



Université de Mostaganem

Faculté des sciences de la nature et de la vie
Département de biologie

Laboratoire des Sciences et Techniques de Productions Animales

Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme de Master

Présenté par :

BOURICHA Habiba

Sous le thème :

**Caractérisation du lait cru
de la ferme expérimentale de Hassi-Mamèche :
Précisément la flore thermophile et mésophile**

Devant le jury :

<i>Président:</i>	Mr S.NEMMICHE	Professeur
<i>Directrice de mémoire:</i>	Mme N.RECHIDI-SIDHOUM	Maitre assistante A
<i>Co-Directeur de mémoire:</i>	Mr. A.DAHOU	Docteur
<i>Examinatrice:</i>	Mme N.BEKENNICHE	Maitre assistante A
<i>Invité d'honneur:</i>	Mr. D.BOUCHERF	Docent

Année Université : 2017/2018

Remerciements

Avant tout, je remercie Dieu tout puissant de m'avoir aidé et donné la foi et la force pour achever ce travail.

*Mon sincère remerciement est adressé premièrement à mes encadreuses Madame **Nadra RECHIDI-SIDHOUM** et Monsieur **DAHOU AMINE** d'avoir acceptés de m'encadrer, pour leur aide, conseils, et orientations leur disponibilité et patience avec moi.*

*Mes vifs remerciements sont adressés à tous les membres de jury :
Nous exprimons toute notre gratitude aux membres de jury :*

*Monsieur **S.NEMMICHE** pour l'honneur qu'elle nous fait en acceptant de présider le jury, et de vous remercier pour tout ce que vous avez apporté tout au long de nos études.*

***Mme BEKENNICHE** pour avoir accepté d'examiner ce travail.*

***Dr D.BOUCHERF** pour avoir accepté d'examiner ce travail.*

Nos plus vifs remerciements s'adressent au personnel de la ferme expérimentale de l'Université Abdelhamid IBN BADIS de Mostaganem de Hassi-Mamèche et pour leur patience et leurs précieuses aides, pendant la réalisation de ce travail.

*En particulier à Mr «**HOMRANI**» responsable de la ferme expérimentale de l'Université Abdelhamid IBN BADIS de Mostaganem*

. Nous vous remercions d'avoir enrichis nos connaissances et de nous avoir guidés durant toute la période du stage et nous avons grandement apprécié votre soutien, votre implication et votre expérience.

Dédicaces

Je remercie tout d'abord, Allah, le tout puissant et clément de m'avoir aidé à réaliser ce travail.

Je dédie ensuite ce fameux travail aux plus exceptionnels qui existent dans le monde Mes parents Djillali et Nacira

*Toute ma gratitude pour leur soutien tout au long de mes études
Qu'Allah Je les garde*

Je dédie également à tous ceux qui m'aiment et spécialement

A ma soeur « Naila » et mes frères Ilyes et Djamel

A toute ma famille BOURICHA sans exception.

A mes encadreuses Mrs Dahou El-Amineet Mme Nadra Rechidi qui méritent tous mon respect.

Enfin, je dédie ce travail à toute personne qui m'a aidé de le réaliser de près ou de loin sans exception.

Bouricha habiba

Résumé

Les bactéries lactiques font naturellement partie de notre environnement et notre alimentation. Elles sont, de par leurs aptitudes fermentaires et technologiques, très utilisées dans les applications industrielles pour la transformation et la conservation des denrées alimentaires . L'objectif de cette étude est de caractériser la flore originelle du lait cru prélevé sur des vaches de race Prim'Holstein, en période de haute lactation, de la ferme expérimentale de l'Université Abdelhamid IBN BADIS de Mostaganem. Au cours de notre étude, 04 échantillons de lait cru (02 de la traite du matin et 02 de la traite du soir) ont été et analysés. Des analyses physico-chimiques (Protéines, Lactose ,Matière grasse , pH , Densité , Extrait sec dégraissé et microbiologiques (dénombrement de la flore totale, isolement, purification et identification des bactéries lactiques selon les normes nationales). Elles ont permis d'isoler et d'identifier 14 souches de bactéries lactiques qui appartiennent à trois genres différents , et qui sont : *Lactobacillus*, *Streptococcus* et *Lactococcus*.

De ces derniers, le genre *Lactococcus* est le plus dominant avec un pourcentage de 50%, et en ce qui concerne les autres genres streptocoques avec 30 % ; et lactobacilles avec 20%)

Mots clés : Bactéries lactique , lait de vache, isolats , streptocoques , lactobacilles, *Lactococcus*

ملخص

بكتيريا حمض اللبن هي بطبيعة الحال جزءًا من بيئتنا ونظامنا الغذائي. بسبب قدراتهم التخمرية والتكنولوجية ، فهي تستخدم على نطاق واسع في التطبيقات الصناعية لتجهيز المنتجات الغذائية والحفاظ عليها. الهدف من هذه الدراسة هو توصيف البنية الأصلية للحليب الطازج التي تم جمعها من الأبقار من سلالة Prim'Holstein من المزرعة التجريبية لجامعة عبد الحميد بن باديس في مستغانم.

خلال دراستنا ، تم تحليل 4 عينات من الحليب الطازج (02 من حليب الصباح و 02 من حليب المساء). تحاليل فيزيوكيميائية (بروتينات ، لاكتوز ، دهون ، أس هيدروجيني ، كثافة ، مستخلص جاف منزوع الدهن ، ميكروبيولوجي (تعداد فلور كامل ، عزل ، تنقية ، تعريف بكتيريا حمض اللاكتيك طبقا للمعايير الوطنية). تحديد 14 سلالة من بكتيريا حمض اللاكتيك التي تنتمي إلى ثلاثة أجناس مختلفة ، والتي هي:

. *Lactobacillus, Streptococcus et Lactococcus* .

من هذه الأخيرة يمثل نوع *Lactococcus* النسبة الغالبة بنسبة 50 % ، *Streptococcus* بنسبة

30 % و *Lactobacillus* بنسبة 20 %).

الكلمات المفتاحية: البكتيريا اللبنية ، حليب البقر ، العزلات ، . , *Lactobacillus, Streptococcus* ،

Lactococcus .

Abstract

Lactic acid bacteria are naturally part of our environment and our diet. Because of their fermenting and technological abilities, they are widely used in industrial applications for the processing and preservation of food products. The objective of this study is to characterize the original flora of raw milk collected from high-lactation cows of the Prim'Holstein breed from the experimental farm of Abdelhamid IBN BADIS University in Mostaganem. During our study, 04 samples of raw milk (02 from morning milking and 02 from evening milking) were analyzed and analyzed. Physicochemical analyzes (Proteins, Lactose, Fat, pH, Density, Defatted dry extract and microbiological (enumeration of total flora, isolation, purification and identification of lactic acid bacteria according to national standards). identify 14 strains of lactic acid bacteria that belong to three different genera, and which are: *Lactobacillus*, *Streptococcus* and *Lactococcus*. Of these, the genus *Lactococcus* is the most dominant with a percentage of 50%, and for the other genera streptococci with 30%; and lactobacilli with 20%)

Key words: Lactic bacteria, cow's milk, isolates, . *Lactobacillus*, *Streptococcus* , *Lactococcus*.

Liste des tableaux

Tableau N°	Titre	Page N°
Tableau 01	Composition typique du lait de vache(Alais C., Linden G. et Miclo L. (2008))	6
Tableau 02	Composition en lipides de lait de vache, CHILLIARD, 1996).	7
Tableau 03	composition minéral du lait (Veisseyre, 1975).	10
Tableau 04	Composition vitaminique moyenne du lait cru (AMIOT et al., 2002))	12
Tableau 05	Caractéristiques physico-chimiques du lait (VEISSEYRE R., 1975).	14
Tableau 06	Flore indigène du lait cru (Amiot et al., 2002).	15
Tableau 07	les différentes sources de contamination du lait cru : (Hassan et al., 2002))	18
Tableau 08	Incidence des bactéries lactiques dans les quatre échantillons de lait frais	41
Tableau 09	Milieux utilisés et conditions d'incubation pour l'isolement des bactéries lactiques	44
Tableau 10	Caractères morphologiques et physiologiques des genres présumés des bactéries lactiques isolées	46
Tableau 11	Profil physiologique et biochimique des souches lactiques isolées	48

Liste des figures

Figure N°	Titre	Page N°
Figure 01	Arbre phylogénétique des principaux genres de bactéries lactiques et des genres associés, obtenu par analyse des ARNr 16S (Stiles et Holzapfel, 1997).	23
Figure 02	Voies fermentaires de la dégradation du glucose (Atlan et al., 2008).	27
Figure 03	Schéma du système protéolytique de <i>Lactococcus lactis</i> (Atlan et al., 2008).	29
Figure 04	Test de catalase	37
Figure 05	Aspect macroscopique des isolats sur le milieu Gibson-Abdelmalek	38
Figure 06	Conservation des souches purifiés à -20°C	39
Figure 07	les 09 isolats de Lactococcus	42
Figure 08	les 02 isolats de Lactobacillus	43
Figure 09	les 03 isolats de Streptococcus	43
Figure 10	Aspect des colonies de bactéries lactiques sur milieu MRS après 48h d'incubation à 37°C	45
Figure 11	Aspect des colonies de bactéries lactiques sur milieu M17 après 48h d'incubation à 37°	45
Figure 12	Genre présumé à Streptococcus	47
Figure 13	Genre présumé à Lactococcus	47
Figure 14	Genre présumé à Lactobacillus	47
Figure 15	production de CO2 par Lactobacillus	49
Figure 16	Aucune croissance des Streptocoques lactiques sur milieu BEA(aucun trouble caractéristique au niveau du tube 1,tube 2 et tube 3 par rapport au témoin)	50

Liste des abréviations

Signification	Abréviations
Flore totale aérobie mésophile	FTAM
Kilogramme	Kg
Litre	L
Lactoperoxydase – thiocynate – peroxyde d'hydrogène	LSP
Matière Grasse	MG
Matière Sèche Totale	MST
	°C
pour cent.	%
degré dornic.	°D
Coliforme totaux.	CT
heure	H
Vitamine	V
Unité Formant de Colonie par millilitre.	UFC/ml
de Man Rogosa et Sharpe	MRS
Milieu de Terzaghi	M17

Table des matières

Remerciements

Dédicaces

Résumé

ملخص

Summary

Liste des abréviations

Liste des tableaux

Liste des figures

Introduction

Partie bibliographie	
Chapitre I : le lait	
I.1.Lait cru de vache	5
I .1.1.1.Définition du lait	5
I .1.2.Composition physico-chimique du lait	5
I.2.1.L'eau	6
I. 2.2. Les lipides	6
I.2.2.1. Les phospholipides et les acides gras	6
I.2.2.2 .Les acides gras	7
I.2.2.3 .Les triglycérides	7
I.2.2.4 .Les protéines	7
I.2.2.5. Les caséines	8
I.2.2.6 .Les protéines de sérum	8
I.2.2.7 . Les glucides	9
I.2.2.8.Les minéraux	9
I.2.2.9. Biocatalyseurs	9
I.2.2.10. Enzymes	10
I.2.2.11. Vitamines	11
I.2.2.12. Matière azotée	12
I.3.Caractéristiques physico-chimiques du lait	13
I..3.1. La densité	13
I..3.2 . L'acidité de titration ou acidité Dornic	13
I..3.3.Le point de congélation	13

I.3.4. PH	13
I.4. Microflore de lait	15
I.4.1. Flore originelle	15
I.4.2. Flore de contamination	16
I.4.2.1. Contamination par l'animal	16
I.4.2.2. Contamination au cours de la traite	16
I.4.2.3. Contamination au cours du transport	17
I.4.3 Flore pathogène	17
I.4.4 Flore psychrophate	19
I.4.4.1. Les causes d'apparition	19
Chapitre II :La flore lactique du lait	
II .1. Présentation des bactéries lactiques	21
II .2. Habitat et origine des bactéries lactiques	21
II 3. Taxonomie des bactéries lactiques	21
II 4. Caractéristiques des principaux genres des bactéries lactiques	23
II .4.1. Le genre <i>Lactobacillus</i>	23
II .4.2. Le genre <i>Lactococcus</i>	24
II .4.3. Le genre <i>Streptococcus</i>	24
II .4.4. Le genre <i>Enterococcus</i>	25
II .4.5. Les genres <i>Leuconostoc</i> , <i>Oenococcus</i> et <i>Weissella</i>	25
II .4.6. Les genres <i>Pediococcus</i> et <i>Tetragenococcus</i> et <i>Leuconostoc oenos</i>	25
II .4.7. Le genre <i>Bifidobacterium</i>	26
II .5. Principales voies fermentaires des bactéries lactiques	26
II .5.1. Voie homofermentaire ou EMP	27
II .5.2. Voie hétérofermentaire ou voie des pentoses phosphate	28
II .6. Métabolisme azoté des bactéries lactiques	28
II .7. Aptitudes technologiques	29
II .7.1. Aptitude acidifiante	29
II .7. 2. Aptitude protéolytique	30
II .7. 3. Aptitude lipolytique	30
II .7.4. Aptitude aromatisante	30
II .7. 5. Aptitude texturante	30
II .7. 6. Activité antimicrobienne	31

II .7. 7.Performance	31
II .8. Applications industrielles des bactéries lactiques	32
Partie expérimentale	
Chapitre I : Matériel	
I -Protocole général :	34
I -2-Matériel	34
I -2-1 Matériel biologique	
I -2-2 Prélèvement des échantillons de lait :	34
I.2.3.Analyse physicochimique	34
I.3.Analyse microbiologique	35
I.3.1.Milieus utilisés	
Chapitre II : Méthodes	
II -3-2 Méthodes	35
II -3-2-1 Isolement des bactéries lactiques	
II -3-2-1-1 Préparation de la suspension mère	
II -3-2-1-2 Dénombrement microbiologique de la solution mère	35
II-2-3-2Analyse préliminaire des isolats Pré-identification	35
II-2-3-2-3 Caractérisation biochimique des isolats obtenus :	36
II -2-3-2-3-1 .Test de catalase	36
II -3-2-3-2 .Coloration de gram	37
II -3-2-3-3 . Croissance à différentes températures	37
II -3-2-3-4 Culture sur milieu hypersalé	37
II -3-2-3-5.Type fermentaire	37
II -3-2-4 Identification phénotypiques des bactéries lactiques isolées	38
II -3-2-5 Conservation des souches isolées	38
Résultats	
1.1 Isolement et identification des bactéries lactiques isolées	41
1.1.1 Dénombrement des bactéries lactiques	41

1.1.2 Obtention des isolats	42
1.1.3 L'examen macroscopique et microscopique :	44
1.1.4 Test physiologiques et biochimiques :	48
1.1. 4.1Analyses physico-chimiques des échantillons de lait frais	50
Discussion	
2.1 Isolement et identification des bactéries lactiques isolées	52
2.1.1 Dénombrement des bactéries lactiques	52
2.1.2 Obtention des isolats	53
2.1.3 Examen macroscopique et microscopique	53
2.1.4 Tests physiologiques et biochimiques	53
Conclusion et perspectives.	
1.Conclusion	58
2.Perspectives	59
Références bibliographiques	60
Annexes	69

Introduction

Introduction

Les micro-organismes sont le principal facteur de dégradation du lait ,ils sont historiquement utilisés pour sa transformation et sa conservation .La fermentation des produits alimentaires comme le lait est employée depuis l'antiquité en Afrique ,Asie et Europe , les agents microbiens laitiers en cause sont découverts au XVII ème siècle et les applications industrielles se développent au XX ème siècle (**Monsallier,2009**).

