



DEPARTEMENT DES SCIENCES ALIMENTAIRES

MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

Pour l'obtention du diplôme de

Master en Sciences Alimentaires

Spécialité : Production et Transformation Laitière

Présenté par

BOUCHENTOUF Anes & SELLAOUI Oussama

Thème

**Cinétique d'une coagulation lactique d'un lait fromager
par deux souches lactiques acidifiantes :**
Lactococcus lactis subsp diacetylactis et *Lactobacillus acidophilus*

Soutenu le : 11 juin 2024

DEVANT LE JURY

Président	Dr ZABOURI Younes	MCA U. Mostaganem
Encadreur	Dr DAHOU Abdelkader El Amine	MCA U. Mostaganem
Examinatrice	Dr TAHLAITI Hafida	MCA U. Mostaganem

Thème réalisé au Laboratoire de recherche des Sciences et Techniques de Production Animale

ANNEE UNIVERSITAIRE : 2023/2024

REMERCIEMENTS

*Avant tout nous adressons un remerciement à **DIEU** le tout puissant qui nous a donné la force, le courage et la volonté pour réaliser ce travail.*

*A travers ce modeste travail, nos remerciements les plus vifs s'adressent surtout à notre encadreur **Dr DAHOU Abdelkader El Amine**, pour sa disponibilité, générosité, conseils précieux et pour toutes les orientations qui nous a apporté durant notre étude et pour la réalisation de ce projet.*

*Nous remercions les plus vifs s'adressent aussi au président du jury, **Dr ZABOURI Younes** et à l'examinatrice, **Dr TAHLAITI Hafida**, d'avoir accepté d'examiner et d'évaluer notre modeste travail.*

*Nous tenons à exprimer une profonde reconnaissance aux membres du laboratoire de recherche des sciences et techniques de production animale de l'université Abdelhamid Ibn Badis de Mostaganem, surtout à l'ingénieur du laboratoire **M BENHARRAT Noureddine** et au **Doctorant BEKIHAL Amine**, pour leur gentillesse, générosité, disponibilité et leur précieuse aide.*

Notre grande reconnaissance à tous les enseignants du parcours « Production et Transformation Laitière » qui ont participé à notre formation et à notre épanouissement dans cette spécialité.

Enfin, tous ceux et celles qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail trouvent ici notre profonde gratitude.

Dédicaces

A Nos chers parents qui ont été toujours à nos côtés et qui nous ont soutenu tout au long de ces longues d'années d'études. En signe de reconnaissance qu'ils trouvent ici l'expression de notre profonde gratitude pour tout ce qu'ils ont consenti d'efforts et de moyens pour nous voir réussir dans nos études.

A toute notre famille

A nos amis

A tous ceux qui aiment le bon travail et ne reculent pas devant les obstacles de la vie

SELLAOUI et BOUCHENTOUF

Résumé

La présente étude a porté sur la mise en évidence des aptitudes technologiques de deux souches lactiques une mésophile (*Lactococcus*) et l'autre thermophile (*Lactobacillus*). Les souches ont été revivifiées et contrôlées par une re-caractérisation phénotypique par la détermination des caractéristiques morphologiques et physiologiques. Le profil technologique a porté, d'une part sur le suivi de leur pouvoir acidifiant, par la cinétique d'acidification et par le potentiel d'hydrogène développé et d'autre part sur l'activité protéolytique, une étude comparative de la cinétique de coagulation lactique des 02 souches avec une détermination du rendement fromager en culture seule et en association. La souche de *Lactobacillus* présumée à *Lactobacillus acidophilus* est la plus performante avec un pouvoir acidifiant élevé (acidité de 98 °D et un pH de 3,98) par rapport à la souche de *Lactococcus* présumée à *Lactococcus lactis subsp. lactis biovar diacetylactis* avec une acidité 56 °D et un pH de 5,38 qui a atteint. Par leur activité ces souches révèlent de bonnes aptitudes technologiques fromagères. Le *Lactobacillus* est un bon levain lactique pour la fermentation et la coagulation lactique du lait. Le *Lactococcus* avec une cinétique d'acidification faible révèle un profil aromatique d'un grand intérêt à adapter soit pour une technologie fromagère de type pâte fraîche ou de type pâte affinée. La mise en culture mixte révèle un bon rendement fromager avec une association qui peut être utilisée pour la fabrication de caillés fromagers soit de type lactique ou de type mixte.

Mots clés : Profil technologique, Cinétique d'acidification, Coagulation lactique, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, Rendement fromager.

Abstract

The present study focused on the technological aptitudes of two lactic strains, one mesophilic (*Lactococcus*) and the other thermophilic (*Lactobacillus*). The strains were revived and phenotypically re-characterized by determining morphological and physiological characteristics. The technological profile involved monitoring their acidifying power, through acidification kinetics and the hydrogen potential developed, as well as their proteolytic activity, a comparative study of the lactic coagulation kinetics of the 02 strains, and a determination of cheese yield in culture alone and in combination. The *Lactobacillus* strain presumed to be *Lactobacillus acidophilus* performed best, with a high acidifying power (acidity of 98 °D and a pH of 3.98), compared with the *Lactococcus* strain presumed to be *Lactococcus lactis subsp.*

lactis biovar diacetylactis, with an acidity of 56 °D and a pH of 5.38, which reached the same level. The activity of these strains reveals good cheese-making technological aptitudes. *Lactobacillus* is a good lactic leavening agent for milk fermentation and lactic coagulation. *Lactococcus*, with its low acidification kinetics, reveals a highly interesting aromatic profile that can be adapted to either fresh or ripened cheese technology. The mixed culture reveals a good cheese yield with a combination that can be used to produce either lactic or mixed cheese curds.

Key words: Technological profile, Acidification kinetics, Lactic coagulation, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, Cheese yield.

ملخص

ركزت الدراسة الحالية على إبراز القدرات التكنولوجية لسلاطين لبنيتين إحداهما محبة لحرارة متوسطة (*Lactococcus*) والأخرى محبة لحرارة عالية (*Lactobacillus*). تم إحياء السلالات والسيطرة عليها عن طريق إعادة التوصيف المظهري من خلال تحديد الخصائص المورفولوجية والفسولوجية. ركز التعريف التكنولوجي، من ناحية على مراقبة قوتها التحمضية، من خلال حركية التحمض وإمكانات إنتاج الهيدروجين ومن ناحية أخرى على النشاط التحليلي، دراسة مقارنة لحركية التخثر اللبني للسلالات مع تحديد إنتاجية الجبن في السلالة الوحيدة وفي التركيبة المزدوجة. تعتبر سلالة *Lactobacillus* المفترض أنها *Lactobacillus acidophilus* هي الأكثر كفاءة مع قوة تحمض عالية (الحموضة 98 درجة مئوية و pH 3.98) مقارنة بسلالة *Lactococcus* المفترض أنها *Lactococcus subsp. lactis*. لاكتيس بيوفار ثنائي الأسيتيل مع حموضة 56 درجة مئوية و pH 5.38. وتكشف هذه السلالات من خلال نشاطها عن قدرات تكنولوجية جيدة في صنع الجبن. *Lactobacillus* هي خميرة لبنية جيدة للتخمر والتخثر اللبني للحليب. كشفت المكورات اللبنية من سلالة *Lactococcus lactis subsp. lactis biovar diacetylactis* حركية تحمض منخفضة وعن قوة عطرية ذو أهمية كبيرة يمكن تكييفها إما مع نوع عجينة جبينة طازجة أو مع نوع ذو عجينة جبينة ناضجة. كشف التحضير اللبني المختلط عن إنتاجية جيدة من الجبن مع ارتباط يمكن استخدامه لتصنيع خثارة الجبن من النوع اللبني أو من النوع المختلط.

الكلمات المفتاحية: القدرة التكنولوجية، حركية التحمض، التخثر اللبني، *Lactococcus* ، *Lactobacillus* ، محصول الجبن.

Liste des abréviations

BL : bactérie lactique

pH : potentiel d'hydrogène.

°C : Degré Celsius .
basique

pKa : constante d'acidité d'un équilibre acido-

CO₂ : dioxyde de carbone.

St: Streptococcus.

D° : degré d'ornic.

s: Seconde .

En : Enterococcus.

T° : température .

EPS : exopolysaccharides.

µm : micromètre.

EST : Extraie Sec Total.

µl : microlitre

V : volume.

g : gramme.

h : heure .

H₂O₂ : hydroxyde d'hydrogène .

ISO : International Organization for Standardization.

JORA : Journal Officiel de la République Algérienne.

l : litre.

Lb : lactobacille.

Lc : Lactococcus .

LSTPA : Laboratoire des sciences et techniques de production animales.

ml : millilitre.

MRS : Man Rogosa Sharp .

Na Cl : chlorure de sodium.

Na OH : hydroxyde de sodium .

OMS : Organisation mondiale de la santé.

Liste des figures

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

Figure 02 : Histoire de la taxonomie de *Lactococcus lactis* originellement nommée *Bacterium lactis* par Lister en 1878, d'après van Hylckama Vlieg et al. 2006

Figure 03: Voies fermentaires de la dégradation du glucose (Atlan et al., 2008).

Figure 04 : Voie métabolique de la fermentation lactique homofermentaire (Tessier,2007).

Figure 05 : Voie métabolique de la fermentation lactique hétérofermentaire(Tessier,2007).

Figure 06 : Schéma du système protéolytique de *Lactococcus lactis* (Atlan et al., 2008).

Figure 07 : Coagulation acide et enzymatique du lait (Eck et Gillis, 2006)

Figure 08 : Burette de titrage pour la mesure de l'activité acidifiante

Figure 09 : Le Lactoscan

Figure 10 : Observation microscopique de la souche *Lactobacillus acidophilus* après coloration de Gram (G×100).

Figure 11 : Observation microscopique de la souche *Lactococcus lactis subsp diacetylactis* après coloration deGram(G×100).

Figure 12 : Évolution de la numération bactérienne de *Lactobacillus acidophilus*

Figure 13 : Évolution de la numération bactérienne de *Lactococcus lactis subsp diacetylactis*

Figure 14 : Evolution du pH de *Lactococcus lactis subsp diacetylactis* et de *Lactobacillus acidophilus*

Liste des tableaux

Tableau 01 : Caractères généraux des principales bactéries lactiques utilisées en fabrication de laits fermentés (Holzapfel W.H. 2001)

Tableau 02 : Milieu utilisé et conditions d'incubation pour l'isolement des souches

Tableau 03 : Critères morphologiques d'identification des 02 genres des souches lactiques étudiées

Tableau 04 : Résultat de la qualité physico-chimique du lait fromageable préparé

Tableau 05 : Diamètre protéolytique moyen en millimètres pour les souches étudiées après 24 h d'incubation

Tableau 06 : Résultats physico-chimiques du caillé fromager obtenu

Table des Matières

Résumé	
Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Introduction	13

I. Synthèse Bibliographique

Chapitre I : Bactéries lactiques.....	17
I.1. Présentation des bactéries lactiques.....	17
I.2. Habitat et origine des bactéries lactiques.....	17
I.3. Taxonomie des bactéries lactiques.....	17
I.4. Caractéristiques des principaux genres étudiés	17
I.4.1. Le genre <i>Lactobacillus</i>	19
I.4.2. Le genre <i>Lactococcus</i>	20
I.5. Fermentation lactique.....	22
I.5.1. Principales voies fermentaires des bactéries lactiques.	22
I.5.1.1. Voie homofermentaire ou EMP.....	23
I.5.1.2. Voie hétérofermentaire ou voie des pentoses phosphate.	24
I.6. Métabolisme azoté des bactéries lactiques.	25
Chapitre II : Ecosystème fromager et son aptitude à la transformation fromagère des laits.	
I.1. Ecosystème fromager : Les ferments lactiques.	28
I.1.1. Définition des ferments lactiques.	28
I.1.2. Types de ferments lactiques.	28
I.2. Aptitude technologique de la flore lactique.	30

a . Aptitude acidifiante.....	30
b . Aptitude protéolytique.....	30
c. Aptitude lipolytique.....	31
d. Aptitude aromatisante.....	31
e . Aptitude texturante.....	31
f. Activité antimicrobienne.....	31
g. Performance et propriétés.	32
I.3- Impact de la qualité physicochimique des laits sur la transformation fromagère et sur le rendement.....	33
1.3.1 Aptitude à la coagulation du lait.	33
1.3.2 Effet du pH.....	33
1.3.3 Teneur en calcium colloïdal.	34
1.3.4 Teneur en caséines.....	34
1.3.5 Taux d'urée.....	35
1.3.6 Teneur en lactose.....	35
1.4. Coagulation lactique.	35
1.5 Rendement fromager.....	36
1.6 Fromageabilité.....	39
1.6.1 Critères d’aptitude fromagère.	39

PARTIE II : METHODOLOGIE

Chapitre I : Matériel et Méthodes.....	42
1.Lieu et cadre de l’étude.....	42
1.1.Cadre de l’étude.	42

1.2 Lieu et période de l'étude.	42
2. Matière animale.....	42
3. Matériel biologique.....	43
4. Milieu de culture.....	43
5 . Revivification des souches lactiques.	43
6. Vérification de la viabilité des souches.	44
7. Vérification des caractères morphologiques.	44
7.1. Observation macroscopique.....	44
7.2. Observation microscopique.....	44
7.3. Test de production de catalase.	44
8. Etude de quelques aptitudes technologiques des bactéries lactiques.....	45
8.1. La cinétique d'acidification des bactéries lactiques.....	45
8.1.1. Pouvoir acidifiant des bactéries lactiques.	46
8.2. Profil protéolytique.....	46
9. Coagulation lactique et pH isoélectrique.	47
9.1. Analyses physico-chimiques du lait fromageable par lactoscan SP Ultrasonic.....	48
9.2. Coagulation lactique du lait.	49
9.2.1. Préparation du coagulum « caillé lactique ».	49
9.2.2. Détermination du pH isoélectrique.....	50
9.2.3. Analyses physico-chimiques du caillé fromager.....	50
10. Rendement fromager.....	51
Chapitre II : Résultats et discussion.....	52
1. Contrôle de la viabilité des souches lactiques.....	52
2. Examen macroscopique.....	52

3. Examen microscopique.....	52
4. Test catalase.....	53
5. Aptitude technologiques des souches étudiées.	53
5.1. Qualité physico-chimique du lait fromageable.	53
5.2. Résultats de la cinétique de croissance des bactéries lactiques.	54
5.3. Mesure du pH.	54
5.4. Profil protéolytique.	57
5.5.Rendement fromager	62
Conclusion	64
Références bibliographiques.....	65
Annexes.....	68

Introduction

Les bactéries lactiques sont des micro-organismes de catégorie alimentaire qui jouent un rôle essentiel dans la fermentation des matières premières animales et végétales. Elles occupent des niches écologiques extrêmement variées. Leur capacité à fermenter les hydrates de carbone et, à un moindre degré, de dégrader les protéines et les lipides mène à la synthèse d'une large gamme de composés, tels que les acides organiques, les peptides, les composés antimicrobiens et aromatiques et les exo polysaccharides. Ces métabolites peuvent contribuer aux caractéristiques organoleptiques, technologiques et nutritionnelles des aliments fermentés (Anjum et al, 2014).

Les ferments lactiques étaient constitués d'un mélange inconnu, non maîtrisé et variable, de plusieurs souches ou espèces de bactéries. Ils provenaient d'une fermentation naturelle dans le produit considéré. Une partie de ce produit fermenté était conservée, pour ensuite ensemercer les fermentations ultérieures. Actuellement, la production de ferments lactiques s'est développée au sein d'usines spécialisées, à partir de souches bactériennes isolées et sélectionnées (Béal et al., 2008) .

