avec la base du col du butyromètre et en évitant un mélange prématuré du lactosérum avec l'acide sulfurique. Puis, 1 ml d'alcool isoamylique est versé à la surface du lactosérum.

Une agitation du butyromètre avec un retournement lent permet la dissolution complète de la caséine, le mélange brunit et s'échauffe à 80°C . Une fois le mélange est homogène, une centrifugation est effectuée immédiatement à une vitesse de rotation comprise entre 1000-1200 tours/minutes pendant une durée de trois minutes.

La lecture s'effectue après avoir placé le butyromètre de manière que le bouchon soit orienté vers le bas en s'assurant que la colonne grasse se situe entièrement dans l'échelle graduée.

Enfin, la lecture se fait sur le niveau le plus bas du ménisque supérieur.

d. Détermination de l'extrait sec total (EST)**• Principe**

Le principe de cette méthode consiste à peser le résidu après dessiccation totale de l'échantillon jusqu'à un poids constant dans un dessiccateur électronique.

- **Mode opératoire**

Le protocole consiste à préparer une capsule en aluminium allant au dessiccateur, tarer et peser 3g du produit, fermer et lancer la dessiccation. Cette dernière se termine automatiquement une fois le poids de l'échantillon est constant.

Le dessiccateur électronique est équipé d'un écran permettant de lire la valeur de l'extrait sec total de l'échantillon.

e. Détermination de la densité

- **Principe**

La densité est le rapport qui existe entre le poids spécifique d'un corps et le poids du même volume d'eau distillée, l'eau étant prise pour unité de poids spécifique égale 1 à 4 °C.

La densité est mesurée à l'aide d'un thermo-lactodensimètre. Elle est ramenée à 20°C par la formule suivante :

$$\text{Densité corrigée} = \text{densité lue} + 0,2 (\text{température du lait} - 20^{\circ}\text{C})$$

- **Mode opératoire**

Homogénéiser l'échantillon en évitant la formation de mousse. Verser le lactosérum dans l'éprouvette, la remplir complètement et échapper la mousse formée en surface. Ensuite, plonger doucement le thermo-lactodensimètre dans le lactosérum et attendre que l'équilibre soit établi sans toucher ni le fond ni les parois de l'éprouvette. Enfin, faire la lecture de la densité brute au niveau supérieur du ménisque d'affleurement du lactosérum sur la tige en tenant compte de la température.

2.3. Analyses microbiologiques du lactosérum

L'objectif de cette analyse est d'évaluer la qualité microbiologique du lactosérum afin de s'assurer de la qualité hygiénique de l'échantillon prélevé.

Les analyses effectuées sont représentées dans le tableau 5 :

Tableau 5 : Analyses microbiologiques du lactosérum

Analyses effectuées	Milieux de culture	Durée d'incubation	Température d'incubation
Coliformes totaux	VRBL	24-48h	30°C
<i>Escherichia coli</i>	ECC	24-48h	44°C
<i>Staphylocoques</i>	Chapman	24-48h	37°C
Levures et moisissure	OGA	3 jours	30°C

2.4. Evaluation de l'effet antibactérien du lactosérum

L'évaluation de l'activité antibactérienne a été réalisée par la **méthode de diffusion sur disque de Kirby Bauer**. Cette méthode consiste à estimer l'inhibition de la croissance des germes mis en contact à l'agent étudié.

La démarche suivie pour l'évaluation de l'effet antibactérien du lactosérum se résume comme suit :

- Préparation d'une suspension bactérienne des deux souches étudiées équivalente à une norme de 0,5 Mc Farland.
- Mise en contact de la bactérie avec le lactosérum testé comme illustré dans la figure 4.

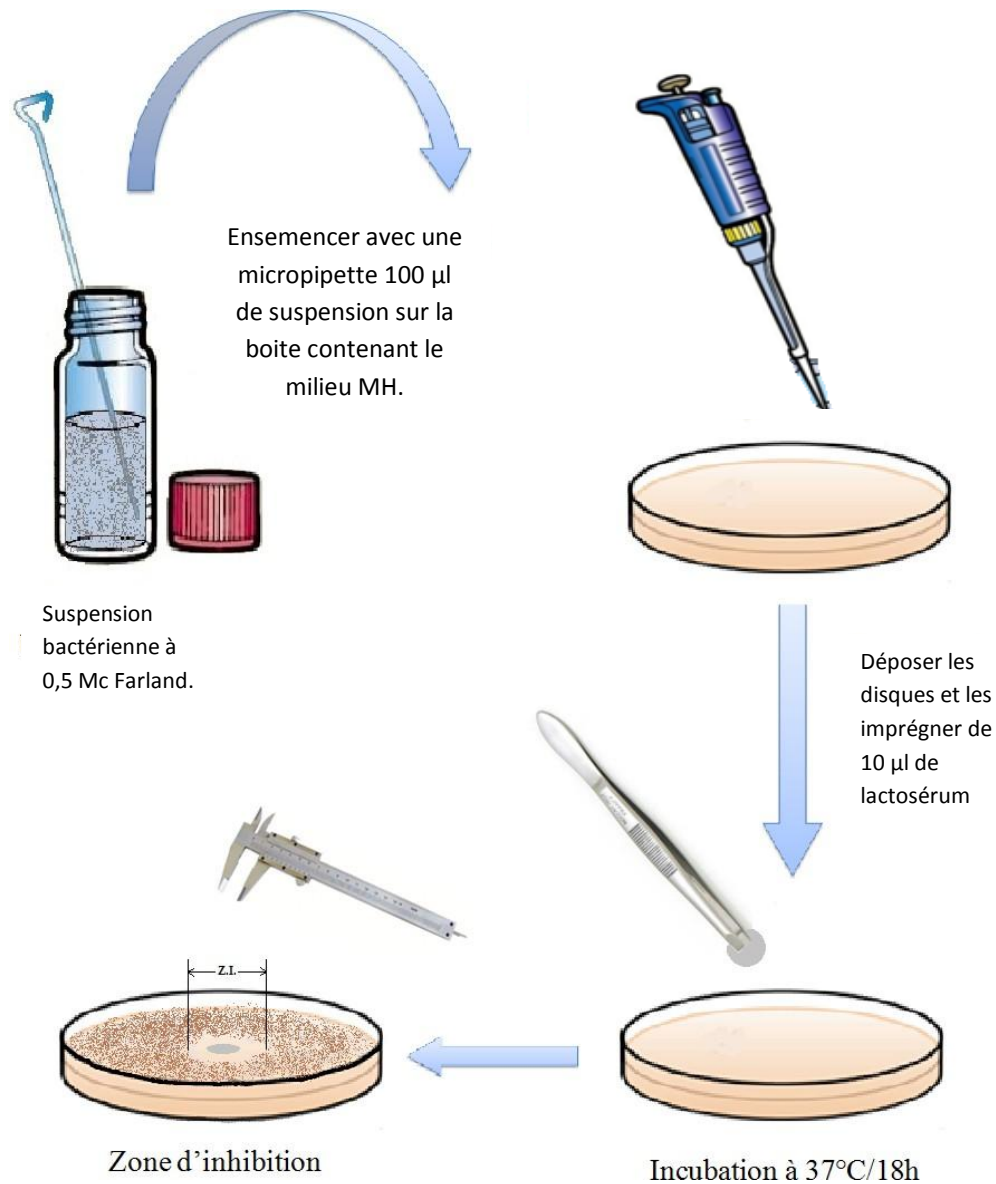


Figure 4 : Schéma montrant les principales étapes entreprises pour l'évaluation de l'effet antibactérien du lactosérum

2.4.1. Préparation des précultures bactériennes

La figure 5 schématise les principales étapes de la réalisation des précultures bactériennes A partir d'un tube en gélose inclinée contenant une culture d'*E.coli* sur le milieu Mueller-Hinton(MH) et dans la zone stérile autour du bec bunsen, on applique la démarche suivante :

- Prélever une quantité de l'inoculum à l'aide d'une pipette Pasteur en grattant légèrement la surface de la gélose sans la briser.

- Effectuer un ensemencement en surface par stries séchés sur une boîte de pétri contenant le milieu de culture MH.

Préparer de la même manière la préculture de *S. aureus*.

- Les deux boîtes de pétri contenant les précultures bactériennes sont incubées à 37°C pendant 18h.
- Après incubation, préparer deux tubes à essai contenant de l'eau physiologique stérile. Deux à trois colonies de chaque boîte sont ensuite prélevées à l'aide d'une pipette Pasteur et introduites dans chacun des tubes. La concentration des suspensions bactériennes préparées est comparée à une solution de 0,5 Mc Farland (annexe 2).

