

République Algérienne Démocratique et Populaire

Université Abdelhamid Ibn Badis  
Mostaganem  
Faculté des Sciences de la  
Nature et de la Vie



جامعة عبد الحميد ابن باديس-  
مستغانم-  
كلية علوم الطبيعة والحياة

DEPARTEMENT DES SCIENCES ALIMENTAIRES

## MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

Présenté par:

*Bouilefane Sonia*

Pour l'obtention du diplôme de

### **MASTER EN SCIENCES ALIMENTAIRES**

**Spécialité:** *Production et transformation laitières*

THÈME

*Identification et caractérisation de  
la flore d'intérêt technologique  
des bactéries lactiques du lait de chèvre*

Devant les membres du jury

Président	Dr. Meghoufel N.	MAB	U. Mostaganem
Examineur	Dr. Zabouri Y	MCB	U. Mostaganem
Encadreur	Dr. Tahlaïti. H	MCA	U. Mostaganem

Travail réalisé au Laboratoire des Sciences et Techniques de Productions Animales

*Année universitaire: 2020-2021*

## *Remerciements*

*J'adresse en premier lieu ma reconnaissance à notre DIEU tout puissant, de m'avoir permis d'en arriver là, car sans lui rien n'est possible.*

*Je remercie vivement, mon encadreur madame Tahlaiti.H, pour avoir accepté de m'encadrer et d'assurer la direction de ce travail, et pour m'avoir apporté la rigueur scientifique nécessaire à son bon déroulement, qu'il soit rassuré de ma profonde gratitude.*

*Je tiens à remercier :*

*Melle Meghoufel N.M, de m'avoir fait l'honneur de présider mon jury de mon mémoire.*

*Monsieur Zabouri Y, d'avoir accepté de faire partie du jury et d'examiner ce modeste travail.*

*L'ensemble des enseignants de l'université Abdelhamid Iben Badis de Mostaganem qui ont contribué à ma formation durant les 5 années particulièrement ceux de l'option biologie chacun son nom.*

*Toute personne qui m'a aidé de loin ou de près afin de réaliser ce travail.*

*Le plus grand merci à mes parents, ma sœur et mon frère, mon mari, ma famille, mes amis et mes camarades de promotion.*

## *Dédicaces*

*Je dédie ce travail :*

*A celle qui attend mon retour a chaque jour*

*A ma mère: Affable, honorable, aimable : tu représentes pour moi le symbole de la bonté par excellence. La source de tendresse aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer ce que tu mérites pour tous les sacrifices que tu n'as cessé de me donner.*

*A mon père : Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime le dévouement et le respect que j'ai toujours eu pour vous rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être et qui m'a toujours encouragée et donné en vie d'aller plus loin.*

*A mon mari Abd el Hamid Youness*

*A mon très chère frère Mohamed Oussama*

*A ma très chère sœur Snoussia*

*A tous mes amis de la promotion de l'année 2021.*

# *Résumé*

## الملخص:

اكتسبت بكتيريا حمض اللاكتيك منذ القدم أهمية كبيرة من خلال استخدامها في المصانع الغذائية.

عزل بكتيريا العزلات من خلال ثلاث عينات من حليب الماعز غير الطازج مأخوذة من ثلاث مناطق موج (خير الدين، عشعاشة، سيدي علي) في ولاية مستغانم قد سمح لنا بالحصول على 20 سلالة موجبة الصيغ جرام و سالبة الكاتلاز.

من أجل تحديد العزلات، نعتمد على الاختبارات التالية: النمو في وسط يحتوي على كلوريد الصوديوم بتركيز 5.6%، النمو في درجات حموضة 9.6، 5 واختبارات نمو في درجات حرارة مختلفة (20 و 15 و 45 درجة مئوية)، دراسة المقاومة الحرارية، اختبار النمو في المتوسط حليب شيرمان، اختبار تحلل الأرجنين، إنتاج الاستوان.

نتائج الاختبارات التكنولوجية كانت مرضية من أجل الاستعمال الصناعي الغذائي.

**الكلمات المفتاحية:** بكتيريا الحليب، حليب غير الطازج، الماعز، الخصائص المورفولوجية والتكنولوجية-العزلات.

**Résumé:**

Les bactéries lactiques ont acquis une grande importance par leur présence dans l'industrie agro alimentaire et ce depuis longtemps.

L'isolement des isolats lactiques à partir de trois échantillons de lait cru de chèvre provenant de trois régions (kheir-Eddine, Achaacha, Sidi Ali) situées dans la wilaya de Mostaganem, nous a permis d'obtenir 20 isolats à Gram positif et catalase négatif.

Pour l'identification des isolats, nous sommes basés sur les tests suivants: Croissance en présence de NaCl: 6,5%; croissance en à pH=5, pH=9.6; test de croissance des différentes températures (20C°, 15C°, 45C°); étude de la thermorésistance; test de croissance en milieu lait de Sherman; test d'hydrolyse de l'arginine (ADH); test de production d'acétoïne.

Les résultats des tests technologiques des isolats sont satisfaisants en vue d'une utilisation dans l'industrie alimentaire.

**Mots clés:** bactéries lactiques, isolats, lait cru, caractérisation phénotypiques et technologiques.

**Summary:**

Lactic acid bacteria have acquired great importance by their presence in the food industry and for a longtime.

Isolation of isolates strains from three samples of raw goat's milk from three regions (kheir-Eddine, Achaacha, Sidi Ali) in the wilaya of Mostaganem, allowed us to obtain 20 strains to Gram positive and catalase negative.

For identified the isolates, we are use this tests : Growth in the presence of NaCl 6.5%; growth at pH=5, pH= 9.6; growth test different temperatures (20C°, 15C°, 45C°); study of heat resistance; growth test in mid milk Sherman; test hydrolysis of arginine (ADH); test production of acetoin.

The results of technological test are satisfactory for industrial use.

**Keywords:** Lactic acid bacteria, raw milk, goat, phenotypic and technologic characterization-isolates.

## *Liste des Abréviations*



## Liste des Abréviations

- **ADH** : Arginine Di hydrolase
- **ADN** : Acide Désoxyribonucléique
- **ARN** : Acide Ribonucléique
- **FAO**: Food Agriculture Organization
- **G+ C**:Guanine+Cytosine
- **MRS** : Man-Rogosa etSharpe
- **NaOH**: Hydroxydede sodium
- **NaCl**: Chlorure de sodium
- **pH**: potentiel Hydrogène

## *Liste des tableaux*

## Liste des tableaux

<b>Tableau 01:</b> Principales constantes physico-chimiques de lait de vache et chèvre (FAO, 1990).	<b>08</b>
<b>Tableau 02:</b> Caractéristiques physico- chimiques effectuées sur les 3 échantillons de lait analysés.	<b>30</b>

## *Liste des figures*

## Liste des figures

<b>Figure 01:</b> Arbre phylogénétique des principaux genres de bactéries lactiques et des genres Associés, obtenu par analyse des ARNr 16S (Stiles et Holzappel, 1997).	<b>14</b>
<b>Figure 02:</b> Méthode d'isolement des isolats.	<b>23</b>
<b>Figure 03:</b> Aspect des bactéries lactiques sur milieu M17 solide après incubation à 37°C pendant 24h on aérobie.	<b>30</b>
<b>Figure 04:</b> Croissance à différents pH.	<b>31</b>
<b>Figure 05:</b> Croissance à différentes températures.	<b>31</b>
<b>Figure 06:</b> La thermorésistance	<b>33</b>
<b>Figure 07:</b> Croissance en milieu hyper salé (NaCl 6,5%).	<b>33</b>
<b>Figure 08:</b> Exemple des résultats du lait de Sherman.	<b>34</b>
<b>Figure 09:</b> L'arginine di hydrolase (ADH).	<b>34</b>
<b>Figure 10:</b> Secteurs de répartition des genres des bactéries lactiques.	<b>35</b>

# *Table des matières*

## ***Table des matières***

Remerciements	
Dédicace	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Liste des abréviations	
ملخص	
Résumé	
Summary	
Introduction	<b>02</b>

### ***Partie Bibliographie***

#### ***Chapitre I: Le lait de chèvre***

I.1 Définition de lait	<b>06</b>
I.2 Définition du lait de chèvre	<b>06</b>
I.2.1 Les caractéristiques du lait de chèvre	<b>06</b>
I.2.1.1 Les critères organoleptiques	<b>06</b>
I.2.1.1.1 Odeur	<b>06</b>
I.2.1.1.2 Couleur	<b>07</b>
I.2.1.1.3 Saveur	<b>07</b>
I.2.1.2 Caractéristiques physico-chimiques	<b>07</b>
I.2.1.2.1 pH	<b>07</b>
I.2.1.2.2 Acidité	<b>07</b>
I.2.1.2.3 Densité	<b>07</b>
I.2.2 Caractéristiques microbiologiques du lait de chèvre	<b>08</b>
I.2.2.1 Flore originelle	<b>08</b>

I.2.2.2 Flore contaminante	09
I.2.2.2.1 Flore d'altération	09
I.2.2.2.2 Flore pathogène	09
A- Bactéries infectieuses	09
B- Bactéries toxigènes	10

## *Chapitre II: Les bactéries lactiques*

II.1 Généralités sur les bactéries lactiques	12
II.2 Définition	12
II.3 Habitat	12
II.4 Genre des bactéries lactiques	13
II.4.1 Le genre <i>Streptococcus</i>	13
II.4.2 Le genre <i>Lactobacillus</i>	13
II.4.3 Le genre <i>Lactococcus</i>	13
II.4.4 Le genre <i>Leuconostoc</i>	13
II.4.5 Le genre <i>Pediococcus</i>	13
II.5 Classification des bactéries lactiques	14
II.6 Aptitudes technologiques	15
II.6.1 Aptitude acidifiante	15
II.6.2 Aptitude protéolytique	16
II.6.3 Aptitude lipolytique	17
II.6.4 Aptitude arômatissante	17
II.6.5 Aptitude texturante	18
II.6.6 Activité antimicrobienne	18
II.6.7 Performance	19

## *Partie Expérimentale*



## *Chapitre III: Matériel et Méthodes*

III.1. Déroulement de l'expérimentation	22
III.2. Echantillonnage et techniques de prélèvement de lait	22
III.3. Analyses physico chimiques	22
III.3.1 Mesure de pH	22
III.4. Dénombrement et isolement des bactéries lactiques	23
III.5. Caractérisation et identification des isolats lactiques	24
III.5.1 Etude morphologique	24
III.5.1.1 Examen macroscopique	24
III.5.1.2 Examen microscopique	24
III.5.1.3 Coloration de Gram	24
III.5.1.4. Recherche de la catalase	24
III.6. Technique de conservation	25
III.6.1 Conservation à court terme	25
III.6.2 Conservation à long terme	25
III.7. Tests physiologiques	25
III.7.1 Test de croissance à différentes températures	25
III.7.2 Test de croissance à différents pH: ( pH=9,6; pH=5)	25
III.7.2.1 Croissance à pH=9.6	25
III.7.2.2 Croissance à pH=5	25
III.7.3 Test de thermorésistance	25
III.7.4 Croissance en milieu hypersalé	26
III.7.5 Croissance dans le lait de Sherman	26
III.8. Tests biochimiques	26
III.8.1 Recherche de l'arginine dihydrolase (ADH)	26

III.8.2 Production de l'acétoïne (Acétyle-Méthyle-Carbinol)	27
III.8.3 Production de dextrane	27
III.9. Etude du pouvoir acidifiant des isolats	27

### *Chapitre IV: Résultats et discussions*

IV.1 Résultats et discussion	29
IV.2 Paramètres physico-chimique	29
IV.2.1 Le pH	29
IV.3. Pré identification des isolats	31
IV.3.1 Caractérisation macroscopique	31
IV.3.2 Caractérisation microscopique	31
IV.4. Les tests physiologiques	31
IV.4.1 Croissance à différents pH	31
IV.4.2 Croissance à différentes températures	32
IV.4.3 Test de la thermorésistance	32
IV.4.4 Croissance en milieu hypersalé	33
IV.4.5 Croissance dans le lait de Sherman	33
IV.5. Les tests biochimiques	34
IV.5.1 Recherche de l'arginine dihydrolase (ADH)	34
IV.5.2 La production d'acétoïne	35
IV.5.3 Production de dextrane	35
Conclusion	37
Références bibliographiques	39
Annexes	

# *Introduction*

### **Introduction**

Le lait est un aliment dont la durée de vie très limitée. En effet, son PH, voisin de la neutralité, le rend très facilement altérable par les microorganismes et les enzymes. Sa richesse et sa fragilité en font un milieu idéal de reproduction pour nombreux microorganismes tels que les moisissures, les levures et les bactéries. On peut y trouver différentes bactéries soit les bactéries lactique, pathogènes ou bactéries de pollution. (Mahaut et *al.*, 2000).