Depuis une dizaine d'années, un intérêt considérable s'est développé autour de l'utilisation de cultures lactiques à effets bénéfiques pour la santé ou « probiotique » (Bifidobacterium, Lactobacillus) pour des applications alimentaires, pharmaceutiques ou encore en alimentation animale. Dans la majorité des cas, les produits laitiers tels les yaourts, laits fermentés, fromages, laits en poudre et crèmes glacées ont été choisis comme véhicules privilégiés des cultures probiotiques (Doleyres et al., 2002).

L'étude de la cinétique de coagulation lactique d'un lait par deux souches lactiques acidifiantes est d'une grande importance dans le domaine de la transformation des produits laitiers. La coagulation lactique est un processus complexe qui joue un rôle clé dans la formation de nombreux produits laitiers tels que les fromages et les yaourts. Comprendre la cinétique de ce processus permet de mieux contrôler la qualité et les caractéristiques des produits finis. Dans cette étude, nous nous concentrerons sur l'effet de deux souches lactiques acidifiantes spécifiques sur la coagulation lactique du lait. En analysant la vitesse et les mécanismes de coagulation, nous espérons apporter de nouvelles connaissances dans ce domaine et contribuer au développement de produits laitiers de haute qualité.

L'objectif de l'étude de la cinétique d'acidification des bactéries lactiques est de comprendre comment ces bactéries produisent de l'acide lactique au fil du temps. Cette information est essentielle dans de nombreux domaines tels que l'industrie alimentaire, la fermentation des produits laitiers et la production de probiotiques. En étudiant la cinétique d'acidification, on peut mieux comprendre les processus métaboliques des bactéries lactiques et optimiser leur utilisation dans diverses applications.

Cette étude a pour objectif de faire la revivification et la re-caractérisation phénotypique d'une bactérie lactique mésophile (*Lactococcus*) et d'une autre thermophile (*Lactobacillus*), d'étudier leurs aptitudes technologiques (cinétique d'acidification, activité protéolytique, aptitude à la coagulation et rendement fromager) en utilisant des laits préparés au niveau du Laboratoire des Sciences et Techniques de Production Animales (LSTPA), de Hassi Mamèche, affilié à l'Université de Mostaganem. L'étude établie a été élaborée comme suit :

- Une première partie relative à la synthèse bibliographique du sujet étudié et qui met l'accent sur la présentation des bactéries lactiques, les caractéristiques des genres étudiés, l'écosystème fromager et son aptitude à la transformation des laits fromagers

- Une deuxième partie reporte la description du protocole expérimental en plusieurs étapes en exposant les techniques utilisées pour la réalisation de ce travail : revivification des souches lactiques et l'étude de quelques aptitudes technologiques (la cinétique d'acidification, pouvoir acidifiant, le profil protéolytique, la coagulation lactique avec des essais des souches en culture seule et en culture mixte, la détermination du rendement fromager). L'expérimentation est suivie d'une interprétation et discussion des résultats obtenus dans cette étude

- Une troisième partie est réservée à la conclusion générale de notre étude réalisée

Partie I :

Synthèse bibliographique

Chapitre I

Bactéries lactiques

Chapitre I : Bactéries lactiques

I.1. Présentation des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques décrites pour la première fois par Orla-Jensen au début du XXe siècle, constituent un groupe hétérogène, qui n'est pas clairement défini du point de vue taxonomique. Elles rassemblent en effet un certain nombre de genres qui se caractérisent par la production, liée à un métabolisme exclusivement fermentaire, de quantités importantes d'acide lactique à partir des sucres. La fermentation est dite : homolactique si l'acide lactique est pratiquement le seul produit formé et hétérolactique si d'autres composés sont aussi présents (acide acétique, éthanol, CO₂ ...etc.) (Leveau et Bouix, 1993 ; Pilet et al., 2005).

Elles sont à Gram positif, généralement immobiles, asporulées, catalase négatives, oxydase négatives généralement nitrate réductase négative, ce sont des bactéries anaérobies facultatives. Elles ont des exigences nutritionnelles complexes pour les acides aminés, les peptides, les vitamines, les sels, les acides gras et les glucides fermentescibles (Dellaglio et al., 1994 ; Hogg, 2005).

I.2. Habitat et origine des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques sont très fréquentes dans la nature. Elles se trouvent généralement associées à des aliments riches en sucres simples. Elles peuvent être isolées du lait, du fromage, de la viande, des végétaux ou des alimentsensemencés par les végétaux. Elles se développent avec la levure dans le vin, la bière et le pain. Quelques espèces colonisent le tube digestif de l'homme et des animaux (Leveau et Bouix, 1993 ; Hassan et Frank, 2001).

I.3. Taxonomie des bactéries lactiques

Depuis la description du *Bacterium lactis* (actuellement *Lactococcus lactis*), la taxonomie des bactéries lactiques est en évolution permanente. Le nombre de nouvelles espèces a augmenté énormément au cours de ces dix dernières années. Les réorganisations effectuées ont contribué à fusionner des espèces en une seule, ou identifier une espèce comme un nouveau genre (Pot, 2008).

La classification des bactéries lactiques peut se faire selon des critères phylogénétiques par l'utilisation des méthodes moléculaires. Cependant, la caractérisation phénotypique biochimique classique demeure pratique dans l'identification préliminaire des

microorganismes. Certaines caractéristiques phénotypiques sont utilisées pour identifier les espèces à l'intérieur des genres comme la capacité à : fermenter les hydrates de carbone, tolérer différentes concentrations en bile, produire des polysaccharides extracellulaires, exiger des facteurs de croissance, produire de l'acétoïne et synthétiser certaines enzymes. La composition en G+C de l'ADN, la composition en acides gras, la mobilité électrophorétique de la lactate déshydrogénase sont également d'autres critères qui peuvent être étudiés pour l'identification des espèces lactiques (Vandamme, 1996 ; Stiles et Holzopfel, 1997 ; Ho et al., 2007).

La morphologie est considérée comme la caractéristique clé pour décrire et classer les genres des bactéries lactiques. De ce fait, les bactéries lactiques peuvent être divisées arbitrairement en bacilles (*Lactobacillus* et *Carnobacterium*) et coques (tous les autres genres). Le genre *Weissella*, récemment décrit, est le seul genre qui comporte à la fois des bacilles et des coques (Collins et al., 1993 ; Ho et al., 2007).

Ce groupe de bactéries lactiques, appartient plusieurs genres comme *Aerococcus*, *Atopobium*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* et *Weissella*. (Stiles et Holzopfel, 1997 ; Pot, 2008).

Des genres nouveaux, par exemple *Alloiococcus*, *Dolosicoccus*, *Dolosigranulum*, *Eremococcus*, *Facklamia*, *Globicatella*, *Helococcus*, *Ignavigranum* et *Lactosphaera*, ont également été décrits, comportant des souches qui montrent des liens physiologiques et phylogénétiques avec les groupe des bactéries lactiques (Broadbent, 2001 ; Axelsson, 2004).

Le genre *Bifidobacterium* est actuellement considéré par plusieurs auteurs comme genre de bactéries lactiques, bien qu'il se distingue par un pourcentage en G+C de 55%, largement supérieur à celui des autres genres et par une voie métabolique de fermentation des sucres particulière.

Les études phylogénétiques basées sur l'analyse des séquences des ARN ribosomiques ont confirmé l'appartenance de ces différents genres à un même groupe qui inclut également *Clostridium*, *Bacillus* et *Propionibacterium* (figure 01) (Stiles et Holzopfel, 1997 ; Pilet et al., 2005).

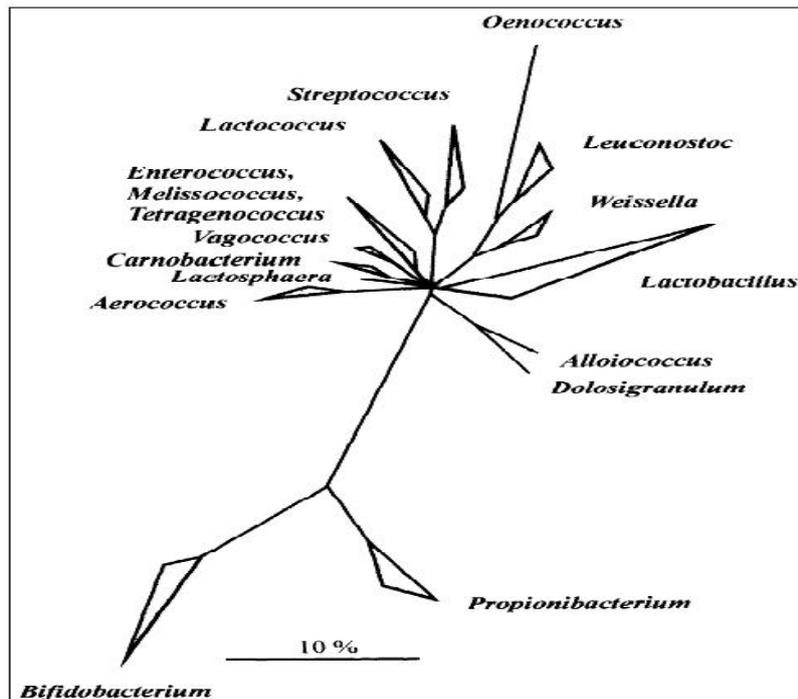


Figure 01 : Arbre phylogénétique des principaux genres de bactéries lactiques et des genres associés, obtenu par analyse des ARNr 16S (Stiles et Holzapfel, 1997).

I.4. Caractéristiques des principaux genres étudiés :

I.4.1. Le genre *Lactobacillus* :

Lactobacillus est le genre principal de la famille des Lactobacillaceae, il contient de nombreuses espèces qui sont des agents de fermentation lactique intervenant dans de nombreuses industries ou qui sont rencontrées comme contaminants. Il s'agit de bacilles longs et fins (parfois incurvés) souvent groupés en chaînes, immobiles, asporulés, catalase négative, se développent à un optimum de température situé entre 30 et 40°C.

Les lactobacilles ont des exigences nutritionnelles très complexes en acides aminés, en vitamines, en acides gras, en nucléotides, en glucides et en minéraux (Khalid et Marth, 1990 ; Leclerc et al., 1994).

Le genre *Lactobacillus* a été subdivisé par Orla-Jensen en trois groupes et cette classification est encore utilisée en milieu industriel (Tamime, 2002 ; Guiraud et Rosec, 2004) :

Groupe I « *Thermobacterium* » : comprend les lactobacilles homofermentaires thermophiles qui se développent à 45°C mais pas à 15°C. Les espèces les plus fréquentes dans l'alimentation (lait, yaourt, fromage) sont *Lb. helveticus*, *Lb. delbrueckii*, *Lb. acidophilus*.

Groupe II « Streptobacterium » : regroupe les lactobacilles homofermentaires mésophiles et peuvent être occasionnellement hétérofermentaires en fonction du substrat. Les espèces les plus fréquentes dans l'alimentation sont *Lb. casei*, *Lb. curvatus*, *Lb. sake* et *Lb. plantarum*.

Groupe III « Betabacterium » : ce sont des lactobacilles hétérofermentaires. Il comporte les espèces *Lb. fermentum*, *Lb. brevis* et *Lb. sanfransisco*.

I.4.2. Le genre Lactococcus :

Le genre *Lactococcus* (streptocoque du groupe N) représente les streptocoques dits « lactique », car ils sont associés à de nombreuses fermentations alimentaires et ne possèdent aucun caractère pathogène. Les produits végétaux constituent leur réservoir principal, mais ils sont largement présents dans le lait et les produits laitiers (Pilet et al., 2005).

Les lactocoques se présentent sous forme de coques en paire ou en chaînes de longueur variable.

Ce sont des bactéries anaérobies facultatives homofermentaires ne produisant que de l'acide lactique L(+), seul *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar. *diacetylactis* produit le diacétyle. Leur température optimale de croissance est proche de 30°C, capable de se développer à 10°C mais pas à 45°C. Quelques espèces produisent des exopolysaccharides et des bactériocines.

Elles sont capables de se développer à 3% de bleu de méthylène et d'hydrolyser l'arginine (Tamime, 2002).

Actuellement, le genre *Lactococcus* comprend cinq espèces, *Lactococcus lactis* est l'espèce la plus connue avec ses trois sous-espèces : *Lc. Lactis* ssp. *lactis*, *Lc. Lactis* ssp. *cremoris* et *Lc. Lactis* ssp. *hordniae* (Corroler, 1999 ; Passerini, 2013).

La taxonomie de *L. lactis* basée sur le phénotype comporte quatre sous-espèces (:

- *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*
 - *L. l. lactis* biovar. *diacetylactis*
- *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, devenu *Lactococcus cremoris* (Orla-Jensen 1919 et Passerini, 2013)
- *Lactococcus lactis* subsp. *hordniae*
- *Lactococcus lactis* subsp. *tructae*, devenu *Lactococcus cremoris* subsp. *tructae* (Hylckama Vlieg et al. 2006)

- **Les sous-espèces**

La sous-espèce *lactis* peut être distinguée par sa plus grande résistance au stress : elle est capable de croître à 40 °C ou en présence de 4 % de NaCl. Elle est de plus capable de produire de l'ammoniac à partir d'arginine. Les souches de la biovar *diacetylactis* sont capables de métaboliser le citrate et de le convertir en diacétyl, un composé aromatique apprécié en fromagerie pour son arôme de beurre.

Les deux sous-espèces L. lactis subsp. lactis et L. lactis subsp. cremoris sont les plus intéressantes pour la production fromagère puisqu'elles entrent dans la composition de la quasi-totalité des levains fromagers. La sous-espèce *lactis* est mieux adaptée à la fabrication des fromages à pâte fraîche ou molle et la sous-espèce *cremoris* pour ceux à pâte pressée. Cette dernière est en outre réputée faire des fromages de meilleure qualité en raison de sa contribution spécifique à la saveur.

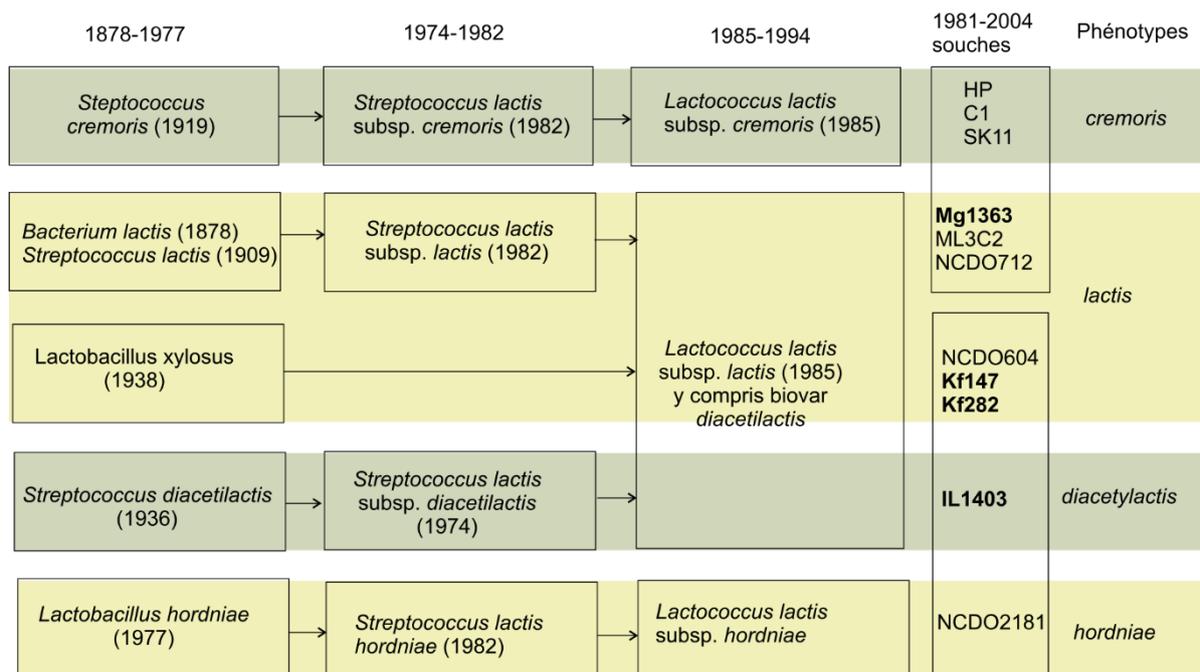


Figure 02 : Histoire de la taxonomie de *Lactococcus lactis* originellement nommée *Bacterium lactis* par Lister en 1878, d'après van Hylckama Vlieg et al. 2006

I.5.Fermentation lactique :

La fermentation est un procédé biologique utilise des sources d'hydrate de carbone et donnée comme résultat l'alcool, l'acide lactique, A acétique, A acétone et co2 pour obtenir des aliments, des boissons ou des produits susceptibles d'améliorer sa condition.(Kandler, 1983).



