

République Algérienne Démocratique et Populaire Ministère de l'enseignement  
supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Abderrahmane MIRA de Bejaïa  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie  
Département de Microbiologie

*Mémoire de Fin de Cycle en vue de l'obtention du diplôme de Master en  
Microbiologie Alimentaire Santé*

## *Thème*

Etude de l'activité antibactérienne de *Leuconostoc  
mesenteroides* ssp. *mesenteroides* vis-à-vis *Staphylococcus  
aureus* dans un fromage frais à base de lait de chèvre,  
conservé ou non dans l'huile d'olive ou dans le lactosérum

### Réalisé par :

*M<sup>lle</sup> MEKBOUL Sonia*

*M<sup>lle</sup> YOUNI Louiza*

### Membres du Jury :

*Promotrice : M<sup>me</sup> FARADJI S.      MCB*

*Président : M<sup>me</sup> BENACHOUR K.    MAA*

*Examinatrice : M<sup>me</sup> Bendali F.      MCA*

*Examineur : M<sup>r</sup> Bendjedou K.      MCB*

*Promotion 2013/2014*

# Remerciements

*Nous remercions, Dieu, le tout puissant pour nous avoir donné la foi qui nous a guidé jusqu'à la réalisation et l'aboutissement de ce travail.*

*Tout d'abord, nous tenons à remercier notre promotrice **M<sup>me</sup> Faradji-Hamma Samia**, pour sa qualité d'enseignement, pour le suivi qu'elle nous a accordé au déroulement de ce mémoire, nous vous somme très reconnaissantes de nous avoir encadré, d'avoir dirigé ce travail et d'avoir veillé à son élaboration en ne ménageant aucunement votre temps et vos conseils.*

*Nous adressons nos sincères remerciements à **M<sup>me</sup> Benachour** qui nous a fait l'honneur de présider le jury.*

*Nous remercions également **M<sup>r</sup> Bendjedou** et **M<sup>lle</sup> Bendali** d'avoir accepté d'examiner ce travail.*

*Nos remerciements s'adressant à **M<sup>r</sup> Atrouche** chef de service au niveau de l'entreprise Tchén-lait Candia.*

*Nous ne pourrions terminer, sans remercier toute l'équipe du laboratoire de Microbiologie et tout particulièrement nos camarades pour leur soutien et leur esprit d'équipe, et à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail ou qui nous ont encouragé et soutenu à tout moment.*

# *Dédicaces*

*En hommage et à la mémoire de ma grand-mère « Yamina »*

*Aux êtres les plus chers à mon cœur dans ce monde, mes parents, pour leur soutien inconditionnel, leur sacrifice, merci beaucoup.*

*A mes sœurs Radia et Ryma.*

*A mes frères Tarik et Hakim.*

*Le plus grand merci A mon fiancé Azeddine Salmi, qui m'a soutenu et encouragé durant la préparation de ce mémoire. Mille merci.*

*A mes beaux parents et à toute ma belle-famille.*

*A ma chère amie warda.*

*A Louiza*

*A toute la promotion M A S 2014.*

*Sonia*



# Dédicaces

*Avec l'aide du Dieu le tout puissant, est enfin achevé ce travail, lequel je dédie à toutes les personnes qui me sont chères :*

*A mes très chers parents qui m'ont tout donné. Qui ont toujours été là pour moi, et qui m'ont donné un magnifique modèle de labeur et de persévérance. J'espère qu'ils trouveront dans ce travail toute ma reconnaissance et tout mon amour.*

*Mes dédicaces vont particulièrement à une personne chère à mes yeux, qui a toujours été présente dans les pires et les meilleurs moments de mon cursus, Makhloufi Abdelhalim.*

*A mes adorables frères ; Zidane et Lyes.*

*A mes sœurs ; Kamila, Lynda, Nassiba, Souheleine et Tiaa à ma belle-sœur ; Dida, ainsi qu'à mes beaux frères ; Djebare, Mourad et Saadi, à qui je souhaite une vie pleine de bonheur, de santé et de réussite.*

*A mes neveux et nièces ; Manis, Alicia, Aris, Anais, Icrame, Imane, Lyticia, Mouhamed Amine et Damia*

*Tous mes amies spécialement Warda, Lilia, Farida, Loubna, ...*

*A Sonia*

*Je n'oublierai pas la section MAS 2014.*

**Louiza**



## *Liste des abréviations*

**AW** : Activity of Water

**BCPL** : Broth with bromocresol purple

**°D** : Degré Dornic

**EMB** : Eosin Methyl Blue

**FTAM** : Flore Totale Aérobic Mésophile

**GC** : Giolotti Contoni

**J.O.R.A** : Journal Officiel de la République Algérienne

**Ln.** : *Leuconostoc*

**meq** : milliéquivalents

**MRS**: Rogosa and Sharpe

**NaOH** : hydroxyde de sodium

**PCA**: Plate Count Agar

**OGA** : Oxytetracycline –Glucose Agar

**S.** : *Staphylococcus aureus*

**SFB** : Selenite Cystine Broth

**SS** : *Salmonella-Shigella*

**Ssp.** : sous espèce

**T** : température

**pH**: potential d'hydrogène

**UFC** : Colony forming units

**VF** : Viande Foie

**VRBG** : Violet Red Bile Glucose Agar

**Meq /Kg** : mili équivalent par kilogramme

## *Liste des figures*

<b>Figure 1 :</b> Les étapes de la revivification de <i>Ln. mesenteroides</i> et de <i>S. aureus</i> et vérification de leur pureté.....	12
<b>Figure 2 :</b> Egouttage du caillé.....	20
<b>Figure 3:</b> Procédé de mise au point des fromages frais au lait de chèvre.....	24
<b>Figure 4 :</b> Résultat de l'activité antibactérienne de <i>Ln. mesenteroides ssp. mesenteroides</i> vis à vis <i>S. aureus</i> (Test de spot).....	29
<b>Figure 5 :</b> Résultat de l'analyse microbiologique du lait cru de chèvre.....	32
<b>Figure 6 :</b> Evolution de la croissance de <i>Leuconostoc mesenteroides ssp. mesenteroides</i> en culture pure dans les différents fromages.....	35
<b>Figure 7 :</b> Résultats de la détermination de l'acidité titrable de <i>Leuconostoc mesenteroides ssp. mesenteroides</i> en culture pure dans les différents fromages témoins.....	36
<b>Figure 8 :</b> Résultats de la mesure du pH de <i>Leuconostoc mesenteroides ssp. mesenteroides</i> dans les différents fromages.....	36
<b>Figure 9 :</b> Evolution de la croissance de <i>S. aureus</i> en culture pure dans les différents Fromages.....	37
<b>Figure 10 :</b> Résultats de la détermination de l'acidité titrable de <i>Staphylococcus aureus</i> en culture pure dans les différents fromages.....	38
<b>Figure 11 :</b> Résultats de la détermination du pH de <i>Staphylococcus aureus</i> en culture pure dans le fromage témoin.....	38
<b>Figure 12 :</b> Evolution de la croissance de <i>Leuconostoc mesenteroides ssp. mesenteroides</i> et <i>Staphylococcus aureus</i> en culture mixte dans les différents fromages.....	39
<b>Figure 13 :</b> Résultats de la mesure de l'acidité titrable de <i>Leuconostoc mesenteroides ssp. mesenteroides</i> et de <i>S.aureus</i> en culture mixte dans les différents fromages.....	41
<b>Figure 14 :</b> Résultats de la mesure du pH de <i>Leuconostoc mesenteroides ssp mesenteroides</i> et <i>S. aureus</i> en culture mixte dans les différents fromages.....	41

## *Liste des tableaux*

<b>Tableau I :</b> Composition moyenne d'un lait de chèvre.....	7
<b>Tableau II:</b> Composition moyenne d'un lactosérum.....	9
<b>Tableau III:</b> Analyse microbiologique du lait cru de chèvre.....	15
<b>Tableau IV :</b> analyse microbiologique du lait de chèvre stérilisé.....	16
<b>Tableau V:</b> Résultats de la vérification de la pureté des souches.....	28
<b>Tableau VI:</b> Valeurs du pH et de l'acidité titrable.....	30
<b>Tableau VII:</b> Résultats d'analyse de divers paramètres physico-chimiques de lait de chèvre.....	31
<b>Tableau VIII:</b> Critères microbiologiques du lait cru (J.O.R.A) en comparaison avec les résultats obtenus .....	33
<b>Tableau IX:</b> Résultats de l'analyse physico-chimique de l'huile d'olive.....	33

## ***Liste des tableaux en annexes***

**Annexe I :** Composition des milieux de culture

**Annexe II :** Matériel utilisé

**Annexe III :**

**Tableau I :** résultats de l'analyse microbiologique de lait cru de chèvre

**Tableau II :** Analyse microbiologique du lactosérum

**Tableau III :** Les dilutions du dénombrement des fromages frais

**Annexe IV :** Résultats du dénombrement de *Ln.mesenteroides* ssp. *mesenteroides* et de *S. aureus* dans le fromage frais ainsi la mesure du pH et de l'acidité titrable

**Tableau I :** Résultat du dénombrement de la culture pure de *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides* dans les fromages frais de chèvre conservés ou pas dans l'huile d'olive ou dans le lactosérum

**Tableau II :** Résultat de dénombrement de la culture pure de *Staphylococcus aureus* dans les fromages frais de chèvres sans et avec conservateur dans l'huile d'olive ou dans le lactosérum

**Tableau III :** Résultat de dénombrement de la culture mixte de *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides* et de *Staphylococcus aureus* dans les fromages frais de chèvre conservés ou pas dans l'huile d'olive ou le lactosérum

**Tableau IV :** Résultats de la détermination du pH et de l'acidité titrable de *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides* en culture pure dans les différents fromages

**Tableau V:** Résultats de la détermination du pH et de l'acidité titrable de *Staphylococcus aureus* en culture pure dans les différents fromages

**Tableau VI:** Résultats de la détermination du pH et de l'acidité titrable de *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides* et de *Staphylococcus aureus* en culture mixte dans les différents fromage

# Sommaire

<b>Introduction</b> .....	1
---------------------------	---

## *Synthèse bibliographique*

I- <i>Leuconostoc mesenteroides</i> ssp. <i>mesenteroides</i> .....	3
I.1. Historique.....	3
I-2- Classification.....	3
I-3- Caractères généraux .....	3
I-4-Effets antibactérienne de <i>Ln. mesenteroides</i> ssp <i>mesenteroides</i> .....	4
II- <i>Staphylococcus aureus</i> .....	4
II-1-Historique.....	4
II-2- Classification.....	5
II-3- Caractères généraux .....	5
II-4-Toxicité de <i>S. aureus</i> .....	5
III- Fromage frais de chèvre.....	6
III-1-Le lait de chèvre.....	6
III-2- Les ferments lactiques .....	7
III-3- Fromage frais.....	8
IV-Lactosérum .....	8
V- L'huile d'olive.....	9

## *Matériel et méthodes*

I- Lieu de la réalisation du travail .....	10
II- Origine des souches.....	10
III- Revivification et vérification de la pureté des souches.....	10
IV-Provenance du lait.....	13
V-Analyses du lait cru de chèvre .....	13
V-I-Analyses physico-chimiques .....	10
V-I-1-La composition du lait .....	13

V-I-2-Mesure du pH.....	14
V-I-3- Mesure de l'acidité titrable .....	15
V-II-Analyse microbiologique du lait cru de chèvre.....	15
VI-Stérilisation du lait.....	17
VII- Recherche de l'activité antibactérienne <i>in vitro</i> de la souche <i>Ln. mesenteroides</i> ssp. <i>mesenteroides</i> à l'égard de <i>S. aureus</i> par le test de spot.....	18
VIII-Standardisation des inocula bactériens .....	18
VIII-1- Préparation de l'inoculum standard de <i>Ln. mesenteroides</i> .....	18
VIII-2- Préparation de l'inoculum standard de <i>S. aureus</i> .....	19
IX-Mise au point des fromages frais au lait de chèvre.....	19
X-Analyses de l'huile d'olive et du lactosérum (utilisés pour la conservation des fromages).....	23
X-1- Analyses physico-chimiques de l'huile d'olive.....	24
X-2- Analyse microbiologique du lactosérum.....	25
XI- Suivi de l'activité antibactérienne de <i>Ln. mesenteroides</i> ssp. <i>mesenteroides</i> vis-à-vis de <i>S. aureus</i> dans les fromages frais.....	25

## ***Résultats et discussion***

I-Vérification de la pureté des souches .....	28
II- Mise en évidence de l'activité antibactérienne de <i>Ln. mesenteroides</i> ssp <i>mesenteroides</i> à l'égard de <i>S. aureus</i> par le test de spot .....	29
III-Standardisation des inocula bactériens .....	30
IV- Analyse du lait de chèvre.....	30
IV-1- Analyses physico-chimiques du lait cru de chèvre .....	30
IV-1-1- Mesure du pH et de l'acidité .....	30
IV-1-2- Mesure de divers paramètres physico-chimiques .....	31
IV-2- Analyse microbiologique de lait cru de chèvre .....	32
IV-3- Analyse microbiologique de lait stérilisé .....	33

V- Analyse microbiologique de lactosérum.....	33
VI- Analyses physico-chimique de l'huile d'olive .....	33
VII- Suivi de la cinétique de croissance de <i>S.aureus</i> et <i>Ln. mesenteroides ssp mesenteroides</i> en culture pure et en culture mixte dans les différents fromages .....	34
VII-1- Fromage frais au lait stérile.....	34
VII-2-Suivi de la cinétique de croissance de <i>Ln. mesenteroides ssp. mesenteroides</i> en culture pure dans les différents fromages.....	34
VII-3- Suivi de la cinétique de croissance de <i>S. aureus</i> en culture pure dans les différents fromages.....	37
VII-4-Suivi de l'activité antibactérienne de <i>S. aureus</i> et <i>Ln. mesenteroides ssp. mesenteroides</i> en culture mixte dans les différents fromages.....	39
<b>Conclusion</b> .....	43

**Références bibliographiques**

**Annexes**

Les bactéries lactiques sont un groupe hétérogène de microorganismes produisant de l'acide lactique comme produit principal de leur métabolisme. Elles colonisent de nombreux produits alimentaires comme les produits laitiers, la viande, les végétaux et les céréales et font parties de la flore intestinale et vaginale humaine ou animale (**Dortu et Thonart, 2009**). Considérées comme inoffensives pour l'Homme, ce qui a conduit à la reconnaissance de leur statut GRAS (Generally Recognized As Safe). Elles sont impliquées dans un grand nombre de fermentations des produits alimentaires en améliorant ainsi leur conservations (**Klaenhammer et al., 2005; Mofradj et al., 2007**).

Le lait de chèvre, comme le lait de vache, sont utilisés traditionnellement par les éleveurs depuis fort longtemps. Dans notre contexte d'urbanisation et d'industrialisation de l'alimentation, le lait de chèvre, sous la forme de lait ou de fromage, jouit incontestablement d'une image « santé » (**Desjeux, 1993**).

Parmi les bactéries lactiques les plus utilisées en industrie laitière, les bactéries hétérofermentaires du genre *Leuconostoc*, qui sont considérées comme des auxiliaires technologiques essentiels dans la formation des ouvertures dans le fromage bleu à pâte persillée comme le Roquefort. Les espèces de *Leuconostoc* ssp peuvent être utilisées en industrie agro-alimentaire pour leur capacité à produire des composés aromatiques (diacétyl et acétoïne) et d'autres composés tels que l'acétate et l'éthanol. Ces derniers, contribuent à la texture et à la saveur des produits laitiers frais (beurre, fromage frais, crème fraîche) (**Dridier et Prévost, 2009 ; Zarour et al., 2012**)

Pendant de nombreuses années, le lactosérum a été considéré comme un déchet encombrant, un sous-produit des fromageries et caséineries. Il constitue un apport important en lactose, sucre rapidement fermentescible en acide lactique, lui-même très vite métabolisé, principalement en acides gras volatils (**Sottiez, 1985**).

La forte médiatisation des bienfaits de l'huile d'olive et ses vertus pour la santé font d'elle un produit de plus en plus consommé dans le monde (**Tanouti, 2011**). **Dilika et al., (2000)** ont observé une activité antibactérienne élevée des acides oléiques et linoléiques particulièrement vis-à-vis des souches Gram positives par rapport à celles Gram négatives.

Des intoxications staphylococciques ont été attribuées au lait de chèvre, au lait en poudre et aux fromages. Dans ces derniers, *Staphylococcus aureus* est parmi les microorganismes potentiellement pathogènes, elle est soumise à des normes réglementaires; en raison de la possible production d'entérotoxines. L'une des principales causes de contamination du lait par *S.aureus* reste les mammites sub – clinique (**Jorgensen et al., 2005**). Pour le lait caprin ces mammites sont sujettes à des variations saisonnières, avec de faibles concentrations en cellules somatiques en avril et de fortes concentrations en septembre (**Drake et al., 1992**).

La maîtrise de *S.aureus* dans le lait est une préoccupation pour les producteurs de fromage au lait cru, ainsi qu'au lait pasteurisé (**Alomar, 2007**).

L'action antibactérienne de *Leuconostoc* à l'égard des germes pathogènes a été attribuée à des mécanismes différents y compris les acides organiques, peroxyde d'hydrogène et les bactériocines (**Bellil, 2013**).

De nombreuses études ont été réalisées sur l'effet inhibiteur de *Leuconostoc* à l'égard de *Staphylococcus aureus* dans le lait cru. Cependant peu d'étude semblent s'être intéressées à l'influence de l'activité antibactérienne de *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides* à l'égard de *Staphylococcus aureus* dans le fromage frais après conservation dans le lactosérum ou dans l'huile d'olive

C'est dans ce contexte s'inscrit notre travail qui porte sur le suivi de l'activité antibactérienne d'une souche *Leuconostoc mesenteroides* à l'égard d'une souche *S.aureus* dans un fromage de chèvre frais (élaboré au niveau du laboratoire de Microbiologie) conservé ou pas dans du lactosérum ou dans du l'huile d'olive.

## **I- *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides***

### **I-1-Historique**

Le genre *Leuconostoc* a été défini par Van Thieghem en 1878. Le terme *Leuconostoc* vient du mot *Nostoc* qui est une algue bleue mucilagineuse et de *leuco* qui veut dire blanc.

La première espèce décrite à été *Leuconostoc mesenteroides* par Tsenkovskii (1878) (Devoyod et Poullain, 1988 ; Euzéby, 2011).

### **I-2-Classification**

Le genre *Leuconostoc* comprend 22 espèces et 3 sous espèces. *Leuconostoc mesenteroides* a été subdivisée en 3 groupes par Garvie (1894) : *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *cremoris*, *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *dextranicum* et *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides*, cette dernière appartient au phylum des Firmicutes, classe Bacilli, ordre Lactobacillales, famille Leuconostocaceae, genre *Leuconostoc*, espèce *Leuconostoc mesenteroides* et à la sous espèce *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides* (Euzéby, 2011).

### **I-3-Caractères généraux**

Les *Leuconostocs* résident dans les produits laitiers et à la surface des fruits et des végétaux (Dunière, 2012)

*Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides* est une bactérie à Gram+, anaérobie facultative, non sporulante et non mobile qui se présente sous forme de coques, souvent lenticulaires en paires ou en chainettes, possède un métabolisme hétérofermentaire (voie des pentoses phosphate) avec production d'acide lactique (isomère D), de CO<sub>2</sub> et d'éthanol (Pilet et al., 1998; Ho et al., 2007). Sa température optimale de croissance est de 30 °C (Dellaglio et al., 1994).