Le lait de chèvre joue un rôle essentiel dans la vie des communautés ruraux, que ce soit sous sa forme crue ou transformée (Raïb, L'ben «laits fermentés traditionnelles locales» et J'ben «fromage frais traditionnel local »). Dans ces produits, la fermentation est spontanée obtenue par la flore lactique naturelle (Badis et *al.*, 2004).

Les bactéries lactiques présentent un grand intérêt dans l'industrie. Elles sont largement utilisées dans l'élaboration des produits alimentaires par des procédés de fermentations lactiques.

Dans l'industrie laitière les souches lactiques sont sélectionnées sur la base de leurs propriétés technologiques (production de l'acide lactique, production d'arome, activité protéolytique et cinétique de croissance), et leurs caractéristiques fonctionnelles (activité antibactérienne, résistance au passage gastro-intestinal).

Les objectifs de cette étude se basent autour des points suivants :

- Isolement des bactéries lactiques à partir de différents échantillons de lait de chèvre cru de la région Ouest d'Algérie (Mostaganem).
- Etude des caractéristiques phénotypiques, physiologiques et biochimiques des isolats.
- Identification phénotypique, physiologique, et biochimique des bactéries lactiques thermophiles et mésophiles à partir du lait cru de chèvre.
- Etude du pouvoir acidifiant des isolats.

## *Partie Bibliographique*

# *Chapitre I:*

## *Le lait de chèvre*

**I.1 Définition du lait**

Le lait est un liquide physiologique complexe secrète par les mammifères et destiné à l'alimentation du jeune animal naissant (Mahé, 1996). L'origine de ses constituants est à la fois la synthèse réalisée au sein des cellules mammaires, à partir d'éléments sanguins tels que les acides gras et triglycérides, les protéines provenant d'acides aminés et le lactose provenant du glucose et de la filtration sélective de certains composants sanguin (sels minéraux) (Mahé, 1996). La composition du lait varie beaucoup d'une espèce à l'autre et reflète les besoins nutritionnels spécifiques de chaque espèce. Il existe, ce pendant des similitudes dans la composition des laits d'une même espèce (Mahé, 1996).

Le lait doit en contre collecté dans de bonnes conditions hygiéniques et présenter toutes les garanties sanitaires, il peut être commercialisé à l'état frais mais le plus souvent après avoir subi des traitements de standardisation lipidique et d'épuration microbienne pour limiter les risques hygiéniques et assurer une plus longue conservation (Jeantet et *al.*, 2008).

**I.2 Définition du lait de chèvre**

Le lait de chèvre est de couleur blanchâtre mate, due à l'absence de B-carotène contrairement au lait de vache. Il a une odeur assez neutre (Goursaud, 1985). Sa valeur vient de l'usage pour le nourrisson qui ne peut pas recevoir le lait maternel ainsi que de son utilisation comme aliment thérapeutique à condition qu'il soit produit dans des conditions d'hygiène (Desjeux, 1993).

Sa composition chimique varie selon l'espèce, condition d'environnement et stade de lactation (Kihal et *al.*, 1999). La composition chimique joue un rôle important sur son aptitude à l'acidification par les ferments lactiques et notamment l'influence des sels minéraux (Masle et Morgan, 2001).

**I.2.1 Les caractéristiques du lait de chèvre****I.2.1.1 Les critères organoleptiques**

**I.2.1.1.1 Odeur:** Fraichement trait, le lait de chèvre à une odeur assez neutre par fois en fin de lactation, il a une odeur dite caprique (Jaubet, 1997).

**I.2.1.1.2 Couleur :** blanc mat, contrairement au lait de vache, le lait de chèvre ne contient pas de B-carotène, aussi le beurre de chèvre a-t-il une couleur blanche (Alais, 1984).

**I.2.1.1.3 Saveur :** Le lait de vache et de chèvre possèdent tous deux une saveur douce, agréable, particulière au lait. Ce pendant, le lait de chèvre fraîchement traité possède une saveur neutre, par contre, après stockage au froid, il requiert une saveur caractéristiques qui s'avère un critère de sélection (Boyaval et *al.*, 1999).

## **I.2.1.2 Caractéristiques physico-chimiques**

### **I.2.1.2.1 pH**

Le pH du lait de chèvre, se caractérise par des valeurs allant de 6,45 à 6,90. (Remeuf et *al.*, 1989). Avec une moyenne de 6,7 différent peu de pH moyen du lait bovin qui est de 6,6 (Remeuf et *al.*, 1989; Le Jaouen et *al.*, 1990). Cette légère acidité est due aux anions phosphoriques et citriques ainsi qu'aux caséines (Sina, 1992).

### **I.2.1.2.2 Acidité**

L'acidité du lait est une notion importante pour l'industrie laitière elle permet de juger l'état de conservation du lait. Elle résulte d'une titration qui consiste à ajouter au lait un volume nécessaire de solution alcaline titrée pour atteindre le point de virage d'un indicateur, en général la phénophtaléine. Elle est exprimée en «degré Dornic» (°D). Ce dernier exprime la teneur en acide lactique: 1 °D= 0,1g d'acide lactique. L'acidité titrable du lait de chèvre est comprise entre 14 °D et 18 °D (Ansart, 1995).

L'acidité de titration indique le taux d'acide lactique formé à partir du lactose. L'acidité du lait de chèvre reste assez stable elle oscille entre 0,16 et 0,18 % d'acide lactique. (Veinoglou et *al.*, 1982b).

### **I.2.1.2.3 Densité**

La densité du lait d'une espèce donnée n'est pas une valeur constante. La densité du lait à 15 °C varie de 1,028 à 1,035 (Amiot et *al.*, 2002).

La densité du lait de chèvre est relativement stable (Veinoglou et *al.*, 1982b). A 15 °C, elle est de l'ordre de 1,027 à 1,035 (Ansart, 1995).



**Tableau 01:** les principales constantes physico-chimiques de lait de vache et chèvre (FAO, 1990).

<i>Constantes</i>	<i>Vache</i>	<i>Chèvre</i>
Energie (Kcal/litre)	705	600-750
Densité du lait entier à 20c°	1,028-1,030	1,027-1,035
Point de congélation (2)	0,520- -0,550	-0,550- -0,583
pH à 20c°	6,60-6,80	6,45-6,60
Acidité titrable(D°)	15-17	14-18
Indice de réfraction	1,45-1,46	1,35-1,46

### I.2.2 Caractéristiques microbiologiques du lait de chèvre

Du fait de sa composition physico-chimique, le lait est un excellent substrat pour la croissance microbienne. De ce fait on trouve que le lait comporte une flore originelle et une flore de contamination.

#### I.2.2.1 Flore originelle

Le lait contient peu de micro-organismes lorsqu'il est prélevé dans de bonnes conditions, à partir d'un animal sain (moins de 103 germes/ml). Il s'agit essentiellement des germes saprophytes de pis et de canaux galactophores: *Microcoques*, *streptocoques* lactiques, *bacillus*. Des germes pathogènes et dangereux du point de vue sanitaire peuvent être présents lorsque le lait est issu d'un animal malade (*Streptococcus pyogène*, *Corynebacterium pyogènes*, des staphylococcus) qui sont des agents des mammites et peut s'agir aussi de germes d'infection générale *salmonella*, *brucella* et exceptionnellement *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium*, *Bacillus anthracis* et quelques virus (Guiraud, 2003).

**I.2.2.2 Flore contaminante**

Ensemble des micro-organismes ajoutés au lait de la récolte jusqu'à la consommation. Elle peut se composer d'une flore d'altération qui causera des défauts sensoriels ou qui réduira la durée de conservation des produits et d'une flore pathogène, capable de provoquer des malaises chez les personnes qui consomment ces produits laitiers (Lamontagne et *al.*, 2002; Vignola et *al.*, 2002).

**I.2.2.2.1 Flore d'altération**

Les germes de l'environnement trouvent dans le lait un excellent milieu de culture (Novel, 1993). La flore d'altération est responsable de diverses dégradations du produit au niveau du goût, de l'arôme, de l'apparence. Les principaux genres identifiés comme flore d'altération sont *Pseudomonas sp*, *Proteus sp*. Les coliformes principalement le genre *Escherichia et Enterobacter*, les sporulés tel que *Bacillus sp*, et certaines levures et moisissures (ST-Gelais et *al.*, 1999). Parfois certains micro-organismes nuisibles peuvent aussi être pathogènes: l'un n'exclut pas l'autre (Vignola et *al.*, 2002).

**I.2.2.2.2 Flore pathogène**

La présence des micro-organismes pathogènes dans le lait peut avoir trois sources: l'animal, l'environnement et l'homme (Guiraud, 1998). Les études réalisés sur la flore microbienne du lait de chèvre ont mis en évidence la présence de *Staphylococcus aureus* dans 3 % de mammites (Contreras et *al.*, 1993).

Le conditionnement du lait et la fabrication des produits laitiers nécessitent une bonne maîtrise des sources microbiennes à l'origine des dégradations et des défauts (Vignola et *al.*, 2002). Il existe deux genres:

**A- Bactéries infectieuses**

Les bactéries infectieuses qui doivent être vivants dans l'aliment, lors de sa consommation, pour agir. Une fois ingérées, elles dérèglent le système digestif. Apparaissent alors divers symptômes connus, tels que la diarrhée, les vomissements, les maux de tête et même la mort, dans certains cas entraînés. Il s'agit de *Salmonella sp*, *E. coli 0157: H7*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium perfringens*, *Brucella et Campylobacter sp* (Lamontagne et *al.*, 2002).

