



N° Ref :

Centre Universitaire Abdelhafid Boussouf-Mila

Institut des Sciences de la Nature et de la Vie

Département des Sciences Biologique et Agricoles

Mémoire préparé En vue de l'obtention du diplôme de **Master**

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Microbiologie Appliquée

Sous le Thème :

**Utilisation des produits de la ruche comme agents Antimicrobiens :
application à la bioconservation du lait bovin**

Présenté par :

➤ **HIOUR Aya Lina**

Devant le jury composé de :

Président : BOUBENDIR Abdelhafid

Professeur, Centre Universitaire de Mila.

Examinatrice : NOUICHI Siham

M.C.A. Centre Universitaire de Mila.

Encadreur : BOUTELLAA Saber

M.C.A. Centre Universitaire de Mila.

Année Universitaire : 2024/2025

Remerciement

Grâce à Dieu, le Tout-Puissant, qui m'a accordé la force, la patience et la persévérance tout au long de ce parcours, j'ai pu mener à bien ce travail de recherche.

Je tiens à exprimer ma gratitude à mon encadrant, Dr BOUTELLAA Saber, pour son orientation et ses conseils, malgré la charge importante de ses responsabilités. Son encadrement, a été précieux dans l'aboutissement de ce mémoire.

Je remercie également Mlle BOUAMRANE Zineb pour son aide précieuse, sa disponibilité et son accompagnement technique tout au long des travaux de laboratoire.

Ma reconnaissance s'adresse également aux membres du jury, que je remercie sincèrement pour le temps consacré à l'évaluation de ce travail.

Je n'oublie pas les ingénieurs du laboratoire pour leur assistance, ainsi que tous les enseignants du Département des sciences de la nature et de la vie pour la qualité de la formation reçue au cours de ces années.

Un merci particulier à ma famille pour son soutien constant, ses encouragements et sa présence dans les moments décisifs.

Enfin, j'adresse mes remerciements à mes collègues de la promotion Master 2024 et à toutes les personnes qui, de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de ce travail.

Dédicace

Je dédie ce travail, avec une profonde reconnaissance, à ma mère Nacima, dont l'amour inconditionnel, l'encouragement constant et l'aide précieuse ont été une véritable source de force et de motivation tout au long de mon parcours.

À mon père, pour sa présence discrète mais toujours significative dans les étapes importantes de ma vie.

Je dédie également ce travail à mes sœurs Hadil et Douaa, et à mon petit frère Mehdi, pour leur tendresse, leur soutien moral et les moments de joie partagés, qui ont su alléger bien des difficultés. Une pensée affectueuse à mes grands-parents, dont les prières et la sagesse m'ont toujours accompagné en silence mais avec une grande force.

À chacun d'entre vous, je dis merci du fond du cœur. Ce travail vous est dédié.

Thank you

Table des matières

Remerciement

Liste des abréviations

Listes des figures

Listes des tableaux

Introduction

Partie Bibliographique

Chapitre I Généralités sur le lait de vache et méthodes de sa conservation

1. Le lait : un aliment essentiel et universel à travers le monde	1
2. Définition du lait cru	3
3. Composition du lait	4
3.1. Composition nutritionnelle en macronutriments.....	4
3.1.1. Eau.....	4
3.1.2. Glucides	4
3.1.3. Lipides	5
3.1.4. Matières azotées totales.....	6
3.1.5. Protéines caséiniques	7
3.1.6. Protéines non caséinique (lactosérum).....	7
3.1.7. Fraction non protéique.....	7
3.2. Composition nutritionnelle en micronutriments	7
3.2.1. Vitamines	7
3.2.2. Minéraux.....	8
3.2.3. Enzymes.....	9
3.2.4. Les oligoéléments.....	9
4. Propriétés physico-chimiques du lait	10
4.1. Caractéristiques physiques du lait.....	10
4.1.1. La densité.....	10
4.1.2. Ph	10
4.1.3. Acidité	10
4.1.4. Viscosité	11

4.1.5. Point de coagulation du lait	11
4.1.6. Point d'ébullition du lait	11
4.1.7. Point de congélation du lait	11
4.1.8. Durée de conservation et consommation	12
4.2. Caractéristiques chimiques du lait	12
4.2.1. Composées chimiques désirables intégrés dans le lait.....	12
4.2.2. Composés chimiques indésirables dans le lait	13
5. La qualité du lait	14
5.1. Caractéristiques sensorielles et organoleptique du lait	14
5.2. La qualité microbiologique du lait cru	15
5.2.1. La flore originale et bénéfique du lait cru.....	15
5.2.2. Flore d'altération dans le lait cru	16
5.2.3. Bactéries infectieuses d'origine environnementale ou animale	16
5.2.4. Bactéries toxigènes et risques pour la transformation laitière	18
6. Les facteurs favorisant la contamination du lait cru	19
6.1. Hygiène de la traite et du matériel	19
6.2. Qualité de l'eau utilisée.....	19
6.3. Environnement d'élevage.....	19
6.4. Etat de santé des animaux	19
6.5. Conditions de stockage et de transport.....	20
7. Les procédés de conservation du lait	20
7.1. Pasteurisation.....	20
7.2. Stérilisation.....	21
7.3. Réfrigération et congélation	21
8. Méthodes de conservation naturelles par les extraits et produits de la ruche	22
 Chapitre II <i>Le pollen d'abeille et ses propriétés biologique</i>	
1. Aperçu sur le pollen comme un produit de la ruche	23
1.1. Définition du pollen	23
1.2. Structure du pollen.....	24
1.3. La pollinisation et la récolte du pollen par l'abeille	24

1.4. Récolte du pollen par l'apiculteur.....	25
1.5. Séchage et conservation du pollen.....	26
1.6. Détermination de l'origine botanique du pollen en Algérie et dans la wilaya de Mila	26
2. Pollen d'abeille.....	27
2.1. Caractéristiques générales.....	27
2.2. Propriétés physiques.....	27
2.3. Propriétés et composition chimique.....	28
3. Les activités biologiques du pollen.....	33
3.1. Activité antibactérienne	33
3.2. Activité antifongique	35
3.3. Activité antioxydante.....	35
4. Utilisation du pollen comme bio-conservateur dans les produits laitiers	36

Partie Expérimentale

Chapitre III Matériel et Méthodes

1. Lieux et déroulement des expérimentations.....	37
2. Source et nature du produit apicole	37
2.1. Région et méthode de la récolte du pollen	38
2.2. Séchage du pollen	39
2.3. Broyage du pollen.....	39
3. Procédés d'extraction et conservation du pollen	39
3.1. Extraction	39
3.1.1. Extraction aqueuse par macération	40
3.1.2. Extraction par Soxhlet.....	41
3.2. Conservation des extraits de pollen	42
3.3. Calcul du rendement	42
3.4. Rendement de l'extraction.....	42
4. Dosage des polyphénols totaux.....	43
4.1. Préparation de la courbe d'étalonnage de l'acide gallique.....	43
4.2. Principe.....	43
4.3. Mode opératoire	44

5. Dosage des flavonoïdes totaux	44
5.1. Préparation de la courbe d'étalonnage	44
5.2. Principe.....	45
5.3. Mode opératoire	45
6. Évaluation de l'activité antioxydante par la méthode DPPH	46
6.1. Principe de la méthode	46
6.2. Mode opératoire	47
6.3. Calcul et interprétation des résultats	48
7. Évaluation de l'activité antibactérienne	48
7.1. Origine des bactéries et conservation des souches	48
7.2. Conservation des bactéries.....	49
7.3. Stérilisation du matériel	49
7.4. Préparation des milieux de culture.....	50
7.5. Préparation des dilutions d'extraits	52
7.6. Repiquage et réactivation des souches bactériennes.....	53
7.7. Préparation d'inoculum bactérien	53
7.8. Test d'activité antibactérienne	54
7.9. Lecture des résultats.....	55
8. Échantillonnage du lait	56
8.1. Prélèvement du lait	56
8.2. Caractéristiques de la vache d'étude.....	57
9. Étude de la croissance microbienne	58
9.1. Stérilisation d'extrait aqueux de pollen par filtration	58
9.2. Ajout d'extraits aqueux de pollen au lait cru.....	59
9.3. Préparation des dilutions décimales	60
9.4. Préparation des milieux de culture.....	61
9.5. Dénombrement de la flore totale aérobie mésophile	62
9.6. Lecture des résultats et détermination du nombre UFC/ml.....	63
9.7. Dénombrement de la flore lactique totale	64
9.8. Mode opératoire	64

9.9. Lecture des résultats	64
10. Analyse biomathématique.....	66
11. Analyse des paramètres physique du lait	66
11.1. Contrôle du ph.....	66
11.2. Contrôle de l'acidité titrable.....	68

Chapitre IV Résultats et discussion

1. Rendement et aspect des extraits	70
2.1. Teneur en composés polyphénoliques totaux.....	71
2.2. Teneur en flavonoïdes Totaux.....	73
3. Activités biologiques.....	75
3.1. Activité antioxydante	75
3.2. Activité antibactérienne	77
4. Paramètres physiques et microbiologique du lait additionné d'extrait de pollen	80
4.1. Contrôle de Ph	80
4.2. Contrôle de l'acidité.....	81
5. Analyse microbiologique du lait	83
5.1. Flore totale aérobie mésophile (FTAM).....	83
5.1.1. Aspect macroscopique des colonies de flore totale aérobie mésophile	83
5.1.2. Évolution de la FTAM dans le lait enrichi en extrait de pollen au froid	83
5.1.3. Modélisation cinétique selon Baranyi et Roberts.....	84
5.1.4. Détermination des paramètres cinétique de la croissance bactérienne	85
5.2. Flore lactique	89
5.2.1. Aspect macroscopique de la flore lactique sur gélose MRS	89
5.2.2. Evolution de la flore lactique dans le lait enrichi en extrait de pollen au froid	90

Conclusion et perspectives

Références bibliographiques

Liste des abréviations

- FAO:** Food and Agriculture Organisation
- OECD:** Organisation for Economic Co-operation and Development
- ISO :** International Standard Organisation
- DDT :** Dichlorodiphényltrichloroéthane
- CLA :** Acide Linoléique conjugué
- BCAA:** Branched-Chain Amino Acids
- DDPH :** 2,2-diphényl-1picrylhydrazyl
- FRAP:** Ferric Reducing Antioxidant Power
- ORAC:** Oxygen Radical Absorbance Capacity
- ABTS :** 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6sulfonic acid)
- FTAM :** Flore Totale Aérobie Mésophile
- PH :** Potentiel Hydrogène
- UFC/ml :** Unité Formant colonie par millilitre
- CI₅₀ :** Concentration Inhibitrice 50%
- CN 10 :** Gentamicine
- NaCl :** Chlorure de sodium
- NaOH :** Hydroxyde de sodium
- °C :** Degré Celsius
- °D:** Degré Dornic
- ATCC:** American Type Culture collection
- DMSO:** Diméthylsulfoxyde
- X_{max} :** Charge ou densité bactérienne maximale
- μ_{max} :** Taux de croissance maximale
- λ:** Phase de latence.

Liste des figures

Figure 01 : Production mondiale de lait et consommation laitière par habitant.....	2
Figure 02 : Les trappes (pièges) à pollen et pollen d'abeilles multiflores	25
Figure 03 : Photographie de pollen récolté dans la région de Mila à Douar Ben Zekri.	38
Figure 04 : Protocole d'extraction par macération aqueuse de pollen.....	40
Figure 05 : Protocole d'extraction par Soxhlet de pollen.	41
Figure 06 : Principe de la réduction de DPPH par un antioxydant.....	46
Figure 07 : Aspect visuel de la réaction des extraits de pollen avec le DPPH pour l'évaluation de l'activité antioxydante.	47
Figure 08 : Stérilisation du matériel par autoclave.	49
Figure 09 : Préparation de l'eau physiologique à 0,9%.	50
Figure 10 : Préparation de milieux de culture : bouillon nutritif et gélose nutritive.	51
Figure 11 : Préparation de la gélose Muller Hinton (MH).....	52
Figure 12 : Méthode de préparation des dilutions décimales des extraits de pollen.	52
Figure 13 : Repiquage et réactivation des souches bactériennes.....	53
Figure 14 : Protocole de l'évaluation de l'activité antibactérienne d'extraits de pollen.	54
Figure 15 : Méthode de lecture et mesure les zones d'inhibition.	55
Figure 16 : Site de prélèvement du lait : ferme Boujouada -commune de Tassadane Haddada-Mila.	56
Figure 17 : Photographie de la vache d'étude	57
Figure 18 : Suivi de la croissance microbienne (FTAM et flore lactique) dans le lait enrichi en extraits de pollen.....	58
Figure 19 : Stérilisation et ajout de l'extraits aqueux de pollen au lait cru.....	59
Figure 20 : Préparation des séries de dilutions des échantillons de lait.....	60
Figure 21 : Méthode de la préparation des dilution décimales.....	61
Figure 22 : Préparation des milieux de culture PCA et MRS.	62

Figure 23 : Protocole et étapes de le suivie de la croissance de la flore mésophile aérobie totale.	65
Figure 24 : Suivre et mesure du PH du lait réfrigéré à 4°Cet supplémenté avec l'extraits de pollen pendant 8jour de stockage.	67
Figure 25 : Montage de la titration et mesure d'acidité de lait.....	68
Figure 26 : Teneur en composés phénoliques totaux dans les extraits de pollen.	71
Figure 27 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.	72
Figure 28 : Courbe d'étalonnage de la quercétine.	73
Figure 29 : Teneur en Flavonoïdes totaux dans les extraits de pollen.	74
Figure 30 : Pourcentage d'inhibition du radical DPPH par l'extrait aqueux de pollen.	75
Figure 31 : Pourcentage d'inhibition du radical DPPH par l'extrait hydroéthanolique de pollen.	75
Figure 32 : Photo représentant les zones d'inhibition exercée par les extraits de pollen sur les souches bactériennes testées.....	77
Figure 33 : Variation du pH durant le stockage à froid du lait enrichi en extrait aqueux de pollen (4 °C) - Témoin (T), C1 = 5 mg/mL, C2 = 10 mg/mL.	80
Figure 34 : Variation de l'acidité Dornic des échantillons du lait durant la période du stockage à froid du lait additionné en extraits aqueux de pollen (4°C), Témoin (T), C1 = 5 mg/mL, C2 = 10 mg/mL.	81
Figure 35 : Flore totale aérobie mésophile du lait cru (Témoin et C1 = lait cru supplémentée en avec 5% de pollen) sur milieu PCA.	83
Figure 36 : Évolution de la croissance microbienne de la FTAM du lait additionné de l'extrait de pollen à différentes concentrations et stocké à froid (4°C).	60
Figure 37 : Suivre de la croissance microbienne des FTAMs du lait additionné à l'extrait aqueux de pollen et stocké à froid (4°C) (modèle de Baranyi et Roberts).....	85
Figure 38 : Résultats des paramètres cinétiques de croissance microbienne (X initiale , X max , μ max et λ) obtenus à l'aide du modèle de Baranyi et Roberts.	86
Figure 39 : Flore lactique totale du lait cru sur milieu MRS : Témoin (a) ; C1 : (b) ; C2 (c)	89

Liste des tableaux

Tableau 01 : Composition moyenne du lait de vache.....	5
Tableau 02 : Constituants lipidiques du lait de vache et localisation dans les fractions physico- chimiques (g/100 g de matière grasse)	6
Tableau 03 : Concentrations en vitamines du lait de vache (mg/L).....	8
Tableau 04 : Teneurs en oligo-éléments du lait de vache (µg/L).....	9
Tableau 05 : Principaux composés polyphénoliques de pollen et leurs dérivés	31
Tableau 06 : Activité antibactérienne des extraits de pollen d'abeille contre différentes souches microbienne (zone d'inhibition en mm).	34
Tableau 07 : Caractéristique de l'échantillon de pollen frais collecté dans la région de Douar Ben Zekri. ..	38
Tableau 08 : Souches bactériennes utilisées pour l'évaluation de l'activité antibactérienne.	49
Tableau 09 : Fiche technique de la vache de prélèvement.	57
Tableau 10 : Quantification des CPT dans les extraits de pollen.....	71
Tableau 11 : Quantification des composés flavonoïques dans les extraits de pollen.	73
Tableau 12 : Valeurs des CI50 des extraits de pollen.	76
Tableau 13 : Diamètres des zones d'inhibition des souches bactériennes testés par les extraits de pollen. ..	78
Tableau 14 : Les valeurs des paramètres de croissance bactérienne de la flore de FTAM du lait témoin et lait additionnée à l'extraits de pollen obtenu par le modèle Baranyi et Roberts.....	85
Tableau 15 : Évolution de la flore lactique totale (UFC/ml) dans le lait additionné de pollen à différentes concentrations au cours de la réfrigération à 4°C.....	90

INTRODUCTION

Introduction

Le lait est une denrée universelle, incontournable dans l'alimentation de l'homme, par sa richesse nutritionnelle et ses contributions aux besoins des populations. Il se caractérise par une composition chimique complexe : protéines de haute valeur biologique (caséines et protéines sériques), glucides sous forme de lactose, lipides riches en acides gras essentiels, vitamines (A, B2, B12, D) et minéraux tels que le calcium, le phosphore et le magnésium **(Sissoko et al., 2023)**. Grâce à cette composition, le lait possède une haute valeur nutritionnelle, particulièrement bénéfique pour la croissance, la minéralisation osseuse et le bon fonctionnement de l'organisme **(Abate Reta & Hailu Addis, 2015)**. Une étude menée par **Kirat (2007)** a mis en évidence les vertus du lait dans l'alimentation des Algériens, montrant que plus de trois milliards de litres sont consommés par an en Algérie. Le lait y occupe ainsi une place centrale dans l'alimentation en raison de sa richesse en nutriments d'origine animale. Ce constat est renforcé par les recommandations scientifiques récentes, qui le considèrent comme un élément majeur de la sécurité alimentaire à l'échelle mondiale **(Smith et al., 2022)**.

Cependant, ce potentiel nutritif est souvent associé à une forte sensibilité à la contamination microbiologique, notamment lors de la production et de la consommation. Le lait cru, en raison de son pH neutre, de sa forte teneur en eau et de sa richesse en nutriments, constitue un milieu particulièrement favorable à la croissance de nombreux microorganismes, y compris des pathogènes tels que *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp. et *Clostridium* spp. **(Berhe et al., 2020 ; Gume et al., 2023)**. Le lait, même transformé, n'est pas exempt de germes. Diverses études ont mis en évidence la présence de microorganismes pathogènes dans le lait de vache, en fonction des conditions de traite et de conservation **(Hamiroune et al., 2014)**. Une mauvaise hygiène lors de la traite, une réfrigération insuffisante ou une rupture de la chaîne du froid peuvent favoriser la prolifération de ces agents pathogènes. La contamination peut provenir d'un matériel mal désinfecté, de l'eau de nettoyage, ou encore de la santé des animaux, sources importantes de germes d'origine animale **(Garedew et al., 2012)**. De plus, des pratiques comme l'utilisation de contenants non stérilisés ou le transport dans des conditions inadéquates aggravent ce risque. La présence de coliformes thermotolérants constitue un indicateur de contamination fécale, témoignant souvent de défaillances dans les procédures sanitaires élémentaires **(Berhe et al., 2020)**.

À cet égard, les produits de la ruche comme le miel, la propolis, la gelée royale et le pollen sont de plus en plus considérés comme des remèdes naturels multifonctionnels. Le pollen, en particulier, mérite une attention particulière. Il s'agit d'un produit apicole complexe, constitué de protéines (15 à 40 %), glucides (30 à 50 %), lipides, acides aminés essentiels, minéraux (fer, zinc, magnésium), ainsi que de polyphénols et flavonoïdes (quercétine, kaempférol) reconnus pour leurs propriétés bioactives. Il possède une forte activité antioxydante, capable de retarder l'oxydation lipidique dans des produits sensibles comme le ghee (**Khider et al., 2013**). Par ailleurs, des extraits méthanoliques de pollen de maïs et de trèfle ont montré une activité antibactérienne significative contre *E. coli*, *S. aureus*, *Listeria monocytogenes*, sans affecter les cultures lactiques comme *Lactobacillus bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus* (**Khider et al., 2013**). Dans les produits laitiers fermentés, l'incorporation de pollen améliore non seulement la stabilité microbiologique, mais aussi la texture et les propriétés sensorielles. Des concentrations de pollen de 0,5 à 1,5 % ont permis une meilleure cohésion du gel, une réduction de la synérèse, et une augmentation des protéines et de la matière sèche (**Çiftçi & Öncül, 2024**).

Plusieurs travaux confirment l'efficacité du pollen contre des bactéries telles que *S. aureus*, *E. coli* et *Salmonella* spp., grâce aux molécules bioactives qu'il contient (**Almaraz-Abarca et al., 2007**). Le pollen peut ainsi être utilisé comme additif alimentaire pour prolonger naturellement la conservation des aliments tout en préservant la santé des consommateurs et en répondant aux exigences de naturalité et de sécurité.

Bien que les huiles essentielles et extraits de plantes soient couramment étudiés pour la conservation alimentaire, l'usage du pollen d'abeille comme agent antimicrobien reste peu exploré. Contrairement aux conservateurs chimiques ou même naturels classiques, le pollen se distingue par sa richesse en métabolites secondaires, qui lui confèrent de nombreuses propriétés biologiques utiles à la préservation du lait cru. Il est capable de limiter la charge microbienne tout en conservant les qualités organoleptiques du lait.

L'originalité de ce travail réside donc dans l'évaluation du pollen, non seulement en tant qu'agent antimicrobien naturel contre les flores indésirables du lait cru, mais aussi comme conservateur fonctionnel prolongeant la durée de vie du lait sans traitements chimiques ni thermiques agressives. Cette étude vise à combler un vide scientifique en testant l'effet du pollen à différentes concentrations sur la flore microbienne totale et les paramètres physicochimiques du lait cru. Il s'agira de déterminer si le pollen constitue une alternative viable aux conservateurs synthétiques ou antibiotiques, dans un contexte de demande croissante pour des produits sains, naturels et sans résidus.

Ce travail de recherche est structuré en quatre chapitres complémentaires. Le premier chapitre présente les caractéristiques physicochimiques et microbiologiques du lait cru ainsi que les méthodes de sa conservation. Le deuxième est consacré au pollen d'abeille, à sa composition biochimique, ses propriétés biologiques et ses applications alimentaires déjà connues. Le troisième décrit la méthodologie expérimentale mise en œuvre pour tester l'activité antimicrobienne du pollen et son effet conservateur sur le lait cru. Le quatrième chapitre, enfin, expose les résultats obtenus, discute leur portée et leurs limites, et propose des perspectives d'intégration industrielle du pollen comme conservateur naturel dans le secteur laitier.

Partie

Bibliographique

Chapitre I

*Généralités sur le lait de vache et méthodes
de sa conservation*

1. Le Lait : Un Aliment Essentiel et Universel à Travers le Monde

Le lait est un aliment fondamental largement apprécié à l'échelle mondiale. Il est pourvu en éléments nutritifs tels que les protéines, le calcium et des vitamines essentielles. Le lait est un aliment intégré à notre alimentation depuis de nombreuses générations **(Walstra et al., 2006)**. À travers le monde, diverses cultures ont développé leurs propres pratiques quant à l'utilisation du lait, en fonction de leurs traditions et des ressources disponibles. Dans les pays occidentaux, le lait de vache est le type de lait le plus largement consommé. Toutefois, dans de nombreuses régions d'Asie et d'Afrique, le lait de chèvre, de brebis ou de chamelle est préféré **(Fox et al., 2015)**.

Le lait ne sert pas seulement à être consommé ; il est crucial dans la production de fromage, de yaourt et de beurre. Selon **Haug et al. (2007)**, ces produits ajoutent de la diversité à nos régimes alimentaires. Ils apportent des éléments nutritifs cruciaux tels que le calcium et les protéines, indispensables pour maintenir la santé et la robustesse des os et des muscles **(Pereira & Vicente, 2017)**. En outre, des études indiquent que l'intégration de produits laitiers dans votre régime alimentaire pourrait contribuer à diminuer les risques de troubles de santé tels que l'obésité, le diabète de type 2 et les affections cardiaques **(Thorning et al., 2016)**.

Toutefois, la production de lait a des impacts environnementaux néfastes et pose des problèmes d'éthique. Elle est fréquemment remise en question pour les émissions de gaz à effet de serre qu'elle produit et pour la qualité de vie des animaux d'élevage **(Steinfeld et al., 2006)**. L'industrie laitière est également confrontée à des enjeux tels que les variations de prix, les exigences croissantes des consommateurs et l'obligation de s'ajuster à une demande mondiale qui évolue sans cesse **(Kozak et al., 2022)**.

Pourtant, la production de lait a également des aspects négatifs pour la Terre et pose des questions éthiques. Il a été établi que le secteur laitier contribue par exemple de manière significative aux émissions de gaz à effets de serre, et que les conditions de vie de nombreux animaux d'élevage négligent leur bien-être **(Steinfeld et al., 2006)**.

De plus, il est confronté à toute une série de difficultés : la variabilité des prix, des attentes de plus en plus élevées de la part des consommateurs, et l'obligation de s'adapter en permanence à une demande mondiale en évolution (**Kozak et al.,2022**). Malgré tout, le lait est un aliment incontournable dans la vie quotidienne de nombreux peuples.

Les chiffres que vous pouvez voir dans (**Figure 01**) illustrent à la perfection pourquoi ni les consommateurs du monde entier ni les exploitants peuvent ignorer le lait. Selon les dernières données disponibles, entre 2005 et 2014, la production globale de lait est passée de 714 Million à 789 Million de tonnes, montrant que les exploitants ont suivi la cadence pour pouvoir fournir un volume de lait toujours plus important (**International Dairy Federation, 2015 ; OECD-FAO, 2016**).

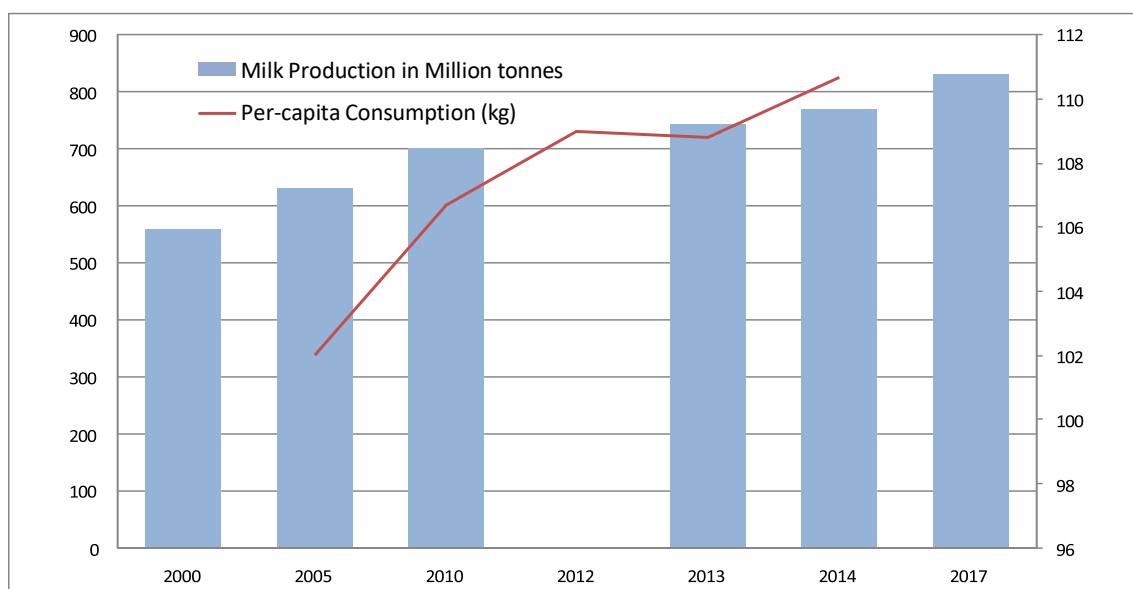


Figure 01 : Production mondiale de lait et consommation laitière par habitant (**Shadbolt et al., 2016**).

2. Définition de lait cru

Le lait est un liquide important produit par les glandes mammaires des animaux appelés mammifères. Il est le premier aliment que reçoivent les bébés animaux, y compris les humains. Ce liquide est plein de choses importantes comme des protéines, des graisses, des glucides (sucres), des vitamines et des minéraux. Toutes ces choses sont essentielles pour grandir et bien fonctionner **(Benyahia-Mostefaoui & Lamri-Senhadj, 2020)**.

La définition officielle du lait, telle que précisée par le **Codex Alimentarius**, est « le produit complet obtenu de la traite d'une femelle laitière en bonne santé, bien nourrie et bien reposée, sans interruption. Il doit être collecté de façon propre et ne doit pas contenir de colostrum » **(Codex Alimentarius Commission, 2011)**. Cette définition exclut les boissons végétales telles que le "lait de soja" ou le "lait d'amande", qui ne possèdent ni les mêmes valeurs nutritives ni les mêmes fonctions que le lait d'origine animale. Historiquement, la consommation de lait par les humains remonte à environ 8 500 ans, après la domestication d'animaux tels que les vaches dans les régions du Moyen-Orient et de l'Asie centrale. Des preuves archéologiques indiquent que la production laitière était déjà pratiquée dans des civilisations anciennes telles que celles de la Mésopotamie et de la vallée de l'Indus **(Evershed et al., 2008)**.

Sur le plan nutritionnel, le lait est considéré comme un aliment complet en raison de sa richesse en protéines de haute qualité, notamment la caséine (environ 80 % des protéines totales) et les protéines de lactosérum (environ 20 %), ainsi qu'en calcium, vitamines et acides gras essentiels. Ces composants contribuent au développement musculaire, au renforcement osseux et à la régulation de divers processus physiologiques **(Korhonen & Pihlanto, 2006)**.

Cependant, la composition du lait peut varier en fonction de plusieurs facteurs, notamment l'espèce animale (vache, chèvre, brebis, etc.), l'alimentation, la race, le stade de lactation et les conditions environnementales. Ces éléments influencent la teneur en protéines, en matières grasses, en lactose et en minéraux du lait **(National Research Council, 2001)**.

3. Composition du lait

Le lait est un aliment complexe, essentiel pour les jeunes mammifères et riche en nutriments **(Vuillemand, 2018)**. Composé à 87 % d'eau, il facilite le transport de nutriments hydrosolubles comme le lactose, les minéraux et vitamines **(Vignola, 2002)**, avec 13 % de matières sèches comprenant lipides (3-4 %), protéines (3,2-3,5 %) et lactose **(Lin et al., 2021)**. Sa composition lipidique, dominée par les triglycérides, varie selon des facteurs génétiques et environnementaux, permettant des stratégies génétiques pour améliorer sa qualité **(Soyeurt et al., 2007)**. Il contient aussi environ 0,7 % de minéraux essentiels, comme calcium et phosphore, cruciaux pour la croissance osseuse **(Gaucheron, 2005)**. La composition du lait dépend de l'espèce, de la lactation, de l'alimentation et des conditions d'élevage **(Jenkins & McGuire, 2006)**. Enfin, ses protéines, telles que la caséine et la β -lactoglobuline, sont très digestibles et biodisponibles, ce qui en fait une source précieuse pour l'alimentation humaine **(Le Feunteun et al., 2014)**.

3.1. Composition nutritionnelle en macronutriments

3.1.1. Eau

L'eau est le constituant majeur du lait, qui en représente environ 87 % de sa masse **(Haug et al., 2007)**. Elle joue notamment un rôle de solvant pour les protéines, glucides, lipides, vitamines et minéraux, ce qui permet leur transport et leur absorption au niveau du tube digestif **(Pereira, 2014)**. Une teneur en eau élevée explique par exemple que le lait a une texture liquide et qu'il soit transformable **(Gaucheron, 2011)**.

3.1.2. Glucides

Le lactose, principal glucide du lait à environ 4,7 %, est un disaccharide composé de glucose et de galactose **(Lindmark-Månsson et al., 2003)**. Il est digéré dans l'intestin grêle par l'enzyme lactase. Le lactose favorise l'absorption du calcium et agit comme prébiotique en stimulant la croissance des bactéries bénéfiques du côlon **(He et al., 2008)**. Certaines personnes sont intolérantes au lactose, manquant de cette enzyme **(Lomer et al., 2008)**.

Tableau 01 : Composition moyenne du lait de vache (VIGNOLA, 2002).

Constituants		Quantité (g/l)	
Eau	Eau libre	842,625	875
	Eau liée	32,375	
Glucides	Lactose	46	
Matière grasse	Matières grasses proprement dite	36	37
	Lécithine (phospholipide)	0,5	
	Partie insaponifiable (stérol, carotène, Tocophérols)	0,5	
Protéines	Caséine	25	32
	Protéines solubles (globulines, albumines)	5,5	
	Substances azotées non protéiques	1,5	
Sels minéraux	Acide citrique	2	8
	Acide phosphorique (P2O5)	3,3	
	Acide chlorhydrique (HCl)	2,7	
Constituants mineurs	Vitamines, enzymes, gaz dissous, pigments, cellules diverses	Traces	

3.1.3.Lipides

Les matières grasses du lait représentent 3 à 4 %, principalement sous forme de globules lipidiques contenant 98 % de triglycérides, ainsi que du cholestérol, des phospholipides et des acides gras libres (Lindmark Månsson, 2008). La matrice lipidique est complexe, avec plus de 400 acides gras différents. Environ 70 % sont saturés, principalement palmitique (30 %), stéarique (12 %) et myristique (11 %) (Lock & Bauman, 2004 ; Pereira, 2014). Le lait contient aussi des acides gras insaturés comme l'acide oléique (24-35 %), les linoléiques et α -linoléniques, ainsi que des acides trans tels que l'acide vaccénique et le CLA, qui sont associés à des effets bénéfiques pour la santé cardiovasculaire, le système immunitaire et la santé globale (Lindmark Månsson, 2008 ; Bhattacharya et al., 2006).

Tableau 02 : Constituants lipidiques du lait de vache et localisation dans les fractions physico-chimiques (g/100 g de matière grasse), (FAO,1998).

Constituants lipidiques	Proportions	Localisation
Triglycérides	96-98	Globule gras
Diglycérides	0,3-1,6	Globule gras
Monoglycérides	0,0-0,1	Globule gras
Phospholipides	0,2-1,0	Membrane du globule gras et lactosérum
Cérébrosides	0,0-0,08	Membrane du globule gras
Stéroïdes	0,2-0,4	Globule gras
Acides gras libres	0,1-0,4	Membrane du globule gras et lactosérum
Esters du cholestérol	Traces	Membrane du globule gras
Vitamines	0,1-0,2	Globule gras

3.1.4. Matières azotées totales

Les matières azotées du lait de vache comprennent environ 95 % de protéines, réparties entre caséines, protéines sériques et une fraction non protéique (NPN) composée d'urée, d'acides aminés libres, de créatinine et d'acide urique (Rafiq et al., 2016). L'urée, principale composante du NPN, reflète l'état nutritionnel de l'animal et varie selon l'apport en protéines et en énergie (Jonker et al., 1998). Le NPN représente en moyenne 5-6 % de l'azote total, soit 25 à 30 mg N/100 g de lait, et fluctue selon la lactation, l'alimentation et la santé de l'animal (Journet et al., 1975). Des études ont aussi détecté des métaux lourds tels que le plomb, l'arsenic et le cadmium, liés à la pollution environnementale, avec des concentrations moyennes de 1,75 µg/L, 0,31 µg/L et 0,05 µg/L respectivement, dans le lait cru en Chine (Zhou et al., 2019).

3.1.5. Protéines caséiniques

Les caséines, représentant 80 % des protéines du lait, forment des micelles complexes (50-500 nm) stabilisées par des interactions hydrophobes, phosphates et charges. Composées d' α s1-, α s2-, β - et κ -caséines, elles jouent un rôle structural, facilitent la liaison au calcium et peuvent encapsuler des composés bioactifs pour des produits laitiers fonctionnels (Dagleish & Corredig, 2012 ; Horne, 2006 ; Semo et al., 2007).

3.1.6. Protéines non caséiniques (lactosérum)

Les protéines du lactosérum (20 % des protéines du lait) sont solubles, riches en acides aminés essentiels (notamment BCAA), digestibles et de haute valeur nutritionnelle (Wang et al., 2018). Composées principalement de β -lactoglobuline et d' α -lactalbumine, elles ont aussi des propriétés technologiques (solubilité, gélification, émulsification) et fournissent des peptides bioactifs avec des activités antioxydantes, antimicrobiennes et immunomodulatrices, utiles pour les produits fonctionnels (Guo & Wang, 2019 ; Shinde et al., 2018 ; Patil et al., 2015).

3.1.7. Fraction non protéique

En plus des protéines, le lait contient une fraction non protéique constituée de peptides bioactifs, enzymes, minéraux et vitamines. Ces composés interviennent dans des fonctions physiologiques telles que l'absorption des nutriments, l'immunité et la protection contre le stress oxydatif (Mills et al., 2011). Les peptides issus de la digestion des protéines laitières peuvent notamment agir sur la satiété, le transit intestinal et la prévention de pathologies chroniques (De Noni & Cattaneo, 2010).

3.2. Composition nutritionnelle en micronutriments

3.2.1. Vitamines

Le lait est une source de vitamines liposolubles (A, D, E) et hydrosolubles (B, C), dont la quantité varie selon le type, l'alimentation de l'animal et la saison (Gaucheron, 2011). Il contient en moyenne 172 μ g de vitamine A/100 g, essentielle pour la vision et le système immunitaire (Schönfeldt et al., 2012). La vitamine D, souvent ajoutée, favorise l'absorption du calcium (Krishnan & Feldman, 2011). Les vitamines B, notamment B2 (riboflavine), présentes à environ 2,09 mg/L, couvrent 10-15 % des besoins quotidiens en ces vitamines (Shetty et al., 2020 ; Insel et al., 2004).

Tableau 03 : Concentrations en vitamines du lait de vache (mg/L), (FAO,1998).

Vitamines hydrosolubles	Teneurs en vitamines
- B ₁ (thiamine)	0,42
- B ₂ (riboflavine)	1 ,72
- B ₆ (pyridoxine)	0,48
- B ₁₂ (cobalamine)	0,0045
- Acide nicotinique (niacine)	0,92
- Acide folique	0,053
- Acide pantothénique	3,6
- Biotine	0,036
- C (acide ascorbique)	8
Vitamines liposolubles :	
- A	0,37
- β-carotène	0,21
- D (cholécalférol)	0,0008
- E (tocophérol)	1, 1
- K	0,03

3.2.2. Minéraux

Le lait fournit environ 1200 mg/L de calcium, essentiel pour la santé osseuse, principalement lié aux caséines. Il contient aussi 950 mg/L de phosphore, 120 mg/L de magnésium, 3-4 mg/L de zinc et 30 µg/L de sélénium, jouant des rôles clés dans la minéralisation, l'énergie, et la protection antioxydante (Gaucheron, 2011 ; McGann et al., 1983 ; IOM, 2012 ; Singh & Gandhi, 2015).

3.2.3. Enzymes

Le lait contient des enzymes bioactives, comme la lactoperoxydase (antimicrobienne grâce au peroxyde d'hydrogène), la lactoferrine (qui lie le fer, inhibe la croissance bactérienne et possède des propriétés immunomodulatrices), et le lysozyme (qui lyse les bactéries Gram-positives). Ces enzymes jouent un rôle dans la protection naturelle du lait et ont des applications nutritionnelles et thérapeutiques potentielles (**González-Chávez et al., 2009 ; Jenssen & Hancock, 2009 ; Pereira, 2014 ; Min, 2005**).

