

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

Présentée par :

HASSINE Sabrina lylia

Pour l'obtention du diplôme de

MASTER EN SCIENCES ALIMENTAIRES

Spécialité : Production et transformation laitières

THÈME

**Isolement et identification des bactéries
Lactiques autochtones isolées de lait de
Vache de la région de Relizane**

Devant les membres du jury

Président	RECHIDI SIDHOUM Nadra	Maitre de conference A	U. Mostaganem
Examineur	DAHOU Abdelkader El Amine	Maitre de conference A	U. Mostaganem
Encadreur	Mme TAHLAITI Hafida	Maitre de conference A	U. Mostaganem

Travail réalisé au Laboratoire des Sciences et Techniques de Productions Animales

Année Universitaire 2021-2022

Remerciements

Je tiens à témoigner ma profonde gratitude à mon encadreur, **Madame TAHLAITI Hafida**, Maître de conférences A à la faculté de SNV, Département des Sciences Alimentaires l'université Ibn Badis, Mostaganem, pour l'honneur qu'elle me fait en dirigeant ce mémoire, pour ses aides, ses conseils, tout au long de l'élaboration de ce modeste travail.

Je tiens également à présenter mes remerciements aux membres de jury :

A **Madame RECHIDI-SIDHOUM Nadra**, Maître de conférences A à la faculté de SNV, Département des Sciences Alimentaires de l'université Ibn Badis, Mostaganem, je tiens à exprimer toute ma gratitude d'avoir accepté de présider le jury de ce mémoire. Veuillez trouver ici l'expression de ma respectueuse considération.

Mes remerciements s'adressent aussi à **Monsieur DAHOU Mohammed amine**, Maître de conférences A à la faculté de SNV, Département des Sciences Alimentaires de l'université Ibn Badis, Mostaganem, d'avoir accepté d'examiner le contenu de ce présent travail, veuillez trouver ici l'expression de mon profond respect.

Les travaux présentés dans ce mémoire ont été effectués au laboratoire des Sciences et Techniques de Production Animale université de Mostaganem à Hassi-Mammèche, Mostaganem dirigé par **Monsieur HOMRANI Abdelkader**, Professeur à l'Université de Mostaganem, à qui j'exprime ma reconnaissance de m'avoir accueilli et mis à ma disposition tous les moyens nécessaires pour la réalisation de ce mémoire.

J'adresse mes sincères remerciements au Doctorant **Monsieur BEKIHAL AMINE**, pour son aide précieuse et sa disponibilité.

J'adresse mes sincères remerciements à l'ingénieur Monsieur **BENHARRAT Noredine**, pour son aide précieuse et sa disponibilité.

Et enfin, je remercie tous ceux ou celles qui ont contribué de près ou de loin à l'accomplissement de ce mémoire.

Mme Sabrina Lyliá HASSINE

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail

A mes très chers parents

A toute ma famille.

À tous mes Amis.

Résumé

Les bactéries lactiques jouent un rôle primordial dans la fabrication de produits alimentaires fermentés. Elles contribuent à l'amélioration du goût, de l'aspect et de l'innocuité microbiologique de l'aliment.

Le but de cette étude était d'évaluer la diversité des bactéries lactiques autochtones qui appartiennent à la flore utile ou technologique, d'un échantillon de lait de vache cru provenant de la Région de Relizane,

L'isolement de 13 souches lactiques, sur la base d'un certain nombre de caractères phénotypiques, physiologiques et biochimiques (type fermentaire, la croissance en présence de NaCl 4% et 6,5% ; croissance aux pH=4.5 et pH 9.6; test de croissance à différentes températures 10°C,37°C, 45°C; étude de la thermorésistance; test de l'hydrolyse de l'esculine), ses différents testes nous ont permis d'identifier 4 genres dont *Lactobacillus* 69,23%,*Leuconostoc*15,38%,*Enterococcus*15,38% et *Tetragenococcus*7,70%.

La galerie API 50 CHL nous ont permis d'identifier au niveau de l'espèce : *Lactobacillus brevis* (4), *Leuconostoc mesenterides ssp* (2),*Enterococcus faecalis* (2),*Lactobacillus plantarum*(2), *Lactobacillus casei* (1), *Tetragenococcus halophilus* (1) *Lactobacillus acidophilus*(1).

Mots clés : bactéries lactiques, lait cru, vaches, analyse physico-chimique,caractérisation phénotypique.

Abstract

Lactic acid bacteria play a major role in the production of fermented food products. They contribute to improving the taste, appearance and microbiological harmlessness of the food.

The aim of this study was to evaluate the diversity of lactobacilli which belong to the useful or technological flora of a sample of raw cow's milk from the Relizane region.

The isolation of 13 lactic strains, on the basis of a certain number of phenotypic, physiological and biochemical characteristics (fermentation type, growth in the presence of 4% and 6.5% NaCl; growth at pH=4.5 and pH 9.6; growth test at different temperatures 10°C, 37°C, 45°C; study of heat resistance; test of esculin hydrolysis), its different tests have enabled us to identify 4 genera, *Lactobacillus* 69.23 %, *Leuconostoc* 15.38%, *Enterococcus* 15.38%, *Tetragenococcus* 7.70%.

The API 50 CHL gallery allowed us to identify at the species level:

Lactobacillus brevis (4), *Leuconostoc mesenteridesssp* (2), *Enterococcus faecalis* (2), *Lactobacillus plantarum* (2), *Lactobacillus casei* (1), *Tetragenococcus halophilus* (1)
Lactobacillus acidophilus(1).

Keywords: lactic acid bacteria, raw milk, cows, physico-chemical analysis, phenotypic characterization.

ملخص

تلعب بكتيريا حمض اللاكتيك دوراً رئيسياً في إنتاج المنتجات الغذائية المخمرة. حيث أنها تساهم في تحسين الذوق والمظهر والسلامة الميكروبيولوجية للطعام.

كان الهدف من هذه الدراسة هو تقييم تنوع العصيات اللبنية التي تنتمي إلى النباتات المفيدة أو التكنولوجيا لعينة من حليب البقر الخام من منطقة غليزان.

عزل 13 سلالة لبنية، بناءً على عدد معين من الخصائص المظهرية والفسولوجية والكيميائية الحيوية (نوع التخمر، النمو بوجود 4% و 6.5% كلوريد الصوديوم؛ النمو عند الأس الهيدروجيني = 4.5 ودرجة الحموضة 9.6؛ اختبار النمو عند درجات حرارة مختلفة 10 درجات مئوية، 37 درجة مئوية، 45 درجة مئوية؛ دراسة مقاومة الحرارة؛ اختبار التحلل المائي للإسكولين)، مكنتنا اختباره المختلفة من تحديد 4 أجناس، *Lactobacillus* 69.23%، *Leuconostoc* 15.38%، *Enterococcus* 15.38%، *Tetragenococcus* 7.70%.

سمح لنا معرض API 50 CHL بالتعرف على مستوى الأنواع: *Lactobacillus brevis* (4)، *mesenteridessp* (2)، *Lactobacillus casei* (1)، *Lactobacillus plantarum* (2)، *Enterococcus faecalis* (2)، *Leuconostoc* (1) *Tetragenococcus halophilus*

كان الهدف من هذه الدراسة هو تقييم تنوع العصيات اللبنية التي تنتمي إلى النباتات المفيدة أو التكنولوجيا لعينة من حليب البقر الخام من منطقة غليزان.

تم عزل 13 سلالة لبنية على أساس عدد من الخصائص المظهرية والفيزيولوجية والكيميائية الحيوية (نوع التخمر، النمو بوجود

الكلمات المفتاحية: بكتيريا حمض اللاكتيك، اللبن الخام، الأبقار، التحليل الفيزيائي والكيميائي، الخصائص المظهر

Liste des abréviations

° D : Dornic

En : *Enterococcus*

FAO: Food and Agriculture Organization

Lb : *Lactobacillus*

Ln : *Leuconostoc*

MRS : Man, Rogosa et Sharpe (Milieu de culture)

NaCl : Chlorure de Sodium

pH : Potentiel d'hydrogène

Liste des figures

N°	Titre	Page
1	Composition globale du lait en g/l de lait	19
2	Représentation de la micelle de caséine avec sous-unités selon le modèle de (Shmidt 1980)	22
3	Différentes formes microscopiques (Objectif x1000) des isolats lactiques avec coloration de Gram ((i) lactobacilles, (ii) enterocoques, (iii) bifidobactéries). Photos prises au Laboratoire LSTP université de Mostaganem	31
4	Dendrogramme consensus reflétant les relations phylogénétiques de l'ordre des « <i>Lactobacillales</i> » au sein de la classe « <i>Bacilli</i> »	32
5	Voies Homofermontaire, Hétérofermentaire et bifide de la dégradation du glucose	33
6	Schéma représentatif du protocole de l'étude	38
7	Mesure de la teneur en MG par le Lacoscan	39
8	Dilution en cascade de 10^{-1} à 10^{-7}	41
9	Les étapes de la coloration de Gram (de gauche-droite)	42
10	Teste de catalase	44
11	Diagramme de l'isolement des souches lactiques	45
12	Galerie API 50 CHL	49
13	Aspect macroscopique des colonies sur milieu M17 après 24h D'incubation	53
14	Aspect macroscopique des colonies sur milieu MRS	53
15	Observation microscopique au laboratoire des isolats	55
16	Test de croissance des isolats à 37°C	57
17	Type fermentaire des isolats RF 01 homofermentaires	58
18	Type fermentaire des isolat RF 02 hétérofermentaires.	58
19	Test de croissance à pH 9,6	61
20	Croissance en présence de 6,5%NaCl des isolats	63
21	Test de caractérisation phénotypique des bactéries lactiques, hydrolyse de l'esculine.	63
22	Test de fermentation des isolats l'aide des galerie API CH 5	68
23	Secteurs de répartition des genres des bactéries lactiques	71

Liste des tableaux

N°	Titre	Page
I	Composition moyenne du lait de vache	20
II	Composition de la matière grasse du lait de vache	21
III	Résultats des différents Testes physico-chimique de lait de vache cru	50
IV	Résumé de l'observation macroscopique des souches des colonies isolées sur milieux MRS et M17	54
V	Résultat du test de la catalase et de la coloration de Gram sur les 13 isolats	54
VI	Résumé de l'aspect microscopique des 13 isolats et leur mode d'association GX1000.	56
VII	Résultat de croissance des isolats à différentes températures	57
VIII	Résultat du test type fermentaire	59
IX	Résultat du test de thermorésistance	60
X	Résultat du test de croissance à différents pH	61
XI	Résultat du test de croissance à différentes concentrations de NaCl	62
XII	Résultat du test de l'hydrolyse de l'esculine	64
XIII	Résultats des tests physiologiques et biochimiques réalisés pour l'identification des genres isolées	65
XIV	Profil fermentaire des isolats par les galeries API 50 CHL	66
XV	Souches identifiées par la Galerie API CHL	69

Table des matières

Remerciements

Dédicace

Résumé

الملخص

Summary

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

INTRODUCTION.....17

I. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE.....ERREUR ! SIGNET NON DEFINI.

I.1	GENERALITES SUR LE LAIT	18
I.2	COMPOSITION GENERALE DU LAIT	18
I.3	COMPOSITION CHIMIQUE DU LAIT.....	19
I.3.1.1	L'eau	20
I.3.2	LES GLUCIDES.....	20
I.3.3	MATIERE GRASSE	21
I.3.4	PROTEINES.....	21
I.3.4.1	Les caséines.....	22
I.3.4.2	Les protéines du sérum.....	22
I.3.5	VITAMINES	23
I.3.6	LES MINERAUX	23
I.3.7	LES ENZYMES	23
I.4	CARACTERISTIQUES PHYSICO-CHIMIQUES DU LAIT.....	23
I.4.1	PH.....	24
I.4.2	ACIDITE TITRABLE OU ACIDITE DORNIC	24
I.4.3	DENSITE.....	24
I.4.4	POINT DE CONGELATION	24
I.5	LES BACTERIES LACTIQUES	25
I.6	CARACTERISTIQUE GENERALE DES BACTERIES LACTIQUES	25
I.7	HABITAT	26
I.8	TAXONOMIE DES BACTERIES LACTIQUES	26
I.8.1	GENRE <i>AEROCOCCUS</i>	27
I.8.2	GENRE <i>CARNOBACTERIUM</i>	27
I.8.3	GENRE <i>ENTEROCOCCUS</i>	27
I.8.4	GENRE <i>LACTOBACILLUS</i>	28
I.8.5	GENRE <i>LACTOCOCCUS</i>	28
I.8.6	GENRE <i>LEUCONOSTOC</i>	28
I.8.7	GENRE <i>OENOCOCCUS</i>	28
I.8.8	GENRE <i>PEDIOCOCCUS</i>	29
I.8.9	GENRE <i>STREPTOCOCCUS</i>	29
I.8.10	GENRE <i>VAGOCOCCUS</i>	29
I.8.11	GENRE <i>TETRAGENOCOCCUS</i>	30

I.8.12	GENRE WEISSELLA.....	30
I.9	VOIES METABOLIQUES	32
I.9.1	HOMOFERMENTAIRES.....	32
I.9.2	HETEROFERMENTAIRES STRICTES.....	33
I.9.3	LA VOIE FERMENTAIRE BIFIDE	33
I.10	INTERET DES BACTERIES LACTIQUES	34
I.10.1	DANS L'INDUSTRIE ALIMENTAIRE.....	34
I.10.1.1	Rôle important dans la fermentation et la bioconservation de différents aliments	34
I.10.1.2	Rôle dans la Formation de l'arôme et de la saveur	34
I.10.2	DANS LE DOMAINE DE LA SANTE.....	34

II. MATERIEL ET METHODES.....49

II.1	ORIGINE ET ECHANTILLONNAGE DU LAIT DE VACHE	49
II.2	LES MILIEUX DE CULTURE	51
II.2.1	MRS MILIEU SPECIFIQUE AUX <i>LACTOBACILLES</i>	51
II.2.2	M17 MILIEU SPECIFIQUE AUX <i>LACTOCOQUES</i> ET AUX <i>STREPTOCOQUES</i>	51
II.3	ANALYSES PHYSICO-CHIMIQUES DES ECHANTILLONS DE LAIT DE VACHE	51
II.3.1	MESURE DU PH.....	52
II.3.2	DETERMINATION DE L'ACIDITE TITRABLE	52
II.3.3	DESCRIPTION DE L'APPAREIL DE MESURE DES PARAMETRES PHYSICO-CHIMIQUES	52
II.3.4	LE PRINCIPE DE LA MESURE	53
II.4	PREPARATION DE L'ECHANTILLON	53
II.4.1	LA DILUTION DECIMALE EN CASCADE.....	53
II.4.2	ISOLEMENT ET PURIFICATION.....	54
II.4.2.1	Isolement.....	54
II.4.2.2	Purification.....	54
II.5	PRE-IDENTIFICATION DES ISOLATS	55
II.5.1	COLORATION DE GRAM.....	55
II.5.2	RECHERCHE DE CATALASE.....	56
II.6	METHODE DE CONSERVATION DES SOUCHES	56
II.6.1	CONSERVATION DE COURTE DUREE	56
II.6.2	CONSERVATION DE LONGUE DUREE.....	57
II.7	IDENTIFICATION ET CARACTERISATION DES ISOLATS	58
II.7.1	TESTS MORPHOLOGIQUES.....	58
II.7.1.1	Examen macroscopique.....	58
II.7.1.2	Examen microscopique	58
II.8	TESTS PHYSIOLOGIQUES ET BIOCHIMIQUES	58
II.8.1	IDENTIFICATION PHENOTYPIQUE DES ISOLATS.....	58
II.8.1.1	Croissance à différentes températures.....	58
II.8.2	RECHERCHE DE LA PRODUCTION DE GAZ (TYPE FERMENTAIRE).....	59
II.8.3	TEST DE THERMORESISTANCE	59
II.8.4	CROISSANCE DANS DES CONDITIONS HOSTILES	59
II.8.5	CROISSANCE EN PRESENCE DE DIVERSES CONCENTRATIONS DE NaCl (HALOPHILIE).....	59
II.8.6	CROISSANCE A PH 4,5 ET 9,6.....	60
II.8.7	HYDROLYSE DE L'ESCLINE	60
II.9	IDENTIFICATION DES LACTOBACILLES PAR LA GALERIE API 50 CHL.....	60
II.10	INOCULATION DES GALERIES.....	60
III.	RESULTATS ET DISCUSSION.....	50
III.1	CARACTERES PHYSICO-CHIMIQUES	50

III.1.1	LE PH.....	51
III.1.2	L'ACIDITE DORNIC (°D)	51
III.1.3	DENSITE.....	51
III.1.4	TENEUR EN MATIERE GRASSE.....	51
III.2	PRE IDENTIFICATION DES BACTERIES LACTIQUES.....	52
III.2.1	DENOMBREMENT DES COLONIES.....	52
III.2.2	ETUDE MORPHOLOGIQUES.....	52
III.2.2.1	Aspect Macroscopique	53
III.2.2.2	Aspect Microscopique.....	54
III.2.3	TESTE DE CATALASE.....	54
III.3	CRITERES PHYSIOLOGIQUES ET BIOCHIMIQUES	56
III.3.1	CROISSANCE A DIFFERENTES TEMPERATURES	56
III.3.2	LE TYPE FERMENTAIRE.....	58
III.3.3	TEST DE THERMORESISTANCE CROISSANCE A 63,5°C.....	59
III.3.4	LA CROISSANCE A DIFFERENTS PH.....	60
III.3.5	CROISSANCE A DIFFERENTES CONCENTRATIONS DE NA CL	61
III.3.6	HYDROLYSE DE L'ESCULINE	63
III.4	IDENTIFICATION DES ISOLATS PAR LES GALERIES API 50 CHL	69
<u>DISCUSSION</u>		<u>70</u>
<u>CONCLUSION.....</u>		<u>72</u>
<u>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE</u>		<u>73</u>
<u>ANNEXES.....</u>		<u>79</u>

Introduction

Introduction

En Algérie, la filière lait s'inscrit dans un contexte socioéconomique qui se caractérise par l'insuffisance de ses productions face à l'augmentation des besoins induits particulièrement par l'accroissement démographique de la population algérienne (**Benyoucef, 2005**). Et face à la demande du consommateur qui sollicite de plus en plus de produits innovants à la qualité constante, l'industrie doit exploiter toutes les richesses de cette matière première à la fois si simple en apparence et si complexe dans sa composition.