#### **I-4-Effet antibactérien de *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides***

Le genre *Leuconostoc* produit de nombreux métabolites aux propriétés antimicrobiennes tels que les acides organiques, le dioxyde de carbone et le diacétyle. Elles jouent un important rôle hygiénique en baissant le pH, et en sécrétant une variété de composés inhibiteurs qui empêchent le développement de bactéries indésirables (**Zarour et al., 2012**).

*Leuconostoc cremoris*, en association avec des bactéries lactiques mésophiles sont capables d'inhiber la croissance des microorganismes pathogènes tel que *Staphylococcus aureus* (**Devoyod et Poullain, 1988**). Cette action inhibitrice serait due à la présence d'acides organiques et principalement de l'acide acétique; **Daly et al., (1972)** avaient constaté que le milieu de culture contenant de l'acide acétique inhibait *Staphylococcus aureus* seulement pour des valeurs de pH égales ou inférieures à 4,5. La forme non dissociée de l'acide peut être plus inhibitrice que la forme dissociée (**Ross, 1981**).

Parmi les bactériocines à effet antimicrobien la mésentéricine Y105 produite par *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides* Y105. En se basant sur les homologies de séquences, les bactériocines produites par *Leuconostoc* appartiennent à deux classes (classe IIa ou classe IIb) (**Makhloufi, 2011**).

### **II-*Staphylococcus aureus***

#### **II-1-Historique**

Jusqu'en 1870, les Staphylocoques étaient connus comme étant la cause des inflammations de la peau, ce n'est qu'en 1884 qu'ils ont été associés aux intoxications alimentaires; lorsque Vaughan et Sternbeg ont isolé le germe d'un cheddar lié à 300 cas d'intoxication alimentaire dans le Michigan. En 1954, la relation entre les empoisonnements alimentaires à *Staphylococcus aureus* et la production de toxines a été établie par Baber (**Elliot, 2001**).

#### **II-2-Classification**

Le genre *Staphylococcus* appartient au phylum des Firmicutes, à la classe des Bacilli, ordre des Bacillales, famille des Staphylococcaceae (**Delarras, 2008**).

### **II-3- Caractères généraux**

Les Staphylocoques sont des germes ubiquitaires; Ils sont présent sur la peau et les muqueuses des animaux et des humains, le sol, l'air et l'eau (**Delarras, 2008**). *Staphylococcus aureus* est une bactérie Gram positive de 0,5 à 1µm de diamètre, aéro-anaérobie facultative, asporulée, immobile, à coagulase et catalase positive. 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 37 et 48 °C et à des pH compris entre 4 et 10. La bactérie est aussi capable de supporter des concentrations en chlorure de sodium allant jusqu'à 20% (**Charlier et al., 2009**). Sa croissance est possible dans des milieux présentant une activité de l'eau (AW) très faible (0,83), avec un optimum quand l'AW est supérieure à 0,99 (**Bennett, 2001**).

Elle forme des colonies jaune-doré, caractéristique due à la production de pigments caroténoïdes. A l'examen microscopique, elle apparaît sous forme de petites cocci en paires, petites chainettes ou en amas donnant l'aspect de grappes de raisin (**Bhunja, 2008**).

### **II-4-Toxicité de *Staphylococcus aureus***

La toxi-infection alimentaire staphylococcique est une intoxication due à l'ingestion d'une ou de plusieurs entérotoxines produites dans un aliment contaminé par un staphylocoque (**Kérouenton et al., 2007**). La dose infectante d'entérotoxines staphylococcique est d'environ 1ng/g d'aliment, ce taux est atteint lorsque la population de *S. aureus* excède les 10<sup>5</sup> cellules/g., elle constitue un risque pour la santé humaine. Les symptômes majeurs apparaissent brutalement : nausées, douleurs abdominales et surtout vomissements violents et répétés souvent accompagnés de diarrhée (**Bhunja, 2008**).

Le danger de *S aureus* entérotoxigène a été observé dans les fromages de type caillé lactique et présure au lait cru de chèvre (**Meyrand, 1999**).

En 1990 Valle a rapporté que 48,8% des souches de *Staphylococcus aureus* isolées du lait de chèvre était toxigène. Smith (1983) a montré que bien que *Staphylococcus aureus* soit détruit par le biais de la pasteurisation, les entérotoxines produites résistent à la pasteurisation et peuvent causer ainsi une intoxication (**Seifu et al., 2007**).

### **III-Fromage frais au lait de chèvre**

En général quatre ingrédients principaux interviennent dans la fabrication du fromage : le lait, la présure, les ferments lactiques et le sel.

#### **III-1- Le lait de chèvre**

Le lait a été défini en 1908, au cours du Congrès International de la Répression des Fraudes à Genève comme étant :

« Le produit intégral de la traite totale et ininterrompue d'une femelle laitière bien portante, bien nourrie et non surmenée. Il doit être recueilli proprement et ne doit pas contenir de colostrum » (**Kebchaoui, 2012**).

Le lait de chèvre est caractérisé par sa couleur blanche et opaque due à la réfraction de la lumière sur les particules de protéines regroupées sous forme de « micelles » (**Paradal, 2012**). Sa composition chimique joue un rôle important sur son aptitude à l'acidification par les ferments lactiques et notamment l'influence des sels minéraux (**Masle et Morgan, 2001**).

Un intérêt particulier est donné aux produits à base de lait de chèvre spécialement le fromage et le yaourt vu leurs goûts caractéristiques ; leurs propriétés nutritives particulières. L'augmentation de leur rentabilité ainsi que la demande qui dérive de l'affliction des personnes présentant des allergies au lait de vache (**Haenlein, 2004**).

➤ **Composition du lait de chèvre**

La composition du lait de chèvre varie d'une façon considérable suivant le pays, le climat et l'alimentation (**Moualek, 2011**). La composition moyenne de lait de chèvre est présentée dans le tableau I :

**Tableau I :** Composition d'un lait de chèvre. (**Zeller, 2005**)

<b>Composants</b>	<b>Lait de chèvre (g/l)</b>
<b>Eau</b>	<b>900</b>
<b>Protéines</b>	<b>30,8</b>
<b>Matière grasse</b>	<b>34,4</b>
<b>Lactose</b>	<b>48</b>
<b>Calcium</b>	<b>1,25</b>
<b>Phosphore</b>	<b>0,95</b>

**III-2-Ferments lactiques**

Les ferments lactiques sont ajoutés au lait pour démarrer le procédé de fermentation ; c'est une préparation comprenant un grand nombre de micro-organismes (une seule espèce ou plusieurs), qui est ajoutée au lait pour produire un aliment fermenté en accélérant et en orientant son processus de fermentation (**Leroy et de Vuyst, 2004 ; Yıldız, 2010**).

La production des ferments lactiques est fondée sur la technique de la « culture pure » initialement élaborée par Robert Koch. Dans une culture pure, chaque colonie microbienne se compose de cellules qui proviennent toutes de la même cellule. Ceci assure que les cultures ne sont pas un mélange de différents micro-organismes inconnus et elles peuvent donc être dénombrées et exploitées pour produire les réactions biochimiques prédéterminées (**Solieri et Giudici, 2009**).

Les ferments lactiques sont utilisés en raison de leur capacité de production d'acide lactique à partir du lactose. De plus, ils possèdent d'autres fonctions importantes comme l'inhibition des micro-organismes indésirables, l'amélioration des propriétés sensorielles et rhéologiques, en plus de leurs bienfaits prouvés pour la santé. (**Parente et Cogan, 2004**). Les ferments lactiques sont généralement classés en deux groupes; les ferments mésophiles

et thermophiles, ces derniers ont une température optimale de croissance variant de 37°C à 43°C tandis que pour les mésophiles ;elle est d'environ 30°C (**Hadef, 2012**). Utilisés principalement pour l'élaboration des produits laitiers frais (fromage frais, beurre et crème fraîche épaisse) (**Dridier et Prévost, 2009**).

*Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides* acidifie le lait très lentement (**Zarour, 2010**).

### **III-3-Fromage frais**

Les fromages frais sont traditionnellement des fromages à égouttage lent, fabriqués à partir de laits; propres à la consommation humaine. Ils résultent de la coagulation à prédominance lactique du lait, combinant souvent l'action des ferments lactiques à celle de la présure. Ces fromages se caractérisent par l'absence d'affinage après les étapes d'égouttage et de moulage. Tous les fromages frais ont une DLC (Date Limite de Consommation) de 24 jours (**Mahaut et al., 2000**).

### **IV- Lactosérum**

C'est le produit laitier liquide obtenu durant la fabrication du fromage, de la caséine, par séparation du caillé après coagulation du lait et/ ou des produits dérivés du lait. Il représente 80 à 90 % du volume total de lait entrant dans le procédé. Il contient environ 50 % des nutriments du lait de départ : protéines solubles, lactose, vitamines et minéraux (**Anonyme, 1995**).

Deux types de lactosérum sont produits : le lactosérum acide (pH <5) obtenu suite à la production de caséine précipitée par un acide et le lactosérum doux (pH 6-7) obtenu à partir de la fabrication de fromage à pâte molle pressée ou semi-pressée, et résulte également de la caséine-présure (**Schuck et al, 2004**). Le lactosérum issu de la transformation du lait de chèvre est principalement du lactosérum acide (pH 4,3 – 4,7), dont la composition est donnée dans le tableau II(**Cayot et Lorient, 1998**).

## **IV-1-Composition du lactosérum**

**Tableau II** : Composition moyenne d'un lactosérum (**Anonyme, 1995**).

<b>Constituant (%)</b>	<b>Lactosérum doux</b>	<b>Lactosérum acide</b>
Matière sèche totale	6,40	6,50
Lactose	4,80	4,90
Protéines	0,55	0,55
Matière grasse	0,05	0,04
Minéraux	0,50	0, A80

## **IV-2-Utilisation du lactosérum**

Les protéines de lactosérum sont utilisées comme suppléments dans l'alimentation animale et exploitées pour leurs propriétés fonctionnelles et nutritionnelles dans l'industrie alimentaire (**Sienkiewicz et al.,1992**), au Bénin le lactosérum est utilisé pour la conservation de fromage wagashi (**Sessou et al., 2013**). Les protéines laitières exercent des activités biologiques variées; Elles présentent une activité antimicrobienne contre des bactéries à Gram positif et à Gram négatif (**Sienkiewicz et al.,1992**).

## **V- Huile d'olive**

L'huile d'olive est une huile de table directement issue du fruit de l'olivier par des procédés physiques sans recourir à des étapes de raffinage (**Veillet, 2010**).

Les huiles d'olive vierges jouent un rôle important dans l'industrie agroalimentaire et sont importantes en nutrition humaine pour plusieurs raisons ; en premier lieu, les lipides sont la principale source d'énergie pour le corps humain. De plus l'intérêt pour les huiles d'olive a été accru depuis la découverte de leur richesse en vitamines liposolubles et en polyphénols qui sont des antioxydants. Ces derniers confèrent à l'huile une longue durée de conservation et un pouvoir antimicrobien .Elles sont également une source importante d'acides gras poly-insaturés essentiels car non synthétisables par le corps humain (**Veillet, 2010**).

## **I- Lieu de la réalisation du travail**

L'ensemble de ce travail a été réalisé au Laboratoire de Microbiologie de l'Université Abderrahmane Mira de Bejaia, durant la période du 15 Février à la mi- Mai de l'année 2014.

- L'objectif de notre travail a porté sur le suivi de l'activité antibactérienne de la souche test (*Ln. mesenteroides* ssp. *mesenteroides*) vis-à-vis de la souche cible (*S. aureus*) en suivant leur croissance dans les différents fromages frais (seuls et en culture mixte) après ou non conservation dans le lactosérum ou dans l'huile d'olive.

## **II- Origine des souches**

La souche lactique *Ln. mesenteroides* ssp. *mesenteroides* et la souche pathogène *S. aureus* utilisées dans cette étude proviennent de la collection des souches du Laboratoire de Microbiologie Appliquée (Microbiologie de lait et des probiotiques).

-La souche de *Ln. mesenteroides* ssp. *mesenteroides* a été isolée à partir de lait cru de chèvre et identifiée par D<sub>r</sub> FARADJI puis conservée sur bouillon MRS additionné de glycérol à -20°C ;

-La souche *S. aureus* isolée à partir de lait de chèvre a été conservée dans les mêmes conditions sur bouillon nutritif.

## **III- Revivification et vérification de la pureté des souches**

La revivification des souches consiste à les repiquer successivement, chacune sur son milieu de culture approprié (9 ml de bouillon MRS pour *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides* et 5ml de bouillon nutritif pour *S.aureus*) puis les incuber respectivement à 30°C et 37°C pendant 24 heures et 48heures ;

Au terme de la période d'incubation du dernier repiquage des deux souches ;

Un tube est soumis pour la réalisation d'un ensemencement en stries sur gélose MRS (*Ln. mesenteroides*) incubé à 30°C pendant 48h;

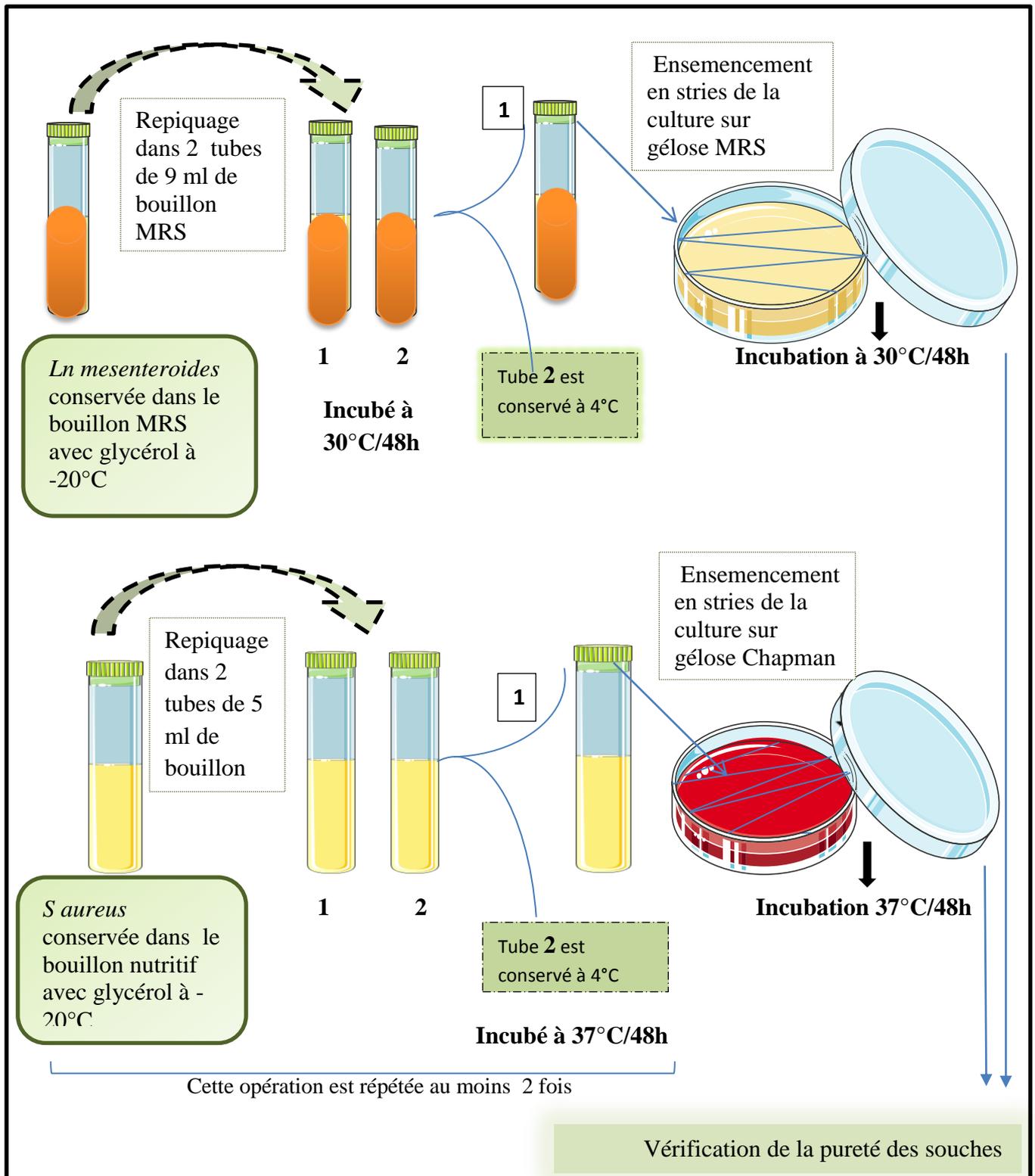
Suivre la même procédure pour *S. aureus*, ensemencé sur gélose Chapman à 37°C pendant 48h.

**NB** : L'opération a été répétée 3 à 4 fois, le tube issu du dernier repiquage est conservé à 4°C.

Après 48 heures d'incubation, la pureté des souches est vérifiée en réalisant quelques tests morphologiques et physiologiques rapides :

- Observation directe de l'aspect des colonies sur gélose MRS et gélose Chapman.
- Test de la catalase, coloration de Gram et observation microscopique.

Les étapes de la revivification des deux souches sont représentées dans la figure (1).



**Figure 1:** Les étapes de la revivification des souches de *Ln. mesenteroides* ssp *.mesenteroides* et de *S. aureus* ainsi la vérification de leur pureté

#### **IV- Provenance du lait**

Le lait utilisé dans cette étude est un lait de chèvre de race croisée provenant d'une ferme située à Tizi « Ighil ouazoug », Bejaia. Les prélèvements ont été réalisés le matin dans de bonnes conditions d'hygiène, la chèvre donne entre 2 à 3 L de lait par jour. Le lait collecté est mis dans des bouteilles d'eau minérale propres et transportés au laboratoire dans une glacière, dans un temps qui n'a pas dépassé 1h30.

#### **V-Analyses du lait cru de chèvre**

##### **V- I- Analyses physico-chimiques**

L'analyse de divers paramètres physico-chimiques a été réalisée au laboratoire physico-chimique de l'unité Tchil-lait Candia par un employeur du laboratoire.

##### **V-I-1-La composition du lait**

La détermination de la composition du lait a été réalisé par à un appareil appelé MilKoScan Minor (FOSS, Allemagne) qui permet de mesurer avec précision 6 paramètres dont :

- ❖ **La teneur en lactose** : le lactose est le sucre spécifique du lait, il est responsable par son gout sucré et par sa concentration élevée de la saveur douce et agréable du lait frais.
- ❖ **Taux de protéines** : les matières protéiques du lait sont représentées principalement par la caséine qui est la protéine caractéristique du lait.
- ❖ **Taux de matière sèche** : le taux de l'extrait sec exprime la teneur en éléments secs du lait.
- ❖ **Point de congélation** : il est mesuré en degrés Celsius (°C). Cette analyse sert à vérifier qu'il n'y a pas eu un ajout d'eau.
- ❖ **La teneur en matière grasse** : la matière grasse existe dans le lait sous forme de globules gras.
- ❖ **Taux de l'extrait sec dégraissé** : le taux de l'extrait sec dégraissé exprime la teneur en éléments secs débarrassés de la matière grasse.