De par leurs aptitudes technologiques acidifiantes, protéolytiques, lipolytiques, aromatisantes, texturantes et antimicrobiennes, ces agents microbiens laitiers jouent un rôle essentiel dans la fabrication d'une gamme variée de produits laitiers.

Les diverses études sur la microbiologie des laits frais montrent qu'il s'agit de véritables écosystèmes microbiens, à l'intérieur desquels il existe de nombreuses interactions entre les différents micro-organismes et avec le milieu dans lequel ils vivent. Ainsi, suivant les conditions physico-chimiques du milieu, de la saison , de l'alimentation des vaches laitières, de l'environnement, à un moment donné de la lactation, certains micro-organismes se multiplient activement alors que d'autres tendent à disparaître. Les équilibres entre les différents groupes de micro-organismes et l'importance relative des populations sont donc en constante évolution.

Le rôle prépondérant de ces microflore dans l'élaboration des aptitudes technologiques et l'établissement des caractéristiques sensorielles des produits laitiers a été démontré par de nombreuses études portant sur des technologies différentes. La suppression de la microflore du lait cru (par microfiltration, pasteurisation) entraîne une diminution du goût et des différences dans les arômes des produits dérivés du lait frais (**Verdier et al., 2005**)

Ce travail se propose donc :

D'apprécier la diversité de la microflore lactique du lait frais produit par le cheptel bovin de la ferme expérimentale du laboratoire des sciences et techniques de production de Hassi-Mamèche

Cette diversité de la microflore lactique sera étudiée par différentes techniques d'identification selon différents niveaux de spécificités avec une approche sur les propriétés biochimiques des souches isolées.

Partie bibliographie

Chapitre I : le lait

I. Le lait de vache

I.1 Définitions du lait :

Le lait a été défini en 1908, au cours du Congrès International de la Répression des Fraudes à Genève comme étant : « Le produit intégral de la traite totale et ininterrompue d'une femelle laitière bien portante, bien nourrie et non surmenée.

Le lait doit être recueilli proprement et ne doit pas contenir de colostrum» (**Alais, 1975**).

La dénomination « lait » est réservée exclusivement aux produits de la sécrétion mammaire normale, obtenus par une ou plusieurs traites, sans aucune addition ni soustraction et n'ayant pas été soumis à un traitement thermique (**JORA N°69,1993**).

Selon le **Codex Alimentarius en 1999** le définit comme étant la sécrétion mammaire normale d'animaux de traite obtenue à partir d'une ou plusieurs traites, sans rien y ajouter ou en soustraire, destiné à la consommation comme lait liquide ou à un traitement ultérieur.

Selon (**Deforges et al. en 1999**), le lait cru est un lait non chauffé au-delà de 40°C ni soumis à un traitement non thermique d'effet équivalent notamment du point de vue de la réduction de la concentration en micro-organismes.

I.2 Composition du lait de vache :

Le lait de vache est un lait caséineux. Sa composition générale est représentée au **tableau (N°1)**. Les données sont des approximations quantitatives, qui varient en fonction d'une multiplicité de facteurs : race animale, alimentation et état de santé de l'animal, période de lactation, ainsi qu'au cours de la traite. Il reste que la composition exacte d'un échantillon de lait ne peut s'obtenir que par analyse (**Roudaut et Lefrancq, 2005**).

Tableau N°1: composition typique du lait de vache(**Alais C., Linden G. et Miclo L. (2008)**)

Constituants	Concentration (g/l)
Eau	905
Glucides : lactose	49
Lipides	35
Matière grasse proprement dite	34
Lécithine (phospholipide)	0,5
Partie insaponifiable (stérols, carotène, tocophérols)	0,5
Protides	34
Caséines	27
Protéines solubles (Globulines, Albumines)	5,5
Substances azotés non protéiques	1,5
Sels	9
De l'acide citrique	2
De l'acide phosphorique	2,6
De l'acide chlorhydrique (Na Cl)	1,7
Vitamines, enzymes, gaz dessous	Traces
Extrait sec total	127
Extrait sec non dégraissé	92

I.2.1.L'eau :

L'eau est l'élément quantitativement le plus important : 900 à 910 g par litre. Elle est dispersés tous les autres constituants du lait, tous ceux de la matière sèche (**Mathieu, 1998**).

I. 2.2. Les lipides :

La matière grasse du lait se composent principalement de triglycérides, phospholipides et une fraction insaponifiable constituée en grande partie de cholestérol et de β -carotène. (**FILQ, 2002**).

Tableau N°2. Composition en lipides de lait de vache, **CHILLIARD, 1996**).

Composition (%)	Lait de vache
Triglycérides	98
Glycérides partielles	0.5
Cholestérol	0.3
Phospholipides	0.9
Acides gras libres	0.4

I.2.2.1 Les phospholipides et les acides gras :

Les phospholipides représentent moins de 1% de la matière grasse, sont plutôt riches en acides gras insaturés. Le lait de vache est pauvre en acides gras essentiels (acide linoléique et acide linoléique. (**CHILLIARD, 1996**).

I.2.2.2 Les acides gras :

Le lait de vache est un peu riche en acides gras à chaîne moyenne (C6, acide caproïque, C8, acide caprylique, C10, acide caprique)

Le lait de vache un peu plus riche en acides butyrique (C4), et acides oléique (C18) (**CHILLIARD, 1996**).

I.2.2.3 Les triglycérides :

Les triglycérides, à bas point de fusion, sont au centre du globule et les triglycérides solides, à plus haut point de fusion, se superposent aux précédents. Les triglycérides constituent près de 98% de la matière grasse présente dans le lait.

Les matières grasses du lait ont la forme de petits globules sphérique qui sont invisible à l'œil nu. La dimension des globules des matières grasses est d'environ 0,1 à 20µm .

I.2.3. Les protéines :

Les protéines sont des éléments essentiels au bon fonctionnement des cellules vivantes et elles constituent une part importante du lait et des produits laitiers (**Jean Amiot et all, 2002**).

On les classe en deux catégories, d'après leur solubilité dans l'eau :

- Les caséines : (α -S1B, α -S2A, β -A2, κ) qui se regroupent sous forme de micelles ;
- Les protéines de sérum : (bêta-lactoglobuline, alpha-lactalbumine) retrouvent sous forme d'une solution colloïdale et qui précipitent sous l'action de la chaleur.

I.2.3.1. Les caséines :

Les caséines forment près de 80% de toutes les protéines présentes dans le lait ;L'éludification de la structure tridimensionnelle Leur point isoélectrique (pHi) moyen de pHi 4,65. Permet d'affirmer que les caséines se regroupent sous forme sphérique appelée micelle.

Les micelles de protéine sont constituées de 92% de protéine et de 8% de minéraux.

La caséine α S1 est la protéine la plus abondante du lait puisqu'elle représente environ 40% des caséines.

- La caséine α S2 représente environ 10% des caséines.
- La caséine β est une protéine qui constitue environ 35% des caséines.
- La caséine K ne représente qu'environ 12% des caséines.
-

I.2.3.2. Les protéines de sérum :

Les protéines de sérum, qui représentent environ 20% des protéines totales, se retrouvent sous forme de solution colloïdale. Les deux principales sont la β -lactoglobuline et l' α -lactalbumine ; les autres protéines du sérum sont les immunoglobulines, le sérum albumine bovine (SBA) et la lactoferrine.

- **β -lactoglobuline :**

-

β -lactoglobuline est la plus importante des protéines du sérum puisqu'elle en représente environ 55% . Son point isoélectrique est de 5,1 la lactoglobuline est une protéine de 162 acides aminés comportant 7 variantes génétiques.

- **α -lactalbumine :**

α -lactalbumine est une protéine de 123 acides aminés comportant trois variantes génétiques. Métalloprotéine (elle possède un atome de calcium par mole) du type globuline (structure tertiaire quasi sphérique). Elle présente environ 22% des protéines du sérum (Vignola, 2002).

- **Immunoglobulines :**

Ce sont glycoprotéines de haut poids moléculaire responsable de l'immunité. On distingue trois grandes classes d'immunoglobulines : IgA, IgG, IgM. Elles sont très abondantes dans le colostrum. Les immunoglobulines sont des protéines du sérum les plus sensibles à la dénaturation thermique (Thapon, 2005).

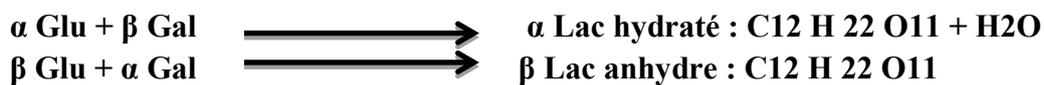
- **Sérum albumine bovine (SBA) :**

Représente environ 7% des protéines du sérum. Elle est constituée de 582 résidus d'acides

aminés. Comptant un seul variant génétique est identique au sérum albumine sanguin (Vignola, 2002).

I.2.4. Les glucides :

Le sucre principal du lait est le lactose ; c'est aussi le composé prépondérant de la matière sèche totale. Sa teneur s'élève en moyenne à 50g par litre. C'est un disaccharide constitué par de l' α ou β glucose uni à du β galactose, ce qui est à l'origine de la présence de 2 lactoses (Luquet, 1985).



Le lactose est fermentescible par de nombreux micro-organismes et il est à l'origine de plusieurs types de fermentations pouvant intervenir dans la fabrication de produits laitiers (Morrissey, 1995).

- **Fermentation lactique** : due aux bactéries lactiques naturelles ou ajoutées (ferments lactiques) qui utilisent le lactose en le transformant en acide lactique.

Fermentation propionique : due aux bactéries propioniques qui transforment le lactose en acide propionique et en acide acétique responsables de la saveur des fromages à pâte cuite et en gaz carbonique induisant l'ouverture de ces fromages (Luquet, 1985).

- **Fermentation butyrique** : par des bactéries du genre Clostridium qui utilisent l'acide lactique déjà produit en le transformant en acide butyrique, responsable d'odeurs putrides et de goût piquant, et en gaz carbonique et hydrogène. Ces substances induisent le gonflement tardif des fromages, en particulier à pâte cuite.

- **Fermentation alcoolique** : due à des levures qui hydrolysent le lactose en glucose et galactose et qui transforment ensuite le glucose en alcool éthylique.

I.2.5 Les minéraux :

La matière minérale du lait (7g à 7,5g/l) est fondamentale d'un point de vue nutritionnel et technologique. Il est possible de doser les matières minérales ou cendres du lait par une méthode de calcination à 550°C (Luquet, 1985).

Les minéraux sont présents, soit en solution dans la fraction soluble, soit sous forme liée dans la fraction insoluble (ou colloïdale). Certains minéraux se trouvent exclusivement à l'état dissous sous forme d'ions (sodium, potassium et chlore) et sont particulièrement biodisponibles. Les ions calcium, phosphore, magnésium et soufre existent dans les deux fractions (Mathieu, 1998).

Il existe un équilibre entre les formes solubles et colloïdales, d'une part, et entre les formes

ionisées et non dissociées d'autre part. Cet état est précaire parce qu'il est sensible à divers facteurs, notamment au pH, à la température, et à la concentration ou à l'addition de calcium. Toute altération de ces équilibres modifie la stabilité du lait, notamment les propriétés de la caséine native.

En raison de la présence concomitante de lactose et de phosphopeptides (produits d'hydrolyse de la caséine), les minéraux sont, de tous les éléments du lait, ceux qui sont les mieux adsorbés et retenus. A cet égard, le rapport calcium/phosphore (Ca/P) du lait de vache (voisin de 1,2), bien qu'inférieur à celui du lait maternel(voisin de 2,2), est de loin supérieur à celui des autres denrées alimentaires, faisant du lait une excellente source de calcium et un bon correctif des rations pauvres en calcium (FAO, 1995).

Tableau N°3: composition minéral du lait (Veisseyre, 1975).

Constituants	Teneurs moyennes g/l
Potassium	1.5
Calcium	1.25
Sodium	0.5
Magnésium	0.13
Chlore	1.0
Phosphore totale	0.95
Acide citrique	1.75

I.3. Biocatalyseurs :

I.3.1 Enzymes :

Ce sont des substances organiques de nature protidique, produites par des cellules ou des organismes vivants, agissant comme catalyseurs dans les réactions biochimiques. Plus de 60 enzymes principales ont pu être isolées du lait ou dont l'activité a été déterminée. La moitié d'entre elles sont des hydrolases (Blanc, 1982 ; Pougheon, 2001). Ces enzymes peuvent jouer un rôle très important en fonction de leurs propriétés :

➤ Lyses des constituants originaux du lait ayant des conséquences importantes sur le plantechnologique et sur les qualités organoleptiques du lait (lipases, protéases). Ainsi, on distingue des protéases original du lait ; la plasmine est le composant majoritaire (elle provient du sang et migre via la glande mammaire), et des protéases d'origine microbienne. Le genre Pseudomonas et tout particulièrement l'espèce Pseudomonas fluorescent , synthétise des protéases exo cellulaires thermostables. Il est également à souligner que dans les laits de mammites, le nombre de cellules somatiques peut être considérablement accru, le niveau de protéolyse est nettement plus élevé que dans les laits normaux (Miranda et Gripon, 1986).

➤ Rôle antibactérien, elles apportent une protection au lait (lactoperoxydase et lysozyme).

➤ Indicateurs de qualité hygiénique (certaines enzymes sont produites par des bactéries et des leucocytes), de traitement thermique (phosphatase alcaline, peroxydase, acétyl estérase, sont des enzymes thermosensibles) et d'espèces (test de la xanthine oxydase pour détecter le lait de vache dans le lait de chèvre) (**Pougheon,2001**).