Le lait de vache est une matière première aux ressources considérables ; il occupe une place stratégique dans l'alimentation quotidienne de l'homme, de par sa composition équilibrée en nutriments de base (protéines, glucides et lipides) et sa richesse en vitamines et en minéraux, notamment en calcium alimentaire (**Najari, 2005**), le lait est un aliment dont la durée de vie est 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 lactiques, pathogènes, ou bactéries de pollution ; l'utilisation des bactéries lactique dans la fabrication des produits laitiers assure des caractéristiques particulières d'arôme, de la texture et une bonne sécurité alimentaire. Elles sont largement utilisées dans les produits dérivés du lait, leurs propriétés pro-biotiques sont très utiles à la santé, en effet, elles améliorent les fonctions digestives et ont un effet très positif sur la microflore intestinale (Gorbach, 1996), d'où leur grand intérêt dans l'industrie.

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à l'étude de la diversité des bactéries lactiques isolées à partir du lait de vache cru appartenant à la région de Relizane.

À ce titre, les objectifs de notre étude sont les suivants :

- Isoler, purifier et identifier des bactéries lactiques par les procédures phénotypiques conventionnelles basées sur les tests morphologiques et biochimiques à partir des échantillons de lait de vache cru.

Dans ce cadre, nous organisons cette étude comme suit :

- La première partie est une synthèse bibliographique où nous faisons le point sur le lait en général suivie d'un rappel sur les bactéries lactiques.

- La deuxième partie s'intéresse aux approches méthodologiques et à la description des techniques qui ont servi à la concrétisation de notre travail.

- Dans la dernière partie. Nous faisons état des résultats obtenus et leurs interprétations, en les comparant aux résultats des travaux similaires.

CHAPITRE I

Synthèse bibliographique

I. Synthèse bibliographique

I.1 Généralités sur le lait

Le lait était défini en 1908 au cours du congrès international de la répression des fraudes à Genève comme étant « Le produit intégral de la traite totale et ininterrompues d'une femelle laitière bien portante bien nourrie et non surmenée, Le lait doit être recueilli proprement et ne doit pas contenir de colostrum » (**Pougheon,2001**).

Le lait est le produit des sécrétions mammaires de mammifères. La composition du lait varie selon les espèces animales, mais aussi selon différents facteurs tels que l'individualité, la race, la période de lactation, l'alimentation, la saison, l'âge. (**CIRIHA,2022**)

Aliment complet équilibré, il est la seule source de nutriments pour les jeunes mammifères au tout début de leur vie avant qu'ils ne puissent digérer d'autres types d'aliments. Le lait en début de lactation, de couleur jaunâtre, présente une composition différente et est appelé colostrum. Il porte les anticorps de la mère, réduisant ainsi le risque de nombreuses maladies chez le nouveau-né, et contient tous les nutriments indispensables (**Mazoyer, et al 2002**).

En Algérie et selon le journal officiel, le nom « LAIT » est réservé exclusivement au produit de la sécrétion mammaire normale, obtenue par une ou plusieurs traites sans aucune addition ou soustraction et n'ayant pas été soumis à un traitement thermique (**arrêté de 18/08/1993, décret du 27/10/1993**).

I.2 Composition générale du lait

Le lait de vache est constitué de nombreux composés dont le plus abondant est l'eau (87%), dans laquelle sont dispersés tous les autres éléments (**Mathieu, 1998**).

Le lait contient des globules de matière grasse (environ 35 g/L) et des micelles de caséines (environ 30 g/L) en suspension dans la phase aqueuse formant un système composé de deux phases dispersées (**Dickinson, 1996**), La composition globale du lait est résumée dans la Figure 1 :

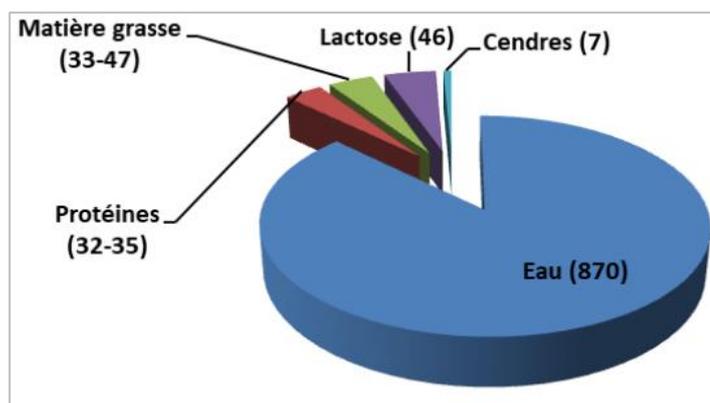


Figure1. Composition globale du lait en g/l de lait (Glebart,2019).

Le lait est donc un milieu hétérogène dans lequel trois phases distinctes coexistent :

- **La phase aqueuse :** Contient l'eau (87% du lait) et les produits solubles pouvant donner naissance au lactosérum (lactose, sels, protéines solubles, composés azotés non protéiques, biocatalyseurs tels que vitamines hydrosolubles ou enzymes) ;
- **La suspension colloïdale micellaire** (2,6%) qui peut donner naissance au caillé obtenu par la coagulation des caséines suite à l'action de micro-organismes ou d'enzymes ;
- **L'émulsion** (4,2%) qui peut donner naissance à la crème, une couche de globules gras rassemblés à la surface du lait par effet de gravité. (Pougheon, 2001).

I.3 Composition chimique du lait

Varie d'une espèce de mammifère à une autre car elle est adaptée aux besoins de chacune d'elle. Cependant, il existe des caractéristiques communes aux différents laits à savoir la richesse en calcium, qualité protéique appréciable, le lactose comme sucre prédominant et une richesse en vitamines notamment du groupe B. Sa composition dépend aussi d'autres facteurs tels que la race des vaches, la saison et le climat. Certains de ces facteurs peuvent être contrôlés donc modifiés pour améliorer la rentabilité laitière d'une vache (Mathieu, 1998).

Les principaux constituants du lait sont donc par ordre décroissant :

- De l'eau, très majoritaire ;
- Des glucides, principalement représentés par le lactose ;
- Des lipides, essentiellement des triglycérides rassemblés en globules gras ;
- Des protéines : caséines rassemblées en micelles, albumines et globulines solubles ;
- Des sels et minéraux à l'état ionique et moléculaire ;
- Des éléments à l'état de traces mais au rôle biologique important : enzymes, vitamines, oligoélément.

Tableau I. Composition moyenne du lait de vache (Alais, 2008).

	Composition (g/l)	Etat physique des composants
Eau	905	Eau libre (solvant) plus eau liée (3,7%)
Glucides (lactose)	49	Solution
Lipides	35	
Matière grasse proprement dite	34	
Lécithine (Phospholipides)	0,5	Emulsion des globules gras
Insaponifiable (stérols, carotènes, trocophérol)	0,5	(3 à 5 µm)
Protides	34	Suspension micellaire
Caséine	27	Phosphocaséinate de calcium (0,08 à 0,12µm)
Protéines solubles (globulines,albumines)	2,5	Solution (Colloïdale)
Substance azotées protéiques	1,5	Solution (Vraie)
Sels	9	
De l'acide citrique (en acide)	2	Solution étatcolloïdale
De l'acide Phosphorique (P₂O₃)	2,6	
Du chlorure de sodium (Nacl)	1,7	
Constituants divers	Traces	
(vitamines,enzymes,gaz dissous)		
Extrait sec total	127	
Extrait sec non gras	92	

I.3.1.1 L'eau

L'eau est le constituant le plus important du lait. Elle a un caractère polaire à cause de présence d'un dipôle et de doublets d'électrons libres. Ce caractère polaire lui permet de former une solution vraie avec les substances polaires comme les glucides, les minéraux et une solution colloïdale avec les protéines hydrophiles du sérum. Parce que les matières grasses possèdent un caractère non-polaire (ou hydrophobe), elles ne pourront se dissoudre et formeront une émulsion du type huile dans l'eau. Il en est de même pour les micelles de caséines qui formeront une suspension colloïdale puisqu'elles sont solides (Amiot et Coll, 2002).

I.3.2 Les glucides

Les glucides sont essentiellement représentés dans le lait par le lactose, cependant le lait contient deux types de glucides :

- Les glucides libres et dialysables (oligoholosides).
- Les glucides combinés en glycoprotéines et non dialysables.

Les glucides représentent le deuxième constituant après l'eau dans le lait avec une teneur de 38% de la matière sèche (**Perreau, 2014**). Le lactose est le glucide prédominant du lait (47 à 52 g/l), il est le constituant le plus stable du lait (**Roca-Fernandez, 2014**), Le lactose constitue la matière carbonée principale pour le développement des bactéries lactiques (**Jeant et al. 2007**).

il intervient dans la fermentation du lait et est éliminé en grande partie dans le lactosérum. Le lait peut contenir d'autres glucides comme le glucose et le galactose, mais à des faibles quantités (**Amiot et al., 2002**).

I.3.3 Matière grasse

La matière grasse laitière est dispersée dans la phase aqueuse du lait sous forme de globules gras de diamètre compris entre 2 et 12µm avec un diamètre moyen de 4 µm (Ribadeau-Dumas & Grappin, 1989). La matière grasse laitière contient essentiellement des triglycérides (esters de glycérol, formés par condensation de trois molécules d'acides gras sur une molécule de glycérol, 96%) et également d'autres glycérides partiels (diglycérides et monoglycérides) et des acides gras libres (AGL), qui sont considérés comme des constituants mineurs.

D'autres composés comme les phospholipides et les stérols sont également présents en faible quantité. La composition en lipides du lait de vache est résumée dans le **Tableau II**.

Tableau II. Composition de la matière grasse du lait de vache (**Mathieu, 1998**).

Matière grasse		g/100g des matières grasses totales
Glycérides	Triglycérides	96
	Diglycérides	2
	Monoglycérides	0,1
Glycérophospholipides et sphingolipides		1
Acides gras libres		0,6
Cholestérol		0,15
Autres composés		0,4

I.3.4 Protéines

La matière protéique du lait est définie par le taux protéique (TP). Le lait bovin contient environ 30 à 35 g/l, le TP conditionne la valeur marchande du lait dans certains pays, plus le TP est élevé plus sera le prix à payer, plus le TP est élevé plus le rendement fromager sera bon. (**Florence, 2010**).

Les protéines dans le lait constituent un ensemble complexe dont la teneur totale avoisine 35g/l, elles sont réparties en deux fractions distinctes :

I.3.4.1 Les caséines

Se présentent en suspension colloïdale et se regroupent sous forme de micelles (les micelles sont constituées de 92% de protéine et de 8% de minéraux) représentent près de 80% de toutes les protéines du lait (Jeantet, 2007).

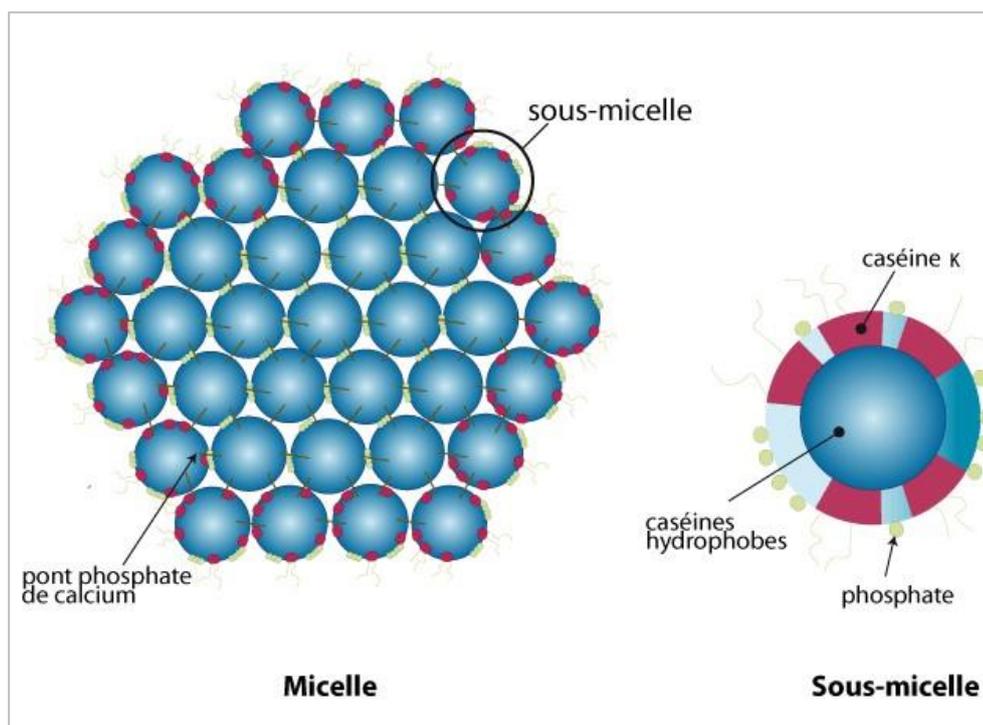


Figure 2. Représentation de la micelle de caséine avec sous-unités selon le modèle de (Schmidt 1980).

I.3.4.2 Les protéines du sérum

Les protéines de sérum, qui représentent environ 20% des protéines totales, se retrouvent sous forme de solution colloïdale. Les deux principales sont la β -lactoglobuline 45 % et l' α lactalbumine 25 % ; les autres protéines du sérum sont les immunoglobulines, le sérum albumine bovine (SBA) et la lactoferrine, la plupart de ces protéines sont globulaires et présentent une grande sensibilité thermique (Mahaut *et al.*, 2011).

I.3.5 Vitamines

Le lait contient des vitamines liposolubles et des vitamines hydrosolubles :

- Les vitamines liposolubles sont : vitamines A, D, E et K ; ces vitamines sont soit associées à la matière grasse soit au centre du globule gras et d'autres à sa périphérie.
- Les vitamines hydrosolubles du groupe B et vitamine C ; ce sont les vitamines de la phase aqueuse du lait (**Perreau, 2014**).

I.3.6 Les minéraux

Le lait contient des sels à l'état dissous (molécules et ions) et à l'état colloïdal. Ils sont essentiellement d'origine minérale. Le calcium et le phosphore sont les deux éléments fondamentaux de la structure de la micelle. Ils sont avec le magnésium, responsables de la stabilisation de la micelle. Les ions potassium, sodium et chlore réalisent avec le lactose, l'équilibre de pression osmotique du lait dans la mamelle vis à vis de la pression sanguine.

I.3.7 Les enzymes

Environ 60 enzymes principales ont été répertoriées dans le lait, pouvant jouer un rôle très important soit par la lyse des constituants originaux du lait soit assurant un rôle antibactérien (protection au lait), soit des indicateurs de qualité hygiénique, de traitement thermique et d'espèce (**Pougheon, 2001**). Les deux principaux facteurs qui influent sur l'activité enzymatique sont le pH et la température (**Amiot et al. 2002**).

Ces enzymes peuvent jouer un rôle très important en fonction de leurs propriétés (**Got, 1997**) :

- lyses des constituants originels du lait ayant des conséquences importantes sur le plan technologique et sur les qualités organoleptiques du lait (lipase, protéase) ;
- rôle antibactérien, elles apportent une protection au lait (lactoperoxydase et lysozyme) ;
- indicateurs de qualité hygiénique, de traitement thermique (phosphatase alcaline, peroxydase, acétyl estérase, sont des enzymes thermosensibles) et d'espèces (test de la xanthine-oxydase pour détecter le lait de vache dans le lait de chèvre).

I.4 Caractéristiques physico-chimiques du lait

Les propriétés physico-chimiques du lait sont plus ou moins stables ; elles dépendent soit de l'ensemble des constituants, soit des substances en solution ou encore des concentrations en ions. Les principales propriétés physico-chimiques utilisées dans l'industrie laitière sont la densité, le PH, l'acidité, le point de congélation et le point d'ébullition (**Vignola, 2002**).

I.4.1 pH

L'acidité actuelle s'apprécie par le pH et renseigne sur l'état de fraîcheur du lait. A la traite, le pH du lait est compris entre 6,6 et 6,8 et reste longtemps à ce niveau. Toute valeur située en dehors de ces limites indique un cas anormal (**Amariglio, 1986**). D'où l'intérêt de cette connaissance pour le diagnostic des mammites.

I.4.2 Acidité titrable ou acidité Dornic

L'acidité de titration globale mesure à la fois le pH initial du lait et l'acidité développée après la traite par la fermentation lactique qui diminue le pH jusqu'à 4 ou 5. L'acidité de titration indique donc le taux d'acide lactique formé à partir du lactose. Le degré Dornic est le nombre de dixième de millilitre de soude utilisé pour titrer dix millilitres de lait en présence de phénolphtaléine (**Amariglio, 1986**).

1°D = 1 ml d'acide lactique dans 10 ml de lait soit 0,1 gramme d'acide lactique par litre.

I.4.3 Densité

La densité du lait varie entre 1,028 et 1,034. Elle doit être supérieure ou égale à 1,028 à 20°C. La densité des laits de grand mélange des laiteries est de 1,032 à 20°C. Celle des laits écrémés est supérieure à 1,035. Un lait à la fois écrémé et mouillé peut avoir une densité normale (**Labioui et al., 2008**).

La densité, est le paramètre le plus recherché en industrie car il permet la détection de fraudes. (**Gaddour et al., 2014**).

I.4.4 Point de congélation

Le point de congélation du lait est l'une de ses caractéristiques physiques les plus constantes. Cette propriété physique est mesurée pour déterminer s'il y a une addition d'eau au lait. La mesure de point de congélation lors de la traite, au-delà de -0,520°C le lait est considéré comme mouillé (**Parguel et carrot, 1994**).

Un mouillage de 1% entraîne une augmentation du point de congélation d'environ 0,0055°C (**Goursaud, 1985**).

I.5 Les bactéries lactiques

C'est une flore à intérêt technologique, les bactéries lactiques sont des cocci ou des bâtonnets Gram+, catalase-. Elles synthétisent leur ATP grâce à la fermentation lactique des glucides. **(Beldjilali,2021)**.

Les bactéries lactiques sont un groupe hétérogène de microorganismes produisant de l'acide lactique comme produit principal du métabolisme.

Elles ont pour habitat de nombreux milieux naturels et accompagnent l'activité humaine en tant que bactéries de la flore commensale des muqueuses comme la flore intestinale ou vaginale humaine et animale. Et de la flore alimentaire comme les produits laitiers, la viande, les végétaux et les céréales.

Elles sont impliquées dans un grand nombre de fermentations spontanées de produits alimentaires, ce qui a conduit à la reconnaissance de leur statut GRAS (Generally Recognized As Safe) (**Dortu et al 2009**).