**B- Bactéries toxinogènes**

Les bactéries toxinogènes qui produisent une toxine dans l'aliment et c'est cette toxine qui rend le consommateur malade (Lamontagne et *al.*, 2002). Il n'est donc pas suffisant de détruire la bactérie pour éviter l'incidence de la maladie. De plus certaines toxines sont très résistantes aux traitements thermiques, tels que la pasteurisation et même la stérilisation, dans certains cas. Il s'agit de *Staphylococcus sp* et *Clostridium* (Lamontagne et *al.*, 2002).

## ***Chapitre II:***

### ***Les bactéries lactiques***

**II.1 Généralités sur les bactéries lactiques**

Les bactéries lactiques sont des microorganismes utiles à l'homme lui permettant de fabriquer et de conserver un nombre important de ses aliments. Elles sont surtout connues pour le rôle qu'elles jouent dans la préparation des laitages fermentés, elles sont utilisées également dans le saumurage des légumes, la boulangerie, la fabrication du vin, le saurissage des poissons, des viandes et des salaisons (EUFIC, 1999). Elles sont devenues les principaux candidats probiotiques et bénéficiant d'un statut GRAS (Generally Recognized AS safe) (Ait Belghanaoui, 2006).

**II.2 Définition**

Les bactéries lactiques sont des cellules procaryotes, hétérotrophes et chimio-organotrophes. Elles sont Gram positive non sporulantes à oxydase négative et immobiles. Elles ont des exigences nutritionnelles complexes pour les acides aminés, les peptides, les vitamines, les sels, les acides gras et les glucides (Dellaglio et al., 1994). Elles sont classées suivant la nature des produits du métabolisme bactérien obtenus à partir des glucides, en effet les bactéries homolactiques strictes produisent uniquement de l'acide lactique, alors que les bactéries hétéro lactiques peuvent produire de l'acide acétique, de l'éthanol et du CO<sub>2</sub> en plus de l'acide lactique.

Les bactéries lactiques sont utilisées dans la fermentation de plusieurs produits d'origine animale et végétale. Les cinq genres *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* et *Streptococcus* sont utilisés dans l'industrie laitière en tant que ferments lactiques (Champagne, 1998). Leur rôle principal est de produire l'acide lactique qui influence le goût, la texture et la qualité organoleptique et microbiologique des produits laitiers. En effet, la production d'acide, facilite la coagulation des protéines par la présure, ainsi l'abaissement du pH limite la croissance des bactéries indésirables (Gilliland, 1985).

**II.3 Habitat**

Les bactéries lactiques sont ubiquistes très fréquentes dans la nature. Elles se retrouvent dans différentes niches écologiques comme le lait et les produits laitiers, les végétaux, la viande, le poisson, les muqueuses humaines et animales ainsi que dans le tractus digestif, ce qui explique leur température de croissance hétérogène. Les bactéries lactiques présentent des activités métaboliques assez diversifiées et une capacité d'adaptation à différents

environnements. Cette diversité est responsable de leur large gamme d'applications à l'échelle industrielle (Makhloufi, 2011).

## **II.4 Genre des bactéries lactiques**

### **II.4.1 Le genre *Streptococcus***

Ces bactéries sont des cocci sphérique ou ovoïdes regroupées en paires ou en chaînettes, en générale immobiles: à partir des glucides leur métabolisme est homo fermentaire elles produisent un certain nombre d'agents antimicrobiens.

### **II.4.2 Le genre *Lactobacillus***

Le genre *Lactobacillus* est quantitativement le plus important des germes du groupe des bactéries lactiques, leur morphologie microscopique varie d'une espèce à l'autre de coccobacilles aux bacilles fines et allongé on rencontre des lactobacilles dans la flore intestinale et la flore vaginale.

### **II.4.3 Le genre *Lactococcus***

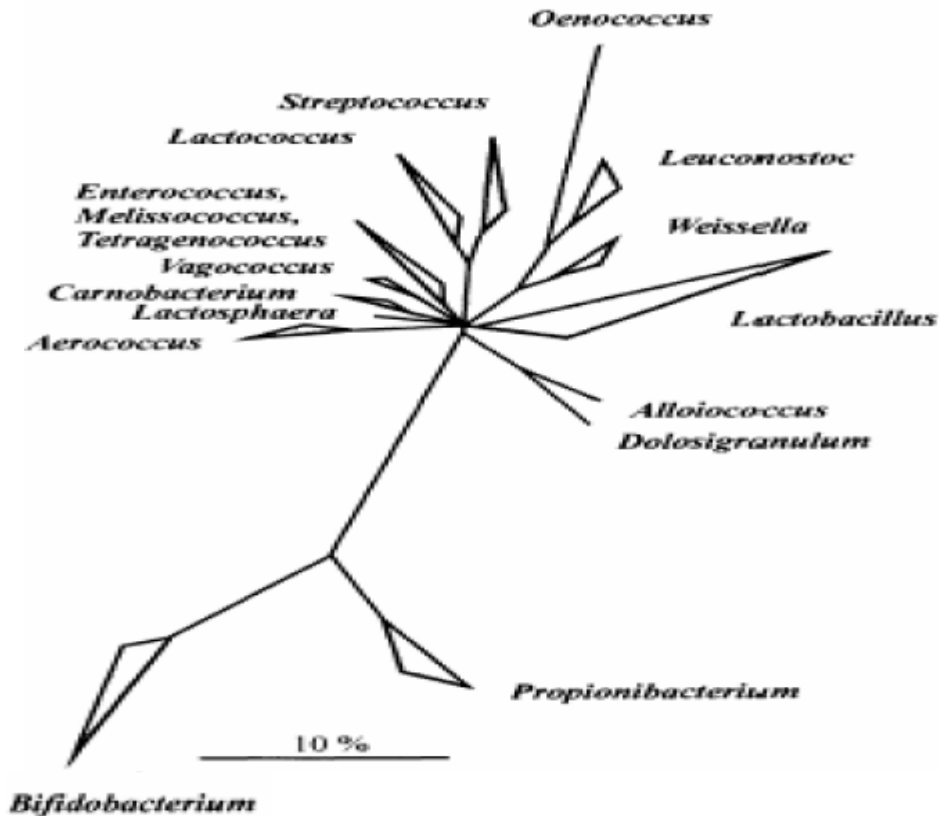
Ils se présentent sous forme de coques, qu'on trouve isolés, en paires ou en chaînettes de longueur variable (Desmazeaud, 1996). Ce sont des organismes homo fermentaires ne produisent que l'acide lactique L (+) (Dellaglio, 1994).

### **II.4.4 Le genre *Leuconostoc***

Les cellules de *Leuconostoc* sont des coques disposées en paires ou en chaînes comme les Streptocoques mais cette bactérie est hétéro fermentaire produisent de l'acide D (-) lactique, de l'éthanol et du CO<sub>2</sub>, ses espèces sont caractérisées, par la production à partir du citrate du lait de di acétyle, parfois du citrate et de 1-7 trines et de levure en présence de saccharose.

### **II.4.5 Le genre *Pediococcus***

Le genre *Pediococcus* sont des germes micro aérophiiles à besoins nutritifs complexe, pour fermentation homolactique donne parfois l'acide lactique racémique, mais fréquemment la forme L prédomine.



**Figure 01:** Arbre phylogénétique des principaux genres de bactéries lactiques et des genres Associés, obtenu par analyse des ARNr 16S (Stiles et Holzapfel, 1997).

## II.5 Classification des bactéries lactiques

Les recherches scientifiques tendent à établir les différences et les interrelations entre les organismes dans le but de les caractériser et de les classer d'une manière rationnelle. Ces études qui incluent la taxonomie, nécessitent des observations écologiques, morphologiques, génétiques et moléculaires.

La taxonomie bactérienne classique s'appuie sur des caractères phénotypiques distinctifs de l'espèce et du genre. Elle est encore utilisée pour les isolats bactériens. En 1919, Orla-Jensen a établi la première classification des bactéries lactiques en se basant sur des critères morphologiques et physiologiques (la forme, type de fermentation, température optimale de croissance, activité catalase). Les critères phénotypiques qui permettent la classification des bactéries se sont ensuite étendus à la composition de la paroi et le type d'acide gras cellulaire (Stiles et Holzapfel, 1997).

La taxonomie des bactéries lactiques révolutionnée par Woese et Fox en 1977 a introduit la phylogénie moléculaire basée sur la séquence des ARN ribosomiques, qui a conduit à une reclassification importante des certaines espèces (Penaud, 2006). Plusieurs méthodes génotypiques (basée sur les acides nucléique) sont aussi utilisées en classification tel que le pourcentage en GC: qui est retenu comme élément de répartition des bactéries lactiques (Holzapfel et *al.*, 2001; Penaud, 2006).

- **Premier groupe:** constitué des genres *Streptococcus* et *Lactococcus*. Dans le genre *Streptococcus* une seule espèce (*St. thermophilus*) est utilisée comme ferment dans l'industrie alimentaire (Stiles et Holzapfel, 1997).

- **Deuxième groupe:** composé des genres *Oenococcus*, *Leuconostoc* et *Weissella* (Collins et *al.*, 1993). Ces bactéries sont très utilisées dans l'industrie agroalimentaire pour la production de vin (*Denococcus oeni*), la fermentation de certains légumes (*Leuconostocitreum*) et la production de choucroute et de entraine (*Leuconostoc mesenteroidess sp. mesenteroidess*) (Collins et *al.*, 1993).

- **Troisième groupe:** celui des *Enterococcus*. Il comporte les genres *Enterococcus*, *Tetragenococcus*, *Melissococcus*, *Carnobactérium*, *Vagococcus*, *Aerococcus* et *Lactosphaera* certains de ces genres sont utilisés dans l'industrieagro-alimentaire, par exemple *Carnobactérium pixicola* pour ses éventuelles capacités à inhiber la flore d'altération lors de la fabrication du saumon fumé (Stiles et Holzapfel, 1997).

- **Quatrième groupe:** comporte deux genres, *Lactobacillus* et *Pediococcus*. Selon des études phylogénétiques bas sur les ARN 16S, 165,5 sous-groupes ont été identifiés au sein du genre *Lactobacillus*: *Lb. acidophilus*, *Lb. salivarius*, *Lb. reuteri*, *Lb. buchneri* et *Lb. plantarum* (Schleifer et *al.*, 1995). De plus, la classification basée sur les profils fermentaires ne se croise pas systématiquement avec ses différents sous-groupes. Ainsi ce type de classification ne distingue pas entre les deux genres *Pediococcus* et *Lactobacillus*, donc le genre *Pediococcus* est compris dans le groupe *Lactobacillus* (Collins et *al.*, 1991).

## II.6. Aptitudes technologiques

### II.6.1 Aptitude acidifiante

La fonction acidifiante constitue la propriété métabolique la plus recherchée des bactéries lactiques. Utilisées dans les industries alimentaires, elles se manifestent par la production de



l'acide lactique à partir de la fermentation des hydrates de carbone au cours de la croissance bactérienne (Mäyrä-Mäkinen et Bigret, 2004; Monnet *et al.*, 2008).

Les conséquences, d'ordre physico-chimique et microbiologique, peuvent se résumer ainsi par (Béal *et al.*, 2008):

- Accumulation d'acide lactique participant à la saveur des aliments fermentés.
- Abaissement progressif du pH.
- Limitation des risques de développement de flore pathogène et d'altération dans les produits finaux ;
- Déstabilisation des micelles de caséines, coagulation des laits et participation à la synérèse.