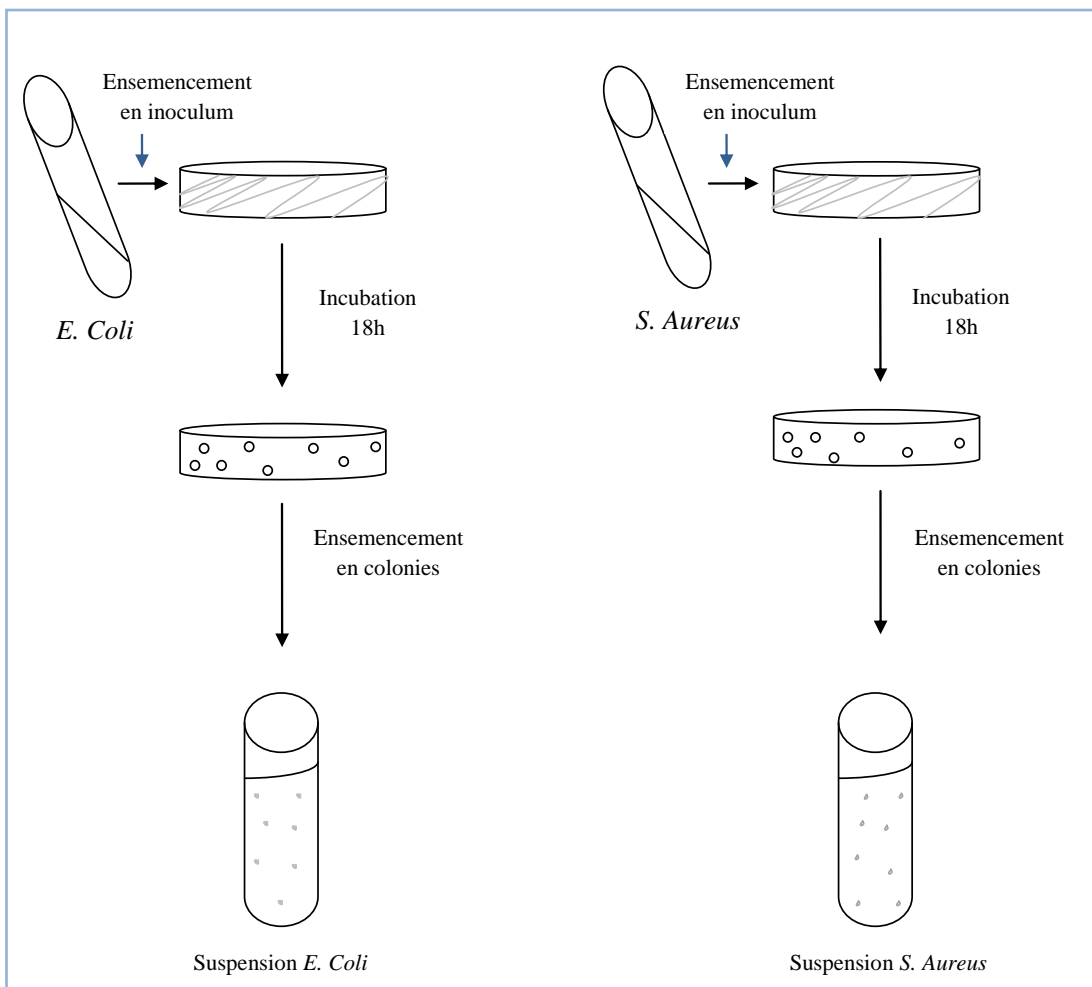


Figure 5 :Schéma descriptif de la préparation de la suspension bactérienne

2.4.2. Antibiogramme

Le lactosérum prélevé est partagé en deux échantillons :

- 1^{er} échantillon : lactosérum réfrigéré à 6°C pendant 24h.
- 2^{ème} échantillon : lactosérum gardé à température ambiante pendant 24h.

L'intérêt du premier échantillon est de stabiliser les réactions éventuelles dans le lactosérum réfrigéré. Par contre, dans le deuxième échantillon, le but consiste à pousser l'acidification du lactosérum gardé à température ambiante, par les ferments lactiques présents, qui poursuivent la transformation du lactose en acide lactique.

L'objectif de cette manœuvre est d'estimer l'effet antibactérien de l'acide lactique par ses différentes concentrations dans les deux lactosérums.

- Préparation des dilutions des lactosérums

- Dilution 0 (100%) : 1ml du lactosérum brut.
- Dilution 1 (50%) : 0,5ml du lactosérum brut + 0,5ml d'eau distillée stérile.
- Dilution 2 (25%) : 0,5ml de la solution 50% + 0,5ml d'eau distillée stérile.

La préparation des dilutions pour chacun des lactosérums est réalisée comme suit :

- Prendre 3 tubes d'éppendorf, les numéroter de 0, 1, 2 (du moins dilué au plus dilué) et les déposer sur un portoir.
- Après du bec bunsen, à l'aide d'une pipette de 1ml stérile, on prélève 1ml du lactosérum brut et le verser dans le tube numéro 0.
- Ensuite, prélever 0,5ml du lactosérum brut, le verser dans le tube 1 et le compléter jusqu'à 1ml avec de l'eau distillée.
- Enfin, prélever 0,5ml du tube 1, le verser dans le tube 2 et le compléter avec de l'eau distillée jusqu'à 1ml.

- Réalisation de l'antibiogramme :

- 14 boîtes de Pétri contenant le milieu de culture MH sont préalablement préparées et séparées en deux séries à raison de 7 boîtes pour chaque bactérie :
 - 1 boîte témoin.
 - 1 boîte pour le lactosérum réfrigéré + 2 répétitions.
 - 1 boîte pour le lactosérum non réfrigéré + 2 répétitions.

- Pour la série d'*E. coli*, ensemencer dans chaque boîte 100µl de cette suspension bactérienne à l'aide d'une micropipette puis, étaler avec un râteau.
- Préparer la deuxième série de *S. aureus* avec 100µl de la suspension bactérienne pour chaque boîte et l'étaler en surface.
- 1 boîte pour chaque bactérie est consacrée pour les témoins qui sont :
 - Témoin positif 1 : acide lactique commercial.
 - Témoin positif 2 : antibiotique Ampicilline.
 - Témoin négatif : eau distillée.
- La réalisation de l'antibiogramme s'est faite avec le reste des boîtes (Figure 6), puis elles ont été incubées à 37°C pendant 18h :
 - 3 boîtes ensemencées avec *E. coli* avec le lactosérum réfrigéré.
 - 3 boîtes ensemencées avec *E. coli* avec le lactosérum non réfrigéré.
 - 3 boîtes ensemencées avec *S. aureus* avec le lactosérum réfrigéré.
 - 3 boîtes ensemencées avec *S. aureus* avec le lactosérum non réfrigéré.

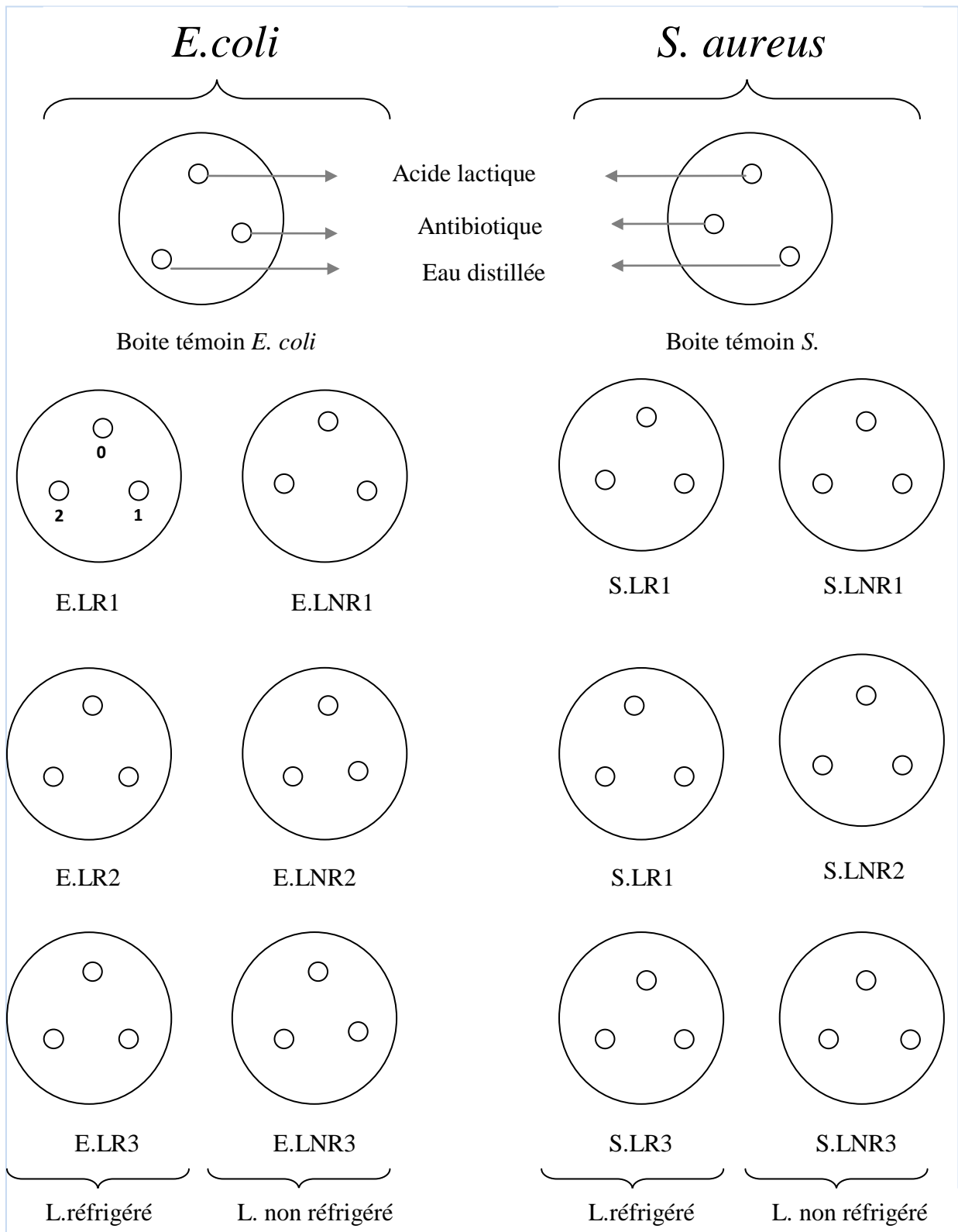


Figure 6 : Schéma illustratif de l'antibiogramme

(*) S : *Staphylococcus aureus* ; E : *Escherichia coli* ; LR : lactosérum réfrigéré ; LNR : lactosérum non réfrigéré.

*Résultats
Et
Discussion*



Le but du présent travail est d'évaluer l'activité antibactérienne du lactosérum acide contre les souches *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*, en vue de l'utiliser pour la conservation naturelle d'aliments et minimiser le recours aux additifs chimiques qui entraînent de sérieux problèmes de santé chez le consommateur.

En outre, l'utilisation du lactosérum a pour objectif la valorisation d'un sous-produit polluant, destiné initialement dans notre pays à être évacué en masse et le plus souvent sans traitement dans le réseau des eaux usées.