I.3.2 Vitamines :

Ce sont des molécules complexes de taille plus faible que les protéines, de structure très variées ayant un rapport étroit avec les enzymes, car elles jouent un rôle de coenzyme associée à une apoenzyme protéique.

On classe les vitamines en deux grandes catégories :

- Les vitamines hydrosolubles (vitamines du groupe B et vitamine C) de la phase aqueuse du lait
- Les vitamines liposolubles (vitamines A, D, E, et K) associées à la matière grasse, certaines sont au centre du globule gras et d'autres à sa périphérie (**Debry, 2001**).

Tableau N°4: Composition vitaminique moyenne du lait cru (AMIOT et al., 2002)

Vitamines	Teneur moyenne
Vitamines liposolubles	
Vitamine A (+carotènes)	40µg/100ml
Vitamine D	2.4µg/100ml
Vitamine E	100µg/100ml
Vitamine K	5µg/100ml
Vitamines hydrosolubles	
Vitamine C (acide ascorbique)	2mg/100ml
Vitamine B1 (thiamine)	45µg/100ml
Vitamine B2 (riboflavine)	175µg/100ml
Vitamine B6 (pyridoxine)	50µg/100ml
Vitamine B12(cyanocobalamine)	0.45µg/100ml
Niacine et niacinamide	90µg/100ml
Acide pantothénique	350µg/100ml
Acide folique	5.5µg/100ml
Vitamine H (biotine)	3.5µg/100ml

I.3.3 Matière azotée :

La matière azotée du lait englobe deux groupes, les protéines et les matières non protéiques qui représentent respectivement 95% et 5% de l'azote minéral du lait (**Goursaud, 1985**)
Les protéines se répartissent en deux phases : une phase micellaire et une phase soluble.
La phase micellaire représente la caséine totale (80% des protéines du lait) du lait. Elle est formée par quatre protéines individuelles:

- Alpha-caséines ou caséines α_1 36 % et α_2 10 % ;
- Bêta-caséine ou caséine β 34 % ;
- Kappa caséine ou caséine κ 13 % ;

- Gamma-caséines ou caséine γ 7 % (produits de la protéolyse de la β -caséine) (**Goy et al., 2005**).

Une micelle de caséine contient environ 92 à 93% de protéines, les caséines, et 8% de minéraux. La partie minérale de la micelle comporte 90% de phosphate de calcium et 10% d'ions citrate et de magnésium (**Cayot et Lorient, 1998**).

La présence de phosphate de calcium lié à la caséine est l'une des forces responsables de la stabilité de la structure des micelles de caséine (**Marchin, 2007**).

Une propriété importante des micelles est de pouvoir être déstabilisée par voie acide ou par voie enzymatique et de permettre la coagulation. Elle constitue le fondement de la transformation du lait en fromage et en laits fermentés (**Ramet, 1985**).

L'autre fraction protéique (environ 17%) du lait est présente dans le lactosérum. Les deux principales protéines sériques sont la β -lactoglobuline et l' α -lactalbumine (**Cayot et Lorient, 1998**).

1.3. Caractéristiques physico-chimiques du lait

1 . La densité :

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

2 . L'acidité de titration ou acidité Dornic :

L'acidité de titration indique le taux d'acide lactique formé à partir du lactose. Un lait frais a une acidité de titration de 16 à 18°Dornic (°D). Conservé à la température ambiante, il s'acidifie spontanément et progressivement (**Mathieu, 1998**). C'est la raison pour laquelle on distingue l'acidité naturelle, celle qui caractérise le lait frais, d'une acidité développée issue de la transformation du lactose en acide lactique par divers microorganismes (**CIPC lait, 2011**).

3. Le point de congélation :

Le point de congélation du lait est l'une de ses caractéristiques physiques les plus constantes. Sa valeur moyenne, si l'on considère des productions individuelles de vache, se situe entre -0,54 °C et -0,55°C (**Mathieu, 1998**).

4. Le pH :

Le pH renseigne précisément sur l'état de fraîcheur du lait. Un lait de vache frais a un pH de l'ordre de 6,7. S'il y a une action des bactéries lactiques, une partie du lactose du lait sera dégradée en acide lactique, ce qui entraîne une augmentation de la concentration du lait en ions hydronium (H_3O^+) et donc une diminution du pH, car : $pH = \log 1 / [H_3O^+]$
A la différence avec l'acidité titrable qui elle mesure tous les ions H^+ disponibles dans

le milieu, dissociés ou non (acidité naturelle + acidité développée), reflétant ainsi les composés acides du lait (CIPC lait, 2011).

Un lait mammitieux, contenant des composés à caractéristiques basiques, aura un pH >7 et le colostrum un pH voisin de 6 (Luquet, 1985).

Tableau N°5 : Caractéristiques physico-chimiques du lait (VEISSEYRE R., 1975).

Caractéristiques	Valeurs
Densité a 15°C	1030-1034
Chaleur spécifique	0,93
Point de congélation	-0,55°C
PH	6,6 à 6,8
Acidité exprimée en degrés Dornic	16 à 18
Indice de réfraction à 20°C	1,35
Eau	900 - 910 g
Extrait sec total	
Matière grasse	35 - 45 g
Lactose	47 - 52 g
Matières azotées	33 - 36 g
Matières salines	9 - 9,5 g
Biocatalyseurs non dosables bu à l'état de traces: pigments, enzymes, vitamines	Traces
Gaz dissous: O2, N2 4	à 5 % du volume du lait à la sortie de la mamelle

1.4. Microflore de lait

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

1.4.1. Flore originelle

Le lait prélevé à partir d'un animal sain dans de bonnes conditions contient peu de germe (moins de 1000 germes/l) il s'agit essentiellement de germes saprophytes du pis et des canaux galactophores, tels que les *Microcoques*, *Streptocoques lactiques* et *Lactobacilles*. Le lait cru est protégé vis-à-vis des germes de contamination par des substances inhibitrices appelées "lactenines", mais l'action de celles-ci est de courte durée (1 heure environ) (**Guiraud et Galzy, 1980**).

La flore originelle des produits laitiers se définit comme l'ensemble des microorganismes retrouvés dans le lait à la sortie du pis, les genres dominants sont essentiellement des mésophiles (**Vignola, 2002**).

Ces microorganismes, plus ou moins abondants, sont en relation étroite avec l'alimentation (**Guiraud, 2003**) et n'ont aucun effet significatif sur la qualité du lait et sur sa production (**Varnam et Sutherland, 2001**). Le tableau 3 regroupe les principaux microorganismes originels du lait avec leurs proportions relatives.

Tableau N°6 : Flore indigène du lait cru (Amiot et al., 2002).

Microorganismes	Pourcentage (%)
<i>Micrococcus sp.</i>	30-90
<i>Lactobacillus</i>	10-30
<i>Streptococcus ou Lactococcus</i>	< 10
Gram négatif	<10

1.4.2.Flore decontamination

Cette flore est l'ensemble des microorganismes contaminant le lait, de la récolte jusqu'à la consommation. Elle peut se composer d'une flore d'altération, qui causera des défauts sensoriels ou qui réduira la durée de conservation des produits, et d'une flore pathogène dangereuse du point de vue sanitaire (**Vignola, 2002**).

Le lait se contamine par des microbes d'origines diverses :

- **Fèces et téguments de l'animal** : *Coliformes*, *Clostridies*, et éventuellement des *Entéobactéries* pathogènes (*salmonella*) ;
- **Sol** : *Streptomyces*, bactéries sporulées, spores fongiques, listéria ;
- **Laitière et aliments** : flore banale variée, en particuliers, *Lactobacilles*, *Clostridium butyriques*(Ensilages) ;
- **Air et eau** : flore diverse dont *pseudomonas*, bactérie sporulées, etc ;
- **Équipements de traite et de stockage du lait** : flore lactique, microcoque, *Lactobacilles*, *Streptocoques*, *Leuconostoc*, levure, cette flore sera souvent spécifique d'une usine à une autre ;
- **Manipulateurs** : *Staphylocoques* dans le cas de traite manuelle.
- **Vecteurs divers** : insectes en particulier, flore de contamination fécale (**GUIRAUD,1998**).

1.4.2.1.Contamination par l'animal :

Le lait renferme, lorsque l'animal est sous médication, des résidus d'antibiotiques qui sont à l'origine de perturbations importantes des processus de fermentation et de maturation des produits laitiers de large consommation tels que les yaourt, fromages et autres laits fermentés (**Ben Mahdi et Ouslimani, 2009**) .

Ces laits anormaux doivent être séparés du lait sain et ne pas être utilisés pour la transformation. La propreté des vaches a un impact significatif sur la santé du pis et en particulier sur le taux de mammites environnementales. Le maintien de la propreté du pis et des membres des vaches permet de diminuer la propagation d'agents pathogènes de l'environnement vers le canal du trayon.

Selon la zone de l'animal qui est souillée, on peut déterminer que les lieux dans l'étable où le niveau de propreté est inadéquat et ainsi apporter les correctifs nécessaires (**Levesque, 2004**).

1.4.2.2.Contamination au cours de la traite :

C'est en surface des trayons que l'on retrouve la plus grande diversité de groupes microbiens : une douzaine de groupes microbiens parmi les flores utiles, flores d'altération et pathogène sont systématiquement détectés. Les groupes microbiens utiles (bactéries lactiques) sont fortement dominants, leurs niveaux étant au moins 100 fois supérieures à ceux des groupes d'altération ou pathogènes (staphylocoques à coagulase positive). Pour un même réservoir,

des différences de niveaux et de composition microbienne existent et sont liées à la saison ; ainsi, en été, les surfaces des trayons abritent des niveaux moindres de tous les groupes microbiens ; par contre, dans les lactoducs, en été, on extrait des niveaux plus importants de *Pseudomonas* (germes d'altération). Pour une même saison, des différences de composition microbienne de ces réservoirs existent entre les exploitations : elles sont alors associées aux pratiques mises en oeuvre.

Ainsi, en hiver, le niveau et la composition de la charge microbienne présente en surface des trayons sont en lien avec la nature des litières et le confinement de l'ambiance (**Lemire, 2007**).

1.4.2.3. Contamination au cours du transport :

La collecte et le transport se font grâce à des camions-citernes réfrigérés qui récoltent régulièrement le lait dans les fermes. Ils doivent respecter un certain nombre de règles légales afin de livrer un lait de bonne qualité, notamment par le maintien du lait au froid qui a pour but d'arrêter le développement des microorganismes. Il constitue un traitement de stabilisation (**Weber, 1985**). Une altération de la qualité au cours du transport par une mauvaise réfrigération, peut avoir un impact grave sur la qualité du lait et engendrer des pertes financières importantes (**Jakob et al., 2011**).

1.4.3. Flore pathogène

L'animal, l'environnement et l'homme peuvent être la cause majeure de la présence de bactéries pathogènes dans le lait cru (**Vignola, 2002**). Parmi ces dernières, certaines sont retrouvées habituellement à un très faible niveau et ont peu de chance de se développer (*Brucella*, *Campylobacter fetus* et *Salmonella*). D'autres sont à un niveau appréciable et peuvent se multiplier, c'est le cas des bactéries mésophiles, telles que : *E. coli* et *Staphylococcus aureus* ou l'espèce psychrotrophe *Yersinia enterocolitica* (**Jacquet et Veisseyre, 1987**).

Les principaux micro-organismes pathogènes associés aux produits laitiers sont :

- *Salmonella sp*
- *Staphylocoques aureus*
- *Clostridium botulinum*
- *Clostridium perfringens*
- *Bacillus cereus*
- *Yersinia enterocolitica*
- *Listeria monocytogenes*
- *Escherichia coli*
- *Campylobacter jejuni*
- *Shigella sonnei*
- Certaines moisissures

Tableau 07 : les différentes sources de contamination du lait cru : (Hassan et al., 2002)

Sources	Genres
Personnel	Coliformes, <i>Selmonella</i> , <i>Entérocooccus</i> , <i>Stapylococcus</i>
Air	<i>Streptococcus</i> , <i>Micrococcus</i> , <i>Corynebactérium</i> , <i>Bacillus</i> Levure et Moisissures.
Intérieur du pis	<i>Streptococcus</i> , <i>Micrococcus</i> , <i>Corynebactérium</i>
Extérieur du pis	<i>Micrococcus</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Entérocooccus</i> , <i>Bacillus</i>
Fèces	<i>Eschérichia</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Listéria</i> , <i>Mycobactérium</i> <i>Selmonella</i>
Appareil de traite	<i>Micrococcus</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Bacillus</i> , Coliformes <i>Clostridium</i>
Litières	<i>Bacillus</i> , <i>Klebsiella</i>
Sol	<i>Clostridium</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Pseudomonas</i> <i>Mycobactérium</i>
Alimentation	Levure et Moisissures
Eau	<i>Clostridium</i> , <i>Listéria</i> , <i>Bacillus</i> , Bactérie lactiques Coliformes, <i>Pseudomonas</i> , <i>Corynebactérium</i> , <i>Alcaligenes</i>

1.4.4.Flore psychrotrophes

Il s'agit essentiellement de : Acinetobacteres, Pseudomonas et Flavobacterium qui se développent à une température de 3 à 7°C (**Hicks et al., 1985; Jooste et al., 1985 in Leveau et Bouix, 1993**). *Listeria monocytogenes* un microorganisme psychrotolérant est capable de se multiplier aussi à une température comprise entre 0°C et 10°C (**Rosset, 2001**).

1.4.4.1.Les causes d'apparition :

- Durée de conservation trop longue entre la traite et le traitement thermique
- Température inadéquate de conservation, non-respect de la chaîne du froid
- Mauvais assainissement des équipements lors des transformations ou de la traite
- Mauvaise qualité de l'eau utilisée
- Contamination par l'air due soit à la qualité de l'air, à l'ouverture prolongée des fenêtres ou des portes ou à l'utilisation de récipients sans couvercle
- Contamination par le sol

Chapitre II

La flore lactique du lait

I.1. Présentation des bactéries lactiques

Décrites pour la première fois par Orla-Jensen au début du XXe siècle, les bactéries lactiques 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 classier 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**).

A 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**).