➤ **Mode d'emploi du MilkoScan Minor**

Le MilkoScan Minor permet de déterminer la composition du produit. Seule une préparation minimale des échantillons est nécessaire à froid et en l'introduisant dans l'appareil puis appuyer sur la touche < démarrer>, les résultats sont obtenus en 2 minutes uniquement et enregistrés automatiquement sur l'écran de contrôle.

**V-I-2- Détermination du pH**

La mesure du pH nous renseigne sur l'acidité du lait. Juste après la traite, le pH du lait cru est mesuré à l'aide d'un pH-mètre type METTLER TOLEDO après étalonnage aux pH 7 et 4 l'électrode est plongée dans un bécher contenant un petit volume de lait.

**V-I-3-Détermination de l'acidité titrable**

Dans un bécher contenant 10 ml de lait additionné de 2 à 3 gouttes de la phénolphthaléine, l'électrode du pH mètre est immergée dans le bécher, puis titré avec une solution d'hydroxyde de sodium (NaOH à N/9) jusqu'au pH de 6,80.

Les résultats sont exprimés en degré Dornic (°D) où 1°D correspond à 0,1g/l d'acide lactique.

**V-II- Analyses microbiologiques du lait cru de chèvre**

L'analyse microbiologique du lait est une étape importante qui vise à vérifier la qualité hygiénique et assurée la sécurité des consommateurs en permettant la détection des microorganismes (**Vignola, 2002**).

Avant de passer à l'analyse, on agite vigoureusement l'échantillon afin d'assurer une répartition aussi uniforme que possible des micro-organismes (**Larpen, 1997**).

Une série de dilutions est réalisée à partir de l'échantillon.

Les analyses microbiologiques du lait cru de chèvre sont représentées dans le tableau III.

Tableau III : Analyse microbiologique du lait cru de chèvre (Guiraud, 2003)

Micro-organismes	Méthodes	Milieus	Durée et T°C d'incubation
<b>FTAM</b>	Ensemencement en masse d'1 ml des dilutions $10^{-3}$ à $10^{-6}$ .	PCA	48h-72h à 30°C
<b>Coliforme Totaux</b>	Ensemencement d'1ml de chaque dilution dans le bouillon BCPL+ cloche de Durhams	BCPL	24h à 37°C
<b>Coiformes fécaux</b>	Test confirmatif : Ensemencement en masse d'1 ml d'un test positif de BCPL sur gélose EMB	EMB	24h à 44 °C
	Ensemencement de 1ml d'un tube du test positif de BCPL dans un tube contenant l'eau péptonée exempte d'indole+ cloche de Durhams	Eau peptonée exempte d'indole	24h à 44 °C
	Ensemencement d'1ml d'un tube positive de BCPL dans un milieu neuf de BCPL	BCPL	24h à 44°C
<b>Levures et moisissures</b>	Ensemencement en masse de 1 ml des dilutions $10^{-1}$ à $10^{-3}$ .	OGA	72h à 28°C
<b>Bactéries lactiques</b>	Ensemencement en masse d'1 ml des dilutions $10^{-4}$ à $10^{-6}$	MRS et M17	48h à 30°C
<i>Staphylococcus aureus</i>	Ensemencement de 1 ml du lait dans 9 ml du milieu de Giolitti Contoni.	GC + Additif	24h-48h à 37°C
<b>Staphylocoques</b>	Ensemencement en masse de 1 ml des dilutions $10^{-2}$ à $10^{-6}$ .	Chapman	24h-48h à 37°C
<b>Streptocoques</b>	Ensemencement d'1ml dans un tube de 9ml puis réalisation d'une série de dilution ( $10^{-2}$ à $10^{-6}$ ).	Bouillon Roth	24h-48h à 37°C
<b>Streptocoques fécaux</b>	Tests confirmatifs : Ensemencement d'1ml d'un tube positif de Roth dans un tube contenant le milieu Litsky	Eva Litsky	24h à 37 °C
	Ensemencement en masse de 1 ml des dilutions $10^{-3}$ à $10^{-5}$ .	Slanetz	24h à 37°C
<i>Clostridium sulfito réducteurs</i>	Mettre 1 ml de lait cru dans un tube stérile puis le mettre dans un bain Marie à 80°C/10min suivi d'un choc thermique puis versé dans le tube la gélose VF+ Additifs	VF + Additifs	24 h à 37 °C

<i>Salmonella et Shigella</i>	Préenrichissement dans 225ml de la solution Ranger+25ml de lait ; Enrichissement dans SFB + 2 disques + 1ml de bouillon de préenrichissement	Solution Ranger  SFB	48 -48h à 37°C  24h à 37°C
	Ensemencement en masse de 1ml de bouillon d'enrichissement des dilutions $10^{-1}$ à $10^{-2}$ .	SS	24 à 37 °C

### VI-Stérilisation du lait

Le lait collecté est réparti dans des flacons de 250 ml, et stérilisé par tyndallisation à 75°C /30 min au bain Marie, une fois par jour, pendant trois jours, à 24h d'intervalle. On détruit ainsi tout germes microbiens y compris les spores (**Guillaume, 2014**). Après refroidissement à température ambiante, le lait est conservé à 4°C.

Afin de s'assurer de l'efficacité du traitement thermique, les flacons sont étuvés à 37°C/ 24h à 72h. Dans le but de confirmer l'absence de tout microorganisme après tyndallisation, une analyse microbiologique est réalisée ;

**Tableau IV** : Analyse microbiologique du lait de chèvre stérilisé

<b>Germes</b>	<b>dénombrement</b>	<b>Milieux</b>	<b>Durée et T°C d'incubation</b>
<b>Coliforme totaux</b>	Ensemencement en masse d'1 ml des dilutions $10^{-1}$ à $10^{-3}$ .	VRBG	24h à 37°C
<b>Levures et moisissures</b>	Ensemencement en masse d' 1 ml des dilutions $10^{-1}$ à $10^{-3}$ .	OGA	72h à 28°C
<b>staphylocoque</b>	Ensemencement en masse d' 1 ml des dilutions $10^{-2}$ à $10^{-5}$ .	Chapman	24h-48h à 37°C
<i>Clostridium Sulfito réducteur</i>	Mettre 1 ml de lait cru dans un tube stérile, puis on le met dans un bain Marie à 80°C/10min suivi d'un choc thermique on verse dans le tube la gélose VF + Additifs	VF + Additifs	24 h à 37 °C

## **VII- Recherche de l'activité antibactérienne *in vitro* de la souche *Ln. mesenteroides* ssp. *mesenteroides* à l'égard de *S. aureus* par le test de spot**

Afin de mettre en évidence l'action antibactérienne de *Ln. mesenteroides* ssp. *mesenteroides* à l'égard de *S. aureus*, le test de spot est réalisé.

### ➤ **Test de spot**

Sur une gélose MRS coulée préalablement dans des boîtes de Pétri après solidification, 5µl de la culture fraîche (incubée à 30°C pendant 18h) de *Ln. mesenteroides* est disposé en spots. Les boîtes sont séchées près du bec bunsen pendant 30 min puis incubées à 30 °C pendant 18h.

Après la période d'incubation, la gélose est recouverte de 1ml de la culture fraîche de la souche cible (*S. aureus*) à un taux de  $10^{-6}$  UFC/ml, additionné avec 9ml de gélose nutritive fondue en surfusion, puis laisser solidifié. Au terme de la période d'incubation (18h à 37°C), les diamètres des zones d'inhibition sont mesurés.

## **VIII-Standardisation des *inocula* bactériens**

La standardisation a pour but d'avoir le même nombre de cellules bactériennes dans 1 ml de culture durant toute l'expérimentation.

### **VIII-1-Préparation de l'*inoculum* standard de *Ln. mesenteroide* ssp. *mesenteroides* (préparation des préferments)**

Une standardisation de l'*inoculum* est indispensable pour pouvoir étudier l'activité antibactérienne de *Ln. mesenteroides* ssp. *mesenteroides* vis-à-vis de *S. aureus*.

L'*inoculum* de la souche *Ln. mesenteroides* ssp. *mesenteroides* est revivifié par ensemencement en stries sur gélose MRS. Après incubation à 30°C pendant 48heures dix colonies bien isolées et bien distinctes de la souche ont été ensemencées dans un tube stérile contenant 50 ml de lait stérilisé, puis incubé à 30°C pendant 18heures (culture fraîche).

Au terme de la période d'incubation, des dilutions décimales sont effectuées dans de l'eau physiologique stérile ( $10^{-1}$  jusqu'à  $10^{-10}$ ), 1ml des dilutions ( $10^{-7}$  jusqu'à  $10^{-10}$ ) est

ensemencé en masse sur gélose MRS incubée pendant 48 heures à 30°C. Au terme de l'incubation un dénombrement est effectué.

### **VIII-2- Préparation de l'*inoculum* standard de *Staphylococcus aureus***

Afin de travailler dans les mêmes conditions, en terme de population bactérienne, la standardisation de l'*inoculum* est jugée indispensable.

L'*inoculum* de *S. aureus* est revivifié par ensemencement en stries sur gélose Chapman. Après incubation à 37°C pendant 24 heures, dix colonies bien isolée et bien distincte de la souche cible ont été ensemencées dans un tube stérile contenant 9ml de lait stérilisé, puis incubé à 37°C pendant 18 heures (culture fraîche).

Au terme de la période d'incubation, des dilutions décimales sont effectuées dans de l'eau physiologique stérile ( $10^{-1}$  jusqu'à  $10^{-10}$ ), 1ml des dilutions ( $10^{-7}$  jusqu'à  $10^{-10}$ ) est ensemencé en masse sur gélose Chapman. Au terme de l'incubation, un dénombrement est effectué après incubation.

### **IX-Mise au point des fromages frais au lait de chèvre**

Afin d'étudier l'activité antibactérienne de *Ln. mesenteroides* ssp. *mesenteroides* vis-à-vis de *S. aureus* dans le fromage, neuf fromages frais ont été fabriqués.

#### **IX-1-Préparation du lait**

5,5 Litre de lait de chèvre stérilisé est répartis à raison de 500 ml par bocal (11 bocaux), dont deux bocaux sont réservés pour la fabrication du lactosérum.

#### **IX-2-Ensemencement de lait par les préferments**

La souche *Ln. mesenteroides* ssp. *mesenteroides* a été inoculée dans les laits à raison de  $10^9$  UFC/ml, suivi d'une incubation à 30°C pendant 6 heures. Les laits ont été également ensemencés avec le préferment de la souche cible *S.aureus* à une concentration finale de  $10^2$  UFC/ml, juste au moment d'ajouter la présure. Neuf fromages frais sont préparés comme suit :

- Fromage 1 : lait ensemencé avec le préferment de *Ln. mesenteroides* ssp. *mesenteroides*.
- Fromage 2 : lait ensemencé avec le préferment de *S.aureus*.
- Fromage 3 : lait ensemencé avec les préferments de *Ln. mesenteroides* et *S. aureus*.

- Fromage 4 : laitensemencé avec le préferment de *Ln. mesenteroides* ssp. *mesenteroides*.
- Fromage 5 : laitensemencé avec les préferments de *S. aureus* et *Ln. mesenteoides* ssp. *mesenteroides*.
- Fromage 6 : laitensemencé avec le préferment de *S. aureus*.
- Fromage 7 : laitensemencé avec le préferment de *Ln. mesnteroides* ssp. (témoin).
- Fromage 8 : laitensemencé avec les préferments de *Ln. mesenteroides* ssp. *mesenteroides* et *S. aureus* (témoin).
- Fromage 9 : laitensemencé avec le préferment de *S. aureus* (témoin).
- Les deux derniers bocaux (10 et 11): aucun ensemencement.

Après ensemencement, tous les bocaux ont été incubés à 30°C pendant 6h afin de fermenter.

### **IX- 3- emprésurage**

Au terme de l'incubation et afin de provoquer la coagulation et la formation de caillé, un ajout de la présure à tous les laits (11 bocaux) en raison de 1ml/500ml est réalisé. Ces derniers sont étuvés à 37°C pendant 2 heures.

### **IX-4- Egouttage**

L'égouttage du caillé permet de séparer le caillé solide, composés de caséines (grosses protéines du lait), la matière grasse, et le lactosérum ;

-A l'aide de 2 bocaux stériles, qui ont été ouvert entre deux becs bunsen et couvert avec des compresses stériles, attachés avec un élastique, le lait caillé est versé sur la compresse. Le caillé est égoutté en remuant avec une spatule stérile pour faciliter l'égouttage, l'opération a pris 2 heures de temps (figure 4).



**Figure 2 :** Egouttage du caillé

➤ **Récupération du lactosérum**

Le lactosérum utilisé pour la conservation des fromages est préparé à partir d'un litre de lait stérilisé auparavant, réparti dans 2 bocaux de 500 ml, emprésuré et coagulé à l'étuve (37°C/2 h puis égoutter comme indiqué dans la figure 4.

- Après égouttage un salage est réalisé, en ajoutant 0,3g pour 100g du caillé, un retournement est effectué puis laissé égoutter dans le réfrigérateur à 8°C pendant 1 heure ;
- Au terme du 2<sup>ème</sup> égouttage les fromages sont moulés dans des bocaux en verres stériles ;
- Un dénombrement pour les deux souches inoculées est réalisé pour chaque fromage (avant conservation dans l'huile ou dans le lactosérum) ;
- parallèlement la détermination du pH et de l'acidité titrable a été réalisé.

➤ **Mesure du pH et de l'acidité titrable**

- **pH**

Après étalonnage dans deux solutions tamponnées à pH =7 et pH=4, l'électrode du pH mètre (HANNA, H1 99161N) est introduite dans le fromage, la valeur correspondante est affichée sur l'écran de contrôle.

- **L'acidité titrable**

-Introduire dans un Becher 10 ml d'échantillon à analyser, auquel on ajoute 2 à 3 (0,1ml) gouttes de l'indicateur coloré (phénolphtaléine) ;

-Titrer avec la solution NaOH (N/9) jusqu'à l'apparition d'une coloration rose pâle persistante. (**Rhiat et al., 2005**)

L'acidité du lait est exprimée comme suit :

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

Soit :

**AT** : Acidité titrable ;

**V** : Volume en ml correspondant à la chute de NaOH de la burette.

Au terme de l'égouttage, les fromages sont conservés soit dans du lactosérum ou dans l'huile d'olive :

- Les fromages 1, 2 et 3 sont conservés dans le lactosérum ;
- Les fromages 4, 5 et 6 sont conservés dans l'huile d'olive ;
- Les fromages 7, 8 et 9 sont des témoins.

### **X-Analyses de l'huile d'olive et du lactosérum (utilisés pour la conservation des fromages)**

#### **X-1- Analyses physico-chimiques de l'huile d'olive**

L'analyse des divers paramètres physico-chimiques a été réalisée au laboratoire d'analyse et contrôle de la qualité (LABO-IDRES) par un employeur de laboratoire.

#### **❖ Acidité**

Le principe de la détermination de l'acidité d'une huile consiste en un dosage acido-basique correspondant à la neutralisation.

L'acidité est le pourcentage d'acides gras libre contenus dans un corps gras, par convention, elle s'exprime en pourcentage d'acide oléique pour les huiles d'olives.

La détermination de l'acidité de l'huile utilisée dans cette étude a été effectuée conformément à la norme AFNOR NF T60-204 de Décembre 1985 (Veillet ,2010) dont le principe est le suivant :

On met en solution 2 g de l'huile d'olive en présence de 50 ml de solvant organique (25 ml d'éthanol à 95% et 25ml d'éther diéthylique) et on titre à l'aide d'un indicateur coloré (phénolphthaléine). La solution vire au rose persistant pour un volume de KOH correspondant à l'équilibre acido-basique L'acidité libre a ensuite été exprimée en pourcentage d'acide oléique libre selon la formule suivante :

Soit :

$$\% \text{ acide oléique} = (V_{\text{KOH}} \times N \times 28,2) / m$$

m : masse de la prise d'essai en gramme ;

V : volume de titrage en ml ;

N : normalité de la solution d'hydroxyde de potassium (0,1 N) ;

28,2 g/mol : masse molaire de l'acide oléique.

#### ❖ Valeur de peroxyde :

La valeur peroxyde a été déterminé par la méthode d'acidité acétique et chloroforme correspondant à la norme AOCS CD 8-53 (Veillet ,2010) .5g d'huile d'olive ont été dissous dans 30 ml d'un mélange acide acétique -Chloroforme la réaction est déclenchée dans l'obscurité puis 0,5 ml d'une solution saturée d'iodure de potassium ont été ajoutés au mélange, puis enfin 30 ml d'eau distillée après exactement une minute d'agitation. Après un temps de repos l'ion libéré a été dosé par un titrage avec du thiosulfate de Sodium à 0,01N en utilisant de l'amidon comme indicateurs coloré, la valeur peroxyde est exprimée en milliéquivalents peroxyde par 1000gd'huile selon la formule suivante ;

$$VP \text{ (meq.O}_2\text{/Kg)} = [(V_{\text{ech}} - V_{\text{blanc}})] \times 0,1 \times 1000 / m_{\text{huile}}$$

Soit :

VP : valeur du peroxyde en milliéquivalents peroxyde par 1000g d'huile. ;

V<sub>ech</sub> : volume de la solution de thiosulfate de sodium utilisé pour la prise d'essai en ml ;

V<sub>blanc</sub> : volume de la solution de thiosulfate de sodium utilisé pour l'essai à blanc en ml ;

m : masse de la prise d'essai en gramme.

❖ **Teneur en eau**

La teneur en eau est déterminée dans 100 g de l'huile d'olive met auparavant dans un flacon stérile, séché dans une étuve à une température de 105°C pendant 2h au maximum. Le résultat obtenu est déterminé selon la formule suivante :

$$H\% = (M_1 - M_2 / P) \times 100$$

Soit :

H% : humidité ;

M<sub>1</sub> : masse de flacon+ échantillon avant étuvage ;

M<sub>2</sub> : masse de flacon+ échantillon après étuvage ;

P : masse de la prise d'essai.