Tableau 1 : Caractères généraux des principales bactéries lactiques utilisées en fabrication de laits fermentés (Holzapfel W.H. 2001)

Tableau 1 – Caractères généraux des principales bactéries lactiques utilisées en fabrication de laits fermentés			
Bactérie	Type de métabolisme (1)	Forme isomère de l'acide lactique	Température optimale de croissance (°C)
<i>Leuconostoc</i> spp.	Hét	D(-)	18 à 30
<i>Lactococcus lactis</i>	Hom	LI(+)	27 à 32
<i>Streptococcus thermophilus</i>	Hom	LI(+)	39 à 44
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	Hom	D(-)	40 à 46
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Hom	DL	35 à 40
<i>Lactobacillus casei</i>	Hom	LI(+)	35 à 40

(1) Hét : hétérofermentaire ; Hom : homofermentaire.

I.5.1. Principales voies fermentaires des bactéries lactiques :

Toute croissance nécessite la production d'énergie et les bactéries lactiques ne font pas exception à la règle. Hétérotrophes, elles tirent leur énergie de la fermentation de substrats carbonés. Les carbohydrates fermentés en acide lactique par les bactéries lactiques peuvent être des monosaccharides tels que des hexoses (glucose, galactose), des pentoses (xylose, ribose, arabinose), hexitols et pentitols (mannitol, sorbitol, xylitol) ou des disaccarides (lactose, saccharose, cellobiose, tréhalose). La fermentation des sucres s'effectue essentiellement en trois étapes (Atlan et al., 2008)

- le transport du sucre à travers la membrane cellulaire ;
- le catabolisme intracellulaire du sucre ;

- formation et expulsion extracellulaire des métabolites terminaux.

Selon les genres ou espèces, les bactéries lactiques utilisent principalement l'une des deux voies majeures du métabolisme des sucres (figure 02).

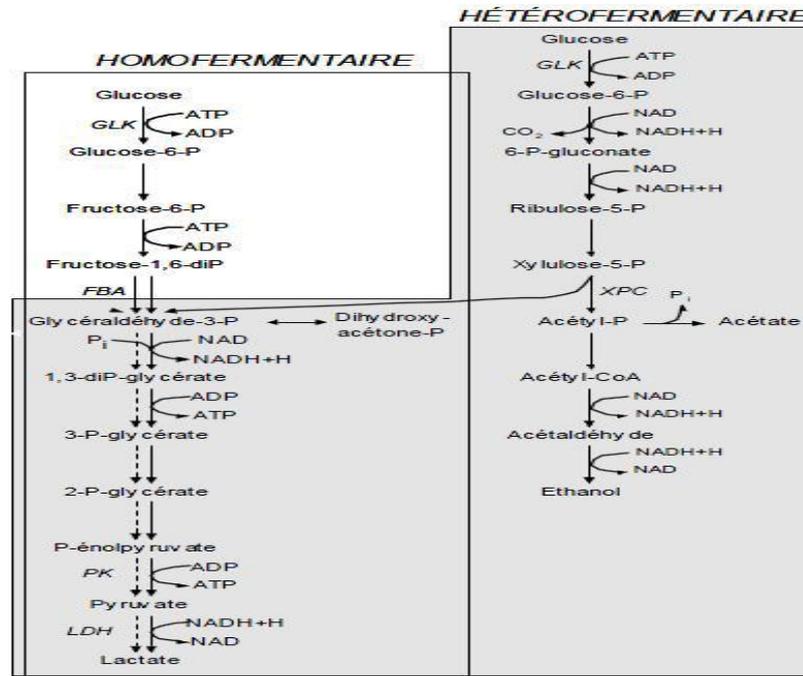


Figure 03 : Voies fermentaires de la dégradation du glucose (Atlan et al., 2008).

[GLK : glucokinase, FBA : fructose-1,6- biphosphate aldolase, XPC : xylulose-5-phosphate phosphocétolase, PK : pyruvate kinase, LDH : lactate déshydrogénase].

Il s'agit des voies homofermentaire (Embden Meyerhof-Parnas, EMP) et hétérofermentaire (voie des pentoses-phosphate) (Atlan et al., 2008).

Voies fermentaires de la dégradation du glucose (Atlan et al., 2008). [GLK : glucokinase, FBA : fructose-1,6- biphosphate aldolase, XPC : xylulose-5-phosphate phosphocétolase, PK : pyruvate kinase, LDH : lactate déshydrogénase].

I.5.1.1. Voie homofermentaire ou EMP

Plus de 90% du lactose fermenté est transformé en acide lactique. Les autres produits apparaissent seulement dans des proportions mineures. Pratiquement toutes les bactéries lactiques utilisées comme cultures acidifiantes appartiennent à ce type. (Mozzi et al., 2010).



Les bactéries lactiques homofermentaires comprennent les espèces de lactocoques, *pediocoque* ainsi que certains lactobacilles. Cette voie 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. La fructose-1,6-bisphosphate aldolase (FBA) est une enzyme clé indispensable au fonctionnement de la voie EMP (Thompson et Gentry-Weeks, 1994).

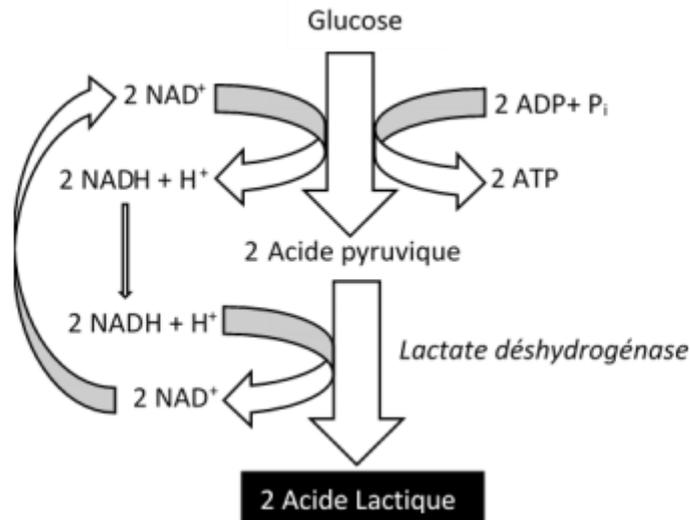


Figure 04 : Voie métabolique de la fermentation lactique homofermentaire (Tessier, 2007).

I.5.1.2. Voie hétérofermentaire ou voie des pentoses phosphate

Au moins 50%, mais pas plus de 90% du lactose fermenté est transformé en acide lactique. Les autres produits issus de cette transformation sont: l'acide acétique, du CO₂ et éventuellement de l'alcool.

Ce type de bactéries lactiques était autrefois employé seulement dans les cultures beurrières, c'est-à-dire pour l'acidification des crèmes et employées lors de la fabrication des fromages à pâte molle et mi-dure car elles peuvent favoriser la formation d'arôme et participer à la création de l'ouverture. (Goy, 2015).

Les groupes principaux de bactéries présentant ce type de métabolisme sont les *Leuconostoc* et certains lactobacilles. Ces microorganismes sont dépourvus d'une FBA et le système de transport PTS (Thompson et Gentry-Weeks, 1994; Hadeif, 2012).

Les bactéries lactiques qui fermentent le glucose en produisant, en plus de l'acide lactique, de l'acétate, de l'éthanol et du CO₂ sont dites hétérofermentaires. Les groupes principaux de

Les peptides sont pris en charge par deux systèmes de transport des oligopeptides (Opp et Opt) pour traverser l'enveloppe bactérienne. Des di et tripeptides peuvent aussi être transportés par deux autres systèmes (DtpT et Opt).

Les acides aminés sont transportés par des systèmes de transport spécifiques. Enfin, dans le cytoplasme bactérien un éventail de peptidases concourent à achever l'hydrolyse des peptides en acides aminés (Savijoki et al., 2006 ; Atlan et al., 2008 ; Picon et al., 2010).

Le catabolisme des acides aminés est une voie majeure de formation de molécules aromatiques (alcool, aldéhydes, acides organiques, ...), comme il peut être une source d'énergie pour certaines bactéries lactiques en cas de limitation en nutriments (Williams et al., 2001) .

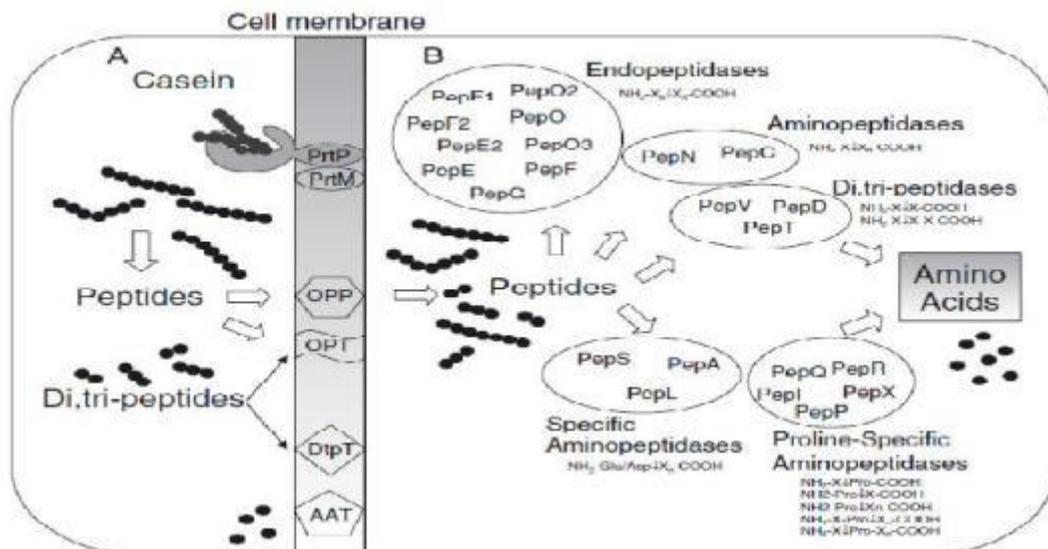


Figure 06 : Schéma du système protéolytique de *Lactococcus lactis* (Atlan et al., 2008).

Chapitre II :
Ecosystème
fromager
et son aptitude à la
transformation
fromagère des laits

Chapitre II : Ecosystème fromager et son aptitude à la transformation fromagère des laits

I.1. Ecosystème fromager : Les ferments lactiques :

I.1.1. Définition des ferments lactiques :

Un ferment est une préparation microbienne d'un grand nombre de cellules, d'un seul microorganisme ou plus, ajoutée à une matière première pour produire un aliment fermenté en accélérant et en orientant son procédé de fermentation. Le groupe des bactéries lactiques occupe un rôle important dans ces processus et une longue histoire d'application. Actuellement, on définit les levains ou ferments lactiques comme étant des cultures pures ou des mélanges de bactéries lactiques Synthèse Bibliographique Bactéries lactiques 10 sélectionnées et utilisées pour la fabrication de produits fermentés comme les yaourts, le kéfir et les fromages (Leroy et De Vuyst, 2004 ; Mäyrä-Mäkinen et Bigret, 2004) .

I.1.2. Types de ferments lactiques

Les ferments lactiques peuvent être classés en se basant sur leur fonction, leur température de croissance, ou leur composition (Carminati et al., 2010).

I.1.2.1. Selon la composition : Selon la fédération internationale de laiterie (1997), les ferments lactiques peuvent être classés en trois catégories (Wouters et al., 2002 ; Monnet et al., 2008):

- Les ferments purs : constitués d'une souche d'une seule espèce bien caractérisée, c'est-à-dire une culture provenant en principe d'une seule cellule bactérienne.
- Les ferments mixtes : ils sont formés d'un mélange de souches en nombre et en proportions indéfinis, ces souches appartiennent aux différents types lysotypiques et ont donc, en général, une bonne activité acidifiante.
- Les ferments mixtes sélectionnés : contiennent plusieurs souches bien définies, issues d'une ou de plusieurs espèces et les proportions entre les souches sont connues et définies selon le cahier des charges de l'utilisateur.

I.1.2.2. Selon la température de croissance Les ferments lactiques sont, selon les productions industrielles à réaliser, des ferments mésophiles et des ferments thermophiles :

- Ferments mésophiles Les bactéries lactiques qui constituent ces ferments ont une température optimale de croissance qui varie selon les souches entre 25°C et 30°C et peuvent atteindre une température maximale de fermentation de 38°C à 40°C.

Ils sont constitués essentiellement des espèces acidifiantes (*Lactococcus lactis ssp. lactis*, *Lc. Lactis ssp. cremoris*) et des espèces aromatisantes (*Lc. Lactis ssp. Lactis biovar. diacetylactis*, *Leuconostoc mesenteroides ssp. cremoris*).

Les ferments mésophiles sont habituellement utilisés dans la fabrication de plusieurs variétés de fromages, en particulier les fromages frais, de certains laits fermentés et du beurre (Chamba, 2008 ; Carminati et al., 2010).

- Ferments thermophiles Ils comprennent les lactobacilles, les bifidobactéries et l'espèce *Streptococcus thermophilus*. Leur température optimale de croissance se situe entre 40°C et 50°C.

Les ferments thermophiles sont souvent utilisés pour la fabrication des yaourts, certains laits fermentés et quelques fromages à pâte cuite tels que l'Emmental et le Gruyère (Mäyrä-Mäkinen et Bigret, 2004 ; Carminati et al., 2010).

I.1.3. Les cultures mixtes des bactéries lactiques

Dans la pratique industrielle, les bactéries lactiques sont très souvent associées, soit entre elles, soit avec d'autres microorganismes (bactéries non lactiques, levures ou moisissures) formant des cultures mixtes où différents types d'interactions peuvent se produire. L'ensemble de ces interactions gouverne la structure des communautés microbiennes et leurs activités.

On les classe en deux catégories : les interactions positives qui se caractérisent par la stimulation d'un ou de plusieurs micro-organismes et les interactions négatives qui correspondent à une inhibition de la croissance et de l'activité métabolique (Cholet, 2006 ; Monnet et al., 2008).

I.1.3.1. Les interactions positives

Quand on parle d'interactions positives, on différencie le commensalisme où l'un des partenaires est stimulé par la production d'une substance essentielle ou par la destruction d'un facteur inhibiteur, du mutualisme où, dans ce cas, l'interaction est bénéfique aux deux partenaires (Cholet, 2006).

I.1.3.2. Les interactions négatives

Il existe divers mécanismes d'inhibition des micro-organismes entre eux. Si l'inhibition intervient par la production de substances inhibitrices et si un seul des deux micro-organismes est inhibé par l'autre, il convient de parler d'amensalisme.

En revanche, si les mécanismes d'inhibition sont réciproques, il s'agit alors d'un phénomène de compétition. Cette compétition peut s'exercer vis-à-vis de l'espace disponible (inhibition de contact) et/ou de la disponibilité en substrats.

L'antagonisme désigne une lutte réciproque des deux populations par la production de molécules inhibitrices, généralement spécifiques (Cholet, 2006 ; Monnet et al., 2008).