1. Analyses physicochimiques

Les résultats d'analyses physico-chimiques effectuées sur les deux types de lactosérum, obtenus lors de la production du fromage à pâte pressée sont présentés dans le tableau 6. Les répétitions effectuées ont permis d'obtenir une moyenne et un écart type pour chaque analyse :

Tableau 6 : Résultats d'analyses physicochimiques

Analyses effectuées	Lactosérum 1 (avant délactosage)	Lactosérum 2 (après délactosage)
pH	6,48 ±0,01	6,27± 0,01
Acidité (°D)	15± 0,00	10± 0,00
EST (g/l)	88,4± 0,00	77,2± 0,00
Matière grasse (g/l)	2± 0,00	1± 0,00
Densité	1035,6± 0,00	1035,2± 0,00

1.1. pH et acidité

D'après le tableau 6, le pH du lactosérum 1 est légèrement plus élevé que celui du lactosérum 2. Ceci est dû à la différence de température des deux lactosérums, ce qui agit sur la valeur de pH selon Marshall et Franck (1981).

Les valeurs de pH des lactosérums analysés sont des valeurs incluses dans l'intervalle trouvée par Morr (1989) et Moletta, (2002) ($\text{pH} \leq 6,6$). En outre, l'acidité titrable des deux lactosérums est estimée à 15°D pour le lactosérum 1 et 10°D pour le lactosérum 2. L'acidité en degré Dornic exprime la teneur en acide lactique dans le lactosérum. L'acide lactique est un composant du lactosérum (Sottiez, 1990). Les différentes concentrations en acide lactique observées sont dues à la dilution du lactosérum 2 avec de l'eau chaude suite à l'opération de délactosage.

Les travaux menés par Veissyre (1975) ont noté que le lactosérum acide doit avoir une acidité supérieure à 18D°, de ce fait notre lactosérum est doux.

1.2. Extrait sec total

Les valeurs obtenues dans notre étude qui sont à l'ordre de 8,84 % et 7,72 % pour le lactosérum 1 et le lactosérum 2 respectivement, sont plus élevées que l'intervalle donnée par Alais (1984) et Sottiez (1990) qui est de 50% à 60%, ceci peut être expliqué par la qualité du lait utilisé par l'unité, ou il peut être dû au procédé de séparation du lactosérum.

Il ressort du tableau 6 que les deux types de lactosérum présentent une différence en matière sèche totale. Cette différence est tout à fait justifiée. En effet, le lactosérum 2 est obtenu après délactosage du caillé qui consiste à ajouter de l'eau chaude à celui-ci, après avoir évacué le lactosérum 1 (qui n'est pas donc dilué).

1.3. Teneur en matière grasse

La teneur en matière grasse (MG) enregistrée pour les deux échantillons (0.2%) est inférieure à celle donnée par Sottiez (1985) qui est de 1 %. La raison principale de la pauvreté du lactosérum en MG est probablement liée aux procédés de séparation du lactosérum, et aussi au fait que la quasi-totalité de la MG du lait est retenue dans le caillé (Fauquant *et al.*, 1985).

1.4. Densité

Les résultats représentés dans le tableau 6 montrent que la densité du lactosérum 1 est légèrement supérieure à celle du lactosérum 2. Cela est dû aux différentes valeurs de l'EST des deux lactosérums.

2. Analyses microbiologiques

Les analyses microbiologiques sont effectuées dans l'objectif de s'assurer de la qualité hygiénique du lactosérum à tester. Le lactosérum choisi pour l'évaluation de l'activité antibactérienne est le lactosérum 1 (avant délactosage), et ceci est en raison de son acidité dornic qui est relativement élevée par rapport au lactosérum 2, ainsi que son extrait sec total qui indique sa richesse en lactose, ce qui le rend plus sujet à des fermentations lactiques qui sont recherchées dans notre étude (afin d'acidifier le milieu).

Le tableau 7 illustre les résultats des analyses microbiologiques effectuées au lactosérum. Les photos des boîtes de Pétri obtenues sont présentées dans l'annexe 3.

Tableau 7 : Résultats d'analyses microbiologiques

Analyses effectuées	Résultats
Coliformes totaux	Absence
<i>Escherichia coli</i>	Absence
<i>Staphylocoques</i>	Absence
Levures et moisissures.	Présence

Les résultats obtenus indiquent l'absence des coliformes totaux, cela implique que les pratiques d'hygiène ont été respectées au cours de notre travail.

L'absence d'*Escherichia coli* indique une absence de contamination fécale qui nous renseigne sur la qualité hygiénique de l'échantillon.

L'absence du germe pathogène *Staphylococcus aureus* indique l'absence de contamination de la matière première par le personnel.

La présence des moisissures et levures est due aux ferments utilisés par l'unité durant le processus de fabrication du fromage.

3. Suivi de l'évolution du pH et de l'acidité Dornic des échantillons utilisés pour l'antibiogramme

Le lactosérum à tester est séparé en deux échantillons après prélèvement, le premier est conservé à 6°C (réfrigéré) et le deuxième est conservé à température ambiante pendant 24h. Un suivi du pH et de l'acidité Dornic leur a été effectué après 24h. Les valeurs obtenues sont présentées dans le tableau 8 :

Tableau 8 : suivi du pH et acidité du lactosérum

	Lactosérum à la production	Lactosérum conservé à 6°C	Lactosérum conservé à température ambiante
pH	6,58	6,65	4,39
Acidité (°D)	10	10	35

Le tableau 8 montre que le pH du lactosérum conservé à 6°C pendant 24h a légèrement augmenté, cela est comparable au résultat trouvé par Imbert-Pondaven(1997), qui l'a expliqué par le fait que le développement des germes psychrotrophes tend à alcaliniser le milieu durant leur séjour à des températures entre 4°C et 10°C.

Tandis que le pH du lactosérum conservé à température ambiante a considérablement baissé, cela s'explique par la présence des ferments qui tend à acidifier le milieu suite à leurs activités métaboliques qui se poursuivent à ces températures favorables.

En revanche, l'acidité titrable n'a pas subi de changement pour le lactosérum conservé à 6°C. Par contre, celle-ci a largement augmentée pour le lactosérum conservé à température ambiante. En effet, cela est expliqué dans la littérature par différents auteurs, d'une part Blanc(1969), Collet et Sales(1971) et Février(1972) ont affirmé que la proportion majeure de la matière sèche du lactosérum est représentée principalement par le lactose (60%), d'autre part, Budslawski et Pogorzelski(1964) ont indiqué que dans tous les fromages, au bout de 24h à 48h, le lactose est complètement transformé par les ferments en acide lactique, ce qui explique l'augmentation considérable de l'acidité dornic du lactosérum au cours de sa conservation à température ambiante.

4. Evaluation de l'effet antibactérien

Les résultats obtenus de l'antibiogramme effectué pour les deux échantillons de lactosérum testés envers les deux souches bactériennes : *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*, indiquent que le lactosérum présente un effet antibactérien vis-à-vis de ces deux souches. Cette activité antibactérienne se traduit par la présence des halos «zones d'inhibition de la croissance bactérienne» autour des disques.

4.1. Résultats des témoins

Afin de s'assurer que l'eau distillée utilisée comme diluant n'exerce aucun effet additionnel interférant dans l'activité du lactosérum à étudier, nous avons testé l'activité de l'eau distillée (témoin négatif) sur les souches bactériennes utilisées. Les résultats obtenus après incubation ont permis de constater que les boîtes de Pétri contenant les disques imprégnés d'eau distillée ne montrent aucune zone d'inhibition de la croissance de *E. coli* et *S. aureus*.

Afin de valider notre test, un antibiotique de référence (ampicilline) a été testé sur *E. coli* et *S. aureus* comme témoin positif.

Pour appuyer la théorie affirmant l'efficacité de l'acide lactique comme agent antibactérien, nous l'avons utilisé comme deuxième témoin positif, étant donné qu'il est l'un des constituants majeurs du lactosérum (Sottiez, 1990).

Les figures 7 et 8 montrent l'effet des différents témoins utilisés sur les souches bactériennes *E. coli* et *S. aureus*.

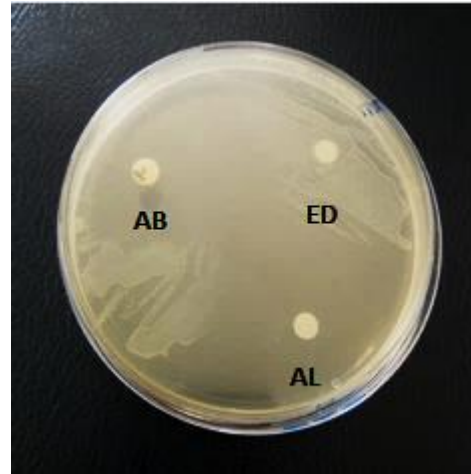


Figure 7 : Effet des témoins sur *E. coli* **Figure 8 :** Effet des témoins sur *S. aureus*

(*) AB : antibiotique ; AL : acide lactique ; ED : eau distillée.

A partir des figure 7 et 8, on constate que la zone d'inhibition obtenue pour l'antibiotique utilisé comme premier témoin positif (Ampicilline) est beaucoup plus importante sur la boîte de Pétriensemencée avec *S. aureus* que la boîteensemencée avec *E. coli*. D'après Nauciel et Vildé(2005), l'ampicilline appartient au groupe des Pénames de la famille des antibiotiques β -lactamines dont le mode d'action est principalement lié à l'affection de la paroi bactérienne.

Les antibiotiques appartenant à la famille β -lactamines agissent sur la synthèse du peptidoglycane en inhibant les protéines liant la pénicilline (PLP). L'inhibition des PLP aboutit à l'inhibition de la formation des ponts pentacycliques responsables de la structure réticulée de la paroi. On obtient ainsi des formes rondes ou filamenteuses qui aboutissent à la lyse bactérienne (Nauciel et Vildé, 2005). Cette explication interprète la différence de sensibilité des deux souches étudiées et cela est dû à la différence de la structure de leur paroi composées essentiellement de peptidoglycane pour *S. aureus*, contrairement à *E. coli* qui possède une paroi plus complexe et plus rigide composée d'une couche externe protectrice, ce qui lui confère une résistance accrue aux antibiotiques agissant sur la paroi bactérienne.