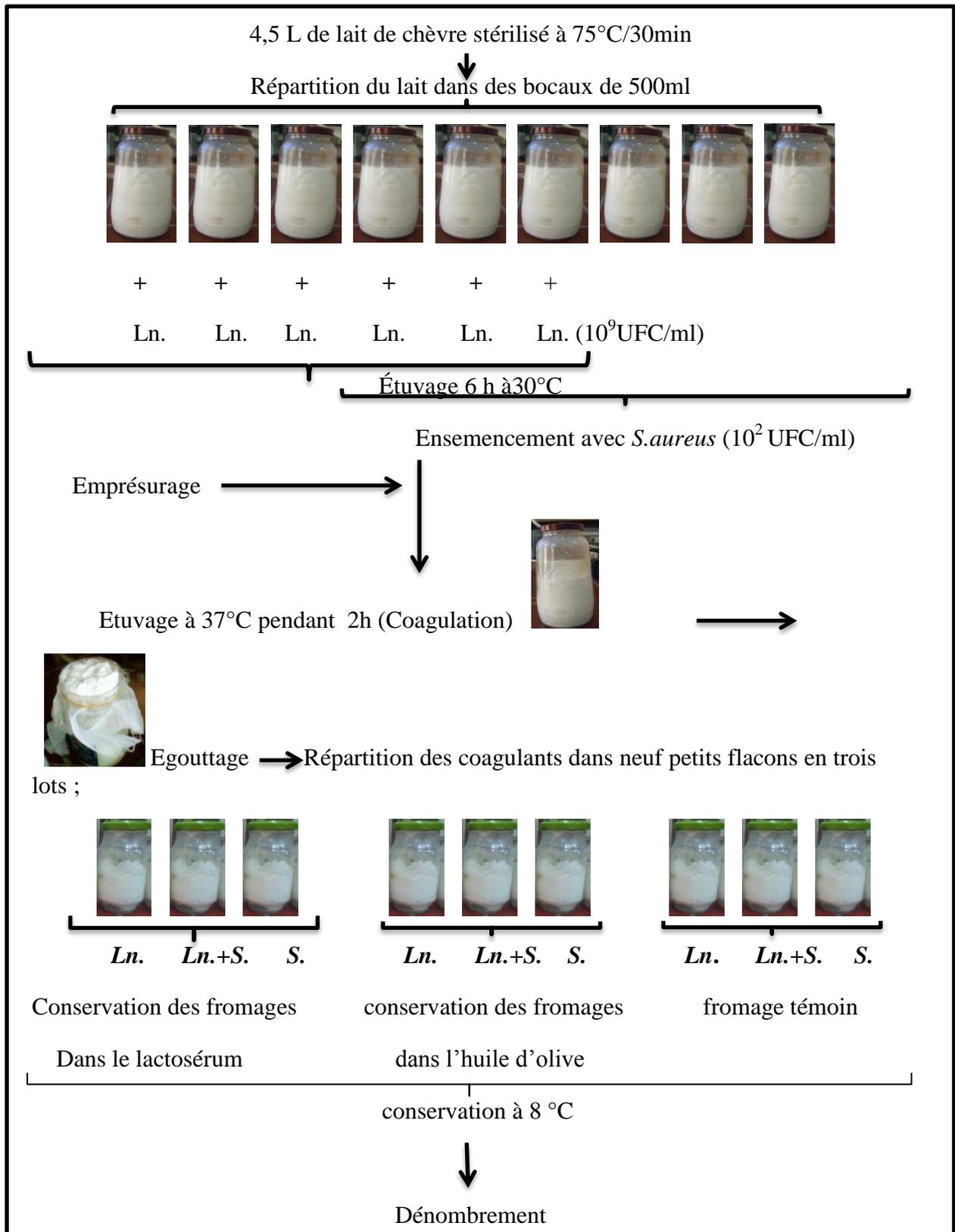
**X-2- Analyse microbiologique du lactosérum**

Prélèvement aseptique d'1 ml de lactosérum à l'aide d'une micropipette, ensuite introduire dans un tube contenant 9ml d'eau physiologique (dilution 10<sup>-1</sup>) ;

-Agité bien à l'aide d'un vortex afin d'assurer une répartition aussi uniforme que possible des microorganismes. Des dilutions ont été préparées jusqu'à la dilution 10<sup>-5</sup>.

-Les germes à dénombrer et à rechercher sont présentés dans le tableau II (annexeIII).

Le procédé de fabrication des différents fromages est représenté sur la figure 3



**Figure 3:** Procédé de mise au point des fromages frais au lait de chèvre.

*Ln.* : *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides*. *S.* : *Staphylococcus aureus*.

## **XI- Suivi de l'activité antibactérienne de *Ln. mesenteroides* ssp. *mesenteroides* vis-à-vis de *S. aureus* dans les fromages frais**

Des dénombrements à partir des 9 fromages frais ont été réalisés chaque jour jusqu'aux 3<sup>ème</sup> jours. Puis chaque 7 jour (7, 14, 21 au 28<sup>ème</sup> jours) pendant 28 jours.

Avec une spatule stérile et entre deux bec bunsen, prélever 1g d'échantillon d'un bocal qui contient le fromage frais et le mettre dans un tube stérile puis le pesé sur la balance (Sartorius), refaire la même opération pour les neuf fromages frais.

Après la pesé une série de dilutions est réalisée à partir de chaque échantillon diluée dans 10ml d'eau physiologique (la solution mère) et bien l'homogénéisé à l'aide d'un vortex pendant 15 secondes, (répéter le même travaille pour les neuf fromages frais).

-Une série de dilution est réalisée à l'aide d'une micropipette (tableau III, « annexe III »).

### ➤ **Dénombrement de *Ln. mesenteroides* ssp. *mesenteroides***

Le dénombrement de *Ln. mesenteroides* ssp. *mesenteroides* est effectué sur gélose MRS. Un ensemencement en masse à raison de deux boites par dilution préparées à partir des dilutions ( $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-9}$  et  $10^{-10}$ ). L'incubation est réalisée à 30°C pendant 48h.

### ➤ **Dénombrement de *S. aureus***

Le dénombrement de *S. aureus* est effectué sur gélose Chapman, pour un ensemencement en masse à raison de deux boites par dilution préparées à partir des dilutions ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  et  $10^{-4}$ ). L'incubation est effectuée à 37°C pendant entre 24 à 48h.

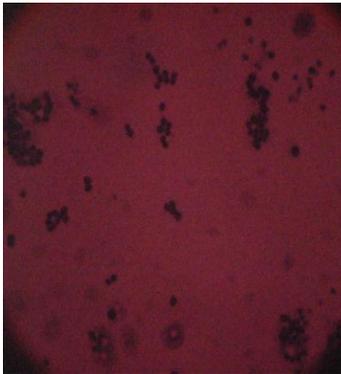
Les dénombrements réalisés pour les différents fromages frais sont présentés dans le tableau III (annexe III)

**NB** : la détermination du pH et de l'acidité titrable est réalisée parallèlement avec les dénombrements, (pages 20 et 21).

### I-Vérification de la pureté des souches

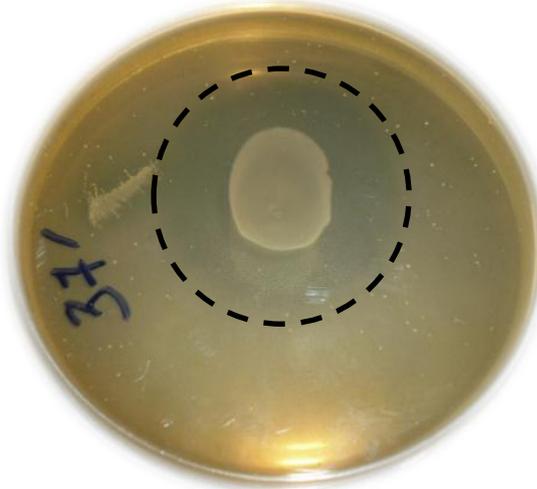
Les résultats de la vérification de la pureté des souches sont illustrés dans le tableau suivant :

**Tableau V** : Résultats de la vérification de la pureté des souches

Souches	Observation macroscopique	Observation microscopique (Coloration de Gram)	Test de catalase
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> ssp. <i>mesenteroides</i>	 <p>Petites colonies, rondes et lenticulaires de couleur blanchâtre</p>	 <p>Cellules violettes, la souche est à Gram positif, forme cocci en paires ou en chaînettes</p>	 <p>Absence d'effervescence Catalase négative</p>
<i>Staphylococcus aureus</i>	 <p>Colonies sphériques Jaunâtres (due à la fermentation du mannitol )</p>	 <p>Cellules violettes, la souche est à Gram positif, Cocci, regroupées en amas ou en grappes de raisin</p>	 <p>Effervescence Catalase positive</p>

## II-Mise en évidence de l'activité antibactérienne de *Ln. mesenteroides* ssp. *mesenteroides* à l'égard de *S. aureus* par le test de spots

Le test de spot a révélé une bonne activité antibactérienne de la souche *Ln. mesenteroides* ssp. *mesenteroides* à l'égard de *S. aureus* (Figure4).



**Figure 4 :** Résultat de l'activité antibactérienne de *Ln. mesenteroides* ssp. *mesenteroides* vis à vis *S. aureus* (Test de spots)

L'activité antibactérienne illustrée dans la figure 4 représentée par l'apparition d'une zone d'inhibition indique que la souche *Ln. mesenteroides* ssp. *mesenteroides* synthétise des substances antibactériennes à l'égard de *S. aureus*.

La souche *Ln. mesenteroides* ssp. *mesenteroides* a montré un diamètre d'inhibition vis-à-vis *S. aureus* de 35 mm. L'inhibition est notée positive lorsqu'elle est supérieure à 1mm (Schillinger et Lucke, 1989).

L'antagonisme des bactéries lactiques envers la souche *S. aureus* est dû probablement, à la synthèse de plusieurs composés antibactériens, à savoir : des acides organiques (lactique, acétique), le dioxyde de carbone, le diacétyle, l'éthanol ou encore des composés protéiques assimilables aux bactériocines (Vandenbergh, 1993 ; Messens et de Vuyst, 2002)

L'action inhibitrice des *Leuconostocs* est due à la présence d'acides organiques et principalement de l'acide acétique (Gyu et Hyung, 2006). Daly et al., (1972) avaient constaté que le milieu de culture contenant de l'acide acétique inhibait le développement de *S. aureus*.

En effet **Gyu et Hyung (2006)** ont trouvé que parmi les souches isolées à partir de Jeotgal aliment fermenté Coréen les souches *Ln. mesenteroides* présentaient des inhibitions vis-à-vis *S. aureus* avec un diamètre de 22mm.

### III-Standardisation des *inocula* bactériens

Selon les résultats du dénombrement effectué pour *Ln. mesenteroides ssp mesenteroides* et *S. aureus*, le nombre des cellules viables obtenus après ensemencement de dix colonies de *Ln. mesenteroides ssp. mesenteroides* dans 50 ml de lait stérilisé est de  $1,2 \times 10^{12}$  UFC/ml. Cependant *S. aureus* donne un nombre de  $10^8$  UFC/ml à partir d'une colonie ensemencée dans 9 ml de lait stérilisé.

### IV- Analyse du lait de chèvre

#### IV-1- Analyses physico-chimiques du lait cru de chèvre

Les analyses physico-chimiques du lait de chèvre ont été réalisées à la l'unité Tchinn-lait Candia.

#### IV-1-1- Détermination du pH et de l'acidité titrable

Les valeurs du pH de lait, et de l'acidité titrable révèlent une bonne qualité du lait ; en se référant aux normes, le pH est de 6,8 et l'acidité titrable est de 18 °D (tableau VI).

Ces résultats sont en concordance avec ceux rapportés par la bibliographie avec une fourchette de variation de pH pour le lait caprin de 6,45 à 6,98 (**Jaubert et al., 1997**)

**Tableau VI : Valeurs du pH et de l'acidité titrable du lait de chèvre**

	Résultats	Normes
pH <sup>1</sup>	6,8	6,6-6,8
Acidité titrable <sup>2</sup>	12,36°D	18 °D max

<sup>1</sup>la norme est selon le codex standard 207-1999, adopté en 1999 .Amendement 2010.

<sup>2</sup>selon la norme AFNOR. (**Boubchir, 2012**).

#### **IV-1-2- Mesure de divers paramètres physico-chimiques**

La composition du lait caprin est très variable, dépend de la race, des facteurs climatiques et d'alimentation (**Boubezari, 2010**).

Les résultats obtenus sont indiqués dans le tableau suivant :

**Tableau VII** : Résultats d'analyse de divers paramètres physico-chimiques du lait de chèvre

<b>Divers paramètres</b>	<b>Résultats</b>	<b>Norme selon FAO, (1998)</b>
<b>Teneur en lactose</b>	52,9 g/l	48 g/l
<b>Taux de protéines</b>	27,2 g/l	30,8 g/l
<b>Taux de matière sèche</b>	154,3 g/l	134 g/l
<b>Point de congélation</b>	-0,57 °C	-0,55 _ -0,583°C
<b>Teneur en matière grasse</b>	70 g/l	34,4 g/l
<b>Taux de matière sèche dégraissé</b>	87,9 g/l	116 _ 134 g/l

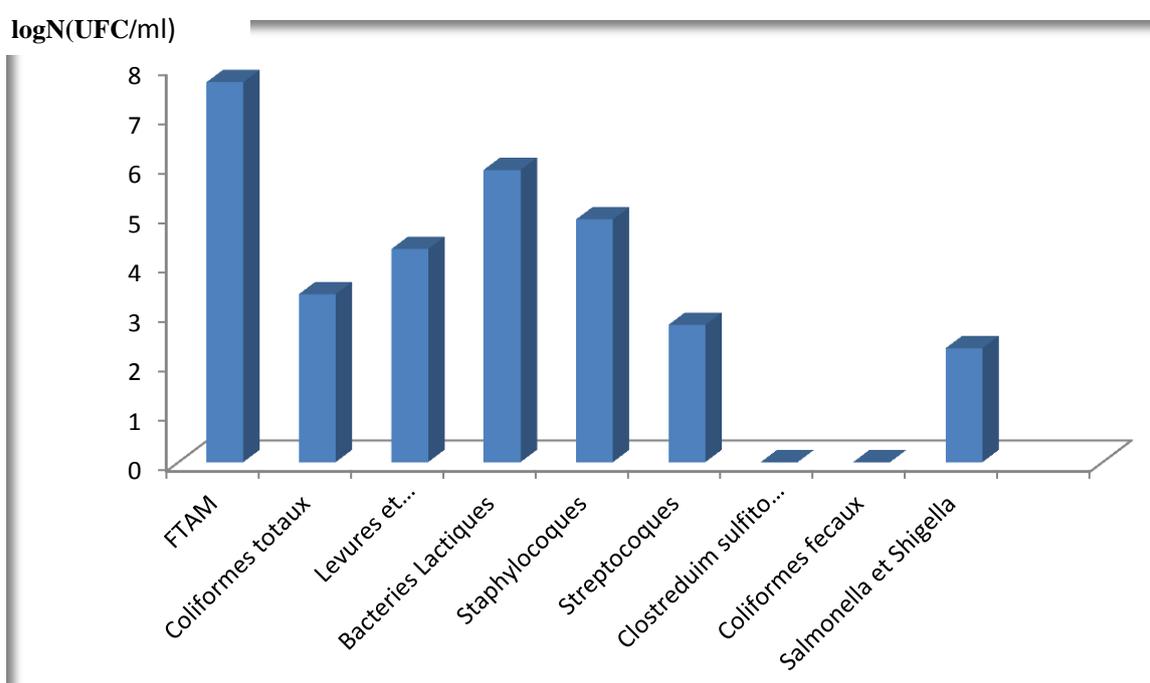
On remarque que le point de congélation se situe dans l'intervalle, donc présente une conformité aux normes.

Le taux de lactose, la matière sèche ainsi la matière grasse sont en moyenne légèrement supérieure à celles recommandées par la norme. Cela peut être dû à certains facteurs tels que les conditions climatiques, l'alimentation et à la période de lactation (**Moualek, 2011**). Selon l'étude de **Masle et Morgan en 2001**, la faible teneur en matière grasse dépend de la période de lactation. Effectivement, entre mai et juillet des taux faibles en matière grasse sont enregistrés. Cependant le lait utilisé dans notre étude est collecté en Février, cela pourrait expliquer l'augmentation de la teneur en matière grasse. Par contre pour les protéines la valeur obtenue (27,2 g /l) se rapproche à la norme.

La variabilité des teneurs obtenues n'influence pas sur la qualité du lait. Ce dernier présente des caractères satisfaisants.

## IV-2- Analyse microbiologique de lait cru de chèvre

Les analyses microbiologiques habituelles du lait concernent le dénombrement de la flore totale aérobie mésophile et des coliformes, néanmoins pour une meilleure appréciation de la qualité microbiologique, une analyse plus complète a été réalisée (figure 5). Cette analyse consiste en un dénombrement des bactéries lactiques, la flore totale aérobie mésophile, Coliformes totaux, Coliformes fécaux, Streptocoques totaux, streptocoques fécaux, levure et moisissures, ainsi la recherche de *Clostridium sulfito réducteur*, *Salmonella/ Shigella* et *S.aureus*.



**Figure 5:** Résultat de l'analyse microbiologique du lait cru de chèvre

Les résultats obtenus indiquent la présence de la majorité des flores qui témoigne d'une mauvaise qualité hygiénique. La charge microbienne totale du lait cru est relativement plus importante ( $10^7$  UFC/ml). La réglementation nationale s'accorde sur le fait qu'une charge supérieure à  $10^5$  UFC/ml signifie une contamination importante (tableau VIII). cela peut être due à la présence d'un défaut d'hygiène dû à la traite manuelle.

Les résultats présentés dans le tableau I (Annexe III) indiquent l'absence des coliformes fécaux, et probablement la présence de *Salmonella* et de *S. aureus*

L'ensilage mal préparé associé à une mauvaise hygiène de la traite constitue les causes majeures de la présence de bactéries pathogènes telles que les staphylocoques (**Hajj Seaman et al., 2011**).

**Tableau VIII:** Critères microbiologiques du lait cru (J.O.R.A) en comparaison avec les résultats obtenus

<b>Germes</b>	<b>Résultats obtenus</b>	<b>Normes J.O.R.A (1998)</b>
<i>Flores aérobies à 30°C</i>	10 <sup>7</sup>	10 <sup>5</sup>
<i>Coliforme totaux</i>	Absence	10 <sup>3</sup>
<i>S. aureus</i>	probablement	Absence

### **IV-3- Analyse microbiologique de lait stérilisé**

Afin de vérifier l'efficacité de la stérilisation du lait, une analyse microbiologique de ce dernier a été réalisée, en dénombrement les Coliformes totaux, Streptocoques, Levures et moisissures ainsi que la recherche de *S.aureus*.

D'après les résultats obtenus, aucune croissance n'est obtenue (0UFC/ml). En effet aucun changement n'est observé (pas de coagulation) pour le lait étuvé à 37°C (témoin).

### **V- Analyse microbiologique du lactosérum**

D'après les résultats de l'analyse microbiologique du lactosérum, aucune croissance bactérienne n'est notée, donc le lactosérum utilisé pour cette étude est stérile.

### **VI- Analyse physico-chimique de l'huile d'olive**

L'analyse physico-chimique de l'huile d'olive est présentée dans le tableau IX suivant :

**Tableau IX :** Résultats de l'analyse physico-chimique de l'huile d'olive

<b>Déterminations</b>	<b>Résultats</b>	<b>Unités</b>	<b>Normes</b>
Teneur en eau	<b>0,10</b>	% m/m	≥ 0,2
Acidité	<b>0,11</b>	% ac oléique	≥ 3,3
Indice de peroxyde	<b>15,2</b>	meq/Kg	≥20

Les résultats obtenus sont en concordance avec la norme ;

L'acidité est un critère important, permet de classer l'huile en différentes catégories en fonction de leurs teneurs en acides gras libres, la teneur en acidité est de 0,11% d'acide oléique. Selon la norme, l'huile d'olive utilisé pour cette étude est classée dans la catégorie de l'huile d'olive « vierge courante ».

L'indice de peroxyde est de 15,2 meq/Kg, ce dernier nous permet de mesurer l'état d'oxydation de l'huile d'olive.