Elles occupent une place importante parmi les auxiliaires de fermentation et de conservation alimentaire, que ce soit en tant que microflore naturelle ou comme culture ajoutée sous des conditions contrôlées (**O'Sullivan et al., 2002 ; Streit et al., 2007**).

Les aliments fermentés avec des bactéries lactiques présentent une part importante de l'alimentation humaine. Ces bactéries jouent un rôle essentiel dans la conservation des aliments ce qui a entraîné un intérêt scientifique de leur étude au cours des dernières décennies alors que le concept de bactéries lactiques a été mis au point au début des années 1900. La première culture pure de *Bacterium lactis*, maintenant connue sous le nom *Lactococcus lactis*, a été obtenue en 1873 par Lister (**Ketrouci,2021**).

I.6 Caractéristique générale des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques sont des microorganismes relativement hétérogènes d'un point de vue morphologique et physiologique. Leurs principales caractéristiques sont :

Des bactéries à Gram positif, aéro-anaérobies, ne produisant pas en général de spores, généralement immobiles, se présentant sous formes de coques ou de bâtonnets et capables de fermenter les sucres en acide lactique (**Arthur,2011**).

Elles sont mésophiles mais elles sont capables de croître dans un intervalle de température allant de 5°C à 45°C. Le pH optimal de croissance varie de 5 à 9 mais aussi elles sont acido-tolérantes (pH 3,2) (**Ketrouci, 2021**).

De forme cocci, coccobacilles ou bacilles, ayant une composition de bases de moins de 50 % en G+C dans leur ADN.

Les bactéries lactiques comportent plusieurs genres comme : *Aerococcus*, *Alloiooccus*, *Atopobium*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*,

Pediococcus, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* et *Weissella*, les genres *Bifidobacterium* et *Gardnerella* sont aussi inclus dans ce groupe (**Corrieu et Luquet, 2008**).

I.7 Habitat

Les bactéries lactiques sont des bactéries ubiquistes. Elles ont pour habitat de nombreux milieux naturels. Elles se trouvent généralement associées à des aliments riches en sucres simples. Elles peuvent être isolées du lait, des fromages, de la viande et des végétaux (plantes et fruits) (**König et Fröhlich, 2009**).

I.8 Taxonomie des Bactéries lactiques

De nombreux changements ont eu lieu dans la classification ou la taxonomie des bactéries au cours des deux dernières décennies. De nombreux nouveaux taxons ont été créés à la suite de l'utilisation de méthodes de génétique moléculaire, seul ou en combinaison avec certaines des méthodes plus traditionnelles.

La première classification des bactéries lactiques a été établie en 1919 par Orla-Jensen sur divers critères morphologiques et physiologiques (activités catalase et nitrite réductase, type de fermentation) (**Orla-Jensen, 1919**).

Les méthodes phénotypiques permettant la classification des bactéries se sont ensuite étendues à la composition de la paroi, le type d'acides gras cellulaires, le type de quinones (accepteur d'électrons). Cependant ces méthodes phénotypiques ne rendent pas compte des relations phylogénétiques entre les groupes.

Dès 1974, selon le Bergey's manual, les bactéries lactiques se retrouvent dissociées en deux familles : celle des *Streptococcacea* et celle des *Lactobacillacea*. En 1985, Schleifer et *al.*, ont proposé la division des streptocoques en 4 genres génétiquement distincts : *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Vagococcus* et *Lactococcus*, ces deux derniers regroupant les streptocoques lactiques (**Makhlouf, 2018**).

En 1977, Woese et Fox introduisent la phylogénie moléculaire basée sur la séquence des ARN ribosomiques. Cette méthode va révolutionner la taxonomie des bactéries, et la classification des BL va être profondément modifiée. D'autres méthodes génotypiques (basées sur les acides nucléiques) sont aussi utilisées en classification, comme le pourcentage en GC ou l'hybridation ADN/ADN (**Mechai, 2009**).

L'identification des espèces de bactéries lactiques peut être réalisée par l'analyse de leur profil fermentaire des carbohydrates à l'aide du système API 50CH (Curk et al., 1993).

L'analyse comparative des séquences d'ARN ribosomal 16S a entraîné des changements importants dans la taxonomie des bactéries lactiques (Salminen et al., 2004).

Selon la dernière édition de Bergey's manual of systematic bacteriology (Vos et al., 2009), les bactéries lactiques sont classées dans le Phylum des Firmicutes, la Classe des Bacilli et l'ordre des *Lactobacillales* renfermant trente-cinq genres répartis sur six familles (figure 5). Parmi ces genres, seulement douze sont utilisés dans la biotechnologie alimentaire,

il s'agit de :

I.8.1 Genre *Aerococcus*

Les cellules de ce genre sont de forme ovoïde (1-2µm de diamètre), ohémolytiques, non-gazogènes, arginine (-), pouvant croître à une concentration de 6.5% de NaCl, la division se déroule sur deux plans formant ainsi des tétrades. Cependant, des cellules isolées ou en paires peuvent être observées au milieu de la phase exponentielle.

I.8.2 Genre *Carnobacterium*

Ce genre est constitué de bâtonnets courts parfois incurvés isolés ou en paires, psychrotolérants, pouvant se développer à pH : 9 et incapables de croître à 8% de NaCl ; quelques espèces sont catalase (+) en présence d'hème.

I.8.3 Genre *Enterococcus*

Ce genre comprend des cellules ovoïdes isolées, en paires ou en courtes chaînes, homofermentaires. Ce genre se caractérise par sa tolérance à 6.5% de NaCl, au pH : 9.6 et par la croissance à 10°C et 45°C avec une température optimale de croissance de 35°C à 37°C.

Il regroupe les streptocoques fécaux, commensaux de l'intestin. Les espèces rencontrées dans l'alimentation sont essentiellement *En. faecalis* et les espèces proches. Les entérocoques sont des coques qui peuvent être mobile, homofermentaires, généralement différenciés par la fermentation de l'arabinose et le sorbitol, ils croissent entre 10°C et 45°C. (Rakhis et al, 2016).

I.8.4 Genre *Lactobacillus*

Le genre *Lactobacillus* est très hétérogène (le G+C varie de 33 % à 55%). Il contient 140 espèces et 27 sous-espèces, mais sa classification évolue régulièrement. Les lactobacilles sont des bacilles Gram positif, non mobile, non sporulant, se développant dans des conditions microaérophiles à strictement anaérobies. *Lactobacillus delbrueckii subsp.*, *Lactobacillus Bulgaricus* (Rochat et al., 2006).

Les cellules de ce genre sont soit des bacilles longs parfois incurvés ou des coccobacilles courts isolés, comme elles peuvent former des chaînes.

Les souches sont acidophiles et peuvent croître à un pH égal à 5 ou moins avec un optimum de 5.5 à 6.2. La température optimale de croissance est de 30°C à 40°C, mais peuvent croître à un intervalle de température allant de 2°C à 53°C. Les thermophiles sont incapables de se développer à moins de 15°C. (Ababsa, 2012).

Le genre *Lactobacillus* peut être divisé en trois groupes : homofermentaires stricts, hétérofermentaires facultatifs et hétérofermentaires stricts.

I.8.5 Genre *Lactococcus*

Les cellules de ce genre sont sphériques ou ovoïdes isolés, en paires, ou en chaînes. De type mésophiles, leur température optimale varie de 10 à 40°C mais sont incapables de se développer à 45°C. Celles-ci se développent généralement à 4% de NaCl et à un pH proche de la neutralité, leur croissance s'arrêtant lorsque le pH du milieu atteint 4,5. Ce genre est un habitant typique des plantes, des animaux et de leurs produits. (Ababsa, 2012).

I.8.6 Genre *Leuconostoc*

Le genre *Leuconostoc* se présente sous forme de cellules sphériques immobiles, souvent lenticulaires après culture sur gélose, regroupée par deux ou en chaînes. Ce sont des coques à Gram positif, mésophile hétérofermentaires stricts, aérobies anaérobies facultatifs. Les principaux produits de leur métabolisme des hexoses sont le D-lactate, l'acétate ou l'éthanol, le CO₂, du diacétyl et de l'acétoïne (Devoyod et Poullain, 1988).

Le genre *Leuconostoc* comprend 12 espèces microbiennes dont : (*L. citreum*, *L. carnosum*, *L. fallax*).(Tormo, 2010).

I.8.7 Genre *Oenococcus*

Les bactéries du genre *Oenococcus* adoptent une forme ellipsoïdale à cocci, mesurant 0,2- 0,4 × 0,5- 0,8 µm, généralement en paires ou en chaînettes, et leur morphologie peut être influencée par les conditions de croissance et l'âge de la culture. Les bactéries *Oenococcus* spp., sont des bactéries

acidophiles à croissance lente, elles produisent très peu de biomasse, ce qui nécessite des milieux de culture riches et complexes en acides aminés et en vitamines. Elles sont mésophiles et leur température de croissance est entre 20 à 30 °C, elles sont aussi anaérobies facultatives (**Meghoufel,2019**).

I.8.8 Genre *Pediococcus*

Ce genre est représenté par neuf espèces ayant un métabolisme homofermentaire. Il rassemble des cellules immobiles de forme sphérique parfois ovoïdes, isolées ou en paires qui se divisent dans deux directions perpendiculaires formant ainsi les tétrades mais jamais les chaînes.

Certaines espèces produisent une catalase ou une pseudo catalase. Les cellules sont acidophiles mais non halophiles et croissent à pH 5 mais pas à pH 9, la température optimale de croissance varie de 25°C à 35°C. (**Megoufel,2019**)

I.8.9 Genre *Streptococcus*

Le genre *Streptococcus* est diversifié et la classification est très mouvementée. Ce genre est généralement divisé en trois groupes : pyogène (les espèces pathogènes et hémolytiques), oral (tel que *Streptococcus Salivarius*, *Streptococcus Bovis*) et les autres streptocoques (Les cellules de ce genre sont immobiles, sphériques ou ovoïdes qui ont un diamètre inférieur à 2µm avec une disposition en paires ou en chaînes longues. La fermentation des carbohydrates produit principalement de l'acide lactique mais il n'y a pas de production de gaz. Le peptidoglycane est du groupe A et leur température optimale de croissance est 37°C. Elles sont incapables de se développer à 15°C et à pH : 9.6. Beaucoup d'espèces sont commensales ou parasites de l'homme et des animaux et certaines sont hautement pathogènes (**Scheilfer, 1987**).

I.8.10 Genre *Vagococcus*

Ce genre appartient aux bactéries gram-positives .Ce sont des coques mobiles ou non mobiles qui ne forment pas de spores, isolées, en paires ou en chaînes. La plupart des espèces sont mobiles possédant des flagelles péritriches. Elles sont capables de croître à 10°C mais non à 45°C sans production de gaz ni d'arginine dihydrolase (ADH) (**Wang et al.2011**).

I.8.11 Genre *Tetragenococcus*

Ce genre rassemble des cellules immobiles, sphériques ou ovoïdes avec un diamètre de 0.5-1.0 µm formant des tétrades après leur division dans deux directions perpendiculaires ; comme elles peuvent être isolées ou en paires. Le métabolisme des *Tetragenococci* est homofermentaire. Ils ne produisent pas de CO₂ à partir de glucose comme ils sont incapables de réduire les nitrates ni d'hydrolyser l'arginine. Leur température optimale de croissance se situe entre 25°C et 35°C et ne peuvent pas croître à 10°C et à 45°C. (Ketrouci,2021).

Les espèces de *Tetragenococcus* ont un rôle crucial dans la fabrication des produits alimentaires à concentration élevée en sel comme les sauces de soja. (Tahlaiti,2019).

I.8.12 Genre *Weissella*

Les cellules de ce genre sont ovoïdes ou de courts bâtonnets à extrémités rondes qui s'associent en paires ou en courtes chaînes.

Elles sont immobiles et hétérofermentaires. La température optimale de croissance est de 15°C, mais quelques espèces peuvent croître entre 42°C et 45°C Parmi tous ces genres cités, seulement cinq (*Aerococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* et *Pediococcus*) répondent aux caractéristiques générales d'une bactérie lactique typique (Salminen et al. 2004).

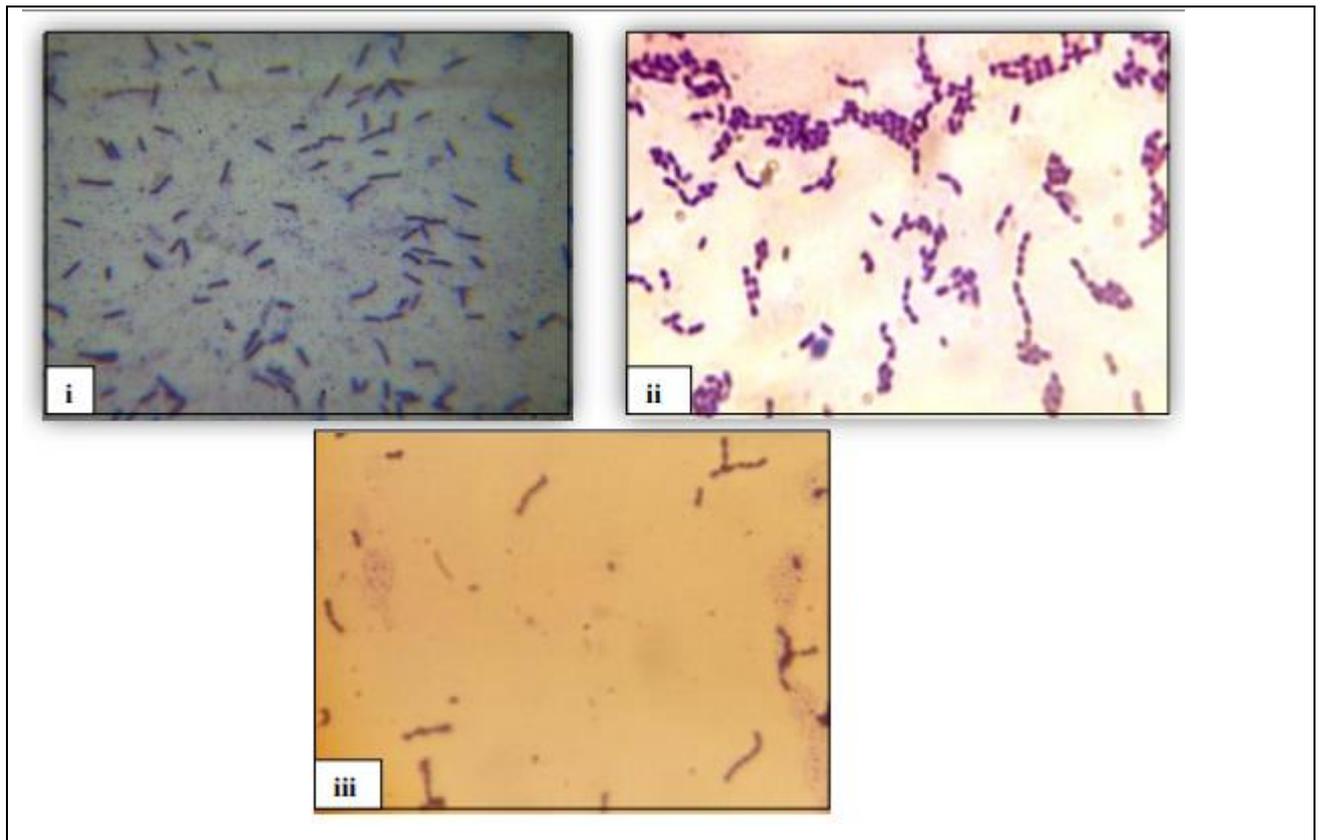


Figure 3. Différentes formes microscopiques (Objectif x1000) des isolats lactiques avec coloration de Gram ((i) lactobacilles, (ii) enterocoques, (iii) bifidobactéries). Photos prises au Laboratoire LSTP université de Mostaganem (**Zergoug, 2017**).

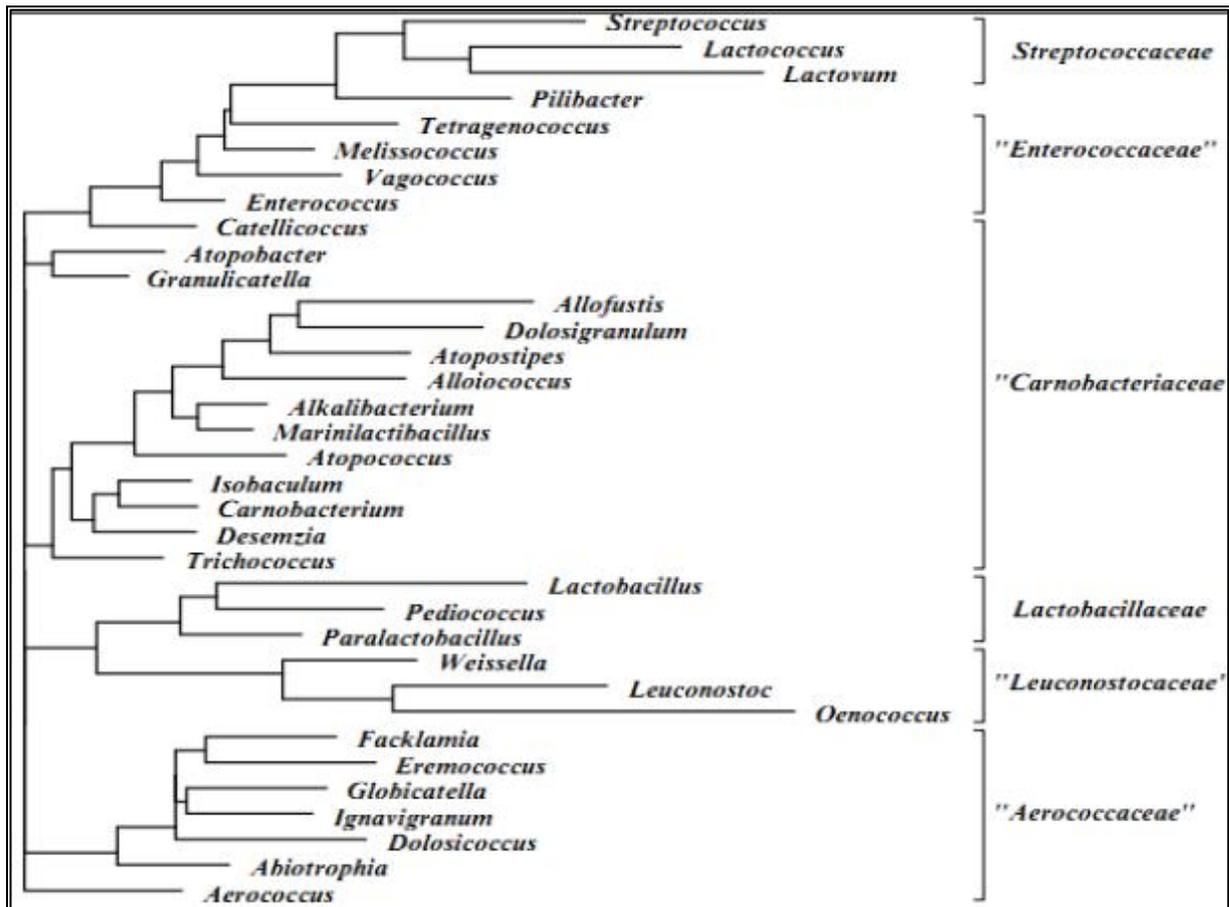


Figure 4. Dendrogramme consensus reflétant les relations phylogénétiques de l'ordre des «*Lactobacillales*» au sein de la classe «*Bacilli*» (De Vos et al., 2009).