3.2.4. Les oligoéléments

Le lait contient de faibles quantités d'oligo-éléments essentiels comme le fer, zinc, cuivre, manganèse, sélénium et iode, nécessaires à l'immunité, la croissance et le métabolisme (**Mehdi et al., 2013**). Leur concentration varie selon l'alimentation, la lactation et la région. Par exemple, le fer (~0,4–0,6 µg/mL) est vital pour l'hémoglobine, mais peu biodisponible. Les autres—zinc, cuivre, manganèse—participent à des réactions enzymatiques clés, avec des niveaux influencés par l'environnement (**Diyabalanage et al., 2021**).

Tableau 04 : Teneurs en oligo-éléments du lait de vache (µg/L) (**FAO,1998**).

Oligo-éléments	Teneurs
Brome	150
Cobalt	0,5
Cuivre	20-40
Fer	200-500
Fluor	70-200
Iode	10-300
Manganèse	10-30
Sélénium	10 -30
Zinc	3000-6000

4. Propriétés physico-chimiques du lait

Les caractéristiques physico-chimiques du lait, liées à ses interactions entre eau, lipides, protéines, glucides et minéraux, influencent sa stabilité, sa transformation et sa qualité sensorielle. Ces propriétés dépendent aussi de facteurs externes comme la température, le pH ou les traitements, et sont essentielles pour contrôler la fabrication et assurer la qualité des produits laitiers (**Haug et al., 2007 ; Park et al., 2007 ; Gaucheron, 2011**).

4.1. Caractéristiques physiques du lait

4.1.1. La densité

Elle varie entre 1,026 et 1,035 g/cm³ à 20 °C, influencée par la composition, la température et le traitement. Elle diminue avec la chaleur, la teneur en matières grasses la réduisant, tandis que les solides non gras l'augmentent. La densité sert à détecter l'ajout d'eau ou l'écémage (**Li et al., 2019 ; Parmar et al., 2020**).

4.1.2. Ph

Le pH du lait, indicateur de fraîcheur et de stabilité, varie généralement entre 6,6 et 6,8 (**Tetra Pak, 2021**). Il diminue lors du chauffage en raison de la libération de protons et de la précipitation du phosphate de calcium (**Chandrapala et al., 2010**). Une analyse sur 285 échantillons de 35 vaches a révélé un pH moyen de $6,63 \pm 0,08$, sans différence significative selon les phases de lactation (**Tsioulpas et al., 2007**). Le pH est ainsi un paramètre essentiel pour évaluer la qualité du lait et anticiper ses réactions en transformation.

4.1.3. Acidité

L'acidité du lait, liée à l'acide citrique, protéines et phosphates, augmente lors de la fermentation bactérienne avec le temps de stockage (**Escuder-Vieco et al., 2016**). Elle est mesurée en degrés Dornic (°D) par titration, influencée par la température, la durée de conservation et la contamination. La relation entre pH et acidité titrable montre leur complémentarité, nécessitant une interprétation adaptée à l'origine du lait (**Wilkowske, 1954 ; Wiley, 1935**). La surveillance de l'acidité est essentielle pour assurer la sécurité et la qualité du lait.

4.1.4. Viscosité

La viscosité du lait, influencée par la température, la matière grasse, les protéines et les solides totaux, varie entre 0,60 et 63,70 mPa·s (**Alcăntara et al., 2012**). Elle augmente avec la teneur en solides et diminue avec la chaleur, ce qui facilite l'écoulement lors du traitement. Son contrôle est essentiel pour optimiser les procédés de transformation.

4.1.5. Point de coagulation du lait

La coagulation du lait, essentielle pour le fromage, peut être enzymatique (via la présure) ou acide. La coagulation enzymatique, catalysée par la chymosine, se produit idéalement entre 30 et 37 °C à pH ~6,6, en déstabilisant les micelles de caséine (**Sievanen et al., 2008**). La coagulation acide survient à pH 4,6, au point isoélectrique des caséines (**Ilboudo et al., 2013**). La température et la concentration en protéines influencent la structure et la texture du caillé (**Panthi et al., 2019**).

4.1.6. Point d'ébullition du lait

Le point d'ébullition du lait est légèrement supérieur à celui de l'eau (100,2 °C à 101 °C), en raison de la présence de solutés (**Mejares et al., 2022**). Il est déterminant dans les traitements thermiques, car influencé par la composition (**Wang et al., 2024**). L'ajout d'extraits naturels peut modifier ce paramètre tout en améliorant la qualité microbiologique (**Trajchev et al., 2016**). Sa variabilité impose une adaptation des traitements pour préserver les qualités nutritionnelles (**Cheng et al., 2021**).

4.1.7. Point de congélation du lait

Le point de congélation, indicateur de fraude, est influencé par le lactose, les minéraux et les protéines. Il se situe entre -0,522 °C et -0,540 °C. Le lait de vache présente un point moyen de -0,522 °C, contre -0,528 °C pour le lait de bufflonne, en raison d'une plus grande concentration en solides non gras (**Pesce et al., 2016**). Il varie selon la race, la saison et l'alimentation, entre -0,510 °C et -0,535 °C. Des valeurs au-dessus de -0,520 °C signalent généralement une dilution (**Hanuš et al., 2010**).

4.1.8. Durée de conservation et consommation du lait

La durée de conservation dépend du traitement thermique. Le lait cru se conserve 48–72 h selon sa charge microbienne (**Mottar, 1984**). Le lait pasteurisé se conserve 7–10 jours à 4 °C, mais doit être consommé sous 2–3 jours après ouverture (**Mourgues et al., 1973**). Le lait UHT, stérilisé à 135–150 °C, est stable 90 jours à température ambiante, mais doit être consommé dans les 3–5 jours après ouverture (**Mottar, 1984**). Des méthodes naturelles comme l'ajout de propolis améliorent la stabilité et prolongent la conservation sans altération sensorielle (**Bengi et al., 2023**).

4.2. Caractéristiques chimiques du lait

Bien que le lait soit un produit naturel, il peut contenir ou recevoir volontairement ou accidentellement des composés chimiques. On les classe en deux catégories : ceux désirables, qui améliorent la stabilité, la conservation ou l'apparence des produits, et les indésirables, pouvant poser un risque pour la santé (**Gallego & Puschner, 2021**). Leur présence est strictement réglementée, et leur contrôle est une priorité dans la filière laitière.

4.2.1. Composés chimiques désirables intégrés dans le lait

✓ Conservateurs alimentaires

Les conservateurs prolongent la durée de conservation des produits laitiers en inhibant la croissance microbienne. L'acide sorbique et le sorbate de potassium, efficaces contre levures et moisissures, sont réglementés, et des dépassements ont été signalés (**Lindnera & Lindnera, 2024 ; ElHennawy et al., 2023**).

Pour répondre à la demande de produits plus naturels, des antimicrobiens végétaux ou microbiens sont explorés comme alternatives, offrant des avantages pour la sécurité et la qualité sensorielle, mais leur stabilité doit encore être améliorée (**Soutelino et al., 2024**). Une utilisation raisonnée de conservateurs, naturels ou synthétiques, reste cruciale pour garantir la sécurité et la qualité des produits laitiers.

✓ Colorants alimentaires

Les colorants alimentaires améliorent l'attrait visuel des produits laitiers, avec une préférence croissante pour les colorants naturels issus de sources végétales comme la betterave, le curcuma ou la spiruline (**Luzardo-Ocampo et al., 2021**). En plus de leur aspect esthétique, ils possèdent des propriétés antioxydantes et antimicrobiennes bénéfiques à la conservation (**Salehi, 2021**). Cependant, leur sensibilité à la lumière, au pH et à la température pose des défis pour leur stabilité durant la transformation (**Ghosh et al., 2022**).

✓ Additifs alimentaires

Les additifs alimentaires, comme les hydrocolloïdes (gomme guar, carraghénane, pectine) et fibres fonctionnelles (inuline), améliorent la texture, la stabilité, la conservation et la qualité sensorielle des produits laitiers (**Yousefi & Jafari, 2019 ; Saha & Bhattacharya, 2010**). Les hydrocolloïdes interagissent avec les caséines pour former des réseaux tridimensionnels, augmentant viscosité et texture, mais leur efficacité dépend du pH, de la température, des ions et de leur structure chimique (**Zhang et al., 2024**). Une utilisation adaptée de ces additifs permet de répondre aux attentes nutritionnelles et sensorielles des consommateurs.

4.2.2. Composés chimiques indésirables dans le lait**✓ Résidus d'antibiotiques**

Les résidus d'antibiotiques dans le lait, principalement les tétracyclines, sulfonamides et quinolones, proviennent de leur usage chez les bovins et présentent un risque sanitaire même à faibles doses (**Costa et al., 2024**). En Algérie, **Baazize-Ammi et al. (2019)** ont trouvé des substances inhibitrices dans 12,67 % des échantillons, avec des résidus de β -lactamines (26,32 %) et tétracyclines (15,79 %). Une autre étude de **Mimoune et al. (2021)** a détecté des résidus dans 18,12 % des échantillons, majoritairement des tétracyclines et pénicillines. Ces résultats soulignent l'importance d'un contrôle strict de l'usage des antibiotiques en élevage.

✓ Pesticides

Les résidus de pesticides dans le lait, issus de la contamination des aliments pour animaux, ont été largement détectés en Chine et en Amérique latine, notamment des néonicotinoïdes et organochlorés comme le DDT (**Wei et al., 2023 ; Figueiredo et al., 2024**). Ces résultats soulignent l'importance d'un contrôle renforcé pour protéger la santé des consommateurs.

✓ Métaux lourds

La présence de métaux lourds (Pb, Cd, Hg, As) dans le lait, provenant de l'environnement ou de l'alimentation animale, constitue un risque sanitaire majeur. Des dépassements des normes ont été signalés en Afrique, Asie et Amérique du Sud (**Alinezhad et al., 2024**). En Algérie, **Boudebbouz et al. (2023)** ont trouvé des niveaux élevés de Pb et Cd dans le lait cru, notamment chez les enfants, confirmant la nécessité d'un contrôle accru. Une méta-analyse mondiale indique des moyennes de 197,04 µg/kg pour le Pb et 31,67 µg/kg pour le Cd, soulignant l'urgence de mesures de surveillance renforcées (**Alinezhad et al., 2024**).

5. La qualité du lait

5.1. Caractéristiques sensorielles et organoleptiques du lait

Les propriétés sensorielles du lait, telles que l'arôme, le goût et la texture, sont essentielles pour sa qualité et sa constance (**Schiano et al., 2017**). La teneur en matières grasses influence l'acceptabilité, le lait entier étant perçu comme plus savoureux que le lait écrémé (**Su et al., 2022**). La fortification en minéraux peut aussi modifier ces attributs, notamment le goût et la viscosité (**Abdulghani et al., 2015**). L'analyse sensorielle est donc clé pour développer des produits laitiers acceptables.

• Couleur

La couleur naturelle du lait, allant du blanc au jaune, dépend des micelles de caséine, des globules gras et de l'alimentation. Les traitements thermiques, comme la pasteurisation ou la stérilisation, peuvent jaunir le lait via la réaction de Maillard, tout en pouvant altérer la biodisponibilité du calcium (**Pagliarini et al., 1990 ; Seiquer et al., 2010**). Un contrôle précis de la température est essentiel pour préserver son aspect et sa qualité (**Rabbani et al., 2025**).

- Odeur

L'odeur du lait, dépendant de sa composition et traitement, indique sa qualité. Des composés volatils et produits par des bactéries contribuent à son arôme, essentiel pour la qualité des produits laitiers (Kilcawley et al., 2018 ; Tong et al., 2022 ; Lim et al., 2022).

- Saveur

La saveur douce et crémeuse du lait frais, due à ses composants et composés volatils, dépend de l'alimentation, de la santé animale et du stockage. Les traitements et la conservation peuvent l'altérer, rendant leur préservation essentielle, surtout pour les produits fermentés ou enrichis (Forss, 1969 ; McNamara & Patton, 2021 ; Chen, 2024 ; Cadwallader & Singh, 2009).

5.2. La qualité microbiologique du lait cru

Le lait cru, très sensible à la contamination, dépend de l'hygiène, de l'état sanitaire de l'animal, et des pratiques de traite. En Algérie, la majorité des échantillons respectaient les normes à la sortie de l'animal, mais très peu après stockage, montrant que la dégradation microbiologique est souvent due à des pratiques hygiéniques insuffisantes (Hamiroune et al., 2016). Il peut aussi accumuler des contaminants chimiques ou biologiques, et une mauvaise gestion de la température favorise le développement de microbes nuisibles, augmentant le risque de contamination par des bactéries pathogènes comme *Listeria* ou *Salmonella*. La qualité microbiologique du lait repose sur une gestion rigoureuse de toute la chaîne de production (Velázquez-Ordoñez et al., 2019 ; Dash et al., 2022).

5.2.1. La flore originale et bénéfique du lait cru

La flore bénéfique du lait cru, principalement de bactéries lactiques comme *Lactococcus* et *Lactobacillus*, contribue à l'acidification, l'aromatisation et la conservation du lait (Steele et al., 1997). Sa composition dépend de l'environnement, de la santé de la vache, de l'alimentation, et des pratiques de traite (Quigley et al., 2013). La conservation à 4 °C peut favoriser certaines bactéries bénéfiques si les conditions sont contrôlées, rendant leur compréhension essentielle pour la transformation artisanale du lait.

5.2.2. Flore d'altération dans le lait cru

La flore d'altération du lait cru, composée principalement de bactéries saprophytes, levures et moisissures, nuit à ses qualités sensorielles en provoquant acidification, odeurs et goûts désagréables, surtout en conditions d'hygiène défaillantes ou de mauvaise conservation (**Dolango, 2021**).

✓ La flore mésophile aérobie totale (FMAT)

La flore mésophile aérobie totale (FMAT), composée principalement de bactéries saprophytes et parfois d'agents pathogènes opportunistes, se développe à 20-45°C en présence d'oxygène (**Lewis & Deeth, 2009**). Elle sert d'indicateur clé de l'hygiène de production du lait cru, une concentration élevée signalant une contamination due à de mauvaises pratiques ou équipements, et elle influence la stabilité organoleptique et la durée de conservation du lait (**Martin et al., 2016 ; Murphy & Boor, 2000**).

✓ Levures et moisissures dans le lait cru

Les levures et moisissures dans le lait cru, telles que *Candida*, *Geotrichum* et *Kluyveromyces*, proviennent souvent de contaminations environnementales liées au fourrage, à l'air, aux surfaces ou à une réfrigération inadéquate. Leur développement, favorisé par des conditions d'hygiène défaillantes, peut entraîner des fermentations secondaires, des gonflements, des goûts anormaux et des défauts visuels comme le floculage. La maîtrise de leur croissance repose principalement sur un nettoyage strict et une bonne ventilation (**Desmaures et al., 1997**).

5.2.3. Bactéries infectieuses d'origine environnementale ou animale

Les bactéries infectieuses dans le lait cru, telles que *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Escherichia coli* et *Listeria monocytogenes*, proviennent d'une excrétion mammaire ou de contaminations environnementales liées à une hygiène défectueuse, notamment par contact avec des mains ou des ustensiles contaminés. Leur présence pose un risque sanitaire important en pouvant causer des infections graves chez l'homme (**Steinmann & Fané, 2004**).

✓ *Escherichia coli*

La souche O157 :H7, d'origine fécale, indique une contamination lors de la traite ou du nettoyage, souvent par des matières fécales ou de l'eau souillée. Elle est particulièrement dangereuse, pouvant causer des diarrhées hémorragiques et des syndromes hémolytiques urémiques, surtout chez les enfants. Résistante à l'acidité, elle peut survivre plusieurs jours dans le lait réfrigéré, faisant de sa détection un indicateur critique de contamination et de risque sanitaire (Loor-Giler et al., 2025).

✓ *Staphylococcus aureus*

Souvent retrouvé dans le lait des vaches mammites subcliniques, ce pathogène produit des entérotoxines thermostables. Même après pasteurisation, ces toxines peuvent rendre le lait dangereux, provoquant des toxi-infections aiguës avec nausées, vomissements et douleurs abdominales. La transmission se fait principalement via les mains des trayeurs ou des équipements mal désinfectés (Oliver et al., 2005).

✓ *Brucella spp.*

Les bactéries du genre *Brucella*, comme *Brucella abortus* et *Brucella melitensis*, peuvent être excrétées dans le lait de vaches infectées sans signes cliniques. Elles causent la brucellose chez l'homme, une maladie chronique caractérisée par fièvre ondulante, douleurs articulaires et grande fatigue. Ces bactéries s'installent dans les tissus mammaires et persistent dans le lait cru. Leur présence est documentée dans plusieurs régions du monde, notamment en Afrique et en Asie, où la surveillance sanitaire est limitée et la consommation de lait cru fréquente (Kebede et al., 2014).

✓ *Shigella spp.*

Entérobactérie humaine contaminant le lait par les mains ou l'eau souillée, provoquant la shigellose, une diarrhée aiguë sanglante. La mauvaise hygiène favorise sa transmission, notamment en Afrique de l'Ouest (Jayarao & Henning, 2001).

✓ *Mycobacterium bovis*

Responsable de la tuberculose bovine, cette bactérie peut se transmettre à l'homme par le lait cru non traité, survivant dans le lait et résistante à la digestion, particulièrement dans les zones où le contrôle vétérinaire est faible (Zahrakar et al., 2024).

✓ *Salmonella* spp.

Les bactéries du genre *Salmonella*, dont les sérotypes *S. Dublin* ou *S. Typhimurium*, peuvent contaminer le lait cru par contact avec des matières fécales, des litières souillées ou du matériel mal désinfecté. Elles sont capables de survivre dans le lait cru pendant plusieurs jours et de se multiplier si la température de stockage dépasse 10 °C. Leur ingestion peut entraîner des salmonelloses sévères, responsables de gastro-entérites parfois compliquées d'infections systémiques, surtout chez les enfants et les personnes âgées (**Jayarao & Henning, 2001**).

✓ *Yersinia enterocolitica*

Yersinia enterocolitica est une bactérie psychrotrophe fréquemment retrouvée dans le lait cru et les produits laitiers non pasteurisés. Elle peut se développer à des températures de réfrigération, ce qui lui permet de proliférer pendant le stockage. Des études ont montré que cette bactérie est capable de survivre dans le lait cru, avec des taux d'isolement atteignant 22 % dans certaines régions (**Ahmed et al., 2019**).

5.2.4. Bactéries toxigènes et risques pour la transformation laitière

Les bactéries sporulantes et toxigènes comme *Clostridium tyrobutyricum* et *Bacillus cereus* présentent un risque pour la transformation laitière. Elles produisent des toxines thermostables et forment des spores résistantes à la chaleur, pouvant germer dans le lait. *C. tyrobutyricum*, souvent introduit par un ensilage mal conservé, peut causer des défauts de fermentation dans le fromage (**Samaržija et al., 2012**), tandis que *B. cereus* peut former des biofilms sur les équipements, persistant après la cuisson (**Catania et al., 2021**). Leur présence entraîne des altérations du produit, telles que la production de gaz ou de substances causant dégradation sensorielle et pertes économiques, soulignant l'importance de contrôles stricts pour la sécurité des produits laitiers (**Scheldeman et al., 2005**).

6. Les facteurs favorisant la contamination du lait cru

6.1. Hygiène de la traite et du matériel

L'hygiène lors de la traite est essentielle pour la qualité du lait cru. Des mains, mamelles ou matériel mal désinfectés peuvent introduire des micro-organismes, notamment des agents pathogènes. Une étude en Algérie a montré que le nettoyage insuffisant augmente la contamination, surtout après la traite, d'où l'importance d'un hygiénisme rigoureux (**Hamiroune et al., 2016**).

6.2. Qualité de l'eau utilisée

L'eau utilisée pour nettoyer les mamelles, les mains et le matériel doit être saine, car une eau contaminée par des germes comme les coliformes, streptocoques fécaux ou *Pseudomonas* spp. Peut introduire des agents pathogènes dans le lait cru, accélérant sa dégradation. Dans les élevages peu encadrés, cette contamination est courante, et la présence de ces micro-organismes dans l'eau ou lors du rinçage est liée à une chute rapide de la qualité microbiologique du lait (**Verdier-Metz et al., 2009**).

6.3. Environnement d'élevage

L'environnement immédiat des vaches, comme l'état du sol, des litières et la qualité de l'air, influence directement la contamination du lait. La poussière, la boue, les résidus de fumier et une ventilation insuffisante favorisent la prolifération de bactéries telles que *Clostridium* ou *Listeria* et augmentent le risque de transmission au lait, surtout si les pratiques de nettoyage et désinfection ne sont pas strictes (**Martin et al., 2011**).

6.4. État de santé des animaux

La santé de la mamelle des vaches affecte directement la qualité microbiologique du lait. Les infections mammaires, même subcliniques, entraînent une excrétion bactérienne continue, avec des germes comme *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus* ou *Mycoplasma bovis*, causant une hausse du nombre de cellules somatiques et une baisse de la qualité technologique du lait. Des suivis sanitaires réguliers sont donc nécessaires pour limiter ces contaminations (**Maréchal et al., 2011**).

6.5. Conditions de stockage et de transport

Une mauvaise maîtrise de la température lors du stockage ou du transport du lait cru favorise la prolifération rapide de bactéries, en particulier les espèces psychrotrophes comme *Pseudomonas* spp. OÙ *Yersinia enterocolitica*. Au-delà de 10 °C, la flore totale du lait peut doubler en quelques heures, provoquant des dégradations enzymatiques (lipolyse, protéolyse) qui altèrent le goût, la texture et la conservation du lait. Il est donc essentiel de maintenir strictement la chaîne du froid dès la traite jusqu'à la transformation (**Griffiths et al., 1987**).

7. Les procédés de conservation du lait

Le lait, en raison de sa richesse nutritionnelle, favorise le développement microbien en cas de mauvaise manipulation ou conservation (**Calahorrano-Moreno et al., 2022**). Des bactéries pathogènes comme *E. coli*, *Listeria monocytogenes* ou *Salmonella* spp. Peuvent entraîner des risques sanitaires graves si le lait est cru ou peu traité (**Keba et al., 2020**). La réfrigération rapide après la traite limite la croissance de bactéries psychrotrophes productrices d'enzymes thermostables (**von Neubeck et al., 2015**). La pasteurisation (LTLT, HTST, UHT) est essentielle pour éliminer les agents pathogènes, bien qu'elle n'assure pas à elle seule une sécurité totale, d'où la nécessité de contrôles complémentaires (**Ceni et al., 2016 ; Sharma et al., 2014**).

7.1. Pasteurisation

La pasteurisation est un procédé thermique dont l'objectif est d'éliminer les micro-organismes pathogènes ayant la capacité de se développer dans le lait sans aucune réelle modification de ses propriétés nutritionnelles. Pour ce faire, le lait est soumis à un traitement thermique à une température précise pendant un certain temps pour éliminer les germes pathogènes (**Souza, 2022**).

Les principaux types de pasteurisation sont :

- **Pasteurisation basse température longue durée (LTLT)** : Chauffage à 63°C durant 30 minutes. Principalement utilisé pour certains produits fermiers et certains fromages (**Elwell & Barbano, 2006**).
- **Pasteurisation haute température, court temps (HTST)** : Chauffage à 72°C durant 15 secondes. Assure une bonne destruction des pathogènes du lait tout en gardant le goût et les autres caractéristiques du lait (**Bezie, 2019**).

- **Ultra haute température (UHT)** : Chauffage à 135-150°C pendant 2-5 secondes puis conditionnement aseptique. Cela permet de conserver le lait quelques mois sans réfrigération (Lindsay et al., 2021).

7.2. Stérilisation

La stérilisation est un procédé thermique encore plus poussé que la pasteurisation. Elle vise à éliminer non seulement les bactéries pathogènes, mais également tous les types de spores résistant à la chaleur. Cela permet de conserver le lait plus longtemps encore, à température ambiante, mais la stérilisation peut altérer certaines des qualités nutritionnelles du lait (Lindsay et al., 2021).

Il existe plusieurs méthodes de stérilisation, parmi lesquelles :

- **Stérilisation en autoclave** : La stérilisation en autoclave consiste à chauffer le lait à 115-121 °C sous pression pendant 15 à 30 minutes, éliminant les germes pathogènes et les spores. Elle permet une longue conservation à température ambiante, idéale pour des produits comme le lait concentré en emballages hermétiques (Kontominas, 2019).
- **Stérilisation UHT** : c'est le fait de chauffer le lait à 135-150°C durant peu de secondes. Le lait doit alors être conditionné pour que cette stérilisation soit efficace sur plus de quelques jours (Lindsay et al., 2021).
- **Filtration stérilisante** : Opération consistant à éliminer les micro-organismes lors du passage d'un liquide à travers une membrane filtrante sans utiliser de (Onyeaka & Nwabor, 2022).

7.3. Réfrigération et congélation

La réfrigération consiste à maintenir le lait à une température inférieure à 4°C tout au long de la chaîne d'approvisionnement. C'est le seul moyen de lutter contre les bactéries à l'origine de l'altération de la qualité du lait en produisant des enzymes spécifiques même à basse température (Raats et al., 2011).

La congélation est peu pratiquée, mais elle est parfois utilisée pour le stockage de lait à long terme. Le lait peut être conservé jusqu'à quelques mois en étant congelé à -18°C car il n'y a plus de croissance des bactéries. Cependant, certains inconvénients sont à noter, le lait, une fois décongelé, peut souffrir d'une perte d'homogénéité : de l'eau peut se trouver séparée du reste du lait (Ma et al., 2023).

8. Méthodes de conservation naturelles par les extraits et produits de la ruche

Les produits de la ruche tels que le pollen, la propolis, le miel, la gelée royale et la cire d'abeille présentent un intérêt croissant comme bioconservateurs naturels dans les produits laitiers.

Le pollen est reconnu pour sa richesse en polyphénols, flavonoïdes, vitamines B, protéines et minéraux, lui conférant des propriétés antioxydantes et antimicrobiennes significatives. Son incorporation dans des produits laitiers, tels que le lait ou le yaourt, permet d'améliorer la stabilité microbienne et de prolonger la durée de conservation, tout en enrichissant le produit en composés bioactifs (**Thakur & Nanda, 2020**). Dans une étude sur le fromage blanc, l'ajout de pollen a permis une réduction significative des charges de *Salmonella typhimurium* et *E. coli*, tout en augmentant le contenu total en composés phénoliques (**Abd Elhamid & Elbayoumi, 2017**).

La propolis, grâce à ses composés phénoliques et flavonoïdes, présente une forte activité antimicrobienne, notamment contre *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* et certaines levures et moisissures dans les produits laitiers, sans altérer les qualités sensorielles (**El-Deeb, 2017**). Le miel agit par pression osmotique et contient des enzymes antimicrobiennes efficaces contre *E. coli* et *Salmonella* spp., tout en améliorant les propriétés antioxydantes des produits laitiers à dose modérée. La gelée royale possède des effets antimicrobiens et immunostimulants ; son ajout dans le yaourt améliore texture, valeur nutritionnelle et acceptabilité sensorielle sans nuire aux bactéries lactiques (**Atallah & Morsy, 2017**).

Enfin, la cire d'abeille est surtout employée comme enrobage comestible, formant une barrière physique contre l'oxygène, l'humidité et les bactéries. Elle permet ainsi de prolonger la conservation des aliments périssables, notamment des produits laitiers comme les fromages affinés. Cette solution naturelle et fonctionnelle répond à la fois au rejet croissant des conservateurs chimiques et aux attentes en matière de santé publique (**Yilmaz & Dagdemir, 2012**).

Chapitre II :

*Le pollen d'abeille et ses propriétés
biologiques*

1. Aperçu sur le pollen comme un produit de la ruche

Les produits de la ruche, tels que le miel, la propolis, la gelée royale, la cire, le venin et le pollen, présentent une grande diversité biochimique et sont utilisés en nutrition, médecine, cosmétique et pharmacologie. Le miel est reconnu pour ses propriétés antimicrobiennes grâce à ses composés actifs ; la propolis, riche en flavonoïdes et terpènes, possède des effets antibactériens et antioxydants (**Pasupuleti et al., 2017 ; Viuda-Martos et al., 2008**). La gelée royale, quant à elle, contient des protéines spécifiques aux propriétés immunomodulatrices. En Algérie, la composition de ces produits varie selon la flore locale, soulignant l'impact de la biodiversité (**Gül & Pehlivan, 2018 ; Kaškonienė & Venskutonis, 2010**).

Parmi eux, le pollen se distingue par son rôle central dans la ruche et son intérêt nutritionnel croissant. Il est une source importante de protéines, vitamines, minéraux et antioxydants, mais nécessite un traitement post-récolte adéquat pour préserver ses propriétés (**Feas et al., 2012 ; Chefrou et al., 2009**).

1.1. Définition du pollen

Le pollen, forme reproductrice mâle des plantes à fleurs, constitue pour les abeilles une source nutritionnelle majeure en protéines, lipides, vitamines et minéraux, indispensables au développement des larves et au bon fonctionnement de la colonie (**Stanley & Linskens, 2012**). Sa composition, influencée par l'origine florale, peut varier considérablement ; une faible diversité végétale peut compromettre la santé des abeilles (**Filipiak et al., 2017**). Sur le plan biochimique, le pollen est riche en acides aminés essentiels, flavonoïdes et composés phénoliques, qui lui confèrent des propriétés antioxydantes, antibactériennes et immunomodulatrices (**Kostić et al., 2020**). Toutefois, sa qualité peut être dégradée par des contaminants environnementaux tels que pesticides, métaux lourds ou agents pathogènes, ce qui rend indispensable l'évaluation sanitaire avant toute utilisation (**Bogdanov, 2006**). Ainsi, le pollen se situe au carrefour des enjeux écologiques, apicoles et nutritionnels.

1.2. Structure du pollen

Le grain de pollen est protégé par deux enveloppes : l'exine, externe, composée de sporopollénine, très résistante aux dégradations, et caractéristique de chaque espèce (**Ariizumi & Toriyama, 2011**), et l'intine, interne, riche en polysaccharides, essentielle à la germination du tube pollinique (**Qin et al., 2009**). Sa diversité morphologique (10–200 µm), en forme, taille et ornementation, en fait un outil précieux en palynologie pour des applications en taxonomie, géographie, archéologie et médecine légale (**Hesse et al., 2009 ; Mildenhall et al., 2006**).

1.3. La pollinisation et la récolte du pollen par l'abeille

Produit dans les anthères, le pollen est vital pour les abeilles et sa composition dépend de l'origine florale, influençant ses propriétés nutritionnelles (**Di Pasquale et al., 2013**). Les abeilles, souvent fidèles à une même source florale, collectent un pollen homogène selon les saisons (**Leonhardt & Blüthgen, 2012 ; Odoux et al., 2014**). La pollinisation, transfert du pollen vers le stigmate, est principalement assurée par les abeilles pour les plantes entomophiles, contribuant à plus de 70 % des cultures alimentaires (**Klein et al., 2007 ; Somme et al., 2015 ; Vaissière et al., 2011**).

Les abeilles ouvrières collectent le pollen avec leurs pattes postérieures, le mélangent à du nectar et à la salive pour former des pelotes. De retour à la ruche, celles-ci sont stockées et fermentées en « pain d'abeille », nourriture des jeunes larves. Les apiculteurs récoltent ce pollen à l'aide de trappes placées à l'entrée de la ruche, méthode efficace mais à utiliser avec modération pour ne pas affecter les besoins de la colonie (**Campos et al., 2008 ; Requier et al., 2015**).

1.4. Récolte du pollen par l'apiculteur

La récolte du pollen repose sur l'usage de trappes à pollen installées à l'entrée des ruches. Ces dispositifs, équipés de grilles perforées (4,5 à 5,0 mm), détachent les pelotes de pollen des pattes des abeilles, qui tombent ensuite dans un bac collecteur ventilé (**Filipiak et al., 2017**). Utilisée de manière raisonnée, cette méthode permet de récupérer 10 à 20 % du pollen sans perturber significativement la colonie (**Roulston & Cane, 2000**). Un usage excessif peut toutefois nuire au développement des larves et à la production de gelée royale, d'où la recommandation d'alternance entre périodes de récolte et de repos pour limiter le stress des abeilles (**Campos et al., 2010**).



Figure 02 : Les trappes (pièges) à pollen et pollen d'abeilles multiflores (**Khalifa et al., 2021**).

1.5. Séchage et conservation du pollen

Le pollen frais, très sensible à l'humidité, doit être séché rapidement après récolte pour éviter moisissures et pertes bioactives. Le séchage s'effectue à 35–40 °C à l'aide de déshydrateurs ventilés, afin de préserver les enzymes, vitamines et propriétés organoleptiques (**Carpes et al., 2009 ; Morais et al., 2011**). Un taux d'humidité < 6 % est requis pour une conservation optimale. Une fois tamisé, le pollen est stocké hermétiquement à l'abri de l'air, de la lumière et de l'humidité. Pour une durée de conservation supérieure à 12 mois, la congélation à -18 °C est recommandée, permettant de maintenir ses qualités nutritionnelles et biologiques (**Almeida-Muradian et al., 2005**).

1.6. Détermination de l'origine botanique du pollen en Algérie et dans la wilaya de Mila

L'identification botanique du pollen, ou méliissopalynologie, repose sur l'analyse morphologique des grains (taille, forme, sculpture, couleur), permettant de relier le pollen aux espèces florales visitées par les abeilles. Cette méthode est cruciale pour authentifier les miels monofloraux, évaluer la biodiversité locale et surveiller les changements environnementaux (**Von Der Ohe et al., 2004**).

En Algérie, la wilaya de Mila présente une richesse floristique remarquable, dominée par les familles Asteraceae, Brassicaceae, et Boraginaceae, fréquemment butinées par *Apis mellifera* et les abeilles solitaires (**Barth, 2004**). Des espèces comme *Anchusa azurea*, *Sinapis arvensis* et *Galactites tomentosa* y sont communes, rendant cette région intéressante pour la valorisation apicole (**Bendifallah et al., 2018 ; Cardoso & Silva, 2016**).

Une étude récente (**Boulfous et al., 2025**) menée à Mila sur 15 échantillons a identifié 30 types polliniques issus de 17 familles, avec une dominance des types *Cistus*, *Brassica*, *Erica*, *Aster* et *Pimpinella anisum*. Cette diversité souligne le potentiel du pollen local pour l'apithérapie et la nutrition fonctionnelle.

2. Pollen d'abeille

2.5. Caractéristiques générales

Chaque espèce florale butinée confère aux pelotes de pollen des caractéristiques spécifiques. Leur aspect macroscopique, tel que la forme, la masse ou la couleur, varie en fonction de l'origine botanique, ce qui permet parfois une traçabilité de l'environnement floristique exploré par les abeilles (Grgić, Vlainić, & Lelas, 2023).

2.5.1. Propriétés physiques

Taille : La pelote de pollen mesure généralement entre 2 et 3 mm de diamètre, une variation liée à l'humidité, à la flore butinée et à la façon dont l'abeille compacte le pollen (Flanjak et al., 2023).

Odeur : Le pollen dégage une odeur caractéristique, souvent proche de celle du foin ou des herbes sèches. Cette odeur dépend de l'origine florale et des conditions de conservation (Anik & Vardar, 2024).

Goût : Le goût varie selon sa composition chimique : il peut être **sucré, amer, acide ou épicé**, en lien avec les acides organiques et composés phénoliques qu'il contient. Séché, sa texture devient farineuse ou granuleuse (Anik & Vardar, 2024).

Couleur : La couleur des pelotes de pollen varie largement, du jaune pâle au brun foncé, avec des nuances rouges, orangées ou verdâtres. Ces teintes reflètent la composition en pigments naturels, comme les flavonoïdes et les caroténoïdes, et renseignent sur l'origine florale (Flanjak et al., 2023).

2.5.2. Propriétés et composition chimique

Le pollen d'abeille, riche en nutriments essentiels et en antioxydants naturels comme les flavonoïdes et caroténoïdes, présente un fort potentiel fonctionnel et thérapeutique. Sa composition, influencée par l'origine florale et les conditions environnementales, justifie son utilisation croissante dans les compléments alimentaires (**Khalifa et al., 2021 ; Sattler et al., 2015**).

- **Les lipides**

Les lipides du pollen, bien que présents en quantité modérée, sont nutritionnellement importants grâce à leur apport en acides gras essentiels (oméga-3 et oméga-6), bénéfiques pour la santé cardiovasculaire et l'équilibre inflammatoire. On y trouve aussi des phospholipides et des phytostérols, aux effets protecteurs sur les membranes cellulaires et hypocholestérolémiants. Leur sensibilité à l'oxydation exige une conservation adaptée pour préserver la qualité biochimique du pollen (**Denisow & Denisow-Pietrzyk, 2016 ; Fatrcová-Šramková et al., 2013**).

- **Les glucides**

Les glucides constituent une part importante du pollen, représentant de 20 % à 40 % de sa matière sèche. Ils incluent des monosaccharides (glucose, fructose), des disaccharides (saccharose) et des polysaccharides structuraux (cellulose, hémicelluloses, pectine). Ces glucides fournissent de l'énergie, contribuent à la structure du pollen et peuvent agir comme prébiotiques, stimulant la croissance de bactéries intestinales bénéfiques. La concentration et la composition en sucres libres influencent les propriétés organoleptiques du pollen, affectant son acceptabilité sensorielle (**Fuenmayor B et al., 2014 ; Thakur & Nanda, 2020**).

- **Les protéines et les acides aminés**

Le pollen est une source riche en protéines, comprenant en moyenne 20 à 35 % de sa masse sèche, et contient les huit acides aminés essentiels, ce qui en fait une alternative végétale intéressante pour les régimes végétariens et les sportifs. Il renferme également des peptides bioactifs aux effets anti-hypertenseurs et anti-inflammatoires. La composition en acides aminés varie selon la flore butinée, avec des compositions spécifiques pour les pollens monofloraux (**Leja et al., 2007**).

- **L'eau**

L'humidité du pollen frais, qui varie de 20 à 30 %, compromet sa conservation. Un séchage rapide réduisant l'humidité à moins de 6 % et l'activité de l'eau (A_w) en dessous de 0,6 est crucial pour inhiber la croissance microbienne. Le séchage à basse température (inférieure à 42 °C) permet de maintenir les vitamines et composés bioactifs, assurant ainsi la stabilité nutritionnelle, chimique et microbiologique du pollen pendant sa conservation (**Feas et al., 2012 ; Zuluaga et al., 2015**).

- **Les minéraux**

Le pollen est riche en minéraux essentiels tels que le potassium, le calcium, le magnésium, le fer, le zinc, le cuivre et le sélénium, cruciaux pour diverses fonctions biologiques. Les pollens provenant de régions volcaniques ou riches en silice présentent une concentration minérale accrue. La bioaccessibilité de ces minéraux a été confirmée par des études de digestibilité (**Rzepecka-Stojko et al., 2012**).

- **Les vitamines**

Le pollen commercial est particulièrement riche en vitamines hydrosolubles et liposolubles. Il contient notamment toutes les vitamines du groupe B (B1, B2, B3, B5, B6), ainsi que l'acide folique (B9) et la cobalamine (B12), cette dernière étant rare dans les produits végétaux. En plus, il apporte des quantités intéressantes de vitamine C (acide ascorbique), de la provitamine A (bêta-carotène), ainsi que de la vitamine D et de la vitamine E (tocophérol). Ces vitamines jouent des rôles essentiels dans la protection cellulaire, la vision, la reproduction, et la stabilité des membranes biologiques, avec leur profil variant selon l'origine florale du pollen (**Mărghitaș et al., 2009**).