## **VII- Suivi de la cinétique de croissance de *S.aureus* et *Ln. mesenteroides* ssp. *mesenteroides* en culture pure et en culture mixte dans les différents fromages**

### **➤ Fromage frais au lait de chèvre stérile**

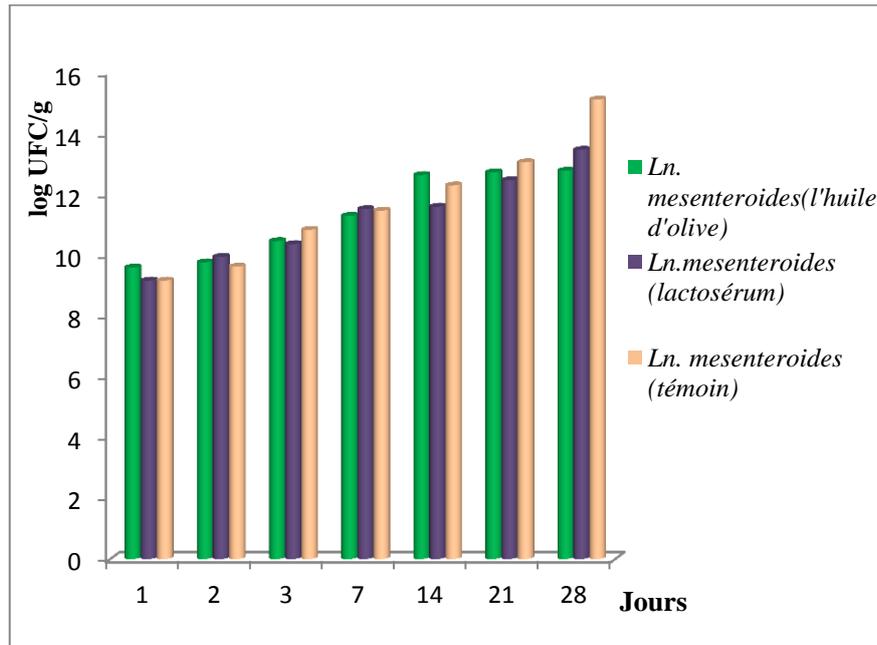
Les fromages frais obtenus après coagulation par l'action de la présure, possèdent des textures onctueuse, frais à Pâte blanche. Chaque fromage obtenu est divisé en trois lots conservés dans l'huile d'olive, dans le lactosérum ou sans conservation dans ces derniers (témoin).

Au cours de la fabrication et la conservation des fromages frais, le comportement des micro-organismes utiles ou pathogènes est fortement lié aux paramètres technologiques tels que la nature et l'activité des ferments lactiques, la vitesse et le niveau d'acidification du caillé (Morgane et al., 2000).

Les fromages de chèvre peuvent être fabriqués selon deux types de technologies : lactique et à présure. (Morgane et al., 2000).

### **VII-1-Suivi de la cinétique de croissance de *Ln. mesenteroides* ssp. *mesenteroides* en culture pure dans les différents fromages**

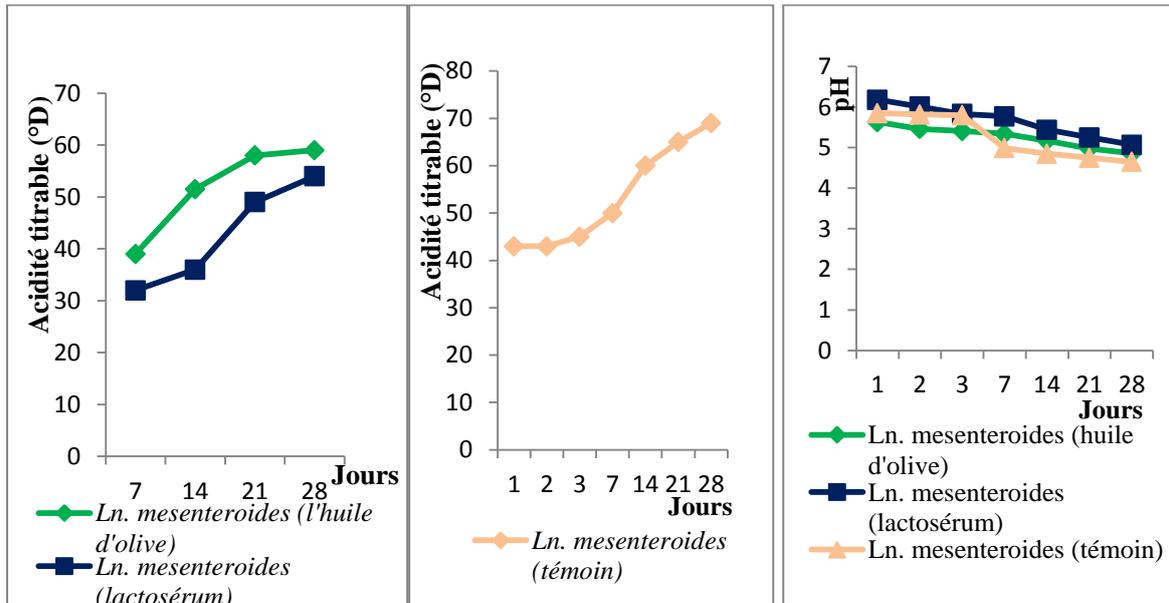
La croissance de la souche *Ln. mesenteroides* ssp. *mesenteroides* dans le fromage frais de chèvre conservé ou non dans le lactosérum ou l'huile d'olive a été suivie. Les résultats du dénombrement de l'acidité titrable ainsi que l'évolution du pH sont représentés dans les figures 10, 11 et 12 respectivement.



**Figure 6:** Evolution de la croissance de *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides* en culture pure dans les différents fromages

Les résultats obtenus dans la figure 6 montrent que le nombre de cellules viable de *Ln. mesenteroides ssp mesenteroides* en culture pure ne cesse d’augmenter durant toute la période de stockage dans les trois fromages frais.

Pour ces derniers, une augmentation progressive est enregistrée, au 1<sup>ier</sup> jour, la concentration de *Ln. mesenteroides ssp. mesenteroides* était  $4.10^9$  UFC/g pour le fromage conservé dans l’huile d’olive,  $1,5.10^9$  UFC/g dans le fromage conservé dans le lactosérum et  $1,5.10^9$ UFC/g dans le fromage témoin. Cependant dans les trois fromages, une phase d’adaptation caractérisée par une légère augmentation est observée. Elle s’étale sur un intervalle de jours de 1<sup>er</sup> jour au 7<sup>ème</sup> jour. Le nombre de *Ln. mesenteroides ssp. mesenteroides* atteint une valeur de  $2,03.10^{11}$  UFC/g dans le fromage frais conservé dans l’huile d’olive. Ce dernier est resté stable pendant les trois jours du dénombrement avec une augmentation de plus d’un log ( $10^{11}$  UFC/g). De 1<sup>er</sup> jour au 3<sup>ème</sup> jour le nombre de *Ln. mesenteroides ssp. mesenteroides* atteint une valeur de  $2,39.10^{10}$  UFC/g dans le fromage frais conservé dans le lactosérum et au 28<sup>ème</sup> jour une augmentation de deux log ( $10^{12}$  UFC/g). Néanmoins dans le fromage frais témoin une augmentation de croissance de *Ln. mesenteroides ssp. mesenteroides* est continue pendant toute la phase de conservation de  $1,33.10^{15}$  UFC/g au 28<sup>ème</sup> jours. Donc l’huile d’olive et le lactosérum n’influence pas sur la croissance de la souche *Ln. mesenteroides ssp. mesenteroides*.



**Figure 7:** Résultats de l'idétermination de l'acidité titrable de *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides* en culture pure dans les différents fromages

**Figure 8:** Résultats de la détermination du pH de *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides* dans les différents fromages

La figure 8 montre, on note une diminution progressive approximativement stable du pH allant de 6,18 au (1<sup>er</sup> jour) à 5,77 au (7<sup>ème</sup> jour) dans le fromage conservé dans le lactosérum et de 5,85 au (1<sup>er</sup> jour) jusqu'au 5,8 au (3<sup>ème</sup> jour) dans le fromage frais témoin et de 5,63 au (1<sup>er</sup> jour) jusqu'au 5,34 au (3<sup>ème</sup> jour) dans le fromage frais conservé dans l'huile d'olive. Après 28 jours de conservation, le pouvoir acidifiant est plus élevé dans le fromage témoin (4,65) par rapport aux fromages conservés dans le l'huile d'olive (4,86).

La diminution du pH dans les trois fromages frais engendre une augmentation de l'acidité Dornic. Ce dernier atteint 54°D dans le fromage conservé dans le lactosérum, 59°D dans le fromage conservé dans l'huile d'olive et de 69°D dans le fromage témoin.

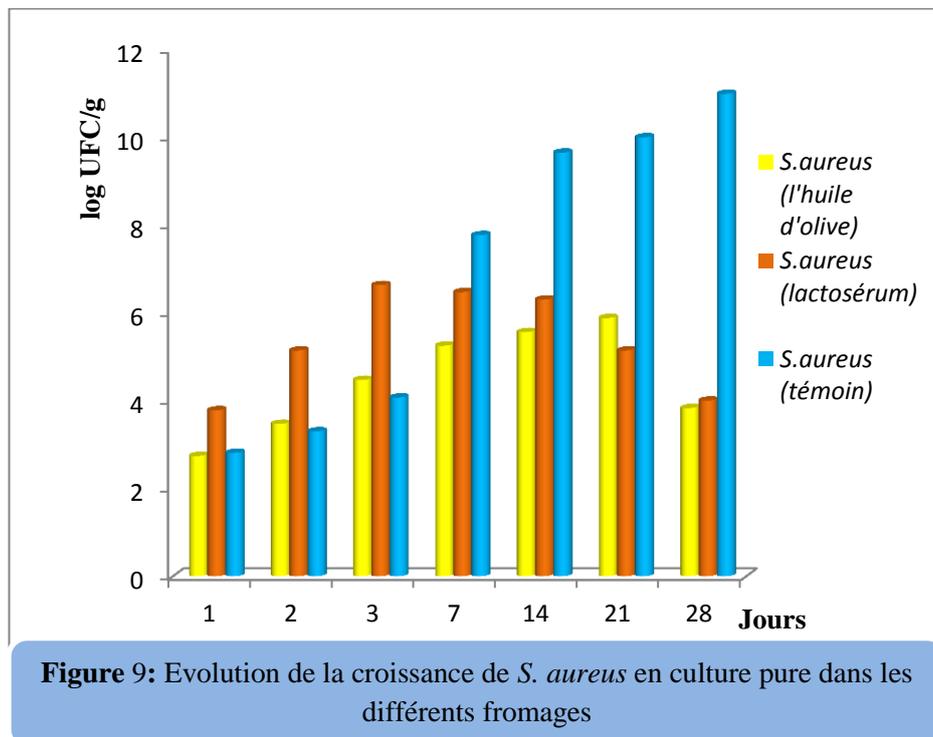
Néanmoins, les résultats obtenus montrent un bon pouvoir acidifiant dans les trois fromages, ce qui est un caractère technologique très important pour l'utilisation d'un ferment.

Les *Leuconostocs* produisent des acides organiques, notamment de l'acide lactique et acétique qui se libèrent dans le milieu provoquant l'acidification qui peut être une cause principale d'inhibition des souches pathogènes (Kihal et al., 1996). L'acidification est une conséquence de l'accumulation du lactate dans le milieu suite à une dégradation du lactose

et donc un abaissement notable du pH et une augmentation de l'acidité titrable (Chamba et al., 1994).

### VII-3- Suivi de la cinétique de croissance de *S. aureus* en culture pure dans les différents fromages

Les résultats du suivi de la croissance de la souche *S. aureus* dans le fromage frais de chèvre conservé ou non dans le lactosérum et l'huile d'olive ainsi que le suivi du pH et l'acidité titrable sont présentés dans les figures 9, 10 et 11 respectivement.



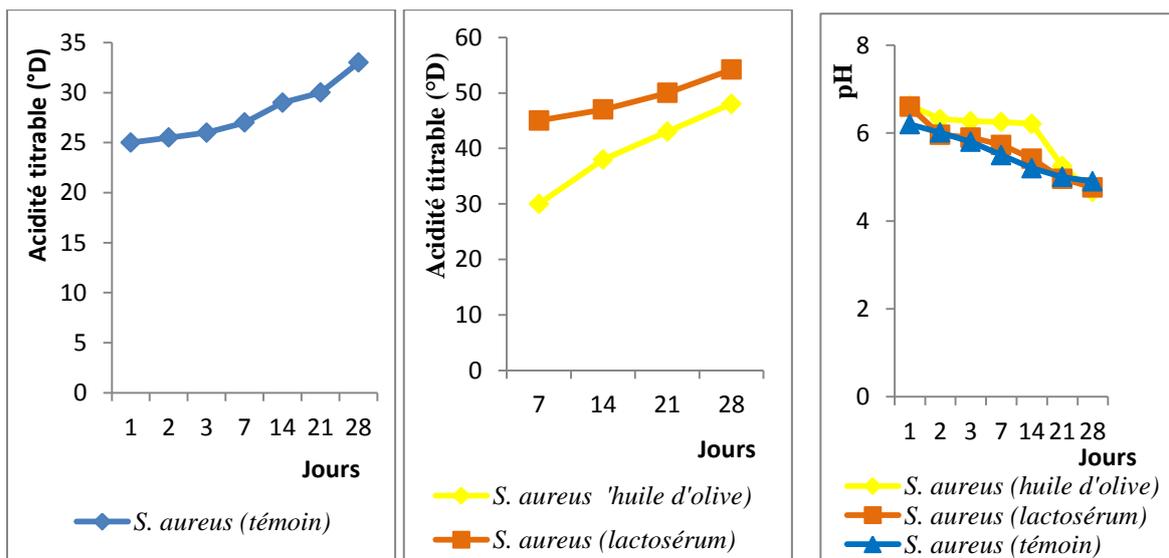
Ce pendant pour le fromage conservé dans l'huile d'olive, le taux de *S. aureus* augmente peu dans les 3 premiers jours de conservation, atteignant  $3 \cdot 10^4$  UFC/g. Sa stabilité à un taux de  $10^5$  UFC/g durant le 7<sup>ème</sup>, 10<sup>ème</sup> et 21<sup>ème</sup> jours, puis une diminution de 2 Log est observée au dernier jour de la conservation.

Un taux de  $3,46 \cdot 10^6$  UFC/g est atteint dès le 3<sup>ème</sup> jours de conservation dans le lactosérum qui reste stable jusqu'au 14<sup>ème</sup> jours. Néanmoins une réduction de 2 log est remarquée au bout du 21<sup>ème</sup> jours ( $10^4$ UFC/ml), avec une légère reprise de la croissance de ( $1,4 \cdot 10^5$  UFC/g) après 28<sup>ème</sup> jours

La croissance progressive de *S. aureus* dans le fromage témoin, peut-être s'expliquer par les conditions favorables de croissance et la richesse des fromages par les facteurs de croissances (Duquenne, 2010).

Selon Brisabois et al.(1997) Le lait traité thermiquement est plus favorable à la croissance de *S. aureus* que le lait cru, car ce micro-organisme est un mauvais compétiteur en présence d'autres flores bactérienne. Dans le lait cru, le nombre initial de *S. aureus* doit être égal ou supérieur à celui de la flore concomitante pour pouvoir se multiplier suffisamment et produire des entérotoxines.

La législation européenne impose un niveau de contamination de *S. aureus* en fromage en dessous de  $10^5$  UFC/g .A des niveaux supérieurs à  $10^5$  UFC/g, la recherche d'entérotoxine devient obligatoire ce qui représente un cout économique important pour les filières (Alomar, 2007).



**Figure10 :** Résultats de la détermination de l'acidité titrable de *Staphylococcus aureus* en culture pure dans les différents fromages

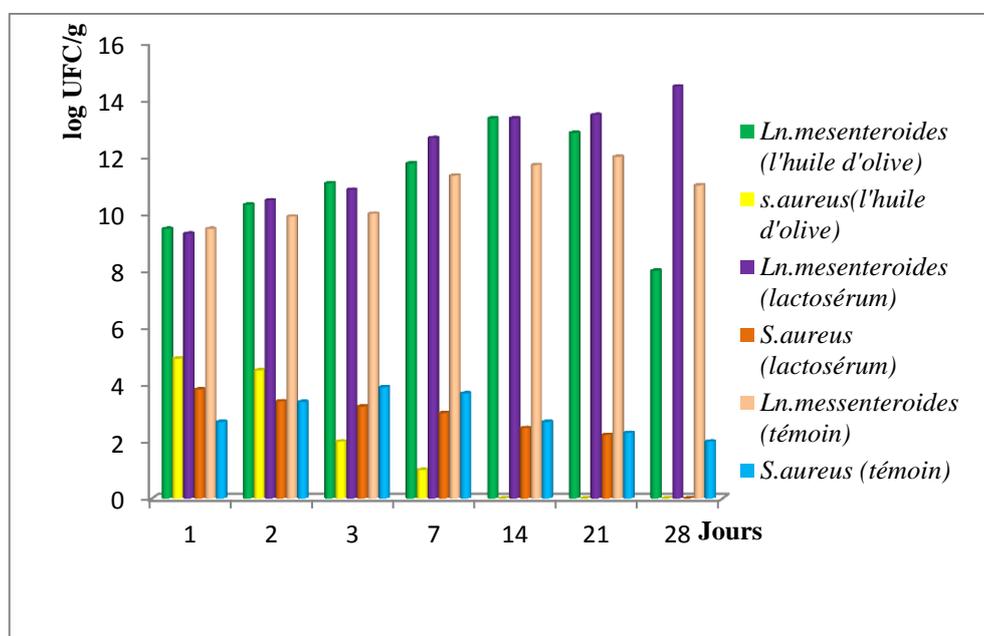
**Figure 11 :** Résultats de la détermination du pH de *Staphylococcus aureus* en culture pure dans les différents fromages

La mesure du pH de *S. aureus* en culture pure dans les différents fromages frais montre une diminution progressive. Après 28 jours de conservation, les pH des fromages témoin, conservé dans l'huile d'olive et conservé dans le lactosérum sont : 4,9, 4,66 et 4,76 respectivement.

#### VII-4-Suivi de l'activité antibactérienne de *S. aureus* et *Ln. mesenteroides* ssp. *mesenteroides* en culture mixte dans les différents fromages

L'étude de l'antagonisme *in vitro* de *Ln mesenteroides* ssp. *mesenteroides* à l'égard de *S. aureus* a été effectuée en culture mixtes dans les fromages frais conservés ou non dans le lactosérum ou l'huile d'olive.

Le dénombrement, la détermination du pH et de l'acidité titrable ont été réalisées dans les 3 premiers jours et après chaque 7 jours pendant 28 jours. La figure 12 nous montre que la souche lactique *Ln. mesenteroides* ssp. *mesenteroides* a provoqué une inhibition importante de la croissance de *S. aureus* dans tous les fromages. Ces résultats indiquent l'existence d'agents inhibiteurs produit par *Ln. mesenteroides* ssp. *mesenteroides*.



**Figure 12:** Evolution de la croissance de *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides* et *Staphylococcus aureus* en culture mixte dans les différents fromages

Dans le fromage témoin (sans conservation) on observe que la souche *Ln. mesenteroides* ssp. *mesenteroides* a pu maintenir les taux de croissance de la souche *S. aureus* en dessous du taux infectieux. En effet, l'évolution de ce dernier n'a pas excédé les  $10^3$  UFC/g. Une diminution d'un log est obtenue à partir du 14<sup>ème</sup> jour pour reprendre le tau initial d'ensemencement qui est de l'ordre de  $10^2$  UFC/g. Cette diminution peut être interprétée par la production de la souche *Ln. mesenteroides* ssp. *mesenteroides* de substances ou de métabolites qui inhibent la croissance de *S. aureus*.