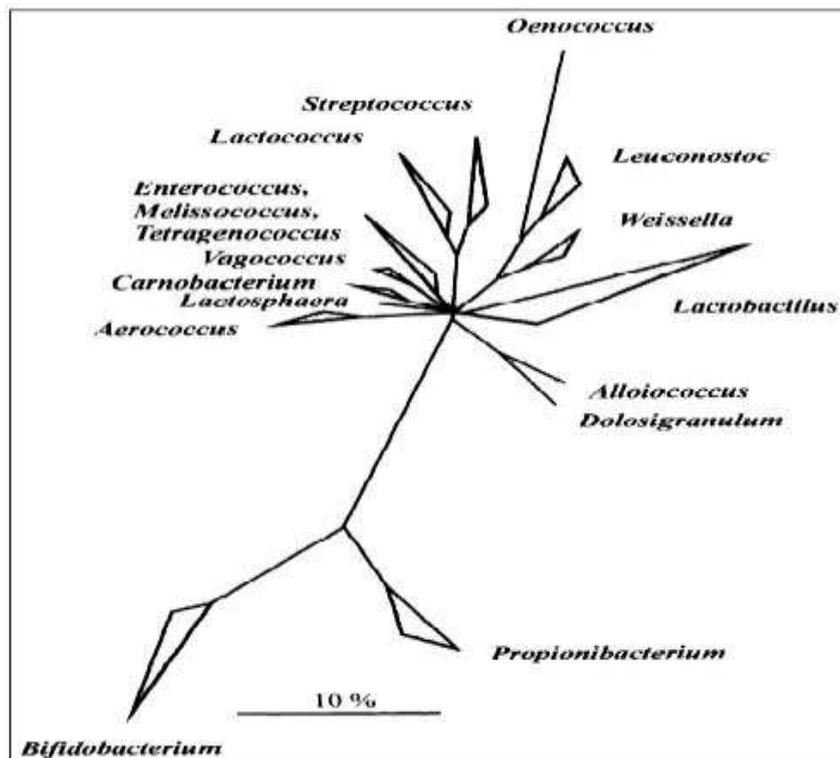


Figure 01 : Arbre phylogénétique des principaux genres de bactéries lactiques et des genres associés, obtenu par analyse des ARNr 16S (Stiles et Holzapfel, 1997)

I.4. Caractéristiques des principaux genres des bactéries lactiques

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* (Pot et al., 1996 ; Pot, 2008).

I.4.3. Le genre *Streptococcus*

Le genre *Streptococcus* est toujours large et la classification est très mouvementée. Ce genre est généralement divisé en trois groupes : pyogène (la plus part des espèces pathogènes et hémolytiques), oral (tel que *St. salivarius*, *St. bovis*) et les autres streptocoques (Scheilfer, 1987).

La seule espèce de streptocoques qui soit utilisée en technologie alimentaire est *Streptococcus thermophilus* qui a été incluse dans le groupe des « autres streptocoques », mais ensuite transféré au

groupe des streptocoques oraux à cause de leur degré d'homologie avec l'ADN de *Streptococcus salivarius* (Stiles et Holzapfel, 1997).

Streptococcus thermophilus se différencie par son habitat (lait et produits laitiers) et son caractère non pathogène. La résistance à la température, la capacité de croître à 52°C et le nombre limité des hydrates de carbones permettent de distinguer les *St. thermophilus* de la plupart des autres streptocoques (Haddie, 1986 ; Pilet et al., 2005).

I.4.4. Le genre *Enterococcus*

Ce genre regroupe les streptocoques fécaux qui représentent une hémolyse de type λ et β et qui appartiennent au groupe D. Ce sont des commensaux de l'intestin. Les espèces rencontrées dans l'alimentation sont essentiellement *En. faecalis* et les espèces proches. Les entérocoques sont des coques qui peuvent être mobiles, homofermentaires, généralement différenciés par la fermentation

de l'arabinose et le sorbitol, ils croissent entre 10°C et 45°C (Tamime, 2002 ; Ho et al., 2007).

I.4.5. Les genres *Leuconostoc*, *Oenococcus* et *Weissella*

Ils ressemblent les coques lenticulaires en paires ou en chaînettes mésophiles, qui possèdent un caractère hétérofermentaire marqué, avec production d'acide lactique (isomère D), de CO₂ et d'éthanol. Les caractéristiques telles que l'hydrolyse de l'esculine, la formation de dextrane, les conditions de croissance, la capacité à croître à différents pH et température, l'assimilation de citrate et/ou malate permettent la différenciation entre les genres *Leuconostoc* et *Weissella* (Pilet et al., 1998 ; Ho et al., 2007).

Actuellement, le genre *Leuconostoc* comprend quatorze espèces, ils sont également anaérobies facultatifs et exigeants au point de vue nutritionnel et leur croissance est toujours lente. Le développement des leuconostoc entraîne souvent l'apparition d'une viscosité dans le milieu grâce à la production des exopolysaccharides. Les leuconostoc principalement *Ln. mesenteroides* ssp. *cremoris* et *Ln. lactis* sont utilisés en association avec les lactocoques dans l'industrie laitière pour produire en plus de l'acide lactique et le CO₂, des substances aromatiques telles que le diacétyle et

l'acétoïne à partir des citrates du lait (Hassan et Frank, 2001 ; Guiraud, 2003 ; Ogier et al., 2008).

Récemment, l'espèce *Oenococcus oeni* et certaines espèces de lactobacilles hétérofermentaires ont été groupées avec *Leuconostoc paramesenteroides* dans le nouveau genre *Weissella* (Stiles et Holzappel, 1997).

I.4.6. Les genres *Pediococcus* et *Tetragenococcus* et *Leuconostoc oenos*

isolée de vins a été classée dans un nouveau genre,

Les *Pediococcus* sont des coques homofermentaires dont la particularité est le regroupement en tétrade. Ils sont mésophiles, le plus souvent incapable d'utiliser le lactose, et leur développement nécessite la présence de divers facteurs de croissance. Certaines espèces se distinguent par leur capacité à se développer à des teneurs en sels très élevées, comme

Pediococcus halophilus, renommé *Tetragenococcus halophilus* et *Tetragenococcus muriaticus* qui tolère jusqu'à 18% de NaCl (Pilet et al., 2005).

Les espèces de *Tetragenococcus* ont un rôle crucial dans la fabrication des produits alimentaires à concentration élevée en sel comme les sauces de soja, alors que les pedicoques sont parfois utilisés comme levains lactiques pour les charcuteries (Guiraud et Rosec, 2004 ; Tosukhowong et al., 2005).

I.4.7. Le genre *Bifidobacterium*

Le genre *Bifidobacterium* est considéré comme faisant partie du groupe des bactéries lactiques grâce à la similarité de ses propriétés physiologiques et biochimiques et à sa présence dans le même habitat écologique, tel que le tube gastro-intestinal. Ces microorganismes sont phylogénétiquement sans rapport avec ces dernières. Ils sont davantage liés au phylum *Actinobacteria* (anciennement *Actinomycètes*) des bactéries Gram positif dont l'ADN est à haut pourcentage de G +C. Les bifidobactéries se caractérisent par leur forme très irrégulière souvent en forme V mais pouvant être coccoïdes, la présence d'une enzyme, la fructose-6-phosphate phosphocétolase, celle-ci leur permet de fermenter les hexoses en produisant de l'acide acétique et de l'acide lactique. Leur température de croissance varie de 36°C à 43°C (Axelsson et al., 2004 ; Pilet et al., 2005 ; Ho et al., 2007).

I.5. 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). Il s'agit des voies homofermentaire (Embden- Meyerhof-Parnas, EMP) et hétérofermentaire (voie des pentoses-phosphate) (**Atlan et al., 2008**).

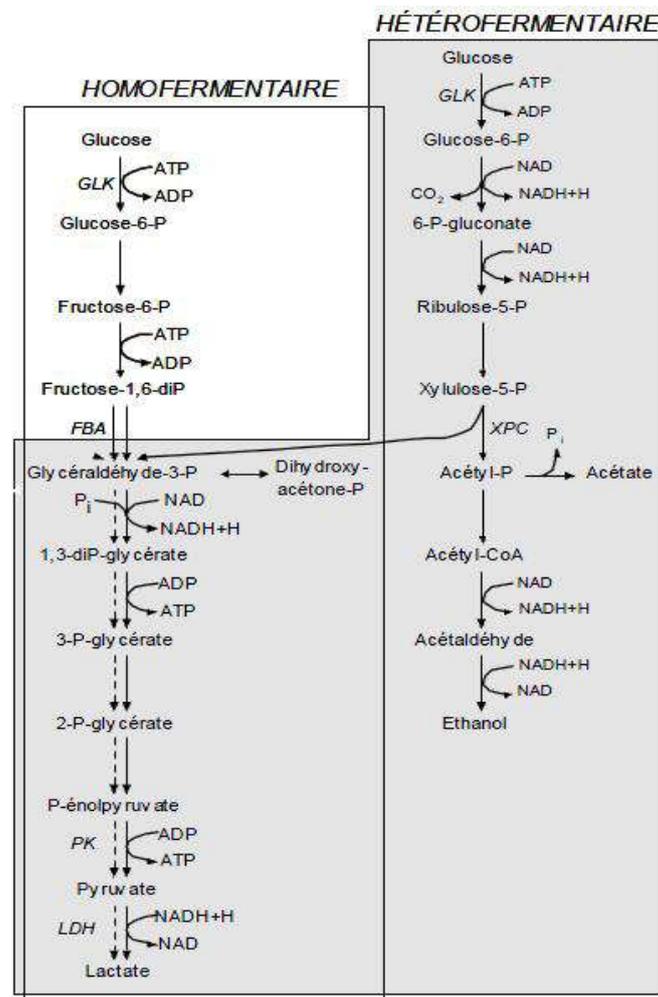


Figure 02 : Voies fermentaires de la dégradation du glucose (**Atlan et al., 2008**).

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

I.5.1. Voie homofermentaire ou EMP

Les bactéries lactiques homofermentaires comprennent les espèces de lactocoques, pedicoques, 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**).

I.5.2. Voie hétérofermentaire ou voie des pentoses phosphate

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 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**).

I.6. Métabolisme azoté des bactéries lactiques

De fait de leurs nombreuses auxotrophies pour les acides aminés, la croissance des bactéries lactiques repose sur leur système protéolytique. Ces systèmes comportent des protéases intracellulaires, des systèmes de transport spécifiques pour les peptides et une multitude de peptidases intracellulaires. Les systèmes protéiques des lactocoques et des lactobacilles sont remarquablement similaires, en ce qui concerne leurs composants et leurs modes d'action (**Law et Haandrikman, 1997 ; Savijoki et al., 2006**).

Les études du système protéolytique ont été menées essentiellement pour le genre *Lactococcus* et ont permis l'établissement d'un modèle de la protéolyse en trois étapes (figure 03) : la première étape fait intervenir une protéase ancrée à la surface bactérienne, appelée protéase de paroi (ou PrtP). 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**).

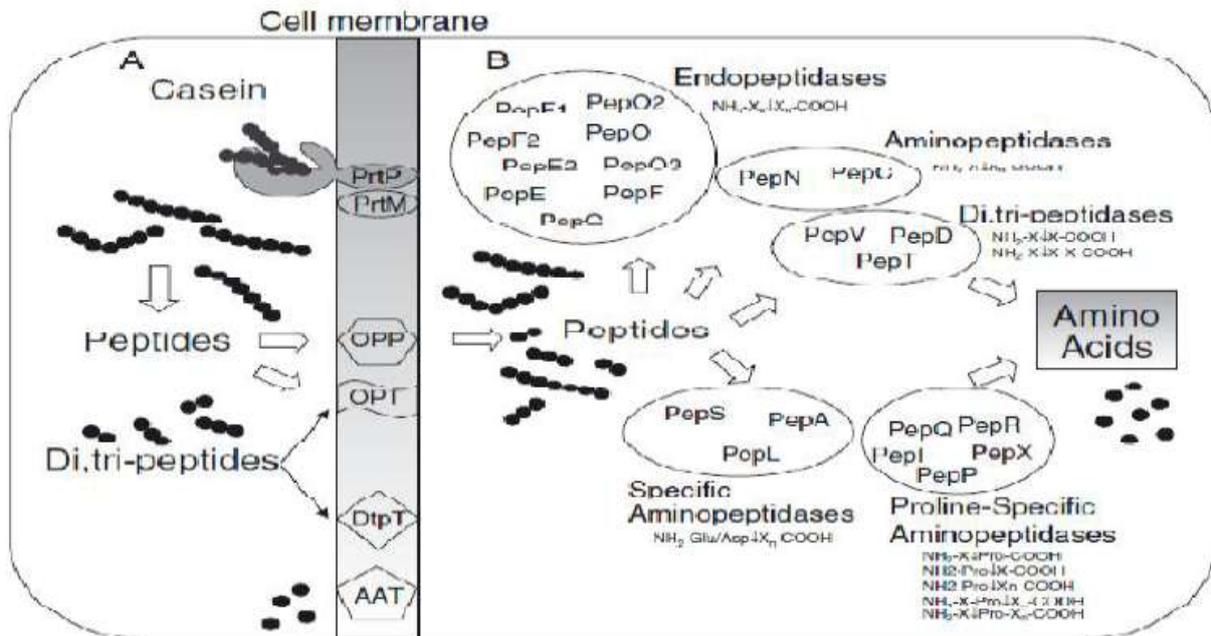


Figure 03 : Schéma du système protéolytique de *Lactococcus lactis* (Atlan et al., 2008).

I.7. Aptitudes technologiques

1. 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

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

2. 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).

3. 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).

4. 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).

5. 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*

ssp. 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 ssp. cremoris* est très prometteuse pour la structure et la viscosité des produits laitiers fermentés (Leroy et De Vuyst, 2004 ; Ho et al., 2007).

6. 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 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 diacétyle 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).

7. Performance

La sélection d'un ferment lactique doit prendre en compte des critères de performance des bactéries.

Les bactéries devront répondre à certaines des spécificités suivantes (Béal et al., 2008) :

- Résistance aux bactériophages et aux traitements mécaniques ;
- Tolérance aux inhibiteurs de croissance (antibiotiques, chlorure de sodium, saccharose, l'acidité, l'éthanol et la température élevée) ;

- Aptitude à la congélation ou à la lyophilisation et à la conservation ;
- Comportement en présence d'oxygène ;
- Croissance à des températures non optimales ;
- Compatibilité avec d'autres souches ;
- Facilité d'emploi.

I.8. Applications industrielles des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques présentent des activités métaboliques assez diversifiées et une capacité d'adaptation à différents environnements. Cette diversité est responsable de leur large gamme d'applications à l'échelle industrielle (**Streit et al., 2007**).