Concernant l'acide lactique utilisé comme deuxième témoin, les résultats obtenus montrent que la zone d'inhibition sur *S. aureus* est beaucoup plus grande que celle observée sur *E. coli*, ce qui est en accord avec les résultats obtenus par d'autres auteurs (Houtsmaet al., 1993; Yuket al., 2007; Tharmaray ; Shah 2007). Cette différence de sensibilité est

expliquée par les différentes compositions structurales et chimiques des parois des deux bactéries

(Nikaido et Vaara 1985) et la tolérance à l'acide de chaque micro-organisme.

L'acide lactique est le métabolite principal des bactéries lactiques entraînant la réduction du pH, qui provoque l'inhibition des microorganismes (Eklund, 1989 et Schnürer et Magnusson, 2005).

L'acide lactique peut franchir la membrane cellulaire des bactéries, en se dissociant à l'intérieur du cytoplasme. Les molécules chimiques issues lors de cette dissociation, provoquent une augmentation de la concentration de protons $[H^+]$ à l'intérieur de la cellule bactérienne, jusqu'au moment où elle dépasse la capacité tampon du cytoplasme, ces derniers seront transportés vers l'extérieur à travers une pompe de protons, diminuant ainsi les réserves énergétiques de la cellule. Quand ces réserves sont épuisées, cette pompe cesse de fonctionner et le pH interne diminue lentement ; provoquant ainsi, la dénaturation des protéines et la déstabilisation des autres composés structurels et fonctionnels de la cellule bactérienne, interférant ainsi dans les fonctions vitales de cette dernière (Piard et Desmazeaud, 1991).

De plus, l'acide lactique pourrait probablement avoir un effet sur les protéines cellulaires, soit en les détruisant ou en inhibant leur synthèse (Zenet *al.*, 2010).

4.2. Effet antibactérien des agents testés

4.2.1. Effet du lactosérum sur *E. coli*

Les résultats de l'activité antibactérienne des deux échantillons de lactosérum testés à différentes concentrations sur *E. coli* sont illustrés dans la figure 9, pour le lactosérum conservé à 6°C et dans la figure 10, pour le lactosérum conservé à température ambiante.

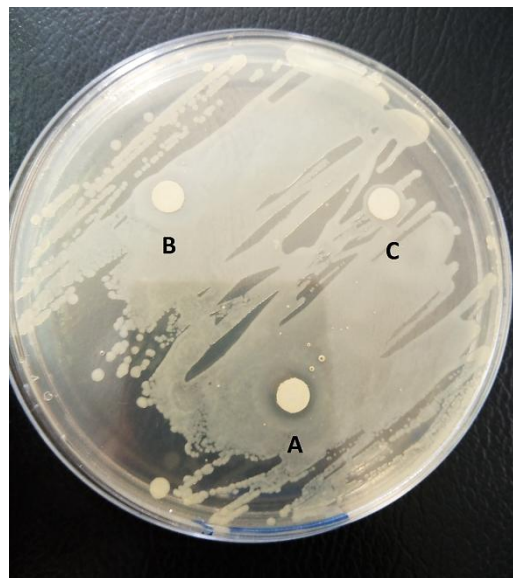


Figure 9 : Photo montrant l'activité antibactérienne du lactosérum conservé à 6°C pendant 24h sur *E. coli*. (A) : 25% ; (B) : 50% ; (C) : 100%

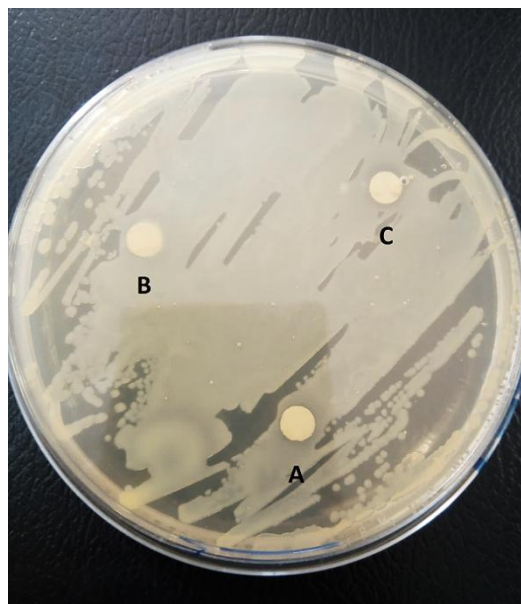


Figure 10 : Photo montrant l'activité antibactérienne du lactosérum conservé à température ambiante pendant 24h sur *E. coli*. (A) : 25% ; (B) : 50% ; (C) : 100%

4.2.2. Effet du lactosérum sur *S. aureus*

Les résultats de l'activité antibactérienne des deux échantillons de lactosérum testés à différentes concentrations sur *S. aureus* sont illustrés dans la figure 11, pour le lactosérum conservé à 6°C et dans la figure 12, pour le lactosérum conservé à température ambiante.

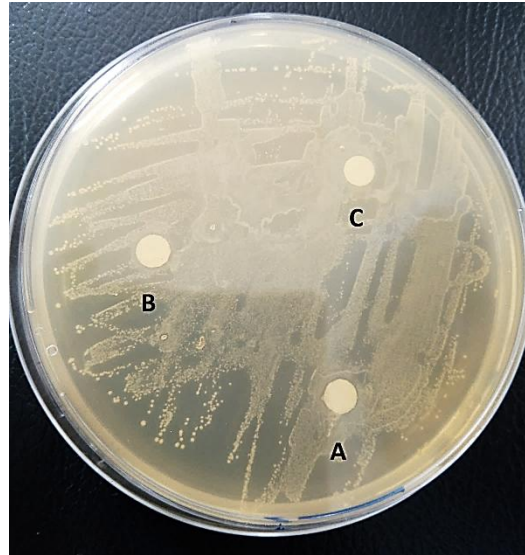


Figure 11 : Photo montrant l'activité antibactérienne du lactosérum conservé à 6°C pendant 24h sur *S. aureus*. (A) : 25% ; (B) : 50% ; (C) : 100%

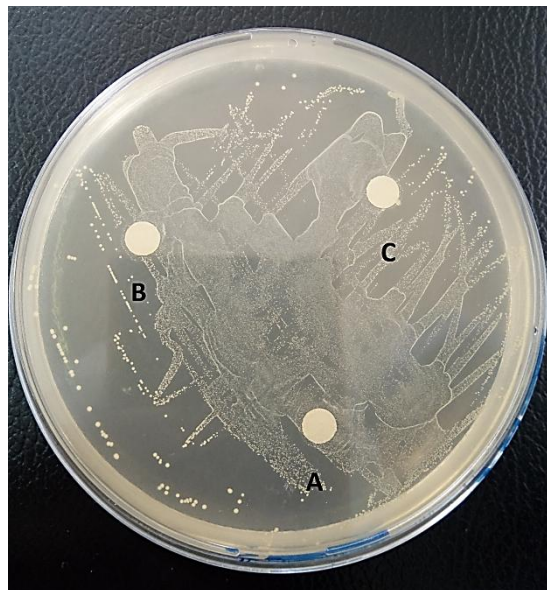


Figure 12 : Photo montrant l'activité antibactérienne du lactosérum conservé à température ambiante pendant 24h sur *S. aureus*. (A) : 25% ; (B) : 50% ; (C) : 100%.

L'activité antibactérienne est exprimée par les diamètres des zones d'inhibition en (mm) en fonction de la concentration en lactosérum. Les diamètres moyens des zones d'inhibition présentés dans le tableau 9 sont compris entre 6 mm et 13 mm. Il est donc possible de constater que les souches testées ont une sensibilité limitée vis-à-vis le lactosérum.

Tableau 9 : Diamètres des zones d'inhibition (mm) en fonction de la concentration en lactosérum utilisé sur les deux souches bactériennes
(Diamètre du disque inclus 6mm)

Les bactéries	<i>E.Coli</i>			<i>S.aureus</i>		
	25%	50%	100%	25%	50%	100%
Lactosérum à 6°C	10,16 ± 1,60	8,50 ± 0,50	7,00 ± 1,00	6,33 ± 0,57	6,66 ± 0,57	10,83 ± 2,46
Lactosérum à température ambiante	8,50 ± 0,50	7,33 ± 0,28	7,00 ± 1,73	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00

D'après le tableau 9, avec *E. coli*, on constate que les diamètres des zones d'inhibition se situent pour le lactosérum conservé à 6°C dans les intervalles de 8 mm à 12 mm pour la concentration 25%, de 8 mm à 9 mm pour la concentration 50% et de 6 mm à 8 mm pour la concentration 100%. A propos du lactosérum conservé à température ambiante, les diamètres des zones d'inhibition se situent dans les intervalles de 8 mm à 9 mm pour la concentration 25%, de 7 mm à 8 mm pour la concentration 50% et de 6 mm à 9 mm pour la concentration 100%.

Concernant *S. aureus*, les diamètres des zones d'inhibition se situent pour le lactosérum conservé à 6°C dans les intervalles de 6 mm à 7 mm pour la concentration 25%, de 6 mm à 8 mm pour la concentration 50% et de 8 mm à 13 mm pour la concentration 100%. Tandis que pour le lactosérum conservé à température ambiante, aucune zone d'inhibition n'est observée pour *S. aureus*.

Contrairement à nos attentes, l'effet antibactérien du lactosérum était observé sur la bactérie à Gram négatif (*E. coli*) par contre, aucun effet inhibiteur n'a été enregistré contre la bactérie à Gram positif (*S. aureus*), ce qui est en accord avec les résultats trouvés par Eswaranandam *et al.*, (2004). Des travaux menés par Stanojevic-Nikolic *et ses collaborateurs* en 2015, ont montré que l'acide lactique peut avoir un effet inhibiteur envers une large gamme de microorganismes. Cependant, il présente une forte activité inhibitrice contre les bactéries à Gram négatif.

La différence de sensibilité des deux souches bactériennes par rapport au lactosérum est certainement liée aux différentes compositions structurales et chimiques des couches externes de cellules (Nikaido *et Vaara*, 1985).