Pour un ferment donné, il s'agit de permettre une vitesse d'acidification élevée et/ou d'atteindre un niveau d'acidité finale prédéfinie. Le niveau d'acidité dépend des spécifications du produit, lesquelles vont conditionner le choix des souches (Monnet *et al.*, 2008).

### **II.6.2 Aptitude protéolytique**

Les bactéries lactiques possèdent des protéinases et des peptidases nécessaires à la dégradation des protéines du lait en peptides et en acides aminés; ceux-ci peuvent alors être transformés en alcools et en acides. L'activité protéolytique intervient de ce fait sur le rendement fromager, la texture et la saveur typique du fromage, et par conséquent sur les caractéristiques du produit final (Buist *et al.*, 1998).

Dans les fromages, l'activité des enzymes protéolytiques des bactéries lactiques est fondamentale car elle va participer à la formation du goût ou des arômes, la protéolyse due aux bactéries lactiques va surtout conduire à des peptides courts et à des acides aminés libres. Ces derniers sont des précurseurs pour de nombreux produits d'arômes. En effet, la méthionine peut conduire à des composés soufrés caractéristiques, ceci, après leur dégradation par la flore d'affinage (Schirch *et al.*, 1985; Ottet *et al.*, 1997).

La croissance jusqu'à des densités cellulaires permettant aux bactéries lactiques d'assurer les fonctions de fermentation repose sur un système protéolytique capable de satisfaire tous les besoins en acides aminés en hydrolysant les protéines. Les bactéries lactiques démontrent des potentialités différentes, liées à leur équipement enzymatique, pour l'utilisation de la fraction azotée.

Les Lactobacilles présentent généralement une activité protéolytique plus prononcée que les *Lactocoques* (Donkor et al., 2007; Monnet et al., 2008; Roudj et al., 2009).

### **II.6.3 Aptitude lipolytique**

Les activités lipolytiques jouent un rôle important dans la formation des substances aromatiques des produits transformés, bien que parfois, elles soient à l'origine d'altérations (Franz et al, 2003). Ces propriétés lipolytiques sont généralement faibles chez les bactéries lactiques, les *Lactocoques* sont considérés comme plus lipolytiques que *Streptococcus Thermophilus* et les *Lactobacilles*. Elles peuvent cependant présenter un intérêt pour certaines applications fromagères (Béal et al., 2008).

D'une manière générale on distingue les estérases qui hydrolysent de façon préférentielle les esters formés avec les acides gras à chaîne courte (C2-C8) et les lipases qui sont actives sur des substrats émulsifiés contenant des acides gras à chaîne longue (>C8). Ces enzymes sont impliquées dans l'hydrolyse de mono, di, et triglycérides (Béal et al., 2008; Serhan et al., 2009).

### **II.6.4 Aptitude aromatisant**

Les bactéries lactiques sont capables de produire de nombreux composés aromatiques (telsque: l' $\alpha$ -acétolactate, l'acétaldéhyde, le diacétyl, l'acétoïne et 2,3-butane diol, l'éthanol, l'acétate, leformiate, etc.) principalement à partir du lactose, du citrate, des acides aminés et des matières grasses. Cette fonctionnalité est particulièrement importante lors de l'élaboration des laits fermentés, des fromages frais, crèmes et beurre dont l'arôme principal est lié à cette activité microbienne (Bourgeois et Larpent, 1996; Gerrit et al., 2005; Cholet, 2006). L'acétaldéhyde est un composant important de l'arôme des produits fermentés.

**I.6.5 Aptitude texturante**

La capacité des bactéries lactiques à synthétiser des exo polysaccharides (EPS) joue un rôle important pour la consistance et la rhéologie des produits transformés (Leroy et De Vuyst, 2004; Ho et *al.*, 2007). La plupart des bactéries lactiques synthétisent les polysaccharides. Certains se trouvent à l'intérieur de la cellule, d'autres sont des composants de la paroi. Un troisième groupe de polysaccharides est excrété à l'extérieur de la cellule d'où vient le terme "exopolysaccharide" (EPS) (Topisirovic et *al.*, 2006).

Les EPS ont l'avantage d'être «naturels», requis en faible concentration et ne peuvent être remplacé par les agents stabilisants par leurs propriétés de modifier positivement la texture, la viscosité et la sensation en bouche des laits fermentés (Marshall et Rawson, 1999). Ils peuvent alors servir d'émulsifiants ou d'agents gélifiants (Welman et *al.*, 2003). Dans le cas des deux bactéries du yogourt : *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*. La production d'EPS est régulée par plusieurs gènes au niveau chromosomique (Cerning, 1995). Généralement, pour les bactéries thermophiles, la production d'EPS est associée à la croissance bactérienne (Petry et *al.*, 2003).

**II.6.6 Activité antimicrobienne**

Les bactéries lactiques produisent une variété de composés antimicrobiens qui sont utilisés dans la fermentation et la bio conservation des aliments (Labioui et *al.*, 2005). Les acides organiques, comme l'acide lactique, l'acide acétique ou l'acide propionique, élaborés lors de la fermentation des glucides, peuvent inhiber des levures, des moisissures et des bactéries. Le peroxyde d'hydrogène produit par les bactéries lactiques s'accumule dans l'environnement et peut inhiber certains microorganismes.

Les bactéries lactiques hétérofermentaires synthétisent du dioxyde de carbone comme métabolite secondaire. Son accumulation dans le milieu extérieur crée une anaérobiose qui s'avère toxique pour certains microorganismes aérobies présents dans l'aliment. Le diacétyl peut inhiber la croissance des bactéries à Gram négatif, des levures et moisissures (Alakomi et *al.*, 2000; Ammor et *al.*, 2006).

Les bactériocines produites par les bactéries lactiques sont des substances antimicrobiennes de poids moléculaire variable. Elles ont une activité inhibitrice dirigée contre les bactéries proches de la souche productrice et leur spectre d'action est généralement étroit. Les plus connues sont: la nisine, la diplococcine, l'acidophiline et la bulgaricane (Ogunbanwo et *al.*, 2003; Dortu et Thonart, 2009). La plupart des bactériocines produites par

les bactéries lactiques partagent le même mode d'action, basé sur la formation de pores dans la membrane de la bactérie cible (De Vuyst et Leroy, 2007; Kumari et *al.*, 2009).

### **II.6.7 Performance**

La sélection d'un ferment lactique doit prendre en compte des critères de performance des bactéries. Les bactéries devront répondre à certaines des spécificités suivantes (Béal et *al.*, 2008):

- Résistance aux bactériophages et aux traitements mécaniques;
- Tolérance aux inhibiteurs de croissance (antibiotiques, chlorure de sodium, saccharose, l'acidité, l'éthanol et la température élevée);
- Aptitude à la congélation ou à la lyophilisation et à la conservation;
- Comportement en présence d'oxygène;
- Croissance à des températures non optimales;
- Compatibilité avec d'autres isolats;
- Facilité d'emploi.

# *Partie Expérimentale*

***Chapitre III :***  
***Matériel et Méthodes***

### **III.1. Déroulement de l'expérimentation**

Le travail expérimental a été réalisé au niveau du laboratoire de recherche des Sciences et Techniques de Production Animale (LSTPA), à l'université Abdelhamid Ibn Badis Mostaganem.

### **III.2. L'échantillonnage et techniques de prélèvement de lait**

Les échantillons de laits ont été aseptiquement prélevés à partir des chèvres des régions de Mostaganem. Le pis et la mamelle ont été nettoyés à l'eau javellisée. La traite est réalisée après lavage soigné des mains et aseptisation. Le lait a été recueilli dans un flacon en verre de 250ml stérile, après avoir éliminé quelques jets, conservé dans une glacière et acheminé directement au laboratoire pour analyse.

- Echantillon 1: lait de chèvre analysé correspond à E1.
- Echantillon 2: lait de vache traité en fin de lactation correspond à E2.
- Echantillon 3: lait de chèvre fraîchement trait correspond à E3.

### **III.3. Analyses physico- chimiques**

#### **III.3.1 Mesure de pH**

La mesure du pH est faite directement par le pH-mètre en plongeant l'électrode dans le volume de lait. Le pH a été déterminé à chaque fois que nous procédions au dosage de l'acide lactique (Guiraud, 2003).

### **III.4. Dénombrement et isolement des bactéries lactiques**

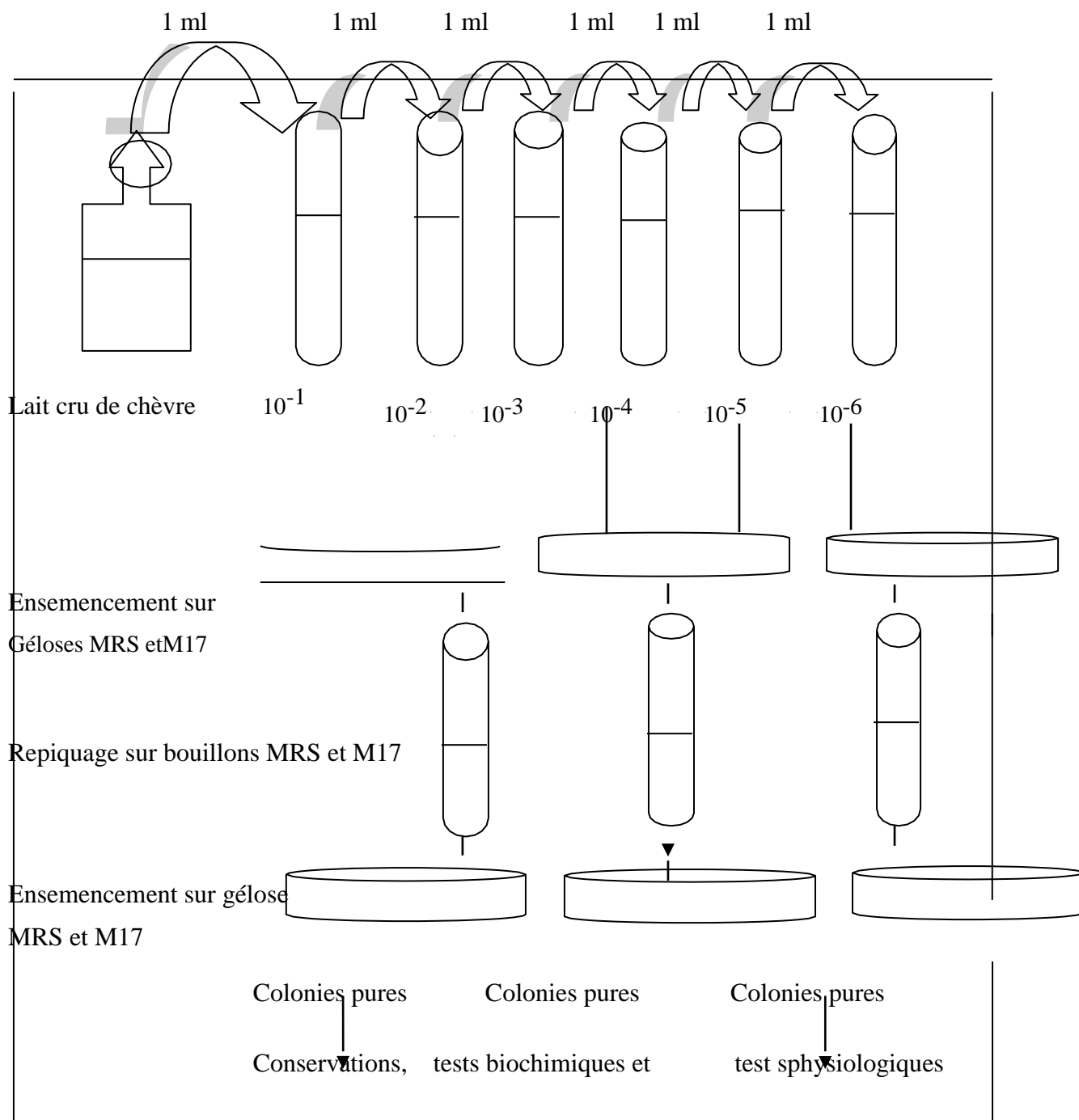
Après homogénéisation du lait de chèvre cru, on effectue des dilutions décimales de  $10^{-1}$  jusqu'à  $10^{-6}$ .