Dans l'industrie alimentaire, ces microorganismes permettent la conversion d'une grande variété de matières premières, conduisant ainsi à de nombreux produits : les saucissons, les laits fermentés, les fromages, les olives fermentés et certains vins. Parmi ces applications, l'industrie laitière est, sans doute, le plus grand utilisateur de ferments lactiques commerciaux (**Axelsson, 2004 ; Streit et al., 2007**).

Les bactéries lactiques sont également utilisées dans l'industrie chimique (production d'acide lactique), dans le domaine médical (notamment pour le traitement de dysfonctionnements intestinaux) et dans l'industrie des additifs alimentaires (production d'exopolysaccharides). Elles sont aussi utilisées pour la production de bactériocines et des protéines thérapeutiques (**Rodriguez et al., 2003**).

Deuxième partie

Matériel et méthodes

1-Protocole général :

L'intégralité de notre étude a été réalisée au Laboratoire des Sciences et Techniques de Production Animale de l'Université Abdelhamid IBN BADIS de Mostaganem, sis à Hassi-Mamèche. Le travail a été réparti comme suit :

1-1 Préparation des milieux de cultures : du 08/04 /2018 au 14/04/2018

1-2 Etude expérimentale : du 15 /04 /2018 au 20 /05 /2018 et Elle a été définie comme suit :

- Isolement et identification des bactéries lactiques à partir de 04 échantillons de lait frais issu de 02 vaches laitières et de 02 traites (une du matin et l'autre du soir)
- Caractérisation biochimique des isolats

2-Matériel :

2-1 Matériel biologique :

2-1-1Prélèvement des échantillons de lait :

Les laits ont été prélevés au niveau de la ferme expérimentale de Hassi-Mamèche

Dans notre expérimentation, nous avons utilisé le matériel biologique suivant :

Lait frais : Des échantillons de lait ont été prélevés aseptiquement dans des récipients stériles des 02 vaches laitières, et conservés à basse température 4°C

jusqu'à la mise en route des analyses expérimentales au laboratoire.

-Un échantillon de la traite du matin .

-Un deuxième échantillon de la traite du soir .

Les laits récupérés sont issus d'un cheptel bovin sain de race Prim' Holstein ; conduit sous d'un système d'élevage semi-intensif traditionnel.. Les vaches âgées de quatre ans (4) (**Code :** 3034, 2748) sont en période de haute lactation. La collecte du lait est manuelle, précédée d'un nettoyage des mamelles.

La Prise de l'échantillon du lait manuellement (voire annexe A)

2-2 Analyses physico-chimiques : Les analyses physico-chimiques ont été réalisées avec un Lactoscan SP (milkalyzer) (annexe B). Les paramètres suivants ont été mesurés : **Mesure du pH, de l'extrait sec ; mesure du pH, de l'extrait sec total, de la matière grasse, de la matière protéique et du taux de lactose:**

2-3 Analyses microbiologiques :

2-3-1 Milieux utilisés : Les milieux utilisés sont :

- a- Milieu pour la culture des bactéries lactiques ont été respectivement les suivants :
 - Milieu M17 Gélosé et en bouillon (annexe C)
 - Milieu MRS Gélosé et en bouillon (annexeC)
- b- Bouillons d'identification sélectifs ont été respectivement les suivants :
 - Milieu BEA en bouillon (annexeC)
 - Bouillon hypersalé (annexeC)

2-3-2 Méthodes : Notre étude a été réalisée come suit :

2-3-2-1 Isolement des bactéries lactiques :

2-3-2-1-1 Préparation de la suspension mère :

La suspension mère a été préparée en réalisant des dilutions décimales adaptées à l'échantillon ont été effectuées.

2-3-2-1-2 Dénombrement microbiologique de la suspension mère :

Des aliquotes des échantillons ont été prélevées et étalées sur milieu mixte de Man-Rogosa-Sharpe (MRS) agar (additionné d'acide sorbique), et de M17 agar additionné d'acide sorbique et incubés à 30°C et 45°C pendant 48-72 heures .Les colonies ont été comptées pour chaque dilution pour déterminer le nombre d'UFC/ml

Les colonies seront comptées pour chaque dilution pour déterminer le nombre d'UFC /g en utilisant la formule suivante :

$$\text{UFC/g} = \text{nombre de colonies} \times 1/\text{Ve} \times 1/\text{D}$$

Ve : étant le volume d'ensemencement et D : étant la dilution prise en compte.

Remarque : Trois (03) répétitions d'analyse de la flore lactique totale ont été réalisées sur les trois (03) échantillons de lait frais et cela dans le but de déterminer la dominance des bactéries lactiques pour chaque lait.

2-3-2-2 Analyse préliminaire des isolats : Pré-identification

La pré-identification a comporté des tests rapides qui permettent l'orientation de l'identification : par l'étude morphologique des bactéries lactiques sur un aspect macroscopique et microscopique.

- Observation microscopique à l'état frais : l'examen direct à l'état frais a permis d'apprécier la morphologie des bactéries, leurs groupements, leur abondance, et observer leur mobilité.
- Observation microscopique par coloration : la coloration a permis de détecter, classer ou identifier les bactéries ou encore pour observer les composants bactériens particuliers.
- Purification des colonies : La purification consiste à réaliser des repiquages successifs sur gélose et bouillon MRS-M17, avec une incubation à 30°C et 45°C pendant 24 à 48 h jusqu'à l'obtention de colonies de même taille, de même forme et de même couleur renseignant ainsi sur la pureté des souches (**Idoui et al., 2008**) .
- Mise en suspension les colonies purifiées sur bouillon MRS et M17, incubation à 30 à 45 °c et lecture après 24 à 48 heures selon la turbidité (suspension intense)
- Dernière vérification au microscope : appréciation de la morphologie des bactéries, leurs groupements et de leur abondance.

Toutes les observations microscopiques à l'état frais ont été réalisées sur un microscope optique x1000

2-3-2-3 Caractérisation biochimique des isolats obtenus :

Les colonies apparemment caractéristiques des groupes bactériens à étudier seront caractérisées biochimiquement comme suit :

Isolats purifiés différenciés par la recherche de la catalase et la coloration de Gram.

2-3-2-3-1 Test de la catalase :

Ce test a été réalisé selon le protocole expérimental décrit par (**Prescott et al., 2003**).

Ce test consiste à mettre une colonie prélevée du milieu MRS gélosé à l'aide d'une anse stérile dans de l'eau oxygénée. Le dégagement de bulles de gaz signifie qu'il y a production de l'enzyme catalase et que le test est positif.

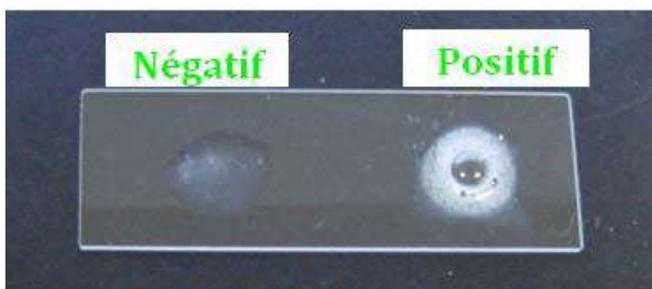


Figure 4: Test de catalase

2-3-2-3-2 Coloration de Gram :

La coloration de Gram a été effectuée selon le protocole décrit par (**Prescott et al ., 2003.**)(annexe E)

2-3-2-3-3 Croissance à différentes températures : Ce test est important car il permet de distinguer les bactéries lactiques mésophiles des bactéries lactiques thermophiles. Après inoculation du bouillon MRS par les cultures pures, les tubes sont incubés pendant 24h à 48h aux températures 30°C, 37°C et 45°C, Au bout de ce délai, la croissance est appréciée par examen des milieux. Les bactéries mésophiles poussent à 30°C alors que les bactéries thermophiles ne le font pas (**Guiraud, 1998**).

2-3-2-3-4 Culture sur milieu hypersalé : La croissance en présence de différentes concentrations de chlorure de sodium (NaCl) donne des renseignements précieux pour l'identification. Les cultures à tester ont étéensemencées sur des bouillons hypersalés à 4% et à 6.5% de NaCl. Après une incubation à 37°C pendant 24h, l'aptitude à croître sur ces milieux se traduit par l'apparition d'un trouble(**Badis et al, 2005**).

2-3-2-3-5 Recherche de type fermentaire : Ce test permet de différencier les bactéries lactiques homofermentaires de celles hétérofermentaires. Il consiste à mettre en évidence la production de gaz (CO₂). Pour se faire, le milieu Gibson-Abdelmalek préalablement fondu, refroidi et solidifié a étéensemencé par les cultures bactériennes par piqûre centrale, puis un bouchon de la gélose blanche stérile a été coulé en surface. L'incubation est faite à 37°C pendant 7 jours. Le développement d'une bactérie homofermentaire ne provoque pas de discontinuité entre le milieu et le bouchon de la gélose blanche. Le gaz produit par un métabolisme hétérofermentaire pousse, au contraire, le bouchon de gélose vers le haut du tube(**Copolla et al, 1997**).



Figure 5 : Aspect macroscopique des isolats sur le milieu Gibson-Abdelmalek

2-3-2-4 Identification phénotypiques des bactéries lactiques isolées :

Les bactéries, bâtonnets ou cocci, gram-positives et catalase négative ont été retenues comme étant des bactéries lactiques. L'identification des souches s'est basée sur les techniques classiques de microbiologie basées sur la recherche d'un certain nombre de caractères morphologiques, physiologiques et biochimiques. Toutes ces techniques ont été décrites par (Larpent (1997), Gusils et al. (2010).)

2-3-2-5 Conservation des souches isolées :

Répartition de 10 ml de culture des souches purifiées par tube Eppendorf

Centrifugation par équilibre des tubes à 3000 rpm; élimination du surnageant

et remplissage du tube avec un mélange MRS et 15% de glycérol.

Le mélange est vortexé, et conservé à -20°C .Les souches purifiés sont conservées.



Figure 6 :Conservation des souches purifiées à -20°C

Résultats

1 / Résultats

1.1/ Isolement et identification des bactéries lactiques isolées

1.1.1 Dénombrement des bactéries lactiques :

Les bactéries lactiques ont été dénombrées dans tous les échantillons de laits frais étudiés.

Leur nombre varie de 2×10^5 ufc /ml à 5×10^5 ufc /ml (voir tableau N°08)

Tableau n° 08

Incidence des bactéries lactiques dans les quatre échantillons de lait frais

Origine du lait	Vache N°01 Code 3034 LSTPA Race : Prim Holstein	Vache N°01 Code 3034 LSTPA Race : Prim Holstein	Vache N°02 Code 2748 LSTPA Race : Prim Holstein	Vache N°02 Code 2748 LSTPA Race : Prim Holstein
TYPE DE LAIT	Lait traite du matin	Lait traite du soir	Lait traite du matin	Lait traite du soir
<u>ANALYSES REALISEES</u>				
pH	6,67	6,68	6,71	6,68
Extrait sec total g /L	86,87 g/L	87,18 g/L	87,13 g/L	86,95 g/L
Matière grasse (g /L)	33,51 g/L	33,10 g/L	32,10 g/L	31,47 g/L
Matière protéique (g /L)	26,98 g/L	27,67 g/L	27,84 g/L	28,12 g/L
Lactose (g /L)	44,13 g/L	43,87 g/L	42,84 g/L	43,18 g/L
UFC/ml	3×10^5	5×10^5	2×10^5	4×10^5
ESPECES APPARENT EES	- Lactocoques	-Streptocoques Lactiques -Lactocoques	Lactocoques	-Streptocoques lactiques -Lactobacilles -Lactocoques
ISOLATS	2	4	3	5

Cette différence de nombre de bactéries lactiques dans les échantillons analysés est le résultat de la variabilité de la traite et de l'alimentation semi-intensif (à l'étable et à l'herbe) des 02 vaches prim Holstein de la ferme expérimentale du laboratoire LSTPA.

1.1.2 Obtention des isolats :

A partir des 04 échantillons de lait frais, nous avons obtenus 14 isolats qui ont été rattachés à la traite du matin et à celle du soir comme suit :

Vache N°01 (code 3034)

Traite du matin : 02 isolats retenus soit des lactocoques

Traite du soir : 04 isolats retenus soit lactocoques et streptocoques lactiques

Vache N°02 (code 2748)

Traite du matin : 03 isolats retenus soit des lactocoques

Traite du soir : 05 isolats retenus soit des streptocoques lactiques, des lactobacilles et des lactocoques



Figure 07 : les 09 isolats de *Lactococcus*



Figure 08 : les 02 isolats de *Lactobacillus*



Figure 09 : les 03 isolats de *Streptococcus*

1.1.3 L'examen macroscopique et microscopique :

Un total de 14 souches ont été isolées et purifiées sur milieu MRS –M17, sur gélose, les isolats sont apparus comme indiqué sur le tableau (N°09) illustrant les milieux utilisés et conditions d'incubation pour l'isolement des bactéries lactiques.

Tableau N° 09 : Milieux utilisés et conditions d'incubation pour l'isolement des bactéries lactiques

Microorganismes	Milieux D'isolement	Température °C	Durée (h)	Incubation
Streptocoques lactiques	M 17 pH= 7	37 et à 45	72	Aérobiose
Lactocoques	M 17 pH = 6,5	30	72	Aérobiose
Lactobacilles Thermophiles	MRS pH = 6 et pH = 5,5	45	72	Anaérobiose

L'observation macroscopique a donné des colonies rondes blanchâtres et de contour régulier apparaissent sur la surface des géloses MRS et M17 ont été retenues et sélectionné parmi les autres micro-organismes trouvés (champignons). Ces colonies ont subi une coloration de Gram et un test de catalase.

Les souches sélectionnées ont conservé le même aspect après plusieurs repiquages : forme ronde, couleur blanchâtre ou peu transparente, contour régulier, lisses et légèrement bombé (Figure 10 et 11).



Figure 10: Aspect des colonies de bactéries lactiques sur milieu MRS après 48h d'incubation à 37°C



Figure 11: Aspect des colonies de bactéries lactiques sur milieu M17 après 48h d'incubation à 37°

L'observation microscopique a donné 02 formes de cellules qui sont la forme cocci et la forme bâtonnet. Le tableau (N°10) illustre les caractères morphologiques et physiologiques des genres présumés des bactéries lactiques isolées.

