



DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

Présenté par

M^{elle} BAHRI DALILA

MASTER EN BIOLOGIE

Spécialité: Exploitation des Écosystèmes Microbiens Laitiers

THÈME

**Isolement de la flore lactique à
partir d'un lait de vache destiné à
la fabrication du camembert.**

Soutenue publiquement le **09/06/2016**

DEVANT LE JURY

Président	<i>M. DACLCHE.F</i>	Grade U. Mostaganem
Encadreur	<i>M.BEKADA.A</i>	Grade U. Mostaganem
Examineurs	<i>Mme. MEDJAHED.M</i>	Grade U. Mostaganem
Co-encadreur	<i>Mme. BOUTARFA.A</i>	Grade U. Mostaganem

Thème réalisé au Laboratoire des Sciences et Technique de Production Animales

Remerciement

En guise de reconnaissance, je veux remercier toutes les personnes qui par leurs conseils, leur collaboration ou leur soutien moral et leur amitié, ont contribué à la réalisation et à l'achèvement de ce travail.

Mon vif remerciement et ma profonde gratitude s'adressent à mon promoteur **M.BEKADA.A**, qui a accepté m'encadrer, je le remercie infiniment pour sa grande patience, ses encouragements, son aide et ses conseils judicieux, durant la réalisation du présent travail.

Je remercie également :

Mme DALACHE .F. Pour avoir accepté de nous honorer par sa présence comme présidente de la commission du jury.

M. MEBJAHEDE. M. pour accepter d'examiner ce travail et pour m'avoir aidé.

Enfin, je ne saurais oublier d'exprimer toute ma sympathie à l'ensemble du personnel de laboratoire de LTSPA.

DALILA

Table des matières :

Résumé

Liste des abréviations

Liste des tableaux

Listes des figures

Chapitre I : Le lait de vache

I.1. Généralités sur le lait.....	3
I.2. La composition de lait de vache.....	3
I.2.1. L'eau	4
I.2.2. Matière grasse	4
I.2.3. Matière azotée	5
I.2.4. Les glucides	5
I.2.5. Matière minérale	6
I.2.6. Enzymes	7
I.2.7. Vitamines	7
I.3. Propriétés physicochimiques du lait	8
I.3.1. Densité du lait	8
I.3.2. Acidité du lait	8
I.3.3. Stabilité à la chaleur	8
I.4. Microbiologie du lait	9
I.5. Les caractéristiques microbiologiques de lait.....	10
I.5.1. Flore originelle	10
I.5.2. Flore de contamination	10

I.6. Qualité organoleptique du lait.....	10
I.6.1. La couleur	10
I.6.2. L'odeur	11
I.6.3. La saveur	11
I.6.4. La viscosité	11

Chapitre II : Les bactéries lactiques

II.1. Généralités sur les bactéries lactiques.....	12
II.2 .Principale caractéristique des bactéries lactiques	14
II.2.1. Caractères morphologiques	14
II.2.2. Caractères biochimiques et physiologiques	14
II.2.3. Caractères de la structure	15
II.3. Habitat des bactéries lactiques	15
II.4. Taxonomie des bactéries lactiques	16
II.5 : Classification des bactéries lactiques	18
II.5.1 : Le genre <i>Lactobacillus</i>	18
II.5.2. Le genre <i>Streptococcus</i>	19
II.5.3. Le genre <i>Lactococcus</i>	19
II.5.4. Le genre <i>Leuconostoc</i>	20
II.5.5. Le genre <i>Bifidobacterium</i>	20
II.6 .Biodiversité des bactéries lactiques dans les fromages.....	21
II.7.Intérêts et rôles des bactéries lactiques dans l'industrie agro-alimentaire.....	22

Chapitre III : Matériels et méthode

III.1. Matériels	24
III.1.1 Objectif	24
III.1.2. Site d'étude	24
III.1. 3. Source des échantillons	24
III.1.4. Milieux de cultures	24
III.1.5. Les bouillons.....	25
III.1.6. Les réactifs.....	25
III.1.7.Les colorants	25
III.1 III.2. Méthodes	25
III.2.1. Analyse physico-chimique.....	25
III.2.1. Analyse physico-chimique.....	25
III.2.2. Mesure du pH de trois échantillons	25
III.2.3.Détermination de l'acidité titrable.....	26
III.2.4.Techniques isolement des bactéries lactiques	26
III.2.4.1.Isolement	26
III.2.4.2. Les dilutions.....	26
III.2.4.3. Purification	26
III.2.5.Technique de conservation.....	28
III.2.5.1. Conservation à court terme	28
III.2.5.2. Conservation à long terme	28
III.2.5. Techniques d'identification des souches isolées.....	28

III.2.5.1. Etude morphologique.....	28
III.2.6. Tests physiologiques.....	28
III.2.6.1. Recherche de catalase	28
III.2.6.2. Test de la thermorésistance.....	29
III.2.6.3. Croissance à différentes températures.....	29
III.2.6.4. La croissance à différents pH	29
III.2.6.5. Croissance en milieu hypersalé.....	30
III.2.6.6. La croissance sur le lait de Sherman	30
III.2.7. Tests biochimiques	30
III.2.7.1. Recherche de l'arginine dihydrolase (ADH)	30
III.2.7.2. Production de l'acétoïne :(Acétyl-Méthyle-Carbinol).....	31
III.2.7.3. Test dextrane.....	31
III.2.7.4. Recherche de type fermentaire.....	31
III.2.7.5. Etude de la fermentation des sucres.....	32

Chapitre IV : Résultats et discussions

IV.1. Résultats d'Analyse physico-chimique des échantillons de lait cru de vache	33
IV.2. Préidentification des bactéries lactiques.....	33
IV.2.1. Caractérisation des bactéries lactiques	33
IV.2.1.1. Etude morphologiques.....	33
IV.2.1.1.1. Aspect macroscopique.....	33

IV.2.1.1.2. Aspect microscopique.....	34
V.2.2: Les tests physiologiques.....	35
IV.2.2.1.Recherche de catalase.....	35
IV.2.2.2.Test de la thermorésistance.....	35
IV.2.2.3. Résultat de la croissance aux différentes températures.....	36
IV.2.2.4.La croissance à différents pH	37
IV.2.2.5.Croissance en milieu hypersalé.....	37
IV.2.2.6.La croissance sur le lait de Sherman.....	38
IV.2.3. Tests biochimiques.....	40
IV.2.3.1. Recherche de l'arginine dihydrolase (ADH)	40
IV.2.3.2. Production de l'acétoïne :(Acétyle-Méthyle-Carbinol).....	40
IV.2.3.3. Recherche de type fermentaire	40
IV.2.3.4. Résultats de test d'extrane.....	41
IV.2.3.5. Etude de la fermentation des sucres.....	41
IV.2.4.Identification des souches lactiques isolées à partir de lait de vache.....	44
V.3.Discussion.....	46
Conclusion	47

Références bibliographiques

Annexe

Résumé

Résumé

Les bactéries lactiques sont des micro-organismes naturellement présents dans le lait et les produits laitiers. Dans cette présente étude, l'isolement de souches lactiques à partir de trois échantillons de lait cru de vache récoltés dans la wilaya de Mostaganem, suivi de purification et d'identification en se basant sur les caractères morphologiques, physiologiques et biochimiques, nous ont permis d'obtenir un total de vingt isolats lactiques répartis en trois principaux genres et espèces suivantes :

Streptococcus bovis (10),

Streptococcus mutans (6),

Streptococcus thermophilus (1),

Lactococcus lactis subsp lactis biovar diacetylactis (2)

Enterococcus faecalis (1).