On prélève à partir des dilutions 0,1 ml qu'on étale sur la surface sur milieu (MRS) les boîtes sont incubées à 37°C pendant 24 heures.

L'isolement a été réalisé sur gélose M17 et MRS préalablement coulée et solidifiée dans des boîtes de Pétri, en portant 0.1ml des dilutions à la surface du milieu suivi d'un étalement. L'incubation est faite à 37°C pendant 24h à 48h (Idoui et *al.*, 2009).

Afin de purifier les isolats, des repiquages successifs sont effectués sur les bouillons (MRS) et gélose (MRS). La purification des isolats consiste à les ensemercer en stries sur des boîtes de Pétri coulées avec des milieux MRS (solide).

Les boîtes sont ainsi incubées à 37°C pendant 24 h. L'opération est répétée jusqu'à l'obtention des colonies pures.



**Figure 02:** Diagramme d'isolement des isolats.



**III.5. Caractérisation et identification des isolats lactiques**

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

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

**III.5.1 Etude morphologique**

Cette étude est basée sur l'observation macroscopique et microscopique.

**III.5.1.1 Examen macroscopique**

Ce test permet de mettre en évidence la morphologie des colonies obtenu sur milieux solides. Il s'agit d'une observation à l'œil nu qui consiste à déterminer taille, couleur et forme des colonies.

**III.5.1.2 Examen microscopique**

L'observation microscopique permet de déterminer la forme et la disposition des cellules bactériennes

**III.5.1.3 Coloration de Gram**

La coloration de Gram est effectuée sur frottis. Elle permet de distinguer deux types de bactéries, les bactéries Gram négatifs (G-) et les bactéries Gram positives (G+). Les bactéries lactiques sont des bactéries à Gram positif.

**III.5.1.4. Recherche de la catalase**

La catalase est une enzyme qui dégrade l'eau oxygénée (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) en eau métabolique (H<sub>2</sub>O) et oxygène (O<sub>2</sub>). On dépose sur une lame propre une colonie bien distincte et on ajoute une goutte d'eau oxygénée.



Les bactéries lactiques sont à Gram positives et catalase négatives.

### **III.6. Technique de conservation**

#### **III.6.1 Conservation à court terme**

La conservation de courte durée se fait par ensemencement d'une colonie sur gélose solide inclinée, après incubation à 37°C pendant 24h, les géloses sont conservées à 4°C pour quelques semaines (Saidi et *al.*, 2002).

#### **III.6.2 Conservation à long terme**

Les isolats sont congelées à -20°C dans une solution contenant 70% de lait écrémé et 30% de glycérol (Saidi et *al.*, 2002).

### **III.7. Tests physiologiques**

#### **III.7.1 Test de croissance à différentes températures (20°C 15°C 45°C)**

Ce test a été effectuée par ensemencement des tubes de bouillon MRS.

Les tubes sont examinés au bout d'un délai de 18 h, la croissance est appréciée par l'apparition d'un trouble.

#### **III.7.2 Test de croissance à différents pH: (pH=9,6; pH=5)**

##### **III.7.2.1 Croissance à pH=9.6**

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

##### **III.7.2.2 Croissance à pH=5**

Il permet d'identifier le genre *Lactobacillus*. On refait les mêmes étapes que celles décrites à pH= 9.6. La croissance se traduit aussi par l'apparition d'un trouble dans le tube.

#### **III.7.3 Test de thermoresistance**

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

Les isolats sont inoculés en milieux liquides (MRS), la culture bactérienne doit être jeune et pure.

Les tubes sont introduites dans un bain marie à 60°C pendant 30 minutes, puis incubés à 37°C durant 24 à 48 heures.

Un résultat positif se traduit par un trouble (De Roissart et *al.*, 2006). Seuls les isolats thermophiles poussent, contrairement aux isolats mésophiles qui sont incapables de se développer.

#### **III.7.4 Croissance en milieu hypersalé**

Les cultures à tester ont étéensemencées sur bouillon hypersalé à 6.5% de NaCl. Les tubes sont incubés à 37°C pendant 24 heures.

Les lactocoques lactiques sont incapables de survivre dans ce milieu.

#### **III.7.5 Croissance dans le lait de Sherman**

L'aptitude des isolats lactiques à croître en présence (bleu de méthylène) été testé à 0,1% et 0,3%; le milieu utilisé est le lait écrémé stérilisé contenu dans tubes à essais de 9 ml ; 1ml d'une solution de bleu de méthylène à 1% stérile (pour lait à 0,1% de BM) et 1ml d'une solution de bleu de méthylène à 3% stérile (pour obtenir un lait à 0,1% de BM) sont ajoutés dans chaque tube. Le milieu estensemencé avec les souches à tester et incubé à 37°C durant 48 heures.

Le bleu de méthylène tire sa couleur grâce à l'oxygène. Ce test porte toujours sur le système respiratoire des lactocoques, car vu que ceux sont des micro-aérophiles, ils ne vont utilisés qu'une partie de l'oxygène présent dans le bleu de méthylène (0.1%) et de ce fait la couleur du lait (bleu) virera vers le blanc.

### **III.8. Tests biochimiques**

#### **III.8.1 Recherche de l'arginine dihydrolase (ADH)**

Cette enzyme ayant l'aptitude de libérer l'ammoniac et la citrulline à partir de l'arginine.

Dans chaque tube à essai, on introduit 1ml d'une culture jeune à laquelle on ajoute quelques gouttes d'arginine en ampoules.

Après l'incubation à 37°C pendant 24h, les isolats d'arginine positives catabolisent l'arginine et libèrent l'ammoniac (NHR3R) et empêchent le virage de la couleur au jaune (Guiraud, 1998).

### **III.8.2 Production de l'acétoïne (Acétyle-Méthyle-Carbinol)**

Sur milieu de Clark et Lubs, et après ensemencement des isolats et incubation à 37°C pendant 24 à 48 h. La production de l'acétoïne est testée par la réaction de Vogues- Proskauer (VP).

Dans un tube à essai on introduit 1ml de la culture à tester, on ajoute 5 gouttes du réactif VPI (solution de soude NaOH à 16% dans l'eau distillée) et le même volume du réactif VPII ( $\alpha$ - naphthol à 6% dans l'alcool à 95%).

On agite soigneusement les tubes et on laisse reposer 5 à 10 min à température ambiante. Le test positif se traduit par l'apparition d'un anneau rose à la surface du milieu, après 10 min. (Guiraud, 1998).

### **III.8.3 Production de dextrane**

On utilise le milieu Mayeux, Sandine et Elliker, 1962 (annexe). La production du dextrane à partir du saccharose est mise en évidence sur milieu solide MSE (Mayeux *et al.*, 1962). Les isolats producteurs de dextrane sont caractérisés par la formation des colonies larges, visqueuses et gluantes.

### **III.9. Etude du pouvoir acidifiant des isolats**

Les isolats sont ensemencés dans des tubes contenant 9ml de lait écrémé stériles et incubés à 30°C durant 18 h. Après homogénéisation, on verse le contenu de chaque tube dans des flacons 200ml de lait écrémé stériles.

On prélève 20ml du flacon qu'on répartit dans deux béchers à raison de 10 ml pour chacun, puis on mesure le pH. (Badis *et al.*, 2004).

Pour le 2ème bécher de 10 ml de l'échantillon, on ajoute 3 à 4 gouttes de phénophtaléine 1% et on titre avec la soude N/9 jusqu'au virage de la couleur du blanc à la rose pale.

L'acidité est déterminée par la formule :

$$\text{Acidité (°D)} = V_{\text{NaOH}} \times 10$$

Où:

**V NaOH:** Volume de NaOH N/9 utilisé pour titrer l'acide lactique contenu dans les 10 ml de lait.

**°D:** Présente 0.1 g d'acide lactique dans 1 litre de lait.

La mesure de pH est faite directement par le pH-mètre, en plongeant l'électrode dans le volume du lait. Le pH a été déterminé à chaque fois qu'on procède au dosage de l'acide lactique.

## *Chapitre IV:*

### *Résultats et Discussion*

### IV.1. Résultats et discussion

Le lait de chèvre blanc mat, due à l'absence de  $\beta$ -Carotène, contrairement au lait de vache il a une odeur assez neutre. Parfois en fin de lactation, une odeur caprique apparait et après stockage au froid pour acquérir une saveur caractéristique (Goursaud, 1995).

Nos échantillons sont caractérisés par:

- Un aspect homogène, ne présente pas de grumeaux.
- Une couleur blanc mat due à l'absence de  $\beta$ -carotène qui est responsable de la couleur blanche de la matière grasse.
- Et une odeur caprique pour E2 par contre les deux échantillons E1 et E3 a une odeur assez neutre.
- Les trois échantillons de lait analysé possèdent une saveur douce.

### IV.2. Paramètres physico-chimique

#### IV.2.1 Le pH

Les valeurs recueillies lors de cette mesure donnent une moyenne de pH échantillons de lait cru de chèvre E1, E2 et E3 qui sont respectivement de 9,6 ; 6,58 et 6,60.

Les pH du lait à la traite peuvent résulter de l'infection de la mamelle de l'animal (Morgan, 1999), aussi, ceci peut également être dû à une grande influence sur les variations de pH du lait de chèvre (Remeuf et *al.*, 2001).

**Tableau 02:** Caractéristiques physico- chimiques effectuées sur les 3 échantillons de lait analysés.

Echantillons	E1	E2	E3
pH	9.6	6.58	6.60
Acidité (°D)	12	14.3	16

### IV.3. Pré identification des isolats

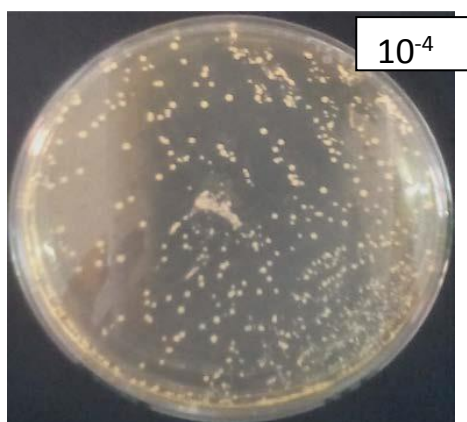
#### IV.3.1 Caractérisation macroscopique

La caractérisation macroscopique, permet de décrire l'aspect des colonies obtenues sur milieu solide MRS à pH 9,6 après 24h d'incubation à 37°C (Anabeien Flozer *et al.*, 2006) et sur milieu M17 à pH 7,2 après 24h d'incubation à 37°C et de déterminer les critères relatifs aux colonies des bactéries lactiques (taille, pigmentation, contour, aspect, viscosité), pour les isolats testés, on a observé sur milieu solide des petites colonies d'environ 1 mm de diamètre, de forme lenticulaire de couleur blanchâtres ou laiteuses.