Tableau N°10 : Caractères morphologiques et physiologiques des genres présumés des bactéries lactiques isolées

Macro morphologie	Micro morphologie	Température °C	Groupes
Colonies blanches rondes ou lenticulaires	Coccis diplocoques et en chainettes	37 et à 45	Streptocoques Lactiques
Colonies blanches rondes ou lenticulaires	Coccis diplocoques et en chainettes	30	Lactocoques
Petites colonies blanches à centre marron et bombé	Bâtonnets filamenteux isolés ou en chainettes.	45	Lactobacille thermophile

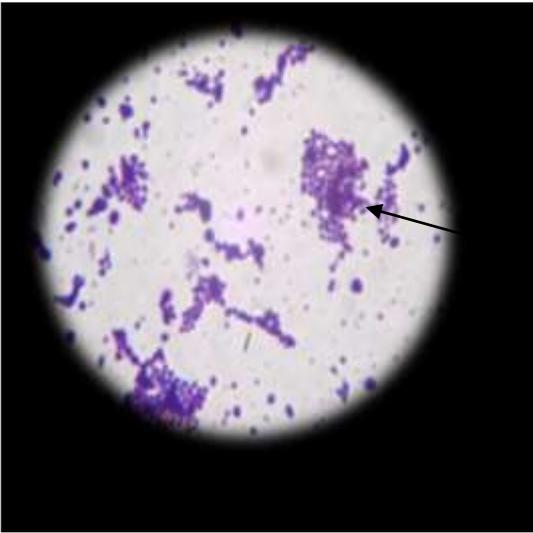


Figure 12: Genre présumé à *Streptococcus*



Figure 13 : Genre présumé à *Lactococcus*



Figure 14: Genre présumé à *Lactobacillus*

1.1.4 Test physiologiques et biochimiques :

Les caractéristiques physiologiques et biochimiques sont présentés dans le tableau (N°11)

Tableau N°11

Profil physiologique et biochimique des souches lactiques isolées

Caractère Souche	Gram	Forme	Catalase	Croissance à 30° c	Croissance à 37 et à 45 °c	Croissance à 6,5 % Nacl	Croissance à PH 4,5	Croissance à PH 6,5	Profil fermentaire	Croissance sur milieu BEA
<i>Streptococcus lactique</i>	+	Cocci	-	-	+	+	-	+	Homo	-
<i>Lactococcus</i>	+	Cocci	-	+	-	+	-	+	Homo	-
<i>Lactobacillus thermophile</i>	+	Bâton net	-	+	+	+	+	+	Hétéro	-

L'analyse de ces résultats obtenus montrent que tous les isolats se sont avérés(gram positif et catalase négative) ce qui est caractéristique des bactéries lactiques.

Parmi les souches isolées, 05 isolats ont montré une capacité à croître à 37 et 45°C , de plus , ils peuvent se développer à pH 6,5 dont ceux apparentés à des Streptocoques lactiques et lactobacille thermophile .Le lactobacille thermophile préfère un pH de 5,5 et une température d'incubation de 45°C avec une libération de gaz carbonique (voir Figure N°15).



Figure 15 : production de CO₂ par *Lactobacillus*

D'après(**Demarigny et al.(2006)**),la croissance des lactobacilles est bonne dans un milieu à pH 4,5-6,5 mais s'arrête à pH 4,0-3,6.Ils libèrent de l'acide lactique D,L ou DL.Le CO₂ à la concentration de 5-10% stimule souvent leur croissance.

Les 09 isolats de lactocoques préfèrent un pH de 6,5 et une température de 30°C (**Gordana et al, .2006**).

Aucun développement par un trouble visible sur bouillon BEA(Bile-Esculine-Azide) n'a été constaté : trouble caractéristique aux enterocoques lactiques. (**Bouton. Y.,(2006)** ce qui confirme que nos coques développés à 37 et 45°C sont des Streptocoques lactiques



Figure 16: Aucune croissance des Streptocoques lactiques sur milieu BEA(aucun trouble caractéristique au niveau du tube 1,tube2 et tube 3 par rapport au témoin)

1.2. Analyses physico-chimiques des échantillons de lait frais :

Les analyses physico-chimiques des quatre échantillons de lait frais sont illustrées dans le tableau N°01 : Incidence des bactéries lactiques dans les différents échantillons de lait frais. D'après les résultats physico-chimiques obtenus et les normes du codex alimentarius, ces laits sont classés dans la famille des laits entiers frais avec au minimum 29 g/l de matière grasse. **(Codex alimentarius des produits laitiers 2^{ème} édition ,2011)**

Discussion

2.1 Isolement et identification des bactéries lactiques isolées :

2.1.1 Dénombrement des bactéries lactiques:

Le tableau (N°01) montre que les bactéries lactiques sont présentes dans les 04 échantillons de laits frais analysés à des dénombrements respectifs de :

3x 10⁵ ufc/ml pour le lait frais de la traite du matin « de la vache N°01 » codifiée 3034

5x 10⁵ ufc/ml pour pour le lait frais de la traite du soir « de la vache N°01 » codifiée 3034

2x 10⁵ ufc/ml pour pour le lait frais de la traite du matin « de la vache N°02 » codifiée 2748

4x 10⁵ ufc/ml pour pour le lait frais de la traite du soir « de la vache N°02 » codifiée 2748

Cette observation est en accord avec celle déjà décrite par (**Benkerroum, 2004 et par Bouton, 2007.**)

La présence des bactéries lactiques pour chaque lait est comme suit :

Pour le lait de la vache N°01 *Lactococcus* et *Streptococcus*

Pour le lait de la vache N°02 : *Lactococcus*, *Streptococcus* et *Lactobacillus*

Cependant toutes les études menées à ce jour par plusieurs auteurs (*Bacillus polymixa* ; *Louis Pasteur*,) ont décrit comme espèces majoritaires et par ordre *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* et *Lactobacillus* dans surtout les laits frais de vache laitière locale. Or dans le cas de notre étude, la dominance est différente ; variabilité liée au lait utilisé issu d'un même cheptel (cheptel de vache laitière importée « Prim Holstein ») donnant ainsi des variantes génétiques des lacto-protéines du lait influées par le type d'alimentation se répercutant ainsi sur la qualité de la flore lactique. Tout cela est en conformité avec les résultats de (**Montel et al., 2003**)

2.1.2 Obtention des isolats :

A partir des 04 échantillons de lait frais, nous avons obtenus 14 isolats décrits dans le tableau (N° 01) et qui ont été rattachés à chaque lait comme suit :

Vache N°01 (code 3034)

Traite du matin : 02 isolats retenus de *Lactococcus*

Traite du soir : 04 isolats retenus : 03 isolats de *Lactococcus* et 01 isolat de *Streptococcus*

Vache N°02 (code 2748)

Traite du matin : 03 isolats retenus de *Lactococcus*

Traite du soir : 05 isolats retenus : 02 isolats de *Streptococcus* , 02 de *Lactbacillus* et 01 de *Lactococcus*

Le nombre se détermine avec la qualité de l'échantillonnage en relation avec le nombre de vaches laitières utilisées.

2.1.3 Examen macroscopique et microscopique :

La micro-morphologie des espèces isolées va de cocci diplocoques et en chainettes pour les streptocoques lactiques, de cocci diplocoques et en chainettes pour les lactocoques et de bâtonnets filamenteux pour le Lactobacille thermophile avec une illustration par des photos prises d'une observation microscopique x1000 et de leur caractéristique portée sur le tableau (N° 03)

Cette approche micromorphologique a été décrite sur la base des techniques déjà établies par **(Larpen, 1997)**

2.1.4 Tests physiologiques et biochimiques :

Les tests physiologiques ont porté surtout sur certains facteurs de croissance tel que la température d'incubation et le pH optimal. En comparaison des paramètres de croissance des bactéries lactiques définis par **(Larpen, J, 1997)**, on a déterminé que la majorité des bactéries lactiques isolées sont neutrophiles qui se développent à un pH compris entre 5,5 et 6,5 avec un optimum voisin de 6,5 sauf pour les espèces *Lactobacillus* acidophiles qui se

multiplient mieux dans les milieux acides à des pH de 4,5 soit le cas des 02 *Lactobacillus* isolés.

D'un autre côté, les lactobacilles, bactéries lactiques hétérofermentaires ont dégagé du gaz carbonique CO₂, pour cette espèce ; la concentration de 5-10% de CO₂ stimule sa croissance cela est en adéquation avec les résultats de **(Demarigny et al.(2006)**

D'un autre côté, en plus des milieux d'isolement utilisés soit le M17 pour les formes cocci et MRS pour les formes en bâtonnets ; milieux qui doivent satisfaire leurs besoins nutritifs et énergétiques, un bouillon BEA utilisé pour la caractérisation des streptocoques lactiques comme énoncé par **(Bouton .Y.(2006)** a été déterminant par le non développement d'un trouble caractéristique par rapport aux témoins des autres espèces en forme cocci.

Les autres bactéries lactiques isolées dont les lactocoques ont un optimum de croissance à une température de 30 °C et à un pH neutrophile de 6,5.

Le lactobacille thermophile tolère un optimum en température de 45 °C et un pH de croissance de 6 et une tolérance acidophile de 4,5 comme déjà noté par **(Larpent, 1997).**

Enfin, biochimiquement les isolats sont catalase négative et de Gram positif ce qui est caractéristique des bactéries lactiques. **(Prescott et al.,2003.)**

Tenant compte du **profil fermentaire** nos isolats de lactocoques sont présumés à *Lactococcus lactis* qui est une bactérie lactique homofermentaire, son métabolisme est hétérotrophe, anaérobie aérotolérante. Sa température optimale de croissance se situe aux environs de 30 °C (elle est dite mésophile).

Lactococcus lactis (ou lactocoque lactique) est une bactérie à Gram positif, non motile, non sporulante, mesurant en moyenne de 0,5 à 1,5 micromètre. Les cellules de ce micro-organisme se regroupent en paires ou en courtes chaînes les lait crus de ruminants sont des milieux naturellement riches en lactocoques. On considère que la surface des trayons constitue la principale source de cette bactérie lactique dans le lait. Ces résultats concordent avec ceux de la microbiologiste **(Schleifer et al. 1986)**

Les deux sous-espèces lactiques de *Lactococcus lactis* ; *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* et *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* sont largement utilisées dans les levains laitiers pour la fabrication de fromages ou d'autres produits laitiers fermentés.

L'espèce présumée de streptocoque thermophile est un *Streptococcus thermophilus* qui est une bactérie alimentaire, thermophile avec un optimum de croissance à 45 °C, présente après la fermentation du lait.

Cette bactérie lactique appartient à la famille des Streptococcaceae

Selon (Schleifer *et al.*, 1995) ; *Streptococcus thermophilus* se présente :

- sous forme de cocci (coque arrondie), de 0,7–1 µm, formant des chaînes ou des paires
- à coloration de Gram positive
- sa température optimale de croissance se situe entre 37 °C et 45 °C, selon les souches. Ne croît pas à 15 °C. Toutes nos souches isolées croissent à 45 °C
- bactérie homofermentaire stricte (produisant du L-lactate), microaérophile
- non pathogène
- sa culture demande des vitamines B et quelques acides aminés.

Pour la 3^{ème} espèce caractérisée est un lactobacille thermophile (*Lactobacillus*) qui appartient au genre de bactéries à gram positif, de la famille des Lactobacillaceae.

Selon (Martinus Willem Beijerinck 1901) ; les lactobacilles sont des bactéries lactiques :

- gram-positives
- immobiles, non flagellés, non sporogènes
- soit homofermentaires, produisant à partir du glucose plus de 85 % d'acide lactique, soit hétérofermentaires et produisant du CO₂, de l'acide lactique, de l'éthanol (et/ou de l'acide acétique) en quantités équimolaires
- aérotolérantes ou anaérobies
- catalase -
- ayant des besoins nutritionnels complexes (milieu riche en glucides, acides aminés, peptides, lipides, sels, vitamines)

Les lactobacilles thermophiles isolées dans notre microbiote le lait frais peuvent être soit des :

Lactobacillus helveticus, *Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis*, *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* . Les lactobacilles thermophiles libèrent des protéases qui se traduisent en fin de coagulation-maturation des laits par une présence importante de petits peptides et d'acides aminés libres.

D'autres lactobacilles hétérofermentaires peuvent être des :

Lactobacillus brevis,

Lactobacillus fermentum,

Lactobacillus casei, ou *Lactobacillus plantarum*.

La qualité du lait produit dépend directement de l'alimentation de la vache. Les vaches laitières nourries majoritairement avec des fourrages produits sur la ferme : herbe pâturée, ont donné une

qualité supérieure (physico-chimique et microbiologique) du lait par rapport à l'alimentation initiale classique établie à base de foin et de concentré.

Les laits crus de la ferme expérimentale sont relativement chargés en flore lactique. La flore lactique joue un rôle antagoniste vis-à-vis de la flore nuisible, qui devraient être abondante (Bourgeois, 1981).

Ces microorganismes, plus ou moins abondants, sont en relation étroite avec l'alimentation, la race et d'autres facteurs liés à l'élevage. Les formes en coques sont dominantes dans la flore indigène, il s'agit de lactocoques, mais aussi streptocoques lactiques.

Ces microorganismes sont retrouvés dans le lait à la sortie du pis par l'application des bonnes pratiques de la traite.

Notre lait contenant trop de bactéries biogènes tend, en lacto-fermentation, à passer par la fermentation lactique dominante à un lait de qualité transformable soit fromageable.

Conclusions et perspectives.

1. Conclusion :

L'étude réalisée a apporté une approche confirmative sur la composition de l'écosystème microbien lactique du lait frais issu des vaches laitières de la ferme expérimentale du Laboratoire des Sciences et Techniques de Production Animale de l'Université Abdelhamid IBN BADIS de Mostaganem. Ce lait frais produit d'un élevage semi-intensif, d'un même cheptel et de race importée « Prim Holstein » montrent cette grande diversité d'espèces bactériennes d'un grand intérêt technologique.

La comparaison des résultats avec ceux cités dans la bibliographie sur des produits similaires permet de conclure que notre ferme expérimentale dispose d'un écosystème microbien lactique riche soit en flore lactique avec des propriétés technologiques à développer davantage.

La divergence de nos résultats avec ceux de (*Orla-Jensen et Karl-Heinz Schleifer et Larpent, 1997*). ; qui ont pu mettre en évidence des enterocoques, lactocoques, leuconostocs et lactobacille peut être expliquée d'une part par les conditions climatiques et géographiques différentes, d'autre part par la qualité des laits crus utilisés dans la transformation obtenus de lactations différentes ; d'un cheptel diversifié et par la qualité de la nourriture selon les saisons sans oublier la qualité et la quantité de l'échantillonnage utilisé pour la réalisation des études établies. On observe une tendance proche ; *Enterococcus, Lactococcus, Leuconostoc, Lactobacillus et Streptococcus* sont les bactéries lactiques les plus fréquemment rencontrées.