Les deux dernières espèces *Lactococcus lactis subsp lactis biovar diacetylactis* et *Enterococcus faecalis* peuvent être exploitées industriellement et utilisées dans la confection d'un starter pour la fabrication fromagère notamment les pâtes molles de type camembert.

Mots clés : Lait cru de vache, bactéries lactiques, isolement, purification, identification.

Summary

Lactic acid bacteria are microorganisms naturally present in milk and milk products. In this present study, the isolation of lactic strains from three samples of raw cow milk collected in the wilaya of Mostaganem, followed by purification and identification based on morphological, physiological and biochemical, enabled us to obtain a total of twenty lactic isolates divided into three main following genera and species:

Streptococcus bovis (10)

Streptococcus mutans (6)

Streptococcus thermophilus (1),

Lactococcus lactis subsp lactis biovar diacetylactis (2)

Résumé

Enterococcus faecalis (1).

The last two species *Lactococcus lactis subsp lactis biovar* and *diacetylactis*

Enterococcus faecalis can be exploited industrially and used in the making of a starter for cheese production including soft cheeses like Camembert.

Keywords: Raw cow's milk, lactic acid bacteria, isolation, purification and identification.

G+ C : Guanine+ Cytosine

°C : Degré Celsius

CO₂ : Oxyde de carbone

pH : potentiel Hydrogène

ml : millilitre

l : litre

g : gramme

H : Heure

NaCl : Chlorure de sodium

MRS : Man-Rogosa et Sharp

S : seconde

ADH : Arginine Dihydrolase

ADN : Acide Désoxyribonucléique

ARN : Acide Ribonucléique

BCP : Pourpre de bromocrésol

LSTPA : Laboratoire des Sciences et Techniques de Productions Animales.

Liste des tableaux :

Tableau 1 : Composition générale du lait de vache	4
Tableau 2 : composition lipidiques du lait.....	4
Tableau 3. Teneur en vitamines du lait de vache (mg/litre)	7
Tableau 4 : Les différents genres des bactéries lactiques et leurs principales caractéristiques.....	21
Tableau 5 : Résultats des analyses physico-chimiques effectuées sur les échantillons de lait analysés.....	32
Tableau 6: Critères morphologiques des bactéries lactiques isolées à partir de lait de vache.	35
Tableau 7: Résultats des tests physiologiques.....	38
Tableau 8 : Résultat de profil fermentaire des souches isolées	42
Tableau 9 : Résultats des tests biochimiques.....	43
Tableau 10 : L'identification des souches lactiques isolées à partir de lait de vache.....	44

Listes des figures :

Figure 01 : Représentation schématique des principales voies métaboliques des bactéries lactiques ayant des impacts technologique.....	13
Figure 02 : Arbre phylogénétique des principaux genres de bactéries lactiques et des genres Associés, obtenu par analyse des ARNr 16S	17
Figure 3 : protocole d'isolement des souches lactiques.....	27
Figure 4 : Observation macroscopique des colonies bactériennes sur milieu MRS et M17...33	
Figure 5 : Observation microscopique de la coloration de Gram au grossissement x100.....	34
Figure 6 : Résultats de la thermorésistance	36
Figure 7 : Résultat de la croissance à différents température.....	36
Figure 8: Résultat de la croissance à différents pH.....	37
Figure 9 : Résultats de la croissance en milieu hypersalée.....	37
Figure 10 : Résultats de croissance pour lait de Sherman.....	38
Figure 11 : Résultats de l'arginine dihydrolase (ADH).....	40
Figure 12 : Résultats du test l'acétoïne	40
Figure 13 : Résultats du test de type fermentaire	41
Figure 14 : Résultats de la fermentation des sucres.....	41
Figure 15 : Secteurs de répartition des genres des bactéries lactique.	46

I.1 Généralités sur le lait

Le lait destiné à l'alimentation humaine a été défini en 1908, lors du premier congrès international pour la répression des fraudes alimentaires, comme « produit intégral de la traite totale et ininterrompue d'une femelle laitière bien portante, bien nourrie et non surmenée. Il doit être recueilli, proprement et ne pas contenir de colostrum » (**Larpen, 1997**).

En générale, le lait est sécrété par les glandes mammaires des femelles mammifères dont l'activité chez la vache commence à la mise bas et se poursuit pendant une dizaine de mois, tant que dure la traite.

Le colostrum est le liquide sécrété par la glande mammaire dans les jours qui suivent la mise bas (**Boudier et Luquet, 1981**).

I.2. La composition de lait de vache

Le lait est une émulsion de matière grasse dans une solution aqueuse comprenant de nombreux éléments dont les uns sont à l'état dissous et les autres sous la forme colloïdale (**Vignola et al., 2002**).

D'un point de vu quantitatif, le lait se compose d'élément majeurs et d'éléments moins abondants, dont beaucoup sont non dosable.

Comme composants majeurs : l'eau, la matière grasse, le lactose, les protéines et les matières salines. Et comme éléments mineurs : les vitamines, les oligo-éléments, les gaz dissous, la lécithine, les enzymes et les nucléotides. Certains d'entre eux jouent un rôle en raison de leur activité biologique.

Cette composition varie selon différents facteurs liés à l'animal. Les principaux étant l'individualité, la race, l'âge et l'espèce, la période de lactation, la saison et enfin l'alimentation.

Tableau 1 : Composition générale du lait de vache (Alais, 1975).

Constituants majeurs	Variations limites (%)	Valeur moyenne (%)
Eau	85,5 – 89,5	87,5
Matière grasse	2,4 – 5,5	3,7
Protéines	2,9 – 5,0	3,2
Glucides	3,6 – 5,5	4,6
Minéraux	0,7 – 0,9	0,8

I.2.1. L'eau

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

I.2.2. Matière grasse

Les matières grasses sont les éléments majeurs du lait (30 à 60 g/l), dont la quantité varie en fonction des conditions d'élevage ; elles se trouvent en émulsion sous forme de globules gras individualisés (0.1 à 20 μm de dimension) (Vignola, 2002).

Les lipides du lait sont constitués de 98% de triglycérides, 1% de phospholipides, 1% de stérols (cholestérol), tocophérol et de vitamines liposolubles.

Tableau 2 : Composition lipidiques du lait (Grappin et Pochet, 1999).

Constituants	Proportions de lipides du lait (%)
Triglycérides	98
Phospholipides	01
Fraction insaponifiable	01

I.2.3. 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 (environ 80% des protéines du lait). Elle est formée par quatre protéines individuelles :

- Alpha-caséines ou caséines α_{s1} 36% et α_{s2} 10%
- Béta-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**).

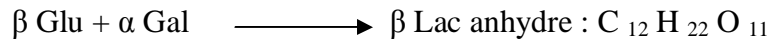
Une micelle de caséine contient environ 92 à 93% de protéines, les caséines, et 8% de minéraux. La partie minérale de la micelle comporte 90% de phosphate de calcium et 10% d'ions citrate et de magnésium (2,9% de Ca, 0,1% de Mg, 4,3% d'ions phosphate, 0,5% d'ions citrate) (**Cayot et Lorient, 1998**). 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**).

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 lactose (**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)**.

A température élevée, le lactose participe avec les protéiques à des réactions de brunissement non enzymatique pouvant altérer la couleur des laits stérilisés **(Alais, 1975)**.

I.2.5. Matière minérale

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 existents 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)**.

I.2.6. Enzymes

Le lait contient principalement trois types d'enzymes : les hydrolyses, les dés-hydrolases (ou oxydase) et les oxygénases.