#### IV.3.2 Observation microscopique

Après coloration de Gram, l'observation microscopique a révélé que nos isolats sont Gram positif, les différentes formes observées sont décrites comme suit:

- Des coques disposées en amas, en chaînes, et en paires.
- Des bacilles disposés en chaînes et en paires.



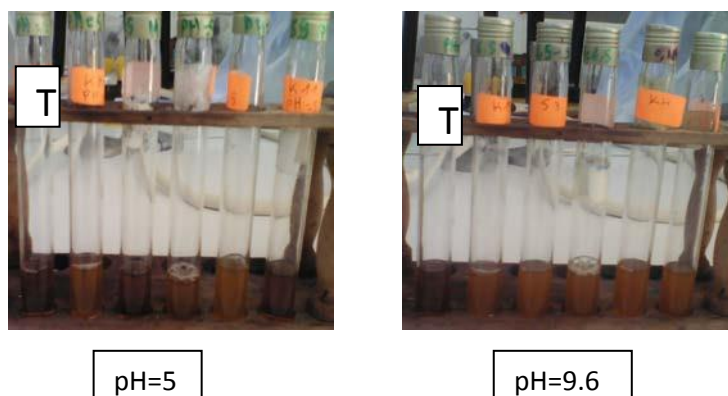
**Figure 03:** Aspect des bactéries lactiques sur milieu M17 solide après incubation à 37°C pendant 24h on aérobie.

### IV.4. Les tests physiologiques

#### IV.4.1 Croissance à différents pH

Croissance à différents pH (5, 9.6) milieu MRS se traduit par un trouble bactérien visible à l'œil nu, on obtient les résultats suivants. La croissance des isolats à pH 5 a été marqué positif (+).

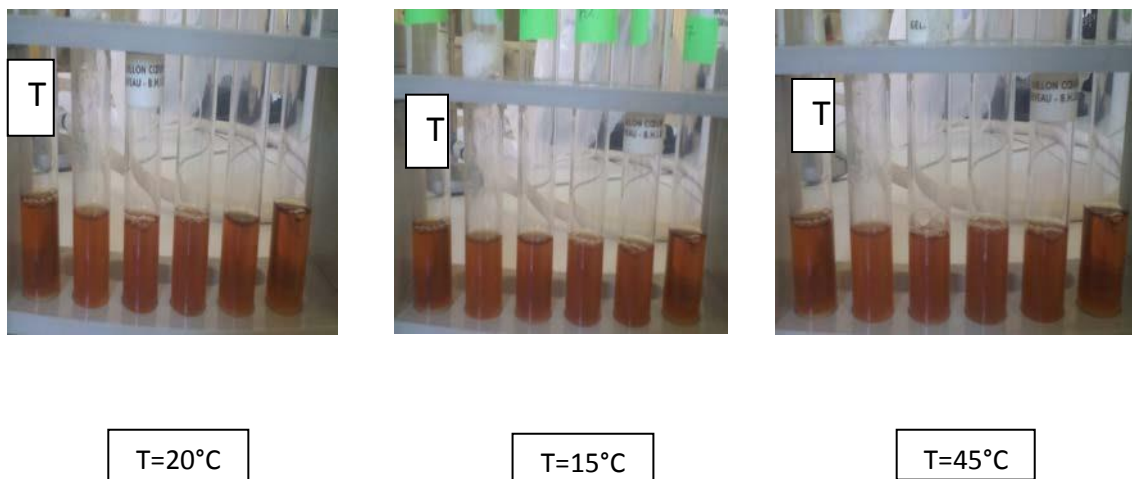




**Figure 04:** Croissance à différents pH.

#### IV.4.2 Croissance à différentes températures

Les variations de température d'incubation pour les différents isolats est un critère physiologique de sélection pour l'identification et la mise en évidence des aptitudes biotechnologique. Les résultats de ce test permettent de distinguer entre isolats mésophiles qui poussent à 15°C, psychrophiles qui poussent à 20°C et celles qui se développent à 45°C et donc thermophiles.



**Figure 05:** Croissance à différentes températures. T: Témoin

#### IV.4.3 Test de la thermorésistance

La thermorésistance est un caractère physiologique permettant de distinguer entre les isolats pouvant tolérer une température de 60°C pendant 30 min de celles qui en sont incapables.



**Figure 06:** La thermorésistance

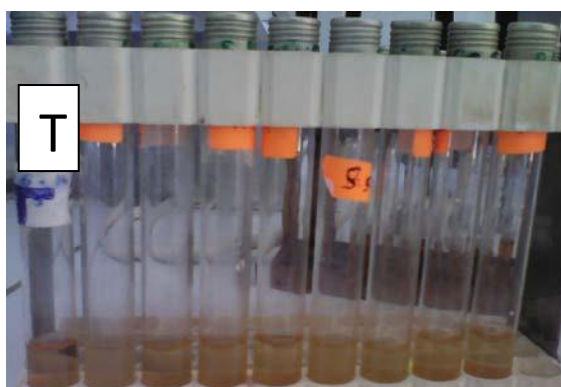
Le résultat positif se traduit par un trouble. Seuls les isolats thermophiles poussent, contrairement aux isolats mésophiles qui sont incapables de se développer.

#### IV.4.4 Croissance en milieu hypersalé

C'est un milieu hostile pour la plupart des bactéries, celles qui le tolèrent peuvent y pousser.

Après incubation la tolérance est marquée par un trouble dans les tubes.

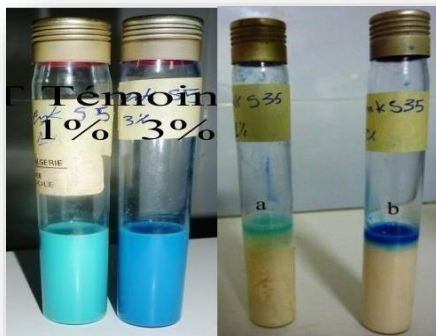
Les résultats par un trouble ont révélé que les isolats ont pu résister à cette concentration de NaCl, 5%.



**Figure 07:** Croissance en milieu hyper salé (NaCl 6,5%).

#### IV.4.5 Croissance dans le lait de Sherman

Tous les isolats ont coagulé le lait et ont réduit le bleu de méthylène pour les deux concentrations, sauf deux isolats ont réduit seulement le bleu de méthylène à 1%.



**Figure 08:** Exemple des résultats du lait de Sherman.

a) réduction du bleu de méthylène à 1 % ; b) réduction du bleu de méthylène à 3 %.

## IV.5. Les tests biochimiques

### IV.5.1 Recherche de l'arginine dihydrolase (ADH)

La mise en évidence de l'arginine dihydrolase se traduit par le virage de l'indicateur de pH du jaune vers le violet par libération d'ammoniac, pour un test négatif la couleur reste jaune due à l'acidification par fermentation du glucose, notons bien qu'au départ le milieu était violet.



**Figure 09:** L'arginine di hydrolase (ADH).

### IV.5.2 La production d'acétoïne

La production d'acétoïne est testée sur milieu Clark et Lubs (FIL, 1996).

Les isolats de lait cru de chèvre:

- Milieu jaune =>absence d'acétoïne =>test du VP négatif pour nos isolats lactiques.
- Milieu rouge =>présence d'acétoïne =>test du VP positif pour nos isolats lactiques.

### IV.5.3 Production de dextrane

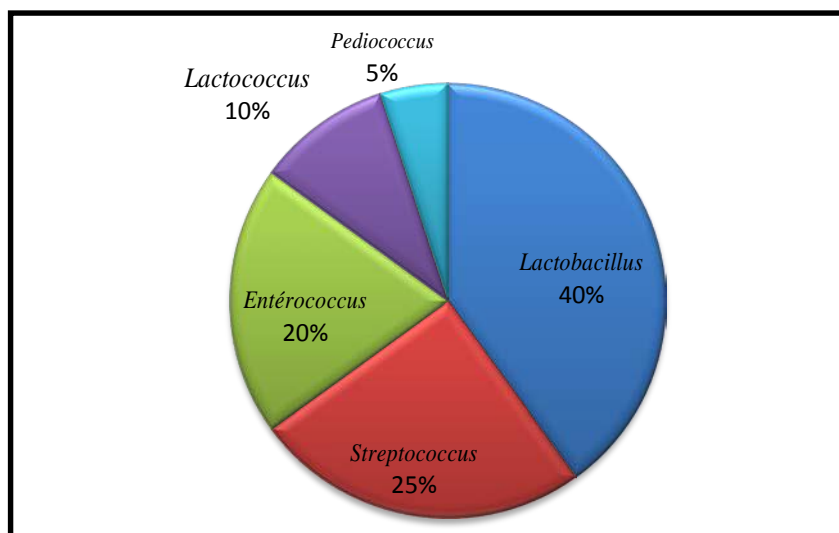
Le test de dextrane s'est révélé négatif pour l'ensemble des souches isolées.

### Discussion

Les analyses morphologiques, physiologiques et biochimiques ont mis en évidence toute la diversité de la flore lactique en genres isolés à partir du lait de chèvre.

Les isolats retenus au nombre de vingt sont répartis en cinq genres: *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus* et *Pediococcus*.

Nous pouvons noter que le genre *Lactobacillus* est dominant avec un pourcentage de 40%, suivi en deuxième lieu du genre *Streptococcus* avec un pourcentage de 25%. Les genres *Enterococcus* à un pourcentage de 20%, *Lactococcus* à pourcentage de 10%, et le dernier *Pediococcus* avec un faible pourcentage de 5% (figure 10).



**Figure 10:** Répartition des genres des bactéries lactiques.

Nos résultats montrent que Les espèces de *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus* sont les genres dominantes les plus fréquemment signalées dans les trois échantillons. Par contre, le nombre d'espèce *Pediococcus* est très faible dans l'ensemble des trois échantillons du lait étudié. Ces résultats sont en accord avec ceux de (Hichener et *al.*, 1998), qui a montré que les espèces de *Leuconostoc* et de *Pediococcus* sont rarement retrouvées dans la flore lactique.

L'absence des bactéries genre *Leuconostoc* est due probablement à la qualité nutritionnelle insuffisante du lait pour leur développement, à la saison de collecte, la région géographique, la période de lactation, ou l'état physiologique de l'animal et d'éventuel traitement par les antibiotiques.

Selon (Saidi et *al.*, 2002), du fait des exigences nutritionnelles des bactéries lactiques, les espèces de bactéries lactiques détectées dépendent essentiellement de la nature de lait cru.

L'évolution de l'acidité et les variations de pH au cours de la croissance des isolats testées sur le lait écrémé démontrent une différence entre les genres, les espèces et même entre les isolats d'une même espèce (Luquet et Corrieu, 2005).