Des espèces tel que *Lactococcus* et *Lactobacillus* devenues rares dans les pays industrialisés sont fréquentes dans nos laits frais ce qui contribue à l'enrichissement du créneau et à la connaissance de leur écologie.

2. Perspectives :

Les résultats de cette modeste étude permettent d'avoir de nouvelles perspectives.

Pour compléter ce travail d'exploitation de la flore lactique du lait frais de la ferme expérimentale du laboratoire LSTPA , nous proposons sur le plan technique :

- Une identification complémentaire par biologie moléculaire des isolats purifiés

-Une étude complète des aptitudes technologiques de cette microflore lactique pour une éventuelle exploitation dans la transformation laitière.

-Détection et développement dans le même créneau de nouvelles souches ayant de très bonnes aptitudes technologiques : penser à élargir l'espace d'exploitation de ces écosystèmes à travers d'autres fermes pilotes et d'autres élevages d'un cheptel laitier diversifié.

-Une meilleure caractérisation des activités enzymatiques de ces souches bactériennes par une approche simple qui peut être utile à l'industrie laitière car la qualité des produits laitiers à fermentation-coagulation lactique passe par une meilleure connaissance des activités métaboliques des bactéries lactiques.

-Le niveau de contamination en flore lactique de notre lait expérimental est étroitement dépendant des conditions d'hygiène dans lesquelles sont effectuées ces manipulations, à savoir l'état de propreté de l'animal et particulièrement celui des mamelles, du milieu environnant (étable, local de traite), du trayon, du matériel de récolte du lait (seaux à traire, machines à traire) et, enfin, du matériel de conservation et de transport du lait (bidons, cuves, tanks).

Enfin, en tenant compte des différentes études établies et les résultats obtenus ; il est nécessaire de penser à la création d'un soucier national pour cette microflore lactique issue de nos produits laitiers frais et qui donne les aptitudes technologiques escomptées dans le contexte Algérien par rapport aux souches commerciales issues d'une transformation modernisée des pays industrialisés.

Références bibliographique

Alais . (1975) : Sciences du lait. Principes des techniques laitières. Edition Sepaic, paris

Alais C. (1984). Sciences du lait. Principes de techniques laitières. 3^{ème} édition, édition Publicité France.

Aamikunnas, J. (2006). Metabolic engineering of lactic acid bacteria and characterization of novel enzymes for the production of industrially important compounds. Academic Dissertation. Université de Helsinki. 67 p.

Aby, BA. (2008). Contribution à l'étude du lait et des produits laitiers importés au Sénégal: étude économique et qualité hygiénique. Thèse de doctorat en sciences et médecine vétérinaire. Université Cheikh Anta Diop de Dakar. 170 p.

Adrian, J. (1987). Les vitamines. In : CEPIL. Le lait matière première de l'industrie laitière. CEPIL –INRA, Paris, pp : 113-119.

Aissaoui,O., Zitoun,M. & Zidoune, N. (2006). Le fromage traditionnel algérien «Bouhezza ». Séminaire d'Animation Régional. Technologies douces et procédés de séparation au service de la qualité et de l'innocuité des aliments. INSAT-Tunis, Tunisie, **27** : 28-29.

Ait Abd Elouhab, N. (2001). Microbiologie alimentaire. Office des Publications Universitaires, Alger, 147 p.

Badis, A., Laouabdia-Sellami, N., Guetarni, D., Kihal, M. & Ouzrout, R. (2005). Caractérisation phénotypique des bactéries lactiques isolées à partir du lait cru de chèvre de deux populations caprines locales « arabia et kabyle ». *Science and Technologie*, **23**: 30-37.

Bourdon, J. L. & Richard, C. L. (1991). Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification biochimiques des bactéries. Doin. Pp : 65-149.

Brennan, N.M., Ward, A.C., Beresford, T.P., Fox, P. F., Goodfellow, M. & Cogan, T.M. (2002). Biodiversity of the bacterial flora on the surface of a smear cheese. *Appl. and Environ. Microbiol*, **68** (2): 820-830.

- Benkerroum, N. & Tamime, A. Y. (2004).** Technology transfer of some Moroccan traditional dairy products (Iben, jben and smen) to small industrial scale. *Food Microbiol*, **65** : 1-15.
- Bigret, M. (1994).** Lactic acid bacteria and organoleptic properties of foods in: Novel G et Le Querler J. F. (1994). Les bactéries lactiques. 25-27. Presses universitaires de Caen, France.
- Boyaval, P. (1989).** Lactic acid bacteria and metal ions. *Le lait*, **69** (2) : 87-113. 63
- Brulé, G. (1987).** Le lait matière première de l'industrie laitière : Les minéraux. *CEPILL-INRA*, Paris. Pp : 87-98.
- Carine, D. & Thonart, P. (2009).** Les bactériocines des bactéries lactiques caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires. *BASE*, **13** (1) : 143-154.
- Cayot, P. & Lorient, D. (1998).** Structure et fonctions des protéines du lait. *Tec et Doc*, Lavoisier, Paris. 348 p.
- Cocaign-Bousquet, M., Garrigues, C., Novak, L., Lindley, N. D. & Loubiere, P. (1995).** Rational development of a simple synthetic medium for the sustained growth of *Lactococcus lactis*. *Journal of Applied Bacteriology*, **79**: 108-116.
- Cogan, T.M. (1981).** Constitutive nature of the enzymes of citrate metabolism in *Streptococcus lactis subsp. diacetylactis*. *Journal of Dairy Research*, **48**: 489-495.
- Copolla, R., Iorizzo, M., Saotta, R., Sorrentino, E. & Grazia, L. (1997).** Characterization of micrococci and staphylococci isolated from sopressata molisana, a Southern Italy fermented sausage. *Food Microbiology*, **14** : 47-53.
- Debry, G. (2001).** Lait, nutrition et santé. *Tec & Doc*, Lavoisier, Paris. 566 p.
- Dellaglio, F. de Roissart, H. Torriani, S. Curk, C. M. & Janssens, D. (1994).** Caractéristiques générales des bactéries lactiques. Loriga, Uriage. . 25-116
- De Roissart, H. & Luquet, F.M. (1994).** Les bactéries lactiques. Uriage, Loriga, France, **1** : 1-286.

- Desmazaud, M. J. & De Roissart, H. (1994).** Métabolisme générale des bactéries lactiques, Aspects fondamentaux et technologiques. Uriage, Lorica, France. Pp : 169-207.
- Dortu, C. & Thonart, P. (2009).** Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et intérêt pour la bioconservation des produits alimentaires. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* , **13** : 143-154.
- Dronault, S. et Corthier, G. (2001).** Effet des bactéries lactiques ingérées avec des laits fermentés sur la santé. *Veterinary Research*, **32** : 107-117.
- El-Ghaish, S., Ahmadova, A., Hadji-Sfaxi, I., El-Mecherfi, K.E., Bazukyan, I., Choiset, I., Rabesona, H., Sitohy, M., Popov, Y. G., Kuliev, A. A., Mozzi, F., Chobert, J. M. & Haertlé, T. (2011).** Potential use of lactic bacteria for reduction of allergenicity and for longer conservation of fermented foods. *Trends in Food Sci. Technol.* **22**: 509-516.
- El Marrakchi, A., Berrada, M., Chahboun, M. & Benbouhou, M. (1986).** Etude chimique du smen marocain. *Le Lait*, INRA Editions, **66** (2) :117-133.
- El Marrakchi, A., Tantaoui-Elaraki, A., Hamama, A. & Grini, A. (1988).** La fore microbienne du smen marocain. II. Flores lipolytique et caseolytique. *Le Lait*, INRA Editions, **68** (3) : 333-347.
- Facklam, R. (1972).** Recognition of group D streptococcal species of human origin by biochemical and physiological tests. *Appl. Microbiol*, **23** : 1131-1139.
- Facklam, R. et Elliott, J. A. (1995).** Identification, Classification, and Clinical Relevance of Catalase-Negative, Gram-Positive Cocci, Excluding the Streptococci and Enterococci. *CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS*, **8** (4): 479-495.
- Garry, P et Le Gherne, L. (1999).** les bactéries lactiques. *Bull.Liaison CTSCCV*, **9**(6): 423-430.
- Gerhardt, P., Murray, R. G. E., Wood, W. A. & Krieg, N. R. (1994).** Method for general and molecular bacteriology. American Society for Microbiology. 518 P.
- Gevers, D. (2002).** Tetracycline resistance in lactic acid bacteria isolated from fermented dry sausages. Thèse de Doctorat. Université de Ghent. Belgium. 205 p.

- Gonzalez, C. J., Encinas, J. P., Garcia Lopez, M. L. & Otero, A. (2000).** Characterization and identification of lactic acid bacteria from fresh water fishes. *Food Microbiol*, **17**: 383-391.
- Guetarni, H. (2013).** Effet antibactérien des bactéries lactiques isolées à partir des laits crus algériens sur la croissance de *Helicobacter pylori*. Thèse de doctorat. Université d'Oran Es-Senia. 220 p.
- Guiraud, J.Y. & Galzy, P. (1980).** L'analyse microbiologique dans les industries alimentaires. Edition de l'usine. 39 p.
- Guiraud, J. P. (1998).** Microbiologie alimentaire. 1er Edition, Dunod, Paris. 652 p.
- Guiraud, J. P. (2003).** Microbiologie alimentaire. Dunod_RIA, Paris. 696 P.
- Hassen, A. N. & Frank, J. F. (2001).** Starter cultures and their use. In **Marth, E. H.** *Food Science and Technology*. Marcel Dekker, New York. Pp: 151-206.
- Holzappel, W.H., Haberer, P., Geisen, R., Björkroth, J. & Schillinger, U. (2001).** Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *Am. J. Clin. Nutr.*, **73** : 365S–73S.
- Idoui, T., Boudjerda, J., Leghouchi, E. & Karam, N. E. (2009).** Lactic acid bacteria from « sheep's Dhan », a traditional butter from sheep's milk: isolation, identification and major technological traits. *Gr. Y. Aceites*, **60** (2): 177-183.
- Ismaili, M.A., Guilal, J., Hamama, A., Saidi, B., Zahar, M. (2016).** Identification de bactéries lactiques du lait cru de chamelle du sud du Maroc. *The International Journal of Multi-disciplinary Sciences*, **1**(1): 81-94. Marchal, N.,
- Jensen, R. & Newburg, D. (1995).** Bovine milk lipids. In: **JENSEN, R.** *Handbook of milk composition*. Academic Press, San Diego, pp: 543-575.
- Kacem, M. et Karam, N. (2006).** Physicochemical and microbiological study of “shmen”, a traditional butter made from camel milk in the Sahara (Algeria): isolation and identification of lactic acid bacteria and yeasts. *GRASAS Y ACEITES*, **57** (2): 198-204.
- Kamaly, K. & Marth, M. E. H. (1989).** Enzyme Activities of Lactic Streptococci and their role in maturation of cheese. *Journal of Dairy Science*, **72**: 1945-1966.

- Kandler, O. (1983).** Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **49**: 209-224.
- Kovacs, L. G., Ballati, P. A., Kroshman, H. B. & Pueppke, S. G. (1995).** Transcriptional organisation and expression of nol XWBTUV. A locus that regulate cultivar-specific nodulation soybean by *Rhizobium fredii* USDA275. *Molecular Microbiology*, **17**: 923-933.
- König, H. & Fröhlich, J. (2009).** Lactic acid bacteria. *Biology of Microorganismes on Grapes, in Must and in Wine*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 522 p.
- Lahsaoui, S. (2009).** Etude du procédé de fabrication d'un produit laitier traditionnel algérien (Klila). Thèse de doctorat. Département d'Agronomie. Université de Batna. Algérie. 50 p.
- Lahsaoui, S. (2009).** les produits laitiers traditionnels en Algérie (Etude bibliographique, Chapitre 2). Mémoire d'ingénieur. Université de Batna, département d'agronomie. Algérie.
- Lane, C. N. & Fox, P. F. (1996).** Contribution of starter and Adjunct Lactobacilli to Proteolysis in Cheddar Cheese during ripening. *International Dairy Journal*, **6** : 715-728.
- Larousse agricole. (2002).** Le monde paysan au XXIe siècle. Ed : Larousse, 767 p.
- Larpent, J. P. & Larpent, G. M. (1990).** Mémento technique de microbiologie. *Tec & Doc*, Lavoisier, Paris. 471 p.
- Larpent, J. P. (1997).** Technique de laboratoire : microbiologie alimentaire. *Tec & Doc*, Lavoisier, Paris. 1073 P.
- Latreche, B. (2016).** Caractérisation des bactéries lactiques isolées du beurre cru, évaluation de leurs aptitudes technologiques et leur utilisation dans la fabrication de la crème sure. Mémoire de Magister en Sciences Alimentaires. Université des frères Mentouri, Constantine. 95 P.
- Leveau, J. Y. & Bouix, M. (1993).** Microbiologie industrielle : les micro-organismes d'intérêt industriel. *Tec et Doc*, Lavoisier, Paris. 612 p.
- Leyral, G et Joffin, J. N. (1998).** Microbiologie technique : Documentation technique. CRDP d'Aquitaine, Bordeaux. 304 p.

- Lenoir, J., Hermier, J. & Weber, F. (1992).** Les groupes microbiens d'intérêt laitier, *CIDIL*, pp : 30-50.
- Limsowtin, G. K. Y., Broom, M. C & Powell, I. B. (2004).** Lactic acid bacteria, taxonomy. In *Encyclopedia of Dairy Science*. **Roginski H.** Oxford, Elsevier, pp :1470-1478.
- Luquet F.M. & Corrieu G. (2005).** Bactéries lactiques et probiotiques .*Tec & Doc.* Lavoisier, Paris. 306 p.
- Lynch, C. M., Mc Sweeney, P. L. H., Fox, P. F., Cogan, T. M. & Drinan, F. D. (1997).** Contribution of starter Lactococci and no starter Lactobacilli to proteolysis in cheddar cheese with a controlled microflora. *Lait*, **77**: 441-459.
- Makhloufi .K. M. (2012)** Caractérisation d'une bactériocine produite par une bactérie lactique *Leuconostoc pseudomesenteroides* isolée du boza. Thèse de doctorat de l'université pierre et marie curie. Spécialité : microbiologie, biochimie (école doctorale iviv). 200 P.
- Mathieu, J. (1998).** Initiation à la physico-chimie du lait. *Tec & Doc*, Lavoisier, Paris. 220 p.
- McSweeney, P. L. H. & Sousa, M. J. (2000).** Biochemical pathways for the production of flavor compounds in cheese during ripening. *Lait*, **80**: 293-324.
- Mentreuil, J. (1971).** La maternisation des laits. Etat actuel de la question. *Ann. Nutr Alim*, **25** : 1-73.
- Mechai, A. & Kirane, D. (2008).** Antimicrobial activity of autochthonous lactic acid bacteria isolated from Algerian traditional fermented milk "Raïb". *African Journal of Biotechnology*, **7** (16): 2908-2914.
- Mkrtchyan, H., Gibbons, S., Heidelberger, S., Zloh, M. & Limaki, H.K. (2010).** Purification, characterization and identification of acidocin LCHV, an antimicrobial peptide produced by *Lactobacillus acidophilus* n.v. Er 317/402 strain narine. *Int.J. Antimicrobial Agents*, **35**: 255-260.