- **Les polyphénols**

Les composés phénoliques sont des nutriments alimentaires fonctionnels et présentent une similitude structurelle, synthétisé par la voie de biosynthèse des polyphénols et des flavonoïdes (**Wang et al., 2023**), sont des métabolites secondaires des végétaux à structure polyphénolique, qui sont largement distribués dans les légumes, les fruits, les céréales, le thé, le vin rouge et leurs aliments et boissons dérivés (**Li et al., 2023**).

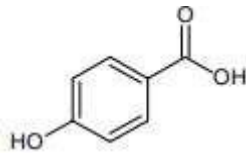
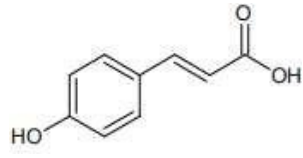
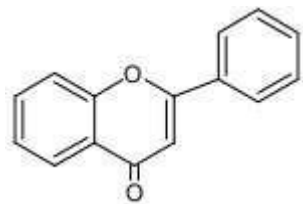
Les polyphénols représentent un groupe important de composés bioactifs présents dans le pollen, en quantités pouvant atteindre jusqu'à 1,6 % de sa masse sèche. Ce sont des métabolites secondaires des plantes qui jouent un rôle fondamental dans la défense contre les stress environnementaux. Dans le pollen, les polyphénols se manifestent sous différentes formes, telles que les acides phénoliques (acide férulique, acide caféique) et les flavonoïdes. Ces molécules sont largement responsables des propriétés antioxydantes du pollen, en neutralisant les radicaux libres et en protégeant les cellules du stress oxydatif. Elles participent également à des activités anti-inflammatoires, antimicrobiennes et anticancéreuses observées dans les études *in vitro*. Leur concentration dépend de l'origine florale et géographique du pollen, les pollens issus de plantes médicinales comme le châtaignier ou le romarin étant particulièrement riches (**Komosinska-Vashev et al., 2015**).

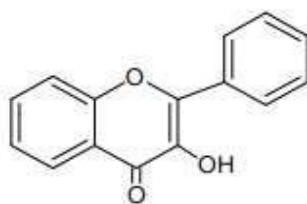
- **Les flavonoïdes**

Les flavonoïdes, sous-classe des polyphénols, sont des pigments naturels responsables de la couleur jaune, orange ou rouge de nombreux pollens. Ils sont aussi parmi les composés bioactifs les plus étudiés du pollen pour leurs effets biologiques. On y retrouve notamment la quercétine, la kaempférol, l'apigénine et la rutine, tous dotés d'un fort potentiel antioxydant et anti-inflammatoire. Ces flavonoïdes exercent une action bénéfique sur la santé cardiovasculaire, le vieillissement cellulaire, et la prévention de certains cancers. Ils ont également démontré un rôle protecteur sur les neurones dans des modèles expérimentaux de stress oxydatif. Leur teneur peut varier considérablement selon les espèces florales à l'origine du pollen, certaines fleurs produisant des concentrations plus élevées de ces molécules spécifiques (**Kizilpinar-Temizer et al., 2022**).

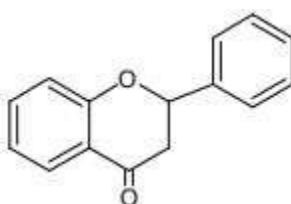
- **Le tableau** suivant représente les principaux composés polyphénoliques de pollen et leurs dérivés ainsi que leurs structures.

Tableau 05 : Principaux composés polyphénoliques de pollen et leurs dérivés (Rzepecka- Stojko et al., 2015).

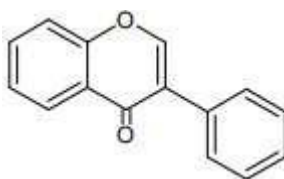
Composants phénoliques	Structures des Composants principaux	Position des groupes hydroxyles libres	TEACa (mM)
1. Acides phénoliques			
Acides hydroxybenzoïques			
			
	Acides hydroxybenzoïques		
Acide gallique		3,4,5	3,0
Acide protocatéchique		3,4	1,2
Acides hydroxycinamiques			
			
	Acides hydroxycinamiques		
Acide caféique		3,4	1,3
Acide férulique		4	1,9
Acide chlorogénique		3,4	1,3
Acide para-coumarique		4	2,2
Acide ortho-coumarique		2	1,0
2. Flavonoïdes			
Flavones			
			
	Flavones		
Lutéoline		5,7,3',4'	2,1
Apigénine		5,7,4'	1,5
Chrysine		5,7	1,4

Flavonols**Flavonols**

Quercetin	3,5,7,3',4'	4,7
Rutine (Q3-O-rutoside)	5,7,3',4'	2,4
Kaempférol	3,5,7,4'	1,3
Myricétine	3,5,7,3',4',5'	3,1
Galangine	3,5,7	

Flavonones**Flavonones**

Naringénine	5,7,4'	1,5
Pinocembrine	5,7	

Isoflavones**Isoflavones**

Génistéine	5,7,4'	
------------	--------	--

3. Les activités biologiques du pollen

3.1. Activité antibactérienne

Le pollen d'abeille possède une activité antibactérienne remarquable, attribuée à la richesse de sa composition en flavonoïdes, acides phénoliques, composés volatils et peptides bioactifs. Ces molécules exercent leur action antimicrobienne en perturbant la membrane cytoplasmique, en inhibant des enzymes essentielles et en interférant avec la synthèse des acides nucléiques. Des recherches menées en Algérie ont révélé que les extraits de pollen, selon le solvant utilisé, sont capables d'inhiber des bactéries pathogènes telles que *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*, avec des zones d'inhibition pouvant atteindre 20 mm, ce qui atteste d'un potentiel thérapeutique significatif (**Bakchiche et al., 2020**). Parallèlement, des travaux menés en Grèce ont synthétisé les données disponibles sur l'activité antimicrobienne du pollen et du pain d'abeille, mettant en évidence une efficacité variable selon l'origine botanique et les méthodes de préparation, ainsi que des perspectives d'application dans la lutte contre les souches multirésistantes (**Didaras et al., 2020**). Une autre contribution importante vient d'Iran, où des extraits de pollen issus de différentes zones climatiques ont permis de réduire considérablement la croissance de souches cliniques résistantes aux antibiotiques, confirmant ainsi la valeur biomédicale de ces produits apicoles dans un contexte de résistance accrue aux antimicrobiens conventionnels (**Yazdani et al., 2025**). Ces résultats soulignent l'intérêt croissant porté au pollen comme ressource fonctionnelle d'origine naturelle, pouvant contribuer au développement d'alternatives antimicrobiennes durables et innovantes.

Tableau 06 : Activité antibactérienne des extraits de pollen d'abeille contre différentes souches microbienne (zone d'inhibition en mm).

Origine et type de pollen	Microorganisme testé	Zone d'inhibition (mm)	Référence
Bee pollen (Roumanie), extrait hydrométhanolique	<i>Staphylococcus aureus</i>	13.00 ± 0.50	Ilie et al., 2022
	<i>Escherichia coli</i>	14.00 ± 1.00	
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	12.00 ± 0.50	
Bee pollen (Nigéria), extrait méthanolique	<i>Staphylococcus aureus</i>	8.80 ± 0.20	ogbu et al, 2018
	<i>Escherichia coli</i>	10.70 ± 0.30	
	<i>Salmonella typhi</i>	10.80 ± 0.20	
	<i>Bacillus subtilis</i>	7.70 ± 0.30	
	<i>Enterococcus faecalis</i>	11.70 ± 0.30	
Bee pollen fermenté (Roumanie), pollen mixte	<i>Staphylococcus aureus</i>	21.32 ± 0.35	Urcan et al., 2024
	<i>Escherichia coli</i>	20.25 ± 0.25	
	<i>Candida albicans</i>	9.25 ± 0.75	
Bee pollen non hydrolysé (Lituanie)	<i>Staphylococcus aureus</i>	26.29 ± 0.25	Damulienė et al., 2023
	<i>Listeria monocytogenes</i>	26.95 ± 0.82	
	<i>Salmonella enteritidis</i>	10.02 ± 0.71	
	<i>Salmonella typhimurium</i>	7.19 ± 0.17	
Pollen d'abeille (Algérie, Inula viscosa), extrait méthanolique	<i>Staphylococcus aureus</i>	14.00 ± 0.0	Khadra et al., 2019
	<i>Escherichia coli</i>	13.00 ± 0.0	
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10.00 ± 0.0	
Pollen d'abeille (Ramiyan -Iran) extrait éthanolique	<i>Staphylococcus aureus</i>	15.70 ± 0.50	Yazdani et al., 2025
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	13.70 ± 1.10	
	<i>Enterococcus faecalis</i>	9.80 ± 1.00	

Les valeurs sont exprimées en millimètres (mm) comme moyennes ± écart-types pour chaque souche bactérienne.

3.2. Activité antifongique

Le pollen d'abeille présente une activité antifongique notable, attribuée à sa richesse en composés bioactifs tels que les flavonoïdes, les phénols et les acides organiques. Une étude réalisée en Turquie a démontré que les produits de la ruche, dont le pollen, exercent une inhibition significative sur les levures pathogènes *Candida spp.* et *Trichosporon spp.*, avec des zones d'inhibition atteignant jusqu'à 20 mm, selon le type d'extrait utilisé (**Koç et al., 2011**). De même, l'activité antifongique des extraits ethanoliques, méthanoliques et aqueux de pollen a été confirmée in vitro contre *Aspergillus niger* et *Candida albicans*, révélant une efficacité variable selon le solvant, avec l'extrait méthanolique montrant l'effet le plus prononcé (**Rana, 2021**). En complément, une étude mexicaine sur trois types de pollen d'abeilles sans aiguillon (Meliponini) a mis en évidence une action antifongique contre *Candida tropicalis*, liée à la présence élevée de composés phénoliques et à un pouvoir antioxydant marqué (**Albores-Flores et al., 2020**). Ces résultats confirment le potentiel du pollen comme source naturelle d'agents antifongiques utilisables dans les secteurs agroalimentaire, médical et cosmétique.

3.3. Activité antioxydante

L'activité antioxydante du pollen repose sur la richesse de ses composés bioactifs, principalement les flavonoïdes (tels que la quercétine, la myricétine et la rutine), les acides phénoliques (acides caféique, férulique et coumarique), les caroténoïdes et les vitamines C et E. Ces composés neutralisent les radicaux libres, limitant ainsi les dommages oxydatifs sur les membranes cellulaires, l'ADN et les protéines (**Kizilpınar-Temizet et al., 2022**).

Les méthodes d'évaluation comme DPPH, ABTS, FRAP ou ORAC sont fréquemment utilisées pour mesurer ce pouvoir par exemple une étude menée par **Ferreira et al. (2007)** a mis en évidence une activité antioxydante significative de différents pollens portugais, avec des valeurs FRAP allant jusqu'à 99,2 $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$, corrélées à la teneur élevée en composés phénoliques totaux.

Martinello & Mutinelli (2021) ont passé en revue plusieurs travaux et ont confirmé que l'activité antioxydante dépend non seulement de la composition chimique du pollen mais aussi de l'origine botanique, les pollens issus de *Cistus*, *Eucalyptus* et *Brassica* étant les plus riches en flavonoïdes. De plus, l'utilisation de solvants polaires comme l'éthanol améliore l'extraction de ces composés, renforçant ainsi l'efficacité antioxydante des extraits.

Une autre étude récente sur le pollen de châtaignier et de tournesol a révélé une capacité de piégeage des radicaux DPPH atteignant 85 %, en particulier dans les extraits à base de méthanol, ce qui confirme l'influence du solvant et de l'origine florale (**Saraiva et al., 2018**). Enfin, les extraits hydroalcooliques de pollen apicole ont montré une activité antioxydante significative dans les tests DPPH et β -carotène/linoléique, avec des variations selon l'origine florale, soulignant le potentiel du pollen dans la prévention du stress oxydatif (**Carpes et al., 2007**).

4. Utilisation du pollen comme bio-conservateur dans les produits laitiers

Le pollen d'abeille, naturellement riche en polyphénols, flavonoïdes, vitamines (notamment C et E), minéraux et composés volatils, est de plus en plus utilisé dans les produits laitiers fermentés en raison de ses propriétés antimicrobiennes et antioxydantes. Son incorporation permet de prolonger la durée de conservation, d'améliorer la stabilité microbiologique et d'enrichir les caractéristiques sensorielles des produits.

Selon **Yerlikaya (2014)**, l'ajout de pollen dans les laits fermentés augmente la viabilité des probiotiques comme *Lactobacillus acidophilus* et *Streptococcus thermophilus*, tout en inhibant des pathogènes tels que *E. coli* et *S. aureus*, avec une efficacité dépendant de la concentration. **Karabagias et al. (2018)** ont observé que les yaourts enrichis en pollen présentent une capacité antioxydante renforcée, une synergie accrue avec les bactéries lactiques, ainsi que des améliorations au niveau de la texture et de la couleur.

Par ailleurs, **Darwish et al. (2023)** ont montré que l'enrichissement des produits laitiers en pollen augmente leur teneur en protéines, flavonoïdes et polyphénols, tout en améliorant leur profil sensoriel. Ces résultats ont été confirmés par **Laaroussi et al. (2023)**, qui ont noté une meilleure résistance oxydative des yaourts durant le stockage, ainsi qu'une consistance améliorée sans recours à des additifs chimiques.

Partie *Expérimentale*

Chapitre III

Matériel et Méthodes

Ce travail de recherche vise à étudier l'efficacité du pollen, en tant que produit naturel issu de la ruche, comme agent antibactérien et conservateur appliqué au lait cru de vache réfrigéré. L'étude examine quatre paramètres clés : l'inhibition des micro-organismes pathogènes par l'extrait de pollen, l'évolution de la flore microbienne du lait traité versus non traité, les changements des propriétés physico-chimiques (pH, acidité, suivi de la flore lactique) durant le stockage, et l'extension de la durée de conservation du lait réfrigéré.

Cette recherche valorise le pollen comme conservateur naturel multifonctionnel pour préserver la qualité des produits laitiers frais de manière durable.

1. Lieux et déroulement des expérimentations

Les grains de pollen brut ont été collectés auprès de producteurs locaux, puis séchés à température ambiante pour préserver leurs composés bioactifs. Deux méthodes d'extraction ont été appliquées au Laboratoire des Sciences Naturelles et des Matériaux de l'Université Abdel Hafid Boussouf de Mila : l'extraction aqueuse par macération et l'extraction hydroéthanolique par montage Soxhlet. La caractérisation des extraits (dosage des flavonoïdes, polyphénols totaux et activité antioxydante) a été réalisée dans le même laboratoire. Les tests antibactériens sur quatre souches de référence, l'analyse physico-chimique du lait et le suivi de croissance microbienne ont été réalisés dans les laboratoires pédagogiques du même établissement à partir de janvier 2025.

2. Source et nature du produit apicole

Pour cette étude, le produit apicole sélectionné est constitué de graines de pollen frais, représentant l'une des principales ressources naturelles issues de l'activité de butinage des abeilles. Issu directement de la ruche, le pollen est considéré comme un indicateur biologique de la diversité florale environnante, tout en reflétant les conditions écologiques et la santé de l'environnement de butinage.



Figure 03 : Photographie de pollen récolté dans la région de Mila à Douar Ben Zekri.

2.1. Région et méthode de la récolte du pollen

Un échantillon de pollen frais, sous forme de graines, a été récolté au cours de la saison hivernale, avant la fin du mois de décembre 2024, par un apiculteur situé dans la wilaya de Mila. Le site exact de collecte est localisé dans la région de « Douar Ben Zekri » commune de Aïn Tine avec les coordonnées géographiques suivantes : 36,414903° de latitude Nord et 6,341867° de longitude Est. Cette région se distingue par une flore locale riche, offrant une diversité végétale propice à la pollinisation, incluant notamment le trèfle blanc (*Trifolium repens*), la luzerne (*Medicago sativa*), le pissenlit (*Taraxacum officinale*), ainsi que d’autres plantes herbacées spontanées des zones semi-rurales, Les principales caractéristique de cet échantillon sont résumées dans le **(Tableau 07)**.

Tableau 07 : Caractéristique de l’échantillon de pollen frais collecté dans la région de Douar Ben Zekri.

Région et Wilaya	Période de récolte	Méthode de Récolte	Alimentation des abeilles	Race d’abeille
Douar Ben Zekri -Mila-	Saison hivernale (mois de décembre)	Trappe à pollen	Trèfle blanc, luzerne pissenlit, flore spontanée	<i>Apis mellifera</i>

2.2. Séchage du pollen

Le pollen collecté par un apiculteur, présentant une masse initiale de 83,46 g, a été soumis à un processus de séchage naturel. Les grains de pollen ont été disposés en fine couche sur une surface propre et absorbante, à l'abri de la lumière directe du soleil et dans un environnement à faible humidité. Cette méthode de séchage à température ambiante a été privilégiée afin de préserver les composés bioactifs et les propriétés nutritionnelles du pollen. Après le processus de déshydratation, la masse finale obtenue était de 82,65 g, indiquant une réduction modérée de l'humidité tout en conservant l'essentiel des nutriments. Le pollen séché a ensuite été conservé dans des contenants hermétiques à l'abri de l'humidité jusqu'à son utilisation ultérieure.

2.3. Broyage du pollen

Le pollen séché a été soumis à un broyage partiel à l'aide d'un moulin électrique adapté aux matières délicates. Contrairement à une pulvérisation complète, ce broyage intermédiaire a été délibérément contrôlé pour obtenir des particules de taille moyenne plutôt qu'une poudre fine. Cette technique permet de préserver davantage la structure des grains de pollen tout en facilitant leur utilisation. Le produit obtenu, présentant une texture granuleuse irrégulière, a été immédiatement conditionné dans des récipients en verre propres et parfaitement secs pour éviter toute reprise d'humidité et garantir sa conservation optimale.

3. Procédés d'extraction et conservation du pollen

3.1. Extraction

La préparation des extraits de pollen a été réalisée selon deux méthodes d'extraction distinctes à partir des grains de pollen séchés (masse initiale de 82,65 g) préalablement soumis à un broyage mécanique contrôlé pour obtenir une poudre semi-fine.

3.1.1. Extraction aqueuse par macération

Une masse de 62,5 g de poudre de pollen a été mise en contact avec de l'eau distillée stérile jusqu'à saturation complète du mélange. Ce dernier a été soumis à une agitation continue de type va-et-vient pendant 72 heures, avec une filtration intermédiaire sur gaze stérile toutes les 24 heures pour optimiser l'extraction des composés bioactifs. Le filtrat obtenu a ensuite été concentré à l'aide d'un évaporateur rotatif (rotavapor) maintenu à une température modérée de 40-45°C afin de préserver les composés thermosensibles (**Campos et al., 2021**). L'extrait concentré a été réparti dans des boîtes de Pétri en verre préalablement stérilisées, puis séché pendant 7 à 15 jours à température ambiante pour éliminer toute trace résiduelle de solvant (**Figure 04**).

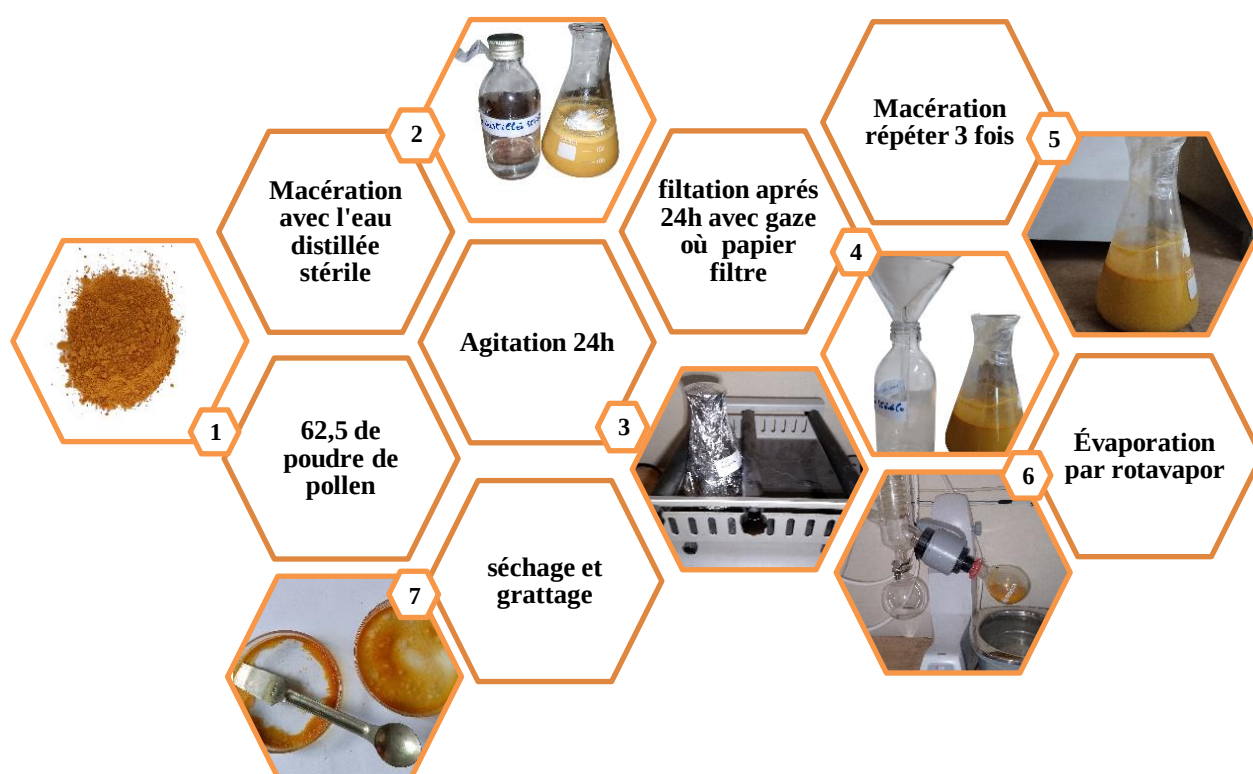


Figure 04 : Protocole d'extraction par macération aqueuse de pollen.

3.1.2. Extraction par Soxhlet

Pour cette méthode, 20 g de poudre de pollen ont été placés dans la cartouche d'extraction du montage Soxhlet. Un volume de 150 ml d'éthanol absolu a été introduit dans le ballon et chauffé à 70°C. L'extraction a été maintenue pendant 5 à 6 heures, permettant plusieurs cycles de contact entre le solvant et la matière première (**Ma et al., 2015**). L'extrait hydroéthanolique ainsi obtenu a été concentré par évaporation du solvant à l'aide du rotavapor, puis transféré dans des boîtes de Pétri en verre pour finaliser le séchage (**Figure 05**).

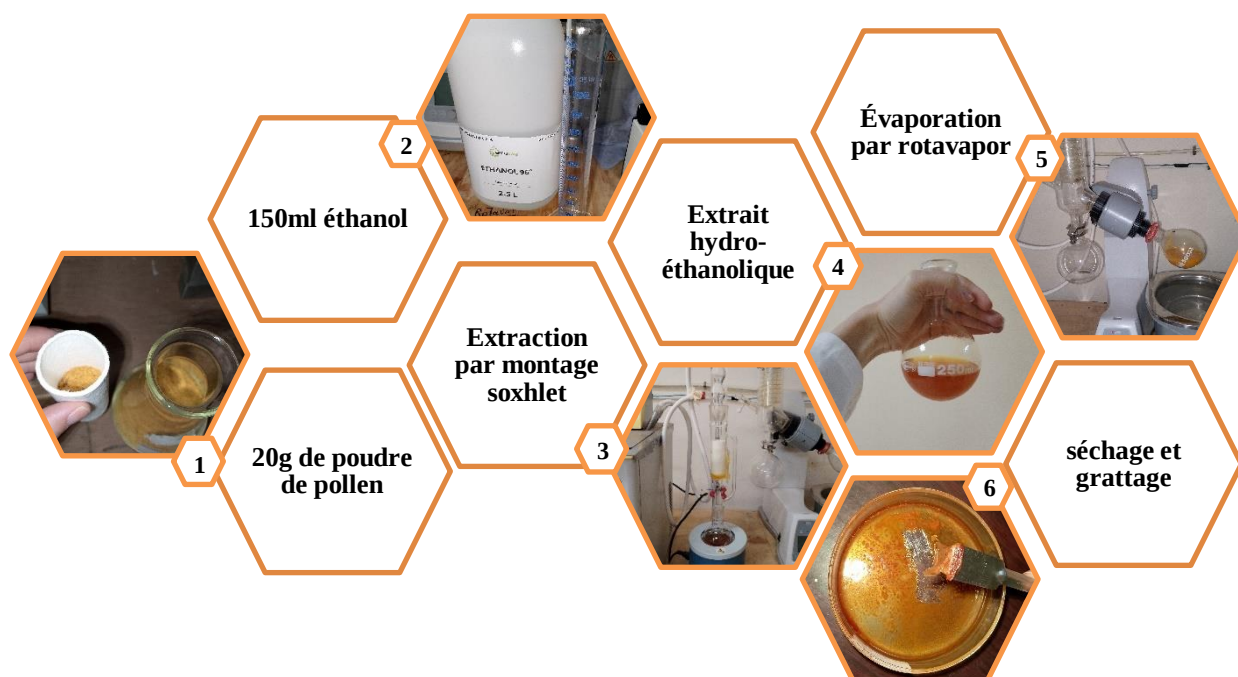


Figure 05 : Protocole d'extraction par Soxhlet de pollen.

3.2. Conservation des extraits de pollen

L'extrait aqueux sec a été minutieusement récupéré par grattage à l'aide d'une spatule stérile, puis finement broyé pour obtenir une poudre homogène de couleur jaune brunâtre. Cette poudre a été pesée puis conditionnée dans un flacon en verre ambré, hermétiquement fermé et conservé au réfrigérateur jusqu'à utilisation.

L'extrait hydroéthanolique, après évaporation, a présenté un aspect de masse cireuse compacte de couleur brun foncé, différent de la texture poudreuse de l'extrait aqueux. Cette masse cireuse a été récupérée par grattage, pesée dans son état semi-solide, puis conditionnée dans un flacon en verre ambré hermétiquement fermé et stockée au réfrigérateur.

3.3. Calcul du rendement

Les rendements d'extraction ont été calculés selon la formule : $Rd (\%) = (M_E/M_I) \times 100$

$$R = M_E/M_I \times 100$$

Où

M_E représente la masse en grammes de l'extrait final obtenu (poudre pour l'extrait aqueux, et la masse cireuse pour l'extrait hydroéthanolique).

M_I la masse initiale de poudre de pollen utilisée pour chaque méthode d'extraction.

4. Dosage des polyphénols totaux

4.1. Préparation de la courbe d'étalonnage de l'acide gallique

Une solution mère d'acide gallique a été préparée à la concentration de 1 mg/mL dans du méthanol. À partir de cette solution, des dilutions successives ont été réalisées afin d'obtenir les concentrations suivantes : 5, 10, 20, 40 et 80 µg/mL. Pour chaque dilution, un volume défini de solution d'acide gallique a été ajouté à un volume de méthanol de manière à obtenir un volume total constant. Ensuite, 0,5 mL de chaque solution standard a été mélangé à 2,5 mL de réactif de Folin-Ciocalteu (dilué 1 :10) puis à 2,0 mL de carbonate de sodium à 7,5 %. Après homogénéisation, les tubes ont été incubés à l'abri de la lumière pendant 90 minutes à température ambiante. L'absorbance a été mesurée à 760 nm à l'aide d'un spectrophotomètre, contre un blanc contenant du méthanol à la place de l'acide gallique. La courbe d'étalonnage obtenue a servi de référence pour le calcul des concentrations en polyphénols totaux dans les échantillons, exprimées en équivalents d'acide gallique (mg EAG/g Ext).

4.2. Principe

Le principe du dosage des polyphénols totaux selon la méthode de Folin-Ciocalteu repose sur une réaction d'oxydoréduction entre les composés phénoliques présents dans les extraits végétaux et un réactif composé d'acides phosphotungstique et phosphomolybdique. Lors de cette réaction, les polyphénols, en tant qu'agents réducteurs, transforment ces composés en oxydes bleus de molybdène et de tungstène, dont l'intensité de coloration bleue, mesurée spectrophotométriquement entre 725 et 765 nm (souvent autour de 735-760 nm), est proportionnelle à la concentration en polyphénols. Les résultats sont exprimés en équivalents d'acide gallique (EAG) à partir d'une courbe d'étalonnage standard. Cette méthode, simple, rapide et sensible, est surtout utilisée pour analyser des matrices complexes comme le pollen, though elle n'est pas entièrement spécifique aux polyphénols, pouvant aussi réagir avec d'autres substances réductrices (**Boizot et Charpentier, 2006**).

4.3. Mode opératoire

Les extraits aqueux et éthanoliques de pollen, ont été pesés à 10 mg et dissous dans 10 mL d'eau distillée ou de méthanol pur pour obtenir une solution mère à 1 mg/mL, homogénéisée par agitation sur plaque agitateur. Un volume de 0,5 mL et 1 mg/mL de chaque extrait, en réplicats, a été mélangé avec 2,5 mL de réactif de Folin-Ciocalteu (dilué au 1/10) et 2 mL de carbonate de sodium à 7,5 %, puis incubé à température ambiante, recouvert de papier aluminium à l'abri de la lumière, pendant 15 à 30 minutes.

Après incubation, l'absorbance des mélanges réactionnels a été mesurée à 760 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible, en utilisant le blanc correspondant comme référence. Les dosages ont été effectués en triplicat pour chaque type d'extrait afin d'assurer la reproductibilité des résultats. Les concentrations en polyphénols totaux ont été déterminées par interpolation sur une courbe d'étalonnage réalisée avec l'acide gallique comme standard. Les résultats ont été exprimés en milligrammes équivalents d'acide gallique par gramme d'extrait sec (mg EAG/g Ext).

Cette méthode est conforme aux protocoles validés pour les extraits de pollen, notamment dans l'étude de **Tomás-Barberán et al. (2001)**, où la méthode de Folin-Ciocalteu est appliquée à des extraits méthanoliques de pollen afin d'évaluer leur richesse en composés phénolique.

5. Dosage des flavonoïdes totaux

5.1. Préparation de la courbe d'étalonnage

Une solution mère de quercétine a été préparée à la concentration de 20 mg/mL dans du méthanol. Une série de dilutions successives a été réalisée par un facteur de 2,5 pour obtenir des concentrations adaptées à la gamme linéaire. Pour chaque dilution, 1 mL de solution de quercétine a été mélangé à 1 mL de trichlorure d'aluminium (AlCl_3 à 2 % dans le méthanol). Les tubes ont été homogénéisés, puis incubés à température ambiante pendant 15 minutes à l'abri de la lumière. L'absorbance a été mesurée à 430 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. Le blanc a été préparé dans les mêmes conditions en remplaçant la quercétine par du méthanol pur. Les résultats ont permis d'établir une courbe de calibration linéaire ($y = ax + b$) servant de base à l'estimation des flavonoïdes totaux dans les extraits.

5.2. Principe

Le dosage des flavonoïdes totaux repose sur la méthode colorimétrique au trichlorure d'aluminium (AlCl_3), largement adoptée pour quantifier les flavones et flavonols dans les extraits végétaux. Cette méthode est fondée sur la capacité des ions aluminium à former des complexes stables avec les groupes hydroxyles en position C-3 ou C-5 ainsi qu'avec la cétone en C-4 des cycles flavonoïdes. Cette réaction donne naissance à une coloration jaune dont l'intensité, mesurée par spectrophotométrie, est directement proportionnelle à la concentration des flavonoïdes présents dans l'échantillon. L'absorbance maximale du complexe formé se situe autour de 430 nm, ce qui permet une lecture simple et reproductible. Cette méthode, rapide et sensible, est couramment utilisée dans l'analyse des extraits de plantes, y compris les produits de la ruche comme le pollen, en raison de sa spécificité vis-à-vis des structures flavonoïdiques (**Chang et al., 2002**).

5.3. Mode opératoire

Pour le dosage, 1 mL de chaque extrait (1 mg/mL) a été transféré dans des tubes à essai, puis mélangé à 1 mL de solution de trichlorure d'aluminium (2 % dans le méthanol). Les tubes ont été incubés à température ambiante pendant 15 minutes dans l'obscurité pour permettre le développement de la coloration jaune. Les mesures d'absorbance ont été réalisées à 430 nm contre un blanc préparé en remplaçant l'extrait par le solvant approprié (eau distillée ou hydroéthanol). Toutes les analyses ont été effectuées en triplicat pour garantir la fiabilité des données.

Les concentrations de flavonoïdes totaux ont été calculées par interpolation sur la courbe d'étalonnage de la quercétine, et les résultats ont été exprimés en mg équivalent quercétine par gramme d'extrait sec (mg EQ/g Ext).

6. Évaluation de l'activité antioxydante par la méthode DPPH

6.1. Principe de la méthode

L'activité antioxydante des extraits aqueux et hydroéthanoliques de pollen a été évaluée *in vitro* par la méthode du piégeage du radical libre DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl). Ce radical stable possède un électron non apparié, délocalisé sur sa structure aromatique, ce qui lui confère une couleur violette intense et une absorbance maximale à 517 nm. Lorsqu'un antioxydant donne un atome d'hydrogène ou un électron au radical DPPH, celui-ci est réduit en une forme non radicalaire, entraînant une perte de couleur (**Figure 06**). La diminution d'absorbance est directement proportionnelle à la capacité de piégeage des radicaux libres de l'échantillon testé, ce qui permet une mesure quantitative par spectrophotométrie (**Sharma & Bhat, 2009**).

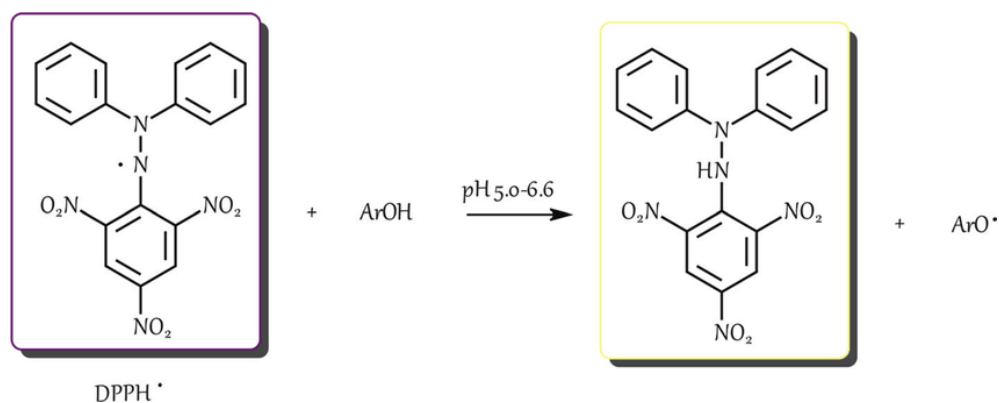


Figure 06 : Principe de la réduction de DPPH par un antioxydant (**Francenia Santos- Sánchez et al., 2019**).

6.2. Mode opératoire

La solution de DPPH a été préparée à une concentration de 4 mM, en dissolvant 4 mg de DPPH dans 100 mL de méthanol. Les extraits aqueux et hydroéthanoliques de pollen, ont été préparés à une concentration initiale de 200 µg/mL (0,2 mg/mL), puis dilués en série selon un facteur de dilution 1:2 pour obtenir sept concentrations décroissantes : 200, 100, 50, 25, 12,5, 6,25 et 3,125 µg/mL. Pour chaque concentration, 400 µL d'extrait ont été introduits dans des tubes à essai contenant 1600 µL de solution méthanolique de DPPH. Les tubes ont été vortexés et incubés à température ambiante, à l'obscurité, pendant 30 minutes. L'absorbance a ensuite été mesurée à 517 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible. Chaque test a été réalisé en triplicat pour assurer la reproductibilité. Un contrôle négatif a été préparé avec 400 µL de méthanol pur à la place de l'extrait (**Figure 07**). Un contrôle positif a également été réalisé en utilisant l'acide ascorbique comme antioxydant standard, avec des concentrations équivalentes à celles des extraits et selon le même protocole, afin de tracer une courbe de référence et comparer l'efficacité antioxydante.



Figure 07 : Aspect visuel de la réaction des extraits de pollen avec le DPPH pour l'évaluation de l'activité antioxydante.

6.3. Calcul et interprétation des résultats

L'activité antioxydante des extraits de pollen a été exprimée en pourcentage d'inhibition du radical DPPH (I%) en comparant l'absorbance de chaque extrait à celle du contrôle négatif. Le calcul a été réalisé selon la formule suivante :

$$I\% = [(Absorbance\ contrôle - Absorbance\ échantillon) / Absorbance\ contrôle] \times 100$$

Où :

- Absorbance contrôle est celle du mélange DPPH + méthanol (contrôle négatif),
- Absorbance échantillon est celle du mélange DPPH + extrait.

Les pourcentages d'inhibition ont été calculés pour chacune des sept concentrations testées, puis représentés graphiquement afin d'établir une courbe dose-réponse. À partir de cette courbe, la CI_{50} (concentration inhibitrice 50 %) a été déterminée par interpolation graphique. Cette valeur indique la concentration nécessaire pour piéger 50 % des radicaux libres DPPH, et permet de comparer l'efficacité antioxydante des extraits : plus la CI_{50} est faible, plus la capacité antioxydante est élevée. Les résultats obtenus ont été comparés à ceux de l'acide ascorbique, utilisé comme standard de référence (Aylanc et al., 2023).

7. Évaluation de l'activité antibactérienne

Cette section vise à caractériser et quantifier les propriétés antibactériennes des extraits aqueux et hydroéthanoliques de pollen contre des souches bactériennes de référence sélectionnées.

L'activité antimicrobienne sera déterminée par la méthode de diffusion en gélose (technique de Kirby-Bauer). Cette méthode permet de mesurer les zones d'inhibition de croissance bactérienne et de déterminer les concentrations minimales inhibitrices (CMI) des extraits testés (Balouiri et al., 2016).

7.1. Origine des bactéries et conservation des souches

Les souches bactériennes utilisées dans cette étude ont été fournies par le laboratoire de microbiologie de l'Université des Frères Mentouri de Constantine. Pour l'évaluation de l'activité antibactérienne, quatre souches bactériennes pathogènes de référence provenant de l'ATCC (American Type Culture Collection) ont été sélectionnées, représentant à la fois des bactéries Gram-positives et Gram-négatives (Tableau 08). Ce choix permet d'évaluer le spectre d'activité antimicrobienne des extraits polliniques sur différents types de parois bactériennes.

Tableau 08 : Souches bactériennes utilisées pour l'évaluation de l'activité antibactérienne.

Bactéries	Classification	Références ATCC
<i>Escherichia coli</i>	Gram⁻	ATCC 25922
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		ATCC 27853
<i>Bacillus subtilis</i>	Gram⁺	ATCC 6633
<i>Staphylococcus aureus</i>		ATCC 25923

7.2. Conservation des bactéries

La conservation des souches bactériennes pures a été réalisée dans de petites boîtes de Pétri de contact, stockées et conservées dans un réfrigérateur à une température de 4°C, permettant leur maintien à l'état viable pour les tests ultérieurs d'activité antimicrobienne.

7.3. Stérilisation du matériel

L'ensemble du matériel utilisé (tubes Eppendorf, flacons en verre, pipettes graduées, tubes à vis, embouts et disques de papier) a été préalablement enveloppé dans du papier aluminium puis stérilisé à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes (**Figure 08**).

**Figure 08** : Stérilisation du matériel par autoclave.

7.4. Préparation des milieux de culture

✓ Eau physiologique stérile

L'eau physiologique à 0,9% a été préparée par dissolution de 9 g de NaCl dans 1000 ml d'eau distillée. Après dissolution complète du sel, la solution a été répartie aseptiquement à raison de 9 ml par tube à vis stérile, puis l'ensemble a été stérilisé à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes. Les tubes ont été conservés à température ambiante jusqu'à utilisation (**Figure 09**).