I.9 Voies métaboliques

Les bactéries lactiques étant incapables d'obtenir leur énergie par la respiration elles recourent à la fermentation des glucides en acide lactique donc (production d'énergie anaérobie).

Les sucres du milieu extérieur afin qu'ils puissent être métabolisés, doivent d'abord franchir la membrane cellulaire. Il existe deux systèmes de transport actif des sucres.

En se basant sur la voie empruntée et le produit final de la fermentation, les bactéries lactiques sont divisées en deux groupes (Dridier et Provost, 2009) (Figure 5) :

I.9.1 Homofermentaires

Les bactéries lactiques homofermentaires comprennent les espèces de *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, ainsi que certains lactobacilles. Cette voie de la glycolyse ou voie d'Embden Meyerhof Parnas (EMP), conduit dans des conditions optimales de croissance à la production de deux molécules de lactate et deux molécules d'ATP par molécule de glucose consommée. Le fructose-1,6-bisphosphate aldolase est une enzyme clé indispensable au fonctionnement de la voie EMP (Thompson et Gentry-Week, 1994).

I.9.2 Hétérofermentaires strictes

C'est la voie des pentoses-phosphates (Atlan et al., 2000) ; lorsqu'il y a production en plus de l'acide lactique, de l'acétate, de l'éthanol et du CO₂ (Thompson et Gentry-Week, 1994). La dégradation d'une molécule de glucose conduit à la formation d'une molécule de lactate, une molécule d'éthanol (CH₃CH₂OH), d'un CO₂ et d'un ATP.

I.9.3 La voie fermentaire bifide

On l'appelle aussi la voie de fructose-6-P phosphocétolaseFP. C'est la voie empruntée par les bactéries du genre *Bifidobacterium*. Pour une molécule d'hexose consommée, cette voie produit 1,5 molécule d'acétate et 2,5 molécules d'ATP.(Drider et Provost, 2009)

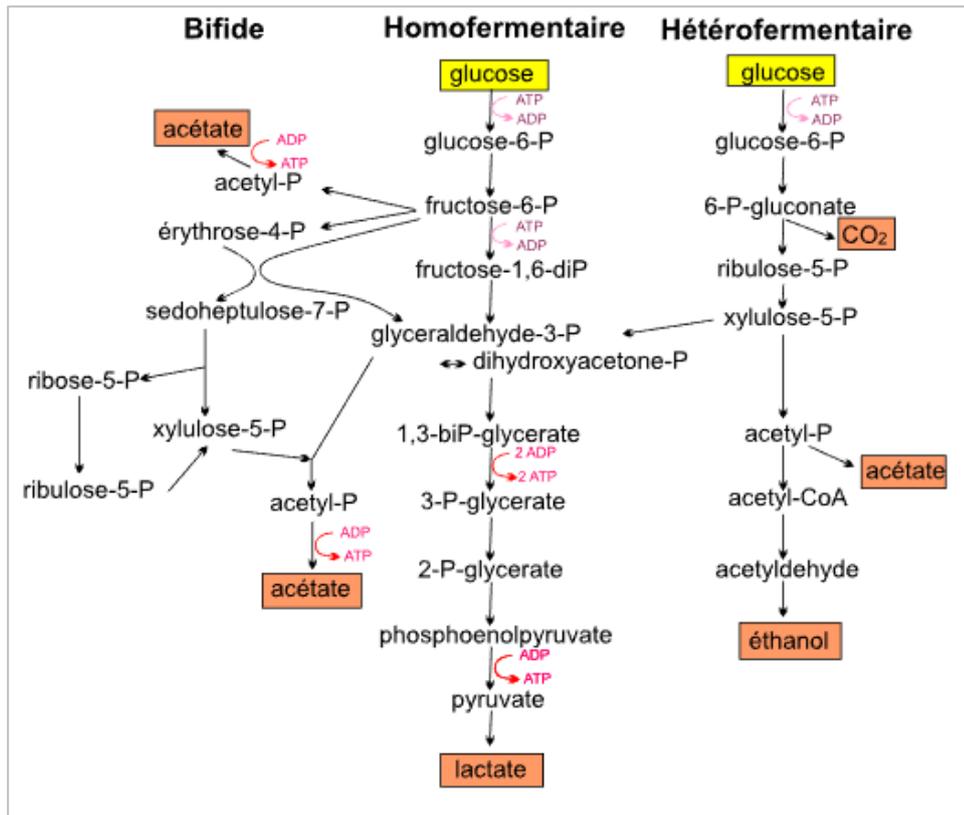


Figure 5. Voies Homofermentaire, Hétérofermentaire et bifide de la dégradation du glucose (Drider et Provost,2009)

I.10 Intérêt des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques sont depuis des millénaires un moyen de bio conservation efficace de nombreux produits alimentaires et ce grâce à leur métabolisme. Cependant leur rôle s'est étendu dans plusieurs secteurs, tel que le domaine alimentaire et thérapeutique (Zergoug,2017).

I.10.1 Dans l'industrie alimentaire

I.10.1.1 Rôle important dans la fermentation et la bioconservation de différents aliments

Les souches de *Lactobacillusbulgaricus*, *Sterptococcus thermophilus* sont utilisées pour la production du yaourt, des fromages et des laits fermentés (Yateem et al., 2008).

I.10.1.2 Rôle dans la Formation de l'arôme et de la saveur

L'acétoïne et ses dérivés ainsi que certains composés aromatiques (1-propanol, acétate d'isoamyle, acétate d'éthyle, 3-methyl-1-butanol, acétoïne), les principaux composés volatils identifiés, respectivement, dans la pâte de maïs fermentée, proviendraient de l'action des bactéries lactiques et donneraient au produit ses caractéristiques organoleptiques (Halm et al., 1993).

➤ Préservation et innocuité de l'aliment

La fermentation est une méthode de conservation des aliments. Les bactéries lactiques produisent plusieurs composés antimicrobiens naturels, savoir : des acides organiques (lactique, acétique, formique, phényllactique, caproïque), le dioxyde de carbone, le peroxyde d'hydrogène, le diacétyle, l'éthanol et des bactériocines (Messens et De Vuyst, 2002).

I.10.2 Dans le domaine de la santé

En 2001, un comité d'experts de l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'Agriculture (Food and Agricultural Organization, FAO) et de l'Organisation mondiale de la Santé (OMS) définissait les probiotiques comme des micro-organismes vivants, qui, lorsqu'ils sont consommés en quantité suffisante dans l'alimentation, ont un effet bénéfique sur la santé de l'hôte (F.A.O et W. H.O., 2001).

➤ Propriétés probiotiques

Les probiotiques apportent un réel bénéfice pour le consommateur. Les souches de bactéries lactiques probiotiques proviennent des aliments et appartiennent principalement aux genres *Lactobacillus* et *Bifidobacterium*. Les effets bénéfiques de ces souches probiotiques sur la santé du consommateur, l'amélioration de la digestion du lactose, permettent l'équilibre de la microflore intestinale (Biard, 2016). La prévention de la diarrhée, la diminution du risque d'allergie alimentaire, la stimulation et la modulation du système immunitaire, l'amélioration de la maladie inflammatoire intestinale, leurs mécanismes reposent sur certaines activités microbiennes spécifiques (production de certaines enzymes ou facteurs de croissance), des interactions microbiennes (production de peroxyde d'hydrogène, acides organiques et peptides antibactériens), des interactions avec l'épithélium intestinal (concurrence pour les récepteurs situés sur l'épithélium intestinal) et des interactions avec le système immunitaire. Si certains de ces effets sur la santé sont déjà largement établis, d'autres ne le sont pas du tout encore (De Vuyst et al., 2004).

Chapitre II

Matériel et Méthodes

II. Matériel et Méthodes

L'intégralité du travail a été réalisée au Laboratoire des Sciences et Technique de Production Animale (LSTPA) de l'université Abdelhamid Ibn Badis de Mostaganem.

II.1 Origine et échantillonnage du lait de vache

L'échantillon de lait de vache cru utilisé pour cette étude provient de la commune de Sidi Saada, wilaya de Relizane. Cet échantillon nous a été fourni par le laboratoire LSTPA.

Le lait cru doit être traité avec un grand soin afin d'éviter tout risque de contamination qui peut influencer sur la flore lactique et ceci par la réalisation du prélèvement en utilisant des gants. Après lavage à l'eau savonneuse, rinçage à l'eau javellisée du pis et séchage, les 2 premiers jets sont éliminés et le lait est recueilli dans des flacons en verre stériles de 250ml. Il est ensuite conservé dans une glacière et acheminé directement au laboratoire pour analyse (**Zergoug, 2017**).

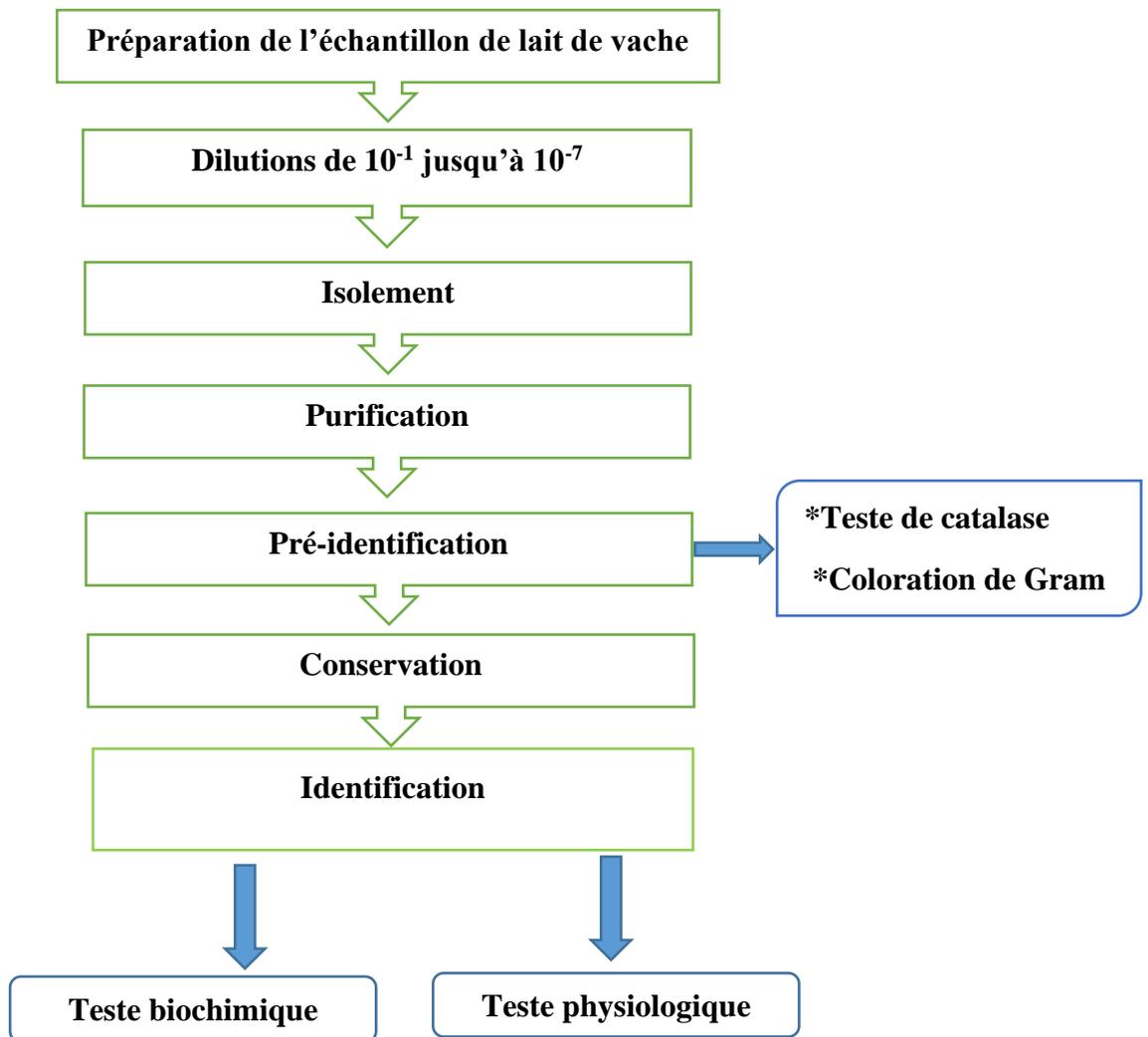


Figure 6. Schéma représentatif du protocole de l'étude.

II.2 Les milieux de culture

Les milieux de cultures utilisés sont sous forme liquide ou solide après l'ajout de 15g/l d'agar agar. Les milieux sont les suivants :

II.2.1 MRS milieu spécifique aux *lactobacilles*

MRS : La gélose MRS de (De Man, Rogosa et Sharpe., 1960) est utilisée pour la culture et le dénombrement des *Lactobacillus* dans les produits laitiers et les autres produits alimentaires ainsi que dans les produits destinés à l'alimentation animale. Ce milieu permet de cultiver des germes à croissance ralentie tels que *Lactobacillus brevis* et *Lactobacillus fermentum*. Acidifié à pH 5,4, il permet également de dénombrer *Lactobacillus bulgaricus* dans les yaourts. D'après la norme NF ISO 15214 pour le dénombrement des bactéries lactiques mésophiles, la gélose MRS doit être utilisée à pH 5,7.

II.2.2 M17 milieu spécifique aux *lactocoques* et aux *streptocoques*

M17 (Terzaghi et Sandine, 1975), La gélose M 17 est utilisée pour le dénombrement des lactocoques (particulièrement *Lactococcus lactis*) et de *Streptococcus thermophilus* dans les produits laitiers et notamment dans les yaourts naturels ou aromatisés (brassés ou non), ainsi que dans les yaourts contenant des morceaux de fruits. Ce milieu permet également l'étude de la sensibilité de ces microorganismes aux bactériophages. La formule-type répond à la composition définie dans les normes FIL-IDF 149A et ISO 7889.

Tous les milieux de culture utilisés dans cette étude sont stérilisés à 120°C pendant 20mn. La composition des différents milieux de cultures est présentée en (Annexe I et Annexe II).

II.3 Analyses physico-chimiques des échantillons de lait de vache

Des analyses ont été effectuées, sur les différents échantillons de laits de vache collectés, afin de déterminer les principales propriétés physiques et chimiques ainsi que la valeur nutritionnelle.

L'ensemble des paramètres analysés sont :

II.3.1 Mesure du pH

La valeur du pH a une importance exceptionnelle par l'abondance des indications qu'elle donne sur la richesse du lait de certains constituants sur l'état de fraîcheur ou sur sa stabilité. (Mathieu, 1998). Le pH des échantillons de lait a été mesuré, à l'aide d'un pH-mètre (type PHSJ-3F), par trempage dans un volume (30ml) de lait prélevé dans un bécher.

II.3.2 Détermination de l'acidité titrable

Des méthodes de titrage plutôt que des mesures de pH sont utilisées pour vérifier l'équilibre acido-basique, qui est généralement appelé acidité titrable du lait.

Pour quantifier le degré d'acidité d'un lait, on utilise un titrage acido-basique par la soude Dornic. La procédure comprend les étapes suivantes :

Un volume de 10 ml de lait est placé dans un bécher de 100 ml en présence de 0,1 ml de phénolphthaléine à 1% dans l'alcool à 95%, la soude Dornic (N/9) est rajoutée jusqu'au virage au rose. La coloration rose doit persister au moins 10 secondes (Guiraud, 1998).

L'acidité du lait est exprimée en degré Dornic. Un degré Dornic équivaut à une teneur de 0,1 g d'acide lactique par litre de lait.

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

V_{NaOH} est le volume de soude écoulé pour titrer 10ml de lait, et $1^{\circ}\text{D} = 0.1\text{g/l}$ de lactate.

II.3.3 Description de l'appareil de mesure des paramètres physico-chimiques

Les analyses physico-chimiques ont été effectuées avec un Lactoscan Voir Annexe III, il permet de déterminer les paramètres de qualité les plus importants dans différents types de lait et de dérivés du lait. Il est utilisé pour la détermination des paramètres suivants :

- A. L'extrait sec total EST.
- B. La densité.
- C. La teneur en matières grasses.MG
- D. Le point de congélation.
- E. La teneur en lactose.
- F. La teneur en protéines. TP

II.3.4 Le Principe de la mesure

Nous faisons introduire la sonde de Lactoscan, dans le lait après l'avoir étalonné, la valeur de (lactose, protéine, minéraux, MG, EST, densité) est lue directement sur l'afficheur de Lactoscan. Figure (8)



Figure 7. Mesure de la teneur en MG par le Lactoscan.

II.4 Préparation de l'échantillon

II.4.1 La dilution décimale en cascade

Après homogénéisation de l'échantillon du lait (agitation pendant 10 secondes).

On prélève aseptiquement 1ml de lait à l'aide d'une pipette graduée et l'introduire dans le tube contenant 9 ml d'eau physiologique peptonée, puis on transfère 1ml de cette première dilution dans le deuxième tube, ainsi de suite jusqu'au septième tube qui correspond à une dilution de 10^{-7} . (Leveau *et al.*, 1991).