I.2. Aptitude technologique de la flore lactique :

a. Aptitude acidifiante :

La fonction acidifiante constitue la propriété métabolique la plus recherchée des bactéries lactiques utilisées dans les industries alimentaires. Elle se manifeste par la production de l'acide lactique à partir de la fermentation des hydrates de carbone au cours de la croissance bactérienne (Mäyrä Mäkinen et Bigret, 2004 ; Monnet et al., 2008).

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

- Accumulation d'acide lactique participant à la saveur des aliments fermentés ; - Abaissement progressif du pH des milieux de culture et des matrices alimentaires ; - Limitation des risques de développement des flores pathogène et d'altération dans les produits finaux ;

- Déstabilisation des micelles de caséines, coagulation des laits et participation à la synérèse.

b . Aptitude protéolytique :

La croissance jusqu'à des densités cellulaires permettant aux bactéries lactiques d'assurer les fonctions de fermentation repose sur un système protéolytique capable de satisfaire tous les besoins en acides aminés en hydrolysant les protéines. Les bactéries lactiques démontrent des potentialités différentes, liées à leur équipement enzymatique, pour l'utilisation de la fraction azotée. Les lactobacilles présentent généralement une activité protéolytique plus prononcée que les lactocoques (Donkor et al., 2007 ; Monnet et al., 2008 ; Roudj et al., 2009).

c. Aptitude lipolytique :

Les propriétés lipolytiques sont généralement faibles chez les bactéries lactiques, les lactocoques sont considérés comme plus lipolytiques que *Streptococcus thermophilus* et les lactobacilles. Elles peuvent cependant présenter un intérêt pour certaines applications fromagères (Béal et al., 2008).

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

d. Aptitude aromatisante

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

e. Aptitude texturante

La capacité des bactéries lactiques à synthétiser des exopolysaccharides (EPS) joue un rôle important pour la consistance et la rhéologie des produits transformés. Les *Lb. Delbrueckii* sp. *Bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus* produisant des EPS sont utilisés dans la fabrication des yaourts, ceci afin d'améliorer la texture, éviter la synérèse et augmenter la viscosité des produits finis. L'utilisation des EPS produits par les souches *Lc. Lactis* sp. *Cremoris* est très prometteuse pour la structure et la viscosité des produits laitiers fermentés (Leroy et De Vuyst, 2004 ; Ho et al., 2007).

f. Activité antimicrobienne

Les bactéries lactiques produisent une variété de composés antimicrobiens qui sont utilisés dans la fermentation et la bioconservation des aliments (Labioui et al., 2005).

Les acides organiques, comme l'acide lactique, l'acide acétique ou l'acide propionique, élaborés lors de la fermentation des glucides, peuvent inhiber des levures, des moisissures et des bactéries. Le peroxyde d'hydrogène produit par les bactéries lactiques s'accumule dans l'environnement et Synthèse Bibliographique Bactéries lactiques 13 peut inhiber certains microorganismes. Les bactéries lactiques hétérofermentaires synthétisent du dioxyde de carbone comme métabolite secondaire. Son accumulation dans le milieu extérieur crée une anaérobiose qui s'avère toxique pour certains microorganismes aérobies présents dans l'aliment. Le diacétyl peut inhiber la croissance des bactéries à Gram négatif, des levures et moisissures (Alakomi et al., 2000 ; Ammor et al., 2006).

Les bactériocines produites par les bactéries lactiques sont des substances antimicrobiennes de poids moléculaire variable. Elles ont une activité inhibitrice dirigée contre les bactéries proches de la souche productrice et leur spectre d'action est généralement étroit.

Les plus connues sont : la nisine, la diplococcine, l'acidophiline et la bulgaricane (Ogunbanwo et al., 2003 ; Dortu et Thonart, 2009). La plupart des bactériocines produites par les bactéries lactiques partagent le même mode d'action, basé sur la formation de pores dans la membrane de la bactérie cible (De Vuyst et Leroy, 2007 ; Kumari et al., 2009).

g. Performance et propriétés :

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

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

I.3- Impact de la qualité physicochimique des laits sur la transformation fromagère et sur le rendement :

La qualité de lait représente une notion complexe parce qu'elle possède plusieurs dimensions telles que la qualité physicochimique et microbiologique ainsi l'aptitude fromagère. La valeur d'un lait peut être jugée par son efficacité à la transformation en fromage. L'aptitude à la coagulation dépend de son pH, sa teneur colloïdale et en caséine, qui jouent un rôle primordial dans la mise en place du gel. Le rendement fromager est fortement corrélé à la teneur en protéine ou caséine et en matière grasse du lait (Laurent et al., 2002).

1.3.1 Aptitude à la coagulation du lait

La coagulation du lait par la présure et/ou par acidification est la première étape de la fabrication d'un fromage qui peut être considéré comme le résultat d'un processus dans lequel la caséine et les matières grasses sont concentrées après élimination du lactosérum. Pour le fromager, le comportement du lait lors de la coagulation joue un rôle important sur le bon déroulement des étapes ultérieures de la fabrication fromagère (Martin et coulon, 1995).

1.3.2 Effet du pH

Le pH initial du lait a un effet déterminant sur la coagulation bien que pour le temps de raffermissement. La maîtrise de la préparation de lait permet de régler le pH qui conditionne la fermenté des gels au moment de moulage (Starry, 1982). En fromagerie, L'abaissement du pH favorise le processus de coagulation (diminution du temps de floculation et formation d'un gel se raffermissant plus rapidement) par deux actions :

- L'activité de la présure sur la caséine k est maximale à $\text{pH} = 5,5$ et est rapidement inactivée lorsque le pH est supérieur à 7,0.
- La stabilité des micelles décroît avec le pH par neutralisation des charges négatives et par libération d'ions calcium, ce qui favorise la réaction d'agrégation (Linden, 1987).

L'acidification du lait entraîne des modifications des propriétés du lait puis de gel.

Elle permet de raccourcir le temps de prise et d'augmenter la vitesse de raffermissement. Elle permet également d'obtenir une fermenté de gel accrue de part une solubilisation du calcium et du phosphore qui deviennent alors disponibles pour créer des liaisons entre les micelles lors de

la phase enzymatique de la coagulation. Si l'intensité de l'acidification est mal gérée, les conséquences sont toujours négatives au niveau de la technologie.

Une acidification excessive entraîne une déminéralisation très forte qui rend le caillé friable. Une acidification insuffisante entraîne une déminéralisation trop faible rend le caillé fragile.

Il est donc nécessaire en premier lieu, l'ajustement du PH et le contrôle des paramètres d'acidification (Delphine, 2005).

1.3.3 Teneur en calcium colloïdal :

Un lait pauvre en calcium coagule difficilement et conduit à un gel mou qui se tient mal et, aussi il est difficile d'agir directement sur ces teneurs dans le lait car, les animaux sont capables de mobiliser leurs réserves corporelles ce qui a pour résultat de maintenir un taux stable de calcium dans le lait. Il peut être ajouté du chlorure de calcium avant emprésurage pour permettre d'obtenir un caillé plus structuré et réduire le temps de floculation. Il est indispensable de rappeler que l'utilisation de chlorure de calcium est interdite pour certaines fabrications sous signe de qualité (Alves D'Oliveira, 2007). D'autre part, l'ajout en excès peut entraîner l'apparition de défaut d'amertume et un goût métallique. L'influence du taux de calcium se manifeste sur le temps de floculation et la fermeté du gel. Le calcium est indispensable à la floculation des micelles. L'aptitude à la coagulation dépend également de la teneur en phosphate de calcium colloïdal. Plus la teneur en phosphate de calcium micellaire sera élevée, plus le gel sera ferme et se prêtera à l'égouttage (Delphine, 2005).

1.3.4 Teneur en caséines :

Le lait contient deux fractions de protéines, la caséine et la protéine du sérum ou protéine sérique. La caséine se compose de 4 composants autonomes: α_1 , α_2 , β et K. La protéine sérique regroupe les «albumines» et les «globulines».

Les caséines ne présentent pas la même sensibilité vis-à-vis du calcium. Les caséines α_1 , α_2 et β s'agrègent en présence de calcium jusqu'à une valeur limite de concentration au-delà de laquelle elles précipitent.

Seule la caséine K ne précipite pas en présence de calcium. Le calcium se lie aux caséines par l'intermédiaire des acides aminés phosphorylés, ainsi deux charges négatives sur les molécules de caséine sont neutralisées par chaque ion calcium lié, ce qui entraîne une diminution des

répulsions électrostatiques entre les caséines (chargées négativement à pH(6,6) et les conduits à s'agréger (Dalgleish, 1982).

La présence à la fois d'interactions électrostatiques et hydrophobes permet aux caséines de former des agrégats colloïdaux (Schmidt, 1982) qui retiennent le calcium et le phosphate. L'augmentation de la teneur en caséine K s'accompagne de la baisse de la taille des micelles et suggère une localisation de cette caséine à la surface des micelles (Goy., Häni et al., 2005).

1.3.5 Taux d'urée

Un excès d'urée dans le lait souvent dû à un excès d'azote dans la ration, engendre des cahiers plus mous et plus humides du fait de la diminution en proportion des caséines romageables (Enil, 2011).

1.3.6 Teneur en lactose

Au cours de traitement de lait à transformer, à température élevée, le lactose participe avec les protéines à des réactions de brunissement non enzymatiques pouvant altérer la couleur et le goût (goût de cuit) des laits pasteurisés et stérilisés et des fromages.

En fromagerie, Le lactose est un sucre fermentescible.

Il est dégradé en acide lactique ce qui provoque un abaissement du pH du lait pouvant entraîner sa coagulation (Enil, 2011, Amiot et al., 2002).

1.4. Coagulation lactique :

La coagulation par voie acide est provoquée par l'acide lactique d'origine bactérienne, qui transforme le lactose en acide lactique.

Le pH du lait de fromagerie diminue avec la production d'acide. Ce qui provoque une solubilisation du phosphate et du calcium colloïdal, un élément important dans la stabilité des micelles de caséine.

Ces dernières vont se lier entre elles et former un gel cassant très friable et peu élastique (Mietton, 1995).

Si l'acidification est rapide par addition d'un acide minéral ou organique, il y a floculation des caséines à pH 4,6 sous la forme d'un précipité plus ou moins granulé dispersé dans le lactosérum. Par contre, une acidification progressive, obtenue soit par fermentation lactique,

soit par hydrolyse de la gluconolactone, conduit à la formation d'un gel lisse homogène qui occupe entièrement le volume initial du lait (Mietton et al., 1994).

La teneur en protéines agit sur la coagulation acide. Un lait riche en protéines formera un caillé lactique plus ferme (Vignola carole , 2002).

La coagulation du lait correspond à une déstabilisation de l'état micellaire originel des caséines du lait.

Cette déstabilisation peut être réalisée de deux manières :

Voie fermentaire à l'aide de bactéries lactiques contenues dans la flore indigène du lait et/ou apportées sous forme de ferments :

Ferments mésophiles :

Les bactéries lactiques qui constituent ces ferments ont une température optimale de croissance qui varie selon les souches entre 25°C et 30°C et peuvent atteindre une température maximale de fermentation de 38°C à 40°C. (Chamba.,2008 ; Carminati et al.,2010).

Ils sont constitués essentiellement des espèces acidifiantes (*Lactococcus lactis ssp. lactis*, *Lc. lactis ssp. cremoris*) et des espèces aromatisantes (*Lc. Lactis ssp. lactis biovar. diacetylactis*, *Leuconostoc mesenteroides ssp. cremoris*). (Chamba.,2008 ; Carminati et al.,2010).

Les ferments mésophiles sont habituellement utilisés dans la fabrication de plusieurs variétés de fromages, en particulier les fromages frais, de certains laits fermentés et du beurre (Chamba.,2008 ; Carminati et al.,2010).

Ferments thermophiles :

Ils comprennent les lactobacilles, les bifidobactéries et l'espèce *Streptococcus thermophilus*. Leur température optimale de croissance se situe entre 40°C et 50°C. Les ferments thermophiles sont souvent utilisés pour la fabrication des yaourts, certains laits fermentés et quelques fromages à pâte cuite tels que l'Emmental et le Gruyère (Mayra Makinen et Bigret., 2004 ; Carminati et al.,2010).

Voie enzymatique à l'aide d'enzymes coagulantes, en particulier la présure. Les mécanismes d'action impliqués lors de la coagulation par voie fermentaire ou enzymatique sont très différents au niveau de la micelle de caséine

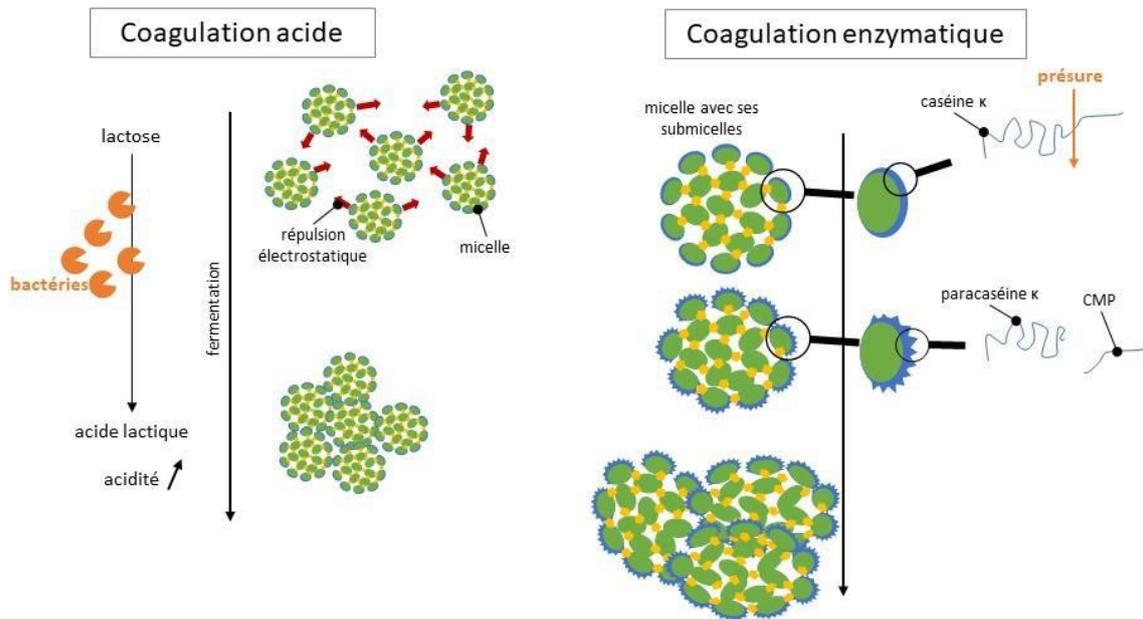


Figure 07 : Coagulation acide et enzymatique du lait (Eck et Gillis, 2006)

1.5 Rendement fromager

Les rendements fromagers correspondent à la quantité de fromage que L'on peut obtenir avec une quantité fixée de lait.

Ils varient principalement en fonction de la quantité d'eau retenue dans le fromage, définie par les paramètres technologiques et de la teneur du lait en protéines et en matières grasses (Goy, Häni et al., 2005).

Toute augmentation du taux protéiques est favorable aux rendements plus précisément, la teneur en caséine. En pratique, la mesure du taux protéique du lait chez des animaux indemnes de mammites, reste un bon indicateur du taux de caséine, donc la surveillance de rendement commence par la maîtrise de taux protéique. Le rendement augmente aussi avec la teneur en matière grasse mais de façon beaucoup moins importante que la teneur en protéine.

En effet, la caséine quand elle coagule forme un réseau protéique qui emprisonne les autres constituants et en particulier la matière grasse présente sous forme de globules gras.