Figure 09 : Préparation de l'eau physiologique à 0,9%.

✓ Gélose nutritive

La gélose nutritive a été préparée selon les recommandations du fabricant en suspendant 28 g de poudre déshydratée dans 1000 ml d'eau distillée. Le mélange a été chauffé progressivement tout en agitant continuellement jusqu'à dissolution complète de la poudre, en évitant la formation de grumeaux. Une fois la gélose complètement dissoute et homogène, elle a été répartie dans des flacons en verre propres et secs, puis fermés hermétiquement. La stérilisation a été effectuée à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes. Après refroidissement, les flacons ont été conservés à température ambiante pour utilisation ultérieure.

✓ Bouillon nutritif

Le bouillon nutritif a été préparé en dissolvant 4 g de poudre déshydratée dans 500 ml d'eau distillée (correspondant à 8 g pour 1000 ml selon les recommandations du fabricant). La dissolution a été facilitée par agitation jusqu'à obtention d'une solution homogène et limpide. Le bouillon préparé a été réparti aseptiquement dans des tubes à vis stériles à raison de 9 ml par tube, puis l'ensemble a été stérilisé à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes. Les tubes de bouillon stérilisé ont été conservés à température ambiante jusqu'à leur utilisation pour la réactivation des souches bactériennes.



Figure 10 : Préparation des milieux de culture : bouillon nutritif et gélose nutritive.

✓ Gélose Mueller-Hinton

La gélose Mueller-Hinton a été préparée en suspendant 38 g de poudre déshydratée dans 1000 ml d'eau distillée. Le mélange a été chauffé et agité vigoureusement jusqu'à dissolution complète du solide, en veillant à éviter la formation de grumeaux. Une fois la gélose parfaitement dissoute, elle a été répartie dans des flacons en verre stériles et fermés hermétiquement. La stérilisation a été réalisée à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes (**Figure 11**). Après stérilisation et léger refroidissement, la gélose a été coulée dans des boîtes de Pétri stériles, puis laissée solidifier à température ambiante jusqu'à leur utilisation pour l'activité antibactérienne.



Figure 11 : Préparation de la gélose Muller Hinton (MH).

7.5. Préparation des dilutions d'extraits

Les solutions mères des extraits aqueux et hydroéthanolique de pollen ont été préparées à une concentration de 200 mg/ml, puis diluées en facteur deux successivement dans le DMSO jusqu'à obtenir la concentration finale de 25 mg/ml (**Figure 12**). La gentamicine a été utilisée comme témoin positif et le DMSO comme témoin négatif.

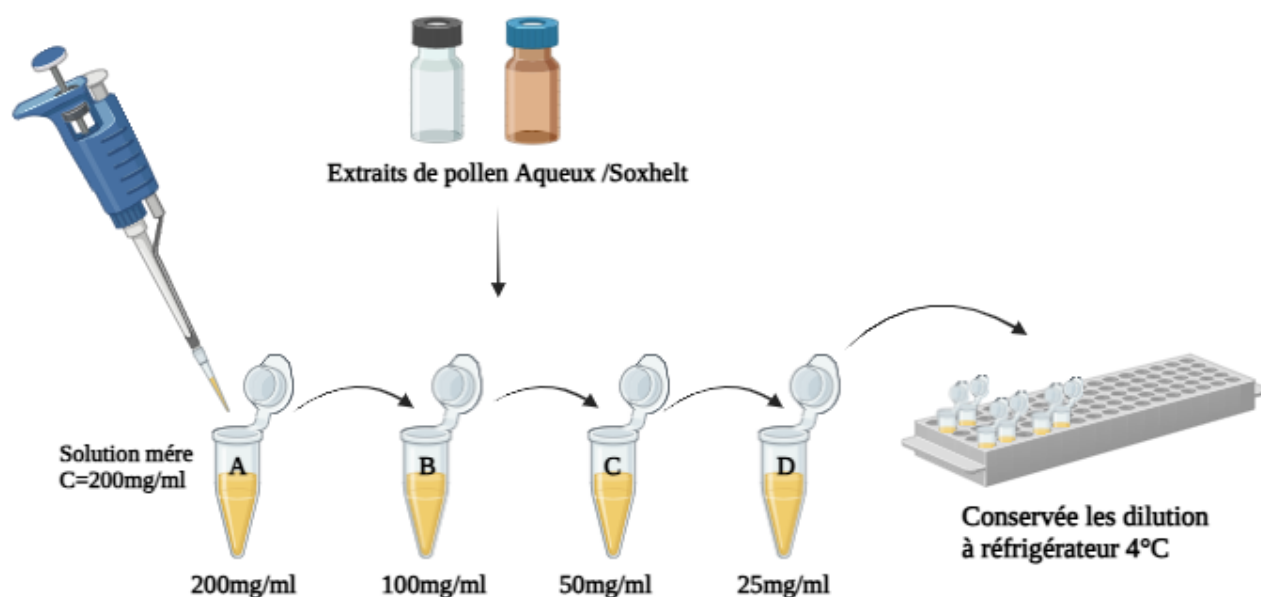


Figure 12 : Méthode de préparation des dilutions décimales des extraits de pollen.

7.6. Repiquage et réactivation des souches bactériennes

Les souches bactériennes conservées ont été repiquées sur gélose nutritive fraîche afin de vérifier leur viabilité et d'obtenir des cultures pures. Pour la réactivation, une colonie isolée de chaque souche a été prélevée et inoculée dans du bouillon nutritif stérile (**Figure 13**). Les cultures en bouillon et en boîtes ont été incubées à 37°C pendant 18 à 24 heures pour avoir des cultures jeunes et favoriser la croissance bactérienne et réactiver le métabolisme cellulaire



Figure 13 : Repiquage et réactivation des souches bactériennes.

7.7. Préparation de l'inoculum bactérien

À partir des cultures réactivées en bouillon nutritif, les souches bactériennes ont été ensemencées sur gélose nutritive dans des boîtes de Pétri et incubées à 37°C pendant 24 heures pour obtenir des cultures jeunes. Des colonies bien isolées ont été prélevées à l'aide d'une anse de platine stérile et mises en suspension dans 9 ml d'eau physiologique stérile. La suspension pour chaque bactérie a été ajustée pour obtenir une densité optique de 0,08 à 0,10 à 625 nm, correspondant à environ 10^8 UFC/ml.

7.8. Test d'activité antibactérienne

L'inoculum bactérien de chaque souche a été ensemencé uniformément à la surface de la gélose Mueller-Hinton à l'aide d'un écouvillon stérile par étalement en stries serrées dans trois directions différentes pour assurer une répartition homogène. Des disques de papier Whatman stériles de 6 mm de diamètre ont été déposés délicatement sur la surface de la gélose à l'aide d'une pince stérile et imbibé dans l'éthanol, en respectant une distance suffisante entre chaque disque.

Chaque extrait (aqueux et hydroéthanolique) de pollen a été testé individuellement puis en combinaison avec les huiles essentielles de myrte et de lavande. Un volume de 10 µl de chaque solution d'extrait a été déposé précisément au centre de chaque disque à l'aide d'une micropipette en embouts stérilisées. Les témoins positifs (Gentamicine) et négatifs (DMSO) ont été appliqués selon le même protocole (**Figure 14**). Chaque test a été réalisé en triplicata avec trois répétitions indépendantes pour assurer la reproductibilité des résultats. Après une période de diffusion de 20 minutes à température ambiante permettant l'imprégnation des extraits dans le papier et leur diffusion initiale dans la gélose, les boîtes de Pétri ont été retournées et incubées à 37°C pendant 24 heures.

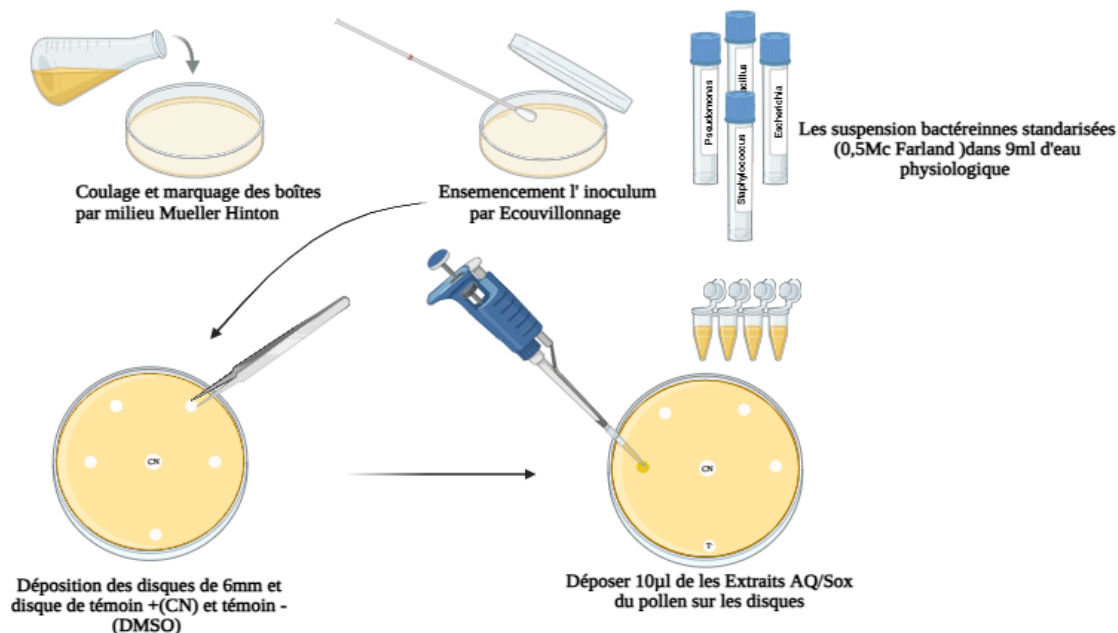


Figure 14 : Protocole de l'évaluation de l'activité antibactérienne d'extraits de pollen.

7.9. Lecture des résultats

Après la période d'incubation, l'activité antibactérienne a été évaluée par la mesure des zones d'inhibition de la croissance bactérienne autour de chaque disque. Les diamètres des halos d'inhibition ont été mesurés avec précision à l'aide d'un pied à coulisse, en prenant la moyenne de deux mesures perpendiculaires pour chaque zone (**Figure 15**). Les résultats ont été exprimés en millimètres (mm) et comparés entre les différents extraits testés, leurs combinaisons avec les huiles essentielles, ainsi qu'avec les témoins positifs et négatifs.

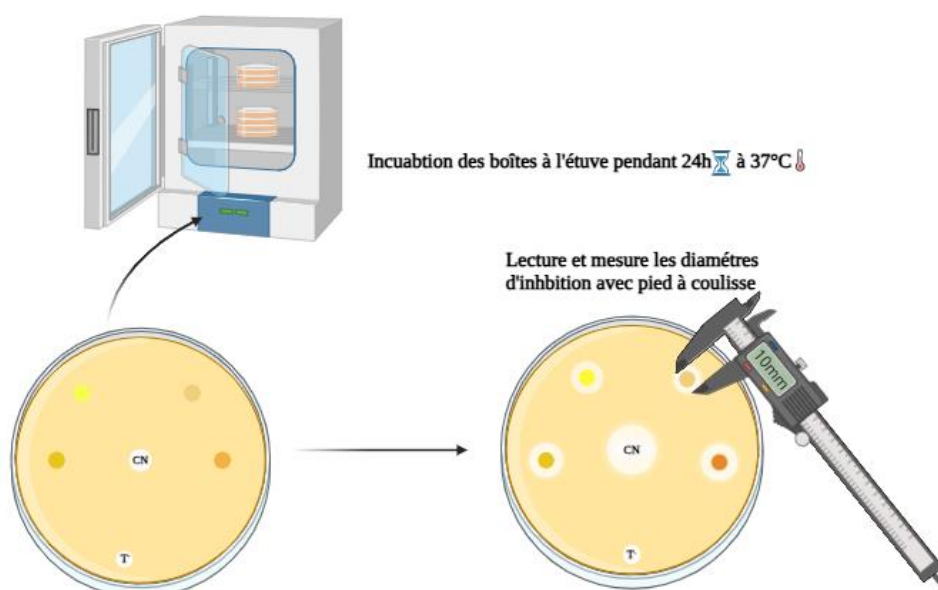


Figure 15 : Méthode de lecture et mesure les zones d'inhibition.

8. Échantillonnage du lait

Dans le cadre de cette étude, des échantillons de lait cru ont été prélevés au niveau de la ferme Boujouada située dans la commune de Tassadane Haddada, dans la région de Mila (Nord-Est algérien). Le site se situe à une altitude de 505 mètres, avec des coordonnées géographiques de la ferme sont $36,51535^{\circ}$ de latitude Nord et $5,78770^{\circ}$ de longitude Est. Ce positionnement géographique permet d'obtenir des données météorologiques et environnementales précises afin d'évaluer l'impact de l'environnement local sur la qualité du lait produit dans cette zone. La figure suivante présente l'image satellite du secteur de prélèvement (**Figure16**).



Figure 16 : Site de prélèvement du lait : ferme Boujouada -commune de Tassadane Haddada-Mila.

8.1. Prélèvement du lait

Avant chaque session de traite, les trayons de la vache ont été soigneusement lavés à l'eau tiède puis désinfectés à l'aide d'une solution antiseptique douce afin de minimiser le risque de contamination bactérienne. Les premiers jets de lait, susceptibles de contenir des impuretés, ont été écartés. Ensuite, un total de 1 litre de lait cru a été collecté de manière homogène à partir des quatre quartiers de la mamelle (**Figure 17**). Le lait recueilli a immédiatement été placé dans des flacons stériles, puis transporté sous chaîne de froid, dans une glacière à température contrôlée (environ 4°C), jusqu'au laboratoire pour les analyses microbiologiques et physico-chimiques.



Figure 17 : Photographie de la vache d'étude.

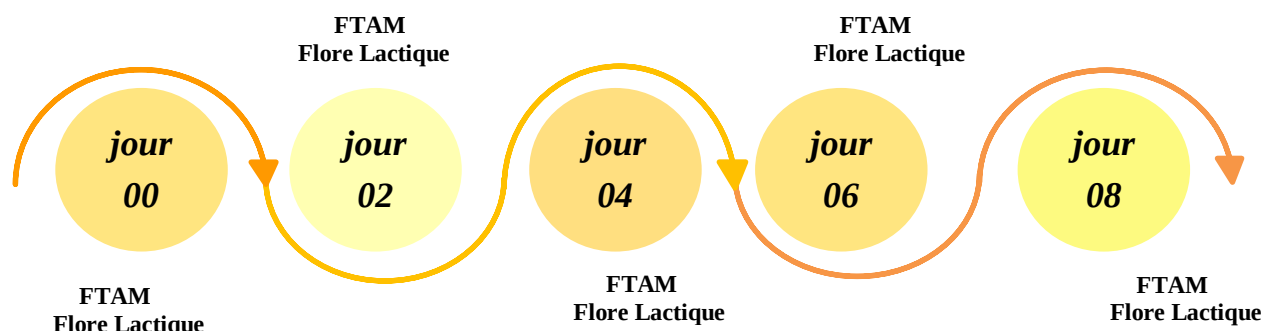
8.2. Caractéristiques de la vache d'étude

Les principales caractéristiques de la vache laitière utilisée dans cette expérience sont présentées dans le tableau ci-dessous :

Tableau 09 : Fiche technique de la vache de prélèvement.

<i>Race</i>	Montbéliarde
<i>Robe</i>	Pie Rouge
<i>Age</i>	2 ans et demi
<i>Santé</i>	Suivie mensuellement par un vétérinaire Vaccination à jour
<i>Traite</i>	Deux traites quotidiennes (matin et soir)
<i>Production Laitière</i>	Environ 12,5 Litre par jour
<i>Alimentation de vache</i>	Régime mixte : foin sec, herbe pâturée, eau fraîche disponible en continu, complément alimentaire.

9. Étude de la croissance microbienne



FTAM : Flore mésophile aérobie totale
Mesures prises à J0, J2, J4, J6, J8.

Figure 18 : Suivi de la croissance microbienne (FTAM et flore lactique) dans le lait enrichi en extraits de pollen.

Le 20 avril 2025, une étude expérimentale a été mise en place afin d'évaluer l'impact de l'ajout d'extrait aqueux de pollen sur la croissance microbienne de la flore totale aérobie mésophile (FTAM) ainsi que de flores lactique dans du lait cru de vache. Des concentrations variables d'extrait ont été utilisées dans le but de déterminer leur efficacité potentielle en tant qu'agents antimicrobiens naturels. Les échantillons de lait, préparés avec ou sans addition d'extraits, ont été conservés à une température contrôlée de 4 °C pendant une durée de 8 jours. Des prélèvements ont été réalisés à intervalles réguliers (0, 2, 4, 6 et 8 jours) pour suivre l'évolution de la charge bactérienne (**Figure 18**).

Cette étude vise à explorer le potentiel des extraits aqueux de pollen, issus de produits apicoles naturels, comme agents antimicrobiens dans la conservation du lait cru, dans l'objectif de réduire l'utilisation de conservateurs chimiques et de valoriser des alternatives d'origine biologique.

9.1. Stérilisation d'extrait aqueux de pollen par filtration

Avant leur incorporation dans le lait, l'extrait aqueux de pollen fraîchement préparés ont subi un processus de filtration stérile. Après une première filtration sous vide, l'extrait a été passé à travers des filtres de seringue stériles (porosité de 0,22 µm), permettant l'élimination de toute charge microbienne sans altérer la composition bioactive des extraits. Cette étape cruciale vise à garantir que l'effet antimicrobien observé est exclusivement attribuable aux composés bioactifs du pollen, et non à une contamination résiduelle.

9.2. Ajout d'extrait aqueux de pollen au lait cru

La préparation des échantillons destinés à l'analyse microbiologique a été réalisée à l'aide de flacons en verre stérilisés au préalable par autoclavage. Après agitation homogène du lait cru, des volumes de 90 ml et 95 ml ont été prélevés à l'aide d'une éprouvette graduée stérile, puis transférés dans des flacons contenant respectivement 10 ml et 5 ml d'extrait aqueux de pollen filtré et stérile (**Figure 19**). Ces mélanges ont permis d'obtenir des concentrations finales de 10 % et 5 % (v/v) d'extrait dans le lait. Un flacon témoin, constitué uniquement de 100 ml de lait cru sans ajout, a été préparé dans les mêmes conditions. Afin de garantir la stérilité tout au long de la procédure, les cols des flacons ont été brièvement passés à la flamme d'un bec Bunsen avant et après l'ajout de lait, puis chaque flacon a été hermétiquement refermé et étiqueté de façon précise pour assurer un suivi rigoureux.

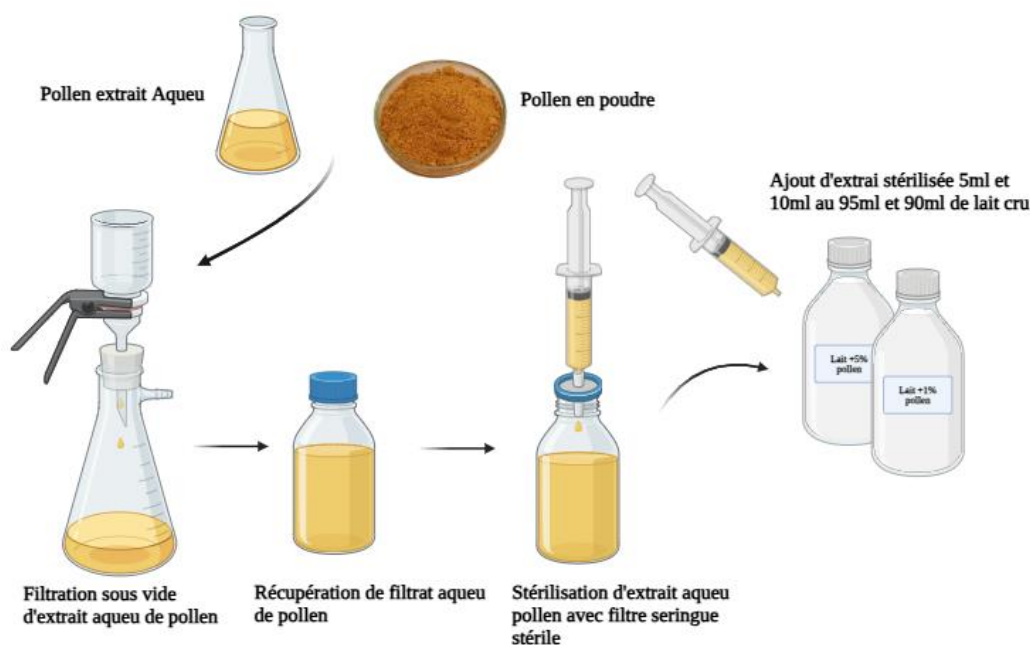


Figure 19 : Stérilisation et ajout de l'extrait aqueux de pollen au lait cru.

9.3. Préparation des dilutions décimales

Pour l'analyse microbiologique, des dilutions décimales ont été préparées à partir des échantillons de lait enrichi. La procédure a consisté à prélever 1 mL d'échantillon, à le diluer dans 9 mL de solution saline stérile (0,85 % NaCl), puis à effectuer des dilutions successives jusqu'à obtenir des concentrations allant de 10^{-1} à 10^{-5} (**Figure 20**). Toutes les manipulations ont été réalisées dans la zone stérile de bec bunsen afin de garantir des conditions d'asepsie rigoureuses (Ryu et al., 2021).

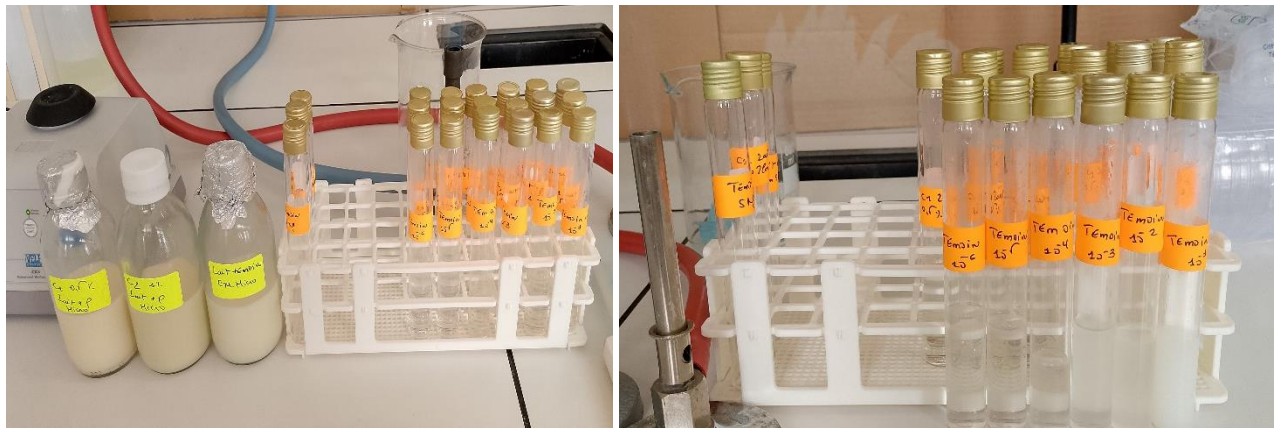


Figure 20 : Préparation des séries de dilutions des échantillons de lait.

✓ Mode opératoire

Pour initier la préparation des dilutions décimales, 1 mL de lait enrichi est transféré dans un tube à vis stérile contenant 9 mL de solution physiologique stérile (NaCl 0,85 %), constituant ainsi la première dilution au facteur 10^{-1} . Le mélange est homogénéisé à l'aide d'un vortex pendant quelques secondes. À partir de cette solution, des dilutions successives sont réalisées en transférant 1 mL de la dilution précédente dans 9 mL de solution saline fraîchement préparée, jusqu'à l'obtention de la dilution finale souhaitée à 10^{-5} (**Figure 21**).

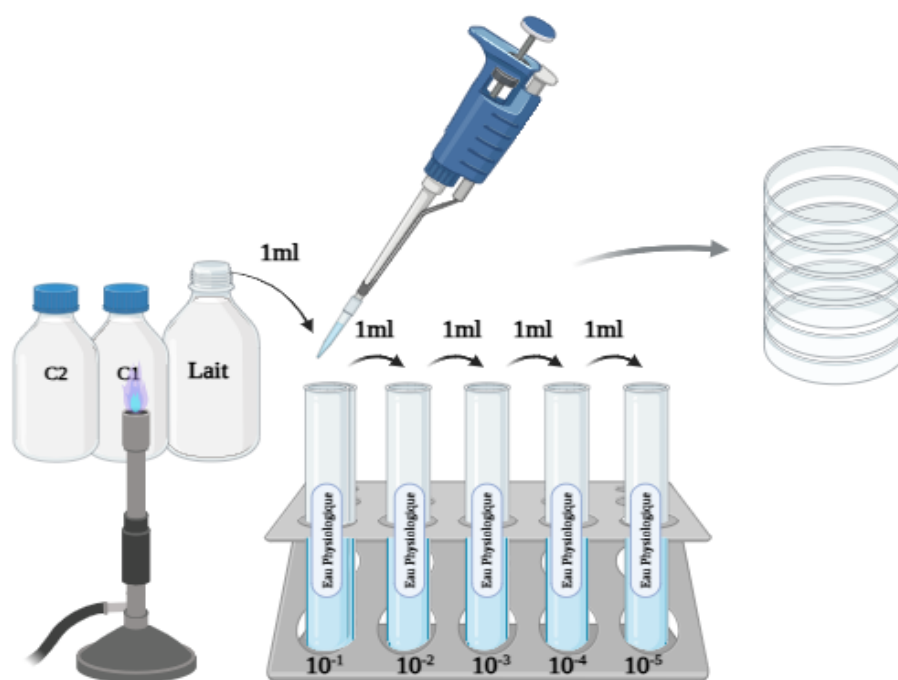


Figure 21 : Méthode de la préparation des dilution décimales.

9.4. Préparation des milieux de cultures

✓ Milieu MRS

Le milieu MRS (Man, Rogosa et Sharpe) a été préparé en suspendant 55,5 g de poudre déshydratée dans 1000 ml d'eau distillée. Le mélange a été chauffé progressivement tout en agitant continuellement jusqu'à dissolution complète de la poudre, en veillant à éviter la formation de grumeaux. Une fois le milieu complètement dissous et homogène, il a été réparti dans des flacons en verre propres et secs, puis fermés hermétiquement. La stérilisation a été effectuée à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes. Après refroidissement, le milieu a été stocké à température ambiante jusqu'à utilisation ultérieure dans le dénombrement de la flore lactique.

✓ Milieu PCA (Plate Count Agar)

Le milieu PCA a été préparé selon les recommandations du fabricant en suspendant 22,5 g de poudre déshydratée dans 1000 ml d'eau distillée. Le mélange a été chauffé et agité vigoureusement jusqu'à dissolution complète du solide, en évitant la formation d'agréats. Une fois la gélose parfaitement dissoute et le mélange homogène, elle a été répartie dans des flacons en verre stériles et fermés hermétiquement. La stérilisation a été réalisée à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes. Après stérilisation et léger refroidissement, la gélose a été conservée à température ambiante avant d'être utilisée dans le dénombrement de la FTAM.

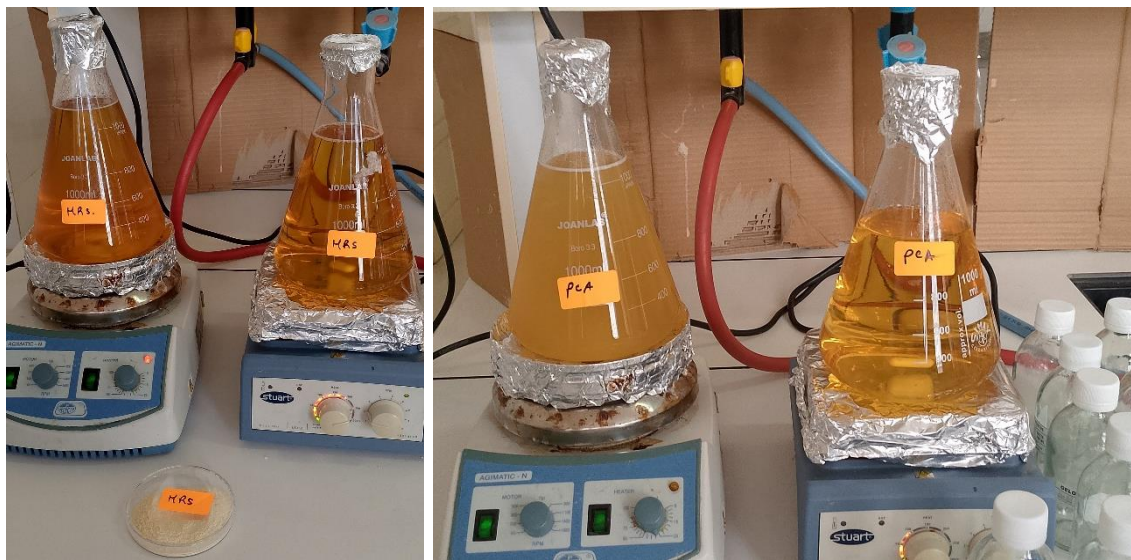


Figure 22 : Préparation des milieux de culture PCA et MRS.

9.5. Dénombrement de la flore totale aérobie mésophile (FTAM)

Le dénombrement de la flore totale aérobie mésophile (FTAM) constitue une méthode standard pour évaluer la charge microbienne globale du lait cru, révélatrice de sa qualité hygiénique. Il repose sur la mise en culture des micro-organismes aérobies mésophiles capables de croître à 30 °C sur gélose nutritive, après ensemencement en profondeur. Cette méthode est normalisée selon la norme (ISO 4833-1:2013), largement utilisée pour le contrôle microbiologique des denrées alimentaires.

✓ Mode opératoire

Un millilitre de lait cru est prélevé aseptiquement et introduit dans 9 ml de solution physiologique stérile pour réaliser une première dilution décimale (10^{-1}). À partir de cette dilution, une série de dilutions successives jusqu'à 10^{-5} est préparée dans les mêmes conditions, en respectant une agitation douce entre chaque étape. Pour chaque dilution préparée, 0,1 ml est transféré dans une boîte de Pétri stérile, puis 15 à 20 ml de gélose PCA (Plate Count Agar) fondue et refroidie à environ 45 °C y sont ajoutés. Le mélange est homogénéisé doucement par rotation circulaire pour assurer une répartition uniforme des micro-organismes. Après solidification complète à température ambiante, les boîtes sont incubées en position inversée dans une étuve réglée à 37 °C pendant 48 heures (**Figure 23**).

9.6. Lecture des résultats et détermination du nombre UFC/ml

À l'issue de l'incubation, seules les boîtes contenant entre 15 et 300 colonies sont retenues pour le dénombrement.

- Lorsque les résultats proviennent d'une seule boîte exploitable, le nombre d'UFC/ml est calculé à l'aide de la formule :

Cn = (nombre d'UFC comptées / volume d'inoculum déposé) × facteur de dilution.

- En cas de deux boîtes exploitables à une même dilution, la formule appliquée est :

Cn = (somme des UFC comptées / 1,1 × volume d'inoculum déposé) × facteur de dilution le plus faible (**Fereja et al.,2023**).

9.7. Dénombrement de la flore lactique totale

Le dénombrement de la flore lactique dans le lait cru permet de quantifier les bactéries bénéfiques responsables de la fermentation lactique, notamment les lactobacilles, lactocoques et entérocoques. Ces micro-organismes sont cultivés sur le milieu MRS (de Man, Rogosa et Sharpe), un substrat sélectif favorisant leur croissance, après ensemencement en masse et incubation à 37 °C pendant 48 heures. Cette méthode est reconnue pour son efficacité dans l'évaluation de la flore lactique dans les produits laitiers (**Cheriguene et al., 2007**).

9.8. Mode opératoire

Une dilution initiale est obtenue en transférant 1 ml de l'échantillon de lait dans 9 ml de solution physiologique stérile, constituant la dilution 10^{-1} . À partir de cette solution, deux autres dilutions successives sont réalisées pour atteindre 10^{-2} et 10^{-3} . À partir de chacune des dilutions, un volume de 0,1 ml est prélevé et introduit au centre d'une boîte de Pétri stérile. Ensuite, 15 à 20 ml de gélose MRS, préalablement fondue et maintenue à 45 °C, sont versés dans chaque boîte. Le contenu est homogénéisé doucement à l'aide de mouvements circulaires pour bien répartir les bactéries dans tout le milieu. Les boîtes sont ensuite laissées à température ambiante pour permettre la solidification de la gélose, puis incubées à 37 °C pendant 48 heures dans une étuve, en position inversée.

9.9. Lecture des résultats

Après incubation, les colonies typiques des bactéries lactiques ont été comptées, et les résultats exprimés en UFC/mL, à partir des dilutions dont le nombre de colonies se situait dans l'intervalle de fiabilité (30 à 300).

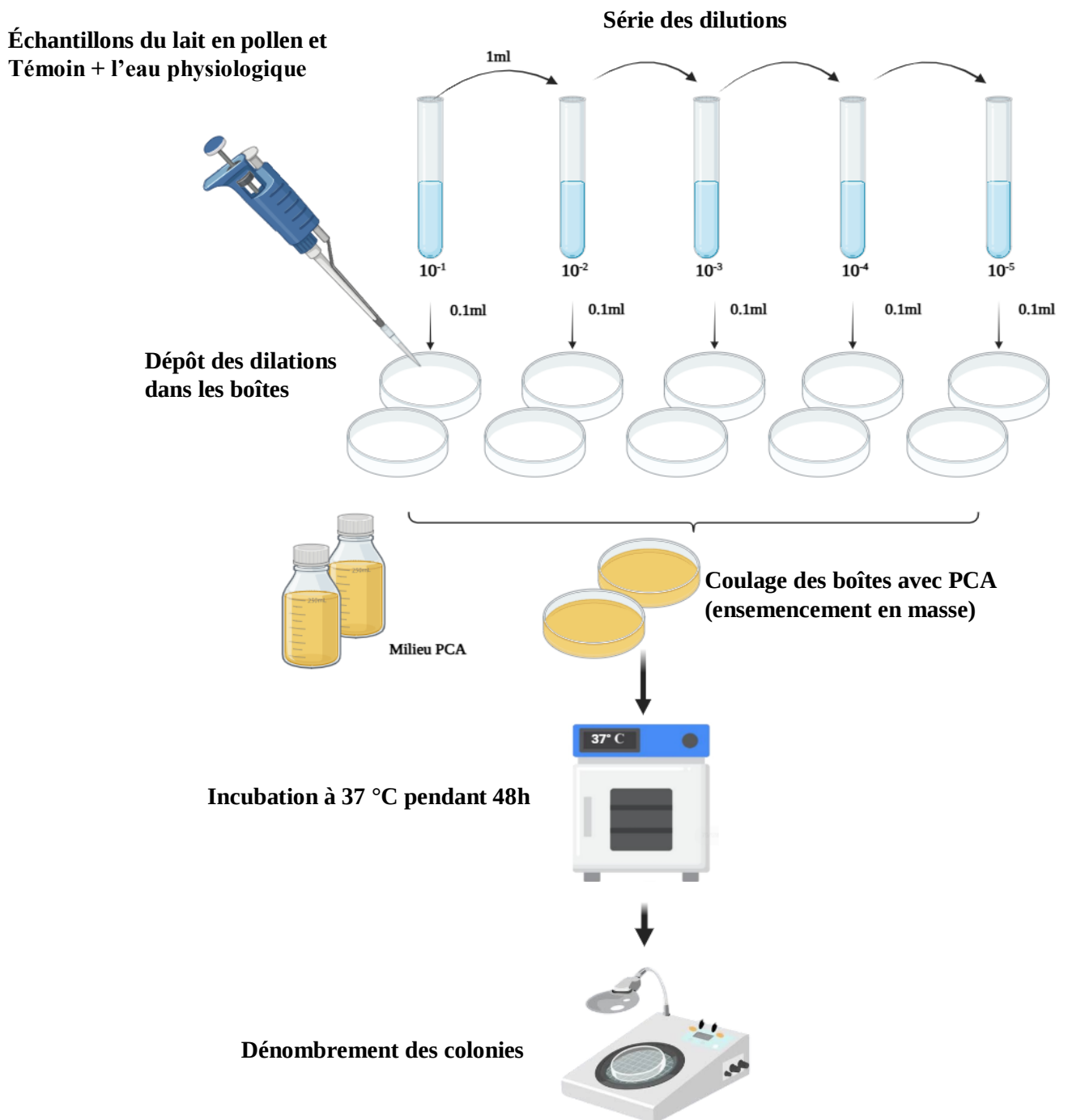


Figure 23 : Protocole et étapes de le suivie de la croissance de la flore mésophile aérobie totale.

10. Analyse biomathématique

L'analyse biomathématique, issue de la microbiologie prédictive, permet de modéliser la croissance microbienne dans les aliments afin de mieux comprendre leur évolution au cours du temps. Dans cette étude, un modèle primaire a été utilisé pour évaluer la dynamique de la flore totale mésophile dans le lait supplémenté en extrait de pollen : le modèle de Baranyi et Roberts (**Baranyi et Roberts, 1995**).

Le modèle de Baranyi et Roberts a été appliqué à partir des données de la base Combase, préalablement converties en échelle logarithmique ($\log_{10}$) à l'aide d'Excel. Les paramètres microbiens estimés incluaient la concentration initiale, la phase de latence, la vitesse de croissance maximale ($\mu_{\max}$) et la population maximale. La qualité de l'ajustement a été vérifiée à l'aide du coefficient de détermination (R^2) et de l'écart-type de l'ajustement (SE of Fit), avec une visualisation graphique réalisée sous GraphPad Prism 9.0.

11. Analyse des paramètres physique du lait

11.1. Contrôle du pH

Le pH est une mesure de l'activité des ions hydrogène (H^+) présents dans une solution et constitue un indicateur fondamental de l'acidité du lait. Un lait est généralement considéré comme frais lorsque son pH se situe entre 6,6 et 6,8, plage dans laquelle il présente un bon état de conservation et une stabilité microbiologique satisfaisante (**Sboui et al., 2010**). Dans le cadre de cette étude, le pH des échantillons a été mesuré à l'aide d'un pH-mètre électronique étalonné, à intervalles réguliers de 48 heures, afin de suivre l'évolution de l'acidité au cours du temps de stockage.

Un volume de 10 ml d'échantillon a été prélevé à l'aide d'une pipette stérile et transféré dans un bécher propre. Le pH a été mesuré à température ambiante à l'aide d'un pH-mètre électronique. Avant chaque série de mesures, l'appareil a été soigneusement rincé et calibré à l'eau distillée afin de garantir la fiabilité des lectures, conformément aux bonnes pratiques de laboratoire. La sonde a été immergée dans chaque échantillon en assurant un bon contact sans formation de bulles, puis maintenue jusqu'à stabilisation de la valeur mesurée. Entre chaque mesure, la sonde a été rincée avec de l'eau distillée pour éviter les erreurs de mesure liées aux résidus d'échantillons précédents. Trois mesures ont été réalisées pour chaque échantillon, et la moyenne a été calculée afin d'obtenir une valeur représentative et reproductible du pH (**Figure 24**).



Figure 24 : Suivre et mesure du PH du lait réfrigéré à 4°Cet supplémenté avec l'extraits de pollen pendant 8jour de stockage.