Ainsi, Nikaido (1996) a révélé que l'efficacité relative de l'acide lactique contre les bactéries gram-négatif n'est pas inattendue, étant donné qu'autant que petite molécule soluble dans l'eau, l'acide lactique gagne l'accès au périplasme à travers les protéines transmembranaires remplies d'eau dites «porines» et qui se trouve dans la membrane externe de la cellule.

La membrane externe fonctionne comme une barrière de perméabilité efficace qui peut exclure les macromolécules (comme les bactériocines ou les enzymes) et les substances hydrophobes (antibiotiques hydrophobes par exemple). La propriété de barrière à la perméabilité de la couche externe est en grande partie due à la présence d'une couche spécifique de lipopolysaccharide (LPS) sur la surface de la membrane (Alakomiet *et al.*, 2000).

Cependant, certains agents externes peuvent conduire à la perte de la fonction de barrière de la membrane externe, de tels agents sont appelés agents perméabilisants (Vaara, 1992). Roth *et Keenan* ont signalé en 1971 que l'acide lactique, par sa fonction perméabilisante, était capable de causer des dommages sublétaux à *Escherichia coli*.

Les Perméabilisants en tant que tels, ne présentent pas d'effet bactéricides ou bactériostatiques pour les bactéries à Gram-négatif, par contre, ils permettent à d'autres composés de pénétrer ainsi ils rendent ces bactéries très sensibles aux antibiotiques hydrophobes, aux détergents, lysozyme, ou bactériocines conduit à l'atteinte de la cellule (Helander *et al.*, 1997).

En outre, les zones d'inhibition observées sur *E. coli* ont été d'autant plus grandes que la concentration en lactosérum diminue. Ibrahim *et al.*(2008), ont indiqué que l'acide lactique, à faible concentration inhibe la croissance de *E. coli*. De plus, la concentration en acide lactique n'est pas connue dans le lactosérum utilisé, ainsi que la composition complexe de ce dernier peut être à l'origine d'autres interactions qui peuvent être synergiques ou antagonistes à l'acide lactique.

Cette complexité de la composition du lactosérum peut expliquer l'activité antibactérienne obtenue dans le lactosérum non acidifié ; celle-ci peut résulter d'autres composants outre l'acide lactique, parmi eux, la lactoferrine, une glycoprotéine présente dans le lactosérum (Sottiez, 1990), qui a un effet antibactérien vis-à-vis les bactéries présentant un besoin en fer important (Valenti et Antonini, 2005 ; Legrand *et al.*, 2008 ; Jenssen et Hancock, 2009).

En revanche, pour *S. aureus*, aucune zone d'inhibition n'a été observée pour le lactosérum acidifié. Ceci est conforme aux résultats rapportés par d'autres auteurs (Miller et Kaspar, 1994 ; Arnold et Kaspar, 1995 ; Benjamin et Datta, 1995; Lin *et al.*, 1996) qui ont indiqué que la résistance aux acides est une caractéristique typique de cette souche.



Conclusion

Et

Perspectives

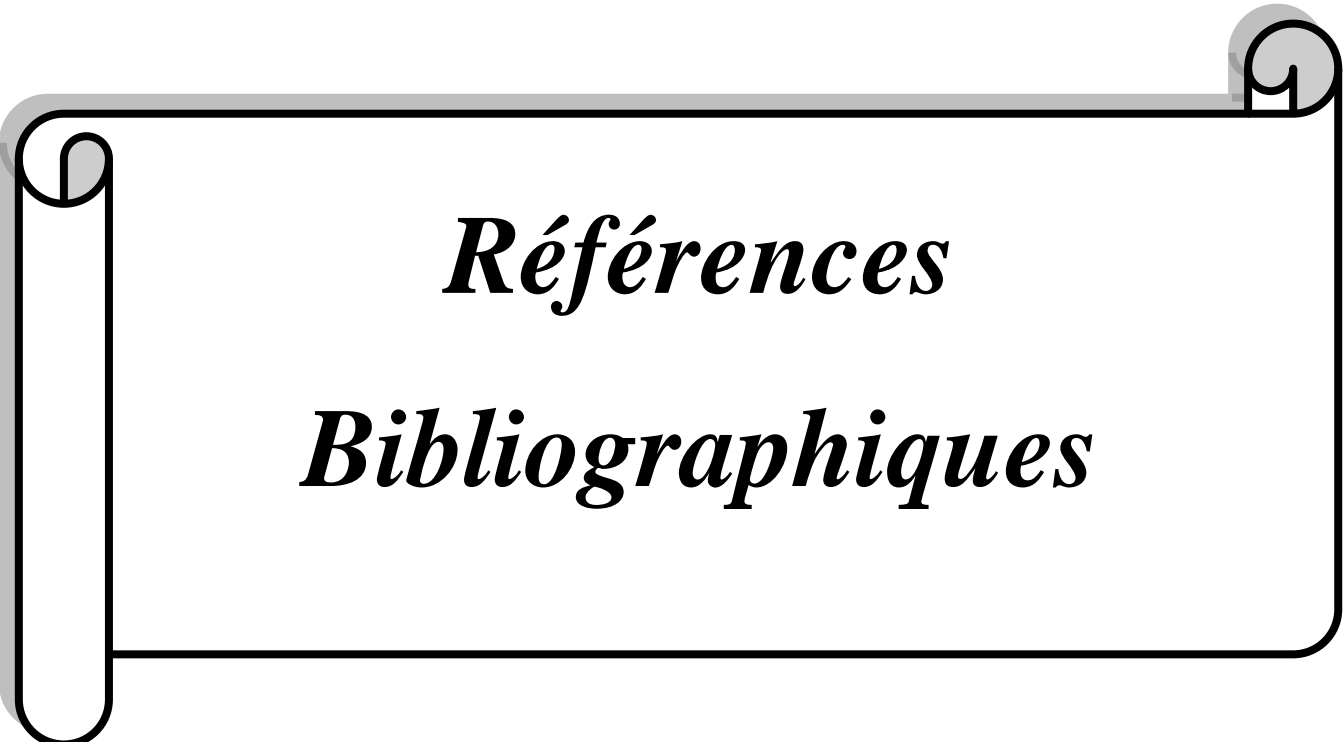
Conclusion et perspectives

Cette étude a pour objectif principal de déterminer in vitro l'effet antibactérien du lactosérum issu de la fabrication du fromage. Les résultats obtenus ont permis de révéler une activité antibactérienne du lactosérum plus ou moins importante vis-à-vis des souches testées, ceci laisse suggérer la possibilité de son utilisation comme agents antibactérien pour la conservation de divers produits en plus de sa propriété nutritionnelle enrichissante.

L'étude antibactérienne du lactosérum peut être approfondie par la recherche du principe actif et d'évaluer son effet antimicrobien et son efficacité à faible dose en vue de substituer le conservateur chimique par le naturel dans divers produits alimentaires tels que les produits laitiers, en biscuiterie ou en boulangerie.

La combinaison de plusieurs agents antimicrobiens peut ainsi être envisagée, cela vise à réduire leur concentration lors de leur incorporation dans divers produits principalement les produits alimentaires, ceci permettra de réduire leur incidence défavorable sur la qualité (sensorielle ou visuelle) du produit traité, ainsi que leur coût.

Toutefois, les résultats obtenus in vitro ne constituent qu'une première étape de recherche, ils doivent être validés par des études menées sur des matrices alimentaires avant de les appliquer à l'échelle industrielle.



Références
Bibliographiques

Références Bibliographiques

A

Achour M. (1994). Contribution à l'étude du traitement d'effluents agro-industriels par extraction liquide-liquide. Mise au point d'un procédé continu de séparation des acides tartrique et lactique. Thèse de doctorat : institut national polytechnique de Toulouse.

Adrian J., Legrand G., Frangne R. (1991). Dictionnaire de biochimie alimentaire et de nutrition. *Lavoisier Tec et doc*. 3ème édition : 116. Amylolytic bacterial lactic acid fermentation. A review : *Biotechnol. Adv.* 26, 22–34.

AFNOR. (1980). Recueil de norme française lait et les produits laitier. ed .paris.

AFNOR. (1986). Contrôle de la qualité des produits laitiers, analyses physique et chimique, troisième édition.

Aït Kaki A. (2004). Isolement de la moisissure *Rhizopus oryzae* et optimisation d'un milieu à base de lactosérum pour la production de l -amylase. Thèse de Magistère. Université Mentouri, Constantine.

Alais C. (1984). La valorisation du lactosérum «les bases et les problèmes». *Technique laitière*. 952, 7-10.

Alakomi H-L., Skytta E., Saarela M., Mattila-Sandholm T., Latva-Kala K., Helander I-M. (2000). Lactic Acid Permeabilizes Gram-Negative Bacteria by Disrupting the Outer Membrane. *Applied and environmental microbiology*. 66(5), 2001-2005.

Anonyme 1 : Tetra Pack Processing System. (1995). Manuel de transformation du lait. Suède. 442.

Anonyme 2: France AgriMer. (2013). Le marché mondial du lactosérum. <https://www.franceagrimer.fr/content/download/26218/220370/file/SYN-LAI-2Lactos%C3%A9rum.pdf>. Consulté le 29/05/2019.

Anonyme 3 : Institut Pasteur. (2016). Le staphylocoque doré. <https://www.pasteur.fr/fr/centre-medical/fiches-maladies/staphylocoque>. Date de consultation 24/05/2019.

Références Bibliographiques

Anonyme 4 : Institut Pasteur. (2018). Escherichia coli (E. coli). <https://www.pasteur.fr/fr/centre-medical/fiches-maladies/escherichia-coli>. Date de consultation 24/05/2019.

Anonyme 5 : OMS (Organisation mondiale de la santé). (2018). Escherichia coli (E. coli). <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/e-coli>. Date de consultation 24/05/2019.

Arnold K-W., Kaspar W-C. (1995). Starvation and stationary phase induced acid tolerance in *Escherichia coli* O157:H7. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 2037–2039.