Ces enzymes originaux proviennent du pis de la vache, et les enzymes bactériens d'origine bactérien. Ils existent cependant beaucoup de bactéries qui produisent le même type d'enzymes (Vignola, 2002).

I.2.7. Vitamines

Tableau 3. Teneur en vitamines du lait de vache (mg/litre) (Alais, 1985).

Vitamine	Moyennes
1- Vitamines hydrosolubles	
B1 (thiamine)	042
B2 (riboflavine)	172
B6 (pyridoxine)	048
B12 (cobalamine)	045
Acide ascorbique	092
Acide folique	053
Acide pantothénique	36
Inositol	160
Biotine	036
Choline	170
C (acide ascorbique)	8
2- Vitamines liposolubles	
A	37
Carotène	021
D (cholécalférol)	0008
E (tocophérol)	11
K	03

I.3. Propriétés physicochimiques du lait

La connaissance des propriétés physicochimiques du lait revêt une importance incontestable car elle permet de mieux évaluer la qualité de la matière première et de prévoir les traitements et opérations technologiques adaptés.

I.3.1. Densité du lait

Le poids d'une substance par unité de la volume est la masse volumique ; tandis que la densité est le rapport de la masse volumique avec celle de l'eau. Etant donné que la masse volumique de toute substance varie avec la température.

La densité du lait à 15°C est en moyenne 1.032 (1.028-1.035). Elle est la résultante de la densité de chacun des constituants du lait et il est aussi donné que la matière grasse est le seul constituant qui possède une densité inférieure de 1 (**Vignola, 2002**).

I.3.2. Acidité du lait

Normalement l'acidité du lait est proche de la neutralité (pH=7,0). Il est légèrement acide et son pH varie normalement de 6,6 à 6,8. Cependant, lorsque le lait n'est pas refroidi rapidement à 4°C après la traite, les bactéries lactiques y croissent rapidement.

Ces bactéries produisent l'acide lactique qui diminue le pH du lait (l'acidité augmente) .

Lorsque l'acidité est suffisamment forte à température ambiante (un pH inférieur à 4,7) la caséine du lait coagule. Si la température est plus élevée, la coagulation de la caséine du lait se produit en présence de moins d'acide (un pH plus élevé). (**Wattiaux, 1997**).

I.3.3. Stabilité à la chaleur

Le lait frais peut maintenir sa structure normale lorsqu'il est exposé à de courtes périodes de chaleur intensive. Cependant, l'exposition prolongée à la chaleur dégrade la structure des micelles de caséines et modifie la structure du lactose qui tend à réagir avec les protéines. La stabilité à la chaleur peut donc indiquer la qualité d'un

lait. Un lait acide se déstabilise plus rapidement à la chaleur qu'un lait normal (**Wattiax, 1997**).

➤ **Point de congélation**

Le point de congélation du lait est légèrement inférieur à celui de l'eau puisque la présence de solides solubilisés abaisse le point de congélation. Il peut varier de $-0,530^{\circ}\text{C}$ à $-0,575^{\circ}\text{C}$ avec une moyenne à $-0,555^{\circ}\text{C}$. Un point de congélation supérieur à $-0,530^{\circ}\text{C}$ permet de soupçonner une addition d'eau au lait. On vérifie le point de congélation du lait à l'aide d'un cryscope (**Piveteau, 1999**).

➤ **Point d'ébullition**

On définit le point d'ébullition comme la température atteinte lorsque la pression de la substance ou la solution est égale à la pression appliquée. Le point d'ébullition est légèrement supérieur au point d'ébullition d'eau, soit $100,5^{\circ}\text{C}$ (**Vignola, 2002**).

I.4. Microbiologie du lait

La microbiologie est intimement liée à l'industrie laitière, elle s'applique à tous ses secteurs. Ses principes, en effet, justifient le mode de production hygiénique du lait, commandent plusieurs traitements et procédés industriels lors de sa transformation à l'usine, et sont à la base des méthodes de conservation des produits laitiers. La qualité du lait et des produits laitiers en dépend en grande partie, si bien que l'on tient compte de normes microbiologiques dans son évaluation officielle.

L'application des principes généraux d'hygiène permet d'atteindre les trois buts suivants :

- Le premier, prévenir et empêcher la transmission de bactéries pathogènes par le lait et les produits laitiers et de cette façon protéger la santé des consommateurs ;
- Le second, prévenir et restreindre la croissance microbienne au lait et aux produits laitiers et ainsi empêcher leur détérioration et l'apparition de défauts ;
- Le troisième, favoriser et guider le développement des bactéries utiles dans certains produits laitiers, tels que les produits fermentés (**Guiraud, 2003**).

I.5. Les caractéristiques microbiologiques 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.

I.5.1. Flore originelle

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

I.5.2. Flore de contamination

Le lait peut se contaminer par des apports microbiens divers :

- Fèces et téguments de l'animal : Coliformes, Entérocoques *Clostridium*, *Salmonella*.
- Sol : *Streptomyces*, *Listeria*, bactéries sporulés, spores fongiques.
- L'air et l'eau : Flores diverses, bactéries sporulées (**Guiraud, 2003**).

I.6. Qualité organoleptique du lait

I.6.1. La couleur

Le lait est de couleur blanc mat, qui est due en grande partie à la matière grasse, aux pigments de carotène (la vache transforme le β -carotène en vitamine A qui passe directement dans le lait (**Fredot, 2005**).

Reumont, (2009) explique que dans le lait, deux composants, les lipides sous forme de globules de matière grasse et les protéines sous forme de micelles de caséines diffractent la lumière. Ces agrégats dispersent les rayons lumineux sans les absorber et le rayonnement

qu'ils renvoient, est identique en composition au rayonnement solaire, à savoir une lumière blanche.

I.6.2. L'odeur

Selon **Vierling (2003)**, l'odeur caractéristique du lait provient du fait que la matière grasse qu'il contient fixe des odeurs animales. Elles sont liées à l'ambiance de la traite, à l'alimentation (les fourrages à base d'ensilage favorisent la flore butyrique, le lait prend alors une forte odeur), à la conservation (l'acidification du lait à l'aide de l'acide lactique lui donne une odeur aigrelette).

I.6.3. La saveur

La saveur du lait normal frais est agréable. Celle du lait acidifié est fraîche et un peu piquante.

Les laits chauffés (pasteurisés, bouillis ou stérilisés) ont un goût légèrement différent de celui du lait cru. Les laits de rétention et de mammites ont une saveur salée plus ou moins accentuée. Il en est parfois de même du colostrum. L'alimentation des vaches laitières à l'aide de certaines plantes de fourrages ensilés, etc. Peut transmettre au lait des saveurs anormales en particulier un goût amer. La saveur amère peut aussi apparaître dans le lait par suite de la pullulation de certains germes d'origine extra-mammaire (**Thieulin et Vuillaume, 1967**).

I.6.4. La viscosité

La viscosité du lait est une propriété complexe qui est particulièrement affectée par les particules colloïdes émulsifiées et dissoutes. La teneur en graisse et en caséine possède l'influence la plus importante sur la viscosité du lait. La viscosité dépend également de paramètres technologiques.

La viscosité est une caractéristique importante de la qualité du lait, étant donné qu'une relation intime existe entre les propriétés rhéologiques et perception de la qualité par le consommateur. Ainsi, un consommateur d'Europe centrale évalue de manière très positive le lait concentré à forte consistance (filandreux). Il associe la teneur élevée des composants du lait à la viscosité élevée.