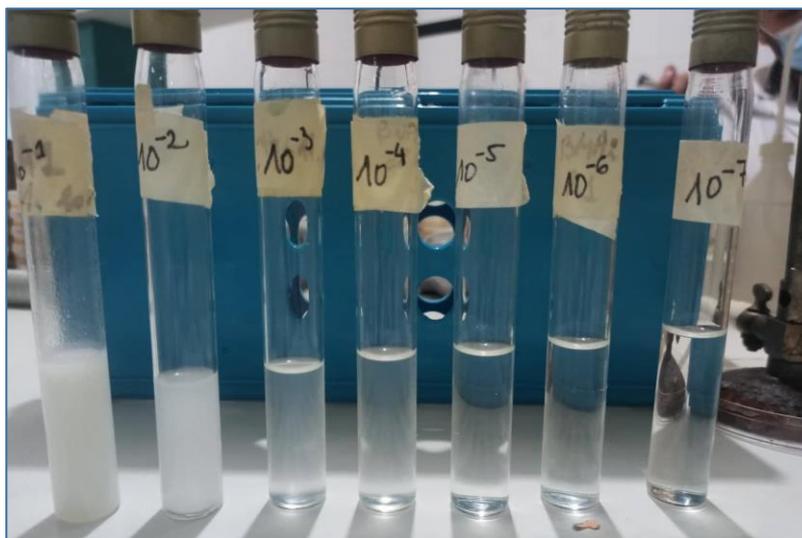


Figure 8. Dilution en cascade de 10^{-1} à 10^{-7} .

II.4.2 Isolement et purification

II.4.2.1 Isolement

Après homogénéisation, on étale 1 ml de chaque dilution sur les milieux de culture (MRS et M17). Les boîtes sont ensuite incubées à 30°C , 37°C , pendant 24 h à 48 h et même jusqu'à 72h.

Après plusieurs essais, seules les dilutions 10^{-3} , 10^{-4} et 10^{-5} sont retenues pour ensemençer les milieux de cultures solides M17 et MRS coulés en boîtes de Pétri. Ces dilutions permettent de repérer des colonies suffisamment séparées. Les temps et les températures d'incubation sont adaptés à chaque genre :

- Incubation à 30°C pendant 48h pour l'isolement des espèces du genre *Streptococcus* - Incubation à 37°C pendant 72h pour l'isolement des espèces du genre *Lactobacillus* (Leveau et al., 1991).

Les boîtes contenant 30 à 300 colonies ont été retenues.

II.4.2.2 Purification

Elle consiste à effectuer des repiquages successifs sur milieu MRS liquide et MRS solide utilisés alternativement jusqu'à l'obtention des colonies bien distinctes et homogènes (Ketrouci, 2021), la purification des souches sur milieu gélosé se fait par la méthode des stries, Suivi d'une observation microscopique. (Guiraud, 1998).

II.5 Pré-identification des isolats

II.5.1 Coloration de Gram

Elle permet de distinguer deux types de bactéries, les bactéries Gram négatifs (G-) et les bactéries Gram positives (G+).

Coloration du frottis fixé à la chaleur au préalable au violet de Gentiane pendant une minute, puis traité pendant une minute par une solution de lugol ensuite il est rincé, une décoloration à l'éthanol à 95 % durant 2 à 3 secondes la lame est maintenue inclinée durant l'écoulement du solvant.

Celui-ci est alors immédiatement rincé à l'eau. On soumet ensuite le frottis à une contre coloration de 30 secondes à la Fuchsine. Après un bref rinçage, on sèche le frottis au buvard et on l'examine à l'objectif à immersion (grossissement X 1000). Toutes les bactéries lactiques sont à Gram positif.

Toutes les bactéries lactiques sont des bactéries à Gram positif, elles fixent le violet de gentiane.(Savador,2018).

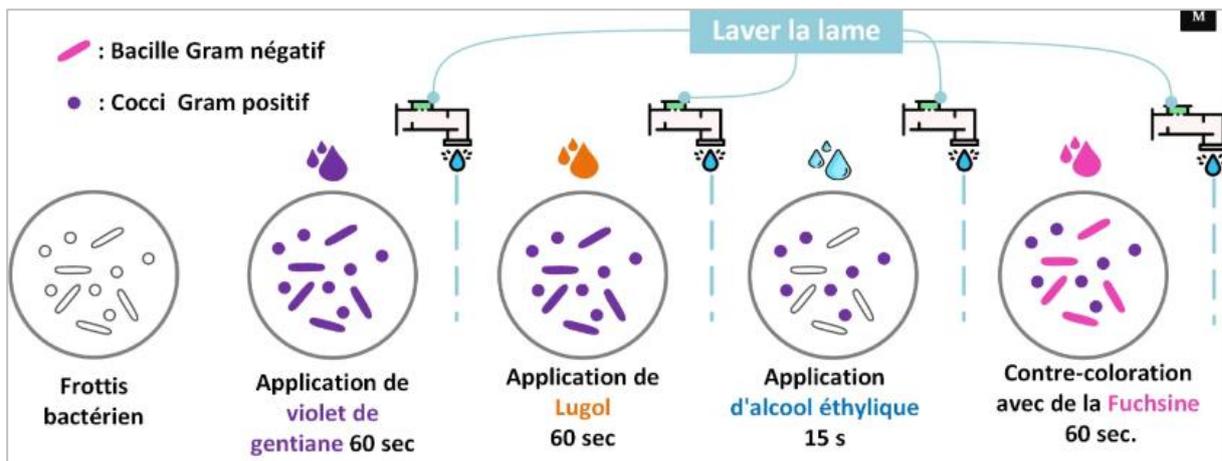


Figure9. Les étapes de la coloration de Gram (de gauche-droite). Accessible En ligne :<https://microbiologie-clinique.com/Coloration-Gram.html>

II.5.2 Recherche de catalase

L'objectif de ce test est de différencier les bactéries lactiques des non lactiques (**Bourgeois et al., 1980**). Les bactéries lactiques sont catalase négative.

La catalase est une enzyme qui dégrade l'eau oxygénée (H_2O_2) en eau métabolique (H_2O) et oxygène (O_2). Une colonie est mise en suspension avec une ou deux gouttes de solution de peroxyde d'hydrogène (10 volumes) sur une lame, déposée sur une lame propre, la réaction chimique de dégradation d'eau oxygénée. La catalase s'exprime aussi tôt par l'apparition des bulles d'air (dégageant gazeux d' O_2) aisément discernable (**Schoener, S., & Krause, G.H. 1990**).

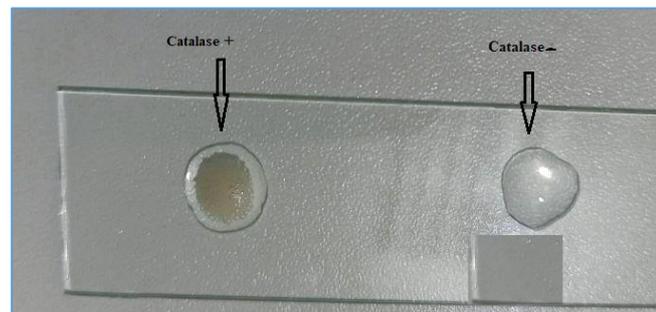
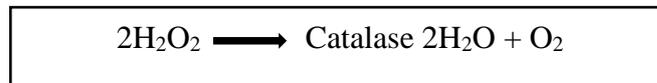


Figure10. Teste de catalase.

Seules les bactéries à Gram positif et catalase négative ont été retenues.

Pour chaque échantillon 5 à 10 colonies sont prélevées et repiquées sur milieu MRS et M17 pour la purification des colonies.

II.6 Méthode de conservation des souches

Deux modes de conservation des souches sont utilisées

II.6.1 Conservation de courte durée

Cette méthode est utilisée pour une conservation des isolats à courte durée. Les souches pures sontensemencées sur bouillons MRS à pH 6.8, après une incubation de 16~18h ces cultures pures sont conservées à 4°C, et le renouvellement des isolats se fait toutes les 04 semaines (**Champagne et al, 2000**).

II.6.2 Conservation de longue durée

Elle est employée pour une conservation des isolats de 1 à 6 mois à -20°C et -86°C . Elle s'effectue en congelant des cultures jeunes,ensemencées massivement sur milieux MRS / M17 à pH 6.8 ou dans du lait écrémé. L'ajout de 30% d'un cryoprotecteur est nécessaire (le glycérol) pour une bonne conservation (Meghoufel, 2019).

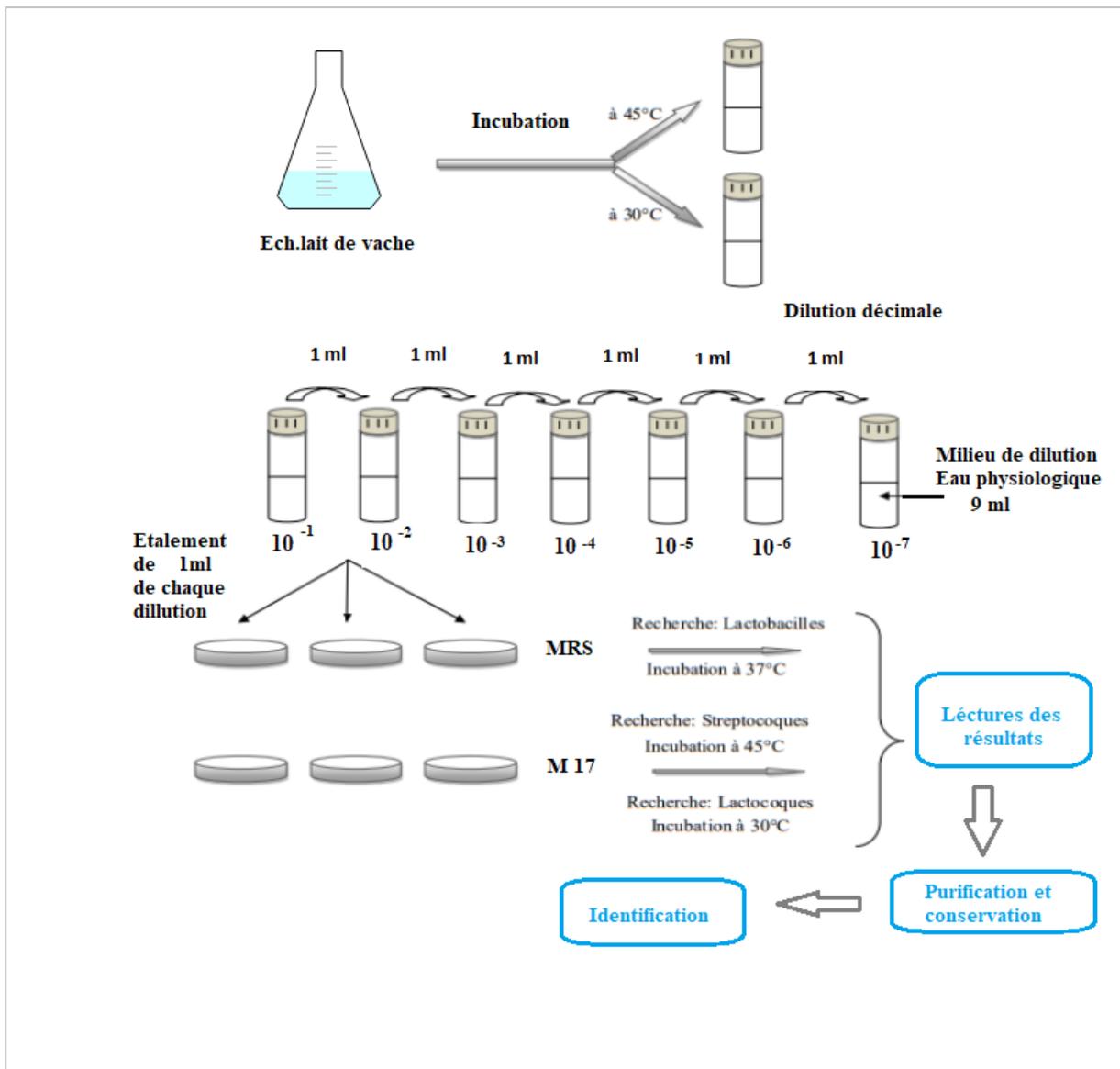


Figure11. Diagramme d'isolement des bactéries lactiques.

II.7 Identification et caractérisation des isolats

II.7.1 Tests morphologiques

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

II.7.1.1 Examen macroscopique

Ce test permet de mettre en évidence la morphologie de colonie obtenue sur boîtes de Pétri et à l'aide d'une loupe binoculaire. Les colonies isolées sont soumises à une observation macroscopique afin de déterminer les caractères cultureux (forme, aspect, taille, couleur, disposition et contour) (Zergoug,2017).

II.7.1.2 Examen microscopique

L'observation microscopique par coloration différentielle nous permet de distinguer les isolats selon le type de Gram (positif ou négatif), leur morphologie (bacille ou coque) et leurs modes d'associations (isolés, en chaînettes ou en tétrades). Les bactéries lactiques sont à Gram+ (Tahlaïti,2019).

II.8 Tests physiologiques et Biochimiques

II.8.1 Identification phénotypique des isolats

Les colonies isolées sur les milieux de dénombrement peuvent être identifiées au moyen de méthodes phénotypiques (tests physiologiques et biochimiques).

II.8.1.1 Croissance à différentes températures

Ce test permet de distinguer les bactéries lactiques mésophiles des bactéries lactiques thermophiles. La croissance bactérienne est évaluée par un trouble après 24 h d'incubation en milieu liquide MRS après 5 jours d'incubation à différentes températures (Menad, 2017)

Ces températures permettent d'identifier les bactéries comme suit :

- 10°C pour les isolats Psychrotrophes.

- 37°C pour les Lactobacilles et les Leuconostoc sur milieu MRS.
- 45°C les Streptocoques et les Entérocoques (**Ketrouci,2021**).

II.8.2 Recherche de la production de gaz (type fermentaire)

Ce test permet de déterminer le type de métabolisme à partir de la dégradation du glucose et la production du gaz (CO₂) (**Hansal, 2015**).

Cela nous permet de classer les bactéries lactiques en homofermentaires ou en hétérofermentaires.

Les isolats isolés sont ensemencés abondamment dans un tube de 10 ml de bouillon MRS dans lequel on introduit une cloche de Durham, le CO₂ dégagé par les bactéries hétérofermentaires s'accumule dans la cloche après incubation à 30°C pendant 24 h à 48 h (**Ketrouci, 2021**).

II.8.3 Test de thermorésistance

Ce test permet identifier les isolatsrésistent à une température de 63.5°C pendant 30 minutes. Les isolats sont inoculés en milieux liquides MRS. Les tubes sont introduits dans un bain marie à 63,5°C pendant 30 minutes, puis incubés à 37°C durant 24 à 48 heures. Un résultat positif se traduit par un trouble, Seules les isolats thermophiles poussent, contrairement aux isolats mésophiles qui sont incapables de s'y développer (**De Rouissi et al, 2006**).

II.8.4 Croissance dans des conditions hostiles

Ce test est réalisé pour caractériser les Lactoccoques des Entérocoques.

II.8.5 Croissance en présence de diverses concentrations de NaCl (Halophilie)

La croissance est testée en ensemencant chaque isolat dans un tube de milieu liquide MRS, à des concentrations de 4% et 6,5% de NaCl. Les tubes sont incubés à 30 et 37°C pendant 24 heures. On apprécie la croissance par l'apparition d'un trouble. La capacité à croître dans ces milieux hostiles est appréciée par une croissance dans les milieux de culture et par comparaison avec un tube témoin réalisé avec une culture dans du MRS sans NaCl (**Carr et al, 2002**).

II.8.6 Croissance à pH 4,5 et 9,6

Ce test est réalisé en inoculant un milieu liquide (bouillon MRS), dont le pH est porté à 9,6 et 4,5, par des isolats purs.

Les isolats sont incubés à 30°C pendant 24 h à 48 h. La croissance bactérienne est appréciée par un trouble dans les tubes et par comparaison avec une culture réalisée dans du MRS à pH6, 5. (Carr et *al.*, 2002).

II.8.7 Hydrolyse de l'esculine

Ce test a été réalisé sur le milieu gélosé contenant la bile à esculine. La gélose estensemencée par des stries serrée, après incubation de la culture à 30°C pendant 24 heures, l'hydrolyse de l'esculine libère l'aglycone qui est décelé par une réaction chimique en présence de sel de fer et donne une couleur noire au milieu de culture (De VOS et *al.*, 2009).

II.9 Identification des lactobacilles par la galerie API 50 CHL

L'identification des souches de lactobacilles, par le système API bioMérieux en utilisant la galerie API 50CH avec API 50 CHL medium (bioMérieux, Marcy l'étoile, France).

Le microorganisme à tester est mis en suspension dans le milieu puis inoculé dans chaque tube de la galerie. Pendant l'incubation, le catabolisme des glucides conduit à des acides organiques qui provoquent le virage de l'indicateur de pH. Les résultats obtenus constituent le profil biochimique permettant l'identification du microorganisme à l'aide du logiciel d'identification **APILAB** (bioMérieux, Marcy l'étoile, France). (Dahou et *al.*, 2016).

II.10 Inoculation des galeries

- Répartir la suspension bactérienne à l'aide d'une pipette stérile dans les 50 tubes de la galerie en se conformant aux précautions suivantes :
- Incliner légèrement vers l'avant la boîte d'incubation.
- Eviter la formation de bulles en posant la pointe de la pipette sur le côté de la cupule.

- Lorsque les tubes doivent être inoculés, les cupules sont remplies avec de l'huile de paraffine stérile.
- Incuber les galeries à la température optimum de croissance de bactéries étudiées.
- Durant la période d'incubation, la fermentation des sucres est indiquée par une couleur jaune exceptée pour l'esculine (brun foncé). Les résultats sont lus à 24 h et vérifiés après 48 h d'incubation.
- L'interprétation des résultats peut se faire par le logiciel Api Web (**Bio Mérieux**) pour identifier les bactéries lactiques.



Figure 12. Galerie API 50 CHL.

Chapitre III

Résultats et Discussions

III. Résultats et discussion

III.1 Caractères physico-chimiques

Les principaux facteurs de variation de la composition chimique du lait sont bien connus. Ils sont liés à l'animal (facteurs génétiques, stade physiologique, état sanitaire) ou au milieu (saison, alimentation, traite). Parmi ces facteurs, certains agissent dans le même sens sur les taux butyreux et protéique (stade physiologique, saison) et peuvent entraîner des variations entre les mois extrêmes selon les situations (Coulon *et al.*, 1991).

Nous avons donc essayé de déterminer la composition du lait prélevé et quelques Caractères physicochimiques afin de déterminer la qualité de ce dernier.

La composition globale du lait ne fait apparaître que les grandes catégories de ses constituants et les valeurs données sont des valeurs moyennes. Les résultats des analyses physico-chimiques sont illustrés dans le tableau III.

Tableau III. Résultats des différents Testes physico-chimique de lait de vache cru.