En effet, **Gonzalez et al. (2007)** ont démontré que les souches de *Leuconostoc* qui ont été isolées à partir de « Genestoso » un fromage fabriqué à partir d'un mélange des laits de chèvre, de vache et de brebis en Espagne avaient une activité inhibitrice à l'égard de *S. aureus*, *L. monocytogenèse*, *Cl. Tyrobutyricum* et *E. faecalis*. Les *Leuconostocs* isolés à partir de lait de chamelle et de chèvre et de produit dérivés ont été signalés à être inhibitrices envers *Listeria monocytogenèses* et *Staphylococcus aureus* sans provoquer des effets néfastes sur le produit frais. (**Benkerroum et al., 2003**).

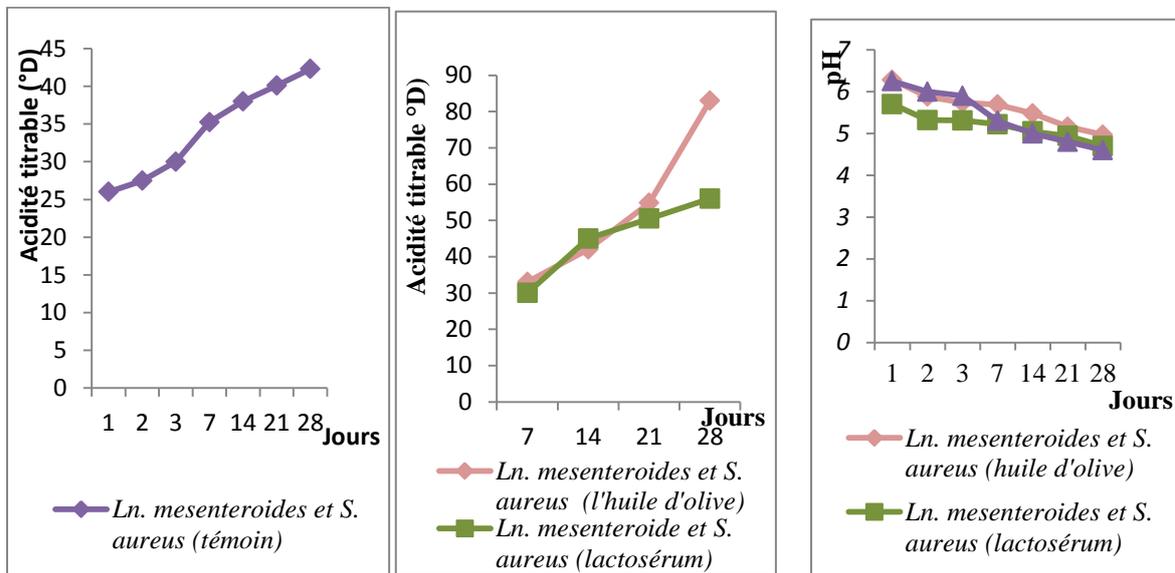
Une augmentation progressive de *Ln. mesenteroides* ssp. *mesenteroides* du 1<sup>er</sup> jour avec un taux de  $3.10^9$  UFC/g jusqu'à  $10^{12}$  UFC/g au 21<sup>ème</sup> jour. Néanmoins, une diminution d'un log est notée au 28<sup>ème</sup> jour. Les résultats obtenus témoignent d'un pouvoir inhibiteur important de *Ln. mesenteroides* vis-à-vis de *S. aureus* dans le fromage. Effectivement, une réduction de huit log ( $10^2$  UFC/g) de la croissance de ce dernier est obtenue au 28<sup>ème</sup> jours par rapport au fromage témoin sans *Ln.mesenteroides* ( $9,8.10^{10}$  UFC/g) (figure 14), En effet, il a été rapporté que les bactéries lactiques pouvaient inhiber certains agents pathogènes par compétitions nutritionnelles (**Charlier et al., 2009**)

Les résultats obtenus de l'étude de l'effet antagoniste dans les fromages conservés révèlent un meilleur effet inhibiteur de *Ln. mesenteroides* vis-à-vis de *S. aureus* après conservation dans l'huile d'olive. À partir du 14<sup>ème</sup> jour, une inhibition totale de *S. aureus* est notée (0UFC /g), aucune reprise de la croissance n'est apparue. Cependant, ce taux d'inhibition de 100 % n'est obtenu qu'au bout du 28<sup>ème</sup> jour dans le lactosérum. Il est à noter que le tau infectieux de *S.aureus* n'est atteint dans aucun fromage en présence de *Ln.mesenteroides* après ou non conservation. Ces résultats indiquent l'existence d'une synergie entre l'effet inhibiteur de la souche *Ln. mesenteroides* ssp. *mesenteroides* avec celui de la conservation dans l'huile d'olive ou le lactosérum. En général, les résultats obtenus suggèrent l'utilisation de *Ln.mesenteroides* non seulement comme ferment mais aussi comme bioconservateurs dans les fromages frais. Cependant, une conservation des fromages dans des produits naturels comme l'huile d'olive et le lactosérum peut améliorer en plus de leur qualité organoleptique et nutritionnelle, leur qualité microbiologique.

**Garem et al.(1996)** et **Pouliot et al.(2000)** ont démontrés dans leurs études que les protéines de lactalbumine, ont une activité antimicrobienne relativement élevée contre les bactéries pathogènes à Gram positif. On constate aussi que l'huile d'olive a un rôle d'inhibiteur, vu que le taux de *S. aureus* en culture pure est de  $7.10^3$  UFC/g au 28<sup>ème</sup> jours ;

La littérature rapporte que l'activité antibactérienne de l'huile peut être également liée aux composés phénoliques (Romero et al., 2007 ; Karaosmanoglu et al., 2010). Dilika et al., (2000) ont observé une activité antibactérienne élevée des acides oléique et linoléique particulièrement vis-à-vis des souches à Gram positive par rapport à celle à Gram négative.

Les valeurs de pH (figure 14) diminuent respectivement de 6,25 à 4,6 pour le fromage témoin, de 5,7 à 4,7 pour le fromage conservé dans le lactosérum et de 6,28 à 4,97 pour le fromage conservé dans l'huile d'olive. L'acidification du milieu joue un rôle important sur la croissance des souches. Les résultats obtenus pour l'acidité titrable (figure 13) montrent une augmentation progressive qui est inversement proportionnelle aux valeurs du pH.



**Figure 13:** Résultats de la détermination de l'acidité titrable de *Leuconostoc mesenteroides ssp mesenteroides* et de *S.aureus* en culture mixte dans les différents fromages

**Figure 14 :** Résultats de la détermination du pH de *Leuconostoc mesenteroides ssp mesenteroides* et *S. aureus* en culture mixte dans les différents

Des études ont montré que l'acidification du milieu par l'addition d'acide lactique jusqu'à un pH de 4,5-4,4 inhibait complètement la croissance de *S. aureus* (Charlier et al, 2009). Néanmoins en plus de la diminution du pH du milieu, l'effet antagoniste des acides organiques (lactique et acétique) envers *S. aureus* résultait de l'action de leur forme non dissociée. Effectivement, la forme non dissociée de l'acide peut traverser facilement la membrane et acidifier le cytoplasme par libération de protons, ce qui altère le

métabolisme cellulaire en inhibant certaines fonctions (**Caplice et Fitzgerald, 1999**). Cependant dans notre étude les pH des cultures mixtes de la souche *S. aureus* dans les fromages témoins, conservés dans le lactosérum ou l'huile d'olive en présence de *Ln. mesenteroides* ssp. *mesenteroides* est respectivement 4,6, 4,70 et 4,97 après 28 jours de stockage. *S. aureus* peut croître à des pH entre 4,6 et 10 avec une croissance optimale à pH neutre (**Charlier et al, 2009**). Si le pH ne joue qu'un rôle mineur dans le phénomène d'inhibition de *S. aureus* on peut supposer que l'effet inhibiteur de sa croissance est dû à l'accumulation d'autres substances anti- Staphylococcique produites par *Ln. mesenteroides* ssp. *mesenteroides*.

**Alomar J. (2007).** Etude des propriétés physiologiques de *Lctococcus lactis* et *Lactococcus garvieae* pour la maîtrise de *Staphylococcus aureus* en technologie fromagères. Thèse de Doctorat de Procédés Biotechnologiques et Alimentaires. Institut National Polytechnique de Lorraine (INPL),94p.

**Anonyme. (1995).** Tetra Pack Processing System Manuel de transformation du lait, Suède. p442.

**Bayoub K, Elotmani F, Assobhei O, Jaoua S et Soukri A. (2006).**Contribution à l'étude des bactériocines produites par des souches isolées du lait fermenté traditionnel « Raïb ». Congrès international de Biochimie, Agadir.7p.

**Bellil Y. (2013).** Evaluation de l'effet des substances antimicrobiennes produites par *Leuconostoc mesenteroides* du lait cru de chamelle sur *Listeria ssp.* Mémoire de Magistère en Contrôle Microbiologique et Hygiène. Université d'Oran, 131p.

**Benkerroum N, Daoudi A et Meryem K. (2003).** Behaviour of *Listeria monocytogenèse* in raw sousages (merguez) in presence of a bacteriocin producing lactococcal strain as protective culture. Meat Science. **63**, 479-484.

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

**Bhunia AK. (2008).** *Staphylococcus aureus*. Edition: Springer Science, New York. 276p.

**Boubchir LK. (2012).** Effet de l'enrichissement (avec des concentrations de protéines laitières) et des paramètres technologiques sur la qualité du yaourt fabriquée à la laiterie Soummam Akbou, pour l'obtention du diplôme Magistère en Biochimie Appliquée et Biotechnologie .Université de Mouloud Mammeri, Tizi-Ouzou, 100p.

**Boubezari MT. (2010).**Contribution à l'étude des caractéristiques physicochimiques et mycologiques du lait chez quelques races bovines, ovines et caprines dans quelques élevages de la région de Jijel. Pour l'obtention du diplôme de Magister en Médecine Vétérinaire Option : hygiène alimentaire. Universite de Mentouri, Constantine, 124p.

**Brisabois A, Lafarge V, Brouillaud A, De Buyser M L, Collecte C, Garin-Bastuji B et Caplice E et Fitzgerald GF. (1999).** Food Fermentation : Rôle of microorganisms in food production and preservation. *International Journal of Food Microbiology*, pp 131-149.

**Cayot P, Lorient D. (1998).** Structures et techno-fonctions des protéines du lait. Tec & Doc Lavoisier. Paris. 363p

**Chamba J F, Duong C, Fazel A et Prost F. (1994).** Sélection des souches de bactéries lactiques. In *bactéries lactiques*. (Eds), Loriga, Paris. pp. 499-519.

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

**Daly MC, Duncan G, McDonough P et Williams DR. (1972).** Published correction appears in *Am. J. Public Health*, 29. P. 115- 157.

**Delarras C. (2008).** Microbiologie pratique pour le laboratoire, d'analyse ou de contrôles sanitaires. Edition TEC et DOC, Paris, pp .234-364.

**Dellaglio F, de Roissard H, Torriani S, Curk M C et Janssens D. (1994).** Caractéristiques générales des bactéries lactiques. In : *Bactéries lactiques* (De Roissard H. et Luquet F.M.). *Loriga, Uriage.* 1 : 25-116.

**Desjeux JF. (1993).** Valeur nutritionnelle du lait de chèvre. *Lait de chèvre et santé*. Paris. 573p.

**Devoyod J J, Poullain F. (1988).** Les Leuconostocs Propriétés: leur rôle en technologie laitière. *Lait*, INRA, Laboratoire de Microbiologie laitière, France, 68 (3), 249-280.

**Dilika F, Bremner P D and Meyer J J M .(2000).** Antibacterial activity of linoleic and oleic acids isolated from *Helichrysum pedunculatum* : a plant used during circumcision rites. *Fititerpia.* 71, 450-452.

**Dortu C, Thonart P. (2009).** Les bactériocines des bactéries lactiques: caractéristique et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 13(1), 143-154.

**Drake E A, Paape M J et DI carlo A L. (1992).** Prevalence of high somatic cell counts in bulk tank goat milk. *Journal of Dairy Science*, 76, 1035-1039.

**Drider D et Prévost H. (2009).** Bactéries Lactiques. Physiologie, Métabolisme, Génomique et Applications industrielles Economica .Paris. 539p.

**Dunière L. (2012).** Stratégies de limitation du portage sain des *Escherichia coli* producteurs de Shigatoxines (STEC) par les bovins Potentiel bio-protecteur des bactéries lactiques en alimentation animale. Thèse de Doctorat en Nutrition et Sciences des Aliments. Université Blaise Pascal d’Auvergne, 318p.

**Duquenne M. (2010).** Incidence de paramètres technologiques sur l’expression de gènes et la production d’entérotoxines de *Staphylococcus aureus* au cours des 72 h suivant l’emprésurage des laits en fabrication fromagère. Thèse de Doctorat en Micronologie. Ecole doctorale Abies, paris 217p.

**Elliot T R. (2001).** Public health concerns. In: applied diary microbiology. Second edition: ELMER H. MARTH, JAMES L.STEELE. Ed. Marcel Dekker, Inc. New York. 690p.

**Euzéby JP. (2011).** List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature – Genus *Lactobacillus*. Base en ligne : <http://www.bacterio.cict.fr/l/lactobacillus>. (Consulté le 5.03.2014).

**Garem A, Léonil J, Daufin G et Maubois J L. (1996) .** Nanofiltration d'acides aminés sur membranes organiques: influence des paramètres physico-chimiques et de la pression transmembranaire sur la sélectivité. Lait, 76:257-282.

**Gonzalez L, Sandoval H, Sacristan N, Castro JM, Fresno JM et Tornadijo ME. (2007).** Identification of lactic acid bacteria isolated from Genestoso cheese throughout ripening and study of their antimicrobial activity. Food Control. **18**, 716-722.

**Guillaume. (2014).** Pasteurisation-Stérilisation. Edition : UPBM, 11p.

**Guiraud JP. (2003).** Microbiologie alimentaire. Dunod.RIA (Le mensuel de l’innovation alimentaire). Paris. 651p.

**Gyu S.C et Hyung K.D. (2006).** Isolation and Identification of Lactic Acid Bacteria Isolated from a traditional Teotgal Product in Korea. Ocean Science Journal. Vol. **41**(2), 113-119.

**Hadef S. (2012).** Evaluation des aptitudes technologiques et Probiotiques des bactéries lactiques locales. Mémoire de Magistère en Microbiologie Appliquée .Université Kasdi Merbah de Ouargla, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre et de l’Univers, 135p.

**Haenlein GFW. (2004).** Goat milk in human nutrition. *Small Rumin.* 51.155-163.

**Hajj seman E, Dib H, Abi Ramia et Chehid M. (2011).** Caractérisation chimique et qualité bactériologique de produits laitiers caprins traditionnels libanais, Libanon, pp.21-29.

**Hennekinne J A, Letertre C, Petit L, Chesneau O, Brisabois A et Buyser ML. (2007).** Characterization of *Staphylococcus aureus* strains associated with food poisoning outbreaks in France. *International Journal of Food Microbiology.*115, 369-375.

**Ho TNT, Tuan N, Deschamps A et Caubet R. ( 2007).** Isolation and identification of lactic acid bacteria (LAB) of the Nem Chua fermented meat product of Vietnam. *Int. Workshop on Food Safety and Processing Technology*, pp.134-142.

**Jaubert G, Bodin J P et Jaubert A. (1997).** Flavour of goat from bulk milk. *CIHEAM, Options Méditerranéenne*, 6. *International Conférence On Goats*, 98-93.

**J.O.R.A. (1998).** Arrêté interministériel du 25 Ramadhan 1418 correspondant au 24 janvier 1998 modifiant et complétant l'arrêté du Safar 1415 correspondant au 23 juillet 1994 relatif aux spécifications microbiologiques de certaines denrées alimentaires.N°035 du 27-05-1998, 7p.

**Jorgensen HJ, Mork T et Rorvik LM. (2005).** The occurrence of *Staphylococcus aureus* on a farm with small-scale production of raw milk cheese. *J Dairy Sci* **88** (11), 3810-7.

**Karaosmanoglu H, Soyer F, Ozen B et Tokalti F. (2010).** Antimicrobial and Antioxidant Activities of Turkish Extra Virgin Olive Oils. *Journal agricultural and Food Chemistry.* **58**, 8238-8238.

**Kebchaoui J. (2012).** Le lait : Compositions et propriétés. *Faculté Polydisciplinaire de Taroudant (Maroc) et L'enil de Besancon Mamirolle, France*, 37p .Base en ligne : <http://www.fpt.ac.ma/l.pdf>. (Consulté le 5.03.2014).

**Kérouenton A, Kihal M, Prevost H, Lhotte ME, Huang DQ, Divies C. (1996).** Instability of plasmid-encoded citrate permease in *Leuconostoc*. *J. Appl. Microbiol.* 22, 219–223.

**Kérouenton A, Hennekinne J A, Letertre C, Petit L, Chesneau O, Brisabois A et Buyser M L. (2007).** Characterization of *Staphylococcus aureus* strains associated with food poisoning outbreaks in France. *International Journal of Food Microbiology.*115, 369-375.

**Kihal M. (1996).** Etude de la production du dioxyde de carbone par *Leuconostoc mesenteroides*, éléments d'application en technologie fromagère type fromage bleu. Thèse de Doctorat d'Etat. Université d'Oran, Algérie, 86p.

**Kihal M, Prevost H, Lhotte ME, Huang DQ, Divies C. (1996).** Instability of plasmid-encoded citrate permease in *Leuconostoc*. *J. Appl. Microbiol.* 22, 219–223.

**Klaenhammer TR., Barrangou R, Logan Buck B et Azcarate-Peril MA. (2005).** Genomic features of lactic acid bacteria effecting bioprocessing and health. *FEMS Microbiol. Rev.*, **29**, 393-409. .

**Larpent J P. (1997).** Microbiologie alimentaire: Technologie de laboratoire. Paris. 1073p.

**Leroy et de Vuyst L. (2004).** Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends Food Science and Technology.* 15:67–78.

**Mahaut M, Jeantet R et Brule G. (2000).** Initiation à la technologie fromagère. Edition Tec & Doc, : Lavoisier, Paris, 580 pages.

**Makhloufi KM. (2011).** Caractérisation d'une bactériocine produite par une bactérie lactique *Leuconostoc pseudomesenteroides* isolée du boza. Thèse de Doctorat en Microbiologie, Biochimie spécialité Microbiologie. Université Pierre et Marie Curie, France, 200p.

**Masle I, Morgan F. (2001).** Aptitude du lait de chèvre à l'acidification par les ferments lactiques : facteurs de variations liés à la composition du lait. *81* :561-569.

**Messens W et De Vuyst L. (2002).** (Inhibitory substances produced by lactobacilli isolated from sourdoughs. *Int. J. Food Microbiol.* 72. P. 31-43.

**Meyrand A. (1999).** Analyse Et Maitrise Du Danger Lié Aux Staphylocoques Dans Les Fromages Au Lait Cru De Chèvre. Thèse de doctorat université de Lyon 1, France. Base en ligne : [http:// : www.inist.fr](http://www.inist.fr).

**Mofredj A, Bahloul H et Chanut C. (2007).** *Lactococcus lactis*: un pathogène opportuniste? *Lactococcus lactis* : une bactérie opportuniste ? *Médecine et Maladies Infectieuses.* **37**, 200-207.

**Morgane F, Bonnin V, Meyraud A, Mazzuy C, Malereau MP, Perrin G et Vernoy-Rozand C. (2000).** Comportement de *S. aureus* et *Listeria monocytogenèse* dans les fromages de chèvre au lait cru. *Renc. Rech. Ruminants.* 7, 351-354

**Moualek I. (2011).** Caractérisation du lait de chèvre collecté localement: Séparation chromatographique et contrôle électrophérique des protéines. Mémoire de Magistère de Tizi Ouzou, Faculté des Sciences Technologiques, Tizi Ouzou, 154p.