II.1. Généralités sur les bactéries lactiques

Le groupe des bactéries lactiques ou bactéries de l'acide lactique a été défini en 1919 par Orla-Jensen. Il a réuni plusieurs genres caractérisés par leur capacité à fermenter les glucides en produisant de l'acide lactique (**Tredez, 2008**).

Les bactéries lactiques sont des cellules vivantes, procaryotes, hétérotrophes. A quelques exceptions près, les bactéries lactiques sont généralement Gram positives, immobiles, asporulées, anaérobies mais aérotolérantes. (**Holzappel et al., 2001 ; Gevers 2002**).

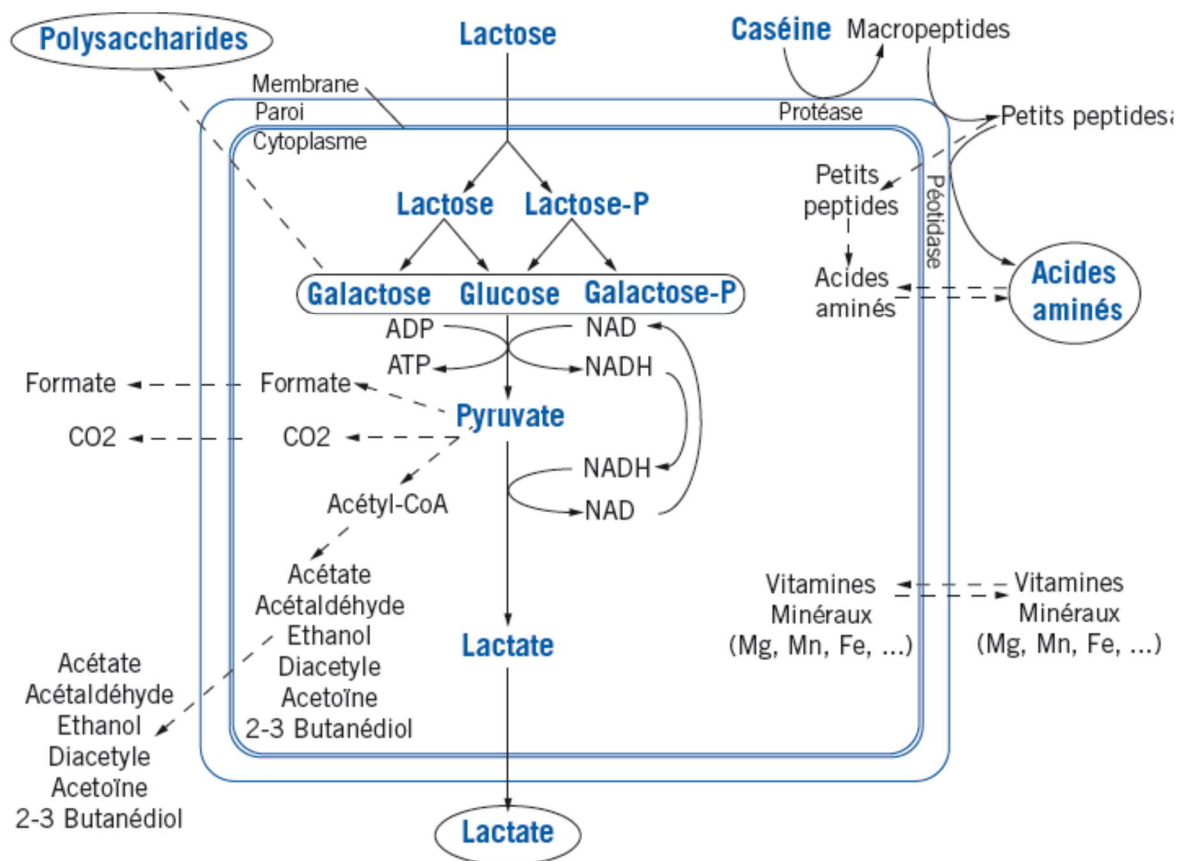
Leur forme peut être coccoïde, coccobacillaire ou bacillaire, elles sont généralement mésophiles avec une température optimum de croissance entre 20°C et 30°C ou thermophiles entre 30°C et 45°. La majorité des souches se développent à pH 4.0-4.5, certaines sont en activité à pH 9.6 et d'autres à pH 3.2 (**Jozala et al., 2005 ; Carr et al 2002 ; Kotelnikova et Gelfand, 2002**).

Elles sont de métabolisme chimio-organotrophe, ce qui signifie qu'elles utilisent comme source énergétique de substances hydrocarbonées telles que les sucres, les alcools et les acides organiques. Elles possèdent souvent des exigences nutritionnelles complexes en termes d'acides aminés, de peptides, de vitamines, de sels, d'acides gras et de sucre (**dellaglio et al., 1994**).

En générale ces bactéries ne possèdent ni catalase, ni nitrate réductase, ni cytochrome oxydase (à l'exception de quelques souches sous certaines conditions). Elles sont protéolytiques, ne liquéfient pas la gélatine, et ne forment plus d'indole ni d'hydrogène sulfureux, ces bactéries sont également incapables de fermenter le glycérol (**Dellaglio et al., 1994 ; Salminen et al., 2004**).

Toutes les bactéries lactiques ont un métabolisme fermentaire strictement saccharolytique par lequel en utilisant les glucides (**figure01**), elles peuvent produire soit de :

- L'acide lactique exclusivement (bactéries homolactiques strictes) ;
- L'acide lactique et l'acide acétique (bactéries hétérolactiques facultatives) ;
- L'acide lactique, de l'acide acétique ou de l'éthanol et du CO₂ (bactéries hétérolactiques strictes) (**Vandamme et al., 1996**).



D'après Danone – World Newsletter n°5

Figure 01 : Représentation schématique des principales voies métaboliques des bactéries lactiques ayant des impacts technologique (**dellaglio et al., 1994**).

II.2 .Principale caractéristique des bactéries lactiques

II.2.1. Caractères morphologiques :

L'étude de la morphologie bactérienne permet une orientation préliminaire dans l'identification des bactéries auxquelles nous nous intéressons. La détermination de la morphologie comporte deux aspects : macroscopique et microscopique.

- Macroscopique : concerne essentiellement les caractéristiques des colonies après cultures sur milieu solide. Chez les bactéries lactiques, ces colonies sont de formes circulaires, à contour régulier, à surface lisse, de couleur blanche avec un aspect laiteux. Leur diamètre est compris entre 0.5 et 1.5 mm.
- Microscopique : l'observation microscopique des bactéries lactiques après coloration simple ou différentielle révèle deux formes majeures : coques (0.5 à 2 μm de diamètre) ou bâtonnets (0.5 à 2 μm de diamètre, 1 à plus de 10 μm de long) (**Dellaglio et al., 1994**). Elles sont toutes à Gram positif et généralement immobiles. Leur mode d'association est très hétérogène (cellules isolées, paire, tétrades, amas irréguliers, longues ou courtes chaînettes) mais spécifique à chaque genre bactérien.

II.2.2. Caractères biochimiques et physiologiques

Les bactéries lactiques sont caractérisées par un ensemble de traits biochimiques et physiologiques communs qui leur sont propres et permettent ainsi de les distinguer des autres groupes bactériens.

Toutes les bactéries lactiques ont la capacité de fermenter certains sucres en acide lactique. Certaines sont dites homofermentaires, car elles produisent très majoritairement de l'acide lactique.