11.2. Contrôle de l'acidité titrable

L'évaluation de l'acidité du lait repose sur un titrage acido-basique nécessitant la préparation de réactifs adaptés. La solution titrante est obtenue en dissolvant précisément 4,445 g de pastilles d'hydroxyde de sodium (NaOH N/9) dans 1 litre d'eau distillée, sous agitation modérée pour assurer une dissolution homogène. La solution indicatrice est préparée en dissolvant 0,1 g de phénolphthaléine pure dans 9,5 mL d'éthanol à 95 %, puis complétée avec de l'eau distillée jusqu'à 10 mL. Pour chaque analyse, 10 mL de lait témoin où supplémenté sont placés dans un bécher, puis trois à quatre gouttes de phénolphthaléine sont ajoutées. La solution de NaOH N/9 est alors versée goutte à goutte sous agitation constante jusqu'à l'apparition d'une coloration rosée stable pour le lait témoin, ou d'une teinte jaune clair à foncée pour les échantillons supplémentés, selon la concentration de pollen ajoutée. Ce protocole est répété à intervalles réguliers pour chaque prélèvement (**Figure 25**).

Enfin, l'acidité est exprimée en degrés Dornic (°D), où 1 °D correspond à 0,1 g d'acide lactique par litre de lait, et elle est calculée selon la formule :

$$A = V \times 10$$

Où A représenté l'acidité en °D et V le volume en mL de solution de NaOH N/9 utilisé pour atteindre le point de virage (**Fabro et al., 2006**).

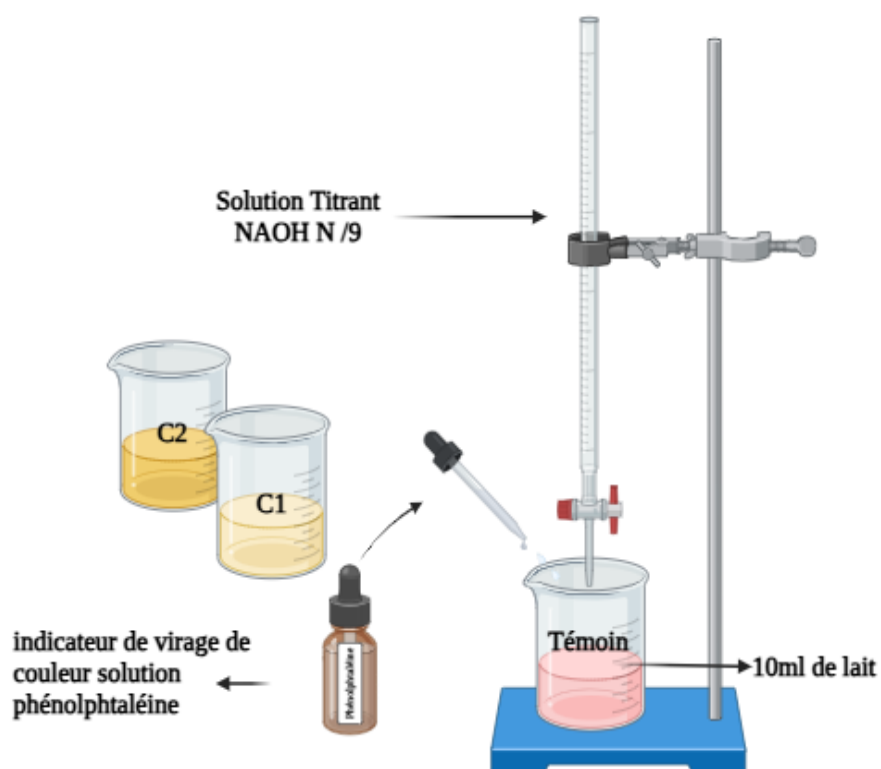


Figure 25 : Montage de la titration et mesure d'acidité de lait.

Chapitre IV

Résultats et Discussion

Résultats et discussion

1. Rendement et aspects des extraits

L'évaluation du rendement d'extraction a été réalisée à partir de 82,65 g de pollen brut. Deux types d'extraits ont été obtenus : un extrait aqueux préparé par macération simple, et un extrait hydroéthanolique obtenu par extraction Soxhlet avec de l'éthanol absolu. Les rendements obtenus ont été respectivement de 18,91 % pour l'extrait aqueux et 5,59 % pour l'extrait hydroéthanolique.

L'extrait aqueux se présente sous forme de poudre jaune clair, non visqueuse, avec une odeur florale intense et un goût rappelant le miel sans en avoir la douceur. Quant à l'extrait hydroéthanolique, il est de texture cireuse, de couleur jaune foncé à brun, et évoque visuellement et olfactivement la cire d'abeille, ce qui reflète probablement une richesse en composés lipidiques et hydrophobes.

Dans la littérature, plusieurs études confirment la variabilité des rendements selon les solvants et la méthode d'extraction. **Lawang et al. (2021)** ont observé des rendements significatifs avec des extraits aqueux de pollen d'abeille, soulignant l'efficacité de l'eau pour solubiliser les composés phénoliques et glucidiques. De même, **Oroian et al. (2020)** ont rapporté un rendement de 21,8 % pour une extraction à l'eau et au méthanol (80 %) assistée par ultrasons, résultat proche de notre rendement aqueux. Concernant l'extraction au méthanol, **Avci et al. (2023)** ont obtenu un rendement de 25,4 % à partir de pollen de *Typha domingensis*, tandis que **Izol et al. (2021)** rapportent un rendement plus modeste de 13 % pour une extraction hydroéthanolique classique de pollen de Bingöl (Turquie).

En comparaison, notre rendement aqueux est compétitif, malgré l'utilisation d'une masse réduite de 62,5 g de pollen, contre les 82,65 g utilisés pour le Soxhlet éthanolique. Cette différence pourrait s'expliquer par la plus grande affinité de l'eau pour les composés hydrosolubles comme les flavonoïdes, tanins et polysaccharides, alors que les solvants organiques comme le méthanol extraient principalement des substances moins polaires (lipides, pigments, cires). Une étude menée par **Dai et al. (2010)** confirme que le choix du solvant influence directement la polarité des composés extraits, ce qui corrobore les caractéristiques sensorielles distinctes des deux extraits.

2.1. Teneur en composés polyphénoliques totaux

Le dosage spectrophotométrique a permis de quantifier les composés phénoliques totaux (CPT) dans les extraits aqueux et hydroéthanoliques de pollen (**Figure 26 ; Tableau 10**). Les résultats sont exprimés en mg d'équivalent acide gallique par gramme d'extrait (mg EAG/g Extrait), à partir de la courbe d'étalonnage obtenue avec l'acide gallique comme standard (**Figure 27**). La teneur a été calculée selon l'équation de régression suivante : ($y = 0,0087x + 0,0219$) avec un coefficient $R^2 = 0,9934$.

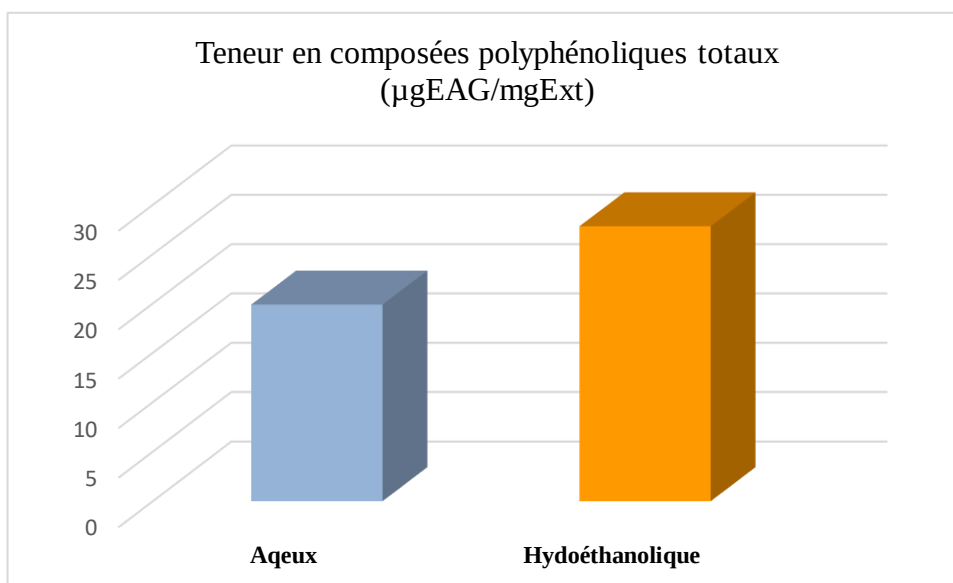


Figure 26 : Teneur en composés phénoliques totaux dans les extraits de pollen.

Tableau 10 : Quantification des CPT dans les extraits de pollen.

Extrait de pollen	Teneurs en CPT (µg Eq AG/ mg d'extrait)
Aqueux	19,89 ± 0,39
Hydroéthanolique	27,83 ± 0,47

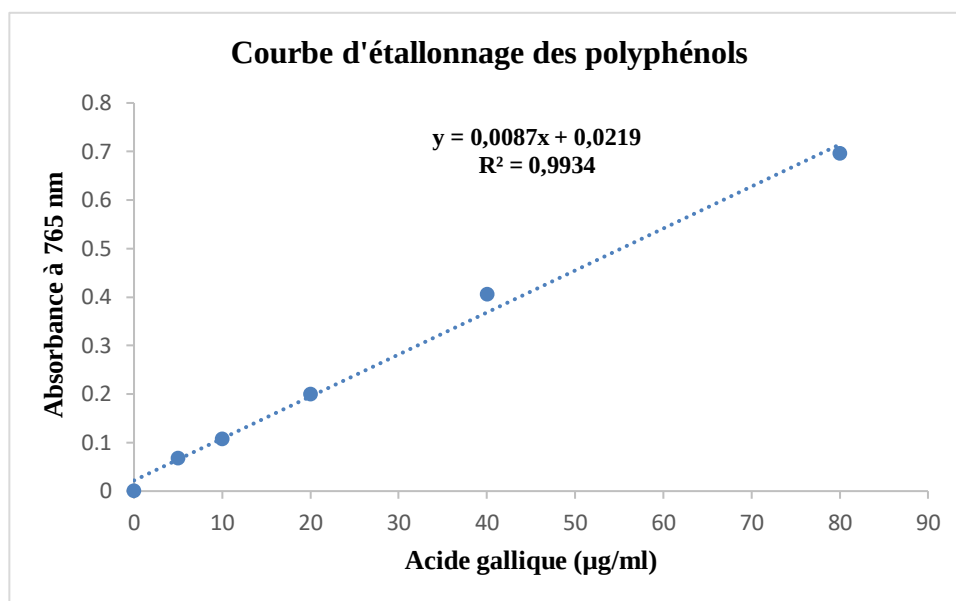


Figure 27 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.

Les résultats obtenus montrent une variation notable des teneurs en CPT selon le type d'extrait utilisé. Pour l'extrait aqueux, la teneur est de $19,89 \pm 0,39$ mg Eq AG/g. Cette valeur reste dans l'intervalle rapporté par **Végh et al. (2023)**, qui ont trouvé des concentrations comprises entre 9,41 et 27,49 mg Eq AG/g pour des extraits aqueux de pollen multifloral récolté en Hongrie. D'autres travaux, comme celui de **Sawicki et al. (2022)**, confirment également des teneurs similaires dans des extraits de produits de la ruche. De plus, **Hemmami et al. (2020)** ont observé des teneurs plus faibles allant de 3,80 à 9,16 mg Eq AG/g pour des extraits méthanoliques de pollen algérien, ce qui souligne l'efficacité de l'eau comme solvant dans certaines conditions.

En ce qui concerne l'extrait hydroéthanolique, la valeur mesurée est de $27,83 \pm 0,47$ mg Eq AG/g. Elle est plus élevée que celle de l'extrait aqueux, ce qui montre que le solvant éthanol améliore le pouvoir d'extraction des polyphénols. **Djelloul (2025)** a rapporté une teneur moyenne de 26,23 mg Eq AG/g pour des extraits hydroéthanoliques de pollen algérien, ce qui est très proche de notre résultat. Cela confirme que ce type de solvant permet d'extraire une plus grande quantité de composés phénoliques.

Selon **Mosić et al. (2019)**, l'utilisation de solvants mixtes permet d'optimiser l'extraction de ces composés grâce à une meilleure pénétration dans la structure du pollen et une solubilité plus large des différents types de polyphénols. Nos résultats confirment donc que l'extrait hydroéthanolique présente une meilleure efficacité d'extraction des polyphénols totaux.

2.2. Teneur en flavonoïdes totaux

La teneur en flavonoïdes totaux des extraits a été déterminée à l'aide de la méthode colorimétrique avec la quercétine comme étalon de référence. La courbe d'étalonnage, obtenue à partir de différentes concentrations standards, est présentée à la (Figure 28).

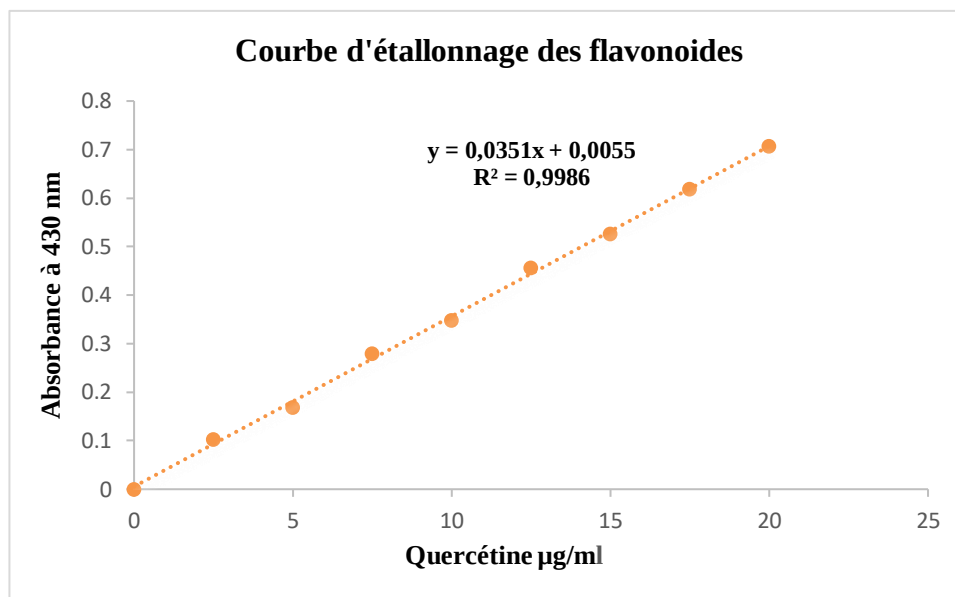


Figure 28 : Courbe d'étalonnage de la quercétine.

Tableau 11 : Quantification des composés flavonoïques dans les extraits de pollen.

Extrait de pollen	Teneurs en flavonoïdes totaux (µg EQ/ mg d'extrait)
Aqueux	6.03 ± 0,04
Hydroéthanolique	8.31 ± 0,17

À partir de cette courbe, la concentration en flavonoïdes des échantillons a été calculée selon l'équation de régression suivante : ($y=0,0351x+0,0055$), avec un coefficient de détermination $R^2=0,9986$ indiquant une excellente linéarité. Les résultats finaux, exprimés en microgrammes équivalents de quercétine par milligramme d'extrait (µg EQ/mg), sont illustrés dans la (Figure 29 ; Tableau11).

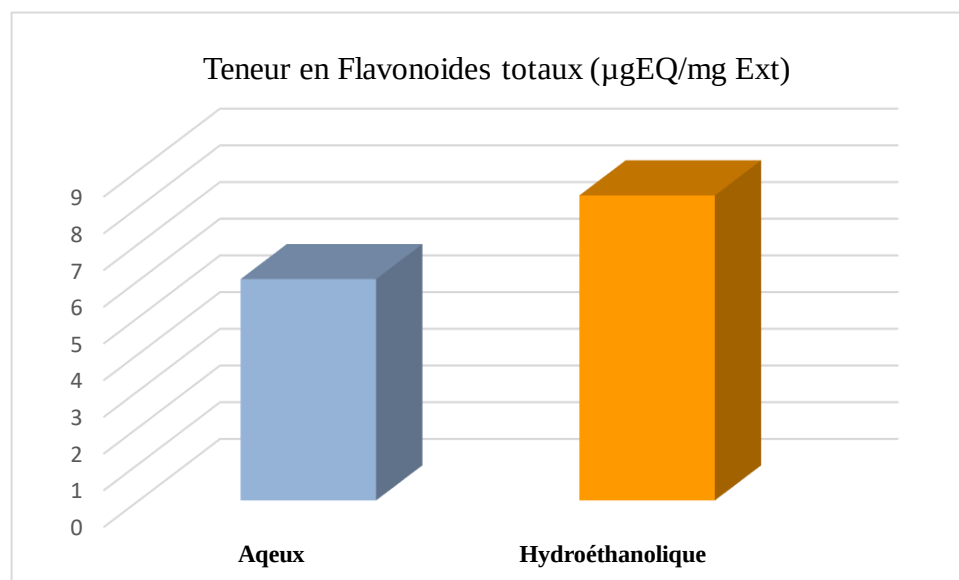


Figure 29 : Teneur en Flavonoïdes totaux dans les extraits de pollen.

L'analyse quantitative des flavonoïdes a révélé une différence significative entre les deux extraits testés. L'extrait hydroéthanolique s'est avéré plus riche, avec une concentration moyenne de $8,31 \pm 0,17 \mu\text{g EQ/mg}$, contre $6,03 \pm 0,04 \mu\text{g EQ/mg}$ pour l'extrait aqueux. Ces résultats suggèrent une meilleure capacité de l'éthanol à extraire les flavonoïdes, ce qui corrobore les données de la littérature. En effet, **Chen et al. (2021)** ont démontré qu'un solvant à 75 % d'éthanol permettait d'obtenir 8,99 mg QE/g de flavonoïdes totaux dans le pollen d'*Actinidia arguta*, un niveau bien supérieur à celui de l'extraction aqueuse. De même, **Ma et al. (2015)** ont montré qu'une extraction par Soxhlet avec 60 % d'éthanol appliquée au pollen de colza permettait d'atteindre une concentration avoisinant 10 mg QE/g.

En ce qui concerne l'extrait aqueux, bien qu'il présente une teneur plus faible, cette valeur reste pertinente. En ce qui concerne l'extrait aqueux, bien qu'il présente une teneur plus faible, cette valeur reste pertinente. Une étude turque menée sur des pollens collectés dans plusieurs régions (Muğla, Trabzon et Mersin) a rapporté des teneurs en flavonoïdes variant de 3,72 à 4,97 mg QE/g, confirmant que l'eau peut extraire une part notable de flavonoïdes, mais de façon moins efficace que l'éthanol (**Nisbet & Tabatabaei, 2021**). Ainsi, la valeur de $6,03 \mu\text{g EQ/mg}$ observée s'intègre dans cette fourchette, reflétant un rendement respectable pour une extraction aqueuse.

La performance supérieure de l'extrait hydroéthanolique obtenu par Soxhlet pourrait être attribuée à l'effet thermique et à la circulation continue du solvant, qui favorisent la rupture des parois cellulaires du pollen et la libération des flavonoïdes (**Da Porto et al., 2013**).

3. Activités biologiques

3.1. Activité antioxydante

Les résultats du test de piégeage du radical DPPH par les extraits de pollen ont été exprimés par les moyennes des pourcentages d'inhibition obtenus lors de trois répétitions indépendantes sont résumé dans les (Figures 30 et 31). Les courbes montrent que les extraits aqueux et hydroéthanoliques de pollen ont une activité antioxydante dose-dépendante. L'extrait hydroéthanolique est plus efficace, atteignant un pourcentage d'inhibition proche de la vitamine C, tandis que l'extrait aqueux reste moins actif. Cette différence souligne l'influence du solvant sur l'extraction des composés antioxydants.

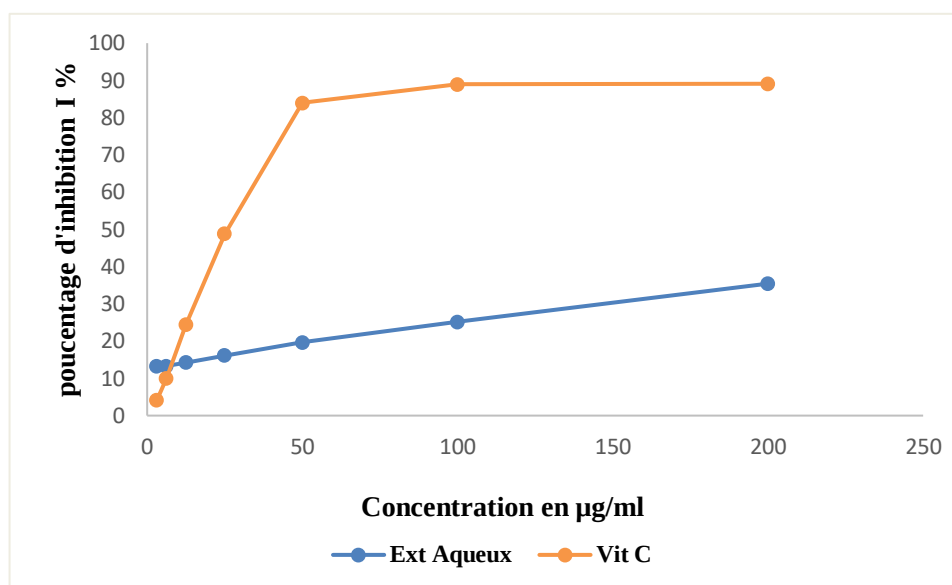


Figure 30 : Pourcentage d'inhibition du radical DPPH par l'extrait aqueux de pollen.

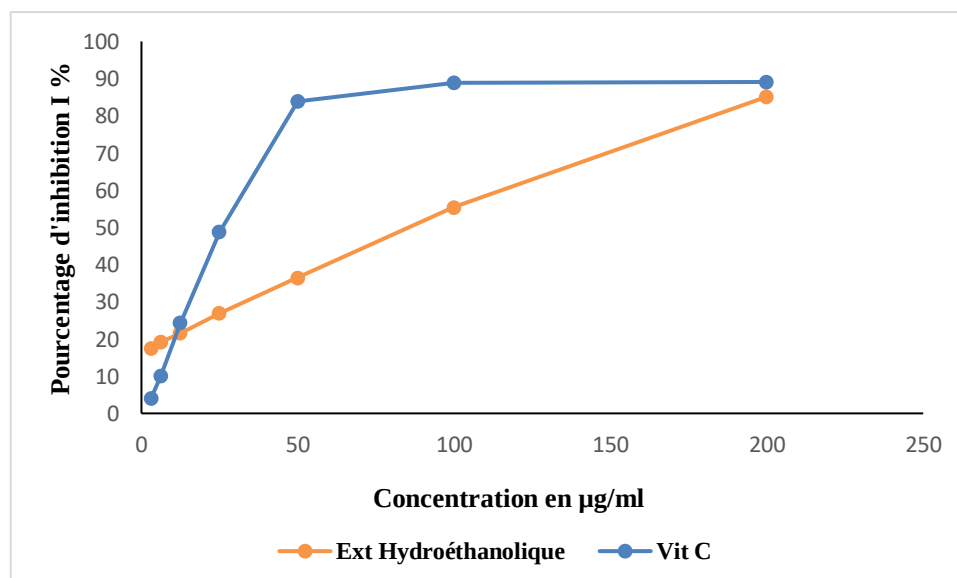


Figure 31 : Pourcentage d'inhibition du radical DPPH par l'extrait hydroéthanolique de pollen.

Les valeurs des CI_{50} ont été calculées à partir des courbes de régression linéaire, avec un coefficient de détermination (R^2) de l'acide ascorbique, utilisé comme antioxydant de référence, a permis de situer l'efficacité relative des extraits testés. Les résultats sont présentés dans le **Tableau12**.

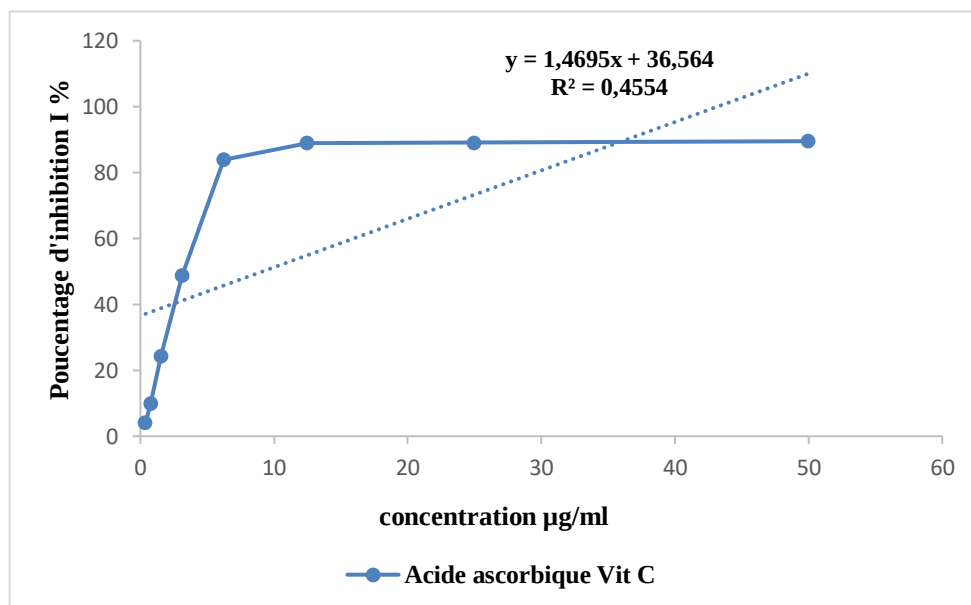


Tableau 12 : Valeurs des CI_{50} des extraits de pollen.

Extraits	Ext aqueux	Ext Hydroéthanolique	Acide ascorbique Vit C
$CI_{50} \mu g/ml$	>200	$85,99 \pm 0,22$	$3,42 \pm 0,02$

L'extrait hydroéthanolique de pollen, obtenu par extraction en continu à l'éthanol via un montage Soxhlet, a montré une activité antioxydante marquée avec une CI_{50} de $85,99 \mu g/ml$. Cette valeur se situe dans la fourchette inférieure des CI_{50} rapportées dans la littérature, notamment dans l'étude de **Kanar et Mazi (2019)**, où un extrait multifloral frais de Turquie présentait une CI_{50} de $0,29 mg/ml$ (soit $290 \mu g/ml$), ce qui est environ trois fois moins actif que notre extrait. D'autres extraits hydroéthanoliques, comme ceux analysés par **Özcan et al. (2019)**, ont révélé des taux d'inhibition DPPH de 60 à 81 %, ce qui est cohérent avec une activité antioxydante élevée. Ces résultats confirment l'efficacité de l'éthanol comme solvant pour l'extraction des polyphénols, en particulier ceux peu solubles dans l'eau.

En comparaison, l'extrait aqueux de pollen, obtenu par macération, a affiché une CI_{50} de 338,04 $\mu\text{g/ml}$, soit une activité antioxydante significativement plus faible. Cette différence peut s'expliquer par la faible capacité de l'eau à extraire certains composés hydrophobes antioxydants. Dans l'étude de **Fatrcová-Šramková et al. (2016)**, les extraits aqueux de pollen de tournesol présentaient un taux d'inhibition DPPH entre 47,97 % et 50,46 %, ce qui reste inférieur aux extraits hydroalcooliques. Une analyse plus poussée par **Dulger Altiner et al. (2020)** a également montré que la biodisponibilité des antioxydants était plus élevée dans les extraits éthanoliques que dans les extraits aqueux, en raison de la meilleure stabilité et solubilité des flavonoïdes dans l'éthanol.

La comparaison directe entre nos deux extraits montre que l'extrait hydroéthanolique est environ quatre fois plus efficace que l'extrait aqueux, selon les valeurs de CI_{50} mesurées. Ce constat rejoint celui de **De-Melo et al. (2018)**, qui ont observé une capacité antioxydante nettement supérieure dans les extraits obtenus par solvants organiques. Ces résultats soulignent l'importance du choix du solvant dans l'optimisation de l'extraction des composés bioactifs responsables de l'activité antioxydante.

3.2. Activité antibactérienne

Nous avons mené une étude afin d'évaluer l'activité antibactérienne des extraits aqueux et hydroéthanoliques de pollen sur quatre souches bactériennes différentes. Cette analyse avait pour objectif de déterminer le potentiel inhibiteur de ces extraits vis-à-vis de la croissance bactérienne, et de comparer l'efficacité de chaque type d'extrait selon la souche testée (**figure 33**).

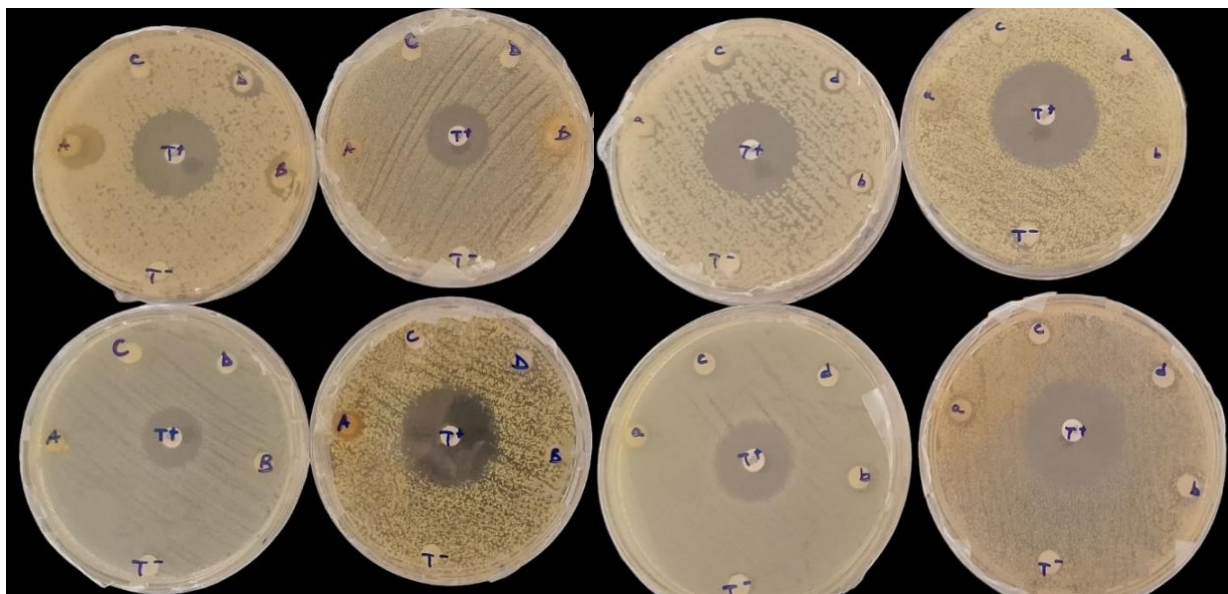


Figure 32 : Photo représentant les zones d'inhibition exercée par les extraits de pollen sur Les souches bactériennes testées.

Tableau 13 : Diamètres des zones d'inhibition des souches bactériennes testés par les extraits de pollen.

		Diamètres des zones d'inhibition (mm)				
Extrait	Souches bactériennes	Abréviation	A	B	C	D
		Concentration (mg/ml)	200	100	50	25
Extrait Aqueux	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922		-	-	-	-
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	Gram-	9,25±0,1	-	-	-
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Gram+	11,78±6,8	-	-	-
	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633		15,6±0,15	11,27±0,62	10,44±0,96	9,25±0,1
Extrait Hydroéthanolique	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922		-	-	-	-
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	Gram-	-	-	-	-
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Gram+	8,91±0,52	8,69±0,04	8,51±0,07	7,36±0,27
	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633		11,86±0,69	9,49±0,15	8,69±0,16	8,57±0,04

- : aucune zone (où $Di \leq 6$ mm).

Les résultats obtenus (**tableau 13**) démontrent une activité antibactérienne variable des extraits de pollen selon leur nature (aqueux ou hydroéthanolique), la concentration utilisée et la souche bactérienne testée.

L'extrait aqueux a révélé une activité antibactérienne modérée, principalement dirigée contre les souches Gram positives. L'inhibition la plus marquée a été observée contre *Bacillus subtilis*, avec une zone de $15,6 \pm 0,15$ mm à 200 mg/ml, suivie de $11,27 \pm 0,62$ mm à 100 mg/ml. *Staphylococcus aureus* a également montré une sensibilité, avec un diamètre de $11,78 \pm 6,8$ mm à la concentration maximale. En revanche, aucune activité n'a été détectée contre *Escherichia coli* ni contre *Pseudomonas aeruginosa*. Comparativement, la gentamicine a produit des zones d'inhibition nettement supérieures : 26,78 mm contre *B. subtilis* et 13,01 mm contre *S. aureus*.

L'extrait hydroéthanolique a présenté une activité antibactérienne plus faible que l'extrait aqueux sur les souches Gram positives testées. Contre *Bacillus subtilis*, la zone d'inhibition maximale atteignait $11,86 \pm 0,69$ mm à 200 mg/ml, diminuant progressivement avec la concentration. Pour *Staphylococcus aureus*, l'effet était plus limité, avec un maximum de $8,91 \pm 0,52$ mm à 200 mg/ml. Aucune inhibition n'a été observée contre *Escherichia coli* ni contre *Pseudomonas aeruginosa*, mettant en évidence la résistance des bactéries Gram négatives face à ces extraits bruts. Ces résultats suggèrent que l'extrait aqueux possède une meilleure efficacité antibactérienne dans ce contexte expérimental.

Nos résultats rejoignent ceux de **Gerçek et al. (2022)**, issus de Bayburt, Turquie qui ont rapporté des zones d'inhibition de 15-18 mm contre *B.cereus* et *S. aureus* avec un extrait hydroéthanolique à 20 mg/ml, une fourchette très proche de celle observée dans notre étude. De même, **Jilo (2021)**, extrait de pollen recueilli en Éthiopie a montré des zones d'inhibition de 18-19 mm contre *S. aureus* avec des extraits aqueux et éthanoliques comparables, et une inhibition prédominante de *B. subtilis* par l'extrait aqueux, en accord avec la répartition d'activité entre nos deux extraits. Enfin, l'étude de **Pascoal et al. (2014)** confirme que les diamètres d'inhibition varient entre 8 et 16 mm selon la méthode d'extraction et la concentration utilisée, en parfait accord avec nos valeurs expérimentales.

En somme, les différences d'efficacité observées entre les deux extraits s'expliquent par leur composition et la nature des bactéries cibles. L'efficacité supérieure de l'extrait aqueux, notamment contre *Bacillus subtilis*, pourrait s'expliquer par l'extraction de composés hydrosolubles actifs comme certains acides phénoliques. Selon **Gerçek et al. (2022)**, le pollen de *Pinus nigra* de Turquie présente un extrait aqueux riche en phénols (173,5 mg GAE/g) et flavonoïdes (79,2 mg QE/g), capable d'inhiber efficacement des souches Gram+. Ceci montre qu'un extrait non alcoolique peut être actif si les composés sont solubles dans l'eau, ce qui justifie les résultats observés sur les bactéries Gram+, dont la paroi plus perméable facilite l'action de ces molécules.

4. Paramètres physiques du lait additionné d'extrait de pollen

4.1. Contrôle de pH

Dans cette étude, nous avons mesuré les variations du pH de lait cru enrichi en extrait aqueux de pollen, stocké à 4 °C, à deux concentrations (C1 = 5 mg/mL et C2 = 10 mg/mL), comparativement à un échantillon témoin non additionné. Ces analyses visent à évaluer l'effet du pollen sur l'évolution de l'acidité du lait au cours de la conservation et à envisager son potentiel comme additif naturel stabilisant (**Figure 33**).

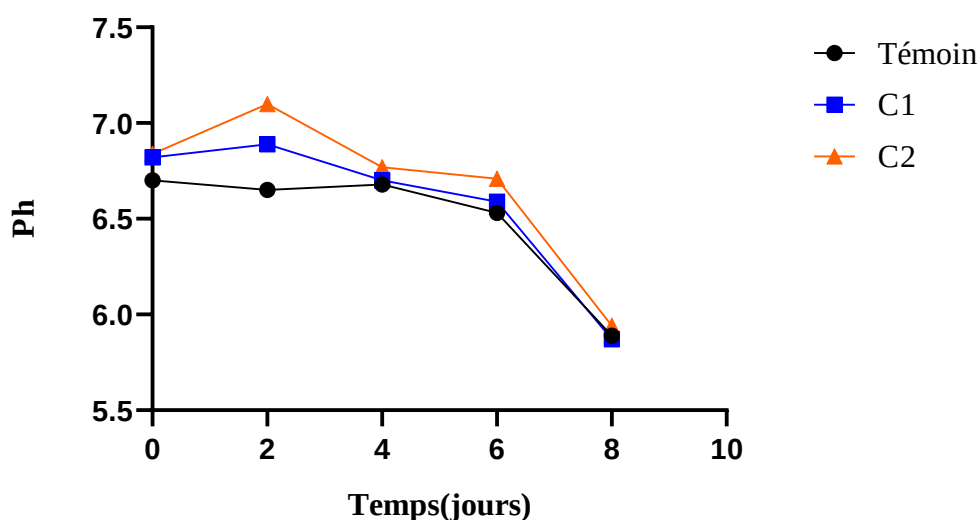


Figure 33 : Variation du pH durant le stockage à froid du lait enrichi en extrait aqueux de pollen (4 °C) -Témoin (T), C1 = 5 mg/mL, C2 = 10 mg/mL.

En examinant les données de pH pour chaque échantillon de lait, on peut observer les variations suivantes :

Au jour 0, les valeurs de pH pour tous les échantillons de lait étaient comprises entre 6,70 et 6,84. Cette observation indique que les échantillons étaient dans la plage normale pour le lait frais, qui est de 6,6 à 6,8, comme mentionné dans l'étude de **Lounis et Harfouche (2022)** sur le lait cru commercialisé en Algérie. Cela montre que l'ajout d'extrait aqueux de pollen n'a pas d'effet immédiat sur l'acidité du lait.

Au jour 2, on observe une augmentation du pH dans les échantillons enrichis : 6,89 pour C1 et 7,10 pour C2, tandis que le témoin affiche une légère diminution à 6,65. Cette élévation pourrait s'expliquer par l'effet antimicrobien des composés bioactifs du pollen, ralentissant la production d'acide lactique.

Au jour 4, les pH de C1 et C2 se stabilisent à 6,70 et 6,77 respectivement, tandis que le témoin atteint 6,67. Cette différence suggère une acidification moins marquée dans les échantillons enrichis.

Au jour 6, une diminution est observée pour tous les échantillons : 6,53 pour le témoin, 6,60 pour C1, et 6,71 pour C2. Le maintien de valeurs plus élevées dans les échantillons enrichis confirme l'effet modulateur du pollen.

Au jour 8, les valeurs de pH chutent à 5,89 (témoin), 5,87 (C1), et 5,94 (C2). Le lait enrichi avec 10 mg/mL d'extrait de pollen conserve un pH supérieur à celui du témoin, indiquant un ralentissement de l'acidification. Ces résultats sont en accord avec ceux de **Yerlikaya (2014)**, qui a montré que l'ajout de pollen dans des boissons lactées permettait de stabiliser le pH pendant la conservation grâce à ses propriétés antimicrobiennes.

Ces résultats suggèrent que l'ajout d'extrait aqueux de pollen peut avoir un effet sur l'évolution du pH dans le lait. Les échantillons supplémentés présentent des valeurs de pH plus stables que le témoin. Ces résultats sont intéressants car ils suggèrent que l'extrait de pollen peut avoir un effet sur la flore bactérienne présente dans le lait, ce qui peut affecter la production d'acide lactique et l'évolution du pH.

4.2. Contrôle de l'acidité

Les résultats de la mesure de l'acidité Dornic des différents échantillons de lait sont représentés dans la **(Figure 34)** ci-dessous.