Essai paramètres	Normes	Résultats	Observation
pH	6.6-6.8	6.64	Conforme
Acidité dornic (°D)	16-18	17	Conforme
Densité	1,028-1,032	1,029	Conforme
Matière grasses %	2,5-6	3,98	Conforme

Chaque mesure de ces paramètres a été répétée trois fois pour chaque échantillon, le résultat obtenu est le calcul de la moyenne des résultats des trois échantillons.

D'après les résultats obtenus, le lait cru de vache étudié de bonne qualité physico-chimique. En effet, toutes les valeurs des paramètres recherchés sont conformes aux normes.

III.1.1 Le pH

Les valeurs de pH rapportés dans cette étude sont situées dans l'intervalle de 6,6 et 6,8 une moyenne de 6,64 cela signifie que le lait étudié est normal et stable (**Vignola, 2002**) le résultat obtenu se rapproche de celui rapportées par certains auteurs tels que (**Remeuf et al.1989**) avec un pH égal à 6,7.

III.1.2 L'acidité Dornic (°D)

Est le deuxième paramètre physico-chimique important à contrôler après le pH, elle nous renseigne sur la fraîcheur du lait.

Pour l'échantillon du lait de vache l'acidité a une valeur moyenne de 18 °D. Cette valeur d'acidité se rapproche des valeurs trouvées auparavant par (**Vignola, 2002**) et (**Alais,1984**).

III.1.3 Densité

La densité, est le paramètre le plus recherché en industrie car il permet la détection de fraudes.

La densité du lait est une grandeur sans dimension qui désigne le rapport entre la masse d'un volume donné de lait à 20°C et la masse du même volume d'eau (**Pointurier, 2003**).

Dans notre étude, nous avons trouvé une valeur moyenne de 1.029 pour les échantillons du lait de vache ; Cette valeur moyenne se situe dans l'intervalle de 1,028 à 1,032, ceci indique que le lait est dans son état normal et qu'il n'est pas dilué.

III.1.4 Teneur en matière grasse

Elle nous renseigne sur la valeur nutritionnelle et énergétique du produit. Les résultats obtenus montrent que la teneur en matière grasse du lait de vache (3.98 %), dans la littérature, nous trouvons des valeurs très proches enregistrés par (**Jaubert,1997**), 33 g/l et (**Kennedey et al. 1981**). Cette variabilité peut s'expliquer par la différence de la nature de l'alimentation.

III.2 Pré Identification des bactéries lactiques

III.2.1 Dénombrement des colonies

Les boîtes contenant de 15 à 300 colonies sont retenues pour le dénombrement.

Le dénombrement des colonies est réalisé selon la formule suivante :

$$N = \frac{\sum c}{(n_1 + 0.1n_2) d}$$

$\sum c$: somme des colonies de toutes les boîtes.

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

n_1 : nombre de boîtes positives de la première dilution.

n_2 : nombre de boîtes positives de la deuxième dilution.

Le dénombrement de la flore lactique sur gélose MRS et M17 est effectué selon de (**Joffin et leyrat, 2006**). Une charge très importante en bactéries lactiques a été enregistrée avec une moyenne de $1,57 \times 10^5$, on note qu'elle était supérieure sur la gélose M17 ($2,19 \times 10^5$) par rapport au milieu MRS ($0,95 \times 10^5$).

Treize isolats bactériens ont été isolés à partir de nos échantillons de vache cru de la région de Relizane. Ces isolements ont été réalisés sur milieu solide MRS. Les colonies ont été d'abord purifiées et ont subi un premier screening basé sur la coloration de Gram et le test de catalase.

Les isolats bactériens sont désignés par les lettres RF, F en référence à l'origine de l'échantillon de « Relizane » et codés F « Flore lactique ».

L'identification des isolats lactiques au stade genre a été conduite en utilisant différents tests portant sur les caractéristiques culturelles, morphologiques (macroscopique et microscopique).

III.2.2 Etude morphologiques

L'étude morphologique consiste à décrire l'aspect des colonies, la couleur et la taille sur milieux solides. Elle est ensuite suivie par une coloration différentielle de Gram pour écarter les bactéries Gram négatif.

L'observation au microscope optique permet de définir les formes, coques ou bâtonnets ainsi que leurs modes de regroupements.

III.2.2.1 Aspect Macroscopique

L'étude macroscopique sur milieu solide des colonies des bactéries cultivées sur milieu gélosé MRS montre des colonies circulaires, arrondies, légèrement bombées de couleur blanche et brillantes de taille (1-2 mm) (figure 13), l'observation des colonies cultivées sur milieu gélosé M17 nous a montré des colonies de couleur crème mat, aspect régulier de taille (1-1.5mm) (figure 13).



Figure 13. Aspect macroscopique des colonies sur milieu M17.

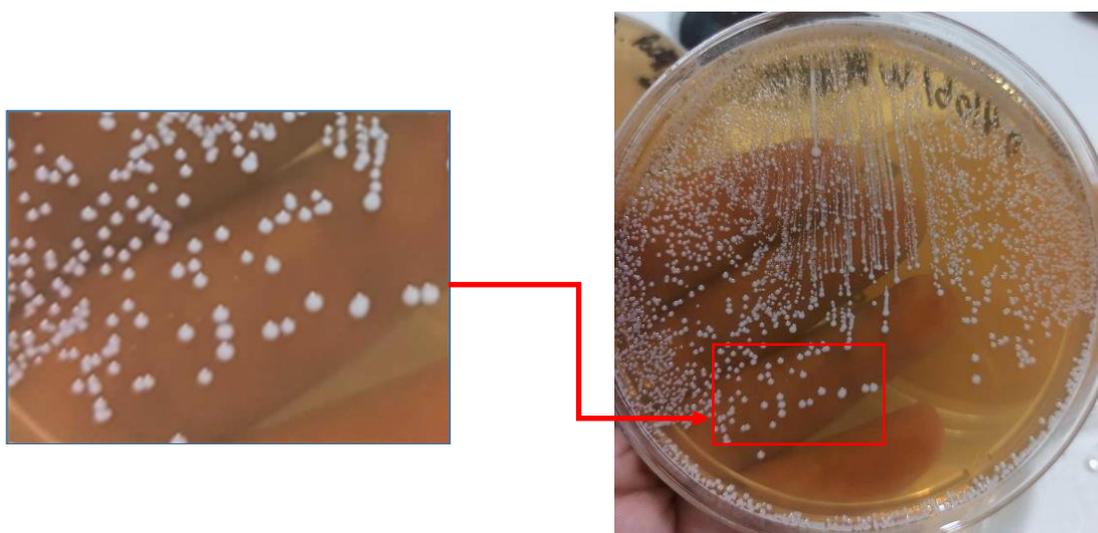


Figure14. Aspect macroscopique des colonies sur milieu MRS.

Tableau IV. Résumé de l'observation macroscopique des souches des colonies isolées.
sur milieux MRS et M17.

Dilution	Couleur	Aspect	Taille	Milieu
R10⁻³	Blanchâtre	Régulier, lisse	(1-2mm)	MRS
R10⁻⁴	Blanchâtre	Régulier, lisse	(1-2mm)	MRS
R10⁻⁵	Blanchâtre	Régulier, lisse	(1-2mm)	MRS
R10⁻³	Blanchâtre	Régulier, mat	(1-1.5mm)	M17
R10⁻⁴	Crème	Régulier, mat	(1-1.5mm)	M17
R10⁻⁵	Crème	Régulier, mat	(1-1.5mm)	M17

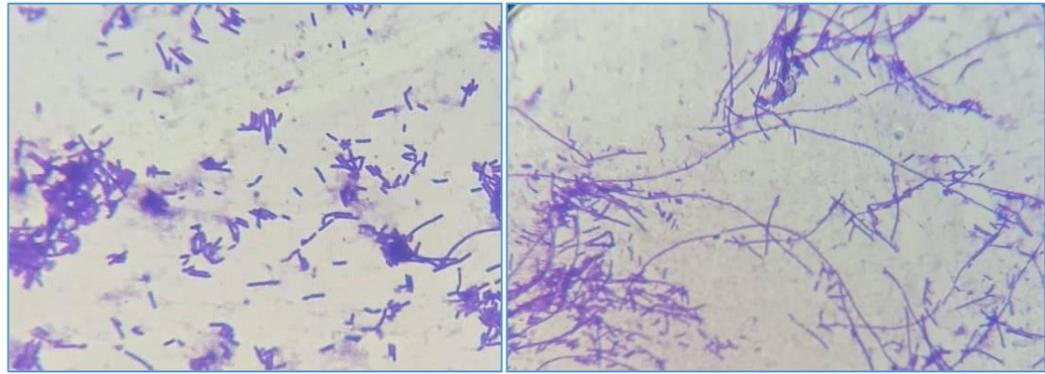
III.2.2.2 Aspect Microscopique

III.2.3 Teste de catalase

Les 13 isolats sont Gram positif et catalase négative, voir TableauV.

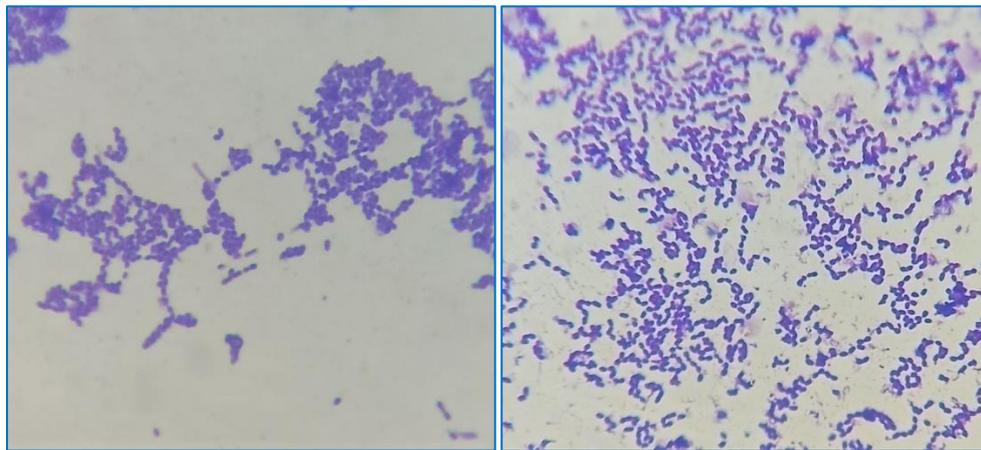
Tableau V. Résultats du test de la catalase et de la coloration de Gram sur les 13 isolats.

Echantillon	Gram	Catalase
RF 01	+	-
RF 02	+	-
RF 03	+	-
RF 04	+	-
RF 05	+	-
RF 06	+	-
RF 07	+	-
RF 08	+	-
RF 09	+	-
RF 10	+	-
RF 11	+	-
RF 12	+	-
RF 13	+	-



A. *Lactobacilles.*

B. *Lactobacilles.*



C. *Lactocoques.*

D. *Lactocoques.*

Figure 15. Observation microscopique au laboratoire des isolats (G x1000).

L'aspect microscopique des isolats a révélé après la coloration de Gram, deux formes de cellules : Bacille et Coques voir **Tableau VI**.

A l'issue des résultats macroscopiques et microscopiques et les tests de la catalase, 13 isolats ont été retenus. Ce premier screening nous a permis de mettre en évidence la présence de lactobacilles et de coques.

Tableau VI. Résumé de l'aspect microscopique des 13 isolats et leur mode d'association GX1000.

Echantillon	Forme	Mode d'association
RF 01	Coques	Diplocoque et en chainettes
RF 02	Coques	En chainettes
RF 03	Coques	Isolées, Tétrades
RF 04	Bacilles	Isolées, en paires et en chainettes
RF 05	Bacilles	Isolées et en chainettes
RF 06	Bacilles	Isolées et en chainettes
RF 07	Bacilles	Isolées et en chainettes
RF 08	Coques	Isolées, paires
RF 09	Coques	Isolées, paires
RF 10	Bacilles	Isolées et en chainettes
RF 11	Bacilles	Isolées et en chainettes
RF 12	Bacilles	Isolées et en chainettes
RF 13	Bacilles	Isolées et en chainettes

III.3 Critères physiologiques et biochimiques

En plus des tests basés sur la morphologie nous avons utilisé des tests physiologiques et biochimiques.

III.3.1 Croissance a différentes températures

- **Croissance à 10°C, 37°C et 45°C**

Ce test permet de distinguer entre la flore mésophile et thermophile.

Les résultats de ce test permettent de distinguer entre bactérie mésophiles qui poussent à 37°C, psychrophiles qui poussent à 10°C et celles qui se développent à 45°C et donc thermophiles.

A 37°C, toutes les bactéries se développent à cette température.

A 45°C : la majorité des bactéries sont capables de se développer à 45°C indiquant qu'elles sont thermophiles à l'exception des isolats RF2, RF 03 ET RF 08 qui sont mésophiles.

Les résultats obtenus sont répertoriés sur le **tableau VII**.



Figure 16. Test de croissance des isolats à 37°C .

Tableau VII : Résultats de croissance des isolats à différentes températures.

Echantillon	Température		
	10 C°	37°C	45°C
RF 01	+	+	+
RF 02	-	+	-
RF 03	+	+	+
RF 04	+	+	+
RF 05	+	+	+
RF 06	+	+	+
RF 07	+	+	+
RF 08	-	+	+
RF 09	+	+	+
RF 10	-	+	+
RF 11	+	+	+
RF 12	+	+	+
RF 13	+	+	+

III.3.2 Le type fermentaire

Ce test constitue la première clé d'identification phénotypique des bactéries lactiques leur objectif est de faire différencier entre les souches hétérofermentaire et les souches homofermentaires.

Les résultats de ce test ont montré que deux isolats RF01 et RF 09 testées ne produisent pas de (CO₂) par la fermentation du glucose, donc c'est des bactéries lactiques homofermentaire. Les 11 isolats restants sont des bactéries lactiques de type hétérofermentaire. Voir (figures 16 et 17). Les résultats obtenus sont répertoriés sur le **tableau VIII**.

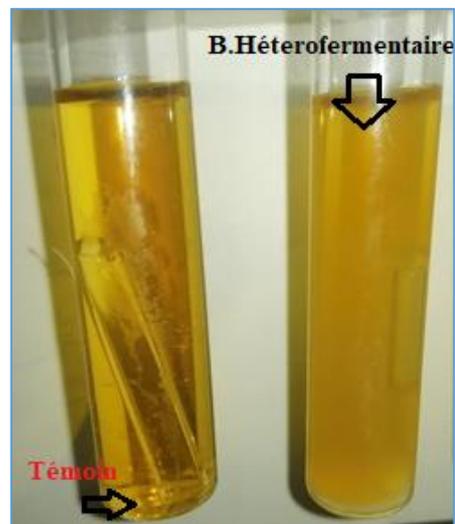


Figure 17. Type fermentaire de l'isolat RF 01 Homofermentaires.

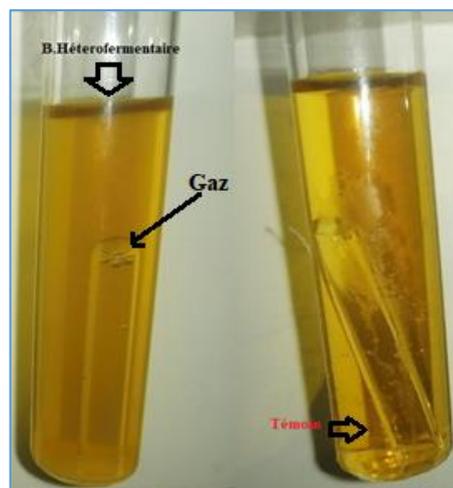


Figure 18. Type fermentaire de l'isolat RF 02 Hétérofermentaires.

Tableau VIII : Résultats du test type fermentaire.

Echantillon	Type fermentaire
RF 01	Homo
RF 02	Hétero +
RF 03	Hétero +
RF 04	Hétero ++
RF 05	Hétero ++
RF 06	Hétero +
RF 07	Hétero +
RF 08	Hétero +
RF 09	Homo+
RF 10	Hétero ++
RF 11	Hétero ++
RF 12	Hétero +
RF 13	Hétero +

III.3.3 Test de thermoresistance croissance à 63,5°C

La thermorésistance est un caractère physiologique permettant de distinguer entre les souches pouvant tolérer une température de 63,5°C pendant 30 min de celles qui en sont incapables. Le résultat positif se traduit par un trouble.

Les résultats du test de thermorésistance sont répertoriés dans le tableau IX :

Tableau IX. Résultats du test de Thermoresistance .

Echantillon	Thermorésistance 63.5 °C
RF 01	-
RF 02	-
RF 03	-
RF 04	+
RF 05	+
RF 06	+
RF 07	+
RF 08	-
RF 09	+
RF 10	+
RF 11	+
RF 12	+
RF 13	+

III.3.4 La croissance à différents pH

La croissance à différents pH (4,5 et 9,6) milieu MRS se traduit par un trouble bactérien visible à l'œil nu. Les résultats obtenus sont répertoriés sur le **Tableau X** :



Figure19. Test de croissance à pH 9,6.

Tableau X. Résultats du test de croissance à différents pH .

Echantillon	pH	
	9,6	4,5
RF 01	-	-
RF 02	+	-
RF 03	+	-
RF 04	-	+
RF 05	-	+
RF 06	+	+
RF 07	+	+
RF 08	+	+
RF 09	+	-
RF 10	+	+
RF 11	+	+
RF 12	+	+
RF 13	+	+

III.3.5 Croissance à différentes concentrations de NaCl

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.

L'ensemble des isolats sont résistants à une concentration de 4 % de NaCl et 11 isolats sur 13 sont résistants à une concentration de 6,5% de Na Cl **Tableau XI.**

Tableau XI. Résultats du test de croissance à différentes concentrations de NaCl.

Echantillon	NaCl	
	4%	6,5%
RF 01	+	+
RF 02	+	-
RF 03	+	+
RF 04	+	+
RF 05	+	+°
RF 06	+	+
RF 07	+	+°
RF 08	+	-
RF 09	+	+°
RF 10	+	+°
RF 11	+	+°
RF 12	+	+°
RF 13	+	+

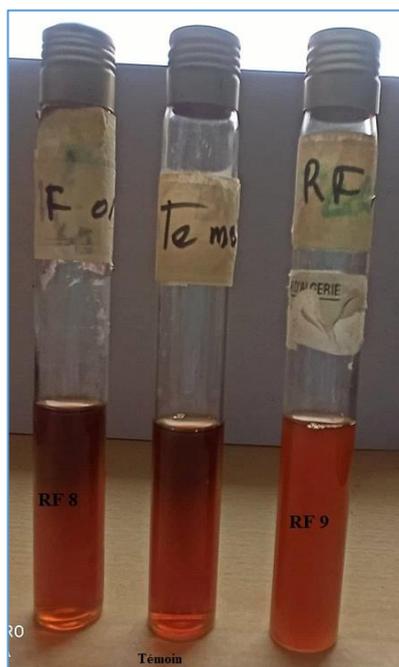


Figure 20. Croissance en présence de 6,5% NaCl, RF 09 croissance positive, RF 08 pas de croissance.