Les hétérofermentaires produisent de l'acide lactique en même temps que d'autres composés (généralement l'acétate et l'éthanol) (**Bolotin et al., 2001 ; Duwat et al., 2001 ; Miyoshi et al., 2003**),

Les bactéries lactiques ne liquéfient pas la gélatine et ne produisent pas d'indole ni d'hydrogène sulfureux. Elles sont asporulantes, ne se développent pas en présence de 6.5% de NaCl, ou lorsque le pH est supérieur à 9.6 (**Dellaglio et al., 1994**). Elles sont anaérobies mais souvent micro-aérophiles, et présentent des exigences nutritionnelles complexes en ce qui

concerne les acides aminés, les peptides, les sels, les acides gras et les glucides fermentescibles.

II.2.3. Caractères de la structure :

Se sont des unicellulaires, donc constitués d'une seule composée obligatoirement d'une paroi, un cytoplasme renfermant les acides nucléiques, principalement l'ADN chromosomique et parfois des plasmides.

Le cytoplasme est entouré d'une membrane cytoplasmique. (Stiles et Holzapfel ; 1997).

II.3. Habitat des bactéries lactiques

Grace à leur souplesse d'adaptation physiologique, les bactéries lactiques peuvent coloniser des milieux très différents du point de vue physico-chimique et biologique. Dans différents écosystèmes, les bactéries lactiques sont capables d'exercer des effets bénéfiques ou, plus rarement, d'engendrer des altérations biologiques.

La source originale des bactéries lactiques est constituée par les plantes vertes, et suite à des processus d'évolution et d'adaptation, ces bactéries ont colonisé d'autres environnements et se trouvent ainsi dans divers habitats, tant que ceux-ci réunissent les conditions adéquates pour satisfaire leurs besoins nutritifs (Fenton, 1987 ; Kelly *et al.*, 1998 ; Carr *et al.*, 2002). De cette manière, le lait, auquel les bactéries lactiques peuvent accéder à travers le corps de l'animal, les excréments ou les végétaux, est devenu un habitat caractéristique des bactéries lactiques, et ainsi elles se trouvent associées à divers produits laitiers fermentés (Dellaglio *et al.*, 1994). Il faut signaler, en outre, que les bactéries lactiques font partie de la microflore naturelle de la bouche, du tractus intestinal et du vagin de l'espèce humaine et de nombreux animaux homéothermes (Holzapfel *et al.*, 1998 ; Sookkee *et al.*, 2001).

II.4. 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 électro phorétique du lactate déshydrogénase sont également d'autres critères qui peuvent être étudiés pour l'identification des espèces lactiques (**Vandamme, 1996 ; Stiles et Holzapfel, 1997**).

La morphologie est considérée comme la caractéristique clé pour décrire et classifier 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**).

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 Holzapfel, 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 groupes des bactéries lactiques (**Broadbent, 2001**).

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 02) (Stiles et Holzapfel, 1997 ; Pilet *et al.*, 2005).

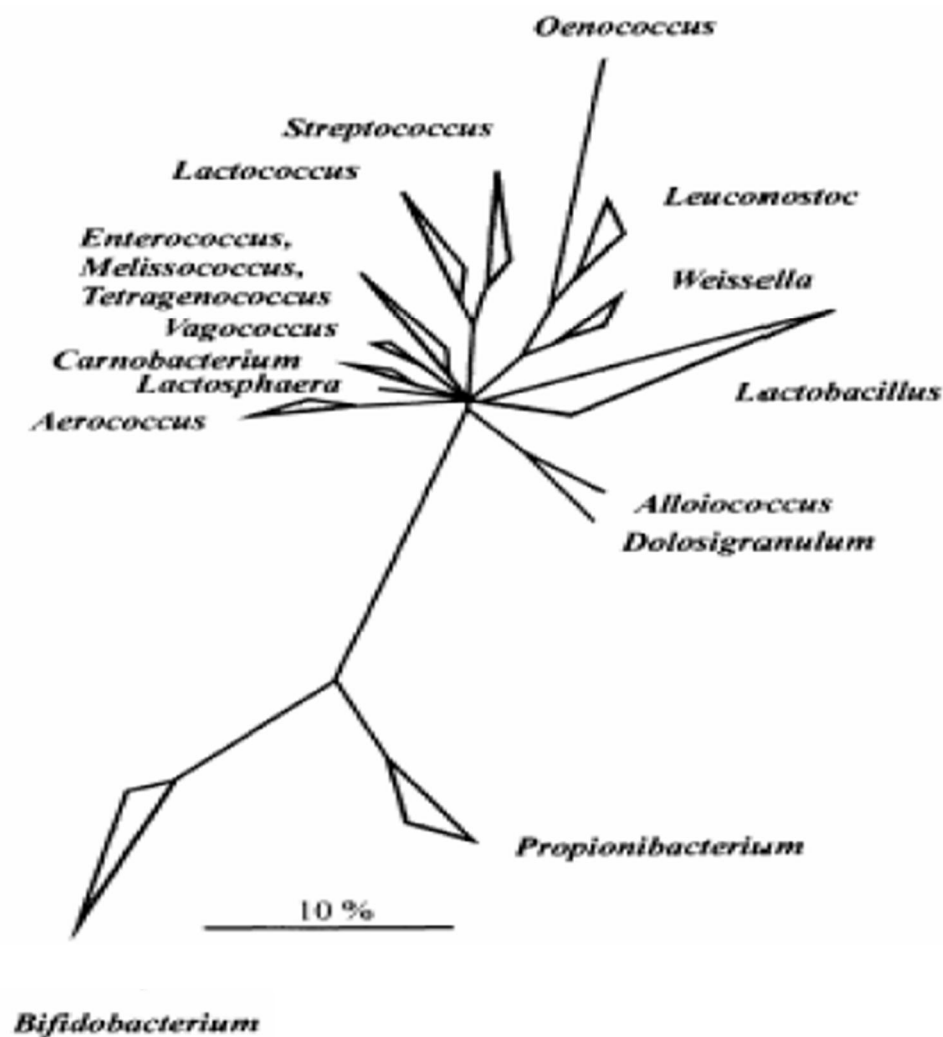


Figure 02 : Arbre phylogénétique des principaux genres de bactéries lactiques et des genres Associés, obtenu par analyse des ARNr 16S (Stiles et Holzapfel, 1997).

II.5 : Classification des bactéries lactiques

Traditionnellement, les bactéries lactiques ont été classées sur la base des propriétés phénotypiques : la morphologie, le mode de fermentation du glucose, la croissance à différentes températures, l'isomère de l'acide lactique produit et la fermentation des différents hydrates de carbone (De Roissart et Luquet, 1994 ; Holzapfel *et al.*, 2001).

Les genres les plus étudiés sont *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, et *Pediococcus* (Drouault et Corthier, 2001). Actuellement le groupe des bactéries lactiques associées aux aliments renferme les 12 genres suivantes : *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* et *Weissella* et *Bifidobacterium*.

II.5.1 : Le genre *lactobacillus*

Parmi les genres les plus utilisés en agroalimentaire et la nutrition humaine, selon la collection Deutsche Sammlung Von Mikroorganismen and Zellkulturen (Kandler et Weiss, 1986), ce genre renferme 174 espèces (les sous-espèces sont incluses). Il contribue aux saveurs des produits fermentés par la production de diacétyle principalement.

Ces bactéries sont de formes bacillaire ou cocobacillaire et ont tendance à former des chaînettes. Elles sont des acidophiles, leur pH maximum de croissance est de 7,2. Certaines espèces sont mésophiles, mais d'autres sont thermophiles comme l'espèce *lactobacillus jensenii* (Laurent *et al.*, 1998).

Les *lactobacilles* se répartissent en trois groupes selon leur profil fermentaire, d'après la classification de Kandler et Weiss (1986) (Tormo, 2010).