Auliffe M-K-W., Scotter D-R., Macgregor A-N., Earl K-W. (1982). Casein whey waste water effects on soil permeability. *Journal of Environmental Quality.* 11, 31 - 34.

B

Banwart G-J. (1989). Basic Food Microbiology. New York, Van Nostrand Reinhold.

Bell L-N., White K-L. (2000). `Thiamin stability in solids as affected by the glass transition'. *Journal of Food Science.* 65 (3), 498-501.

Benjamin M-M., Datta R-A. (1995). Acid tolerance of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 1669–1672.

Bennett R-W. (2001). *Staphylococcus aureus*. In : Guide to foodborne pathogens Labbé. (Eds). *John Wiley and Sons, Inc.* New York, USA. 201-220.

Berry D. (2000). Ingredients foods. *Dairy Foods.* 101 (4), 32.

Bhunja A-K., (2008). *Staphylococcus aureus*. In: Foodborne Microbial Pathogens. Edition: *Springer Science, Bsiness Media LLC. Springer.* New York. 276p.

Blanc B. (1969). Lactosérum et produits dérivés: aspects compositionnels et nutritionnels (dans le cas de l'homme). Séminaire F.LL.-LD.F. de Weihenstephan, 11-13.

Bouchardon A., Brisabois A., Chaslus-Dancla E., Colin P., Dabernat H., Guillemot D. (2006). Diffusion de la résistance à l'Homme et conséquences pour la santé publique. In : Usages vétérinaires des antibiotiques, résistance bactérienne et conséquences pour la santé humaine. *AFSSA.*

Références Bibliographiques

Budslawski J., Pogorzelski K. (1964). Fermentation du lactose dans les différentes variétés de fromages. *Le Lait. INRA Editions.* 44 (438), 496-505.

C

Charlier C., Cretenet M., Even S., Le Loir Y. (2009). Interaction between *Staphylococcus aureus* and lactic bacteria: an old story with new perspectives. *Food Microbiol.* 131 (1), 30-39.

Chenjie W., Tong C., Hong Y., Min C. (2015). Antibacterial mechanism of lactic acid on physiological and morphological properties of *Salmonella Enteritidis*, *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes*. *Food Control.* 47 (2015), 231-236.

Cinelli P., Schmid M. Bugnicourt E. Wildner J. Bazzichi A. Anguillesi I. Lazzeri A. (2014). Whey protein layer applied on biodegradable packaging film to improve barrier properties while maintaining biodegradability. *Polymer Degradation and Stability*, 108, 151-157.

Collet J., Sales M. (1971). Le lactosérum - Origine et composition - Technologie - Utilisation dans l'alimentation du veau et du porc. Mémoire de fin d'études E.N.S.A, Rennes.

Cousin M-A. (1996). Food Microbiology Course Notes. Purdue University, West Lafayette.

D

Datta R., Tsai S-P., Bonsignor P., Moon S., Frank J. (1995). Technological and economical potential of polylactic acid and lactic acid derivatives. *FEMS Microbiol. Rev.* 16, 221-231.

De Wit J-N., Hontelez-Backx E. (1981). Les propriétés fonctionnelles des protéines du lactosérum ; conséquences des traitements thermiques. *La technique laitière.* 952, 19-22.

De Witt J-N. (2001). Manuel de l'enseignant sur le lactosérum et les produits de lactosérum. 1ère édition. European whey products association. Bruxelles, Belgique.

Dryer J. (2001). La grande diversité du lactosérum. *Dairy foods* .102 (5), 35p.

Références Bibliographiques

Ducluzeau R., Raibaud P. (1985). Microbial ecology of the digestive system. *Agressologie: revue internationale de physio-biologie et de pharmacologie appliquées aux effets de l'agression.* 26 (2), 161-163.

Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schkeufer K-H., Stackebrandt E. (2006). *The Prokaryotes: Bacteria: Firmicutes, Cyanobacteria.* 3^{ème} édition. *Springer.* New-York.

E

Eklund T. (1989). Organic acids and esters. *In: Gould, G.W. (Ed.), Mechanisms*

of Action of Food Preservation Procedures, Elsevier Applied Science. London. 161-200.

Eswaranandam S., Hettiarachchy N., Johnson M-G. (2004). Effect of citric, lactic, malic, and tartaric acids on antimicrobial activity of nisin-incorporated soy protein film against *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella*. *Gaminara. J. Food Sci.* 69, 79–84.

Eyque M-A., Alouf J., Montagnier L. (1998). *Traité de Microbiologie Clinique «Staphylocoques»* Nevine EL SOLH. PICCIN NUOVA. Italie. 567-591.

F

FAO-ONU (Organisation des Nations unies pour l'Alimentation et l'Agriculture-Organisation des Nations Unies). (2017). Production alimentaire: fromage (Algérie). <http://perspective.usherbrooke.ca/bilan/servlet/BMTendanceStatPays?codeTheme=5&codeStat=RSA.FAO.CheeseAllKinds&codePays=DZA&optionsPeriodes=Aucune&codeTheme2=5&codeStat2=RSA.FAO.CheeseAllKinds&codeays2=DZA&optionsDetPeriodes=avecNomP&forceAxe=on>. Date de consultation 26/04/2019.

Fauquant J., Vieco E., Brule G., Maubois, J-L. (1985). Clarification des lactosérums doux par agrégation thermocalcique de la matière grasse résiduelle. *Le lait.* 65(647-648), 1-20.

Février C. (1972). Réunion A.F.T.A.A, Grignon.

Fruteau de Lacos H., Membrez Y. (2004). Energie a partir de petit-lait: comparaison des filières biogaz et bioéthanol. Programme de recherche énergétique Biomasse Office fédéral de l'énergie. Suisse.

Références Bibliographiques

G

Gana S., Touzi A. (2001). Volarisation du lactosérum par la production de levures lactiques avec les procédés de fermentation discontinue et continue. *Rev. Energ. Ren.* 51-58.

Gordon D-M., Cowling A. (2003). The distribution and genetic structure of *Escherichia coli* in Australian vertebrates: host and geographic effects. *Microbiology.* 149 (12), 3575-3586.

Gouget C. (2011). Additifs alimentaires. Dongern. P(31-35-37-38-39-51-52-95).

Guiraud J., Galzy. (1998). Microbiologie alimentaire. Edition *dunod*. Paris. p 137.

H

Hayes K-D., Nielsen S-S. (2000). `Plasmin levels in fresh milk whey and commercial whey protein products'. *Journal of Dairy Science.* 83 (3), 387-394.

Helander I-M., Von Wright A., Mattila-Sandholm T. (1997). Potential of lactic acid bacteria and novel antimicrobials against gram-negative bacteria. *Trends Food Sci. Technol.* 8, 146–150.

Heslot H. (1996). L'ingénierie des protéines et ses applications. *Lavoisier Tec et Doc.* 424-432.

Houtsma P-C., Wit., C-J., Rombouts M-F. (1993). Minimum inhibitory Concentration (MIC) of sodium lactate for pathogens and spoilage organisms occurring in meat products. *Int. J. Food Microbiol.* 20, 247–257.

Hug-iten S., Handschin S., Conde-petit B., Escher F. (1999). `Changes in starch microstructure on baking and staling of wheat bread'. *Lebensmittel-Wissenschaftund Technologie.* 32 (5), 255-260.

I

Ibrahim A-S., Yang H., SEO W-C. (2008). Antimicrobial activity of lactic acid and copper on growth of *Salmonella* and *Escherichia coli* O157:H7 in laboratory medium and carrot juice. *Food Chem.* 109, 137–143.

Imbert-Pondaven A. (1977). Étude de l'évolution de la composition des lactosérums au cours de leur conservation. *Le Lait. INRA Editions.* 57 (568), 521-546.

Références Bibliographiques

J

Jay J-M. (2000). Modern Food Microbiology, Gaithersburg, MD, Aspen Publishers.

Jenssen H., Hancock R-E. (2009). Antimicrobial properties of lactoferrin. *Biochimie.* 91, 19-29.

Jouan P. (2002). Lactoprotéines et lactopeptides: propriétés biologiques. Ed. Quae. INA. 127p.

K

Kilcast D., Subramaniam P. (2000). The Stability and Shelf-life of Food, Boca Raton, FL, CRC Press. *Woodhead Publishing.*

King L-A., Loukiadis E-P., Mariani-Kurkdjian S., Haeghebaert F-X., Weill C., Baliere S., Ganet M., Gouali V., Vaillant N., Pihier H., Callon R., Novo O., Gaillot D., Thevenot-Sergentet E., Bingen P., Chaud and H de Valk. (2014). Foodborne transmission of sorbitol-fermenting *Escherichia coli* O157:[H7] via ground beef: an outbreak in northern France, 2011. *Clinical Microbiology and Infection.* 20 (12), 1136-1144.

Kluytmans J., Van Belkum A., Verbrugh H. (1997). Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. *Clin Microbiol Rev.* 10, 505-520.

Kosikowski F-V. (1979). Whey utilization and whey products. *Journal of dairy Science* 62(7), 1149-1160.

L

Labuza T-P., Szybist L-M. (2001). Open Dating of Foods, Trumbull, CT., *Food & Nutrition Press.*

Laplanche J. (2004). Système d'épuration du lactosérum d'alpage par culture fixée sur lit de compost. *Revue suisse Agric.* 36(5), 220-224.

Leghlimi H. (2004). Optimisation de la production de la cellulase d'*Aspergillus niger* ATCC 16 404 cultivé sur un milieu à base de lactosérum : étude comparative entre *Aspergillus niger* ATCC 16 404 et *Aspergillus niger* O.Z isolée localement. Thèse de Magistère. Université Mentouri, Constantine.

Références Bibliographiques

Legrand D., Pierce A., Elass E. (2008). Lactoferrin structure and functions. *Adv Exp Med Biol* ; 606, 163-94.

Lievonen S-M., Laaksonen T-J., Roos Y-H. (2002). `Nonenzymatic browning in food models in the vicinity of the glass transition: effects of fructose, glucose and xylose as reducing sugar'. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50 (24), 7034-7041.