Par contre, une trop forte teneur en matière grasse peut entraîner des problèmes d'égouttage et de coagulation (Bank et al., 1984).

Un caillé insuffisamment acidifié ou emprésuré trop tôt, risque d'avoir des micelles très minéralisées il contient moins d'eau car le calcium et le phosphore occupent les sites de fixation de l'eau. Il y a donc plus de lactosérum égoutté (Delphine, 2005).

Le rendement en fromage (RF) est la quantité de fromage obtenue à partir de 100 kg de lait.

Dans l'industrie laitière, il est important de prévoir le (RF) des productions pour prévoir les matériaux, la main-d'œuvre et l'équipement qui seront utilisés dans l'élaboration ; il permet également le calcul de la rentabilité du processus de fabrication (Veisseyre ,1980).

Il est important d'avoir une formule qui vous permet de calculer un rendement théorique du fromage aussi proche que possible pour corriger les écarts par rapport au processus et sélectionner le lait qui assure de bons rendements.

Le rendement du fromage a été étudié pendant plus d'un siècle par plusieurs chercheurs (Jakob et Hänni 2004 ; Pouliot, et al., 2002).

Plusieurs auteurs ont décrit différentes formules pour prédire le QR en tenant compte de la composition du lait.

Il existe différents types d'équations qui utilisent la composition du lait (réactif principal) en utilisant un ou plusieurs paramètres:

Les teneurs sont exprimées en % :

Teneur en protéines (PT) ou de la caséine (C), de matières grasses (MG), les matières solides(TS) et de solides non gras (SNG); ainsi que la teneur en humidité (H), le sel et la graisse du fromage (FIL 2018).

Il n'y a pas de façon unique de prédire la performance du fromage en fonction de la composition du lait et de la composition du fromage et des modèles théoriques et empiriques et de leurs formules correspondantes ont été développés. Le modèle théorique utilisé (Goudédranche et al., 2008) bien qu'il existe d'autres formules plus complexes (Jakob et Hänni 2004 ; Lucey Lee,2010 ; St-Gelais, Tirard-Collet ,2002).

Certaines des formules sont d'application générale, tandis que d'autres ont été développées pour des fromages spécifiques.

1.6 Fromageabilité

1.6.1 Critères d'aptitude fromagère :

Les critères de la fromageabilité sont comme suit :

- comportement à la coagulation
- temps de raffermissement et fermeté du caillé
- influence sur la texture du fromage.

Ces critères sont influencés par :

- Le taux butyreux pour un produit final à 45% de MG :

il en faut un minimum pour le goût, la flaveur (odeur + texture).

L'affinage fait surtout travailler ces molécules.

- Le taux de caséines dans le TP :

Il est à noter quand la concentration en caséines du lait augmente, le rendement fromager augmente. Cette augmentation de rendement s'explique par un caillage plus rapide et la formation d'un gel plus ferme qui retient ainsi plus de particules (matière grasse et sels minéraux). En général, le taux de caséines est proportionnel au TP (Jakob, et Hänni, 2004).

Ce taux de caséines est très influencé par le taux cellulaire : une réaction mammaire à une infection entraîne une protéolyse (destruction des chaînes de caséines) qui fait chuter très fortement l'aptitude du lait à coaguler.

· Type de caséines : il y en a 3

1. AlphaS1-caséine : non favorable à la fermeté du gel mais ramollit la pâte lors de l'affinage.
2. Beta-caséine : favorable à la fermeté du gel
3. Kappa-caséine : favorable à la coagulation et au gel

L'extrait sec

L'extrait sec ou la matière sèche du lait caillé désigne tous ses constituants autres que l'eau.

Il doit être au moins égal à l'extrait sec d'un lait normal. La teneur en matière sèche du lait caillé est augmentée par les opérations de poudrage, de sucrage ou de concentration du lait par évaporation (Jakob et Hänni ,2004 ; Ouali ,2002).

pH

Le pH du lait frais normal est de l'ordre de 6,7. Cette valeur est due en grande partie au groupement basique ionisable et acide dissociables des protéines, aux groupements esters phosphoriques des caséines et aux acides phosphoriques citriques (Mathieu, 1998).

PARTIE II : METHODOLOGIE

Chapitre I : Matériel et Méthodes

1. Lieu et cadre de l'étude

1.1. Cadre de l'étude

Cette étude a pour objectif d'étudier les profils technologiques de deux souches lactiques sur les aspects suivants :

- Cinétique d'acidification,
- Cinétique du potentiel hydrogène
- Profil de l'activité protéolytique
- Adaptation technologique pour une utilisation en transformation fromagère sur un lait fromager préparé par :
 - La caractérisation de leur activité métabolique : de la fermentation à la coagulation lactique,
 - Le calcul du rendement fromager en culture simple et en culture mixte.

1.2 Lieu et période de l'étude :

Réalisation de l'étude au Laboratoire de Recherche en Sciences et Techniques de Production Animale, Ferme Expérimentale, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Abdelhamid Ibn Badis de Mostaganem, durant la période allant de 24 février 2024 au 10 mai 2024.

2. Matière animale :

La matière animale est essentiellement du lait en poudre écrémé reconstitué de qualité fromageable (voir fiche technique en annexe), avec une teneur en matière sèche de 12% et une teneur en protéines de 3,2%. Ce lait préparé n'a montré aucune viabilité cellulaire après une double pasteurisation, l'une en LTLT (Low Temperature Long Time) et l'autre en HTST (High Temperature Short Time), et un stockage réfrigéré à 4°C.

L'utilité de la double pasteurisation est d'éviter la viabilité de toute cellule microbienne, ainsi que toute activité enzymatique et donc toute interaction avec les BL testées. Le premier traitement modéré (à 75°C avec un traitement thermique de 20 secondes) a permis de détruire tous les microorganismes pathogènes et de réduire la flore totale, avec la présence d'une flore fongique thermorésistante. Le deuxième traitement complémentaire (flash à 95°C avec un chambrage de 5 secondes) a permis d'éliminer complètement la flore fongique persistante dans le lait expérimental.

3. Matériel biologique :

L'origine des deux bactéries lactiques, *Lactobacillus acidophilus* et *Lactococcus lactis subsp diacetylactis*, est un isolement précédemment établi à partir d'un fromage frais local "J'ben" provenant des régions steppiques de l'ouest de l'Algérie. Pour confirmer leur pureté, les 02 souches ont été identifiées phénotypiquement à l'aide des galeries API de bioMérieux à Marcy-l'Etoile, France, en utilisant la référence API 50 CHL version 5.2. Outre 70% de lait écrémé, le milieu de conservation des souches contenait des ingrédients microbiologiques provenant de l'Institut Pasteur d'Alger, Algérie, composés de 0,05% d'extrait de levure, 0,05% de glucose et 30% de glycérol.

4. Milieu de culture

Le milieu de culture utilisé dans cette étude pour la croissance des souches lactiques est le milieu MRS (De Man Rogosa et al.,1960) (Voir annexe)

Tableau 02 : Milieu utilisé et conditions d'incubation pour l'isolement des souches

Micro-organismes	Milieux d'isolement	Température °C	Durée	Incubation
Lactocoques	MRS pH = 6,5	30 et 37	72 heures	Aérobiose
Lactobacilles	MRS pH = 5,5	37 et 45	72 heures	Anaérobiose

5. Revivification des souches lactiques

Technique

Les cultures bactériennes récupérées de la congélation ont été décongelées à température ambiante. Il a été établi ce qui suit pour les utiliser.

-Agitation pendant 10 secondes des flacons décongelés contenant les souches

-Prélevement de 1 ml des souches étudiées à l'aide d'une pipette graduée stérile.

-Introduction aseptique du volume prélevé dans un tube contenant 9 ml de bouillon MRS.

Une incubation a été établie à 30 et à 37°C pendant 72 heures et une viabilité cellulaire des bactéries lactiques a été estimée par un spectrophotomètre UV avec une DO mesurée conforme à 620 nm.

6. Vérification de la viabilité des souches

Les souches lactiques revivifiées ont été vérifiées par ensemencement sur gélose MRS et incubées à 30°C pendant 48 à 72 heures pour la souche mésophile et à 37°C pendant 48 heures pour la souche thermophile. Cette opération a permis de confirmer la viabilité des souches lactiques.

7. Etude de caractères morphologiques

7.1. Observation macroscopique

En se basant sur l'observation à l'œil nu des colonies de *Lactococcus* et de *Lactobacillus* afin de déterminer l'aspect, la taille, la forme des colonies des cultures bactériennes obtenues sur gélose MRS.

7.2. Observation microscopique

L'examen microscopique a été effectué après coloration de Gram établie sur une culture, Elle permet de décrire la forme des cellules, leur mode d'association, après réalisation des frottis colorés.

7.3. Test de production de catalase

La catalase est une enzyme respiratoire capable de dégrader l'eau oxygénée (H₂O₂) en eau et O₂ selon la réaction suivante : 2 H₂O₂ Test de la catalase 2 H₂O + O₂



Sur une lame et à l'aide d'une pipette pasteur, on dépose une colonie bactérienne à laquelle on ajoute de l'eau oxygénée H₂O₂ (à 10 volumes).

La présence d'une catalase est révélée par l'apparition immédiate de bulle de gaz qui correspondent à l'oxygène dégagé (Badis et al., 2005).

8. Etude de quelques aptitudes technologiques des bactéries lactiques

8.1. La cinétique d'acidification des bactéries lactiques

L'acidification du lait est essentiellement due à la production d'acide lactique qui est plus ou moins importante selon la souche lactique. Ce caractère est très recherché en industrie laitière ; il dépend de l'aptitude de la souche à fermenter le lactose et à résister, à l'acidité du milieu (Dahou et al., 2015).

Méthode

Les souches étudiées indépendamment sont les suivantes : Une souche lactique mésophile « *Lactococcus* » et une autre thermophile « *Lactobacillus* ».

Chaque souche lactique pour le contrôle de sa viabilité a étéensemencée d'abord sur MRS liquide et incubée à température de croissance optimale.

1- Pour la souche *Lactococcus* à 30°C pendant 48 heures.

2- Pour la souche *Lactobacillus* à 37°C pendant 72 heures. Après 48 heures un trouble de croissance a été observé sur les milieux MRS des 02 cultures. 1ml de la culture mésophile et de la culture thermophile a été ajouté séparément dans un tube contenant 10 ml de lait préparé. Le tube contenant la culture mésophile a été incubé à 30°C, celui contenant la thermophile a été incubé à 37°C pendant 24h. Après fermentation 3 ml de chaque levain obtenu mésophile et thermophile a été additionné dans 02 flacons séparés contenant 100 ml de lait préparé. Une incubation a été établie à 30°C pour la préparation mésophile pendant 24h et une autre à 37°C pour la préparation thermophile. Ces préparations ont été faites dans le but de déceler d'une part la croissance bactérienne et d'autre part la cinétique d'acidification (acidité et pH).

8.1.1. Pouvoir acidifiant des bactéries lactiques

Dans le lait et les produits laitiers, l'acide lactique provient de la dégradation du lactose par les bactéries. Plus un lait est frais, moins il contient d'acide lactique. La concentration en acide lactique dans un lait s'exprime en degré Dornie (°D) : 1 °D correspond à 0.1 g d'acide lactique par litre de lait.

Un lait frais contient de 15 à 18°D, il caille à 60-70°D (IDF, 2018 ; Ketrouti et al., 2021 ; Leroy, et De Vuyst, 2004).

La mesure de l'activité acidifiante consiste à suivre d'une part l'évolution du pH des différentes cultures en fonction du temps et d'autre part à doser simultanément l'acidité totale par la soude. On commence par la répartition du lait écrémé dans des flacons stériles ensemencé à raison de (V/ 100V). Après incubation à 30 et à 37°C, et à un intervalle de temps de 2h, 4h, 6h, 8h et 24h ; 10ml du lait sont prélevés stérilement puis titrer par la soude Dornic (N/9) en ajoutant préalablement 2 à 3 gouttes de phénolphtaléine à 1% (alcool), jusqu'au virage de la couleur au rose pâle persistante au moins 10 secondes.

L'acidité est déterminée par la formule : Acidité (°D) = $V_{NaOH} \times 10$

Où :

V_{NaOH} : Volume de NaOH utilisé pour titrer l'acide lactique contenu dans les 10ml de lait.

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

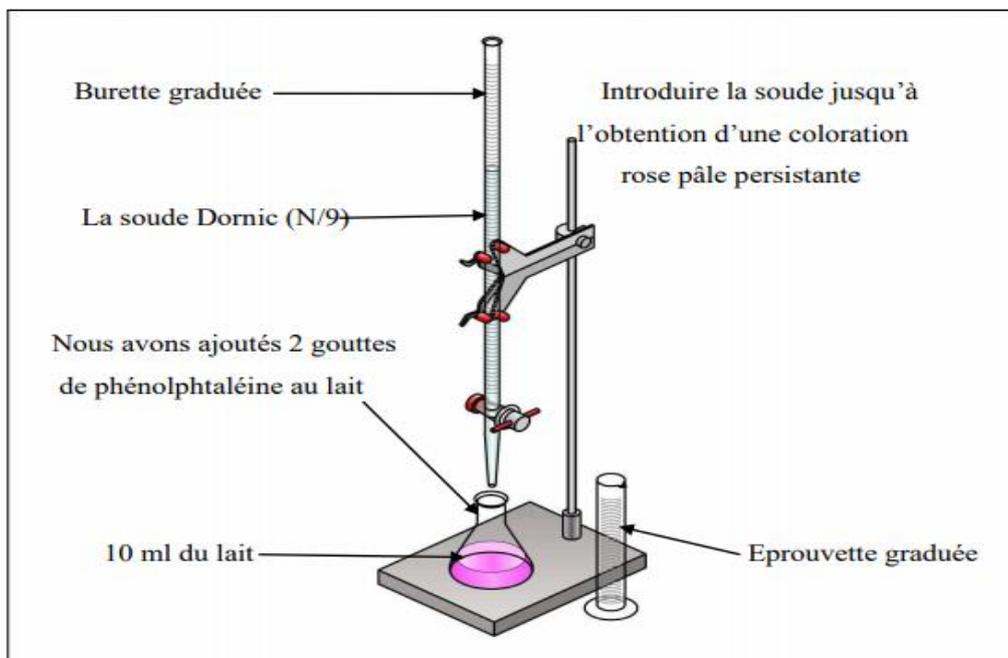


Figure 08 : Burette de titrage pour la mesure de l'activité acidifiante

8.2. Profil protéolytique

Pour déterminer l'activité protéolytique des bactéries lactiques, la gélose MRS additionnée de lait écrémé à 10% sera coulée, solidifiée et séchée puis des disques de papier Wattman stérile seront déposés en surface de la gélose. Chaque disque recevra un volume de 1, 2,5 et 5 µl d'une culture jeune. Après une incubation à 37°C pendant 24h, la protéolyse se révélera par des zones claires autour des disques (**Veuillemard, 1986**).

9. Coagulation lactique et pH isoélectrique

Préparation de lait reconstitué fromageable à l'aide d'une poudre de lait low-heat partiellement écrémé

Pour la préparation du lait reconstitué, il a été établi ce qui suit : On chauffe l'eau à 40°C et on laisse réhydrater la poudre de lait mélangée cela va permettre une meilleure dissolution et une meilleure homogénéisation.

Le dosage utilisé est comme suit :

- 120 g du lait en poudre dans 880ml d'eau traitée.
- Une double pasteurisation, l'une en LTLT à 75°C (Low Temperature Long Time) et l'autre en HTST à 95°C (High Temperature Short Time), et un stockage réfrigéré à 4°C.

Une réfrigération et une conservation pendant 10 heures pour une bonne hydratation des micelles de caséines.

9.1. Analyses physico-chimiques du lait fromageable par lactoscan SP Ultrasonic

Le lactoscan est un analyseur moderne qui fonctionne grâce à la technologie à ultrasons qu'il utilise, C'est un analyseur automatiquement calibré.