III.3.6 Hydrolyse de l'esculine

L'hydrolyse de l'esculine se traduit par un noircissement sur milieu à esculine gélosé (**figure 22**). Nous remarquons que 11 isolats se sont révélés positifs à ce test à l'exception de RF01 et RF 11. **Tableau XII.**

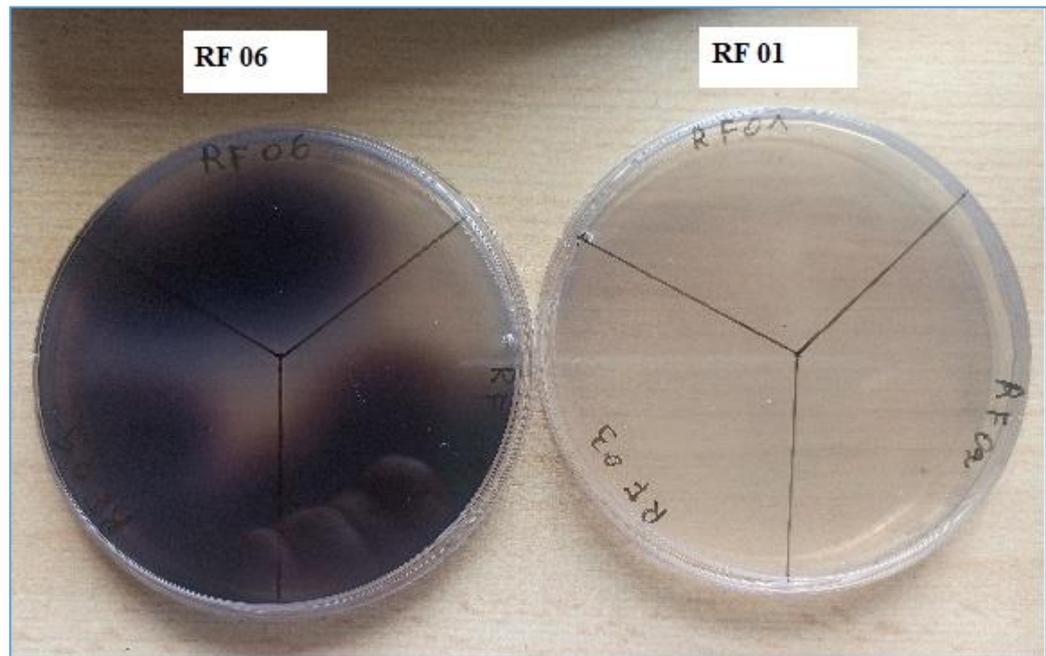


Figure 21. Test de caractérisation phénotypique des bactéries lactiques, Hydrolyse de l'esculine.

Tableau XII: Résultats du test de l'hydrolyse de l'esculine.

Echantillon	Esculine
RF 01	+
RF 02	+
RF 03	+
RF 04	+
RF 05	+
RF 06	+
RF 07	-
RF 08	+
RF 09	+
RF 10	+
RF 11	-
RF 12	+
RF 13	+

Tableau XIII:Résultats des tests physiologiques et biochimiques réalisés pour l'identification des genres isolées.

Echantillon	Gram	Catalase	Forme	NaCl		pH		Thermorésistance 63.5 °C	Température			Type fermentaire	Esculine	Pré-identification
				4%	6,5 %	9,6	4,5		10 C°	37°C	45°C			
RF 01	+	-	Coques	+	+	-	-	+	+	+	+	Homo	+	<i>Enterococcus</i>
RF 02	+	-	Coques	+	-	+	-	-	-	+	-	Hétéro +	+	<i>Leuconostoques</i>
RF 03	+	-	Coques	+	+	+	-	+	+	+	+	Hetero +	+	<i>Tétragénococcus</i>
RF 04	+	-	Bacilles	+	+	-	+	+	+	+	+	Hétéro ++	+	<i>Lactobacillus</i>
RF 05	+	-	Bacilles	+	+°	-	+	+	+	+	+	Hétéro ++	+	<i>Lactobacillus</i>
RF 06	+	-	Bacilles	+	+	+	+	+	+	+	+	Hétéro +	+	<i>Lactobacillus</i>
RF 07	+	-	Bacilles	+	+°	+	+	+	+	+	+	Hétéro +	-	<i>Lactobacillus</i>
RF 08	+	-	Bacilles	+	-	+	+	-	-	+	-	Hétéro +	+	<i>Leuconostoque</i>
RF 09	+	-	Coques	+	+°	+	-	+	+	+	+	Homo+	+	<i>Entéroccoccus</i>
RF 10	+	-	Bacilles	+	+°	+	+	+	-	+	+	Hétéro ++	+	<i>Lactobacillus</i>
RF 11	+	-	Bacilles	+	+°	+	+	+	+	+	+	Hétéro ++	-	<i>Lactobacillus</i>
RF 12	+	-	Bacilles	+	+°	+	+	+	+	+	+	Hétéro +	+	<i>Lactobacillus</i>
RF 13	+	-	Bacilles	+	+	+	+	+	+	+	+	Hétéro +	+	<i>Lactobacillus</i>

(+) résultat positif (-) résultat négatif

TableauXIV. Profils fermentaires des isolats par les galeries API 50 CHL.

Numéro	SUCRE	RF3	RF4	RF 5	RF 6	RF 7	RF 8	RF 10	RF 11	RF 12	R13
	Témoin										
1	GLY	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+
2	ERY	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+
3	DARA	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+
4	LARA	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-
5	RIB	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-
6	DXXL	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-
7	LXXL	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+
8	ADO	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
9	MIDX	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
10	GAL	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-
11	GLU	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
12	FRU	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
13	MNE	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
14	SBE	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+
15	RHA	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
16	DUL	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+
17	INO	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+
18	MAN	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
19	SOR	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
20	MDM	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+

21	MDG	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22	NAG	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
23	AMY	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
24	ARB	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
25	ESC	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
26	SAL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
27	CEL	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
28	MAL	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
29	LAC	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
30	MEL	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
31	SAC	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-
32	TRE	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
33	INU	+	-	-	+	-	-	+	+	-	+
34	MIZ	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+
35	RAF	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-
36	AMD	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-
37	GLYG	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+
38	XLT	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+
39	GEN	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
40	TUR	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+
41	LYX	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+
42	TAG	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-

43	DFUC	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+
44	LFUC	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+
45	DARL	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+
46	LARL	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+
47	GNT	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-
48	2KG	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+
49	5KG	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>Souches probables identifiées</i>		<i>En.faecalis</i>	<i>Lb.plantarum</i>	<i>Lb.plantarum</i>	<i>Tetragenococcus halophilus</i>	<i>Lb. brevis</i>	<i>L.mésentéroïdes</i>	<i>En.faecalis</i>	<i>Lb. casei</i>	<i>Lb. brevis</i>	<i>Lb. brevis</i>

0: Témoin, GLY: Glycérol, ERY: Erythritol, DARA: D-Arabinose, LARA: L-Arabinose, RIB: DRibose, DXYL: D-Xylose, LXYL: L-Xylose, ADO: D-Adonitol, MDX: Méthyl-βDXylopyranoside, GAL: D-Galactose, GLU: D-Glucose, FRU: D-Fructose, MNE: DMannose, SBE: L-Sorbose, RHA: L-Rhamnose, DUL: Dulcitol, INO: Inositol, MAN: DMannitol, SOR: D-Sorbitol, MDM: Méthyl-αDMannopyranoside, MDG: Méthyl-αDGlucoopyranoside, NAG: N-AcétyleGlucosamine, AMY: Amygdaline, ARB: Arbutine, ESC: Esculine, SAL: Salicine, CEL: D-Cellobiose, MAL: D-Maltose, LAC: D-Lactose, MEL: DMélibiose, SAC: D-Saccharose, TRE: D-Trehalose, INU: Inuline, MLZ: D-Méli, RAF: D-Raffinose, AMD: Amidon, GLYG: Glycogène, XLT: Xylitol, GEN: Gentiobiose, TUR: D-Turanose, LYX: D-Lyxose, TAG: D-Tagatose, DFUC: D-Fucose, LFUC:LFucose, DARL: D-Arabitol, LARL: L-Arabitol, GNT: Gluconate, 2KG: 2-CétoGluconate, 5KG: 5- CétoGluconate.

Bande 0 - 9

Tube	Test	Composants actifs	QTE (mg/cup.)
0		TEMOIN	-
1	GLY	GLYcérol	1,64
2	ERY	ERYthritol	1,44
3	DARA	D-ARAbinose	1,4
4	LARA	L-ARAbinose	1,4
5	RIB	D-RIBose	1,4
6	DXYL	D-XYLose	1,4
7	LXYL	L-XYLose	1,4
8	ADO	D-ADOnitol	1,36
9	MDX	Méthyl-β-D-Xylopyranoside	1,28

Bande 10 - 19

Tube	Test	Composants actifs	QTE (mg/cup.)
10	GAL	D-GALactose	1,4
11	GLU	D-GLUcose	1,56
12	FRU	D-FRUctose	1,4
13	MNE	D-MaNnosE	1,4
14	SBE	L-SorBosE	1,4
15	RHA	L-RHAmnose	1,36
16	DUL	DULcitol	1,36
17	INO	INOsitol	1,4
18	MAN	D-MANnitol	1,36
19	SOR	D-SORbitol	1,36

Bande 20 - 29

Tube	Test	Composants actifs	QTE (mg/cup.)
20	MDM	Méthyl-αD-Mannopyranoside	1,28
21	MDG	Méthyl-αD-Glucopyranoside	1,28
22	NAG	N-AcétylGlucosamine	1,28
23	AMY	AMYgdaline	1,08
24	ARB	ARButine	1,08
25	ESC	ESCuLine citrate de fer	1,16 0,152
26	SAL	SALicine	1,04
27	CEL	D-CELlobiose	1,32
28	MAL	D-MALtose	1,4
29	LAC	D-LACtose (origine bovine)	1,4

Bande 30 - 39

Tube	Test	Composants actifs
30	MEL	D-MELibiose
31	SAC	D-SACcharose
32	TRE	D-TREhalose
33	INU	INULine
34	MLZ	D-MéLéZitose
35	RAF	D-RAFfinose
36	AMD	AmiDon
37	GLYG	GLYcoGène
38	XLT	XyLiToL
39	GEN	GENtiobiose

Bande 40 - 49

Tube	Test	Composants actifs
40	TUR	D-TURanose
41	LYX	D-LYXose
42	TAG	D-TAGatose
43	DFUC	D-FUCose
44	LFUC	L-FUCose
45	DARL	D-ARAbitoL
46	LARL	L-ARAbitoL
47	GNT	potassium GlucoNaTe
48	2KG	potassium 2-CétoGluconate
49	5KG	potassium 5-CétoGluconate

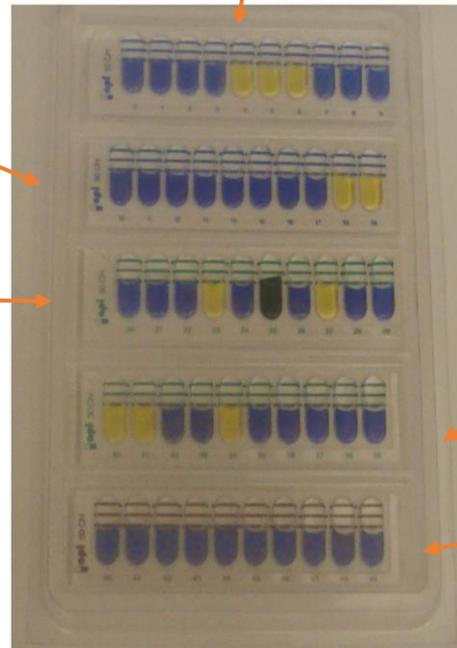


Figure 22. Teste de fermentation des isolats l'aide des galerie API CH 50.

III.4 Identification des isolats par les galeries API 50 CHL

Nous avons identifié les bactéries au niveau de l'espèce. En établissant leur profil fermentaire à l'aide de galeries API 50 CHL, en utilisant le site internet Abis online bacterial identification (http://www.tgw1916.net/bacteria_logare_desktop.html). L'identification a révélée 7 espèces différentes sur 13 souches, ce qui montre une grande diversité des bactéries composant cet échantillon.

Les résultats obtenus (tableau VI) sont comme suit :

4 souches *Lactobacillus brevis*, souches de *Leuconostocmesenterides*, 2 souches d'*Enterococcusfaecalis*, 2 souches *Lactobacillus plantarum*, une souche de *Lactobacillus casei*, une souche de *Tetragenococcus halophilus*, et enfin une souche de *Lactobacillusacidophiles*.

Tableau XV.Souches identifiées par la Galerie API CHL.

Echantillon	Identification galerie API CHL 50
RF 01	<i>En.faecalis</i>
RF 02	<i>L.mésentéroïde</i>
RF 03	<i>Tetragenococcus halophilus</i>
RF 04	<i>Lb.plantarum</i>
RF 05	<i>Lb.plantarum</i>
RF 06	<i>Lb.brevis</i>
RF 07	<i>Lb. brevis</i>
RF 08	<i>L.mésentéroïdes</i>
RF 09	<i>En.faecalis</i>
RF 10	<i>Lb. acidophilus</i>
RF 11	<i>Lb. casei</i>
RF 12	<i>Lb. brevis</i>
RF 13	<i>Lb. brevis</i>

Discussion

Le lait est un aliment spécifique dont l'importance nutritionnelle n'est plus à démontrer. En effet, le lait constitue le premier apport protéique de l'être humain et le premier aliment naturel complet dès le jeune âge. Il renferme les nutriments de base nécessaire au bon développement de l'organisme humain.

Nous avons commencé notre étude par des analyses physico-chimiques, pour s'assurer de la qualité de notre échantillon de lait de vache, nos résultats montrent que ce produit est de bonne qualité par rapport au pH, sa teneur d'acidité titrable, sa densité, sa température ainsi que sa teneur en matière grasse, selon les normes (AFNOR).

Dans un deuxième temps nous nous sommes dirigés vers l'objectif de notre étude qui est l'isolement et l'identification des bactéries lactiques. L'isolement a été effectué sur le milieu MRS et M17, suite aux exigences nutritionnelles des bactéries lactiques, les milieux de culture doivent être très riches en sucres, en matières azotées et surtout en facteurs de croissances (**Pilet et al, 2005**).

MRS pour les lactobacilles et sur M17 les lactocoques, Les résultats du dénombrement de la microflore lactique présentent une charge très importante en bactéries lactiques avec une moyenne de $1,57 \times 10^5$ UFC/ml.

Triez isolats lactiques ont été pré-identifiés dans le stade de genre.

L'observation microscopique a révélée deux formes de cellules (Coques et Batônnetts). Les résultats obtenus sur les 13 isolats sélectionnés sont Gram positif, catalase négative, Ces résultats confirment les données. (**Gunter et al, 1998**). Les formes bâtonnets sont largement dominantes (**figure 23**) soit 9 isolats représentés par le genre *Lactobacillus* avec 69,23% de l'effectif total. Le genre *Enterococcus* représente 15,38 %, dont deux isolats présentent un développement positif à 10 °C et à 45 °C, à pH 9,6 présence de 6,5 % de NaCl et une thermorésistance égale à 63.5 °C durant 30 min. les formes coques sont représentées par le genre *Leuconostoc* soit 15,38%, suivi du genre *Tétragénococcus* avec une fréquence très faible soit 7,7 % .A la différence des autres bactéries lactiques les Tétragénocoques se développent à 4% et 6,5 % de NaCl croissance à pH 9,6 (**Wilhelm et al 2013**) .

Les analyses morphologiques, physiologiques et biochimiques ont montré une diversité dans la flore lactique en genres et espèces.

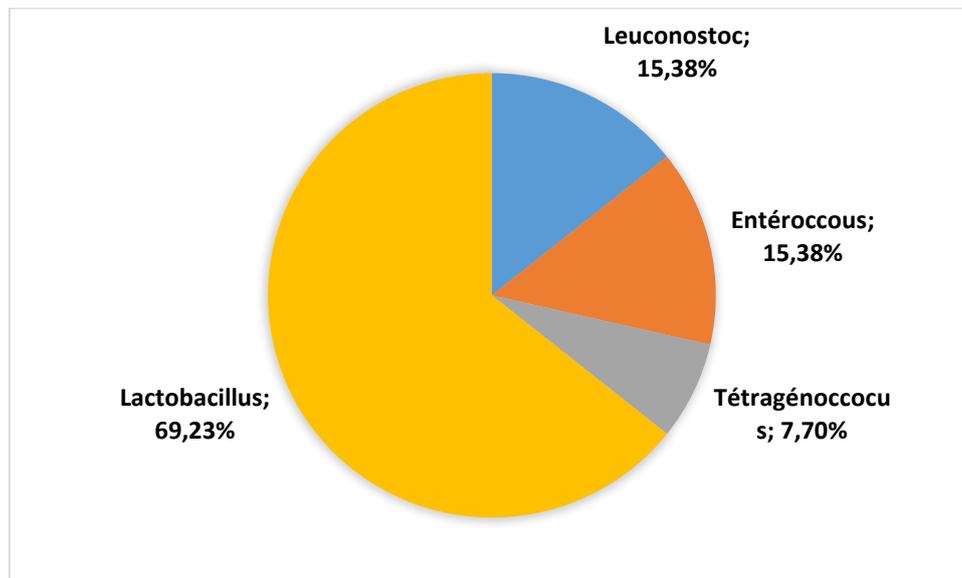


Figure 23. Secteurs de répartition des genres des bactéries lactiques.

Les tests physiologiques et biochimiques ont facilité la répartition des isolats en 4 groupes *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc* et *Tétragénococcus*. Ces résultats sont en accord avec les travaux de **(Benrguieg,2015)**.