Groupe I : il comprend les espèces homofermentaires obligatoires, c'est-à-dire produisant exclusivement de l'acide lactique à partir du glucose. Ce groupe est constitué d'environ 25 espèces, la plupart thermophiles (croissance à 45°C) dont *Lb.delbrueckii*, *Lb. acidophilus* et *Lb.helveticus*. La plupart des espèces sont présentes dans le lait et les produits laitiers.

Groupe II : ce sont les espèces hétérofermentaires facultatives, c'est-à-dire capables d'utiliser la voie hétérofermentaire dans certaines conditions comme une concentration en

glucose limitante. Il est constitué d'une vingtaine d'espèces dont *Lb. casei*, *Lb. curvatus*, *Lb. sake* et *Lb. plantarum*, majoritairement mésophiles (**Laurent et al., 1998**).

Groupe III : il est constitué des espèces hétérofermentaires obligatoires, c'est-à-dire utilisant la voie des pentoses phosphates pour la fermentation des hexoses et des pentoses.

C'est un groupe qui rassemble des espèces relativement hétérogène, surtout mésophiles, comme *Lb. brevis*, *Lb. kefir* et *Lb. sanfransisco*, Outre leur présence dans les produits laitiers et carnés, certaines espèces se développent dans le tube digestif de l'homme, et participent à l'équilibre de la flore intestinale (**Laurent et al., 1998**).

II.5.2. Le genre *Streptococcus*

Les Streptocoques sont des coques Gram positif, disposés en paires ou en chaînettes, non sporulés, apparaissant parfois capsulés, immobiles, anaérobies facultatifs, fragiles aux variations de température et de PH. Habituellement sont isolées de la peau et des muqueuses de l'homme et des animaux. Leur pouvoir pathogène est très polymorphe selon les espèces (**Ctinils, 2010**).

Le genre *Streptococcus* contient plus de 40 espèces. Elles se répartissent en six groupes, chaque groupe est caractérisé par distinct potentiel pathogénique et autres propriétés (**Kilian, 2002**).

- Le groupe *pyogenic* regroupe la majorité d'espèces qui sont pathogènes de l'homme et les animaux.
- Le groupe *mitis* regroupe les espèces commensales de cavité buccale et le pharynx de l'homme. Bien que *Streptococcus pneumoniae* est une espèce pathogène très important.
- Le groupe *bovis* vive au niveau du colon.
- Le groupe *mutans* colonise exclusivement les dents humaines et certains animaux.
- Les groupes *anginosus* et *salivarius* parmi la microflore commensale de cavité buccal et du pharynx.

II.5.3. Le genre *Lactococcus*

Ce sont des microorganismes mésophiles, à Gram positif, sans activité catalase, non mobiles et se présentant sous forme de coques disposés en paires ou en chaînette. Leur métabolisme est homofermentaire, de l'acide lactique (L+) étant produit par la voie des hexoses (Tormo, 2010). Le genre *Lactococcus* comprend 6 espèces : *L.garviae*, *L.piscium*, *L.plantarum*, *L.raffinolactis* et *L.lactis*, *L. chungangens*. Cette dernière espèce est divisée en trois sous espèces : *L.lactis subsp. Lactis*, *L.lactis subsp. Cremoris* et *L.lactis subsp.hordniae* (Bekouche, 2006).

Les lactocoques se retrouvent fréquemment dans les laits crus à des niveaux pouvant varier de 10 à 10 000 ufc.ml-1, selon les études et les espèces laitières. Les niveaux sont supérieurs dans les laits de chèvre et de brebis, comparés au lait de vache. Parmi les lactocoques, *Lactococcus lactis* est l'espèce la plus étudiée et la plus fréquemment détectée dans les laits crus (Serna et Rodríguez, 2006).

II.5.4. Le genre *Leuconostoc*

La famille des *leuconostocaceae*, contient des coques ovoïdes, pouvant être allongés ou elliptiques. Ce sont des cellules sphériques disposent en paire ou en chaîne, elles sont caractérisées par un métabolisme hétérofermentaire en convertissant le glucose en D- lactate et éthanol ou en acide acétique par la voie de transcétolase, elles sont incapables de dégrader l'arginine ce qui leurs distinguent des *lactobacilles* hétérofermentaires (Gonzalez et al., 2007).

On range habituellement les *leuconostocs* dans les anaérobies facultatifs mais certains les considèrent comme des anaérobies facultatifs, mais certains les considèrent comme des anaérobies aérotolérants. Ils sont exigeants et présentent souvent une auxotrophe pour les acides aminés, les peptides, les vitamines, les sels minéraux et glucides (Dellaglio et al., 1994).

Ce genre comprend les espèces suivantes : *Ln. Mesenteroides* avec ces sous espèce *mesenteroides cremoris* et *dextranicum* et *Ln. Lactis* et *Pseudomesenteroides* et *Ln. Paramesenteroides* (Collins et al., 1993).

II.5.5. Le genre *Bifidobacterium*

Bifidobacterium a été isolée pour la première fois par Tissier en 1899 (**Biavati et al., 2000**), 32 espèces ont été assignées de ce genre (**Dong et al., 2000**). Ces bactéries sont Gram positif, anaérobie, immobiles, non sporulés et catalase négative (à l'exception de *B.indicum* et *B.asteroides*. Elle a haut pourcentage en G+C (entre 55 et 67%) (**Valeria, 2009**).

Le tractus intestinal humain et animal est l'habitat naturel de *Bifidobacterium*, Celle-ci prédominant de ce dernier : environ 3% de la microflore fécale chez l'adulte et de 91% chez les nourrissons (**Hadadji et al., 2005 ; Boclé, 2005**).

Tableau 4 : Les différents genres des bactéries lactiques et leurs principales caractéristiques (**Laurent et al, 1998**).

Genre	Morphologie	Fermentation	Température optimale	Nombre d'espèces
Lactobacilles	Bacilles	Homo ou heterofermentaires	thermophiles ou mésophiles	G1 :23 G2 :16 G3 :22
Lactococcus	Coques	homofermentaires	Mésophiles	5
Streptococcus	Coques	homofermentaires	Mésophiles ou thermophiles	19
Leuconostoc	Coques	heterofermentaires	Mésophiles	11
Bifidobacterium	Forme irrégulière	Acide acétique et lactique	Mésophiles	25

II.6 .Biodiversité des bactéries lactiques dans les fromages

Des études décrivant la biodiversité de la flore lactique dans les fromages à pâte molle, essentiellement porté sur le camembert montrent que la flore lactique du camembert est quantitativement marquée par les lactocoques qui atteignent 10^9 $\mu\text{fc/g}$ de fromage au cours de l'affinage (**Richard, 1984 ; Desmaures, 1995**), avec une prédominance de l'espèce *Lactococcus lactis*. Au niveau intraspécifique, (**Corrolier, 1999**) a mis en évidence une appartenance unique à la sous-espèce *Lc lactis ssp. lactis* et *Lc. lactis ssp. cremoris* au plan génotypique. Les lactobacilles, dont la principale source serait le lait, représentent le second groupe de bactéries lactiques majoritairement retrouvées. Ils atteignent dans le camembert une population de 3.10^7 $\mu\text{fc/g}$ de fromage au cours de l'affinage, tant à l'intérieur qu'en surface, *Lb. paracasei* et *Lb. plantarum* étant les deux espèces les plus fréquemment rencontrées (**Choisy et al., 1997b ; Henri Dubernet et al., 2004**).