Figure 09 : Le Lactoscan

Le lactoscan permet de réaliser les analyses physico-chimiques nécessaires à notre étude :

F : Matière grasse

M : Matière minérale

S : Matière sèche

P : Protéines

pH : Potentiel hydrogène

L : Lactose

Méthode d'utilisation

Pour faire une analyse physico-chimique : la sonde du lactoscan prélève 10 ml d'une prise d'échantillon du lait à analyser.

Expression des résultats

Les résultats de l'analyse sont affichés dans les 60 secondes sur l'écran, mais peuvent être imprimés sur papier à l'aide d'une imprimante intégrée.

9.2. Coagulation lactique du lait

Le principe de la coagulation lactique est le changement d'état du lait de liquide à demi solide qui est appelé gel ou coagulum. Le produit se sépare alors en deux phases : le lactosérum et le coagulum. Le lait possède des caséines (protéines insolubles) responsables de la coagulation lactique.

Coagulation acide ou lactique se fait grâce à un élément chargé positivement, contenant des ions H⁺, ainsi les charges négatives des caséines sont neutralisées. L'acide va déshydrater la micelle, ces micelles vont donc se rapprocher. Elles se soudent entre elles avec des liaisons fortes et irréversibles. Ces liaisons sont le résultat d'interactions hydrophobes contenant dans ce réseau des globules gras, des micro-organismes, des vitamines, du calcium, etc...On obtient un gel grâce à ces interactions. On note également que le sel diminue les répulsions électrostatiques. Les particules peuvent donc entrer en contact, ce qui donne lieu à la floculation, et au mieux à la coagulation. La floculation est un rassemblement sous forme de petits flocons des particules d'une suspension colloïdale. Ce sont donc dans notre cas le rassemblement des micelles de caséine.

Caractéristiques de coagulation : La coagulation du lait se caractérise par sa coagulation totale qui est déterminée par le fromager après un temps de raffermissement en obtenant une coupe franche du caillé au tranchage manuel.

9.2.1. Préparation du coagulum « caillé lactique »

Pour la préparation du coagulum, on a établi la démarche suivante : Dans un flacon contenant 100 ml de lait préparé on a ajouté 2.5 ml de la culture mésophile. La même démarche a été établie pour la culture thermophile. L'incubation a été à 30°C pour la préparation mésophile et à 37°C pour la préparation thermophile pendant 24 heures.

9.2.2. Détermination du pH isoélectrique

L'incubation établie pour la préparation du coagulum nous a permis aussi de déterminer les pH à différents temps technologiques allant de la fermentation à la coagulation lactique et en déterminant le pH isoélectrique nécessaire au raffermissement du lait soit à sa coagulation totale. Ce suivi du pH et de l'acidité a été établi chaque 02 heures.

9.2.3. Analyses physico-chimiques du caillé fromager

Le potentiel d'hydrogène

Le pH est une mesure de l'activité chimique des ions hydrogène. La mesure de pH est réalisée à l'aide d'un pH mètre avec sonde à fromage de type HANNA® HI2210.

Teneur en matière grasse

La teneur de la matière grasse a été déterminée par la méthode acido-butyrométrique de Gerber (Afnor, 1993). Cette méthode consiste à attaquer l'échantillon du caillé fromager à tester, dans un butyromètre à fromage GERBER, par l'acide sulfurique puis récupérer la matière grasse obtenu par centrifugation en présence d'alcool iso amylique (Afnor, 2001).

Teneur en azote total (matière protéique)

La teneur en azote total est déterminée par la méthode de Kjeldahl. Celle-ci consiste en la minéralisation de l'échantillon du caillé fromager par chauffage en présence d'un mélange d'acide sulfurique concentré, de sulfate de potassium et de sulfate de cuivre, pour convertir l'azote organique de l'échantillon en sulfate d'ammonium. De la soude est ensuite ajoutée au produit de la réaction pour libérer de l'ammoniac, qui est titré avec une solution d'acide chlorhydrique en présence d'acide borique.

Teneur en eau et en matière sèche

La teneur en eau et en matière sèche (extrait sec total) est déterminée comme suit : premièrement par évaporation au bain marie à 70°C puis par dessiccation de l'échantillon (10 g de caillé fromager) pendant 3 heures dans une étuve à $103 \pm 2^\circ\text{C}$ (Afnor, 1980).

Teneur en lactose

Le lactose est déterminé par spectrophotométrie. 1 g de caillé fromager est dissout, après broyage, dans 1 ml d'eau phénolée et 5 ml d'acide sulfurique et le tout est homogénéisé mécaniquement sur vortex (Cadillac) puis porté à ébullition pendant cinq petites minutes. L'absorbance est lue à 490 nm par rapport à un témoin préparé avec de l'eau distillée. Une courbe standard est réalisée à partir d'une solution mère contenant 1 g/l de lactose (Afnor, 1993).

10. Rendement fromager

Le rendement est généralement exprimé en kg de fromage obtenu à partir de 100 litres de lait.

Détermination du Rendement en extrait sec total (EST)

Cette méthode consiste à une évaporation de l'eau de la prise d'essai dans une étuve (Memmert) à une température de 103°C et la pesée du résidu, selon la méthode (F.I.L, 2018).

Dans une capsule métallique préalablement séchée, on prend 10g du caillé lactique issu de la culture mésophile et de on le dessèche dans une étuve pendant 3 heures à 103°C. La même démarche est établie pour le caillé lactique issu de la culture thermophile. Après dessiccation, une pesée est effectuée pour pouvoir déterminer l'EST du caillé issu de chaque culture.

L'extrait sec total est déterminé en utilisant la formule suivante :

C0 : poids de la capsule (g).

C1 : poids de la prise d'essai avant dessiccation (g).

C2 : poids de la prise d'essai après dessiccation (g).

$$\text{EST \%} = \frac{\text{C2} - \text{C0}}{\text{C1} - \text{C0}} \times 100$$

Chapitre II : Résultats et discussion

1. Contrôle des souches lactiques

Après revivification des 02 souches lactiques et leur culture sur de la gélose MRS, une observation macroscopique et microscopique a été établie avec une confirmation de leur appartenance aux bactéries lactiques par le test de catalase et de coloration de Gram.

2. Examen macroscopique

L'observation à l'œil nu des cultures sur gélose MRS a révélé des colonies visibles, de tailles similaires pour chaque genre (environ 0,5 mm de diamètre pour *Lactobacillus* et 1,5 mm de diamètre pour *Lactococcus*) de petites tailles lenticulaires transparentes pour les lactobacilles et blanches et rondes pour les lactocoques. Le test de catalase négatif confirme que nos 02 souches sont des bactéries lactiques.

Tableau 03 : Critères morphologiques d'identification des 02 genres des souches lactiques étudiées

Macro-morphologie	Micro-morphologie	Température °C	Groupes
Colonies blanches rondes	Coccis diplocoques et en chaînettes	25 à 37	Lactocoques
Petites colonies blanches rondes ou lenticulaires	Petits bâtonnets Et en chaînettes	37 à 45	Lactobacilles

3. Examen microscopique

La caractérisation microscopique après une coloration de Gram a donné une coloration de Gram positif, des bactéries de forme cocci ovoïde pour les lactocoques et de forme en petits bâtonnets séparés et en chaînettes pour les lactobacilles (**voir figure et figure**). Cette description confirme les résultats donnés par **Dahou et al., 2017** .

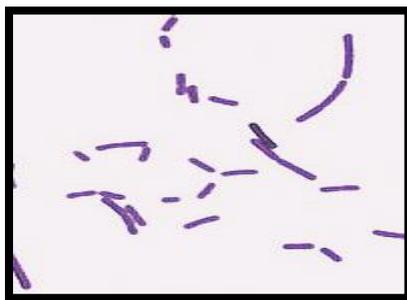


Figure 10 : Observation microscopique de la souche *Lactobacillus acidophilus* après coloration de Gram (G \times 100).

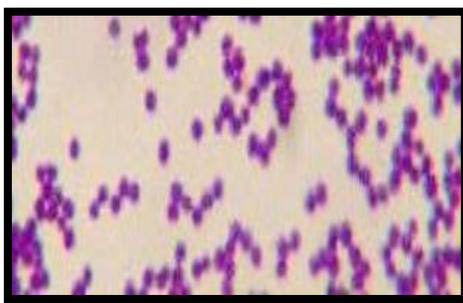


Figure 11 : Observation microscopique de la souche *Lactococcus lactis subsp diacetylactis* après coloration de Gram (G \times 100).

4. Test catalase

Les 02 souches examinées ont présenté une catalase négative (absence de bulles gazeuses).

5. Aptitude technologiques des souches étudiées :

5.1. Qualité physico-chimique du lait fromageable :

Tableau 04 : Résultat de la qualité physico-chimique du lait fromageable préparé

Désignation	R1	R2	R3	R4	R5	Moyenne
PH	6,72	6,74	6,71	6,73	6,71	6,72
Matière protéique %	3,19	3,21	3,19	3,20	3,20	3,20
Matière grasse %	0,30	0,28	0,28	0,28	0,29	0,29
Lactose %	4,77	4,77	4,78	4,77	4,78	4,77
Extrait sec total %	11,98	11,97	11,98	11,97	11,98	11,98
Matière minérale %	1,88	1,90	1,90	1,89	1,90	1,89
Teneur en eau %	91,20	91,18	91,19	91,20	91,18	91,19

La moyenne des résultats de la qualité physico-chimique du lait préparé démontre sa qualité selon les critères définis par la fédération internationale du lait (FIL, 2018). Les premiers critères retenus sont sa richesse en matière protéique (3,1 à 3,4%), en lactose (4,4 à 5,1%) et en extrait sec total (11,5 à 12,5%). Nos résultats ont donné un taux de 3,2% en MP, un taux de 4,77% en lactose et un extrait sec total de 11,98%.

5.2. Résultats de la cinétique de croissance des bactéries lactiques :

En suivant l'évolution du nombre de bactéries et du pH en fonction du temps, les résultats obtenus sont présentés dans les figures 12 et 13.

La notion de norme de croissance bactérienne recouvre deux aspects : la croissance des cellules bactériennes (taille, masse, volume) et le phénomène de division cellulaire (population). De plus, cette croissance induit une série de réactions métaboliques conduisant à la production de biomasse cellulaire. La durée de croissance est normative (visible sur les figures et en UFC/ml), \leq à 19 h pour la souche thermophile avec un pic de multiplication des cellules bactériennes à 18 h et \leq à 15 h pour la souche mésophile. Cette cinétique conduit à la production d'un caillé lactique, visiblement défini par l'augmentation de la biomasse lactique dans le coagulum lactique produit et la synérèse contrôlée du lactosérum.

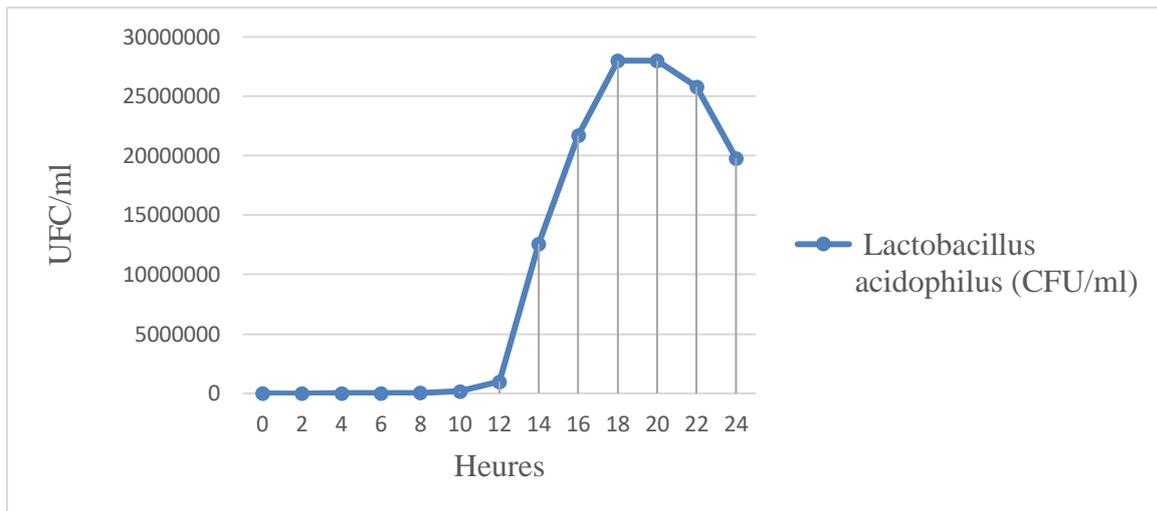


Figure 12 : Évolution de la numération bactérienne de *Lactobacillus acidophilus*

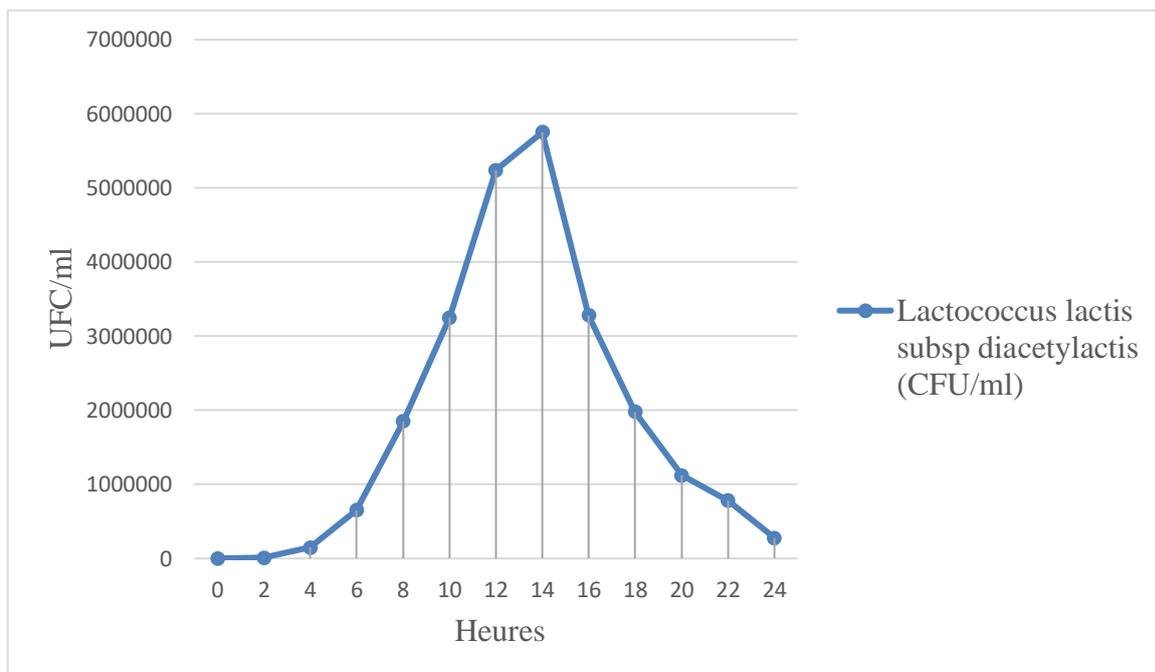


Figure 13 : Évolution de la numération bactérienne de *Lactococcus lactis subsp diacetylactis*

5.3. Mesure du pH :

La figure montre l'évolution de la concentration en ions hydrogène pH des souches lactiques *Lactobacillus acidophilus* et *Lactococcus lactis subsp diacetylactis* étudiées en fonction du temps (h) lors des mesures de la cinétique de croissance.