**Paradal M. (2012).** La transformation fromagère caprine fermière, Ed TEC et DOC, Lavoisier .12 . 289p

**Parente E et Cogan TM. (2004).** Starter cultures: general aspects. In: Fox, P. F., McSweeney P. L. H., Cogan T.M. et Guinee, T. P. (Eds.), *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, Vol. I. Chapman and Hall, London, pp.123-148.

**Pilet M F, Magras C et Federighi M. (1998).** Bactéries lactiques. In : Manuel de bactériologie alimentaire (Sutra L, Federighi M, Jouve J.L.). Polytechnica. Paris, pp .235-260.

**Pouliot Y, Gauthier S F et L'Heureux J. (2000).** Effect of peptide distribution on the fractionation of whey protein hydrolysates by nanofiltration membranes. *Lait* **80**,113-122.

**Pouliot Y, Wijers M C, Gauthier S F et Nadeau L. (1999).** Fractionation of whey protein hydrolysates using charged UF/NF membranes. *J. Membrane Sci.* **158**,105-114.

**Rhiat M, Labioui H, Driouich H, Aouane M, Chbab Y, Mennane Z et Ouhssine M. (2005).** Etude bactériologique comparative des fromages frais marocains commercialisés (Mahlabats) est des fromages fabriqués au laboratoire. *Afrique Science.* **07**,108-112.

**Romero C, Medina E, Vargas J, Brenes M and De Castro A. (2007).** In vitro activity of olive polyphenols against *Helicobacter pylori* *Jornal of Agricultural and Food Chemistry.* **55**(3), 680-686.

**Ross GR. (1981).** The inhibition of growth of spoilage microorganisms in milk by *Streptococcus lactis* subsp. *diacetylactis*, *Leuconostoc cremoris* and *L. dextranicum*. *Aust. J. Dairy Technol.*36, 147-152.

**Schillinger U et Lück F.K. (1989).** Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**, 1901-1906.

**Schuck P, bouhallah S, Durupt D, Varielle P, Humbert JP et Mrin M. (2004).** Séchage des lactosérums et dérivés : rôle du lactose et de dynamique de l'eau. Dairy science and Technologie. 84.243-268.

**Seifu L, Souza A M L, Lopes R V, Nunes A C et Nicoli RJ. (2007).** Comparison of antagonistic ability against Enteropathogenes by G+ and G- anaerobic dominant components of human fecal microbiota. Folia Microbial.51.141-145.

**Sessou P, Farougou S, Azokpota P, Youssao I, Yehouenou B, Ahounou A et Codjoko koko Sohounhloue D. (2013).** Inventaire et analyse des pratiques endogènes de conservation du *wagashi*, un fromage traditionnel produit au Bénin. Int. J. Biol. Chem. Sci .7(3): 938-952.

**Sienkiewicz T, Riedel C L, Verlag T, Mann G B. (1992).** Whey and wheyutilization. International Dairy Journal, 2, 6: 373 – 375 **Sottiez. (1985).** Produits dérivés des fabrications fromagères-extrait du lait et produits laitiers Tome 2. Collection Tec et Doc. Apria, pp.357-392.

**Solieri L, Giudici P. (2009).** Vinegars of the World Springer-Verlag. Italia.97p.

**Sottiez. (1985).** Produits dérivés des fabrications fromagères-extrait du lait et produits laitiers .Tome 2. Collection Tec et Doc. Apria, pp. 357-392.

**Tanouti K, Serghini Caid H, Abid M, Mihamou A, Khiar M, Hachem M E, Bahetta Y et Elamrani A. (2011).** Isly Huile d'Olive Vierge Analyse des Triglycérides et Composition en Acides Gras. Les Technologies de Laboratoire, Volume, N° 23. 59p

**Thoral MF. (1997).** Les germes pathogènes dans le lait et les produits laitiers : situation en France et en Europe. Science. Technologie. off.Int. Epiz.16 (1). 452-471.

**Vandenbergh PA. (1993).** Lactc acid bacteria, their metabolic products and interference with microbial growth. FEMS Microbiology Reviews. 12, 221-238.

**Veillet S. (2010).** Enrichissement nutritionnel de l'huile d'olive : Entre tradition et innovation. Thèse de doctorat en science chimique .Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse, 160p.

**Vignola CL. (2002).** Science et technologie du lait : transformation du lait.600p.

**Yildiz F. (2010).** Developpement and manufacture of yougurt and other dairy products, CRC Press Taylor & Francis Group.USA.435p.

**Zarour k (2010).**Contribution à l'étude microbiologique et technologique des espèces de *Leuconostoc mesenteroides* isolées de différents écosystèmes. Mémoire de Magistère Contrôle et hygiène microbiologique. Université D'Oran Es-Senia, 127p.

**Zarour K, Benmechernene Z, Hadadji M, Boumediene MBB, Henni J et Kihal M. (2012).**caractérisation microbiologique et technologique des espèces de *Leuconostoc mesenteroides* isolées du lait cru de chèvre et de chamelle d'Algérie, Nature et Technologie,pp.39-47

**Zeller B. (2005).** Le fromage de chèvre : Spécificités technologiques et économiques. Thèse de Doctorat. Université Paul-Sabatier de Toulouse .Ecole Nationale Vétérinaire. Toulouse.78p.

L'objectif de la présente étude a été de suivre en premier lieu la croissance de la souche *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides* et *S.aureus* en culture pure et en culture mixte dans un fromage frais au lait de chèvre mis au point au laboratoire. En deuxième lieu étude de l'impact de la conservation dans l'huile d'olive ou dans le lactosérum sur la croissance de ces dernières et l'activité anti-*S.aureus* de la souche de *Ln. mesenteroides* ssp. *mesenteroides*.

Dans ce contexte une revivification et vérification de la pureté des souches ont été réalisées, les résultats obtenus montrent que les souches étudiées sont parfaitement pures. L'effet antagoniste de *Ln. mesenteroides* ssp *mesenteroides* vis-à-vis *S. aureus* a été mis en évidence par le test de spot, les résultats montrent une zone d'inhibition de 35 mm. Cela révèle que *Ln.mesenteroides* ssp *mesenteroides* est douée d'une activité antistaphylococcique.

Neuf fromages frais ont été fabriqués et inoculés avec *Ln. mesenteroides* ssp *mesenteroides* et/ou *S.aureus* en culture pure ou en culture mixte. Certains de ces derniers sans conservés soit dans l'huile d'olive ou le lactosérum.

Afin d'étudier la croissance et le pouvoir acidifiant de la souche *Ln. mesenteroides* ssp *mesenteroides* et la souche cible *S. aureus* dans les différents fromages frais, la mesure du pH et de l'acidité titrable ainsi que le suivi de la cinétique de croissance de ces dernières a été réalisée pendant 28 jours ; chaque jour durant 3 jours puis après chaque 7 jours, jusqu'au 28<sup>ème</sup> jours. Ceci, après une conservation à 8°C. Les résultats obtenus montrent que la conservation dans l'huile d'olive ou le lactosérum réduit les taux de *S.aureus* qui atteignent les  $10^{10}$ UFC/g dans les fromages non conservés. Néanmoins le taux infectieux est atteint dans l'huile d'olive dès le 7<sup>ème</sup> jour ( $1,8.10^5$ UFC/g) et dans le lactosérum seulement au bout du deuxième jour ( $1,4 10^5$ UFC /g). Cependant aucune influence n'est notée sur la croissance de *Ln.mesenteroides*. En effet, un taux de croissance qui dépasse les  $10^{12}$ UFC/g est obtenu.

Le pH des milieux diminue successivement durant toute la période de conservation. Ce dernier varie entre 5,07 à 4,64 après 28 jours de conservation pour *Ln. mesenteroides* et de 4,9à 4,66 pour *S.aureus*.

Les résultats obtenus de l'étude de l'effet antagoniste révèlent un meilleur effet inhibiteur de *Ln. mesenteroides* vis-à-vis *S. aureus* dans le fromage frais conservé dans l'huile d'olive. Effectivement à partir du 14<sup>ème</sup> jour, une inhibition totale de *S. aureus* est notée (0UFC /g),

aucune reprise de la croissance n'est apparue. Cependant, ce taux d'inhibition de 100 % n'est obtenu qu'au bout du 28<sup>ème</sup> jour dans le lactosérum. Ces résultats indiquent l'existence d'une synergie entre l'effet inhibiteur de la souche *Ln. mesenteroides ssp mesenteroides* avec celui de l'huile d'olive et le lactosérum. En général, les résultats obtenus suggèrent l'utilisation de *Ln. mesenteroides* et les produits naturels (l'huile d'olive et le lactosérum) comme bioconservateurs.

En perspective, cette étude qui reste préliminaire doit être complétée par d'autres études relatives à :

- L'étude de la qualité physicochimique et nutritionnelle des différents fromages témoins (sans *S. aureus*).
- Association de *Ln. mesenteroides ssp mesenteroides* avec d'autres souches lactiques
- Réalisée une analyse sensoriel pour les fromages témoin (sans *S. aureus*).
- La recherche de l'origine de l'activité antimicrobienne de *Ln. mesenteroides ssp. mesenteroides* à l'égard de *S. aureus*. Testée cette dernière vis-à-vis d'autres espèces pathogènes.
- La détection et la caractérisation des entérotoxine produites par *S. aureus* par des techniques immunologiques de biologie moléculaire et suivre l'évolution de leur production en présence de *Ln. mesenteroides ssp mesenteroides*.

**Annexe I :** Composition des milieux de culture

(Guiraud, 2003 ; Delarras, 2008)

**Bouillon nutritif**

Composant	Quantité
Extrait de viande	1g
peptone	5g
Chlorure de sodium	5g
Eau distillée	1000ml

pH =7,5, autoclave à 120°C/20min

**Gélose Chapman**

Composant	Quantité
Extrait de viande	1g
Peptone	10g
Mannitol	10g
Chlorure de sodium	75g
Rouge de phénol	0.025g
Agar	15g
Eau distillée	1000ml

pH=7,5, autoclave à 120°C/20min

**Gélose EMB**

Composant	Quantité
Peptone pancréatique de gélatine	10,0 g
Lactose	10,0 g
Phosphate dipotassique	2,0 g
Eosine Y	0,4 g
Bleu de méthylène	64,0 mg
Agar agar bactériologique	15,0 g
Eau distillée	1000 ml

pH=7,0 ± 0,2 , autoclave à 115°C/20min

## Annexes

### Milieu MRS

Composant	Quantité
Peptone	10g
Extrait de viande	10g
Extrait de levure	5g
Glucose	20g
Tween 80	1ml
Phosphate bipotassique	2g
Acétate de sodium	5g
Citate d'ammonium	2g
Sulfate de magnésium, 7H <sub>2</sub> O	0,2g
Sulfate de manganèse, 4H <sub>2</sub> O	0,5g
Agar	15g
Eau distillée	1000ml

pH=6,5, autoclave à 120°C/20min

### Bouillon MRS

Composant	Quantité
Peptone	10g
Extrait de viande	10g
Extrait de levure	5g
Glucose	20g
Tween 80	1ml
Phosphate bipotassique	2g
Acétate de sodium	5g
Citate d'ammonium	2g
Sulfate de magnésium, 7H <sub>2</sub> O	0,2g
Sulfate de manganèse, 4H <sub>2</sub> O	0,5g
Eau distillée	1000ml

pH=6,5, autoclave à 120°C/20min

### Eaux physiologique

Composant	Quantité
Chlorure de sodium	9g
Eau distillée	1000ml

pH=7,2, autoclave à 120°C/20min

## Annexes

### Gélose SS

Composant	Quantité
Peptone pancréatique de viande	5,0 g
Extrait de viande	5,0 g
Lactose	10,0 g
Sels biliaires	8,5 g
Citrate de sodium	10,0 g
Thiosulfate de sodium	8,5 g
Citrate ferrique ammoniacal	1,0 g
Rouge neutre	25,0 mg
Vert brillant	0,33 mg
Agar agar bactériologique	15,0 g
Eau distillée	1000 ml

pH=7,3, autoclave à 115°C/20min

### Gélose VRBG

Composant	quantité
Peptone (peptone de viande pancréatique et papainique)	7,0 g
Extrait de levure	3,0 g
D-glucose	10,0 g
Sels biliaires (sels biliaires purifiés)	1,5 g
NaCL	5,0 g
Rouge neutre	0,03 g
Violet cristallisé	0,002 g
Agar-agar	15 g
Eau distillée	1000 ml

pH=7,4 ± 0,2, autoclave à 115°C/20min

### Bouillon de Roth

Composition	quantité
Extrait de viande de bœuf	4,5 g
Typtone	15 g
Glucose	7,5 g
Chlorure de sodium (Na Cl)	7,5 g
Azoture de sodium (Na N <sub>3</sub> )	0,2 g

pH=7,2± 0,2 , autoclave à 120°C/20min

## Annexes

### Bouillon litsky

Composition	Quantité
Peptone	20 g
Glucose	5 g
Chlorure de sodium (NaCl)	5 g
Phosphate monopotassique ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ )	2,7 g
Phosphate bipotassique ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ )	2,7 g
Azoture de sodium ( $\text{NaN}_3$ )	0,3 g
Ethyl-violet	0,4 mg

pH=6,9± 0,2 , autoclave à 115°C/20min

### Viande et foie (VF)

Composition	Quantité
Base viande-foie	30 g
Glucose	2 g
Amidon	2 g
Sulfite de sodium	2,5 g
Sels de fer	0,1 g
Agar	11 g

pH=7,7± 0,1, autoclave à 120°C/20min

### Gélose de Baird-Parker

Composition	Quantité g/l
Peptone de caséine	10 g
Extrait de viande	5 g
Extrait de levure	1 g
Glycine	12 g
Chlorure de lithium	5 g
Pyruvate de sodium	10 g
Tellurite de potassium	0,1 g
Suspension de jaune d'œuf	10 ml
Agar	17 g

pH=7,2 , autoclave à 120°C/20min

**Gélose PCA**

Composition	Quantité g/l
Tryptone	5
Extrait autolytique de levure	2,1
Glucose	1
Agar	15

pH=7,4± 0,2 , autoclave à 115°C/20min

**Milieu BCPL**

Composition	Quantité
Peptone	5
Lactose	10
Extrait de viande	3
Pourpre de bromoc <sup>2</sup> résol	25
Agar	15

pH=6,8, autoclave à 115°C/20min

**Bouillon de Giolitti et Cantoni**

Composition	Quantité
Paptone	10
Extrait de viande	5
Extrait de levure	5
Chlorure de lithium	5
Mannitol	20
Chlorure de sodium	5
Glycine	1,2
Pyruvate de sodium	3

pH=7, autoclave à 115°C/20min

**Bouillon de Roth (Delarras C 2008)**

<b>Composition</b>	<b>quantité</b>
Extrait de viande de bœuf	4,5 g
Typtone	15 g
Glucose	7,5 g
Chlorure de sodium (Na Cl)	7,5 g
Azoture de sodium (Na N <sub>3</sub> )	0,2 g

pH=6,8 ,autoclave à 120°C/20min

**Gélose Mueller- Hinton**

<b>Composition</b>	<b>Quantité</b>
Infusion de viande de bœuf	300 ml
Peptone de caséine	17,5g
Amidon de maïs	1,5g
Agar	17g
Eau distillé	1000 ml

pH= 7,4, autoclave à 115°C/15min

**Annexe II : Matériel utilisé**

**Produits chimiques et réactifs**

Violet de Gentaine  
Fushine  
Bleu de méthylène  
Phénolphtaléine à 1% ; la soude (N/9)  
pour la détermination de l'acidité  
titrable  
Ethanol  
Lugol  
eau oxygéné  
Présure de marque « Caglio liquido  
Caglifici Clerici » (Italie) de force  
1/10000  
Ether diéthylique  
Ethanol à 96% en volume  
Solution d'hydroxyde de  
potassium (0,1 N)  
Chloroforme ;  
Acide acétique  
Solution de thiosulfate de sodium  
(0,01 N)  
Empois d'amidon (solution aqueuse à  
1%)  
Solution d'iodure de potassium ;  
Thiosulfate de sodium (0,1N)  
Hydroxyde de sodium

**Autres matériel**

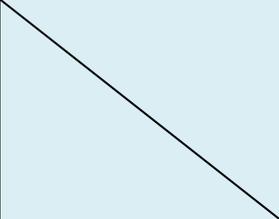
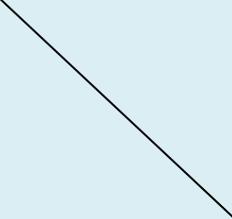
Verrerie usuelle (boites pétri,  
erlenmeyers, béchers, fioles, pipettes  
pasteurs, tube à essais, flacon burettes,  
entonnoirs, ...).  
Autoclave (Omron, E5C4, H2C)  
Bain Marie (Raypa) ;  
Balance électronique (Sartorius)  
Congelateur (Samsung)  
Etuve à 30°C (melaz)  
Etuve à 37 °C  
Four pasteur (Heraeus)  
Four pasteur (Controlsl  
Micropipettes (Accumax)  
Microscope optique (Zein)  
pH -mètre mobile (Hanna)  
pH-mètre (METTLER TOLEDO)  
Milko Scan-Minor (FOSS)  
Réfrigérateur (ENIEM)  
Vortex électrique (VELP)

Annexe III

Tableau I : résultats de l'analyse microbiologique de lait cru de chèvre

Germes	Observation	Résultats	Confirmation	Observation
<i>Salmonella et shigella</i>	- Colonies rose au centre noir des colonies violettes		1-Trouble dans la solution de près enrichissement. 2-Virage de couleur dans les solutions d'enrichissement. Probablement présence de <i>Salmonella</i>	 1 2
Levures et moisissures	Présence des levures (colonies Blanchâtre et crémeuse)			
Bactéries lactiques	Présence des Bactéries lactiques			
FTAM	Des colonies blanches est jaunâtres			
<i>Staphylocoque</i>	Noircissement de milieu GC		-colonies jaune, -après coloration de Gram on a observé par le microscope ;des amas en grappes de raisins, donc probablement il s'agit de <i>S. aureus</i>	 
<i>Coliformes totaux et fécaux</i>	Production du gaz et virage de couleur dans certain tubes		1-dans le tube BCPL virage de couleur, absence du gaz 2-absence de croissance da le milieu EMB 3-virage de couleur dans l'Eau peptoné exp d'indole mais absence d'anneau Absence des coliformes féaux	 2 1 3

## Annexes

<p><i>Streptocoque</i></p>	<p>Présence de trouble.</p>		<p>-absence de pastille violette dans le milieu Litsky. absence de colonie sur le milieu Slanetz</p> <p>Donc absence des Straptocoques fécaux(Entérocoques)</p>	
<p><i>Clostréduim sulfito réducteur</i></p>	<p>Absence de noircissement</p>			

**Tableau II :** Analyse microbiologique du lactosérum

Germes	dénombrement	Milieux utilisé	Durée et T°C d'incubation
Coliforme totaux	Ensemencement en masse d' 1 ml des dilutions $10^{-1}$ à $10^{-3}$ .	VRBG	24h à 37°C
Levures et moisissures	Ensemencement en masse d' 1 ml des dilutions $10^{-1}$ à $10^{-3}$ .	OGA	72h à 28°C
staphylocoque	Ensemencement en masse d' 1 ml des dilutions $10^{-2}$ à $10^{-5}$ .	Chapman	24h-48h à 37°C
<i>Clostridium sulfito réducteur</i>	Mettre 1 ml de lait cru dans un tube stérile on le met dans un bain Marie à 80°C/10mn suivi d'un choc thermique on verse dans le tube la gélose VF+ Additifs	VF + Additifs	24 h à 37 °C