L'évolution de la flore lactique du Venaco, pâte molle à croûte lavée fabriquée à partir de lait cru de chèvre ou de brebis, a été suivie par **Casalta (2003)** à partir de fromages fabriqués sans ajout de ferments. Les bactéries dénombrées provenaient donc exclusivement de la flore naturelle du Venaco. Ainsi, **Casalta (2003)** a observé que les lactocoques, présents dans les laits à hauteur de 10^5 germes/ml, se développaient rapidement pour atteindre environ 10^9 $\mu\text{fc/g}$ après 2 jours. Ce genre représente le principal agent acidifiant du Venaco. Les lactobacilles hétérofermentaires facultatifs, 10 fois plus nombreux dans les laits de chèvre (2.10^4) que dans ceux de brebis (10^3), constituent également l'une des flores quantitativement majoritaires du Venaco. Leur nombre augmente fortement au cours des premiers jours d'affinage pour atteindre environ 10^7 $\mu\text{fc/g}$ après 15 jours. Les leuconostocs et entérocoques, initialement présents dans le lait de chèvre ou de brebis, sont aussi retrouvés au cours de l'affinage du Venaco.

II.7. Intérêts et rôles des bactéries lactiques dans l'industrie agro-alimentaire

Les genres *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* et *Streptococcus* sont majoritairement retrouvés dans les fromages (Stiles et Holzappel, 1997). Elles sont utilisées en particulier dans les laitages fermentés comme par exemple le yaourt, le fromage, le beurre, le babeurre, le kéfir et le koumis. La fermentation modifie les textures et les saveurs des aliments d'origine et en améliore la conservation (Rigaux, 2009).

Le lait ne pouvant être conservé longtemps, ses valeurs nutritionnelles sont gardées sous la forme d'un fromage (préservation). L'immense variété des fromages est en partie relative à une grande variété de souche employées dans leurs fabrications, modifiant ainsi le goût et texture de ces produits. En effet ces bactéries sont responsables de l'apparition des qualités organoleptiques souhaitables de ce produit transformé, en plus de sa protection et sa conservation (Van de Guchte et al., 2006).

C'est l'acide lactique qui donne aux laitages fermentés cette saveur légèrement aigrelette caractéristique. D'autres sous-produits des bactéries lactiques donnent des saveurs et des arômes supplémentaires. C'est le cas par exemple, de l'acétaldéhyde qui donne au yaourt son arôme si caractéristique ou encore le diacétyl qui donne une saveur crémeuse à d'autres laitages fermentés. Les bactéries lactiques ont un rôle fondamental dans l'inhibition des flores non lactiques, dont certaines sont pathogènes ou préjudiciables à la qualité des fromages ou autre produit laitier.

Chapitre I

Le lait de vache

Chapitre II

Les bactéries lactiques

Chapitre III

Matériels et méthodes

Chapitre IV

Résultats et discussion

Conclusion

Conclusion

A l'issue de cette expérimentation et des résultats obtenus, cette étude est une contribution dans l'estimation de la flore lactique présente dans le lait de vache récolté à partir de trois échantillons de lait cru provenant de trois régions (Mazagran, Hassi Mamèche et Ain Tedles) situées dans la wilaya de Mostaganem.

Après isolement, purification et caractérisation des souches lactiques nous avons pu obtenir cinq espèces différentes et à diverses proportions: *Streptococcus bovis* (10), *Streptococcus mutans* (6), *Streptococcus thermophilus* (1), *Lactococcus lactis sub sp lactis biovar diacetylactis* (2) et *Enterococcus faecalis* (1) sur un total de vingt isolats étudiés.

Deux espèces s'avèrent intéressantes car faisant partie du starter utilisé lors de la phase de maturation pour la fabrication d'un fromage à pâte molle type camembert, et par conséquent pouvant faire l'objet d'autres investigations en terme d'identification en utilisant l'outil de biologie moléculaire et bien évidemment d'autres tests comme le profil biotechnologique et des tests d'interaction.

Alais (1985) : Milk protein : biochemical and biological aspects.

Alais C. (1975). Sciences du lait. Principes des techniques laitières. Edition Sepaic, Paris.

Axelsson L. T. (2004). Lactic Acid Bacteria: classification and physiology. In Lactic Acid Bacteria-microbiology and functional aspects. Edited by S. Salminen, Av. Wrigh et A Ouwehand MarcelDekker, Inc. 1-66.

Badis A., Laouabdia-Sellami N., Guetarni D., Kihal M. et Ouzrout R. (2005). Caractérisation phénotypique des bactéries lactiques isolées à partir de lait cru de chèvre de deux populations caprines locales « Arabia et Kabyle ». *Sci et Tecnol.*23 :30-37.

Bekhouche F. (2006). Bactéries lactiques du lait cru de vache et Microorganismes petionolytiques des olives noires et vertes : 1. Isolement et Identification Biochimique. 2. Evaluation et Optimisation de la production d'enzyme Polygalacturonase. Thèse présenté pour obtenir le grade de Docteur en Microbiologie et Enzymologie, Option : Génie alimentaire. Université de Docteur en Microbiologie et Enzymologie, Option : Génie alimentaire. Université de Mentouri Constantine. P21, 24,27.

Biavati B, Vescovo M, Torriani S & Bottazzi V. (2000). Bifidobacteria : history, ecology, physiology and application. *Annals of Microbiology*, 50, 117-131.

Boclé J-C Et Thomann C. (2005). Effets des probiotiques et prébiotiques sur la flore et l'immunité de l'homme adulte. Afssa (agence française de sécurité sanitaire des aliments) Nancy. P 19.

Bolotin, A., Wincker, P., Manger, S., Jaillon, O., Malarne, K., Weissenbach, J., Ehrlich, S. D. & Sorokin, A. (2001). The complete genome sequence of the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IL1403. *Genome Res* **11**, 731-753.

Broadbent J.R., 2001. Genetics of Lactic Acid Bacteria. In : Applied Dairy Microbiology (Marth E.H. et Steele J.L.). 2 e Ed., Marcel Dekker, Inc. New York. 243-300.

Carr F.J., Chill D., Maida N. 2002. The lactic Acid Bacteria : A Literature survey. *Critical Rev. Microbiol.*28 :281-370.²

Casalta, E. (2003). Bases scientifiques de la qualité du Venaco, fromage traditionnel au lait cru. Mise au point de ferments sélectionnés spécifiques: Thèse de Doctorat à l'Institut

National de la Recherche Agronomique. Laboratoire de Recherches sur le Développement de l'Elevage, Corté, France.

Cayot P. et Lorient D. (1998). Structures et Techno fonctions des protéines du lait. Edition Tec et Doc Lavoisier. Paris.

Choisy, C., Desmazeaud, M., Grippon.J.C., Lambert, G.& Lenoir, J.(1997a). *La biochimie de l'affinage*, in: *Le fromage*, Edited by A. Eck & J.C. Gillis, edn. Paris: Technique & Documentation, Lavoisier, PP.86-153.

Choisy, C., Desmazeaud, M.,Géguen, M., Lenoir,J., Schmidt, J.L.& Tournneur,C. (1997b). *Les phénomènes microbiens*, in: *Le fromage*, Edited by A. Eck & J.C. Gillis, edn. Paris: Technique & Documentation, Lavoisier, PP.377-446.

Collins M.D., Samelis J., Metaxopoulos J. et Wallbanks S., 1993. Taxonomic studies of some *Leuconostoc* like organisms from fermented sausages, description of a new genus *Weissella* for the *Leuconostoc* paramesenteroides group of species. J. Appl. Bacteriol. : 595-603.