- Ouadghiri, M. (2009).** Biodiversité des bactéries lactiques dans le lait cru et ses dérivés «Lben» et «Jben» d'origine marocaine. Thèse de doctorat en Microbiologie et Biologie Moléculaire. Université Mohammed v-agdal. Faculté des sciences Rabat, Maroc. 132 p.
- Pilet, M. F., Magras, C. et Federighi, M. (1998).** Bactéries lactiques. Polytechnica, Paris. Pp : 235-260.
- Randazzo, C., Caggia, C. & Neviani, C. (2009).** Application of molecular approaches to study lactic acid bacteria in artisanal cheeses. *J. Microbiol. Methods*, **78**, 1-9
- Renner, E. (1983).** Milk and dairy products in human nutrition. Munchen. Volkswirtschaftlicher Verlag. 450 p.
- RMT. (2011).** Microflore du lait cru. Vers une meilleure connaissance des écosystèmes microbiens du lait et de leurs facteurs de variation. CNAOL, 134p.
- Sakili, D. & Issoual, D. (2003).** Lactic acid bacteria in processing maroccan smen. Université Moulay Ismail, Faculté des Sciences et Techniques, Département de Biologie Errachidia. Copyright academic d'agriculture de France, Maroc. 18 p.
- Salminen, S., Wright, A. V. & Ouwehand, A. (2004).** Lactic acid bacteria. Microbiological and functional aspects. Marcel Dekker. Inc., U.S.A. 798 p.
- Schleifer, K. H. & Ludwig, W. (1995).** Phylogeny of genus *Lactobacillus* and related genera. *System Appl Microbiol*, **18**: 461-467
- Seydi, M. (2004).** Caractéristiques du lait cru. EISMV, Dakar. 12 p.
- Souki, H. (2009),** Les stratégies industrielles et la construction de la filière lait en Algérie : portée et limites. In Revue scientifique trimestrielle de l'université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou, **15** : 03-15
- Stiles, M. E. & Holzappel, W. H. (1997).** Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int J Food Microbiol*, **36**: 1-29.
- Touati, K. (1990).** Chimique d'un fromage artisanal algérien "la klila". Mémoire d'ingénieur, INATAA, Constantine, Algérie. 83 p.

- Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., De Vos, P., Kersters, K. & Swings, J. (1996).** Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol Rev*, **60**: 407-438.
- Veisseyre, R. (1975).** Technologie du lait : Constitution, récolte, traitement et transformation du lait. Maison Rustique, Paris. 714 p.
- Vierling, E. (2003)** Aliment et boisson-Filière et produit. Doin éditeurs, Paris. 270p.
- Vos, P., Garrity, G., Jones, D., Krieg, N.R., Ludwig, W., Rainey, F.A., Schleifer, K.-H. & Whitman, W.B. (2009).** Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd ed., vol. 3, Springer-Verlag, New York, NY. 1317 p.
- Whitney, R. Brunner, J. & Ebner, K. (1976).** Nomenclature of the proteins of cow' milk: fowth revision. *J. diary Sci.* **87**(6) : 1641-74.
- Williams, A. G., Noble, J. & Banks, J. M. (2001).** Catabolism of amino acids by lactic acid bacteria isolated from Cheddar cheese. *International of Dairy Journal*, **11**: 103-115.
- Yantyati, W. R. & Andi, F. (2014).** The Role of Lactic Acid Bacteria in Milk Fermentation. *Food and Nutrition Sciences*, **5**: 435-442.

Liste des Annexes

Annexe A

Prise de l'échantillon du lait manuellement , Vache de la race Prim' Holstein



Annexe B

Lactoscan SP (milk analyzer)



Analyses physico-chimiques :

Origine du lait	Vache N°01 Code 3034 LSTPA Race : Prim Holstein	Vache N°01 Code 3034 LSTPA Race : Prim Holstein	Vache N°02 Code 2748 LSTPA Race : Prim Holstein	Vache N°02 Code 2748 LSTPA Race : Prim Holstein
TYPE DE LAIT	Lait traite du matin	Lait traite du soir	Lait traite du matin	Lait traite du soir
<u>ANALYSES REALISEES</u>				
pH	6,67	6,68	6,71	6,68
Extrait sec total g /L	86,87 g/L	87,18 g/L	87,13 g/L	86,95 g/L
Matière grasse (g /L)	33,51 g/L	33,10 g/L	32,10 g/L	31,47 g/L
Matière protéique (g /L)	26,98 g/L	27,67 g/L	27,84 g/L	28,12 g/L
Lactose (g /L)	44,13 g/L	43,87 g/L	42,84 g/L	43,18 g/L

Annexe C:

composition des milieux de culture

Milieu MRSGélosé (PH 6,5)

Peptone.....	10,00 g
Extrait de viande.....	10,00 g
Extrait de levure.....	5,00 g
Glucose.....	20,00 g
Tween 80.....	1ml
Phosphate biotassique.....	2,00 g
Acétate de sodium.....	5,00 g
Citrate d,ammonium.....	2,00 g
Sulfate de magnesium ,7 H2O.....	0,20 g
Sulfate de magnanése ,4 H2O.....	0,50 g

Agar..... 15,00 g
 Eau distillée qps..... 1000ml
 Stérilisation par autoclavage à 120°C pendant 15 min.

Milieu MRS Bouillon (PH 6,5)

Peptone10g
 Extrait de viande.....8g
 Extrait de levure4g
 Glucose20g
 Acétate de sodium trihydraté5,0 g
 Citrate d'ammonium2,0 g
 Tween 801,0 ml
 Hydrogénophosphate de potassium2,0 g
 Sulfate de magnésium heptahydraté0,2 g
 Sulfate de manganèse tétrahydraté 0,05 g

Milieu M17Gélosé(PH 6,5)

Tryptone.....2,50 g
 Peptone pepsique de viande2,50 g
 Peptone pepsique de soja.....5,00 g
 Extrait autolytique de levure.....2,50 g
 Extrait de viande.....5,00 g
 Lactose.....5,00 g
 Glycérophosphate de sodium.....19,00 g
 Sulfate de magnésium.....0,25 g
 Acide ascorbique.....0,50 g
 Agar bactériologique.....15,00 g

Milieu M17 Bouillon (PH 6,5)

Pour 1 litre de milieu :

- Tryptone.....	2,50 g
- Peptone pepsique de viande	2,50 g
- Peptone papaïnique de soja	5,00 g
- Extrait autolytique de levure.....	2,50 g
- Extrait de viande	5,00 g
- Lactose	5,00 g
- Glycérophosphate de sodium	19,00 g
- Sulfate de magnésium	0,25 g
- Acide ascorbique	0,50 g

Milieu BEA

Pour 1 litre de milieu :

- Tryptone.....	17,00 g
- Peptone pepsique de viande	3,00 g
- Extrait autolytique de levure.....	5,00 g
- Bile de boeuf bactériologique	10,00 g
- Chlorure de sodium.....	5,00 g
- Esculine	1,00 g
- Citrate ferrique ammoniacal	0,50 g
- Azide de sodium	0,15 g
- Agar agar bactériologique.....	13,00 g

pH du milieu prêt-à-l'emploi à 25°C : 7,1 ± 0,2.

Milieu hypersalé Bouillon (PH 7,2)

Extrait de viande.....	5,00 g
Glucose.....	5,00 g
Peptone.....	15,00 g
NaCl.....	40 /65g
Eau distillée qps.....	1000ml

Stérilisation par autoclavage à 120°C pendant 20 min.

Milieu de profile fermentaire « Gibson-Abdelmalek » (PH 6,5)

Extrait de levure.....	2,50 g
Glucose.....	50,00 g
Jus de tomate	100ml
Lait	800ml
Gélose nutritive ordinaire.....	200ml

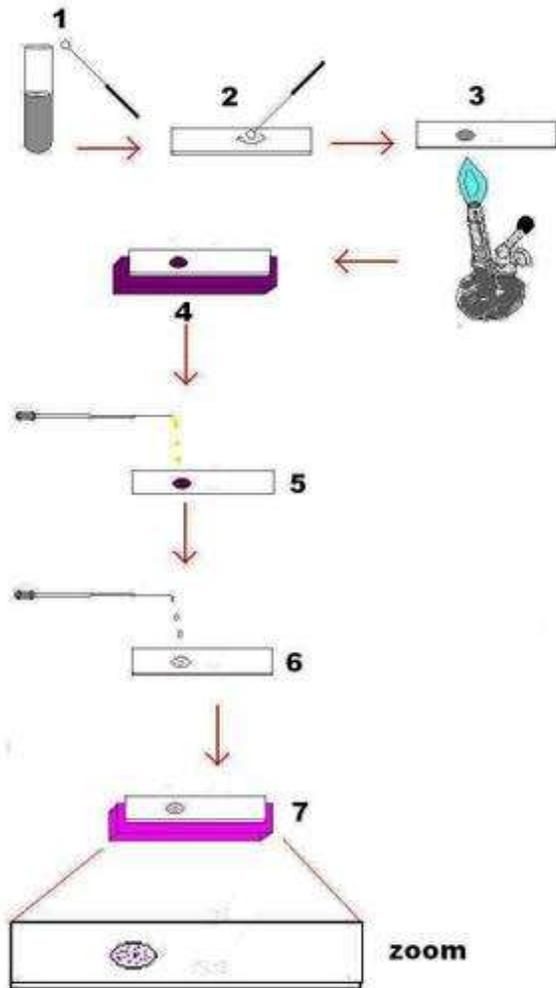
Annexe D

Stérilisation par tyndallisation, 3 fois pendant 30 min à 100°C .

Eau physiologique	
NaCl.....	9g
Eau physiologique.....	1L

Annexe E

Coloration de Gram



La coloration de Gram a été réalisée selon la technique suivante :

- 1- Déposer une goutte d'eau oxygénée sur une lame bien propre ;
- 2- Prélever un échantillon de colonie et mélanger avec la goutte d'eau, strier et sécher par passage rapide sur la flamme d'un bec benzène ;
- 3- Couvrir le frottis par du cristal violet pendant 60 secondes ;
- 4- Ajouté du lugol pendant 30 secondes ;
- 5- Décoloré avec l'alcool 95% ;
- 6- Laver à l'eau distillée pendant 5 secondes
- 7- Ajouter la fuschine et laisser pendant 15 à 30 secondes ;

8- Laver à l'eau;

9- Après séchage déposer une goutte d'huile à immersion sur le frottis et observer au microscope à au grossissement ($\times 100$).

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

Annexe F

Appareillage :

- **Bain Marie (GFL)** : pour liquéfier les milieux de culture.
- **Balance de précision** : Pour peser des ingrédients de milieux de culture.
- **Distillateur (NUVE)**
- **Etuve (MEMMERT) 44°C** : Pour l'incubation des boîtes ensemencées.
- **Etuves (INCUCCELL) (30 et 37°C)** : Pour l'incubation des boîtes ensemencées.
- **L'Autoclave (NUVE)** : Pour stérilisation (par la chaleur humide : T°120C/15min) des équipements en verrerie ainsi que des milieux de culture.
- **pH-mètre (BANTE)**
- **Microscope Optique** : observation des bactéries aux différents grossissements
- **Plaque chauffantes agitatrices (VELP scientifique)** : Faire agiter les milieux de culture durant leur préparation jusqu'à l'ébullition.
- **Réfrigérateur (CONDOR)** : Pour la conservation des milieux de culture.
- **Haute Microbiologique(BIOHAZARD)** : Pour manipuler dans des conditions stérile.

Equipements :

Anse de platine, bec Bunsen, boîtes de petri, papier absorbant, contenaires pour pipettes, papier aluminium, portoirs, seringues (10ml), spatules de laboratoire, pipettes pasteur.

- **verreries :**

Béchers à différents volumes, burette, erlenmeyers, flacons en verre (250ml), lames et lamelles en verre, tubes à essai, Pipettes Pasteur.

- **Réactifs :**

Alcool, Eau distillée, Lugol, Solution d'eau oxygénée (20%) , L'huile à émersion, SolutionNaOH.

Annexe G

Milieux utilisés et conditions d'incubation pour l'isolement des bactéries lactiques

Microorganismes	Milieux D'isolement	Température °C	Durée (h)	Incubation
Streptocoques lactiques	M 17 pH= 6,5	37 et à 45	72	Aérobiose
Lactocoques	M 17 pH = 6,5	30	72	Aérobiose
Lactobacilles Thermophiles	MRS pH = 6 et pH = 5,5	45	72	Anaérobiose

Annexe H

Caractères morphologiques et physiologiques des genres présumés des bactéries lactiques isolées

Macro morphologie	Micro morphologie	Température °C	Groupes
Colonies blanches rondes ou lenticulaires	Coccis diplocoques et en chainettes	37 et à 45	Streptocoques Lactiques
Colonies blanches rondes ou lenticulaires	Coccis diplocoques et en chainettes	30	Lactocoques
Petites colonies blanches à centre marron et bombé	Bâtonnets filamenteux isolés ou en chainettes.	45	Lactobacille thermophile

Annexe I

Profil physiologique et biochimique des souches lactiques isolées

Caractère Souche	Gram	Forme	Catalase	Croissance à 30°c	Croissance à 37 et à 45 °c	Croissance à 6,5 % Nacl	Croissance à PH 4,5	Croissance à PH 6,5	Profil fermentaire	Croissance sur milieu BEA
<i>Streptococcus lactique</i>	+	Cocci	-	-	+	+	-	+	Homo	-
<i>Lactococcus</i>	+	Cocci	-	+	-	+	-	+	Homo	-
<i>Lactobacillus thermophile</i>	+	Bâtonnet	-	+	+	+	+	+	Hétéro	-