L'identification des souches au niveau de l'espèce a été établie et confirmée par l'étude du profil fermentaire à partir des galeries API CHL. Les résultats de ce test ont confirmé une prédominance du genre *Lactobacillus* qui présente un profil hétérofermentaire, thermorésistantes. Parmi elles, l'espèce de *Lactobacillus brevis* qui est largement dominante et représentée par 4 isolats, 2 espèces de *Lactobacillus plantarum*, une espèce de *Lactobacillus acidophilus* et une espèce de *Lactobacillus casei*. Nos résultats concordent avec ceux de **(Bekhouche et Boulahrouf, 2005)**.

La présence de deux espèces du genre *Leuconostoc mesenteroides* et une espèce du genre *Tetragenococcus halophilus*. La présence de 2 souches de l'espèce du genre *Enterococcus faecalis* sur les 13 souches isolées, prouve que les conditions hygiéniques de la traite et de stockage du lait sont favorables à ce type de bactérie qui est d'origine fécale.

Conclusion

A travers cette étude, nous avons tenté d'apporter une contribution à la caractérisation et l'identification des souches lactiques du lait de vache cru issu de la région de Sidi Saada wilaya de Relizane.

A l'issue de cette étude, treize (13) souches ont été isolées, purifiées et identifiées. Cette identification a été réalisée dans un premier temps par la détermination des caractéristiques morphologiques, physiologiques et biochimiques qui nous a permis de réaliser d'une part par la répartition des isolats en 4 groupes dont : *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Tetragenococcus* et *Leuconostoc* et d'autre part une identification et une confirmation de l'espèce à l'aide des galeries API CHL.

Les résultats de la caractérisation obtenus ont permis de déterminer la nature de la flore lactique présente dans notre échantillon.

La connaissance du microbiote initial des laits transformés par région est primordial pour orienter la technologie, préserver l'originalité des produits laitiers fabriqués et garantir leur typicité.

Ces résultats offrent des perspectives et peuvent être complétés par :

- Une mise en évidence des aptitudes technologiques des 13 souches lactiques isolées à partir de lait de vache en particulier le pouvoir acidifiant, protéolytique, et lipolytique ; la production d'acétoïne et d'EPS ainsi que la résistance aux antibiotiques et à la chaleur
- Une identification moléculaire

Références Bibliographiques

Références Bibliographiques

- **ALAISC., (1984).** Lait de chèvres : la recherche est en marche, *Revue Laitière Française*, 64p, p 31-38.
- **ALAIS C., Linden G. et Miclo L., (2008).** *Biochimie alimentaire*, Dunod, 6eme édition. Paris. p :86-88.
- **AMARGLIO S. (1986).** Contrôle de la qualité des produits laitiers : *analyse physique et chimique*, 3ème édition Paris : AFNOR ; ITSV, p1030.
- **ARTHUR C.OUWEHAUD, ATTE VON WRIGHT, SAMPO LAHITINEN et SEPPO SALMINEN., (2011).**
- **BELDJILALI A.,(2021).** *Toxicologie et Sécurité Microbiologique des Aliments*, usto,Fsnv,Biotech, Cours de Toxicologie et Sécurité microbiologique des aliments,p32.
- **BOURGEOIS C.M. ET LARPENT J.P (1980).** Microbiologie alimentaire. T.2. Aliments fermentés et fermentations alimentaires. Ed. Tec et Doc, Lavoisier (Paris), 523p.
- **BENREGUIEG M, (2015).**Propriétés Antibactériennes et Probiotiques de Bactéries Lactiques Isolées à Partir du Lait de Vache, de Chèvre et de Brebis dans la région de l'Ouest Algérien, Thèse de Doctorat en biologie, Option Microbiologie, Université de Mostaganem.
- **CARR FJ, CHILL D, MAIDA N (2002).** The lacticacidbacteria : A littérature survey. *Crit. Rev. Microbiol.*, p281-370.
- **CHAMPAGNE C.P., GARDNER N.J., SOULIGNAC L. and INNOCENT J.P., (2000).** The production of freeze-driedimmobilized cultures of *Streptococcus thermophilus* and their acidification properties in milk. *Journal of AppliedMicrobiology*,p124-131.
- **CIRIHA :** Centre d'Information et de Recherche sur les Intolérances et l'Hygiène Alimentaires, *composition du lait*. Consulté le 22 mai 2022. Accessible sur la page Page : web :<http://ciriha.org/index.php/allergies-et-intolerances-2/le-lait/composition-et-proprietes-du-lait-de-vache>.
- **DAHOU A, HOMRANI A, BENSALAH F, BEKADA A et MEGHOUFEL N., (2016).** Caractérisation phénotypique et génotypique de deux *Lactobacillus* isolés d'un fromage traditionnel frais type J'ben, *Afrique SCIENCE*, p14 – 22.

- **DE MAN, J.C., ROGOSA, M., SHARPE, M.E. (1960).** A medium for the cultivation of lactobacilli. *J. App. Bacteriol.*, p.130-135.
- **De VUYST L., AVONTS L., MAKRAS E, (2004).** Probiotics, prebiotics and guthealth. In : Remacle C. (Ed.), *FunctionalFoods, Ageing and DegenerativeDisease*. Taylor & Francis : London, p416- 482.
- **DEVOYOD, J.J., POUILLAIN, F., (1988).** Les *leuconostocs*: propriétés, leur rôle en technologie laitière. *Lait*, p249–280.
- **DICKINSON, E., ROLFE, S. E., & DALGLEISH, D. G. (1988).** Competitive adsorption of α 1-casein and β -casein in oil-in-water emulsions. *Food Hydrocolloids*, 2(5), 397–405. [http://doi.org/10.1016/S0268-005X\(88\)80004-3](http://doi.org/10.1016/S0268-005X(88)80004-3).
- **DIDIER D et PROVOST H., (2009),** Bactéries lactiques, *Physiologie, Métabolisme Génomique et applications industrielles*, Economica, 593p.
- **DORTU,C et THONART p.,(2009).** In *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, 13 (1), p. 143-154.
- **DUNG V. NGUYEN1, TUAN Q. NGUYEN2 and Tu H. K. NGUYEN, (2016),***Differentiation of Leuconostocmesenteroides media modifiedwithdifferentsugars*. Faculty of Resources and Environment, Thu Dau Mot University, Vietnam, ISSN : 0975-7384.
- **FAYOLLE L.,(2015).** Le lactose, indicateur de déficit énergétique chez la vache laitière ? Thèse de doctorat : sciences vétérinaires. Campus vétérinaire de Lyon ,141 p.
- **FLORENCE C. L., (2010).** Qualité nutritionnelle du lait de vache et de ses acides gras. Voie d'amélioration par l'alimentation. Thèse de doctorat : Faculté de médecine de Créteil. Créteil, 128 p.
- **FREDOT E., (2005)** Connaissance des aliments-Bases alimentaires et nutritionnelles de la diététique, Tec et Doc, Lavoisier:p10-14.
- **GADDOUR A., NAJARI S., ABDENNEBI M., ARROUM S., ASSADI M., (2014).** Caractérisation physicochimique du lait de chèvre et de vache collectée localement dans les régions arides de la Tunisie. *Options Méditerranéennes : Série A. Séminaires méditerranéens* ; n. 108, p151-154.
- **GELEBART P., (2019),** *Modulation de la texture de gels acides laitiers par addition d'agrégats de protéines laitières*, Thèse de doctorat, université de Nantes,p 250.
- **GORBACH.S.L,(1996)** . The discovery of L. GG. *Nutrition Today*, 2S-4S.
- **GOT R. 1997** Les enzymes du lait. *Ann Nutr Alim*, 25 : A291-A311.

- **Gunter K., Pack. A., Bonaparte C. & Reute G.(1998)**,Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria”.J. food. microbial., Vol 41, pp103-125.
- **GUETOUACH M,(2021)**.Ecologie des bactéries lactiques des produits laitiers fermentés traditionnels et leurs caractérisations biotechnologiques, Thse de doctorat 3eme cycle,Université Abdelhamid ibn badis Mostaganem, faculté des sciences de la nature et de la vie .63p
- **GUIRAUD.(1998)**. Microbiologie alimentaire, Techniques d'analyse microbiologiques, Ed, Dunod.
- **HALM M., LILLIE A., SORENSEN A.K., JAKOBSEN M., (1993)**.Microbiological and aromaticcharacteristics of fermentedmaizedoughs for kenkey production in Ghana. Int. J. Food Microbiol.,19, p135-143.
- **HANSAL, N., 2015**. Isolement, purification, identification et étude des caractéristiques biotechnologiques de *Leuconostocmesenteroides* isolé à partir du lait cru de chèvre. Mémoire en vue de l’obtention d'un diplôme magister en microbiologie fondamentale et appliquée Université d'Oran, p17, 108.
- **JEANTET, R. (2007). CROGUNNEC T., SCHUCK P. et BRULE G.** Science des aliments-technologie des produits alimentaires tec et doc, Lavoisier : 456 p.
- **JEANTET. R. CROYENNEC T. MAHANT M. SCHUCK P. BRULE G. (2008)**. Les produits laitiers (2emeed.): Lavoisier.
- **JOURNAL OFFICIEL DE LA REPUBLIQUE ALGERIENNE n° 69, 27 octobre 1993**, p. 16 à 20
- **KETROUCI, L,(2021)**.Etude physico-chimique et microbiologique du lait de brebis collecté dans différentes régions d’Algérie, détermination de la flore lactique et des caractéristiques technologiques des bactéries lactiques, Thèse de Doctorat en biologie, université de Mostaganem.
- **LABIOUI H, ELMOUALDI L, BENZAKOUR A, EL YACHIOUI M, BERNY E ET OUHSSINE M (2009)**. "Etude physicochimique et microbiologique de laits crus." Bull. Soc. Pharm. Bordeaux p148 : 7-16.
Lacticacidbacteria : *microbiological and functional aspects, fourthedition*, CRC Press, 4° 2d., 798p.
- **LARPENT J.P., (1997)**. Microbiologie alimentaire. Tec & doc, Lavoisier. Paris. p10-72.
- **LARPENT, J. P. (1990)**. Les fermentations alimentaires. In-Microbiologie alimentaire, Technique & Documentation, Lavoisier, p3-17.

- **Mahaut M., Jeantet R., Brulé G., (2011).** Initiation à la technologie fromagère. Technique et documentation Lavoisier, Paris, 194p
- **MAKHLOUF, A. (2018).** Méthodologie pour l'optimisation dynamique multicritère d'un procédé discontinu alimenté : Application à la production bactérienne d'arômes laitiers. Thèse Biotechnologie et Industries Alimentaires. Institut National Polytechnique De Lorraine.
- **MATHIEU J. (1998).** Ecole nationale des industries du lait et des viandes de la Roche-Surforon. Initiation à la physico-chimie du lait. Ed. Tec & Doc : Lavoisier, Paris. p : 12-210. ISBN : 2-7430-0233-6.
- Mazoyer et Marcel, (2002). Larousse agricole, paris, 767p.
- **MECHAI, A.B., (2009).** Isolement, caractérisation et purification de bactériocines produites par des bactéries lactiques autochtones : études physiologiques et biochimiques. Thèse doctorat Biochimie. Université Badji-Mokhtar- Annaba.
- **MEGOUFEL L, (2019).** Etude de la diversité taxinomique et technologique des bactéries lactiques isolées au cours de la production de Jben et approche moléculaire de leurs interactions au microcosme fromager. Thèse de doctorat. Laboratoire des Sciences et Techniques de Production Animale. Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie Domaine : S.N.V .Université de Mostaganem. 56p
- **MESSENS W., DE VUYST L. (2002).** Inhibitory substances produced by *Lactobacilli* isolated from sourdoughs a review. Int. J. Food Microbiol., 72, p31-43.
- **MILLER, M (1982).** Bibliothèque d'image de santé publique (public health Image) des centres pour contrôle et la prévention des maladies avec le numéro d'identification. 1048
- **NAJARI S., (2005).** Caractérisation zootechnique et génétique d'une population caprine. Cas de la population caprine locale des régions arides tunisiennes. Thèse de doctorat d'Etat. Institut National Agronomique, Tunisie, 214 p.
- **PARGUEL G., CARROT O., SAUVE P. (1994).** Variation du point de congélation et principale causes de mouillage du lait de vache. Renc.Rech. Rump 129-132.
- **PERREAU, J.-M. (2014).** Conduire son troupeau de vaches laitières. 2ème ed. Agriproduction France Agricole. France. 405p.
- **POINTURIER, H., (2003).** La gestion matière dans l'industrie laitière, Tec et Doc, Lavoisier, France : 64,388 p.
- **POUGHEON S. (2001).** Contribution à l'étude des variations de la composition du lait et ses conséquences en technologie laitière. Thèse doctorat d'état en médecine vétérinaire, université Paul Sabatier de Toulouse, France.

- **REMEUF F., LENOIR J. AND DUBY C., (1989).** Etude des relations entre les Caractéristiques physico-chimiques des laits de chèvre et leur aptitude à la coagulation par la présure dans le Lait, 69, p 499-518.
- **RIBADEAU-DUMAS, B., & GRAPPIN, R. (1989).** Milk protein analysis. Le Lait, 69(5), 357–416.
- **ROCA-FERNANDEZ A.I.,(2014).** Animal factors condition milk performance and quality of grazing dairy cows Iranian Journal of Applied Animal Science, 4, p1-20.
- **ROCHAT, T., GRATADOUX, J.J., GRUSS, A., CORTHER, G., MAGUIN, E., LANGELLA, P., VAN DE GUCHTE, M., (2006).** Production of a heterologous nonheme catalase by *Lactobacillus casei* : an efficient tool for removal of H₂O₂ and protection of *Lactobacillus bulgaricus* from oxidative stress in milk. Applied and Environmental Microbiology 72, p 5143-5149.
- **ROUSSI H., KAMOUN M., REKIK B., TAYACHI L., HAMMAMI S., HAMMAMI M., (2006).** Etude de la qualité du lait des ovins laitiers en Tunisie. Options Méditerranéennes, 78 : p307- 311.
- **SAIDI N., (2005),** *La Microflore lactique du lait cru local de chèvre : Etudes microbiologique, biochimique et génétique des bactéries lactiques d'intérêt.* Thèse de doctorat, Université d'Oran. 175p
- **SALVADOR D., (2018).** *Étude structurale d'un système d'efflux tripartite bactérien MexAB-OprM impliqué dans la résistance aux antibiotiques chez Pseudomonas aeruginosa.* Thèse de doctorat, université de bordeaux, 233p.
- **SCHMIDT D.G., (1980).** Colloidal aspects of casein. Neth, Milk Dairy J, 34, p. 42 64.
- **SCHOENER, S., & KRAUSE, G.H.(1990).** Protective systems against oxygen species in spinach : response to cold acclimation in excess light, Planta 180(3), p383-389.
- **TAHLAITI, H. (2019).** Etude des propriétés technologiques et inhibitrices de bactéries lactiques isolées à partir de blé fermenté, Thèse de doctorat. Université Abdelhamid ibn badis Mostaganem, faculté des sciences de la nature et de la vie, p23
- **THOMPSON J ET GENTRY -WEEKS C.R, (1994).** Métabolisme des sucres par les bactéries lactiques In : Bactéries lactiques. Aspects fondamentaux et technologies. Volume 1. Chapitre I-6 :.Ed. De-Roissard H. et Luquet F. M. Loria : Uriage, France p239-290.
- **TORMO H., (2010).** Diversité des flores microbiennes des laits crus de chèvre et facteurs de variabilité. Thèse de doctorat. Pathologie, Toxicologie, Génétique et Nutrition. Toulouse : Université de Toulouse, 258p.

- **VIERLING, E., (2003).** Aliment et boisson-Filière et produit, 2ème édition, éditeurs, centre régional de la documentation pédagogique d'Aquitaine, 270 p.
- **VIGNOLA C., (2010).** Sciences et technologie du lait, transformation du lait. Ed 2. Presse polytechnique de Montréal. 608 p.
- **VIGNOLA, C. (2002).** Science et Technologie du Lait Transformation du Lait. Edition Presses Internationales Polytechnique, Canada. p. 3-75.
- **Wilhelm H. Holzapel, Brian Wood,(2013).** *Lactic Acid Bacteria : Biodiversity and Taxonomy*, Wiley-Blackwell, 632 p.
- **WANG L ;Cui YS ; Kwon CS (2011).** Vagococcus acidifermentans sp. nov., isolé d'un bioréacteur de fermentation acidogène de microbiologie systématique et évolutive. *Journal of Applied Microbiology* 111:1123-1126.
- **ZAROUR, K., (2018).** Etude de la diversité phénotypique, génotypique et aptitudes technologiques des souches de *Leuconostoc* isolées localement. Thèse de doctorat en Microbiologie Fondamentale et Appliquée. Uni. D'Oran p16-112.
- **ZERGOUG A (2017).** Effet des probiotiques et bactériocines vis-à-vis des pathogènes responsables des infections urinaires, thèse de doctorat, Université Abdelhamid ibn badis Mostaganem, faculté des sciences de la nature et de la vie, p53.

Annexes

Annexes

Annexe I

Tableau I . Milieu MRS (Man, Rogasa et Sharpe) (pH 6,5)

Peptone	10 g
Extrait de viande	10 g
Extrait de levure	5 g
Glucose	20 g
Tween 80	1 ml
Phosphate bipotassique	2g
Acétate de sodium	5g
Citrate d'ammonium	2g
Sulfate de magnésium	0,2g
Agar	15g
Eau distillée qsp	1000 ml

- Le milieu est stérilisé à 121°C durant 15 min.

Tableau II : Milieu M17 (pH 7,2)

- Le milieu est stérilisé à 121°C durant 15 min.

Tryptone.	2,5g
Peptone pepsique de viande	2,5 g
Peptone papainique de soja	5g
Extrait de levure	2,5g
Extrait de viande	5g
Lactose	5g
Glycérophosphate de sodium	19g
Sulfate de magnésium	0,25g
Acide ascorbique	0,5g
Agar-agar	15g

pH 7 Autoclavage 120°C/ 20 minutes

Annexe II

Tableau III. Bouillon MRS (Man, Rogasa et Sharpe)

Peptone	10 g
Extrait de viande	10 g
Extrait de levure	5 g
Glucose	20 g
Tween 80	1 ml
Phosphate bipotassique	2g
Acétate de sodium	5g
Citrate d'ammonium	2g
Sulfate de magnésium	0,2g
Sulfate de manganèse	0,5g
Eau distillée qsp	1000 ml

- Le milieu est stérilisé à 121°C durant 15 min.(Guiraud, 2003).

La solution NAOH pour le titrage:

Composition.....	g/l
NaOH	40 g
Phénol phtaline (indicateur de couleur : rose)	0,05ml
Alcool	30ml Eau
distillé.....	500ml