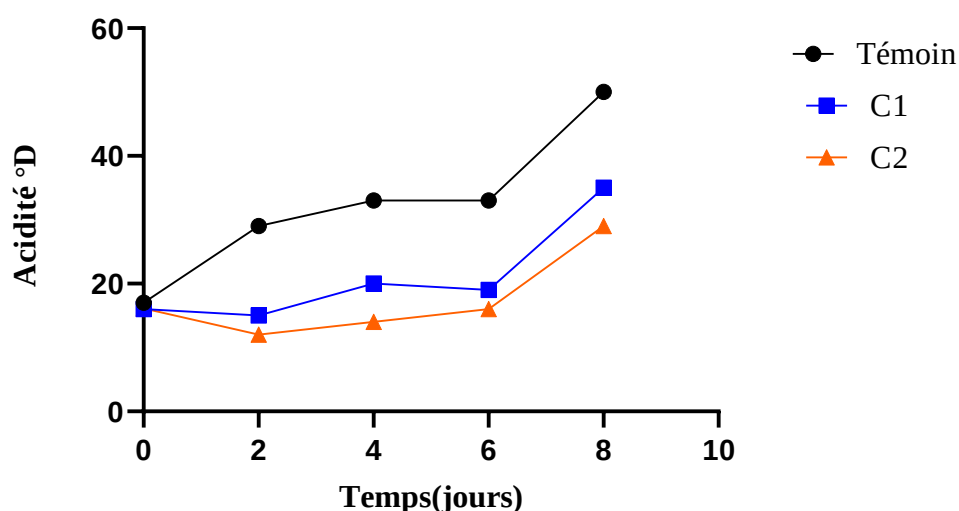


Figure 34 : Variation de l'acidité Dornic des échantillons du lait durant la période du stockage à froid du lait additionné en extraits aqueux de pollen (4°C), Témoin (T), C1 = 5 mg/mL, C2 = 10 mg/mL.

En observant les données recueillies, on constate que les valeurs initiales d'acidité mesurées **au jour 0** sont comprises entre 16 et 17 °D. Ces valeurs se situent dans la plage normale indiquée pour le lait cru frais, généralement comprise entre 14 et 16 °D selon **El Marnissi et al. (2013)** ainsi que **Gagara et al. (2022)**, ce qui atteste de la bonne qualité du lait au moment de l'échantillonnage. Aucun effet immédiat de l'ajout de pollen n'a été constaté à cette étape.

Au jour 2, une hausse importante de l'acidité est observée dans l'échantillon témoin, qui atteint 29 °D, tandis que les échantillons C1 et C2 conservent des valeurs inférieures, respectivement de 15 °D et 12 °D. Cette différence peut être interprétée comme un effet modérateur de l'extrait de pollen sur l'activité microbienne responsable de l'acidification.

Au jour 4, l'évolution se poursuit : l'échantillon témoin atteint 33 °D, indiquant une fermentation rapide, alors que les échantillons enrichis présentent encore des niveaux plus faibles : 20 °D pour C1 et 14 °D pour C2. Le maintien d'une acidité plus basse confirme une action inhibitrice progressive de l'extrait.

Au jour 6, les résultats montrent une stagnation de l'acidité du témoin à 33 °D, tandis que les échantillons C1 et C2 restent en dessous, à 19 °D et 16 °D respectivement, ce qui souligne la persistance de l'effet retardateur du pollen sur la production d'acide lactique.

Au jour 8, la différence devient encore plus marquée. L'échantillon témoin atteint 50 °D, une valeur qui témoigne d'une forte acidification, susceptible d'altérer la qualité du lait. En revanche, les échantillons C1 et C2 présentent des valeurs respectives de 35 °D et 29 °D, démontrant que l'extrait aqueux de pollen, notamment à la concentration de 10 mg/mL, ralentit efficacement l'évolution de l'acidité.

Ces résultats confirment l'effet protecteur du pollen contre l'acidification accélérée du lait cru. Comme le souligne **Yerlikaya (2014)**, l'incorporation de pollen dans des produits laitiers peut moduler l'activité bactérienne par ses propriétés antimicrobiennes, contribuant ainsi à une meilleure stabilité du produit pendant sa conservation.

5. Analyse microbiologique du lait

5.1. Flore Totale Aérobie Mésophile (FTAM)

5.1.1. Aspect macroscopique des colonies de flore totale aérobie mésophile

L'examen macroscopique des boîtes de Pétri cultivées sur le milieu PCA a permis de confirmer la présence de la flore totale aérobie mésophile (FTAM) dans tous les échantillons de lait cru, qu'ils soient additionnés ou non en extrait aqueux de pollen. Les colonies observées présentent une diversité phénotypique notable, caractérisée par des tailles variées, des couleurs allant du blanc au crème ou au jaunâtre, et des morphologies tantôt régulières (circulaires, lisses), tantôt irrégulières. Certaines poussent en surface, d'autres en profondeur dans la gélose, formant des disques opaques distincts (**Figure 35**). Cette hétérogénéité reflète la diversité microbienne naturelle du lait cru.

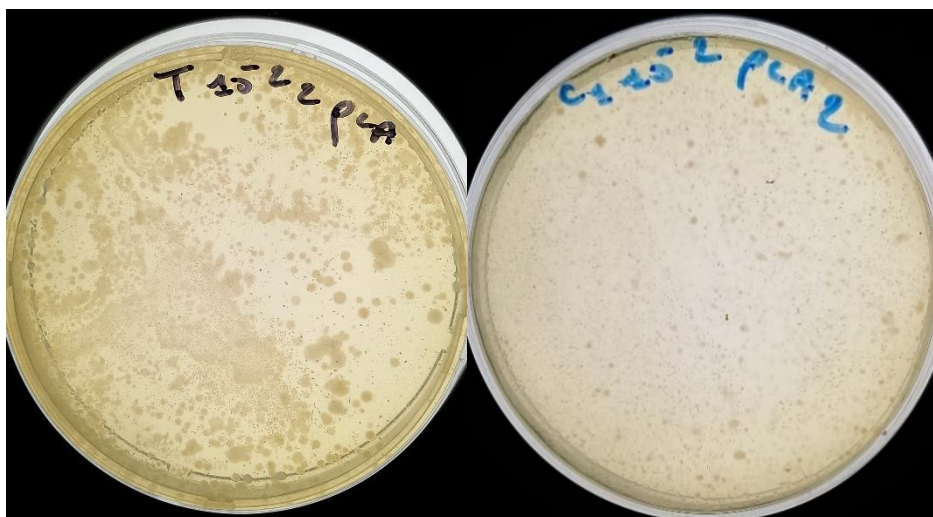


Figure 35 : Flore totale aérobie mésophile du lait cru (Témoin et C1 = lait cru supplémentée en avec 5% de pollen) sur milieu PCA.

5.1.2. Évolution de la FTAM dans le lait enrichi en extrait de pollen au froid

L'analyse de la dynamique de croissance microbienne dans les échantillons stockés à 4 °C pendant 8 jours, montrant une évolution différenciée selon la concentration d'extrait de pollen ajoutée, est présenté dans la **figure 36**.

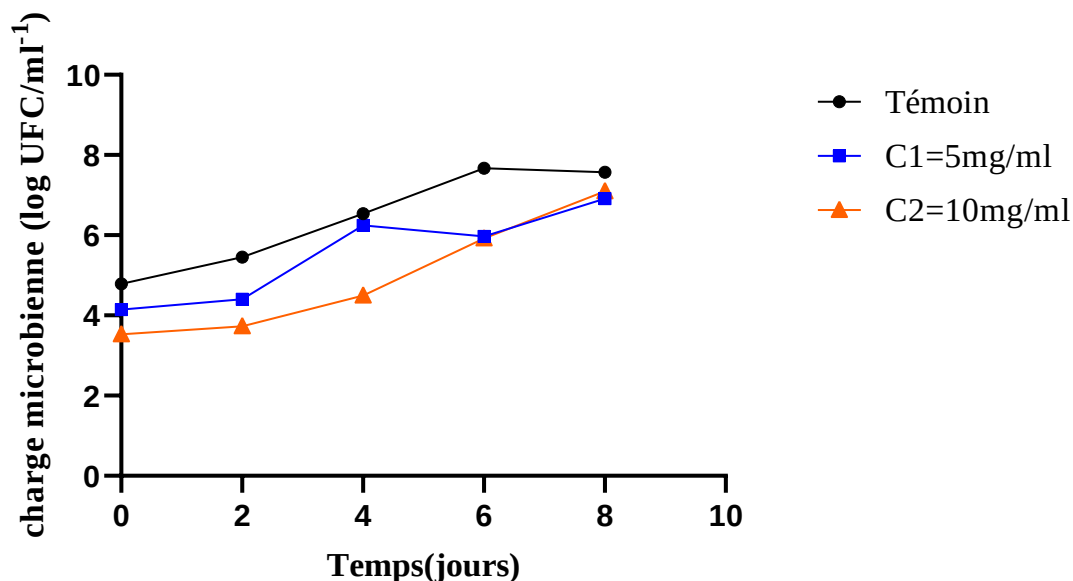


Figure 36 : Évolution de la croissance microbienne de la FTAM du lait additionné de l'extrait de pollen à différentes concentrations et stocké à froid (4°C).

Selon la **figure 36**, le témoin non additionné révèle une prolifération progressive de la flore mésophile tout au long du stockage, alors que les échantillons enrichis, notamment à 10 mg/mL (C2), présentent une croissance nettement ralentie. L'effet inhibiteur est également perceptible à 5 mg/mL (C1), bien que légèrement moins marqué. Ces observations suggèrent que l'extrait aqueux de pollen exerce une action antimicrobienne dose-dépendante sur les bactéries aérobies mésophiles présentes dans le lait cru.

5.1.3. Modélisation cinétique selon Baranyi et Roberts

Afin de mieux caractériser la croissance bactérienne, les données expérimentales issues des dénombrements sur milieu PCA ont été modélisées à l'aide de l'approche mathématique de **Baranyi et Roberts (1995)**. Cette méthode permet d'ajuster les courbes microbiennes en tenant compte des différentes phases de croissance : latence, exponentielle et stationnaire (**Figure 37**).

Les simulations ont été réalisées en utilisant les ressources de la base de données ComBase, permettant d'extraire les principaux paramètres cinétiques de croissance : la densité initiale (X_0), le taux de croissance maximal (μ_{max}), la durée de la phase de latence (λ), et la charge finale (X_{max}). Les résultats confirment un ralentissement significatif de la cinétique microbienne dans les laits additionnés d'extrait de pollen, en particulier à 5 mg/mL, traduisant un potentiel conservateur naturel du pollen.

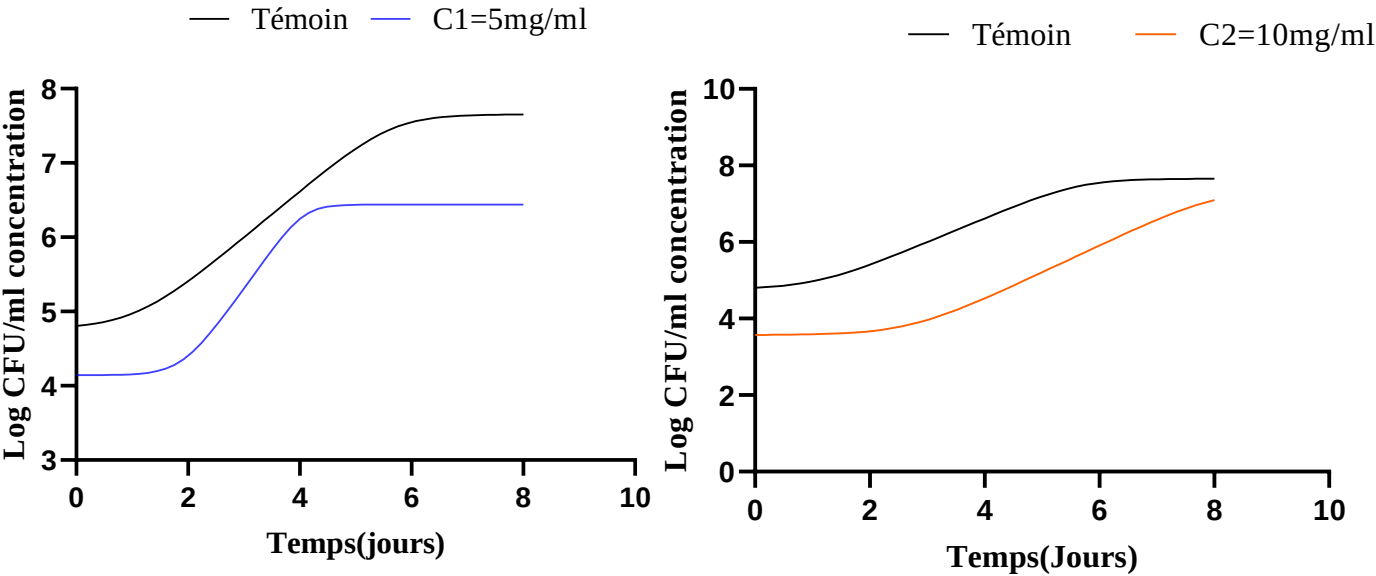


Figure 37 : Suivie de la croissance microbienne des FTAMs du lait additionné à l’extrait aqueux de pollen et stocké à froid (4°C) (modèle de Baranyi et Roberts).

5.1.4.Détermination des paramètres cinétique de la croissance bactérienne

Tableau 14 : Les valeurs des paramètres de croissance bactérienne de la flore de FTAM du lait témoin et lait additionnée à l’extraits de pollen obtenu par le modèle Baranyi et Roberts.

Paramètres de croissance	X initiale	μ max	Lag (λ)	X max
Témoin	4.805 ± 0.171	0.63 ± 0.12	1.114 ± 0.562	7.653 ± 0.156
C1= 5mg/ml	4.143 ± 0.666	1.0716 ± 0.871	1.917 ± 1.587	6.44 ± 0.471
C2=10mg/ml	3.574 ± 0.0718	0.712 ± 0.0627	2.711 ± 0.274	7.392 ± 0.351

X initiale : Niveau ou charge initiale de croissance (log UFC/ml⁻¹).

X max : Niveau ou charge initiale de croissance (log UFC/ml⁻¹).

μ max : le taux de croissance maximal (Δ Log UFC/ml-1.Jours-1).

Lag (λ) :la durée de la phase de latence (jours) = 1 /μ max.

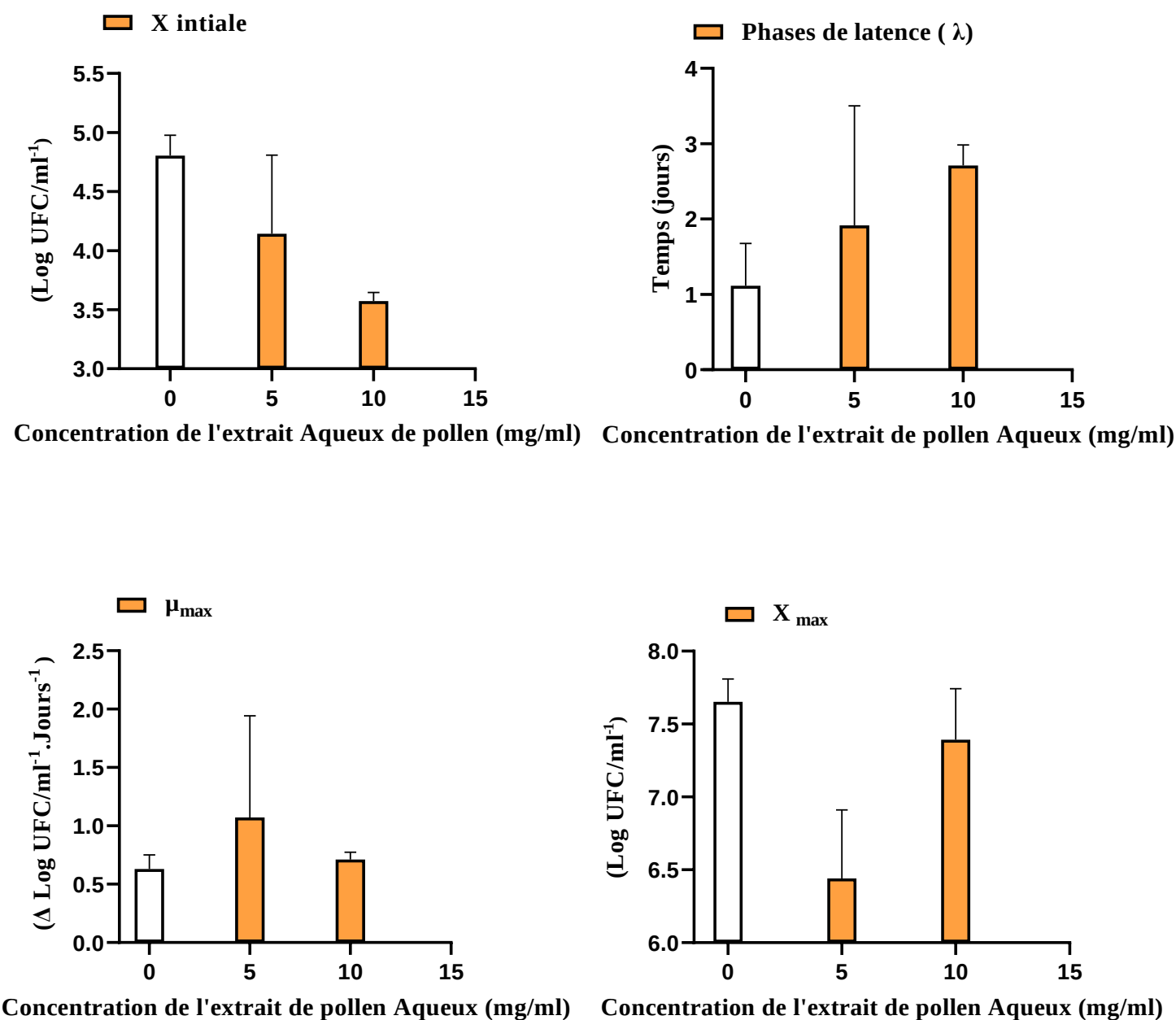


Figure 38 : Résultats des paramètres cinétiques de croissance microbienne (X_{initiale} , X_{max} , μ_{max} et λ) obtenus à l'aide du modèle de Baranyi et Roberts.

La charge microbienne initiale des bactéries aérobies mésophiles dans le lait cru a été déterminée sur milieu PCA au début de la période de stockage. Les résultats montrent une densité de $4,805 \pm 0,171$ log UFC/mL pour l'échantillon témoin, tandis que les échantillons additionnés en extrait de pollen présentent des valeurs légèrement inférieures, soit $4,143 \pm 0,666$ log UFC/mL pour C1 (5 mg/mL) et $3,574 \pm 0,0718$ log UFC/mL pour C2 (10 mg/mL) (**Figure 38, Tableau 14**). Ces résultats sont en accord avec les normes microbiologiques du lait cru, qui fixent un seuil d'acceptabilité autour de 10^5 UFC/mL (soit 5 log UFC/mL), comme mentionné par **Cempírková et Mikulová (2009)** et confirmé dans l'étude régionale menée par **Rizani et al. (2018)** au Kosovo. En Algérie, ces seuils sont définis par l'arrêté interministériel du 4 octobre 2016 fixant les critères microbiologiques des denrées alimentaires (**Journal Officiel de la République Algérienne, n°39, 2017**).

Par ailleurs, les résultats de notre étude montrent que l'ajout d'extrait aqueux de pollen au lait cru peut avoir un effet sur le taux de croissance des bactéries aérobies mésophiles. En effet, le taux de croissance maximale (μ_{max}) des bactéries aérobies mésophiles a été observé comme étant plus élevé dans l'échantillon C1 ($1,0716 \pm 0,871$ log UFC/mL/jour), suivi de l'échantillon C2 ($0,712 \pm 0,0627$ log UFC/mL/jour), puis de l'échantillon témoin T ($0,63 \pm 0,12$ log UFC/mL/jour). Il est important de noter que ces résultats semblent être en accord avec ceux obtenus par **Serrar et al. (2023)**, où une diminution de la vitesse de croissance maximale (μ_{max}) a été observée pour certaines concentrations testées d'extraits végétaux. D'autre part, nos résultats indiquent que l'échantillon T, qui n'a pas été additionné avec de l'extrait, a présenté la phase de latence la plus courte de 1,114 jour. En revanche, les échantillons C1 et C2 ont présenté des phases de latence plus longues, respectivement de 1,917 et 2,711 jours. De plus, il a été observé que la concentration C2=10 mg/mL avait entraîné la plus grande phase de latence, ce qui confirme l'effet inhibiteur progressif.

Ces résultats sont cohérents avec l'étude de **Serrar et al. (2023)**, qui ont montré que l'utilisation d'extrait aqueux végétal a entraîné un retard de croissance microbienne dans le lait, caractérisé par un allongement du temps de phase de latence (λ). Nos résultats montrent également que la charge maximale des bactéries aérobies mésophiles est la plus élevée dans l'échantillon témoin T ($7,653 \pm 0,156$ log UFC/mL), suivi de l'échantillon C2 ($7,392 \pm 0,351$ log UFC/mL), puis de l'échantillon C1 ($6,44 \pm 0,471$ log UFC/mL). Ces résultats suggèrent que la charge microbienne maximale diminue en présence d'extrait aqueux de pollen, particulièrement à faible dose, ce qui souligne un effet modulant sur la croissance bactérienne dans le lait.

L'ajout d'un extrait aqueux de pollen au lait cru a révélé un effet bioconservateur marqué, mesuré à travers la cinétique de croissance des flores totales aérobies mésophiles (FTAM) durant la conservation à 4 °C. Pour l'échantillon témoin, la phase de latence était de 1,114 jours ($\approx 26,74$ heures), avec un taux de croissance maximal (μ max) de 0,63 log UFC/mL/jour et une densité cellulaire finale de 7,653 log UFC/mL. À 5 mg/mL, la phase de latence a été prolongée à 1,917 jours ($\approx 46,01$ heures), μ max a été abaissé à 0,1072 log UFC/mL/jour, et la densité cellulaire finale limitée à 6,44 log UFC/mL. À 10 mg/mL, l'effet était encore plus marqué : la phase de latence atteignait 2,401 jours ($\approx 57,62$ heures), avec un μ max réduit à 0,058 log UFC/mL/jour et une densité finale de 7,056 log UFC/mL. Ces résultats démontrent une inhibition progressive et dose-dépendante de la croissance microbienne, tout en préservant une activité fermentaire résiduelle, ce qui constitue un avantage pour la conservation du lait cru.

Ces observations rejoignent celles de **Glušac et al. (2015)**, qui ont constaté que l'enrichissement du lait acidophilus et du yaourt probiotique avec 0,6 % de pollen augmentait la production d'acide lactique, sans altérer la qualité sensorielle, démontrant ainsi une activité fermentaire soutenue. De son côté, **Yerlikaya (2014)** a confirmé que l'ajout de pollen dans des boissons fermentées inhibait *E. coli* et *Salmonella* dès 10 mg/mL, tout en améliorant la viscosité et la stabilité du produit, bien que des doses élevées puissent nuire à certaines perceptions sensorielles. En complément, **Zlatev et al. (2018)** ont montré que l'ajout de pollen jusqu'à 0,4 % dans le yaourt améliorait significativement les paramètres physico-chimiques (acidité, matière sèche) et sensoriels, à condition de respecter un seuil technologique pour ne pas inhiber les ferments lactiques. L'étude de **Çiftçi et Öncül (2024)** va dans le même sens, révélant une amélioration de la viabilité microbienne dans des yaourts enrichis en pollen, avec une stabilité prolongée jusqu'à 14 jours au froid. De plus, **Elkassas et al. (2023)** ont mis en évidence un effet similaire avec l'ajout de propolis dans le lait cru et le yaourt, en soulignant une réduction significative de la charge microbienne ainsi qu'un maintien des critères de qualité pendant le stockage réfrigéré. Enfin, **Mironova et al. (2020)** ont démontré que l'enrichissement du lait glacé avec 1 % de pollen renforçait la valeur nutritionnelle sans compromettre les propriétés organoleptiques, confirmant la stabilité du pollen en matrice laitière.

En conclusion, les résultats de cette étude valident l'efficacité de l'extrait aqueux de pollen comme agent bioconservateur naturel dans le lait cru, avec une action antimicrobienne mesurable dès 5 mg/mL et optimale à 10 mg/mL. L'effet observé est cohérent avec les données issues de produits laitiers fermentés ou transformés, et ouvre la voie à des applications prometteuses dans la conservation naturelle du lait, sous réserve d'une évaluation sensorielle complémentaire.

5.2. Flore lactique

5.2.1. Aspect macroscopique de la flore lactique sur gélose MRS

L'observation macroscopique des échantillons cultivés sur gélose MRS a révélé la présence constante de colonies caractéristiques de la flore lactique dans tous les laits crus, qu'ils soient témoins ou enrichis en extrait de pollen. Ces colonies apparaissent généralement petites à moyennes, opaques, de couleur blanche à crème, avec des bords réguliers et une surface lisse, typiques des bactéries lactiques. Une croissance plus dense en surface a été observée dans les échantillons témoins, tandis que les laits additionnés de pollen présentaient une densité légèrement moindre, traduisant une modulation de la croissance. Notamment, les colonies du lait enrichi à 5 mg/mL affichaient une implantation régulière en surface, avec une homogénéité de forme, tandis que celles du lait à 10 mg/mL étaient plus dispersées et parfois de taille réduite. Ces observations suggèrent un impact dose-dépendant du pollen sur l'implantation macroscopique des bactéries lactiques, sans toutefois inhiber complètement leur développement (**figure 39**).

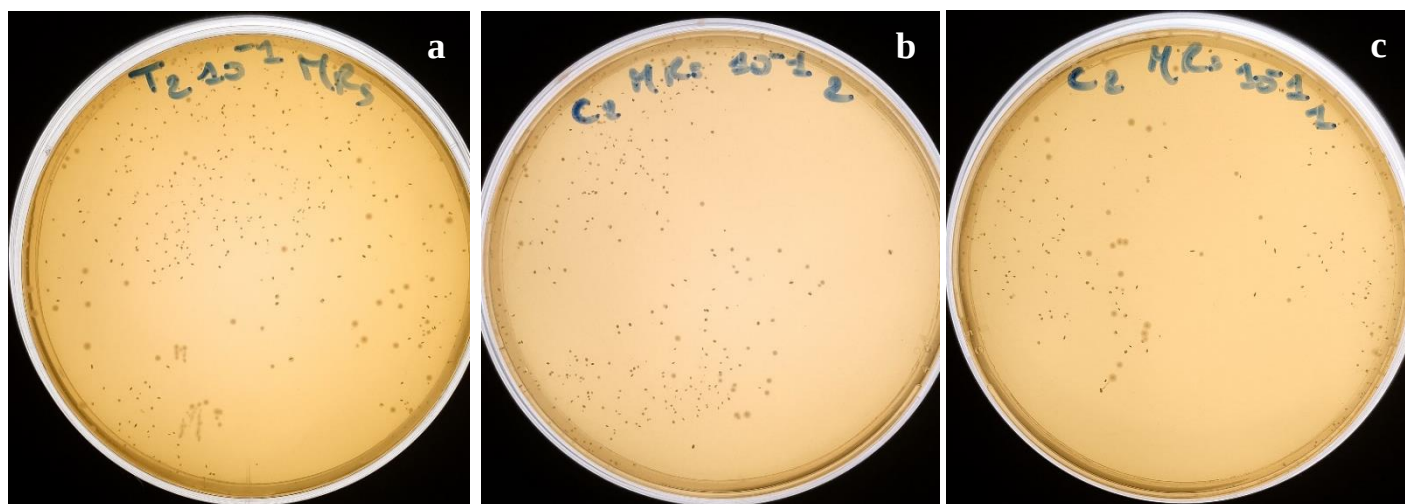


Figure 39 : Flore lactique totale du lait cru sur milieu MRS : Témoin (a) ; C1 : (b) ; C2 (c).

5.2.2. Evolution de la flore lactique dans le lait enrichi en extrait de pollen au froid

Le suivi de la flore lactique dans les échantillons du lait additionné d'extrait de pollen et stockés à 4 °C pendant 8 jours est présenté dans le **tableau 15**.

Tableau 15 : Évolution de la flore lactique totale (UFC/ml) dans le lait additionné de pollen à différentes concentrations au cours de la réfrigération à 4°C.

Temps(jours)	Témoin	C ₁ =5mg/ml	C ₂ =10mg/ml
0	2,39×10 ⁵	9,20×10 ⁴	2,33×10 ⁴
2	3,90×10 ⁴	1,99×10 ⁴	3,80×10 ³
4	1,31×10 ⁴	2,20×10 ³	2,10×10 ³
6	3,00×10 ³	3,93×10 ⁴	2,86×10 ⁴
8	1,63×10 ⁵	3,41×10 ⁴	2,71×10 ⁴

En analysant l'évolution de la flore lactique dans notre étude illustrée dans le **tableau 15**, on observe que le témoin sans additif suit une cinétique classique de décroissance progressive de 2,39×10⁵ UFC/ml **au jour 0** à 1,63×10⁵ UFC/ml **au jour 8**, ce qui correspond aux données de **Quigley et al. (2013)** qui rapportent des concentrations naturelles de bactéries lactiques dans le lait cru variant de 10³ à 10⁶ UFC/ml selon les conditions de production.

L'ajout d'extraits de pollen à 5mg/ml (C₁) démontre un effet prébiotique remarquable avec le maintien de concentrations élevées et stables se situant entre 1,99×10⁴ et 3,93×10⁴ UFC/ml tout au long de l'expérimentation, suggérant que les composés polliniques (acides aminés, vitamines, polysaccharides) agissent comme facteurs de croissance et substrats préférentiels pour les bactéries lactiques.

En revanche, la concentration plus élevée (C₂=10mg/ml) présente un comportement irrégulier avec une stimulation initiale (2,33×10⁴ UFC/ml) suivie d'une réduction **aux jours 2 et 4**, puis une reprise **au jour 8**, indiquant un effet dose-dépendant où l'extrait de pollen exerce certes un effet limitant sur la flore lactique mais sans l'éliminer complètement, maintenant ainsi une activité microbienne résiduelle.

Ces résultats, conformes à la réglementation européenne **CE n°853/2004** concernant la qualité microbiologique du lait, suggèrent que l'incorporation optimisée d'extraits de pollen pourrait constituer une stratégie prometteuse pour contrôler modérément la flore lactique tout en préservant ses propriétés bénéfiques, ouvrant des perspectives en technologie laitière et développement de produits fonctionnels.

Conclusion

Conclusion

Le présent travail s'inscrit dans une approche innovante de valorisation des produits apicoles, en particulier le pollen d'abeille, comme agent antimicrobien naturel appliqué à la bioconservation du lait cru. Cette étude met en lumière le potentiel du pollen, à travers ses extraits aqueux et hydroéthanoliques, pour freiner le développement microbien et prolonger la durée de conservation du lait, tout en préservant ses qualités physico-chimiques.

Les résultats obtenus ont montré que l'extrait aqueux de pollen présentait un rendement d'extraction supérieur 18,91 % comparativement à l'extrait hydroéthanolique 5,59 %, témoignant de sa richesse en composés hydrosolubles. Le dosage des composés phénoliques a révélé des concentrations remarquables : $19,89 \pm 0,39 \mu\text{g Eq AG/mg}$ pour l'extrait aqueux et $27,83 \pm 0,47 \mu\text{g Eq AG/mg}$ pour l'extrait hydroéthanolique. Parallèlement, le dosage des flavonoïdes a montré que l'extrait hydroéthanolique était également plus riche en flavonoïdes avec une concentration de $8,31 \pm 0,17 \text{ EQ/mg}$ comparativement à l'extrait aqueux $6,03 \pm 0,04 \text{ EQ/mg}$. Ces teneurs en composés bioactifs confirment le potentiel antioxydant des extraits, comme en témoignent les valeurs d'IC₅₀ de 338,04 $\mu\text{g/ml}$ extrait aqueux et 85,99 $\mu\text{g/ml}$ extrait hydroéthanolique, l'extrait hydroéthanolique présentant ainsi une activité antioxydante quatre fois plus élevée.

L'évaluation de l'activité antibactérienne menée sur quatre souches de référence *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 a démontré un pouvoir inhibiteur différentiel selon les concentrations testées. À la concentration de 200 mg/ml, l'extrait aqueux a montré une efficacité remarquable contre les bactéries Gram+ avec des diamètres d'inhibition de $11,78 \pm 6,80 \text{ mm}$ pour *S. aureus* et $15,6 \pm 0,15$ pour *B. subtilis* ainsi qu'une activité modérée contre les Gram-. À la concentration de 100 mg/ml, l'extrait aqueux conserve son efficacité avec des diamètres de $11,27 \pm 0,62 \text{ mm}$ pour *B. subtilis*, tandis que l'extrait hydroéthanolique montre des performances similaires avec *B. subtilis* $11,86 \pm 0,69 \text{ mm}$. Ces résultats confirment que l'extrait aqueux seul présente l'efficacité antibactérienne la plus élevée, particulièrement contre les bactéries Gram+.

L'enrichissement du lait cru avec l'extrait aqueux de pollen a permis d'évaluer son effet bioprotecteur in situ. Les analyses de cinétique microbienne ont révélé une prolongation significative de la phase de latence (lag). À la concentration de 5 mg/ml, le temps de génération atteint 1,917 jours (vs 1,114 jours pour le témoin) avec une densité cellulaire maximale de 6.44 log UFC/ml et un taux de croissance maximal de 1,0716 log UFC/ml/jour. À la concentration de 10 mg/ml, les performances sont optimales avec un lag de 2,711 jours, une densité cellulaire finale de 7,392 log UFC/ml et un taux de croissance contrôlé à 0,712 log UFC/ml/jour. Le suivi spécifique de la flore lactique a montré un impact modéré de l'extrait de pollen, avec un maintien partiel de cette flore bénéfique. À la concentration de 5 mg/ml (C1), la flore lactique reste présente tout au long de la période d'observation, malgré une légère variation des niveaux de dénombrement. À 10 mg/ml (C2), une diminution temporaire est observée jusqu'au quatrième jour, suivie d'une reprise progressive de la croissance. Ces résultats suggèrent que l'ajout d'extrait de pollen n'élimine pas la flore lactique, mais en régule légèrement l'évolution, tout en préservant l'équilibre microbiologique favorable à la qualité du lait. L'addition de pollen n'a pas altéré significativement le pH (variation < 0,2 unité) ni l'acidité Dornic du lait, garantissant une stabilité organoleptique satisfaisante du produit traité. Ces résultats confirment que l'extrait aqueux de pollen à 10 mg/ml constitue la concentration optimale pour la bioconservation du lait cru, permettant une extension de la durée de conservation de plus de 100% tout en préservant les caractéristiques qualitatives du produit.

Perspectives

Pour consolider l'application du pollen comme agent de bioconservation, plusieurs axes de recherche méritent d'être développés :

- ✓ La mise au point de procédés d'extraction verts (ultrasons, micro-ondes assistées) permettrait de maximiser le rendement en composés bioactifs, tandis que le développement de formes galéniques adaptées (microencapsulation, nanoémulsions) améliorerait la stabilité et la biodisponibilité des extraits.
- ✓ L'identification par HPLC-MS/MS des composés phénoliques responsables de l'activité antimicrobienne et les analyses spectroscopiques pour mieux comprendre les mécanismes d'action au niveau moléculaire les composées bioactives du pollen. Les tests à l'échelle pilote sur différents types de lait cru (bovin, caprin, ovin).
- ✓ L'évaluation sensorielle approfondie par panels de consommateurs et les études de stabilité en conditions réelles de stockage et distribution sont essentiels pour la validation industrielle.

- ✓ L'évaluation sur d'autres matrices alimentaires (fromages artisanaux, produits laitiers fermentés).
- ✓ La formation des apiculteurs aux techniques de récolte et transformation du pollen, la création de filières de valorisation des produits apicoles algériens et le développement de partenariats industrie-recherche favoriseraient la commercialisation de ces innovations.

Enfin, la sensibilisation aux bénéfices des produits de la ruche et de leurs applications biotechnologiques, la promotion de l'apiculture durable comme levier de développement rural et la contribution à la sécurité alimentaire par la réduction des pertes post-récolte représentent des enjeux sociétaux majeurs pour la valorisation durable de cette ressource naturelle exceptionnelle.

Références Bibliographiques

Références bibliographiques

A

AA, Atallah., & KM, Morsy. (2017). Effect of Incorporating Royal Jelly and Bee Pollen Grains on Texture and Microstructure Profile of Probiotic Yoghurt. *Journal of Food Processing & Technology*, 08(09). <https://doi.org/10.4172/2157-7110.1000693>

Abate Reta, M., & Hailu Addis, A. (2015). Available online. In *International Journal of Food Science and Microbiology* (Vol. 2, Issue 6). www.internationalscholarsjournals.org

Abd Elhamid, A., & Elbayoumi, M. (2017). Influence of Bee Pollen on the Bioactive Behavior, Sensory and Physicochemical Properties of White Cheese Made from Camel and Cow Milk Mixture. *Journal of Food and Dairy Sciences*, 8(11). <https://doi.org/10.21608/jfds.2017.38933>

Abdulghani, A. H., Prakash, S., Ali, M. Y., & Deeth, H. C. (2015). Sensory evaluation and storage stability of UHT milk fortified with iron, magnesium and zinc. *Dairy Science and Technology*, 95(1). <https://doi.org/10.1007/s13594-014-0188-z>

Adam L. Lock and Dale E. Bauman. (2004). *Modifying Milk Fat Composition of Dairy Cows to Enhance Fatty Acids Beneficial to Human Health.*

Ahmed, H. A., Tahoun, A. B. M. B., Abou Elez, R. M. M., Abd El-Hamid, M. I., & Abd Ellatif, S. S. (2019). Prevalence of *Yersinia enterocolitica* in milk and dairy products and the effects of storage temperatures on survival and virulence gene expression. *International Dairy Journal*, 94. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2019.02.010>

Albores-Flores, V., Saavedra-Camacho, E., López-García, J. A., Grajales-Conesa, J., & Córdova-Albores, L. C. (2020). Physicochemical characterization, antioxidant and antifungal activity of three stingless bee pollen aggregate (Apidae: Meliponini) from Soconusco, Chiapas. *Revista Mexicana de Fitopatología, Mexican Journal of Phytopathology*, 39(1). <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.2009-4>

Alcántara, L. A. P., da Costa Ilhéu Fontan, R., Cristina, R., Bonomo, F., de Souza, E. C., Sampaio, V. S., & Pereira, R. G. (2012). Density and dynamic viscosity of bovine milk affect by temperature and composition. *International Journal of Food Engineering*, 8(1). <https://doi.org/10.1515/1556-3758.1860>

Alinezhad, Z., Hashemi, M., & Sany, S. B. T. (2024). Concentration of heavy metals in pasteurized and sterilized milk and health risk assessment across the globe: A systematic review. In *PLoS ONE* (Vol. 19, Issue 2 February). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0296649>

Almaraz-Abarca, N., da Graça Campos, M., Ávila-Reyes, J. A., Naranjo-Jiménez, N., Herrera Corral, J., & González-Valdez, L. S. (2007). Antioxidant activity of polyphenolic extract of monofloral honeybee-collected pollen from mesquite (*Prosopis juliflora*, Leguminosae). *Journal of Food Composition and Analysis*, 20(2), 119–124. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2006.08.001>

Almeida-Muradian, L. B., Pamplona, L. C., Coimbra, S., & Barth, O. M. (2005). Chemical composition and botanical evaluation of dried bee pollen pellets. *Journal of Food Composition and Analysis*, 18(1). <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2003.10.008>

Amol S. Vyawahare, P. N. S. K. K. P. P. D. H. and K. J. R. (2011). *psychorheological study on viscosity of milk* (Vol. 30, Issue 1).