Lin H-T., Wang F-S. (2007). Optimal design of an integrated fermentation: process for lactic acid production. *Am. Inst. Chem. Eng. J.* 53 (2), 449-459.

Lin J., Smith P-M., Chapin C-K., Baik S-H., Bennett N-G., Foster W-J. (1996). Mechanisms of acid resistance in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 3094–3100.

Lipinsky ES., Sinclair RG. (1986). Is lactic acid a commodity chemical? *chem eng prog.* 82, 26-32.

Litchfield J-H. (1996). Microbiological production of lactic acid. *Adv. Appl. Microbiol.* 42, 45-95.

Lowisfert S. (1994). Recyclage du lactosérum issu de la transformation fromagère dans l'alimentation animale. *Bulletin technique UC AAB.* 2, 11-17.

Luquet F-M., Boudier J-F. (1990). Utilisation des lactosérums en alimentation humaine et animale. *Apria.* 21, 1-7.

M

Macwan S-R., Dabhi B-K., Parmar S-C., Aparnathi K-D. (2016). Whey and its Utilization. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences.* 5(8), 134-155.

Madec J-Y., Poirel L., Saras E., Gourguechon A., Girlich D., Nordmann P. (2012). *Escherichia coli* from cattle harbouring human-like *bla*(CTX-M-15)-carrying plasmids. *J Antimicrob Chemother.* 67(3), 578-581.

Marshall W-L., Franck E-U. (1981). "Ion product of water substance, 0-1000C, 1-10000 bars". *J. Phys. Chem.* 10 (2), 295-304.

Références Bibliographiques

Marwaha S-S., Kennedy J-F., (1988). Whey-pollution problem and potential utilization. International Journal of Food Science and Technology. *Int. J. Food Sci. Technol.* 23, 323 - 336.

McIntoch G-H. (1998). Whey proteins as functional food ingredients. *Dairy J.* 8, 425-434.

Miller L-G., Kaspar W-C. (1994). *Escherichia coli* O157:H7 acid tolerance and survival in apple cider. *J. Food Prot.* 57, 460–464.

Moletta R. (2002). Gestion des problèmes environnementaux dans les IAA. *Ed. Tech et Doc.* Paris .600p.

Morr C-V. (1989). Whey proteins: manufacture. *Developments in dairy chemistry.* 4(6), 245-284.

N

Nauciel C., Vildé J-L. (2005). Principales familles d'antibiotiques et leur mode d'action. Edition : *Masson.* Paris .49-56.

Naveena B-J., Altaf M-D., Bhadriah K., Reddy G. (2004). Production of L(+) lactic acid by *Lactobacillus amylophilus* GV6 in semi-solid state fermentation using wheat bran, *Food Technol. Biotechnol.* 42, 147–152.

Nikaido H. (1996). Outer membrane. In : *Escherichia coli and Salmonella typhimurium: Cellular and Molecular Biology (F.C. Neidhardt, ed.).* 29–47, American Society of Microbiology Press, Washington, DC.

Nikaido H., Vaara T. (1985). Molecular basis of bacteria outer membrane permeability. *Microbiol. Rev.* 49, 1–32.

Nouwen J-L., Van Belkum A., Verbrugh H-A. (2001). Determinants of *Staphylococcus aureus* nasal carriage. *The Netherlands J. Med.* 59, 126-33.

Novick P-R., Schevert P., Ruzin A. (2001). Pathogenicity and Resistance Islands of Staphylococci. *Journal of Microbes and Infections.* 3, 585-594.

Références Bibliographiques

O

OECD-FAO (Organisation de Coopération et de Développement économiques- Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture). (2011). "Perspectives agricoles de l'OECD-FAO 2011- 2020". 9, 159-173.

P

Panesar P-S., Kennedy J-F. (2012). Biotechnological approaches for the value addition of whey. *Critical reviews in biotechnology*. 32(4), 327-348.

Piard J-C., Desmazeand M. (1991). Inhibiting factors produced by lactic and bacteria part L.oxygen metabolites and catabolism end-products. *Lait*. 71, 525-541.

Piazza L., Masi P. (1995). 'Moisture redistribution throughout the bread loaf during staling and its effect on mechanical properties'. *Cereal Chemistry*. 72 (3), 320-325.

R

Reddy G., Altaf M-D., Naveena B-J., Venkateshwar M., VijayKumar E. (2008). Amylolytic bacterial lactic acid fermentation - a review. *Biotechnol Adv.* 26(1), 22-34.

Robinson R-K., Batt C-A., Patel P-D. (2000). *Encyclopaedia of Food Microbiology*, New York, Academic Press.

Roth L-A., Keenan D. (1971). Acid injury in *Escherichia coli*. *Can. J. Microbiol.* 17, 1005–1008.

S

Schnürer J., Magnusson J. (2005). Antifungal lactic acid bacteria as biopreservatives. *Food Sc. Technol.* 16, 70-78.

Shah N-P. (2007). Functional cultures and health benefits. *International Dairy Journal*. 17, 1262-1277.

Sienkiewicz T., Riedel C-L., Verlag T., Mann G-B., (1992). Whey and whey utilization. *International Dairy Journal*. 2, 6, 373 - 375.

Références Bibliographiques

Singh R. et Anderson B. (2004). The major types of food spoilage: an overview. *In* : Steele R (ed.). Understanding and measuring the shelf-life of food. Edition *Woodhead*. Publishing Limited: Cambridge, Angleterre. 3-23.

Smati M., Clermont O-F., Le Gal O., Schichmanoff F., Jauréguy A., Eddi E., Denamur B., Picard C. (2013). Real-time PCR for quantitative analysis of human commensal *Escherichia coli* populations reveals a high frequency of subdominant phylogroups. *Applied and Environmental Microbiology*. 79 (16), 5005-5012.

Smithers G-W. (2008). Whey and whey proteins From ‘gutter-to-gold’. *Int. Dairy J.* 18 (7), 695-704.

Sottiez P. (1985). Produits dérivés des fabrications fromagères. Laits et produits laitiers: vache, brebis, chèvre. Société scientifique d'hygiène alimentaire. François M. Luquet, coordonnateur, assiste de Yvette Bonjean-Linczowski ; prefaces de J. Keilling, R. de Wilde.

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

Spinnler H-E. (1998). Technologies de transformation des produits agroalimentaires. Techniques de l'ingénieur. F1 170, 1-14.

Stanojevic-Nikolic S., Dimic G., Mojovic L., Pejcin J., Djukic-Vukovic A., Kocic - Tanackov S. (2015). Antimicrobial activity of lactic acid against pathogen and spoilage microorganisms. *Journal of Food Processing and Preservation*. 1745-4549.

T

Tango M-S-A., Ghaly A-E. (1999). Amelioration of lactic acid production from cheese whey using micro-aeration. *Biomass and bioenergy*. 17, 3, 221 - 238.

Tebbouche L. (2012). Centre de Développement des Energies Renouvelables.

Tenaillon O., Skurnik D., Picard B., Denamur E. (2010). The population genetics of commensal *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*. 8 (3), 207-217.

Tharmaray N., Shah N-P. (2009). Antimicrobial effects of probiotics against selected pathogenic and spoilage bacteria in cheese-dips. *Int. Food Res. J.* 16, 261–276.

Toumi K-H. (2009). Modélisation et identification paramétrique des processus de

Références Bibliographiques

fermentation lactique. Magistère en Génie Chimique. Université Ferhat ABBAS. Setif, Algérie.

U

Um M-M. (2016). Escherichia coli entérohémorragiques et/ou résistantes aux antibiotiques : contamination des effluents d'origine bovine. Science des productions animales. Université Paul Sabatier : Toulouse III.

V

Vaara M. (1992). Agents that increase the permeability of the outer membrane. *Microbiol. Rev.* 56, 395–411.

Valenti P., Antonini G. (2005). Lactoferrin : an important host defence against microbial and viral attack. *Cell Mol Life Sci* ; 62, 2576-87.

Veisseyre R. (1975). Technologie du lait: constitution, récolte, traitement et transformation du lait 3.

Vicroy TB. (1985). Lactic Acid. *Blanch HW, Drew S, Wang DIC*, editors. Comprehensive Biotechnology. 3, 761–76. Oxford, Pergamon.

Violleau V. (1999). Valorisation du lactosérum par électrodialyse. Thèse de doctorat. Montpellier.

Von Freiling P., Schugerl K. (1999). Recovery of lactic acid from aqueous model solution and fermentation broths. *Process Biochem.* 34, 685-696.

Vrignaud Y. (1983). Valorisation du lactosérum, une longue histoire. *Revue laitière Française.* 422, 41-46.

W

Wasewar KL., Yawalkar AA., Moulijn JA., Pangarkar VG. (2004). Fermentation of glucose to lactic acid coupled with reactive extraction. A Review *Ind Eng Chem Res.* 43, 5969-5982.

Woo A. (2002). La grande diversité du lactosérum. Agriculture et agroalimentaire. Canada. 3-13.

Références Bibliographiques

Y

Yang S-Y., Jones J-H., Olsen F-J., Peterson J. (1980). Soil as a medium for dairy liquid waste disposal. *Journal of Environmental Quality*. 9, 370 - 372.

Yuk H-G., Yoo., M-Y., Yoon J-W., Marshall D-L., Oh D-H. (2007). Effect of combined ozone and organic acids treatment for control of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* on enoki mushroom. *Food Control* 18, 548–553.

Z

Zhang B., He P-J., Ye N-F., Shao L-M. (2008). Enhanced isomer purity of lactic acid from the non-sterile fermentation of kitchen wastes. *Biores. Technol.* 99, 855–862.

Zeng X., Tang W., Ye G., Ouyang T., Tian L., Ni Y. (2010). Studies on disinfection mechanism of electrolyzed oxidizing water on *E. coli* and *Staphylococcus aureus*. *Journal of Food Science*. 75(5), 253-260.