Ces résultats présentent une activité acidifiante plus faible par rapport à ceux obtenus par (Cheriguene et *al.*, 2006) qui ont trouvé que *Lactocoques lactis ssp. lactis*, isolées à partir de lait de chèvre, produit une moyenne de 7.5g/l d'acide lactique après 24h d'incubation.

## *Conclusion*

### **Conclusion**

Depuis l'antiquité, les bactéries lactiques ont été utilisées pour la fabrication et la conservation d'aliments. La découverte de leur action sur le lait fut probablement accidentelle mais leur utilisation fut perpétuée sous forme de ferments et elle est en développement continu (Hadeef, 2012).

Le but de cette étude était la caractérisation des isolats de bactéries lactiques et l'étude du pouvoir acidifiant. L'identification des isolats a été réalisée par la détermination des caractéristiques morphologiques, physiologiques et biochimiques. La totalité était sept genres différents et diverses proportions: *Lactobacillus* (40%), *Pediococcus* (5%), *Streptococcus* (25%), *Lactococcus* (10%), *Enterococcus* (20%) sur un total de vingt isolats étudiés.

D'après les résultats de l'étude du pouvoir acidifiant nous avons pu déduire que, même au sein d'une même espèce.

Les résultats de caractérisation obtenus, on a permis d'avoir une idée sur la nature de la flore lactique présente dans le lait de chèvre, et on conclut que la majorité des espèces des bactéries lactiques sont présentes dans le lait cru de chèvre.

## *Références bibliographiques*



### Références bibliographiques

1. Ait-Belghanoui A., Lamine F., Han W., Eutamene H., Fioramonti J., Bueno L. et Theodorou V., (2005). A probiotic strain (*Lactobacillus farciminis*) prevents stress-induced increase of colonic permeability and visceral sensitivity to distension in rats. *Nutr. Ali. Fonct.* 3.
2. Alais, C. (1984). *Sciences du lait : principes des techniques laitières*, 4<sup>ème</sup> Edition, Paris.
3. Alakomi H.L., Skytta E., Saarela M., Mattila-Sandholm T., Latva-Kala K. et Helander I.M., 2000. Lactic acid permeabilizes gram-negatif bacteria by disrupting the outer Membrane. *App. Env. Microbiol:* (2001-2005).
4. Amiet.J et Lapointe- vignola C., (2002). *Science et technologie du lait: transformation du lait*. Presses Intl, polytechnique, Quebec, 600.
5. Ammor S., Tauveron G., Dufor E. Et Chevalier I., (2006). Antibacterial activity of lactic Acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-Scale facility 1-Screening and characterization of antibacterial compound. *Food Control.* 17.
6. Anabeien Flozer T.T et Zerrouki N., (2000). Influence des saisons et de l'alimentation sur la composition du lait de chèvres bédouines (*caprahircus*). Le 22<sup>ème</sup> Forum des Sciences Biologiques de L'Association Tunisienne des Sciences Biologiques. 4 p.
7. Ansart M, (1995). Les industries agricoles et alimentaires, progrès des sciences et techniques, p, 46 in Andria Tsidikana D. (2010). *Projet de création d'une unité de fabrication semi –industrielle de fromage à partir de lait de chèvre dans la région d'ambatolampy*. Mémoire du diplôme d'ingénieur. Université d'Antananarivo.
8. Badis A., Guetarni D., Moussa B. B., Henni D. E., Kihal M. (2004). Identification and technological properties of lactic acid bacteria isolated from raw goat milk of four Algerian races. *Food Microbiol*, Vol. 21.
9. Béal C., Marin M., Fontaine E., Fonseca F. Et Obert J.P., (2008). Production et Conservation des ferments lactiques et probiotiques. In : *Bactéries lactiques, de la génétique Aux ferments* (Corrieu G.et Luquet F.M.). Tec& Doc, Lavoisier. Paris.
10. Boyaval, P., Deborde, C., Corre C., Blanco, C et Begue, E. (1999). *Le Lait*.
11. Bourgeois C.M. et Larpent J.P., (1996). *Microbiologie alimentaire : Aliments fermentés et Fermentations alimentaires*. Tec & Doc, Lavoisier. Paris.
12. Buist G., Venema G et Kok J., (1998). Autolysis of *lactococcus lactis* influenced by Proteolysis, *Journal of Biotechnology*. N°22: 5953-5974.

## Références bibliographiques

---

13. Cerning J., (1995). Production of exopolysaccharides by lactic acid bacteria and dairy Propionibacteria. *Lait*, 75.
14. Champagne C. P, (1998). Production de ferments lactiques dans l'industrie laitière Ed: maloine, Paris.
15. Cheriguene A., Chougrani F. et Bensoltane A., (2006). Identification and characterization of lactic acid bacteria isolated from goat's Algerian milk. *Pakistan J. Biol. Sci.*
16. Cholet O., (2006). Etude de l'écosystème fromager par une approche biochimique et moléculaire. Institut National Agronomique Paris-Grignon. Ecole Doctorale ABIES. UMR de Génie et Microbiologie des Procédés Alimentaires INRA, INA.16
17. Collins M D., Rodrigues U., Ash C., Aguirre M., Farrow J A E., Martinez-Murcia A., Phillips B A., Williams A M and Wallbanks S., (1991). Phylogenetic analysis of the genus *Lactobacillus* and related lactic acid bacteria as determined by reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA. *FEMS Microbiology Letters*.
18. Collins M D., Samelis J., Metaxopoulos J and Wallbanks S., (1993). Taxonomic studies on 189 some leuconostoc-like organisms from fermented sausages: description of a new genus *Weissella* for the *Leuconostoc paramesenteroides* group of species. *J. Appl. Bacteriol.*
19. Contreras A., Corrales J C et Siera D., (1993). Caprin eintrammamryinfection: quality of milk. *Lait*.
20. Critical Rev. Microbiol: 281-370. Institut National Agronomique Paris-Grignon. Ecole Doctorale ABIES. UMR De Génie et Microbiologie des Procédés Alimentaires INRA, INA.16.
21. Dellaglio, F., De Roissart, H., Torriani, S., Curk, M.C. et Janssens, D. (1994), Caractéristiques générales de bactéries lactiques. In *bactéries lactiques*, 25-116. Uriage loriga.
22. De Roissart, L. et Bensoltane, A. (2006). Physico-chemical, microbiological and biotechnological studies of lactic acid bacteria isolated from ewe's milk of Algeria two breeds (Ouled Djellal and El Hamra). *Egypt. J. Appl. Sci.* 21.
23. Desmazeaud, M. (1996). Les bactéries lactiques dans: L'alimentation humaine: utilisation et innocuité. *Cahiers Agricultures*.
24. Desjeux J F, (1993). Valeur nutritionnelle du lait de chèvre. *Lait*.
25. De Vuyst L et Leroy F., (2007). Bacteriocins from lactic acid bacteria: production, Purification, and food applications. *Mol. Microbiol. Biotechnol.*
26. Donkor O.N., Henriksson A., Vasiljevic T et Shaha N.P., (2007). Proteolytic activity of Dairy lactic acid bacteria and probiotics as determinant of growth and in vitro angiotensin Converting enzyme inhibitory activity in fermented milk. INRA, EDP Sciences.

## Références bibliographiques

---

27. Dortu C et Thonart P, (2009). Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et Intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires. *Biotechnol. Agron. Soc. Env.* 13.
28. EUFIC, (1999). The European Food Information Concl.
29. FAO, (1990). Le lait et les produits laitiers dans la nutrition humaine. Collection FAO/Alimentation et nutrition.
30. FIL-Norme, (1996). Yaourt, identification des micro-organismes caractéristiques: *Lactobacillus de lbrueckii sub spbulgaricus* et *Streptococcus. Salivarius subs pthermophilus*. Revue: 46.
31. Franz et Stiles, (2003). Enterococci in foods – a conundrum for food safety. *International Journal of Food Microbiology. Functional and Safety Aspects*, vol 88.
32. Gilliland S.E. (1985). Role of starter culture bacteria in food preservation. *Bacterial starter cultures for food*. Gilliland S. E. Boca Raton, USA, CRC Press Inc.
33. Goursaud J, (1985). Le lait de vache, composition et priorité physico-chimiques. In: lait et produits laitiers vache- brebis- chèvre. (tome 1) .Ed. Masson, Paris.
34. Gueguen, B., Chamba, J. F., Coulon, J. et Perreard, E. (1996). Effect of milk chemical composition and clotting characteristics on chemical and sensory properties of reblochon de savoir cheese. *J. Dairy Res.*Gerrit S., Bart A.S. et Wim J.M.E., (2005). Flavour formation by lactic acid bacteria and Biochemical flavor profiling of cheese products. *FEMS. Microbiol. Rev* 29.
35. Guiraud, J. P. (1998). *Microbiologie alimentaire*. Ed. Dunod, Paris.
36. Guiraud J.P., (2003). *Microbiologie Alimentaire*. Tec & Doc, Dunod. Paris. 90-292.
37. Hadeif. S, (2012). Evaluation des aptitudes technologies et probiotiques des bactéries lactiques locales, Mémoire en vue de l'Obtention du Diplôme de Magister, Université Kasdi Merbah-Ouergla. 32p.
38. Holzapfel W H., Haberer P., Geisen R., Björkroth J et Schillinger U., (2001). Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *Am. J. Clin. Nutr.* 73(2 Suppl), 365S-373S.
39. Ho T.N.T., N. Tuan N., Deschamps A. Et Caubet R., (2007). Isolation and identification of Lactic acid bacteria (LAB) of the Nem Chua fermented meat product of Vietnam. *Int. Workshop on Food Safety and Processing Technology*.
40. Idoui, T., Boudjerda, J., Leghouchi, E. ET Karam, N.E., (2009). Lactic acid bacteria from sheep's Dhan'', a traditional butter from sheep's milk: Isolation, identification and major technological traits. *Gr. Y. Aceites*.