Anik, S., & Vardar, F. (2024). botanical origin and biochemical composition of different color fractions of bee pollen. *Journal of Apicultural Science*, 68(2), 143–154. <https://doi.org/10.2478/JAS-2024-0011>

Ariizumi, T., & Toriyama, K. (2011). Genetic regulation of sporopollenin synthesis and pollen exine development. *Annual Review of Plant Biology*, 62. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042809-112312>

Asmarech Dolango, S. A. T. and B. D. (2021). Quality of Assessment Raw Cows' Milk at Different Sampling Points Using Bacteriological Parameters and Other Techniques in Jimma Town, South Western Ethiopia. *Food Science and Quality Management*. <https://doi.org/10.7176/fsqm/104-04>

Avci, a., Cerit, i., Hamk, m., & Yilmazer KESKIN, s. (2023). Improved extraction of bioactive compounds from the pollens of typha domingensis with sequential conventional and ultrasound treatment. *Gıda*, 48(2). <https://doi.org/10.15237/gida.gd22129>

Ays,e, A., Koç, N., Silici, S., Kasap, F., Tuna Hörmet-O " Z, H., Mavus-Buldu, H., Barıs,, B., & Ercal, B. (2011). *Antifungal Activity of the Honeybee Products Against Candida spp. and Trichosporon spp.* www.liebertpub.com

B

Baazize-Ammi, D., Dechicha, A. S., Tassist, A., Gharbi, I., Hezil, N., Kebbal, S., Morsli, W., Beldjoudi, S., Saadaoui, M. R., & Guetarni, D. (2019). Screening and quantification of antibiotic residues in broiler chicken meat and milk in the central region of Algeria. *Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)*, 38(3).

Bakchiche, B., Temizer, İ. K., Güder, A., Çelemlı, Ö. G., Yegin, S. Ç., Bardaweel, S. K., & Ghareeb, M. A. (2020). Chemical composition and biological activities of honeybee products from algeria. *Journal of Applied Biotechnology Reports*, 7(2). <https://doi.org/10.30491/jabr.2020.109498>

Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibnsouda, S. K. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. In *Journal of Pharmaceutical Analysis* (Vol. 6, Issue 2). <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>

Baranyi, J., & Roberts, T. A. (1995). Mathematics of predictive food microbiology. *International Journal of Food Microbiology*, 26(2). [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(94\)00121-L](https://doi.org/10.1016/0168-1605(94)00121-L)

Barth, O. M. (2004). Melissopalynology in Brazil: a review of pollen analysis of honeys, propolis and pollen loads of bees. *Scientia Agricola*, 61(3). <https://doi.org/10.1590/s0103-90162004000300018>

Bendifallah, L., Ortiz-Sánchez, F. J., & Correspondence, A. (2018). FLOWERING PLANTS PREFERRED BY NATIVE WILD BEES (HYMENOPTERA, APOIDEA, APIFORMES) IN THE ALGERIAN LITTORAL REGION. *J Fundam Appl Sci*, 10(2). <https://doi.org/10.4314/jfas.v10i2.12>

Bengi, S., Gursoy, O., Güler Dal, H. Ö., & Yilmaz, Y. (2023). Effect of propolis extract addition on some physicochemical, microbiological, and sensory properties of kefir drinks. *Food Science and Nutrition*, 11(11). <https://doi.org/10.1002/fsn3.3671>

Benyahia-Mostefaoui, A., & Lamri-senhadj, M. (2020). Cow's milk: Composition, nutritional, biological and cardioprotective benefits. *Nutrition & Santé*, 09(01). <https://doi.org/10.30952/9.1.1>

Berhe, G., Wasihun, A. G., Kassaye, E., & Gebreselasie, K. (2020). Milk-borne bacterial health hazards in milk produced for commercial purpose in Tigray, northern Ethiopia. *BMC Public Health*, 20(1). <https://doi.org/10.1186/s12889-020-09016-6>

Bezie, A. (2019). The Effect of Different Heat Treatment on the Nutritional Value of Milk and Milk Products and Shelf-Life of Milk Products. A Review. *Journal of Dairy & Veterinary Sciences*, 11(5). <https://doi.org/10.19080/jdvs.2019.11.555822>

Bhattacharya, A., Banu, J., Rahman, M., Causey, J., & Fernandes, G. (2006). Biological effects of conjugated linoleic acids in health and disease. In *Journal of Nutritional Biochemistry* (Vol. 17, Issue 12, pp. 789–810). <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2006.02.009>

Bogdanov, S. (2006). Contaminants of bee products. In *Apidologie* (Vol. 37, Issue 1). <https://doi.org/10.1051/apido:2005043>

Boizot, N., & Charpentier, J.-P. (2006). Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. *Le Cahier Technique de l'Inra*.

Boudebbouz, A., Boudalia, S., Bousbia, A., Gueroui, Y., Boussadia, M. I., Chelaghmia, M. L., Zebsa, R., Affoune, A. M., & Symeon, G. K. (2023). Determination of Heavy Metal Levels and Health Risk Assessment of Raw Cow Milk in Guelma Region, Algeria. *Biological Trace Element Research*, 201(4). <https://doi.org/10.1007/s12011-022-03308-1>

Boulfous, N., Belattar, H., Ambra, R., Pastore, G., & Ghorab, A. (2025). Botanical Origin, Phytochemical Profile, and Antioxidant Activity of Bee Pollen from the Mila Region, Algeria. *Antioxidants*, 14(3). <https://doi.org/10.3390/antiox14030291>

C

Cadwallader, K. R., & Singh, T. K. (2009). Flavours and off-flavours in milk and dairy products. In *Advanced Dairy Chemistry* (Vol. 3). https://doi.org/10.1007/978-0-387-84865-5_14

Calahorrano-Moreno, M. B., Ordoñez-Bailon, J. J., Baquerizo-Crespo, R. J., Dueñas-Rivadeneira, A. A., B. S. M. Montenegro, M. C., & Rodríguez-Díaz, J. M. (2022). Contaminants in the cow's milk we consume? Pasteurization and other technologies in the elimination of contaminants. *F1000Research*, 11, 91. <https://doi.org/10.12688/f1000research.108779.1>

Campos, M. G. R., Bogdanov, S., de Almeida-Muradian, L. B., Szczesna, T., Mancebo, Y., Frigerio, C., & Ferreira, F. (2008). Pollen composition and standardisation of analytical methods. In *Journal of Apicultural Research* (Vol. 47, Issue 2). <https://doi.org/10.1080/00218839.2008.11101443>

Campos, M. G. R., Frigerio, C., Lopes, J., & Bogdanov, S. (2010). What is the future of Bee-Pollen? *Journal of ApiProduct and ApiMedical Science*, 2(4). <https://doi.org/10.3896/ibra.4.02.4.01>

Campos, M. G., Anjos, O., Chica, M., Campoy, P., Nozkova, J., Almaraz-Abarca, N., Barreto, L. M. R. C., Nordi, J. C., Estevinho, L. M., Pascoal, A., Paula, V. B., Chopina, A., Dias, L. G., Tešić, Ž. L. j., Mosić, M. D., Kostić, A., Pešić, M. B., Milojković-Opsenica, D. M., Sickel, W., ... Carreck, N. L. (2021). Standard methods for pollen research. In *Journal of Apicultural Research* (Vol. 60, Issue 4). <https://doi.org/10.1080/00218839.2021.1948240>

Carpes, S. T., Cabral, I. S. R., Luz, C. F. P., Capeletti, J. P., Alencar, S. M., & Masson, M. L. (2009). Palynological and physicochemical characterization of *Apis mellifera* L. bee pollen in the Southern region of Brazil. *Journal of Food, Agriculture and Environment*, 7(3–4).

Catania, A. M., Civera, T., di Ciccio, P. A., Grassi, M. A., Morra, P., & Dalmasso, A. (2021). Characterization of vegetative *Bacillus cereus* and *Bacillus subtilis* strains isolated from processed cheese products in an Italian dairy plant. *Foods*, 10(11). <https://doi.org/10.3390/foods10112876>

Cempírková, R., & Mikulová, M. (2009). Incidence of psychrotrophic lipolytic bacteria in cow's raw milk. *Czech Journal of Animal Science*, 54(2). <https://doi.org/10.17221/1667-cjas>

Ceni, G., Fernandes Silva, M., Valério, C., Cansian, R. L., Oliveira, J. V., Dalla Rosa, C., & Mazutti, M. A. (2016). Continuous inactivation of alkaline phosphatase and *Escherichia coli* in milk using compressed carbon dioxide as inactivating agent. *Journal of CO2 Utilization*, 13. <https://doi.org/10.1016/j.jcou.2015.11.003>

Cf Saraiva, L., Vm Cunha, F., Léllis, D. R., & Nunes, L. C. (2018). Composition, biological activity and toxicity of bee pollen: State of the art [Composición, actividad biológica y toxicidad del polen apícola: Estado-del-arte]. In *AROMÁTICAS* (Vol. 17, Issue 5). www.blacpma.usach.cl

Chandrapala, J., McKinnon, I., Augustin, M. A., & Udabage, P. (2010). The influence of milk composition on pH and calcium activity measured in situ during heat treatment of reconstituted skim milk. *Journal of Dairy Research*, 77(3). <https://doi.org/10.1017/S0022029910000026>

Chang, C. C., Yang, M. H., Wen, H. M., & Chern, J. C. (2002). Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of Food and Drug Analysis*, 10(3). <https://doi.org/10.38212/2224-6614.2748>

Chefrour, C., Draiaia, R., Tahar, A., Ait Kaki, Y., Bennadja, S., & Battesti, M. (2009). Physicochemical characteristics and pollen spectrum of some north-east Algerian honeys. *African Journal of Food, Agriculture, Nutrition and Development*, 9(5). <https://doi.org/10.4314/ajfand.v9i5.45101>

Chemistry, Biology and Potential Applications of Honeybee Plant-Derived Products. (2016). In *Chemistry, Biology and Potential Applications of Honeybee Plant-Derived Products*. <https://doi.org/10.2174/97816810823701160101>

Chen, S., Wang, X., & Cheng, N. (2021). Ultrasound-assisted ethanol extraction of *Actinidia arguta* pollen possesses antioxidant activity and protects DNA from oxidative damage. *Journal of Food Biochemistry*, 45(4). <https://doi.org/10.1111/jfbc.13603>

Chen, Y. (2024). Review on Influence of Food Technology on the Flavor of Dairy Product. *Academic Journal of Science and Technology*, 12(3), 247-252. <https://doi.org/10.54097/fj5eeb78>

Cheng, T., Tang, J., Yang, R., Xie, Y., Chen, L., & Wang, S. (2021). Methods to obtain thermal inactivation data for pathogen control in low-moisture foods. In *Trends in Food Science and Technology* (Vol. 112). <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.03.048>

Cheriguene, A., Chougrani, F., Bekada, A. M. A., el Soda, M., & Bensoltane, A. (2007). Enumeration and identification of lactic microflora in Algerian goats' milk. *African Journal of Biotechnology*, 6(15). <https://doi.org/10.5897/AJB2007.000-2275>

Chethouna, F., Boudjenah, S. H., Beldi, N., & Siboukeur, O. (2022). Comparative study of the physico-chemical and microbiological characteristics of raw and pasteurized camel milk. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 34(10), 850–858. <https://doi.org/10.9755/ejfa.2022.v34.i10.2942>

Çiftçi, M., & Öncül, N. (2024). The viability of microorganism of probiotic yogurt enriched with bee pollen. *CYTA - Journal of Food*, 22(1). <https://doi.org/10.1080/19476337.2024.2319834>

Codex Alimentarius Commission. (2011). Milk and milk products (2nd ed.). FAO/WHO. <https://www.fao.org/4/i2085e/i2085e00.pdf>

Costa, L. V., Gebara, C., Zacaroni, O. d. F., Freitas, N. E., Silva, A. N. d., Prado, C. S., Nunes, I. A., Cavicchioli, V. Q., Duarte, F. O. S., Lage, M. E., Alencar, F. R. d., Machado, B. A. S., Hodel, K. V. S., & Minafra, C. (2024). Antibiotic Residues in Raw Cow's Milk: A Systematic Review of the Last Decade. *Foods*, 13(23), 3758. <https://doi.org/10.3390/foods13233758>

D

Da Porto, C., Porretto, E., & Decorti, D. (2013). Comparison of ultrasound-assisted extraction with conventional extraction methods of oil and polyphenols from grape (*Vitis vinifera* L.) seeds. *Ultrasonics Sonochemistry*, 20(4). <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2012.12.002>

Dai, J., & Mumper, R. J. (2010). Plant phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. In *Molecules* (Vol. 15, Issue 10). <https://doi.org/10.3390/molecules15107313>

Dalgleish, D. G., & Corredig, M. (2012). The structure of the casein micelle of milk and its changes during processing. *Annual Review of Food Science and Technology*, 3(1). <https://doi.org/10.1146/annurev-food-022811-101214>

Damulienė, V., Kaškonienė, V., Kaškonas, P., & Maruška, A. (2023). The Influence of Enzymatic Hydrolysis on Bee Pollen Antioxidant and Antibacterial Activities. *Foods*, 12(19). <https://doi.org/10.3390/foods12193582>

Darwish, A. M. G., Abd El-Wahed, A. A., Shehata, M. G., El-Seedi, H. R., Masry, S. H. D., Khalifa, S. A. M., Mahfouz, H. M., & El-Sohaimy, S. A. (2023). Chemical Profiling and Nutritional Evaluation of Bee Pollen, Bee Bread, and Royal Jelly and Their Role in Functional Fermented Dairy Products. *Molecules*, 28(1). <https://doi.org/10.3390/molecules28010227>

De-Melo, A. A. M., Estevinho, L. M., Moreira, M. M., Delerue-Matos, C., de Freitas, A. da S., Barth, O. M., & de Almeida-Muradian, L. B. (2018). Phenolic profile by HPLC-MS, biological potential, and nutritional value of a promising food: Monofloral bee pollen. *Journal of Food Biochemistry*, 42(5). <https://doi.org/10.1111/jfbc.12536>

De Noni, I., & Cattaneo, S. (2010). Occurrence of β -casomorphins 5 and 7 in commercial dairy products and in their digests following in vitro simulated gastro-intestinal digestion. *Food Chemistry*, 119(2), 560–566. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.06.058>

Denisow, B., & Denisow-Pietrzyk, M. (2016). Biological and therapeutic properties of bee pollen: a review. In *Journal of the science of food and agriculture* (Vol. 96, Issue 13). <https://doi.org/10.1002/jsfa.7729>

Desmaures, N., Bazin, F., & Gué, M. (1997). Microbiological composition of raw milk from selected farms in the Camembert region of Normandy. In *Journal of Applied Microbiology* (Vol. 83).

Di Pasquale, G., Salignon, M., le Conte, Y., Belzunces, L. P., Decourtye, A., Kretzschmar, A., Suchail, S., Brunet, J. L., & Alaux, C. (2013). Influence of Pollen Nutrition on Honey Bee Health: Do Pollen Quality and Diversity Matter? *PLoS ONE*, 8(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072016>

Didaras, N. A., Karatasou, K., Dimitriou, T. G., Amoutzias, G. D., & Mossialos, D. (2020). Antimicrobial activity of bee-collected pollen and beebread: State of the art and future perspectives. In *Antibiotics* (Vol. 9, Issue 11). <https://doi.org/10.3390/antibiotics9110811>

Diyabalanage, S., Kalpage, M. D., Mohotti, D. G., Dissanayake, C. K. K., Fernando, R., Frew, R. D., & Chandrajith, R. (2021). Comprehensive Assessment of Essential and Potentially Toxic Trace Elements in Bovine Milk and Their Feeds in Different Agro-climatic Zones of Sri Lanka. *Biological Trace Element Research*, 199(4). <https://doi.org/10.1007/s12011-020-02242-4>

Dulger Altiner, D., Sandikci Altunatmaz, S., Sabuncu, M., Aksu, F., & Sahan, Y. (2021). In-vitro bioaccessibility of antioxidant properties of bee pollen in Turkey. *Food Science and Technology (Brazil)*, 41. <https://doi.org/10.1590/fst.10220>

E

El Deeb, A. (2017). Utilization of Propolis Extract as A Natural Preservative in Raw Milk. *Journal of Food and Dairy Sciences*, 8(8). <https://doi.org/10.21608/jfds.2017.38890>

El Ghouizi, A., Bakour, M., Laaroussi, H., Ousaaid, D., el Menyiy, N., Hano, C., & Lyoussi, B. (2023). Bee Pollen as Functional Food: Insights into Its Composition and Therapeutic Properties. In *Antioxidants* (Vol. 12, Issue 3). <https://doi.org/10.3390/antiox12030557>

ElHennawy, R. A., Moawad, A. A., Ibrahim, A. S., & Halawa, M. A. (2023). Assessment of Selected Varieties of Cheese Analogues sold in Egyptian Markets. *Egyptian Journal of Chemistry*, 66(10). <https://doi.org/10.21608/EJCHEM.2023.183559.7388>

El Marnissi, B., Belkhou, R., El Ouali Lalami, A., & Bennani, L. (2013). Caractérisation microbiologique et physicochimique du lait cru et de ses dérivés traditionnels Marocains (Lben et Jben). *Les Technologies de Laboratoire*, 8(33), 100–106. <https://www.researchgate.net/publication/291485714>

Elwell, M. W., & Barbano, D. M. (2006). Use of microfiltration to improve fluid milk quality. *Journal of Dairy Science*, 89 Suppl 1. [https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302\(06\)72361-x](https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302(06)72361-x)

Encyclopædia Universalis. (2025). Pollen pollinisation. Universalis Junior. <https://junior.universalis.fr/encyclopedia/pollen>

Escuder-Vieco, D., Vázquez-Román, S., Sánchez-Pallás, J., Ureta-Velasco, N., Mosqueda-Peña, R., & Pallás-Alonso, C. R. (2016). Determination of Acidity in Donor Milk. *Journal of Human Lactation*, 32(4). <https://doi.org/10.1177/0890334415591338>

Evershed, R. P., Payne, S., Sherratt, A. G., Copley, M. S., Coolidge, J., Urem-Kotsu, D., Kotsakis, K., Özdoğan, M., Özdoğan, A. E., Nieuwenhuyse, O., Akkermans, P. M. M. G., Bailey, D., Andeescu, R. R., Campbell, S., Farid, S., Hodder, I., Yalman, N., Özbaşaran, M., Biçakci, E., ... Burton, M. M. (2008). Earliest date for milk use in the Near East and southeastern Europe linked to cattle herding. *Nature*, 455(7212). <https://doi.org/10.1038/nature07180>

F

Fabro, M. A., Milanesio, H. v., Robert, L. M., Speranza, J. L., Murphy, M., Rodríguez, G., & Castañeda, R. (2006). Technical Note: Determination of acidity in whole raw milk: Comparison of results obtained by two different analytical methods. *Journal of Dairy Science*, 89(3). [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72149-X](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72149-X)

Fatrcová-Šramková, K., Nôžková, J., Kačániová, M., Máriássyová, M., Rovná, K., & Stričík, M. (2013). Antioxidant and antimicrobial properties of monofloral bee pollen. *Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, 48(2). <https://doi.org/10.1080/03601234.2013.727664>

Fatrcová-Šramková, K., Nôžková, J., Máriássyová, M., & Kačániová, M. (2016). Biologically active antimicrobial and antioxidant substances in the *Helianthus annuus* L. bee pollen. *Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, 51(3). <https://doi.org/10.1080/03601234.2015.1108811>

Feas, X., Vazquez-Tato, M. P., Estevinho, L., Seijas, J. A., & Iglesias, A. (2012). Organic bee pollen: Botanical origin, nutritional value, bioactive compounds, antioxidant activity and microbiological quality. *Molecules*, 17(7). <https://doi.org/10.3390/molecules17078359>

Fereja, A. B., Aboretugn, N. F., & Bulti, N. Q. (2023). Determination of Microbial Hygiene Indicators of Raw Cow Milk in Assosa District, Ethiopia. *Journal of Food Quality*, 2023. <https://doi.org/10.1155/2023/6769108>

Fernández-Martán, F. (1972). Influence of temperature and composition on some physical properties of milk and milk concentrates. II. Viscosity. *Journal of Dairy Research*, 39(1). <https://doi.org/10.1017/S0022029900013868>

Figueiredo, T. M., Santana, J. da M., Granzotto, F. H. B., Anjos, B. S. dos, Guerra Neto, D., Azevedo, L. M. G., & Pereira, M. (2024). Pesticide contamination of lactating mothers' milk in Latin America: a systematic review. *Revista De Saúde Pública*, 58(1), 19. <https://doi.org/10.11606/s1518-8787.2024058005446>

Filipiak, M., Kuszewska, K., Asselman, M., Denisow, B., Stawiarz, E., Woyciechowski, M., & Weiner, J. (2017). Ecological stoichiometry of the honeybee: Pollen diversity and adequate species composition are needed to mitigate limitations imposed on the growth and development of bees by pollen quality. *PLoS ONE*, 12(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183236>

Flanjak, I., Bilić Rajs, B., & Drača, N. (2023). Physicochemical characteristics of bee pollen collected from Virovitica-Podravina County. *Croatian Journal of Food Science and Technology*, 15(2), 185–194. <https://doi.org/10.17508/cjfst.2023.15.2.06>

Forss, D. A. (1969). Flavors of Dairy Products: A Review of Recent Advances. In *Journal of Dairy Science* (Vol. 52, Issue 6). [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(69\)86659-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(69)86659-2)

Fox, P. F., Uniacke-Lowe, T., McSweeney, P. L. H., & O'Mahony, J. A. (2015). Dairy chemistry and biochemistry, second edition. In *Dairy Chemistry and Biochemistry*, Second Edition. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-14892-2>

Fratini, F., Cilia, G., Turchi, B., & Felicioli, A. (2016). Beeswax: A minireview of its antimicrobial activity and its application in medicine. In *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* (Vol. 9, Issue 9). <https://doi.org/10.1016/j.apjtm.2016.07.003>

Francenia Santos-Sánchez, N., Salas-Coronado, R., Villanueva-Cañongo, C., & Hernández-Carlos, B. (2019). Antioxidant Compounds and Their Antioxidant Mechanism. In *Antioxidants*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.85270>

Fuenmayor B, C., Zuluaga D, C., Díaz M, C., Quicazán de C, M., Cosio, M., & Mannino, S. (2014). Evaluation of the physicochemical and functional properties of Colombian bee pollen. *Revista MVZ Córdoba*, 19(1). <https://doi.org/10.21897/rmvz.120>

G

Gagara, M. H., Sessou, P., Dossa, F. S. P., Azokpota, P., Youssao, I. A. K., Gouro, S. A., & Farougou, S. (2022). Hygienic quality of raw and fermented cow milk in the local milk sector of the Liptako-Gourma area in Niger. *Veterinary world*, 15(6), 1541–1549. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2022.1541-1549>

Gallego, M., & Puschner, B. (2020). Chemical hazards in milk and dairy products. In B. Puschner (Ed.), *Chemical hazards in food of animal origin* (pp. 283–308). Wageningen Academic Publishers. https://doi.org/10.3920/978-90-8686-877-3_15

Garedew, L., Berhanu, A., Mengesha, D., & Tsegay, G. (2012). Identification of gram-negative bacteria from critical control points of raw and pasteurized cow milk consumed at Gondar town and its suburbs, Ethiopia. *BMC Public Health*, 12(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2458-12-950>

Gaucheron, F. (2005). The minerals of milk. In *Reproduction Nutrition Development* (Vol. 45, Issue 4). <https://doi.org/10.1051/rnd:2005030>

Gaucheron, F. (2011). Milk and dairy products: A unique micronutrient combination. *Journal of the American College of Nutrition*, 30, 400S-409S. <https://doi.org/10.1080/07315724.2011.10719983>

Gercek, Y. C., Celik, S., & Bayram, A. S. (2022). Screening of plant pollen sources, polyphenolic compounds, fatty acids and antioxidant/antimicrobial activity from bee pollen. *Molecules*, 27(1). <https://doi.org/10.3390/molecules27010117>

Ghosh, S., Sarkar, T., Chakraborty, R., Shariati, M. A., & Simal-Gandara, J. (2022). Nature's palette: An emerging frontier for coloring dairy products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 64(6), 1508–1552. <https://doi.org/10.1080/10408398.2022.2117785>

González-Chávez, S. A., Arévalo-Gallegos, S., & Rascón-Cruz, Q. (2009). Lactoferrin: structure, function and applications. In *International Journal of Antimicrobial Agents* (Vol. 33, Issue 4, p. 301.e1-301.e8). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2008.07.020>

Glušac, J. R., Stijepić, M. J., Milanović, S. D., & Durdević-Milošević, D. M. (2015). Physicochemical properties of honeybee pollen enriched acidophilus milk and probiotic yoghurt. *Acta Periodica Technologica*, 46. <https://doi.org/10.2298/APT1546045G>

Griffiths, M. W., Phillips, J. D., & Muir, D. D. (1987). Effect of low-temperature storage on the bacteriological quality of raw milk. In *Food Microbiology* (Vol. 4).

Glušac, J. R., Stijepić, M. J., Milanović, S. D., & Durdević-Milošević, D. M. (2015). Physicochemical properties of honeybee pollen enriched acidophilus milk and probiotic yoghurt. *Acta Periodica Technologica*, 46. <https://doi.org/10.2298/APT1546045G>

Gül, A., & Pehlivan, T. (2018). Antioxidant activities of some monofloral honey types produced across Turkey. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 25(6). <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2018.02.011>

Gume, B., Berhanu, L., Kassa, T., Bediru, H., Fikre, A. G., Dadi, L. S., & Mereta, S. T. (2023). Bacterial hazard identification and exposure assessment of raw milk consumption in Jimma zone, South West Ethiopia. *BMC Microbiology*, 23(1). <https://doi.org/10.1186/s12866-023-02910-0>

Guo, M., & Wang, G. (2019). Whey protein production, chemistry, functionality, and applications. In *Whey Protein Production, Chemistry, Functionality, and Applications*. <https://doi.org/10.1002/9781119256052>

H

Hamiroune M., Berber. A., Boubekour. S. (2014). Qualité bactériologique du lait cru de vaches locales et améliorées vendu dans les régions de Jijel et de Blida (Algérie) et impact sur la santé publique. In *Ann. Méd. Vét* (Vol. 158).

Hamiroune, M., Berber, A., & Boubekour, S. (2016). Evaluation of the bacteriological quality of raw cow's milk at various stages of the milk production chain on farms in Algeria. In *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz* (Vol. 35, Issue 3).

Hanuš, O., Frelich, J., Tomáška, M., Vylětlova, M., Genčurová, V., Kučera, J., & Trínáctý, J. (2010). The analysis of relationships between chemical composition, physical, technological and health indicators and freezing point in raw cow milk. *Czech Journal of Animal Science*, 55(1). <https://doi.org/10.17221/1708-cjas>

Haug, A., Høstmark, A. T., & Harstad, O. M. (2007). Bovine milk in human nutrition - A review. In *Lipids in Health and Disease* (Vol. 6). <https://doi.org/10.1186/1476-511X-6-25>

He, T., Priebe, M. G., Zhong, Y., Huang, C., Harmsen, H. J. M., Raangs, G. C., Antoine, J. M., Welling, G. W., & Vonk, R. J. (2008). Effects of yogurt and bifidobacteria supplementation on the colonic microbiota in lactose-intolerant subjects. *Journal of Applied Microbiology*, 104(2), 595–604. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03579.x>

Hemmami, H., ben Seghir, B., ben Ali, M., Rebiai, A., Zeghoud, S., & Brahmia, F. (2020). Phenolic profile and antioxidant activity of bee pollen extracts from different regions of Algeria. *Ovidius University Annals of Chemistry*, 31(2), 93–98. <https://doi.org/10.2478/auoc-2020-0017>

Horne, D. S. (2006). Casein micelle structure: Models and muddles. In *Current Opinion in Colloid and Interface Science* (Vol. 11, Issues 2–3). <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2005.11.004>

I

Ilboudo, A., Savadogo, A., Seydi, M., & Traore, A. (2013). Place de la matière azotée dans le mécanisme de la coagulation présure du lait. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 6(6). <https://doi.org/10.4314/ijbcs.v6i6.35>

Ilie, C. I., Oprea, E., Geana, E. I., Spoiala, A., Buleandra, M., Pircalabioru, G. G., Badea, I. A., Ficai, D., Andronescu, E., Ficai, A., & Ditu, L. M. (2022). Bee Pollen Extracts: Chemical Composition, Antioxidant Properties, and Effect on the Growth of Selected Probiotic and Pathogenic Bacteria. *Antioxidants*, 11(5). <https://doi.org/10.3390/antiox11050959>

Insel P, Turner E, Ross D. Nutrition. 2nd ed. Jones and Bartlett Publishers; 628 2003. p. Jones and Bartlett Publishers.

International Dairy Federation. (2015). *Bulletin of the International Dairy Federation the World Dairy Situation 2015 VIEW THE UPCOMING IDF EVENTS AT:* <http://www.fil-idf.org/EventsCalendar.htm>. www.fil-idf.org

IOM. Dietary Reference Intakes. 2012.

İzol, E., Turhan, M., Yılmaz, M. A., Çağlayan, C., & Gülçin, İ. (2025). Determination of Antioxidant, Antidiabetic, Anticholinergic, Antiglaucoma Properties and Comprehensive Phytochemical Content by LC-MS/MS of Bingöl Honeybee Pollen. *Food Science and Nutrition*, 13(3). <https://doi.org/10.1002/fsn3.4531>

J

Jayarao, B. M., & Henning, D. R. (2001). Prevalence of foodborne pathogens in bulk tank milk. *Journal of Dairy Science*, 84(10), 2157–2162. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(01\)74661-9](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(01)74661-9)

Jenkins, T. C., & McGuire, M. A. (2006). Major advances in nutrition: Impact on milk composition. *Journal of Dairy Science*, 89(4). [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72198-1](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72198-1)

Jenssen, H., & Hancock, R. E. W. (2009). Antimicrobial properties of lactoferrin. In *Biochimie* (Vol. 91, Issue 1, pp. 19–29). <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2008.05.015>

Jilo, Kasim. (2021). A study of antimicrobial activities of aqueous and ethanolic extract of bee pollen against. 10.21203/rs.3.rs-819311/v1.

Jonker, J. S., Kohn, R. A., & Erdman, R. A. (1998). Using Milk Urea Nitrogen to Predict Nitrogen Excretion and Utilization Efficiency in Lactating Dairy Cows. *Journal of Dairy Science*, 81(10). [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(98\)75825-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(98)75825-4)

JOURNET, M., VERITE, R., & VIGNON, B. (1975). L'azote non protéique du lait : facteurs de variation. *Le Lait*, 55(543–544). <https://doi.org/10.1051/lait:1975543-54414>

K

Kanar, Y., & Mazi, B. G. (2019). Effect of different drying methods on antioxidant characteristics of bee-pollen. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 13(4). <https://doi.org/10.1007/s11694-019-00283-5>

Karabagias, I. K., Karabagias, V. K., Gatzias, I., & Riganakos, K. A. (2018). Bio-functional properties of bee pollen: The case of “bee pollen yoghurt.” *Coatings*, 8(12). <https://doi.org/10.3390/coatings8120423>

Kaškonienė, V., & Venskutonis, P. R. (2010). Floral Markers in Honey of Various Botanical and Geographic Origins: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9(6). <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2010.00130.x>

Keba, A., Rolon, M. L., Tamene, A., Dessie, K., Vipham, J., Kovac, J., & Zewdu, A. (2020). Review of the prevalence of foodborne pathogens in milk and dairy products in Ethiopia. In *International Dairy Journal* (Vol. 109). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2020.104762>

Kebede, G., Girma, K., Tilahun, Z., & Haimanot, D. (2014). Review on Milk Safety with Emphasis on Its Public Health. *World Journal of Dairy & Food Sciences*, 9(2), 166–183. <https://doi.org/10.5829/idosi.wjdfs.2014.9.2.85184>

Khadra, L., Kamel, M., Hamama, B., Ibrahim, D., & Daoud, H. (2019). CHEMICAL COMPOSITION, ANTIOXIDANT AND ANTIMICROBIAL ACTIVITIES OF ALGERIAN BEE POLLEN (INULA VISCOSA) METHANOLIC EXTRACT. *International Journal of Research in Pharmacy and Chemistry*, 9(4). <https://doi.org/10.33289/ijrpc.9.4.2019.972>

Khalifa, S. A. M., Elashal, M. H., Yosri, N., Du, M., Musharraf, S. G., Nahar, L., Sarker, S. D., Guo, Z., Cao, W., Zou, X., Abd El-Wahed, A. A., Xiao, J., Omar, H. A., Hegazy, M. E. F., & El-Seedi, H. R. (2021). Bee pollen: Current status and therapeutic potential. In *Nutrients* (Vol. 13, Issue 6). <https://doi.org/10.3390/nu13061876>

Khider, M., Elbanna, K., Mahmoud, A., & Owayss, A. A. (2013). Egyptian honeybee pollen as antimicrobial, antioxidant agents, and dietary food supplements. *Food Science and Biotechnology*, 22(5). <https://doi.org/10.1007/s10068-013-0238-y>

Kilcawley, K. N., Faulkner, H., Clarke, H. J., O’Sullivan, M. G., & Kerry, J. P. (2018). Factors influencing the flavour of bovine milk and cheese from grass based versus non-grass-based milk production systems. In *Foods* (Vol. 7, Issue 3). <https://doi.org/10.3390/foods7030037>

Kizilpınar-Temiz, I., Guder, A., Candan, E. D., & Yolcu, U. (2022). Antioxidant properties, element contents and antimicrobial activities of bee pollen collected by *Apis mellifera* L. in Türkiye. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 20(4). <https://doi.org/10.5424/sjar/2022204-18826>

Klein, A. M., Vaissière, B. E., Cane, J. H., Steffan-Dewenter, I., Cunningham, S. A., Kremen, C., & Tscharntke, T. (2007). Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. In *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* (Vol. 274, Issue 1608). <https://doi.org/10.1098/rspb.2006.3721>

Komosinska-Vassev, K., Olczyk, P., Kaźmierczak, J., Mencner, L., & Olczyk, K. (2015). Bee pollen: Chemical composition and therapeutic application. In *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine* (Vol. 2015). <https://doi.org/10.1155/2015/297425>

Kontominas, M. G. (2019). Packaging and the Shelf Life of Milk: Recent Developments. In *Reference Module in Food Science*. <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-100596-5.22646-2>

Korhonen, H., & Pihlanto, A. (2006). Bioactive peptides: Production and functionality. In *International Dairy Journal* (Vol. 16, Issue 9). <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2005.10.012>

Kostić, A., Milinčić, D. D., Barać, M. B., Shariati, M. A., Tešić, Ž. L., & Pešić, M. B. (2020). The application of pollen as a functional food and feed ingredient—the present and perspectives. In *Biomolecules* (Vol. 10, Issue 1). <https://doi.org/10.3390/biom10010084>

Krishnan, A. v., & Feldman, D. (2011). Mechanisms of the anti-cancer and anti-inflammatory actions of vitamin D. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 51, 311–336. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010510-100611>

L

Laaroussi, H., Ferreira-Santos, P., Genisheva, Z., Bakour, M., Ousaid, D., el Ghouizi, A., Teixeira, J. A., & Lyoussi, B. (2023). Unveiling the techno-functional and bioactive properties of bee pollen as an added-value food ingredient. *Food Chemistry*, 405. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.134958>

Lawag, I. L., Yoo, O., Lim, L. Y., Hammer, K., & Locher, C. (2021). Optimisation of bee pollen extraction to maximise extractable antioxidant constituents. *Antioxidants*, 10(7). <https://doi.org/10.3390/antiox10071113>

Le Feunteun, S., Barbé, F., Rémond, D., Ménard, O., le Gouar, Y., Dupont, D., & Laroche, B. (2014). Impact of the Dairy Matrix Structure on Milk Protein Digestion Kinetics: Mechanistic Modelling Based on Mini-pig In Vivo Data. *Food and Bioprocess Technology*, 7(4). <https://doi.org/10.1007/s11947-013-1116-6>

Leja, M., Mareczek, A., Wyzgolik, G., Klepacz-Baniak, J., & Czekońska, K. (2007). Antioxidative properties of bee pollen in selected plant species. *Food Chemistry*, 100(1). <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.09.047>

Leonhardt, S. D., & Blüthgen, N. (2012). The same, but different: Pollen foraging in honeybee and bumblebee colonies. *Apidologie*, 43(4). <https://doi.org/10.1007/s13592-011-0112-y>

Lewis, M. J., & Deeth, H. C. (2009). Heat Treatment of Milk. In *Milk Processing and Quality Management* (pp. 168–204). Wiley-Blackwell. <https://doi.org/10.1002/9781444301649.ch7>

Li, S., Ye, A., & Singh, H. (2019). Seasonal variations in composition, properties, and heat-induced changes in bovine milk in a seasonal calving system. *Journal of Dairy Science*, 102(9). <https://doi.org/10.3168/jds.2019-16685>

Li, W., Chen, H., Xu, B., Wang, Y., Zhang, C., Cao, Y., & Xing, X. (2023). Research progress on classification, sources and functions of dietary polyphenols for prevention and treatment of chronic diseases. In *Journal of Future Foods* (Vol. 3, Issue 4). <https://doi.org/10.1016/j.jfutfo.2023.03.001>

Lim, S. H., Chin, N. L., Sulaiman, A., Tay, C. H., & Wong, T. H. (2022). Sensory Analysis for Cow Milk Product Development Using High Pressure Processing (HPP) in the Dairy Industry. *Foods*, 11(9). <https://doi.org/10.3390/foods11091233>

Lin, T., Meletharayil, G., Kapoor, R., & Abbaspourrad, A. (2021). Bioactives in bovine milk: Chemistry, technology, and applications. In *Nutrition Reviews* (Vol. 79). <https://doi.org/10.1093/nutrit/nuab099>

Lindmark Månsson, H. (2008). Fatty acids in bovine milk fat. *Food and Nutrition Research*, 52. <https://doi.org/10.3402/fnr.v52i0.1821>

Lindmark-Månsson, H., Fondén, R., & Pettersson, H. E. (2003). Composition of Swedish dairy milk. *International Dairy Journal*, 13(6), 409–425. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(03\)00032-3](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(03)00032-3)

Lindnera, J. D. D., & Lindnera, J. D. D. (2024). Critical analysis of the use of preservatives sorbic acid and potassium sorbate in yogurts in light of Brazilian legislation. *Biotechnology Research and Innovation*, 8(2), e2024018. <https://doi.org/10.4322/biori.00182024>

Lindsay, D., Robertson, R., Fraser, R., Engstrom, S., & Jordan, K. (2021). Heat induced inactivation of microorganisms in milk and dairy products. In *International Dairy Journal* (Vol. 121). <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2021.105096>

Little, E. M., & Holt, C. (2004). An equilibrium thermodynamic model of the sequestration of calcium phosphate by casein phosphopeptides. *European Biophysics Journal*, 33(5), 435–447. <https://doi.org/10.1007/s00249-003-0376-x>

Lomer, M. C. E., Parkes, G. C., & Sanderson, J. D. (2008). Review article: Lactose intolerance in clinical practice - Myths and realities. In *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* (Vol. 27, Issue 2, pp. 93–103). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2007.03557.x>

Lonnerdal, B. (1985). Dietary factors affecting trace element bioavailability from human milk, cow's milk and infant formulas. In *Progress in food & nutrition science* (Vol. 9, Issues 1–2).