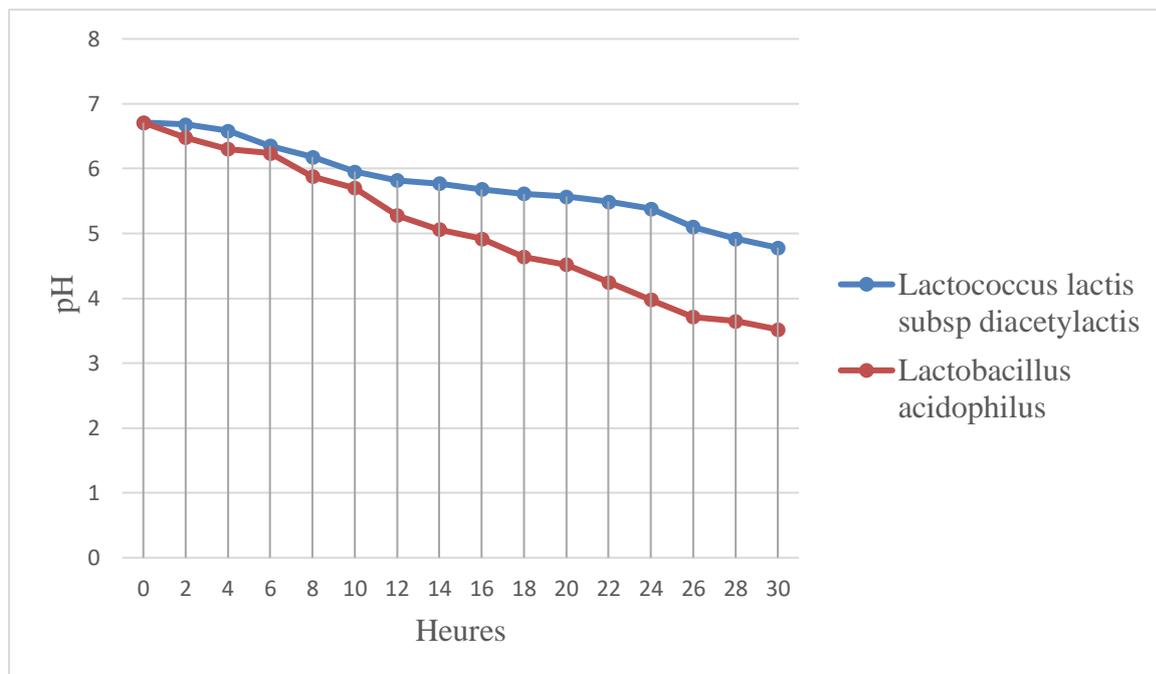


Figure 14 : Evolution du pH de *Lactococcus lactis subsp diacetylactis* et de *Lactobacillus acidophilus*

Kholif et al. (2011) ont obtenu des résultats similaires avec des lactobacilles. L'acide lactique, issu de la décomposition du lactose par les bactéries lactiques, porte des charges positives (ions hydrogène) qui neutralisent les charges négatives des colloïdes (caséines). À un pH de 4,6 à 4,8, connu comme le point isoélectrique de la caséine, ils deviennent neutres. L'acide déshydrate donc les micelles de caséine en les rapprochant les unes des autres. Plus la déminéralisation (acidification du lait par des bactéries lactiques ou coagulation acide) est importante, plus le caillé est lactique.

D'après nos résultats et la figure , à 0 h, le pH initial du lait de fromagerie inoculé avec deux cultures de souches *Lactobacillus acidophilus* et *Lactococcus lactis diacetylactis* est proche de la neutralité, avec une moyenne de 6,67. Le pH isoélectrique (autour de 4,6 - 4,8) de la souche *Lactobacillus acidophilus* a été atteint après plus de 17 à 18 heures d'inoculation du lait de fromage, tandis que pour *Lactococcus lactis diacetylactis*, le pH isoélectrique a été atteint après plus de 29 à 30 heures d'incubation. Pour les deux souches étudiées, le lait de fromage a subi une post-acidification contrôlée même après 24 h d'incubation à un pH inférieur à 4 pour les 02 BL.

En effet, l'abaissement du pH joue un rôle essentiel, d'une part dans la coagulation lactique du lait en déstabilisant les micelles de caséine qui conduisent à la formation d'un gel lactique homogène, et d'autre part, en conférant une bio-protection et un goût distinctif au dérivé laitier qui contribue à sa saveur et à son arôme (Leroy et De Vuyst, 2004 ; Mechai et al., 2014 et Saidane et al., 2021).

5.4. Profil protéolytique :

Les systèmes protéolytiques des BL sont importants dans les processus d'affinage du caillé des fromages fabriqués, ce qui confère aux fromages leurs propriétés rhéologiques et leurs caractéristiques organoleptiques (Kholif et al., 2011 et Roudj et al., 2009). D'autre part, l'activité protéolytique des BL est essentielle pour leur croissance dans le lait et ses dérivés, ainsi que pour le développement de métabolites organiques essentiels à la bioprotection des produits dérivés du lait. Le résultat du test de protéolyse est un halo de lyse autour de la colonie bactérienne, dont le diamètre est mesuré pour évaluer l'intensité de l'activité protéolytique (Salminen et al., 2004). Les résultats ont montré que *Lactobacillus acidophilus* était hautement protéolytique par rapport à *Lactococcus lactis diacetylactis*, les mêmes résultats obtenus par Saidane et al. (2021), qui ont montré que dans des milieux similaires, l'activité protéolytique est induite à la fois par les lactocoques mésophiles et les lactobacilles thermophiles.

Tableau 05 : Diamètre protéolytique moyen en millimètres pour les souches étudiées après 24 h d'incubation

Répétitions	L1			L2		
	D1	D2	D3	D1	D2	D3
1	15	16	14	-	-	-
2	13	15	14	-	-	-
3	12	14	15	-	-	-
4	10	16	16	-	-	-
Moyenne en mm	* 12,5	* 15,25	* 14,75	-	-	-

L1 : *Lactobacillus acidophilus* ; L2 : *Lactococcus lactis* subsp *diacetylactis* ; D1 : 1 µl de la culture ; D2 : 2,5 µl de la culture ; D3 : 5 µl de la culture ; - : Test négatif.

*L'activité protéolytique moyenne, à différentes doses de lait écrémé, des 02 cultures BL a montré une différence significative $P > 0.05$

D'après le tableau, l'activité protéolytique est variable d'une dose à l'autre, la meilleure zone de protéolyse étant obtenue à la dose de 2,5 µl de *Lactobacillus acidophilus*, avec un haut

niveau de protéolyse reflété par un diamètre moyen de lyse de 15,25 mm, et à la dose de 5µl, la souche a montré une protéolyse moyenne avec un diamètre de 14,75 mm. À la dose de 1µl, la souche était moyennement protéolytique, avec une zone moyenne de lyse de 12,5 mm de diamètre. En revanche, *Lactococcus lactis diacetylactis* a aucune activité protéolytique, comme le démontre les résultats du tableau 05.

Selon Anjum et al. (2014) et Sadi et al. (2017), une souche lactique peut être confirmée comme protéolytique si elle développe une zone de lyse caractérisée par un halo autour de la colonie bactérienne d'un diamètre compris entre 5 et 15 mm. Si l'on compare ces données avec nos résultats, on peut dire que *Lactobacillus acidophilus* a un profil protéolytique nécessaire pour une activité coagulante en transformation et en maturation des caillés lactiques en affinage.

Dans ce contexte et selon les travaux de recherche établis par Dahou et al. (2015) ; Kholif et al. (2011) ; Saidane et al. (2021), la sous-espèce de *Lactococcus lactis subsp diacetylactis* peut être distinguée par sa plus grande résistance au stress : elle est capable de croître de 37 °C. Elle est de plus capable de produire de l'ammoniac à partir d'arginine. Cette souche est capable de métaboliser le citrate et de le convertir en diacétyle, un composé aromatique apprécié en fromagerie pour son arôme de beurre. Cette sous-espèce est la plus intéressante pour la production fromagère puisqu'elles entrent dans la composition de la quasi-totalité des levains fromagers destinés à l'affinage. La sous-espèce lactis est mieux adaptée à la fabrication des fromages à pâte fraîche ou molle. Cette dernière est en outre réputée faire des fromages de meilleure qualité en raison de sa contribution spécifique à la saveur.

Selon Dahou et al. (2015), l'intérêt pratique des lactobacilles est considérable pour plusieurs raisons :

- La production d'acide lactique en fermentation lactique des laits et dérivés est une des principales fonctions des lactobacilles, car la quantité produite par ces derniers est supérieure à celles formée par les autres genres utilisés industriellement.
- L'activité protéolytique des lactobacilles participent à l'accélération de l'affinage des fromages avec un moindre risque de développement d'amertume, et d'être à l'origine d'une flaveur plus intense.
- Certaines espèces du genre *Lactobacillus* comme *Lb. acidophilus* possèdent une aptitude à produire un polysaccharide, qui confère l'épaississement du milieu dans le cas des laits fermentés.

5.4. Pouvoir coagulant : Coagulation lactique déterminée après une période d'incubation de 24 heures ; lait préparé et inoculé avec une culture mixte des deux lactobacilles, l'un mésophile et l'autre thermophile.

La coagulation lactique totale a été déclenchée à un pH isoélectrique de 4,8, où les charges négatives des caséines kappa sont neutralisées par les ions H⁺ de la fermentation lactique. L'acide a déshydraté les micelles de caséine, conduisant à leur assemblage par des liaisons fortes et irréversibles.

Selon (Leroy et De Vuyst, 2004 et Vignola et Amiot, 2002), la concentration en ions hydrogène est déterminante pour une bonne coagulation lactique, au pH isoélectrique du lait (pH entre 4,6 et 4,8) : les caséines (protéines insolubles du lait) perdent leur charge négative, et se lient entre elles par des liaisons faibles. Elles créent un maillage qui solidifie le lait et lui donne une consistance "épaisse". C'est ainsi que l'on obtient le caillé lactique à partir de la coagulation lactique.

Roudj et al, 2009, reconnaît que cette méthode de coagulation dépend de la dose de culture bactérienne et du type de BL utilisé, de la qualité du lait et de sa température d'incubation lors de l'acidification. Plusieurs heures à plusieurs dizaines d'heures sont nécessaires pour obtenir un caillage satisfaisant. Vignola et Amiot, 2002 recommandent 04 à 06 heures pour les ferments lactiques thermophiles et 12 à 18 heures pour les ferments mésophiles.

Nos résultats sont également en accord avec les normes de la FIL pour la transformation fromagère. Par leurs activités métaboliques, les souches étudiées ont induit une concentration en ions hydrogène avec les activités de coagulation recherchées dans les applications fromagères, adaptables aux fromages de type caillé lactique ou mixte. Le coagulum obtenu pour la souche *Lactobacillus* en a été perçu à l'œil nu comme ferme, non friable, avec un gel brillant et non dégradé. La post-acidification non abondante a entraîné une faible exsudation du lactosérum avec une teneur < à 20 % pour une norme d'exsudation du lactosérum définie par la FIL de 15 à 30 %. Ceci explique pourquoi tout dérivé laitier réussi nécessite le bon choix des bactéries lactiques utilisées, le contrôle du substrat et l'adaptation des paramètres technologiques pour obtenir des produits laitiers typiques très appréciés par le consommateur.

Les performances technologiques des bactéries lactiques autochtones isolées d'un fromage de terroir J'ben à caillé lactique, utilisées en culture mixte, ont montré une similitude dans les cinétiques de croissance et les profils d'acidification étudiés, démontrant un bon profil

métabolique avec une montée contrôlée des ions hydrogène donnant des pH isoélectriques en accord avec une coagulation lactique à la fois mésophile et thermophile. Cette comparaison a été faite par rapport aux fiches techniques des souches de référence ATCC des mêmes espèces de BL, *Lactobacillus acidophilus* et *Lactococcus lactis diacetylactis*. Ces fiches certifiées déterminent les performances des bactéries lactiques en termes de profil fermentaire (pouvoir acidifiant - production d'acide lactique), d'activités protéolytiques et de propriétés sensorielles pour une transformation laitière typique. La protéolyse par hydrolyse des protéines du lait écrémé varie significativement ($P>0,05$) en fonction des doses utilisées et de la culture bactérienne testée. En tenant compte des mêmes recherches établies dans le cadre des activités protéolytiques des BL, notamment celles de (Dahou et al, 2015 ; Roudj et al, 2009 ; Salminen et al, 2004 ; Zhu et al, 2009) et nos résultats obtenus avec une protéolyse évoluant en fonction de la dose de la cultureensemencée et avec une teneur constante des protéines du lait utilisé. Cela prouve que nos cultures natives sont adaptables aux laits pauvres et riches en protéines, comme c'est le cas de nos laits locaux qui présentent une fluctuation de la teneur en protéines qui s'affaiblit au fur et à mesure de l'évolution des phases de lactation du troupeau laitier.

Selon les résultats obtenus, ces BLs du terroir laitier algérien s'adaptent bien à la disponibilité et à la typicité qualitative des laits locaux pour la production d'une variété de produits laitiers et fromagers fermentés très consommés, qui représentent un patrimoine algérien d'une grande importance diététique, médicinale et économique.

Tableau 06 : Résultats physico-chimiques du caillé fromager obtenu

	E1	E2
PH	4,10	4,62
Matière grasse	0,65%	0,63 %
Matière protéique	15,35%	14,56%
Matière sèche	34,20%	33,75%
Eau	65,80%	66,25%
G/S (Gras sur sec)	1,90 %	1,87%
Lactose	10,25%	10,20%

E1 : Echantillon de caillé fromager fabriqué avec la souche *Lactobacillus*

E2 : Echantillon de caillé fromager mixte fabriqué avec une culture mixte *Lactobacillus et Lactococcus*

La flore microbienne (essentiellement la flore lactique) est responsable du pH du caillé fromager, la flore lactique diminue le pH du lait qui permet la coagulation du lait qui est la

phase le plus important de la fabrication du fromage, aussi la diminution de pH permet de préserver naturellement le caillé fromager et augmenter leur durée de vie.

La teneur de la matière grasse du fromage est liée essentiellement à la teneur du lait d'origine qui est pour la norme FIL entre 35 à 45g/l. La teneur du lait en matière grasse (Taux butyreux) est aussi sous l'influence de plusieurs facteurs (l'animale, la saison, l'alimentation...etc.). Pour nos caillés fromager obtenus, le taux butyreux est varié entre 0,63 % et 0,65 %.

La teneur en matière grasse porte une grande importance pour classer les caillés fromagers à caillé lactique, frais et non affinés selon les normes générales pour les caillés fromagers (Codex Standard 221-2001), cette teneur est exprimée en pourcentage de matière grasse dans l'extrait sec G/S ou (Gras sur sec) et permet de donner 5 classes différents :

- Extra gras ou double crème (si la teneur en G/S est égale ou plus de 60 %) ;
- Tout gras ou au lait entier ou crème (si la teneur en G/S est supérieure ou égale à 45 % et inférieure à 60 %) ;
- Mi-gras ou demi-écrémé (si la teneur en G/S est supérieure ou égale à 25 % et inférieure à 45 %) ;
- Partiellement écrémé (si la teneur en G/S est supérieure ou égale à 10 % et inférieure à 25 %) ;
- Maigre ou écrémé (si la teneur en G/S est inférieure à 10 %).

Les résultats physico-chimiques de nos échantillons de caillé fromager ont montré que le pourcentage en G/S (Gras sur sec) varie entre 1,87 % et 1,90 % ; à partir de ces résultats nos échantillons sont classés dans la catégorie des caillés fromagers maigres ou écrémés ayant un G/S égale ou supérieur à 10 %.

La teneur du caillé fromager en matière protéique est aussi liée au taux de protéine du lait préparé qui doit être compris entre 33 à 36 g/l. Nos résultats ont montré que la teneur en matière protéique est variable entre 14,56 % et 15,35 % qui est une grande marge. Comme la matière grasse le taux protéique est aussi influencé par les différents facteurs en causant ces variations des taux dans les échantillons.