## Annexes

**Tableau III** : Les dilutions du dénombrement des fromages frais

Jours	Souches	Conserver dans le lactosérum				Conserver dans l'huile d'olive			Sans conservateur (témoin)		
		Fromage 1 +Ln.	Fromage 2 +S.	Fromage 3 Ln+S	Fromage 4 +Ln.	Fromage 5 Ln+S.	Fromage 6 +S.	Fromage 7 Ln.	Fromage 8 Ln. + S.	Fromage 9 S.	
1 <sup>ème</sup>	Ln. S.	$10^{-7}$ à $10^{-10}$ /	$10^{-7}$ à $10^{-10}$ $10^{-1}$ à $10^{-4}$	/ $10^{-1}$ à $10^{-4}$	$10^{-7}$ à $10^{-10}$ /	$10^{-7}$ à $10^{-10}$ $10^{-1}$ à $10^{-4}$	/ $10^{-1}$ à $10^{-4}$	$10^{-7}$ à $10^{-10}$ /	$10^{-7}$ à $10^{-10}$ $10^{-1}$ à $10^{-4}$	/ $10^{-1}$ à $10^{-4}$	
2 <sup>ème</sup>	Ln. S.	$10^{-7}$ à $10^{-10}$ /	$10^{-7}$ à $10^{-10}$ $10^{-1}$ à $10^{-4}$	/ $10^{-1}$ à $10^{-4}$	$10^{-7}$ à $10^{-10}$ /	$10^{-7}$ à $10^{-10}$ $10^{-1}$ à $10^{-4}$	/ $10^{-1}$ à $10^{-4}$	$10^{-7}$ à $10^{-10}$ /	$10^{-7}$ à $10^{-10}$ $10^{-1}$ à $10^{-4}$	/ $10^{-1}$ à $10^{-4}$	
3 <sup>ème</sup> jo	Ln. S.	$10^{-8}$ à $10^{-11}$ /	$10^{-8}$ à $10^{-11}$ $10^{-2}$ à $10^{-5}$	/ $10^{-2}$ à $10^{-5}$	$10^{-8}$ à $10^{-11}$ /	$10^{-8}$ à $10^{-11}$ $10^{-2}$ à $10^{-5}$	/ $10^{-2}$ à $10^{-5}$	$10^{-7}$ à $10^{-10}$ /	$10^{-8}$ à $10^{-11}$ $10^{-1}$ à $10^{-4}$	/ $10^{-2}$ à $10^{-5}$	
7 <sup>ème</sup>	Ln. S.	$10^{-8}$ à $10^{-11}$ /	$10^{-8}$ à $10^{-11}$ $10^{-1}$ à $10^{-4}$	/ $10^{-2}$ à $10^{-5}$	$10^{-8}$ à $10^{-11}$ /	$10^{-8}$ à $10^{-11}$ $10^{-1}$ à $10^{-4}$	/ $10^{-2}$ à $10^{-5}$	$10^{-7}$ à $10^{-10}$ /	$10^{-8}$ à $10^{-11}$ $10^{-1}$ à $10^{-4}$	/ $10^{-2}$ à $10^{-5}$	
14 <sup>ème</sup>	Ln. S.	$10^{-7}$ à $10^{-10}$ /	$10^{-8}$ à $10^{-11}$ $10^{-1}$ à $10^{-4}$	/ $10^{-3}$ à $10^{-6}$	$10^{-8}$ à $10^{-11}$ /	$10^{-8}$ à $10^{-11}$ $10^{-1}$ à $10^{-4}$	/ $10^{-2}$ à $10^{-5}$	$10^{-7}$ à $10^{-10}$ /	$10^{-8}$ à $10^{-11}$ $10^{-1}$ à $10^{-4}$	/ $10^{-3}$ à $10^{-6}$	
21 <sup>ème</sup>	Ln. S.	$10^{-9}$ à $10^{-12}$ /	$10^{-11}$ à $10^{-14}$ $10^{-1}$ à $10^{-4}$	/ $10^{-1}$ à $10^{-4}$	$10^{-9}$ à $10^{-12}$ /	$10^{-11}$ à $10^{-14}$ $10^{-1}$ à $10^{-4}$	/ $10^{-1}$ à $10^{-4}$	$10^{-7}$ à $10^{-10}$ /	$10^{-11}$ à $10^{-14}$ $10^{-1}$ à $10^{-4}$	/ $10^{-1}$ à $10^{-4}$	
28 <sup>ème</sup>	Ln. S.	$10^{-11}$ à $10^{-14}$ /	$10^{-13}$ à $10^{-16}$ $10^{-1}$ à $10^{-4}$	/ $10^{-1}$ à $10^{-4}$	$10^{-9}$ à $10^{-12}$ /	$10^{-11}$ à $10^{-14}$ $10^{-1}$ à $10^{-4}$	/ $10^{-1}$ à $10^{-4}$	$10^{-7}$ à $10^{-10}$ /	$10^{-13}$ à $10^{-16}$ $10^{-1}$ à $10^{-4}$	/ $10^{-1}$ à $10^{-4}$	

Ln. : *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides* S. : *Staphylococcus aureus*. Dén. : Dénombrement,

**Annexe IV : Résultats du dénombrement de *Ln.mesenteroides* ssp. *mesenteroides* et de *S. aureus* dans le fromage frais ainsi la mesure du pH et de l'acidité titrable**

**Tableau I :** Résultat de dénombrement de la culture pure de *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides* dans les fromages frais de chèvre conservés ou pas dans l'huile d'olive ou dans le lactosérum

Jours	<i>Ln. mesenteroides</i> (l'huile d'olive)		<i>Ln. mesenteroides</i> (lactosérum)		<i>Ln. mesenteroides</i> (témoin)	
	UFC/ml	Log UFC/ml	UFC/ml	Log UFC/ml	UFC/ml	Log UFC/ml
1 <sup>er</sup>	4.10 <sup>9</sup>	9,60	1,5.10 <sup>9</sup>	9,17	1,50.10 <sup>9</sup>	9,17
2 <sup>ème</sup>	6.10 <sup>9</sup>	9,77	9.10 <sup>9</sup>	9,95	4,3.10 <sup>10</sup>	10,63
3 <sup>ème</sup>	3.10 <sup>10</sup>	10,47	2,39.10 <sup>10</sup>	10,37	7.10 <sup>10</sup>	10,84
7 <sup>ème</sup>	20,3.10 <sup>10</sup>	11,30	3,32.10 <sup>11</sup>	11,60	30x10 <sup>10</sup>	11,47
14 <sup>ème</sup>	44.10 <sup>11</sup>	12,64	4.10 <sup>11</sup>	11,52	20,3.10 <sup>11</sup>	12,30
21 <sup>ème</sup>	54,5.10 <sup>11</sup>	12,73	3.10 <sup>12</sup>	12,47	11,55.10 <sup>12</sup>	13,06
28 <sup>ème</sup>	61.10 <sup>11</sup>	12,78	30.10 <sup>12</sup>	13,47	13,3.10 <sup>14</sup>	15,12

**Tableau II :** Résultat de dénombrement de la culture pure de *Staphylococcus aureus* dans les fromages frais de chèvre conservés ou pas dans l'huile d'olive ou dans le lactosérum

Jours	<i>S. aureus</i> (l'huile d'olive)		<i>S. aureus</i> (lactosérum)		<i>S. aureus</i> (témoin)	
	UFC/g	Log UFC/g	UFC/g	Log UFC/g	UFC/g	Log UFC/g
1 <sup>er</sup>	5,5.10 <sup>2</sup>	2,74	61.10 <sup>3</sup>	4,78	6,5.10 <sup>2</sup>	2,81
2 <sup>ème</sup>	3.10 <sup>3</sup>	3,47	140.10 <sup>3</sup>	5,14	2.10 <sup>3</sup>	3,30
3 <sup>ème</sup>	3.10 <sup>4</sup>	4,47	3,46.10 <sup>6</sup>	6,63	1,2.10 <sup>4</sup>	4,07
7 <sup>ème</sup>	18.10 <sup>4</sup>	5,25	29.10 <sup>5</sup>	6,47	6.10 <sup>7</sup>	7,77
14 <sup>ème</sup>	37.10 <sup>4</sup>	5,56	2.10 <sup>6</sup>	6,30	4,5.10 <sup>9</sup>	9,65
21 <sup>ème</sup>	76.10 <sup>4</sup>	5,88	10 <sup>4</sup>	5,14	10 <sup>10</sup>	10
28 <sup>ème</sup>	7.10 <sup>3</sup>	3,83	1,4.10 <sup>5</sup>	4	9,8.10 <sup>10</sup>	10,99

## Annexes

**Tableau III :** Résultat du dénombrement de la culture mixte de *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides* et de *Staphylococcus aureus* dans les fromages frais de chèvres conservés ou non dans l'huile d'olive ou dans le lactosérum.

Jours	<i>S. aureus</i> + <i>Ln. mesenteroides</i> (l'huile d'olive)				<i>S. aureus</i> + <i>Ln. mesenteroides</i> (lactosérum)				<i>S. aureus</i> + <i>Ln. mesenteroides</i> (témoin)			
	<i>S. aureus</i>		<i>Ln. mesenteroides</i>		<i>S. aureus</i>		<i>Ln. mesenteroides</i>		<i>S. aureus</i>		<i>Ln. mesenteroides</i>	
	Log UFC/g	Log UFC/g	Log UFC/g	Log UFC/g	Log UFC/g	Log UFC/g	Log UFC/g	Log UFC/g	Log UFC/g	Log UFC/g	Log UFC/g	Log UFC/g
<b>1<sup>er</sup></b>	83. 10 <sup>3</sup>	4,9 1	3.10 <sup>9</sup>	9,47	72.10 <sup>2</sup>	3,85	2.10 <sup>9</sup>	9,30	5.10 <sup>2</sup>	2,69	3.10 <sup>9</sup>	9,47
<b>2<sup>ème</sup></b>	32.10 <sup>3</sup>	4,5	21.10 <sup>9</sup>	10,32	26.10 <sup>2</sup>	3,41	3.10 <sup>10</sup>	10,47	2.5.10 <sup>3</sup>	3,39	8.10 <sup>9</sup>	9,9
<b>3<sup>ème</sup></b>	10 <sup>2</sup>	2	12.10 <sup>10</sup>	11,07	17.10 <sup>2</sup>	3,23	7.10 <sup>10</sup>	10,84	8.3.10 <sup>3</sup>	3,91	10 <sup>10</sup>	10
<b>7<sup>ème</sup></b>	10	1	6.10 <sup>11</sup>	11,77	10.10 <sup>2</sup>	3	6.10 <sup>11</sup>	11,77	5.10 <sup>3</sup>	3,69	2.2.10 <sup>11</sup>	11,34
<b>14<sup>ème</sup></b>	0	0	22.4.10 <sup>11</sup>	13,35	3.10 <sup>2</sup>	2,47	22.4.10 <sup>12</sup>	13,35	5.10 <sup>2</sup>	2,69	5.2.10 <sup>11</sup>	11,71
<b>21<sup>ème</sup></b>	0	0	70.10 <sup>11</sup>	12,84	17.10	2,23	30.10 <sup>12</sup>	13,47	2.10 <sup>2</sup>	2,30	10 <sup>12</sup>	12
<b>28<sup>ème</sup></b>	0	0	10 <sup>8</sup>	8	0	0	30.10 <sup>13</sup>	14,47	10 <sup>2</sup>	2	2.5.10 <sup>11</sup>	11

## Annexes

**Tableau IV :** Résultats de la détermination du pH et de l'acidité titrable de *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides* en culture pure dans les différents fromages de chèvre

Souches Jours	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> ssp. <i>mesenteroides</i> (témoin)		<i>Leuconostoc mesenteroides</i> ssp. <i>mesenteroides</i> (l'huile d'olive)		<i>Leuconostoc mesenteroides</i> ssp. <i>mesenteroides</i> (lactosérum)	
	pH	Acidité titrable (°D)	pH	Acidité titrable (°D)	pH	Acidité titrable (°D)
1 <sup>er</sup>	5,85	43	5,63	/	6,18	/
2 <sup>ème</sup>	5,82	43	5,46	/	6,01	/
3 <sup>ème</sup>	5,80	45	5,41	/	5,83	/
7 <sup>ème</sup>	4,99	50	5,34	39	5,77	32
14 <sup>ème</sup>	4,85	60	5,17	51,7	5,44	36
21 <sup>ème</sup>	4,75	65	4,98	58	5,25	49
28 <sup>ème</sup>	4,65	69	4,86	59	5,07	54

**Tableau V :** Résultats de la détermination du pH et de l'acidité titrable de *Staphylococcus aureus* en culture pure dans les différents fromages de chèvre

Souches Jours	<i>Staphylococcus aureus</i> (témoin)		<i>Staphylococcus aureus</i> (l'huile d'olive)		<i>Staphylococcus aureus</i> (lactosérum)	
	pH	Acidité titrable (°D)	pH	Acidité titrable (°D)	pH	Acidité titrable (°D)
1 <sup>er</sup>	6,2	25	6,63		6,50	/
2 <sup>ème</sup>	6,01	25,5	6,27		5,96	/
3 <sup>ème</sup>	5,8	26	6,21		5,90	/
7 <sup>ème</sup>	5,5	27	6,32	30	5,73	45
14 <sup>ème</sup>	5,2	29	6,25	38	5,42	47
21 <sup>ème</sup>	5	30	5,25	43	4,96	50
28 <sup>ème</sup>	4,9	33	4,66	62	4,76	54,2

## Annexes

**Tableau VI:** Résultats de la détermination du pH et de l'acidité titrable de *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides* et de *Staphylococcus aureus* en culture mixte dans les différents fromages

Souches Jours	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> ssp. <i>mesenteroides</i> + <i>staphylococcus aureus</i> (témoin)		<i>Leuconostoc mesenteroides</i> ssp. <i>mesenteroides</i> + <i>staphylococcus aureus</i> (l'huile d'olive)		<i>Leuconostoc mesenteroides</i> ssp. <i>mesenteroides</i> + <i>staphylococcus aureus</i> (lactosérum)	
	pH	Acidité titrable (°D)	pH	Acidité titrable (°D)	pH	Acidité titrable (°D)
1 <sup>ier</sup>	6,25	26	6,28	/	5,70	/
2 <sup>ème</sup>	6	27,5	5,88	/	5,22	/
3 <sup>ème</sup>	5,9	30	5,74	/	5,32	/
7 <sup>ème</sup>	5,3	35,25	5,69	33	5,31	30
14 <sup>ème</sup>	5	38	5,48	83	5,05	45
21 <sup>ème</sup>	4,8	40,1	5,16	42	4,94	50,5
28 <sup>ème</sup>	4,6	42,3	4,97	54,8	4,70	56

## *Annexes*

---

*Synthèse bibliographique*

# *Introduction*

## *Matériel et méthodes*

## *Résultats et discussion*

*Conclusion*

## *Références bibliographiques*

## *Annexes*

## Résumé

Dans cette étude, l'effet antagoniste de la souche *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides* à l'égard de *Staphylococcus aureus* dans des fromages frais de chèvre conservés dans l'huile d'olive ou le lactosérum, un suivi de la cinétique de croissance des deux souches est réalisé pendant 28 jours de stockage à 8°C. Au préalable, un test de spot a été réalisé pour *Ln. mesenteroides* vis-à-vis *S. aureus*. Les résultats obtenus montrent un effet inhibiteur important avec un diamètre d'inhibition de 37mm.

L'étude de l'évolution du pH et de l'acidité titrable dans la culture pure et mixte a révélé un bon pouvoir acidifiant dans les fromages frais.

La croissance des deux souches en culture pure est importante dans les fromages témoins après 28 jours de conservation, elle atteint  $13,3 \cdot 10^{14}$  UFC/g pour *Ln. mesenteroides* ssp. *mesenteroides* et  $10^{12}$  UFC/g pour *S. aureus*. Des. Néanmoins, un maintien du taux de *S. aureus* au taux initial d'ensemencement de  $10^2$  UFC/g est obtenu en présence de *Ln. mesenteroides* dans le fromage témoin (sans conservation). Les résultats obtenus de l'étude de l'effet antagoniste dans les fromages conservés révèlent un meilleur effet inhibiteur de *Ln. mesenteroides* vis-à-vis *S. aureus* dans le fromage frais conservé dans l'huile d'olive. A partir du 14<sup>ème</sup> jour, une inhibition totale de *S. aureus* est notée (OUFC/g), aucune reprise de la croissance n'est apparue. Cependant, ce taux d'inhibition de 100 % n'est obtenu qu'au bout du 28<sup>ème</sup> jours dans fromage conservé dans le lactosérum. L'effet inhibiteur est issu d'une synergie entre la souche *Ln. mesenteroides* ssp. *mesenteroides*, l'huile d'olive et le lactosérum. En général, les résultats obtenus suggèrent l'utilisation de *Ln. mesenteroides* et les produits naturels (l'huile d'olive et le lactosérum) comme bioconservateurs.

**Mots clés :** *Leuconostoc mesenteroides*, *Staphylococcus aureus*, activité antibactérienne, fromage frais au lait de chèvre, l'huile d'olive, lactosérum.

## Abstract

In this study, the antagonistic effect of strain *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides* against *Staphylococcus aureus* in fresh goat cheese preserved in olive oil or whey, a follow-up of the kinetics of growth of the two strains is achieved during 28 days of storage at 8 ° C. Previously a spot test conducted for *Ln. mesenteroides* ssp. *mesenteroides* against *S. aureus*. The results obtained show an inhibitory effect with inhibition of 37mm in diameter. The study of the evolution of pH and titratable acidity in pure and mixed culture revealed a good power acidifier in fresh cheeses.

The growth of the two strains in pure culture is important in cheeses witnesses after 28 days of conservation, it reaches  $13,3 \cdot 10^{14}$  cfu/g for *Ln. mesenteroides* ssp. *mesenteroides* and  $10^{12}$  cfu/g for *S. aureus*. Some. Nevertheless, maintaining the rate of *S. aureus* to the initial seeding of 102 cfu/g rate is obtained in the presence of *Ln. mesenteroides* ssp. *mesenteroides* in cheese control (no retention). The results obtained from the study of the antagonistic effect in preserved cheeses reveal a better inhibitory effect of *Ln. mesenteroides* ssp. *mesenteroides* opposite *S. aureus* in cheese preserved in olive oil. From the 14th day, a complete inhibition of *S. aureus* is denoted (OUFC g), no resumption of growth appeared. However, this rate of 100% inhibition is obtained only after the 28th day in cheese preserved in the whey. The inhibitory effect comes from a synergy between the strain *Ln. mesenteroides* ssp. *mesenteroides*, olive oil and the whey.

The inhibitory effect is a synergy between the strain *Ln. mesenteroides* ssp. *mesenteroides*, olive oil and whey. In general, the results suggest the use of *Ln. mesenteroides* ssp. *mesenteroides* and natural products (olive oil and whey) as biopreservatives.

**Key words:** *Leuconostoc mesenteroides*, *Staphylococcus aureus*, fresh cheese containing goat's milk, olive oil, whey, antibacteria activity, goat's milk.