Loor-Giler, A., Robayo-Chico, M., Puga-Torres, B., Hernandez-Alomia, F., Santander-Parra, S., Piantino Ferreira, A., Muslin, C., & Nuñez, L. (2025). Escherichia coli O157:H7, a Common Contaminant of Raw Milk from Ecuador: Isolation and Molecular Identification. *Foods*, 14(3), 410. <https://doi.org/10.3390/foods14030410>

Lounis, Mohamed & Harfouche, Laid. (2020). PHYSICOCHEMICAL CHARACTERISTICS OF RAW MILK MARKETING IN THE CITY OF DJELFA, ALGERIA. *Agricultura*. 113. 10.15835/agrisp. v113i1-2.13579.

Luan Souza. (2022). the-role-of-pasteurization-methods-and-benefits-of-pasteurized-milk-in-todays-daily-life.

Luzardo-Ocampo, I., Ramírez-Jiménez, A. K., Yañez, J., Mojica, L., & Luna-Vital, D. A. (2021). Technological applications of natural colorants in food systems: A review. In *Foods* (Vol. 10, Issue 3). <https://doi.org/10.3390/foods10030634>

M

Ma, S., Tu, X., Dong, J., Long, P., Yang, W., Miao, X., Chen, W., & Wu, Z. (2015). Soxhlet-assisted matrix solid phase dispersion to extract flavonoids from rape (*Brassica campestris*) bee pollen. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 1005. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2015.09.038>

Ma, Y., Li, J., Huang, Y., Liu, X., Dou, N., Zhang, X., Hou, J., & Ma, J. (2023). Physicochemical stability and in vitro digestibility of goat milk affected by freeze-thaw cycles. *Food Chemistry*, 404. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.134646>

Maguire, M. E., & Cowan, J. A. (2002). Magnesium chemistry and biochemistry. In *BioMetals* (Vol. 15, Issue 3). <https://doi.org/10.1023/A:1016058229972>

Maréchal, C. le, Thiéry, R., Vautor, E., & Loir, Y. le. (2011). Mastitis impact on technological properties of milk and quality of milk products-A review. In *Dairy Science and Technology* (Vol. 91, Issue 3). <https://doi.org/10.1007/s13594-011-0009-6>

Mărghitaș, L. A., Stanciu, O. G., Dezmirean, D. S., Bobiș, O., Popescu, O., Bogdanov, S., & Campos, M. G. (2009). In vitro antioxidant capacity of honeybee-collected pollen of selected floral origin harvested from Romania. *Food Chemistry*, 115(3). <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.01.014>

Martin, N. H., Ranieri, M. L., Murphy, S. C., Ralyea, R. D., Wiedmann, M., & Boor, K. J. (2011). Results from raw milk microbiological tests do not predict the shelf-life performance of commercially pasteurized fluid milk. *Journal of Dairy Science*, 94(3), 1211–1222. <https://doi.org/10.3168/jds.2010-3915>

- Martin, N. H., Trmcic, A., Hsieh, T. H., Boor, K. J., & Wiedmann, M. (2016).** The evolving role of coliforms as indicators of unhygienic processing conditions in dairy foods. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 7, Issue SEP). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01549>
- Martinello, M., & Mutinelli, F. (2021).** Antioxidant activity in bee products: A review. In *Antioxidants* (Vol. 10, Issue 1). <https://doi.org/10.3390/antiox10010071>
- Mcgann, T. C. A., Buchheim, W., Kearney, R. D., & Richardson, T. (1983).** Composition and ultrastructure of calcium phosphate-citrate complexes in bovine milk SYSTEMS. In *Biochimica et Biophysica Acta* (Vol. 760).
- Mehdi, Y., Hornick, J. L., Istasse, L., & Dufrasne, I. (2013).** Selenium in the environment, metabolism and involvement in body functions. In *Molecules* (Vol. 18, Issue 3). <https://doi.org/10.3390/molecules18033292>
- Mejares, C. T., Huppertz, T., & Chandrapala, J. (2022).** Thermal processing of buffalo milk – A review. In *International Dairy Journal* (Vol. 129). <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2021.105311>
- Mildenhall, D. C., Wiltshire, P. E. J., & Bryant, V. M. (2006).** Forensic palynology: Why do it and how it works. In *Forensic Science International* (Vol. 163, Issue 3). <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2006.07.012>
- Mills, S., Ross, R. P., Hill, C., Fitzgerald, G. F., & Stanton, C. (2011).** Milk intelligence: Mining milk for bioactive substances associated with human health. In *International Dairy Journal* (Vol. 21, Issue 6, pp. 377–401). <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2010.12.011>
- Mimoune, N., Seddiki, S., Baazizi, R., Saboundji, I. E., Saidi, R., Khelef, D., & Kaidi, R. (2021).** Antibiotic residues in cow's milk. *Veterinarska Stanica*, 52(5). <https://doi.org/10.46419/vs.52.5.9>
- Mironova, I. v., Galieva, Z. A., Konovalov, S., Bychkova, T. S., Baydan, D. v., & Rozhkov, K. A. (2020).** Enrichment of milk ice cream with bee products. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, 613(1). <https://doi.org/10.1088/1755-1315/613/1/012082>
- Morais, M., Moreira, L., Feás, X., & Estevinho, L. M. (2011).** Honeybee-collected pollen from five Portuguese Natural Parks: Palynological origin, phenolic content, antioxidant properties and antimicrobial activity. *Food and Chemical Toxicology*, 49(5). <https://doi.org/10.1016/j.fct.2011.01.020>
- Mosić, M., Trifković, J., Vovk, I., Gašić, U., Tešić, Ž., Šikoparija, B., & Milojković-Opsenica, D. (2019).** Phenolic composition influences the health-promoting potential of bee-pollen. *Biomolecules*, 9(12). <https://doi.org/10.3390/biom9120783>
- MOTTAR, J. (1984).** Influence de la durée de conservation sous réfrigération du lait cru sur la conservabilité du lait U.H.T. *Le Lait*, 64(635–637). <https://doi.org/10.1051/lait:1984635-6373>

MOURGUES, R., AUCLAIR, J., & DESCHAMPS, N. (1973). Durée de conservation à 4° C et 8° C du lait pasteurisé conditionné aseptiquement. *Le Lait*, 53(528). <https://doi.org/10.1051/lait:197352820>

Murphy, S. C., & Boor, K. J. (2000). Trouble-shooting sources and causes of high bacteria counts in raw milk. *Dairy, Food and Environmental Sanitation*, 20(8).

N

National Research Council. 2001. Nutrient Requirements of Dairy Cattle: Seventh Revised Edition, 2001. Washington, DC: The National Academies Press. <https://doi.org/10.17226/9825>.

NİSBET, C., & TABATABAEİ, P. (2021). Investigation of phenolic compounds and antioxidant capacity of bee pollen collected from different geographical regions in Turkey. *Kocatepe Veterinary Journal*. <https://doi.org/10.30607/kvj.846905>

O

Odoux, J. F., Aupinel, P., Gateff, S., Requier, F., Henry, M., & Bretagnolle, V. (2014). ECOBEE: A tool for long-term honey bee colony monitoring at the landscape scale in West european intensive agroecosystems. *Journal of Apicultural Research*, 53(1). <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.53.1.05>

Oecd-fao. (2016). *OECD-FAO Agricultural Outlook 2016-2025 Special focus: sub-saharan africa*.

Olga Kozak, S. R. P. J. C. G. (2022). *World dairy market Challenges and opportunities*.

Oliver, S. P., Jayarao, B. M., & Almeida, R. A. (2005). Review Foodborne Pathogens in Milk and the Dairy Farm Environment: Food Safety and Public Health Implications. In *FOODBORNE PATHOGENS AND DISEASE* (Vol. 2, Issue 2). www.liebertpub.com

Onyeaka, H. N., & Nwabor, O. F. (2022). Food Preservation and Safety of Natural Products. In *Food Preservation and Safety of Natural Products*. <https://doi.org/10.1016/C2020-0-02892-6>

Ogbu, K. I., ochai, S. O., olabode, M. P., olaolu, O. S., maimadu, A. A., gurama, (2018). Comparative Study on the Antibacterial Activities of Bee Product (Propolis, Pollen, Bee Wax and Honey). *IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences* (IOSR-JPBS, 13(2), 20–27. <https://doi.org/10.9790/3008-1302022027>

Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO), Le lait et les produits laitiers dans la nutrition humaine, Collection FAO : Alimentation et nutrition, 1998, n° 28, ISBN 92-5-20534-6

Özcan, M. M., Aljuhaimi, F., Babiker, E. E., Uslu, N., Ceylan, D. A., Ghafoor, K., Özcan, M. M., Dursun, N., Ahmed, I. M., Jamiu, F. G., & Alsawmahi, O. N. (2019). Determination of antioxidant activity, phenolic compound, mineral contents and fatty acid compositions of bee pollen grains collected from different locations. *Journal of Apicultural Science*, 63(1). <https://doi.org/10.2478/jas-2019-0004>

P

Panthi, R. R., Kelly, A. L., Sheehan, J. J., Bulbul, K., Vollmer, A. H., & McMahon, D. J. (2019). Influence of protein concentration and coagulation temperature on rennet-induced gelation characteristics and curd microstructure. *Journal of Dairy Science*, 102(1). <https://doi.org/10.3168/jds.2018-15039>

Park, Y. W., Juárez, M., Ramos, M., & Haenlein, G. F. W. (2007). Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk. *Small Ruminant Research*, 68(1–2). <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2006.09.013>

Parmar, P., Lopez-Villalobos, N., Tobin, J. T., Murphy, E., McDonagh, A., Crowley, S. v., Kelly, A. L., & Shalloo, L. (2020). The effect of compositional changes due to seasonal variation on milk density and the determination of season-based density conversion factors for use in the dairy industry. *Foods*, 9(8). <https://doi.org/10.3390/foods9081004>

Pascoal, A., Rodrigues, S., Teixeira, A., Feás, X., & Estevinho, L. M. (2014). Biological activities of commercial bee pollens: Antimicrobial, antimutagenic, antioxidant and anti-inflammatory. *Food and Chemical Toxicology*, 63. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.11.010>

Pasupuleti, V. R., Sammugam, L., Ramesh, N., & Gan, S. H. (2017). Honey, Propolis, and Royal Jelly: A Comprehensive Review of Their Biological Actions and Health Benefits. In *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* (Vol. 2017). <https://doi.org/10.1155/2017/1259510>

Patil, P., Wadehra, A., Garg, V., Munjal, K., Tomar, S. K., & Mandal, S. (2015). Biofunctional properties of milk protein derived bioactive peptides -A review. *Asian Journal of Dairy and Food Research*, 34(4). <https://doi.org/10.18805/ajdfr.v34i4.6873>

Pesce, A., Salzano, C., Felice, A. de, Garofalo, F., Liguori, S., Santo, A. de, Palermo, P., & Guarino, A. (2016). Monitoring the freezing point of buffalo milk. *Italian Journal of Food Safety*, 5(2). <https://doi.org/10.4081/ijfs.2016.5691>

Pereira, P. C. (2014). Milk nutritional composition and its role in human health. In *Nutrition* (Vol. 30, Issue 6, pp. 619–627). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2013.10.011>

Pereira, P. C., & Vicente, F. (2017). Milk Nutritive Role and Potential Benefits in Human Health. In *Nutrients in Dairy and their Implications for Health and Disease* (pp. 161–176). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809762-5.00013-9>

Pollen Terminology. (2009). In *Pollen Terminology*. <https://doi.org/10.1007/978-3-211-79894-2>

Q

Qin, Y., Leydon, A. R., Manziello, A., Pandey, R., Mount, D., Denic, S., Vasic, B., Johnson, M. A., & Palanivelu, R. (2009). Penetration of the stigma and style elicits a novel transcriptome in pollen tubes, pointing to genes critical for growth in a pistil. *PLoS Genetics*, 5(8).<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000621>

Quigley, L., O’Sullivan, O., Stanton, C., Beresford, T. P., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., & Cotter, P. D. (2013). The complex microbiota of raw milk. In *FEMS Microbiology Reviews* (Vol. 37, Issue 5, pp. 664–698). <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12030>

R

Rana, A. (2021). Antibacterial, Antifungal and Antihelminthic Properties of Ethanolic, Methanolic and Water Extracts of Pollen. *Journal of Pharmaceutical Research International*, 33(53B), 78–88. <https://doi.org/10.9734/jpri/2021/v33i53B33682>

Raats, D., Offek, M., Minz, D., & Halpern, M. (2011). Molecular analysis of bacterial communities in raw cow milk and the impact of refrigeration on its structure and dynamics. *Food Microbiology*, 28(3). <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.10.009>

Rabbani, A., Ayyash, M., D’Costa, C. D. C., Chen, G., Xu, Y., & Kamal-Eldin, A. (2025). Effect of Heat Pasteurization and Sterilization on Milk Safety, Composition, Sensory Properties, and Nutritional Quality. *Foods*, 14(8), 1342. <https://doi.org/10.3390/foods14081342>

Rafiq, S., Huma, N., Pasha, I., Sameen, A., Mukhtar, O., & Khan, M. I. (2016). Chemical composition, nitrogen fractions and amino acids profile of milk from different animal species. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 29(7). <https://doi.org/10.5713/ajas.15.0452>

Règlement (CE) n° 853/2004 du Parlement européen et du Conseil du 29 avril 2004, annexe III, section IX, chapitre I.<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/FR/TXT/?uri=CELEX%3A32004R0853>

Renner, E. 1983. Milk and dairy products in human nutrition. München, Volkswirtschaftlicher Verlag. 450 pages. Lipides

Renner, E. 1989. Micronutrients in milk and milk-based food products. London, Elsevier Applied Science. 311 pages.vitamines

République Algérienne Démocratique et Populaire. (2017). Arrêté interministériel du 4 octobre 2016 fixant les critères microbiologiques des denrées alimentaires. Journal Officiel de la République Algérienne, (39), 11–32. <https://www.joradp.dz/FTP/JO-FRANCAIS/2017/F2017039.pdf>

Requier, F., Odoux, J. F., Tamic, T., Moreau, N., Henry, M., Decourtye, A., & Bretagnolle, V. (2015). Honey bee diet in intensive farmland habitats reveals an unexpectedly high flower richness and a major role of weeds. *Ecological Applications*, 25(4). <https://doi.org/10.1890/14-1011.1>

Rizani, H., Cabeli, P., Jashari, B., Shala, S., Rizani, M., & Kamberi, N. (2018). Determination of Aerobic Mesophilic Bacteria and Coliforms in Raw Milk in the Region of Kosovo. *Albanian j. Agric. Sci*, 17(1).

Roulston, T. H., & Cane, J. H. (2000). Plant Systematics and Evolution Pollen nutritional content and digestibility for animals. *Plant Syst. Evol*, 222.

Ryu, S., Shin, M., Yun, B., Lee, W., Choi, H., Kang, M., Oh, S., & Kim, Y. (2021). Bacterial quality, prevalence of pathogens, and molecular characterization of biofilm-producing staphylococcus aureus from korean dairy farm environments. *Animals*, 11(5). <https://doi.org/10.3390/ani11051306>

Rzepecka-Stojko, A., Pilawa, B., Ramos, P., & Stojko, J. (2012). Antioxidative properties of bee pollen extracts examined by EPR spectroscopy. *Journal of Apicultural Science*, 56(1). <https://doi.org/10.2478/v10289-012-0003-0>

Rzepecka-Stojko, A., Stojko, J., Kurek-Górecka, A., Górecki, M., Kabala-Dzik, A., Kubina, R., Moździerz, A., Buszman, E., & Iriti, M. (2015). Polyphenols from Bee Pollen: Structure, absorption, metabolism and biological activity. In *Molecules* (Vol. 20, Issue 12). <https://doi.org/10.3390/molecules201219800>

S

Saha, D., & Bhattacharya, S. (2010). Hydrocolloids as thickening and gelling agents in food: A critical review. In *Journal of Food Science and Technology* (Vol. 47, Issue 6). <https://doi.org/10.1007/s13197-010-0162-6>

Salehi, F. (2021). Quality, physicochemical, and textural properties of dairy products containing fruits and vegetables: A review. In *Food Science and Nutrition* (Vol. 9, Issue 8). <https://doi.org/10.1002/fsn3.2430>

Samaržija, D., Zamberlin, Š., & Pogačić, T. (2012). Psychrotrophic bacteria and their negative effects on milk and dairy products quality. *Mljekarstvo*, 62(2).

Sattler, J. A. G., de Melo, I. L. P., Granato, D., Araújo, E., da Silva de Freitas, A., Barth, O. M., Sattler, A., & de Almeida-Muradian, L. B. (2015). Impact of origin on bioactive compounds and nutritional composition of bee pollen from southern Brazil: A screening study. *Food Research International*, 77. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.09.013>

Sawicki, T., Starowicz, M., Kłębukowska, L., & Hanus, P. (2022). The Profile of Polyphenolic Compounds, Contents of Total Phenolics and Flavonoids, and Antioxidant and Antimicrobial Properties of Bee Products. *Molecules*, 27(4). <https://doi.org/10.3390/molecules27041301>

Sboui, A., Khorchani, T., Djegham, M., & Belhadj, O. (2010). Comparaison de la composition physicochimique du lait camelin et bovin du Sud tunisien ; variation du pH et de l'acidité à différentes températures. *Afrique Science : Revue Internationale Des Sciences et Technologie*, 5(2). <https://doi.org/10.4314/afsci.v5i2.61744>

Scheldeman, P., Pil, A., Herman, L., de Vos, P., & Heyndrickx, M. (2005). Incidence and diversity of potentially highly heat-resistant spores isolated at dairy farms. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(3), 1480–1494. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.3.1480-1494.2005>

Schiano, A. N., Harwood, W. S., & Drake, M. A. (2017). A 100-Year Review: Sensory analysis of milk. *Journal of Dairy Science*, 100(12). <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13031>

Schönfeldt, H. C., Hall, N. G., & Smit, L. E. (2012). The need for country specific composition data on milk. *Food Research International*, 47(2), 207–209. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.05.018>

Schukken, Y. H., Günther, J., Fitzpatrick, J., Fontaine, M. C., Goetze, L., Holst, O., Leigh, J., Petzl, W., Schuberth, H. J., Sipka, A., Smith, D. G. E., Quesnell, R., Watts, J., Yancey, R., Zerbe, H., Gurjar, A., Zadoks, R. N., & Seyfert, H. M. (2011). Host-response patterns of intramammary infections in dairy cows. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 144(3–4), 270–289. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2011.08.022>

SEACHEOL MIN, L. J. H. A. J. M. K. (2005). Antimicrobial Effects of Lactoferrin, Lysozyme, and the Lactoperoxidase System and Edible Whey Protein Films Incorporating the Lactoperoxidase System Against *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* O157:H7. In *M332 JOURNAL OF FOOD SCIENCE* (Vol. 70). www.ift.org

Seiquer, I., Delgado-Andrade, C., Haro, A., & Navarro, M. P. (2010). Assessing the effects of severe heat treatment of milk on calcium bioavailability: In vitro and in vivo studies. *Journal of Dairy Science*, 93(12). <https://doi.org/10.3168/jds.2010-3469>

Semo, E., Kesselman, E., Danino, D., & Livney, Y. D. (2007). Casein micelle as a natural nano-capsular vehicle for nutraceuticals. *Food Hydrocolloids*, 21(5–6). <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2006.09.006>

Serrano, S., Navas, F. J., & Rodríguez, I. (2025). Dried Vs Fresh-Frozen Bee Pollen: Botanical Sensory Profiling. *Current Research in Nutrition and Food Science*, 13(1), 145–161. <https://doi.org/10.12944/CRNFSJ.13.1.9>

Serrer, A., Boubendir, A., Bouchair, K., & Boutellaa, S. (2023). Effect of Rosemary and Oregano Aqueous Extracts Supplementation on Microbial Growth during Refrigerated Storage of Milk. *Agriculturae Conspectus Scientificus*, 88(1).

Séverin, S., & Wenshui, X. (2005). Milk biologically active components as nutraceuticals: Review. In *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* (Vol. 45, Issues 7–8, pp. 645–656). <https://doi.org/10.1080/10408690490911756>

Shadbolt, N. M., Shadbolt 1a, N. M., & Apparao B A Professor, D. (2016). Factors Influencing the Dairy Trade from New Zealand. In *International Food and Agribusiness Management Review Special Issue* (Vol. 19). <https://www.researchgate.net/publication/307513351>

Sharma, O. P., & Bhat, T. K. (2009). DPPH antioxidant assay revisited. *Food Chemistry*, 113(4). <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.08.008>

Sharma, P., Oey, I., Bremer, P., & Everett, D. W. (2014). Reduction of bacterial counts and inactivation of enzymes in bovine whole milk using pulsed electric fields. *International Dairy Journal*, 39(1). <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2014.06.003>

Shetty, S. A., Young, M. F., Taneja, S., & Rangiah, K. (2020). Quantification of B-vitamins from different fresh milk samples using ultra-high performance liquid chromatography mass spectrometry/selected reaction monitoring methods. *Journal of Chromatography A*, 1609. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.460452>

Singh, P., & Gandhi, N. (2015). Milk Preservatives and Adulterants: Processing, Regulatory and Safety Issues. *Food Reviews International*, 31(3). <https://doi.org/10.1080/87559129.2014.994818>

Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16(3). <https://doi.org/10.5344/ajev.1965.16.3.144>

Shinde, G., Kumar, R., Chauhan, S. K., Shinde, G., Subramanian, V., & Nadanasabapathi, S. (2018). Whey Proteins: A potential ingredient for food industry- A review. *Asian Journal of Dairy and Food Research*, of. <https://doi.org/10.18805/ajdfr.dr-1389>

Sievanen, K., Huppertz, T., Kelly, A. L., & Fox, P. F. (2008). Influence of added calcium chloride on the heat stability of unconcentrated and concentrated bovine milk. *International Journal of Dairy Technology*, 61(2). <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2008.00391.x>

Sissoko, A., Samake, F., İg, A., Dembele, S., Kone, F., & Tembely, S. (2023). Evaluation de la qualite microbiologique du lait frais pasteurise et du lait local transforme (thiakry) vendus dans district de bamako, mali assessment of the microbiological quality of fresh pasteurized milk and local processed milk (thiakry) sold in the district of bamako, mali. In *Agronomie Africaine* (Vol. 35, Issue 2).

Smith, N. W., Fletcher, A. J., Hill, J. P., & McNabb, W. C. (2022). Modeling the Contribution of Milk to Global Nutrition. *Frontiers in Nutrition*, 8. <https://doi.org/10.3389/fnut.2021.716100>

Somme, L., Vanderplanck, M., Michez, D., Lombaerde, I., Moerman, R., Wathelet, B., Wattiez, R., Lognay, G., & Jacquemart, A. L. (2015). Pollen and nectar quality drive the major and minor floral choices of bumble bees. *Apidologie*, 46(1). <https://doi.org/10.1007/s13592-014-0307-0>

Souhila Kirat. (2007). Les conditions d'émergence d'un système d'élevage spécialisé en engraissement et ses conséquences sur la redynamisation de l'exploitation agricole et la filière des viandes rouges bovines – Cas de la Wilaya de Jijel en Algérie.

Soutelino, M. E. M., Silva, A. C. d. O., & Rocha, R. d. S. (2024). Natural Antimicrobials in Dairy Products: Benefits, Challenges, and Future Trends. *Antibiotics*, 13(5), 415. <https://doi.org/10.3390/antibiotics13050415>

Soyeurt, H., Gillon, A., Vanderick, S., Mayeres, P., Bertozzi, C., & Gengler, N. (2007). Estimation of heritability and genetic correlations for the major fatty acids in bovine milk. *Journal of Dairy Science*, 90(9). <https://doi.org/10.3168/jds.2007-0054>

Stanley, R. G., & Linskens, H. F. (2012). Pollen: Biology, biochemistry and management (pp. 1-4). Springer Science & Business Media.

Steele, M. L., McNab, W. B., Poppe, C., Griffiths, M. W., Chen, S., Degrandis, S. A., Fruhner, L. C., Larkin, C. A., Lynch, J. A., & Odumeru, J. A. (1997). Survey of Ontario Bulk Tank Raw Milk for Food-Borne Pathogens. In *Journal of Food Protection* (Vol. 60, Issue 11). www.jfoodprotection.org

Steinfeld, H., Gerber, P., Wassenaar, T., Castel, V., Rosales, M., & de Haan, C. (2006). Livestock's long shadow: Environmental issues and options. *Renewable Resources Journal*, 24(4).

Steinmann, P., & Fané, A. (2004). *Qualité microbiologique du lait et des produits laitiers vendus au Mali et leurs implications en santé publique*. <https://www.researchgate.net/publication/281091858>

Su, Y., Wang, H., Wu, Z., Zhao, L., Huang, W., Shi, B., He, J., Wang, S., & Zhong, K. (2022). Sensory Description and Consumer Hedonic Perception of Ultra-High Temperature (UHT) Milk. *Foods*, 11(9). <https://doi.org/10.3390/foods11091350>

T

Thakur, M., & Nanda, V. (2020). Composition and functionality of bee pollen: A review. In *Trends in Food Science and Technology* (Vol. 98). <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.02.001>

Thorning, T. K., Raben, A., Tholstrup, T., Soedamah-Muthu, S. S., Givens, I., & Astrup, A. (2016). Milk and dairy products: Good or bad for human health? An assessment of the totality of scientific evidence. In *Food and Nutrition Research* (Vol. 60). Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.3402/fnr.v60.32527>

Tomaánds-Barberaandn, F. A., Martos, I., Ferreres, F., Radovic, B. S., & Anklam, E. (2001). HPLC flavonoid profiles as markers for the botanical origin of European unifloral honeys. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81(5). <https://doi.org/10.1002/jsfa.836>

Trajchev, M., Nakov, D., & Andonov, S. (2016). The effect of thermal environment on daily milk yield of dairy cows. *Macedonian Veterinary Review*, 39(2). <https://doi.org/10.1515/macvetrev-2016-0084>

Tsioulpas, A., Lewis, M. J., & Grandison, A. S. (2007). A study of the pH of individual milk samples. *International Journal of Dairy Technology*, 60(2). <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2007.00308.x>

U

Urcan, A. C., Criste, A. D., Dezmiorean, D. S., Bobiş, O., Bonta, V., Burtescu, R. F., Olah, N. K., Cornea-Cipcigan, M., & Mărgăoan, R. (2024). Enhancing Antioxidant and Antimicrobial Activities in Bee-Collected Pollen through Solid-State Fermentation: A Comparative Analysis of Bioactive Compounds. *Antioxidants*, 13(3). <https://doi.org/10.3390/antiox13030292>

V

Vaissière, B., Freitas, B., & Gemmill-Herren, B. (2011). Protocol to detect and assess pollination deficits in crops: a handbook for its use. ... *of Pollination* ...

Végh, R., Sipiczki, G., & Csóka, M. (2023). Investigating the Antioxidant and Color Properties of Bee Pollens of Various Plant Sources. *Chemistry and Biodiversity*, 20(7). <https://doi.org/10.1002/cbdv.202300126>

Velázquez-Ordoñez, V., Valladares-Carranza, B., Tenorio-Borroto, E., Talavera-Rojas, M., Antonio Varela-Guerrero, J., Acosta-Dibarrat, J., Puigvert, F., Grille, L., González Revello, Á., & Pareja, L. (2019). Microbial Contamination in Milk Quality and Health Risk of the Consumers of Raw Milk and Dairy Products. In *Nutrition in Health and Disease - Our Challenges Now and Forthcoming Time*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.86182>

Verdier-Metz, I., Michel, V., Delbès, C., & Montel, M. C. (2009). Do milking practices influence the bacterial diversity of raw milk? *Food Microbiology*, 26(3). <https://doi.org/10.1016/j.fm.2008.12.005>

Vignola, C. L. (2002). Science et technologie du lait : Transformation du lait (p. 32). Presses internationales Polytechnique.

Viuda-Martos, M., Ruiz-Navajas, Y., Fernández-López, J., & Pérez-Álvarez, J. A. (2008). Functional properties of honey, propolis, and royal jelly. In *Journal of Food Science* (Vol. 73, Issue 9). <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2008.00966.x>

Von der Ohe, W., Persano Oddo, L., Piana, M. L., Morlot, M., & Martin, P. (2004). Harmonized methods of melissopalynology. *Apidologie*, 35(Suppl. 1). <https://doi.org/10.1051/apido:2004050>

Von Neubeck, M., Baur, C., Krewinkel, M., Stoeckel, M., Kranz, B., Stressler, T., Fischer, L., Hinrichs, J., Scherer, S., & Wenning, M. (2015). Biodiversity of refrigerated raw milk microbiota and their enzymatic spoilage potential. *International Journal of Food Microbiology*, 211. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.07.001>

Vuillemard, J.-C. (2018). Science et technologie du lait (p. 45). Presses de l'Université Laval.

W

Walstra, P., M Wouters, J. T., & Geurts, T. J. (2006). *Dairy Science and Technology, Second Edition.*

Wang, G., Liu, N., & Guo, M. (2018). Use of whey protein as a natural polymer for tissue adhesive: Preliminary formulation and evaluation in vitro. *Polymers*, 10(8).
<https://doi.org/10.3390/polym10080843>

Wang, H., Zhang, Z., Song, J., Tian, M., Li, R., & Cui, X. (2023). Phenolic compound identification in tomato fruit by UPLC-QTOF-MS. *LWT*, 182.
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2023.114791>

Wang, Y., Xiao, R., Liu, S., Wang, P., Zhu, Y., Niu, T., & Chen, H. (2024). The Impact of Thermal Treatment Intensity on Proteins, Fatty Acids, Macro/Micro-Nutrients, Flavor, and Heating Markers of Milk—A Comprehensive Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(16), 8670. <https://doi.org/10.3390/ijms25168670>

Wei, X., Pan, Y., Tang, Z., Lin, Q., Jiang, Y., Chen, J., Xian, W., Yin, R., Li, A. J., & Qiu, R. (2023). Neonicotinoid's residues in cow milk and health risks to the Chinese general population. *Journal of Hazardous Materials*, 452.
<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2023.131296>

Wiley, W. J. (1935). 94. A study of the titratable acidity of milk. i. The influence of the various milk buffers on the titration curves of fresh and sour milk. *Journal of Dairy Research*, 6(1). <https://doi.org/10.1017/S0022029900001205>

Wilkowske, H. H. (1954). Relationship between Titratable Acidity and pH during Lactic Acid Fermentation in Reconstituted Nonfat Milk. *Journal of Dairy Science*, 37(1).
[https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(54\)91227-8](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(54)91227-8)

Y

Yazdani, A., Koohsari, H., & Sadegh Shesh Poli, M. (2025). Antibacterial Activity of Honey and Bee Pollen Collected from Bee Hives from Three Climatic Regions of Golestan Province Against some Clinical Isolates with High Antibiotic Resistance. *Research and Innovation in Food Science and Technology*, 14(1), 19–28. <https://doi.org/10.22101/JRIFST.2024.415662.1514>

Yerlikaya, O. (2014). Effect of bee pollen supplement on antimicrobial, chemical, rheological, sensorial properties and probiotic viability of fermented milk beverages. *Mljekarstvo*, 64(4), 268–279. <https://doi.org/10.15567/mljekarstvo.2014.0406>

Yilmaz, F., & Dagdemir, E. (2012). The effects of beeswax coating on quality of Kashar cheese during ripening. *International Journal of Food Science and Technology*, 47(12).
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2012.03137.x>

Yousefi, M., & Jafari, S. M. (2019). Recent advances in application of different hydrocolloids in dairy products to improve their techno-functional properties. In *Trends in Food Science and Technology* (Vol. 88). <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.04.015>

Z

Zahrakar, A., Rashidian, E., Jaydari, A. et al. Preliminary. Study of molecular identification of *Mycobacterium bovis* from cow's milk in Lorestan (Iran). *Sci Rep* 14, 25271 (2024). <https://doi.org/10.1038/s41598-024-77059-5>

Zhang, S., Ren, C., Wang, C., Han, R., & Xie, S. (2024). Effects of hydrocolloids and oleogel on techno-functional properties of dairy foods. In *Food Chemistry: X* (Vol. 21). <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2024.101215>

Zhou, X., Qu, X., Zheng, N., Su, C., Wang, J., & Soyeurt, H. (2019). Large scale study of the within and between spatial variability of lead, arsenic, and cadmium contamination of cow milk in China. *Science of the Total Environment*, 650. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.09.094>

Zidane Djelloul, Physicochemical Characterization and Antioxidant Activity of Algerian Bee Pollens: Exploring Geographical Influences, *Current Nutrition & Food Science*; Volume 21, Issue 4, Year 2025, e15734013320080. DOI: 10.2174/0115734013320080240909045601

Zlatev, Z., Taneva, I., Baycheva, S., & Petev, M. (2018). A comparative analysis of physico-chemical indicators and sensory characteristics of yogurt with added honey and bee pollen. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 24(1).

Zouari, A., Schuck, P., Gaucheron, F., Triki, M., Delaplace, G., Gauzelin-Gaiani, C., Lopez, C., Attia, H., Ali Ayadi, M., Mi-, al, & Gaucheron, F. (2019). Microstructure and chemical composition of camel and cow milk powders' surface. *LWT - Food Science and Technology*, 117, 108693. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108693>

Zuluaga, C. M., Serrato, J. C., & Quicazan, M. C. (2015). Chemical, nutritional and bioactive characterization of Colombian bee-bread. *Chemical Engineering Transactions*, 43. <https://doi.org/10.3303/CET1543030>

Résumé

L'objectif de cette étude était d'évaluer le potentiel du pollen d'abeille comme agent de bioconservation naturel du lait cru à travers ses extraits aqueux et hydroéthanoliques. L'extrait aqueux a été préparé par macération avec de l'eau distillée stérile, tandis que l'extrait hydroéthanolique a été obtenu à l'aide d'un montage Soxhlet utilisant le méthanol absolu, avec des rendements respectifs de 18,91 % et 5,59 %. Les extraits aqueux et hydroéthanoliques présentaient respectivement des teneurs en composés phénoliques totaux de $19,89 \pm 0,39$ et $27,83 \pm 0,47$ $\mu\text{g Eq AG/mg}$, et en flavonoïdes de $6,03 \pm 0,04$ et $8,31 \pm 0,17$ $\mu\text{g Eq/mg}$. Les extraits aqueux et hydroéthanoliques ont présenté des activités antioxydantes par DPPH (IC_{50}) de 338,04 $\mu\text{g/ml}$ et 85,99 $\mu\text{g/ml}$, respectivement. L'évaluation de l'activité antibactérienne contre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Escherichia coli* ATCC 25922 et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 a montré des diamètres d'inhibition allant de $9,25 \pm 0,1$ mm à $15,6 \pm 0,15$ mm pour l'extrait aqueux, et de $7,36 \pm 0,27$ mm à $11,86 \pm 0,69$ mm pour l'extrait hydroéthanolique. L'application en bioconservation du lait cru a permis de prolonger significativement la phase de latence de la flore totale, passant de 1,114 jours (témoin) à 2,711 jours avec 10 mg/ml d'extrait aqueux, tout en maintenant la stabilité physico-chimique et une partie de la flore lactique bénéfique. Cette étude ouvre des perspectives prometteuses pour l'industrie agroalimentaire, en proposant une alternative naturelle aux conservateurs chimiques pour la préservation du lait cru.

Mots clés : Pollen, composés phénoliques, flavonoïdes, activité antioxydante, activité antibactérienne, bioconservation, phase de latence, flore totale mésophile, pH, acidité, lait cru bovin.

Abstract

The objective of this study was to evaluate the potential of bee pollen as a natural biopreservative agent for raw milk through its aqueous and hydroethanolic extracts. The aqueous extract was prepared by maceration using sterile distilled water, while the hydroethanolic extract was obtained using a Soxhlet apparatus with absolute methanol, yielding 18.91% and 5.59% respectively. The total phenolic content in the aqueous and hydroethanolic extracts was 19.89 ± 0.39 and 27.83 ± 0.47 $\mu\text{g GAE/mg}$, respectively, while flavonoid contents were 6.03 ± 0.04 and 8.31 ± 0.17 $\mu\text{g QE/mg}$. Antioxidant activities measured by DPPH assay showed IC_{50} values of 338.04 $\mu\text{g/ml}$ and 85.99 $\mu\text{g/ml}$ for aqueous and hydroethanolic extracts, respectively. The antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Escherichia coli* ATCC 25922, and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 demonstrated inhibition zones ranging from 9.25 ± 0.1 mm to 15.6 ± 0.15 mm for the aqueous extract, and from 7.36 ± 0.27 mm to 11.86 ± 0.69 mm for the hydroethanolic extract. Application of these extracts for the biopreservation of raw milk significantly extended the latency phase of total microbial flora, increasing it from 1.114 days (control) to 2.711 days with 10 mg/ml of aqueous extract, while maintaining physicochemical stability and preserving part of the beneficial lactic flora. This study offers promising prospects for the agri-food industry by proposing a natural alternative to chemical preservatives for raw milk preservation.

Keywords: Bee pollen, phenolic compounds, flavonoids, antioxidant activity, antibacterial activity, biopreservation, latency phase, total mesophilic flora, pH, acidity, raw bovine milk.

هدفت هذه الدراسة إلى تقييم إمكانية استخدام حبوب لقاح النحل كعامل طبيعي لحفظ الحليب الخام، من خلال مستخلصيها المائي والإيثانولي المائي. تم تحضير المستخلص المائي بنقع الحبوب في ماء مقطر معقم، بينما تم الحصول على المستخلص الإيثانولي المائي باستخدام جهاز Soxhlet مع الميثانول المطلق، بنسبة مردود بلغت 18.91% و 5.59% على التوالي. بلغت نسبة المركبات الفينولية الكلية في المستخلصين 0.39 ± 19.89 و 0.47 ± 27.83 ميكروغرام مكافئ حمض الغاليك/ملغ، بينما بلغت نسبة الفلافونويدات 0.04 ± 6.03 و 0.17 ± 8.31 ميكروغرام مكافئ كيرسيتين/ملغ، على التوالي. أظهرت الفعالية المضادة للأوكسدة باستخدام اختبار DPPH قيم IC_{50} بلغت 338.04 ميكروغرام/مل و 85.99 ميكروغرام/مل للمستخلص المائي والإيثانولي المائي على التوالي. أما الفعالية المضادة للبكتيريا ضد *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ، *Bacillus subtilis* ATCC 6633 ، *Escherichia coli* ATCC 25922 و *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 فقد أظهرت أقطار تثبيط تراوحت بين 0.1 ± 9.25 ملم و 0.15 ± 15.6 ملم للمستخلص المائي، وبين 0.27 ± 7.36 ملم و 0.69 ± 11.86 ملم للمستخلص الإيثانولي المائي. أدى تطبيق هذه المستخلصات في حفظ الحليب الخام إلى إطالة فترة الكمون للفلورا الكلية بشكل ملحوظ، من 1.114 يومًا (عينة الشاهد) إلى 2.711 يومًا بتركيز 10 ملغ/مل من المستخلص المائي، مع الحفاظ على الاستقرار الفيزيائي الكيميائي وجزء من الفلورا اللبنية المفيدة. تفتح هذه الدراسة آفاقًا واعدة للصناعة الغذائية من خلال تقديم بديل طبيعي للمواد الحافظة الكيميائية في حفظ الحليب الخام.

الكلمات المفتاحية: حبوب لقاح، مركبات فينولية، فلافونويدات، نشاط مضاد للأوكسدة، نشاط مضاد للبكتيريا، الحفظ الحيوي، فترة الكمون، الفلورا المتوسطة الحرارة الكلية، درجة Ph، الحموضة، الحليب الخام البقري.