La perte du lactose dans les grains de caillé fromager a lieu surtout à cause de la déshydratation et moins à cause de la fermentation du lactose (Dahou et al.,2015). Le taux du lactose dans nos caillés fromage fluctue entre 10,20 et 10,25%.

La teneur en eau est conforme pour la norme FIL (2018) d'un caillé fromager de type lactique (de 60 à 75%). Cette teneur est comprise dans nos caillés fromagers entre 65,80 et 66,25%.

Les résultats physico-chimiques de nos caillés fromagers concordent avec la norme formulée par la FIL (2018), pour caillé fromager maigre à caractère lactique. La variation des caractéristiques de notre caillé fromager à caractère lactique est d'abord au dépend du lait préparé utilisé et de ses caractéristiques physico-chimiques qui sont influencés par l'origine du lait, de son espèce animale, sa race, son alimentation, et des conditions zootechniques et des pratiques d'élevage.

5.5 Rendement fromager

Selon la fédération internationale du lait (2018) ; le rendement fromager d'un lait pour un caillé fromager lactique varie entre 35 et 40 kg pour 100 litres de lait fromageable. Notre essai expérimental avec la culture lactique de *Lactobacillus* a donné le rendement escompté pour un caillé frais se situant à une valeur très appréciable de 38,25 kg pour 100 litres. L'essai avec une culture mixte *Lactobacillus* –*Lactococcus* a donné presque le même rendement avec 38,18 kg pour 100 litres de lait.

Un lait apte à une transformation fromagère doit avoir comme taux protéique TP plus de 3% (30 g/L de lait). Notre lait expérimental a présenté un TP supérieur à 3% soit 3,2%. Il faut savoir pour tout point ou gramme de protéine gagnée, on gagnera 4 g de fromage. De plus le profil protéique de notre souche lactique a donné la qualité escomptée en caillé lactique sur le plan rendement fromager et fermeté du coagulum lactique.

Nos résultats sont conformes à la norme FIL, 2018 : en effet le caillé obtenu a une teneur en extrait sec total entre 33,75 et 34,20 % et une teneur en eau de 65,80 à 66,25 % soit un coagulum de la catégorie des caillés fromagers à caractère lactique qui doivent présenter un rendement en extrait sec entre 25 et 40 % et une humidité (teneur en eau) comprise entre 60 et 75 %.

Conclusion

Selon l'intérêt de chaque espèce bactérienne caractérisée et ses effets sur le plan technologique, cette étude est une contribution qui vise à apporter aux fromagers l'approche scientifique qui assurerait une meilleure connaissance des souches lactiques à fermentations différentes, à activités protéolytiques et aux propriétés organoleptiques et rhéologiques spécifiques.

L'évaluation des souches lactiques autochtones isolées des produits laitiers de l'ouest algérien a confirmé la typicité de deux espèces étudiées : *Lactobacillus acidophilus* et *Lactococcus lactis subsp diacetylactis*.

Le potentiel fonctionnel des 02 souches à travers leurs aptitudes technologiques était conforme au référentiel de la fédération internationale du lait présentant un profil acidophile fermentaire avec une activité protéolytique favorisant la production de facteurs de croissance et d'acides aminés nécessaires au développement d'une microflore lactique secondaire hautement dépendante nécessaire au développement des caractéristiques texturales et aromatiques particulières dans les fromages affinés.

Par ailleurs, les perspectives de cette étude seront, à plus d'un titre, convaincantes en travaillant sur une meilleure connaissance des écosystèmes microbiens laitiers de nos produits locaux et en proposant l'utilisation de cocktails de souches sélectionnées, ayant la capacité de reproduire des métabolismes d'intérêt dans la transformation laitière et donnant de l'originalité aux produits élaborés. De plus, avec ces évaluations technologiques de notre flore lactique indigène, nous commençons à avoir une image fiable de la diversité microbienne de nos produits laitiers traditionnels, qu'il faudra exploiter davantage pour les valoriser et préserver leur typicité, et tendre vers une appellation d'origine protégée pour le patrimoine des dérivés laitiers.

En perspective ces souches caractérisées peuvent être utilisées en application fromagère pour des essais de fabrication d'un fromage à caillé mixte.

Références bibliographiques

Anjum, N., Shabana, M., Tariq, M., Asif, A., Asma, S. (2014). *Lactobacillus acidophilus*: Characterization of the species and application in food Production. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 54(9):1241-1251. <https://doi.org/10.1080/10408398.2011.621169>.

ATCC (American Type Culture Collection) reference strains (2022) Technical documents by Reference strains. web link : <http://www.atcc.org>.The Global Bioresource Center.

Badis, A., Laouabdia-Sellami, N., Guetarni, D., Kihal, M., Ouzrout, R. (2005). Phenotypic characterization of lactic acid bacteria isolated from raw goat milk of two local goat populations "arabia and kabyle". Science and Technology. 23(1): 30-37.

Béal C., Marin M, Fontaine E et Obert J.P. 2008 Production et conservation des ferments lactiques et probiotiques. Techniques de l'ingénieur ; Réf F 6315.10-44p

Corroler David, *Biodiversité des lactocoques sauvages au sein de la zone d'appellation d'origine « Camembert de Normandie » : implication au cours de la transformation fromagère.*, thèse: Université de Caen Basse-Normandie, 1999

Dahou, A., Homrani, A., Bensaleh, F., Medjahed, M. (2015).The lactic microflora of a traditional Algerian cheese "j'ben type": knowledge of local dairy microbial ecosystems and their roles in cheese making. Afrique Science. 11(6): 1-13.

Doleyres, Y.; Paguin, C.; Leroy, M. and Lacroix, C. Bifidobacterium longum ATCC 15707 cell production during free- and immobilized-cell cultures in MRS-whey permeate medium. Applied Microbiology and Biotechnology, October 2002, vol. 60, no. 1-2, p. 168-173.

Eck et Gillis, 2006. Le fromage. 3eme edition : Tec et Doc, Lavoisier.Paris. 891p.

Hylckama Vlieg, Jan L W Rademaker, Herwig Bachmann, Douwe Molenaar, William J Kelly, Roland J Siezen. 2006.Natural diversity and adaptive responses of Lactococcus lactis. Curr Opin Biotechnol. . 2006 Apr;17(2):183-90. doi: 10.1016/j.copbio.2006.02.007. Epub 2006 Mar 6.

Holzappel W.H. 2001. « *Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition* », *The American journal of clinical nutrition*, vol. 73, n° 2 Suppl, février 2001, p. 365S-373S ([ISSN 0002-9165](https://doi.org/10.1093/ajcn/73.2.365S)).

FIL / I.D.F. (2018). *The reference ISO 707/ I.D.F. Defined standards for microbiological and chemical analysis of milk, milk products and milk powder*. Rome, Italy. pp. 75-125.

Ketrouci, L., Dalache, F., Benabdelmoumene, D., Dahou, A.E.A., Homrani, A. (2021). Technological characterisation of lactic acid bacteria isolated from different sheep's milk. *Asian Journal of Dairy and Food Research*. 40(3) : 239-245. <https://arccjournals.com>.

Kholif, AM., Mahran, GA., El-Nawawy, MA., Ismail, AA., Salem, MME. (2011). Evaluation of proteolytic activity of some dairy Lactobacilli. *World. J of Dairy and Food Sciences*. 6(1): 21-26.

Leroy, F. and De Vuyst, L. (2004). Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation Industry. *Trends in Food Science & Technology*. 15(1): 67–78. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2003.09.004>.

Man J. C., Rogosa M., Sharpe M. E. 1960 Medium for the cultivation of lactobacilli. *J. Appl. Bacteriol.* 23, 130–135. *J. Appl. Bacteriol.* 23, 130–135.

Mechai, A., Debabza, M., Kirane, D. (2014). Screening of technological and probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from Algerian traditional fermented milk products. *International Food Research Journal*, 21(6).

Montel, MC., Buchin, S., Mallet, A., Delbes-Paus, C., Vuitton, D. (2014). Traditional cheeses : Rich and diverse microbiota with associated benefits. *International Journal of Food Microbiology*. 177 (1) :136-154. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.02.019>.

Morin, I. (2020). A Bactoscan, how does it work ? *Lactanet.ca.doc*. 12(2020) : 1-5. <https://lactanet.ca/en/how-does-a-bactoscan-work>

Orla-Jensen, S. (1919) *The Lactic Acid Bacteria*. Andr. Fred. Host and Son, Copenhagen.

Passerini D., « *New insights into Lactococcus lactis diacetyl- and acetoin-producing strains isolated from diverse origins* », *International journal of food microbiology*, vol. 160, n° 3, 1^{er} janvier 2013, p. 329-336 ([ISSN 1879-3460, DOI 10.1016/j.ijfoodmicro.2012.10.023](https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.10.023))

Quigley, L., O'Sullivan, O., Beresford, T.P., P Ross, R., Fitzgerald, G.F., Cotter, P.D. (2011). Molecular approaches to analysis the microbial composition of raw milk and raw milk cheese, *International journal of food and microbiology*, 150(2-3): 81-94.

Roudj, S., Belkheir, K., Zadi-Karam, H., Karam, NE. (2009). Proteolysis and autolysis in two lactobacilli isolated from camel milk from South West Algeria. *Euro J Sci Res.* 34(2): 218-227.

Sadi, F., Dilmi Bouras, A., Ghomari, N., Hallouz, F., Noui, A. (2017). Phenotypic, molecular and technological characterization of autochthonous lactobacilli strains isolated from cow's milk and goat of Algerian populations. *Journal of Fundamental and Applied Sciences.* 9(1) :339-353. <http://dx.doi.org/10.4314/jfas.v9i1.21>.

Saidane, Z., Dahou, A.E.A, Tahlaiti, H., Daoudi, M., Doukani, K., Homrani, A. (2021). Physico-chemical parameters with direct influence on the dynamism of the indigenous microflora of the traditional cheese « J'ben Elgafs ». *Asian Journal of Dairy and Food Research.* 40(2) : 157-161. <https://arccjournals.com>.

Salminen, S., Ouhwehand, A., Von Wright, A. (2004). *Lactic Acid Bacteria: Microbial and Functional Aspects*, 3rd Ed, Marcel Dekker, New York, USA. pp. 375-395.

Veuillemard .J.C.,1986.Microbiologie des aliments.Evolution de l'activité protéolytique des bactéries lactiques. Tec et Doc. Lavoisier.Paris .3 : 1-65

Vignola, CL. and Amiot, J. (2002). *Science and Technology of Milk and Milk Processing*. Ed. Presses Internationales Polytechnique, Canada. pp. 3-600.

Zhu, Y., Zhaping, Y., and Li, Y. (2009). Understanding the industrial application potential of lactic acid bacteria through genomics. *Applied Microbiology and Biotechnology.* 83(4) : 597–610. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2034-4>.

Annexes

Annexe A : Milieu de culture : Composition

➤ Milieu MRS (pH 6.5)

- Peptone	10g
-Extrait de viande	10g
-Extrait de levure.....	5g
-Glucose.....	20g
-Tween 80... ..	1ml
-Phosphate bipotassique... ..	2g
-Acétate de sodium... ..	5g
- Citrate d'ammonium.....	2g
-Sulfate de magnesium, 7 H ₂ O	0.2g
-Sulfate de manganèse, 4 H ₂ O.....	0.5g
-Agar.....	15g
-Eau distillée qsp... ..	1000ml
-Stérilisation par autoclavage à 120°C pendant	15min

Annexe B : Coloration de Gram

- ✓ Déposer une goutte d'eau physiologique stérile sur une lame bien propre.
- ✓ Prélever un échantillon de colonie et mélanger avec la goutte d'eau, et sécher par passage rapide sur la flamme d'un bec benzène Couvrir le frottis par du cristal violet pendant 60 secondes.
- ✓ Laver l'excès du colorant avec de l'eau distillée.
- ✓ Couvrir de lugol pendant 30 secondes.
- ✓ Laver à l'eau distillée pendant 5 secondes.
- ✓ Rincer immédiatement le frottis avec le mélange alcool - acétone en inclinant la lame et par goutte à goutte jusqu'à disparition complète de la coloration violette Rincer avec l'eau distillée pendant 5 secondes.
- ✓ Couvrir avec de la fuschine pendant 15 secondes.
- ✓ Laver avec l'eau distillée pendant 10 secondes.
- ✓ Déposer une goutte d'huile à immersion sur le frottis et observer au microscope à un fort grossissement.

Lecture : Les cellules Gram+ absorbent la couleur du cristal violet et demeurent violettes en apparence, contrairement aux cellules Gram- qui apparaissent distinctement rosâtres.

Annexe C : Test de catalase

- ✓ Préparer une lame propre et stérile .
- ✓ Déposer 2 à 3 gouttes d'eau oxygénée à 10 volume sur la lame .
- ✓ A l'aide d'une pipette stérile prélevé quelques cellules de la colonie .
- ✓ Mélanger soigneusement les cellules avec de l'eau oxygénée.

Lecture : dégagement de gaz signifie que la souche est catalase +, l'absence de dégagement de gaz signifie que la souche est catalase négative

Annexe D : FICHE TECHNIQUE POUDRE DE LAIT FROMAGERE LOW HEAT

01.01.2024	Unité	Valeurs garanties	Valeurs typiques
Composition			
Humidité ³⁾	[%]	max. 4.0 par kg poudre	3.75
Protéines (x 6.38) dans l'extrait sec dégraissé	[%]	min. 34.0	34.0 - 36.5
Protéines (x 6.38) dans poudre	[%]	32.5	32.6 - 35.0
Matières grasses	[%]	max. 1.5	0.4
Lactose	[%]		50 - 56 ¹⁾
Cendre	[%]		8 ²⁾
Paramètres chimiques			
Acidité titrable	[%]	max. 0.15	max. 0.13
WPN Index	[mg WPN/g poudre]	min. 6	7.5
Paramètres physiques			
Densité en vrac	g/l		400 - 620
Particules brûlées ADPI	A-D	B	A-B
Indice de solubilité ADPI	ml	max. 0.5	0.1
Paramètres sensoriels			
Couleur		blanche à crème	blanche à crème
Goût et odeur		pur, un peu sucré, différence permise: à une petite part	pur, un peu sucré, agréable
Appareuce		pas de grumeaux	fluide libre
Paramètres microbiologiques			
Germes aérobies mésophiles	[KBE / g]	max. 15'000	< 10'000
Enterobacteriaceae	[KBE / g]	<10	<10
Staph. Aureus	[KBE / g]	<10	<10
Levures/Moisissures	[KBE / g]	<100	<10
Salmonelles spp.		neg. dans 5 x 25 g	neg. dans 5 x 25 g
Contaminations de l'environnement			
Pesticides (Screening)		exigences OCont	exigences OCont
Organochlorine pesticides	[mg/kg]		0.002
Somme des PCDD/F	[ng/kg]	-	-
PCB	[mg/kg]		<0.03
Métaux lourds			
Arsenic	[mg/kg]		<0.02
Plomb	[mg/kg]	max. 0.2	<0.05
Cadmium	[mg/kg]		<0.002
Mercuré	[mg/kg]		<0.01
Mycotoxines			
Aflatoxine M1	[ng/kg]	max. 50	<20
Radioactivité			
Caesium 137	[Bq/kg]	max. 10 ²⁾	<5
Caesium 134	[Bq/kg]	max. 10 ²⁾	<5
Antibiotiques			
		neg. Delvo	neg. Delvo
Information nutritionnelle			
Energie	kJ / 100 g		1500
Qualité organique		non	non
Kosher		non	non (possible sur demande)
Halal		non	non (possible sur demande)
Vegetarien		non	oui
Additifs		non	non
Supplément de vitamine A		non	non
Supplément de vitamine D		non	non
Durée de conservation			
Max. 20°C			
Max. 65% rel. humidité	mois	18	