## Références bibliographiques

---

41. Jaubet, J. et Mourre, V. (1997). Growth of yeast contaminants in an immobilized lactic acid bacteria system. *Let. APPL. Microbiol.* 8:207.
42. Jeantet, R., Croguennec, T., Mahaut, M., Schuck, P., et Brule, G. (2008): Les produits laitiers, 2<sup>ème</sup> édition, tec et doc, Lavoisier : 1-3-13-14-17(185 pages).
43. Kihal, M., Chekroun, A., Bensoltane, A., Kheroua, O. et Saidi, D. (1999). Characterization of Algerian Awamel's Milk: Proteins content and native lactic acid bacteria, l'ère journées sur la Recherche Cameline, 25 au 27 mai, ITAS, Ouargla.
44. Kumari A., Makeen K., Garg A.P., Marotta F., Gupta C. Et Divya., (2009). Effet of the Bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCSUB202, on mode of action of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* MTCC3038. *Int. J. Prob. Preb.*
45. Labioui H., Elmoualdi L., El Yachioui M. Et Ouhssine M., (2005). Sélection de souches de Bactéries lactiques antibactériennes. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux.* 144.
46. Lamontagne Michel Claud P., Champagne J., Reitz A., Sylvain M., Nancy G., Maryse, L., Julie J. et Ismail F. (2002). *Microbiologie de lait. Science et technologie de lait.* Ecole polytechnique de Montréal.
47. Lamontagne Michel Claud P., Champagne J., Reitz A., Sylvain M., Nancy G., Maryse.
48. Le Jaouen J C., Remeuf F et lenoir j. (1990). Données récentes sur le lait de chèvre et les fabrications des produits laitiers caprins. XXIII International Dairy Congress, Octobre, 8-12, Montréal, Québec.
49. Leroy F. Et De Vuyst L., (2004). Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the Food fermentation industry. *Tre. FoodSci. Technol.* 15.L., Julie J. et Ismail F. (2002). *Microbiologie de lait. Science et technologie de lait.* Ecole polytechnique de Montréal.
50. Luquet F.M. et Corrieu G., (2005). Bactéries lactiques et probiotiques. Tec & Doc, Lavoisier. Paris.
51. Mahaut M., Jeantet R., Schuck P., Brule G. (2000). Les produits industriels laitiers. Ed, TEC & DOC, Lavoisier, paris, pp. 2-14.
52. Mahé S, 1996. Valeur nutritionnelle du lait en alimentation Humaine. Colloques Inra, 7 novembre, Paris, France.
53. Makhloufi O., (2011). Lantibiotics; structure; biosynthesis and mode of action. *FEMS Microbiol. Rev.*, 25: 285-308.
54. Marshall V.M., Rawson H.L. (1999). Effects of exopolysaccharides-producing strains of Thermophilic lactic acid bacteria on the texture of stirred yoghurt. *International journal of Food science and technology.*

## Références bibliographiques

---

55. Masle, I et Morgan, F. (2001). Aptitude du lait de chèvre à l'acidification par les ferments lactiques : facteurs de variation liés à la composition du lait. *Lait*, 81 :561-569.
56. Mayeux, J. V. Sandine, W. W. F. et Elliker, P. R (1962). a selective medium for detecting *Leuconostoc* organisms in mixed isolate starter cultures. *J. Dairy Sci.*45.
57. Mäyrä-Mäkinen A. Et Bigret M., (2004). Industrial use and production of lactic acid Bacteria. In: *Lactic acid bacteria: microbiology and functional aspects* (Salminen S., Wright A.V. et Ouwehand A.). 3e Ed., Marcel Dekker, Inc. New York.
58. Monnet V., Latrille E., Béal C. Et Corrieu G., (2008). Croissance et propriétés Fonctionnelles des bactéries lactiques. In : *Bactéries lactiques de la génétique aux ferments* (Corrieu G. Et Luquet F.M.). Tec & Doc, Lavoisier. Paris.
59. Morgnan F., Bodin J-P et Garborit P., (1999). Lien entre le niveau de lipolyse du lait de chèvre et la qualité sensorielle des fromages au lait cru ou pasteurisé. *Lait*, 81,743-756.
60. Novel G, (1993). Les bactéries lactiques in "Microbiologie industrielle" les microorganismes d'intérêt industriel. Ed. Leveau G.V., Bouix M. technique et documentation Lavoisier. Paris.
61. Ogunbanwo S.T., Sanni A.I., et Onilude A.A., (2003). Characterization of bacteriocin Produced by *Lactobacillus plantarum* F1 and *Lactobacillus brevis* OG1. *African J. Biotechnol.*
62. Ott R., Vije T., Ten Brink B., Mont B. Et Konings W.N. (1997). Energy metabolism In *Streptococcus cremoris* during lactose starvation. *Archives of Microbiology*.
63. Penaud, (2006). Analyse de la séquence génomique et étude de l'adaptation à l'acidité de *Lb. Delbrueckii* sp. *Bulgaricus* ATCC 11842. Thèse de Doctorat. Institut National Agronomique de Paris-Grignon.
64. Petry S., Furlana S., Waghornec E., Saulnier L., Cerning J., Maguin E. (2003). Comparison of the thickening properties of four *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* Strains and physicochemical characterization of their exopolysaccharides, *FEMS Microbiol Letter*, vol. 221.
65. Remeuf V., Claisse O., Miot-Sertier C., Lonvaud-Funel A. (2001). Lactic acid bacteria évolution during winemaking: Use of *rpoB* gene as a target for PCR-DGGE analysis. *Food Microbiol*, vol 23, p.136-145.
66. Remeuf F., Lenoir J et DUBY C., (1989). Etude des relations entre les caractéristiques Physico-chimiques des laits de chèvre et leur aptitude à la coagulation par la présure. *Lait*, 69.
67. Roudj S., Belkheir K., Zadi-Karam H. Et Karam N.E., (2009). Protéolyse et autolyse chez Deux lactobacilles isolés de lait camelin du Sud-Ouest Algérien. *European. J. Sci. Res.*

## Références bibliographiques

---

68. Saidi, N., Guessas, B., Bensalah F., Badis, A., Hadadji, M., Henni, D. E., Prevost, H. et Kihal, M. (2002). Caractérisation des bactéries lactiques isolées du lait de chèvre des régions arides. *J. Aleg. Reg. Arides*.
69. Schirch V., Hopkins S., Villar E. and Angelaccio S. (1985). Serine Hydro xymethyl transferase from *Escherichia coli*: purification and properties; *J. Bacteriol.* Saidi, N., Guessas, B., Bensalah F., Badis, A., Hadadji, M., Henni, D. E., Prevost, H. et Kihal, M. (2002). Caractérisation des bactéries lactiques isolées du lait de chèvre des régions arides. *J. Aleg. Reg. Arides*.
70. Schleifer, K.-H., Ehrmann, M., Beimfohr, C., Brockmann, E., Ludwig, W., Amann, R., (1995). Application of molecular methods for the classification and identification of lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*.
71. Serhan M., Cailliez-Grimal C., Borges F., Revol-Junelles A.M., Hosri C. Et Fanni J., (2009). Bacterial diversity of Darfiyeh, a Lebanese artisanal raw goat's milk cheese. *Food Microbiol.*
72. Sina L, (1992). Contrôle de qualité du lait et des produits laitiers fabriqués par la SOCA. *Th. Méd. Vét. EISMV, Dakar*.
73. ST-Gelais D D., Ould-baba A M et Turcot S M., (1999). Composition du lait de chèvre et aptitude à la transformation. *Agriculture et Agro-alimentaire, canada*, 1-33.
74. Stiles M E et Holzappel W H., (1997). Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int.J. Food Microbiol.* 36: Acidification improves cryotolerance of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus*. *CFIIJ Biotechnol.*
75. Topisirovic L., Kojic M., Fira D., Golic N., Strahinic I., Lozo J. (2006). Potential of lactic Acid bacteria isolated from specific natural niches in food production and preservation. *Int J Of Food Microbiol*, vol. 112.
76. Veinoglou B., Baltadjieva M., Kalatzopoulos G., Stamenova V et Papadopoulou E., (1982) b. la composition du lait de chèvre de la Plovidiv en Bulgarie et d'Ionnina en Grèce. *Lait*.
77. Vignola C L., Michel J C., Laquin P., Moineau M., Ponlont M et Simpson R., (2002). *Science et technologie du lait: transformation du lait. technique et documentation Lavoisier*.
78. Welman A.D., Maddox I.S., (2003). Exopolysaccharides from lactic acid bacteria Perspectives and challenges. *Trends in Biotechnology*, vol. 21.

# *Annexes*

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

### **I-1 Milieu d'isolement**

#### **I.1.1 Milieu M17 (Idoui *et al.*, 2009)**

Utilise pour la culture des lactocoques:

Extrait de viande.....	5g
Extrait de levure.....	2,5 g
Acide ascorbique.....	0,5g
Peptone de soja.....	5g
B-glycérophosphate.....	9g
Peptone papistique de viande.....	,5g
Sulfate de magnésium.....	0,25g
Lactose.....	5g
Peptone triasique de caséine.....	,5g
Agar.....	18g
Eau distillée.....	1000ml

On ajuste le pH à 7,2

Autoclave 20 min à 120°C.

#### **I.1.2 Milieu MRS (Idoui *et al.*, 2009)**

Utilise pour la culture des lactobacilles:

Peptone.....	10g
Extrait de viande.....	8g
Extrait de levure.....	4g
Glucose.....	20g
Phosphate di potassique.....	2g
Acétate de sodium.....	5g
Citrate d'ammonium.....	2g



Sulfate de magnésium, 7H <sub>2</sub> O.....	0,2g
Sulfate de manganèse, 4H <sub>2</sub> O.....	0,05g
Tween 80.....	1ml
Agar.....	18g
Eau distillée.....	1000ml

On ajuste le pH à 6,5

Stérilisation par autoclavage à 120°C pendant 20 min.

## **I.2 Milieu d'identification**

### **I.2.1 Bouillon hypersalée**

Employée pour différencier les lactocoques et streptocoques thermophiles:

Peptone.....	15g
Extrait de viande .....	5g
Glucose.....	5g
NaCl.....	65g
Eau distillée.....	1000ml

On ajuste le pH à 6,5

Stérilisation par autoclavage à 120°C pendant 20min

### **I.2.2 Milieu de Clark et Lubs (Guiraud, 1998)**

Utilise pour mettre en évidence l'acétyle:

Peptone.....	5g
Phosphate di potassique.....	5g
Glucose.....	5g
Eau distillée.....	1000ml

On dissout toutes les ingrédients dans l'eau distillée on ajuste le pH à 7,0

Réparation en tubes à raison de 7ml

### I.2.3 Milieu MSE

Tryptone.....	10g
Extrait de levure.....	5g
Saccharose.....	100g
Glucose.....	5g
Citrate de sodium.....	1g
Gélatine.....	2,5g
AZohydrate de sodium.....	0,075g
Agar.....	18g
Eau distillée.....	1000ml

On ajusté le pH à 7

Stérilisation par autoclavage à 120°C pendant 20min

### **I.2.4 Lait écrémé**

Lait écrémé.....10g

Extrait de levure.....0, 5g

Eau distillée.....100ml

Stérilisation à 120° C pendant 10min

Glycérol (30%)

### **I.3 Les diluants:**

#### **I.3.1 Eau physiologique:**

Utilise pour la réalisation des dilutions:

Chlorure de sodium .....9g

Eau distillée.....1000 ml

Stérilisation à 120°C pendent 20 min.

## **Annexe II: Détermination de l'acidité titrable (Badis *et al.*, 2004)**

### **II.1 Matériels**

- Burette graduée
- Bécher de 50ml
- Pipettes de 10ml

### **II.2 Produits**

- Lait
- Solution d'Hydrolyse de sodium N/9
- Phénolphthaléine à 1%

### **II.3 Mode opératoire**

- Prendre 10 ml du lait dans un bécher de 50ml en présence 4 gouttes de phénolphthaléine
- Le titrage est effectué par la solution NaOH à N/9 jusqu'à virage de la couleur rose pale.
- Effectuer des répétitions sur le même échantillon préparé.
- La valeur de l'acidité du lait est obtenue par la formule suivante:

$$A=10(V/V') \text{ (g/l)}$$

Où :

**A** : Quantité d'acide lactique

**V** : Volume de la solution de NaOH utilisé

**V'** : Volume de l'échantillon

- La valeur en acidité titrable exprimée en degré dornic (°D), est donnée par l'expression suivante:

$$1^{\circ}\text{D}=0,1\text{ml de NaOH à N/9}$$