Annexes

Annexe 1 : matériel inerte

2.1. Instruments de laboratoire

- Bain marie
- Balance de précision
- Bec bunsen
- Becher
- Boîtes de Pétri
- Burette
- Butyromètre
- Capsule en aluminium
- Centrifugeuse GERBER
- Dessiccateur électronique
- Disques d'antibiotique (ampicilline)
- Disques stériles (6 mm)
- Embouts (jaunes et blancs)
- Eprouvette
- Erlenmeyer de 200 ml
- Etuve
- Fiole (10 ml)
- Glacière
- Micropipette (100µl)
- pH mètre
- Pince stérile
- Pipette Pasteur
- Pipettes (1 ml, 10 ml)
- Réfrigérateur
- Thermo-lactodensimètre
- Thermomètre
- Tubes à essais stériles
- Tubes d'éppendorf

2.2. Réactifs

- Acide lactique
- Acide sulfurique (91%) H_2SO_4
- Acide sulfurique (96%) H_2SO_4
- Alcool isoamylique
- Chlorures de barium $BaCl_2$
- Eau distillée stérile
- Eau physiologique (0,09%)
- Hydroxyde de sodium NaOH (N/9)
- Phénolphtaléine

2.3. Milieux de culture

- Milieu de culture Chapman
- Milieu de culture ECC
- Milieu de culture MH
- Milieu de culture OGA
- Milieu de culture VRBL

Annexe 2 : préparation de la solution Mc Farland

Les étalons de turbidité Mc Farland sont préparés en mélangeant divers volumes d'acide sulfurique à 1% et de chlorure de baryum (à 1%) pour obtenir des solutions de densité optique spécifique. Un standard de turbidité de 0,5 Mc Farland fournit une densité optique comparable à la densité d'une suspension bactérienne de $1,5 \times 10^8$ unités formant des colonies (UFC / ml). 0,5 Mc Farland standard est disponible dans le commerce.

Pour effectuer des tests de sensibilité aux antimicrobiens en utilisant la **méthode de diffusion sur disque de Kirby Bauer**, une suspension cellulaire d'organismes équivalente à une norme de 0,5 Mc Farland est utilisée.

Mode opératoire :

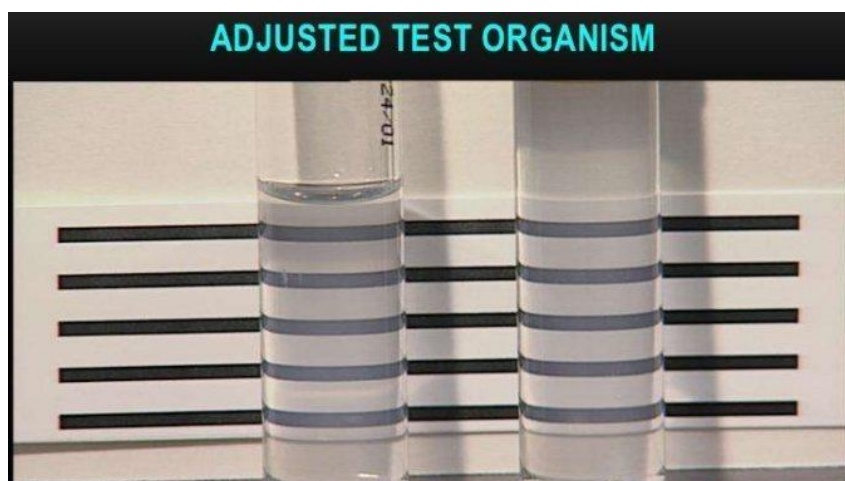
- Préparer la solution à 0,5 Mc Farland en versant 0,5 ml d'une solution de BaCl_2 à 1% (10g/l d'eau distillée), dans une éprouvette de 100ml. Compléter à 100ml avec du H_2SO_4 à 1% (10ml/l d'eau distillée). Ainsi préparé, il doit avoir une D.O. de 0,08 à 0,1 lue à 625nm.
- Aliquoter la solution en volumes de 10 ml, dans des tubes identiques à ceux qui serviront à la préparation des inocula.
- Sceller ces tubes de façon à éviter toute évaporation (parafilm, ruban adhésif...).
- Placez le mélange obtenu dans un tube à capuchon recouvert d'une feuille d'aluminium.
- Conservez l'étalon Mc Farland à la température ambiante (25°C) lorsqu'il n'est pas utilisé. La solution de densité standard Mc Farland précipitera et s'agglomérera au fil du temps, et nécessite un vortex vigoureux avant chaque utilisation. Marquez le tube pour indiquer le niveau de liquide et vérifiez avant utilisation pour vous assurer qu'il ne s'est pas évaporé.
- Préparez une nouvelle solution standard tous les 6 mois.

Tableau : Les normes de turbidité Mc Farland.

Norme de turbidité McFarland no.	0.5	1	2	3	4
1% de chlorure de baryum (ml)	0,05	0,1	0,2	0,3	0,4
1% d'acide sulfurique (ml)	9.95	9.9	9.8	9.7	9,6
Environ. densité cellulaire (1×10^8 UFC / ml)	1,5	3	6	9	12

La densité de la suspension de cellules bactérienne est comparée à l'étalon de turbidité Mc Farland (étalon de turbidité 0,5 Mc Farland pour les tests de sensibilité aux antimicrobiens) en maintenant la suspension de l'étalon devant un feu sur un fond blanc avec des lignes noires contrastantes (Figure).

Si la densité est trop lourde, la suspension doit être diluée avec une solution saline ou un bouillon (selon ce qui a été utilisé pour préparer la suspension). Si la densité est insuffisante, des bactéries supplémentaires doivent être ajoutées à la suspension. Les suspensions ajustées doivent être utilisées comme inocula dans les 15 minutes.



Annexe 3 : Résultats des analyses microbiologiques



Figure : Photo montrant le résultat du dénombrement de la flore totale aérobie mésophile dans le lactosérum

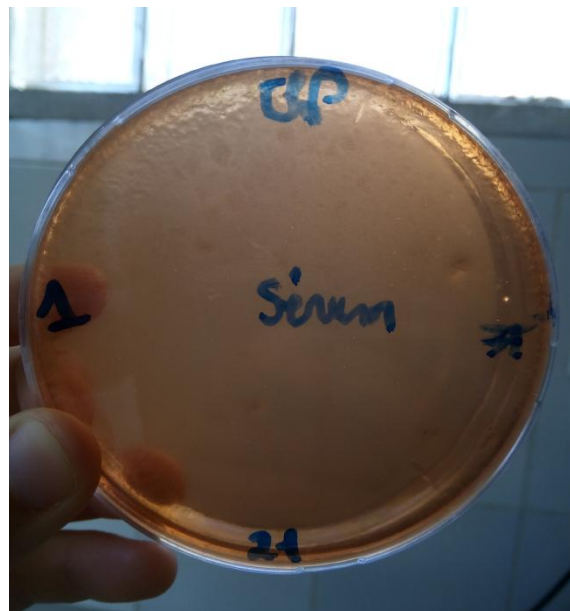


Figure : Photo montrant le résultat la recherche de *Staphylococcus aureus* dans le lactosérum



Figure : Photo montrant le résultat de la recherche de *Escherichia coli* dans le lactosérum

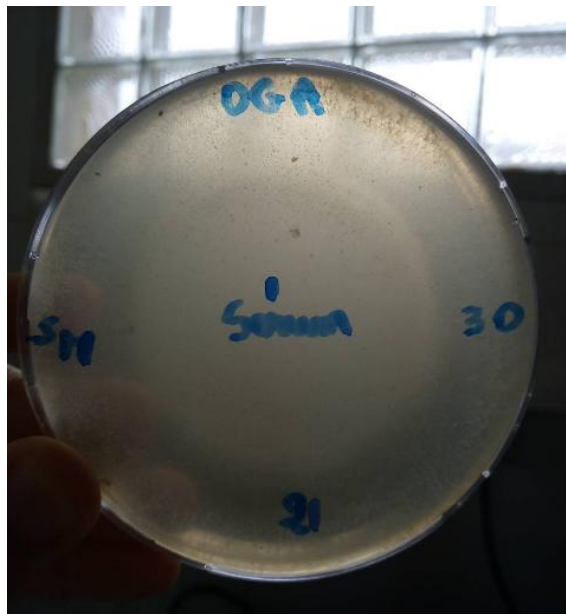


Figure : Photo montrant le résultat de dénombrement des levures et moisissures dans le lactosérum

Abstract

This study is part of the valorization of whey, which is a by-product of the dairy industry. The objective is to study in vitro the antibacterial activity of whey resulting from the manufacture of pressed cheese against two bacterial strains pathogenic and alteration.

To evaluate the antibacterial effect of whey, we tested in vitro two samples, the first is kept at 6 ° C and the second is kept at room temperature to push its acidification by lactic ferments.

The results of the antibiogram showed a moderate inhibitory effect against the *E. coli* bacterium, because of the interference of lactic acid in its membrane permeability, while for *S. aureus*, no effect was observed.

The results of this study suggest the possibility of using whey in combination with other bioactive substances for possible food bioconservation.

Key-words : whey, lactic acid, antibacterial, bioconservation, valorization.

Résumé

Cette étude rentre dans le cadre de la valorisation du lactosérum qui est un sous-produit de l'industrie laitière. L'objectif étant d'étudier *in vitro* l'activité antibactérienne du lactosérum issu de la fabrication du fromage à pâte pressée contre deux souches bactériennes pathogènes et d'altération.

En vue d'évaluer l'effet antibactérien du lactosérum, nous avons testé *in vitro* deux échantillons, le premier est conservé à 6°C et le deuxième est conservé à température ambiante afin de pousser son acidification par les ferments lactiques.

Les résultats de l'antibiogramme ont montrés un effet inhibiteur modéré envers la bactérie *E. coli*, du fait de l'interférence de l'acide lactique dans sa perméabilité membranaire, tandis que pour *S. aureus*, aucun effet n'a été observé.

Les résultats de cette étude suggèrent la possibilité d'utilisation du lactosérum en combinaison avec d'autres substances bioactives pour une éventuelle bioconservation des aliments.

Mots clés : lactosérum, acide lactique, antibactérien, bioconservation, valorisation.