Corroler, D. (1999). Biodiversité des Lactocoques sauvages au sein de la zone d'appellation d'origine "Camembert de Normandie": implication au cours de la transformation fromagère. Thèse à l'Institut de biologie fondamentale et Appliquée, Université de Caen Basse-Normandie, France.

Ctinils. (2010). Conduite à tenir en cas de suspicion d'infection invasive à *Streptococcus pyogenes* (streptocoque bêta-hémolytique du groupe A) en service de gynécologie obstétrique et maternité. *Centre de Coordination de Lutte contre les Infections Nosocomiales Sud-Est. P9.*

De contrôle dans les industries agroalimentaires. Vol. 2. Ed. Tech. El Doc. Lavoisier et APRIA, Paris, 77-115.

De Roissart, H. et Luquet, F.M. (1994). Les bactéries lactiques. Uriage, Lorica, France, 1 :1-286.

Dellaglio F.,de Roissard H., Torriani S., Curk M.C., Janssens D., (1994). Caractéristiques générales des bactéries lactiques. Dans : Bactéries lactiques. Vol 1. De Roissard H et Luquet FM (ed). Lorica : Uriage.25-116.

Références bibliographiques

Desmaures, N. (1995). Étude des laits de haute qualité: caractéristiques et aptitude microbiologique à la transformation en camembert au lait cru: these de doctorat de l'université de Caen, France.

Devriese, L.A., Vancanneyt, M., Descheemaeker, P., Baele, M., Van Landuyt, H. W., Gordts, B., Butaye, P., Swing, J., et Haesebrouck, F.,(2002). Differentiation and identification of *Enterococcus durans*, *E. hirae* and *E. villorum*. *Journal of Applied Microbiology* 92 : 821-827.

Dong X, Xin Y, Jian W, Liu X & Ling D. (2000). *Bifidobacterium thermacidophilum* sp. *Evolutionary Microbiology* (2000), 50, 119-125.

Drouault, S. et Corthier, G. (2001). Effets des bactéries lactiques ingérées avec des laits fermentés.

Duwat, P. S., S Cesselin, B Lambert, G Vido, K Gaudu, P Le Loir, Y Violet, F Loubière, P Gruss, A.. (2001). Respiration capacity of the fermenting bacterium *Lactococcus lactis* and its positive effects on growth and survival. *J Bacteriol* **183**,4509-4509-4516.

FAO. (1995). Le lait et les produits laitiers dans la nutrition humaine. Collection FAO Alimentation et nutrition n°28.

Fonton M.P.1987. An investigation into the Sources of lactic acid bacteria in GRAS silage. *J.Appl .Bacteriol.*62 :181-188.

Fredot E., (2005). Connaissance des aliments-Bases alimentaires et nutritionnelles de la diététique, Tec et Doc, Lavoisier :10-14 (397 pages).

Gevers. D.(2002). Tetracycline resistance in lactic acid bacteria isolated from fermented dry sausages. Thèse Doc Univ. Gent. Fac. Sci. Gent. Belgium.

Gonzalez, et al., (2007). In Boudjani, W. (2009). Action de la flore lactique sur les bactéries contamination. Mémoire d'ingénieur, Institut de biologie, Université de Tlemcen. 73 pages.

Goursaud J., (1985). Composition et propriétés physico-chimiques. Dans Laits et produits laitiers vache, brebis, chèvre. Tome 1 : Les laits de la mamelle à la laitière. Luquet F. M. Edition Tec et Doc Lavoisier, Paris.

Goy D., Häni JP., Wechsler D. et Jakob E. (2005). Valeur de la teneur en caséine du lait de fromagerie. Edition, Agroscope Liebfeld-Posieux. Groupe de discussions Gruyère N°27f.

Grappin, R, Pochet, S, Le lait, 1999, P 3-22.

Guiraud J. P., (1998). Microbiologie alimentaire. Ed. DUNOD, Paris.

Guiraud J.P, 2003. Microbiologie Alimentaire. Dunod. Paris. 651p.

Hadadji M, Benama R, Saidi N, Henni D & Kihal M. (2005). Identification of cultivable *Bifidobacterium* species isolated from breast-fed infants feces in West- Algeria. *African Journal of Biotechnology Vol. 4(5), pp. 422-430, May 2005.*

Henri-Dubernet, S., Desmasures, N. & Guéguen,M. (2004). Culture-dependent and culture-independent methods for molecular analysis of the diversity of lactobacilli in "Camembert de Normandie" cheese. *le lait* **84**,179-189.

Holzappel W,H,Haberer P, Geisen R,Bjorkroth J,and schillinger U,2001,Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *Am J clin Nutr*, 73:3655-735.

Holzappel W.H., Haberer P., Snel J., Schillinger U., Huis In't Veld J.H.J. (1998). Overview of gut flora and probiotics. *Int. J. food Microbiol.* 41:85-101.

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**: 36S-73S *Int. J. Food Microbiol.* , 132:109-116.

Institut Pasteur d'Algérie. (2003). Catalogue Milieu de culture réactifs de laboratoire. Edition IPA.

Jozala AF, de lencastre Novaes LC,c holewo O, Moras D,et penna TCV.2005,Increase of nisin production by lactococcus lactis in different media. *Afr J Biotechnol*,4:3:262-265.

Kandler, O., Weiss, N., (1986). Genus *Lactobacillus*. In : Bergey's Manual of Systematic Bacteriology., Vol 2. P.H.A, Sneath., N.S, Mair., Sharpe, M.E., Holt, J.G (Ed). Williams and Wilkins, Baltimore, M.D.

Kelly W.J., Davey G.P., Ward L.J.1998. characterization of lactococci isolated from minimally processed fresh and vegetables. *Int. J. Food Microbiol.* **45** :85-92.

Références bibliographiques

Kilian M. (2002). Streptococcus and Enterococcus. Bacterial pathogens and associated diseases, N°16.174-188.

Kotelnikava EA, et Gelfand MS. 2002, Bacteriocin production by Gram positive bacteria and the Mechanisms of Transcriptional Regulation, Russian J, Genetics, 38(6):628-641, translated from genetika, 38(6):758-772.

Larpent J-P., (1997). « Microbiologie alimentaire. Techniques de laboratoire. Paris : Technique et documentation », 273 p. (Boudier et Luquet, 1981).

Laurent, S. (1998). Manuel de bactériologie alimentaire. Poly technica Paris. 307 pages.

Le codex Alimentarius (CODEX STAN 206-1999).

Leveau J.Y., Bouix M., Deroissart H., (1991). La flore lactique. In : Techniques d'analyse et

Luquet F. M. (1985). Laits et produits laitiers-Vache, brebis, chèvre. Tome 1 : Les laits De la mamelle à la laiterie. Tech. & Doc., Coll. STAA, Lavoisier, Paris.

Marchal, L.V.m., Laws, A.P., Gu, Y., Levander, f., radstrom, P., De Vuyst., Degeest, B., Veningel gem, F.,Dunn, H.and Elvin, M.(2001). Exopolysaccharides producing strains of thermophilic lactic acid bacteria cluster into groups according to their EPS structure. *Lett. App. Mic.* 32, (6) :433-437.

Marchal, N., Bourdon, J. L. et Richard, CL. (1991). Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries. 3 ème Ed. Doin éditeurs, Paris.

Marchin S. (2007). Dynamique de la micelle de caséines : caractérisation structurale. Thèse INRA/ Agrocampus Rennes.

Mathieu J. (1998). Initiation à la physicochimie du lait. Guides Technologiques des IAA. Edition Lavoisier Tec et Doc, Paris.

Miyoshi, A., Rochat, T., Gratadoux, J. J., Le Loir, Y., Oliveira, S. C., Langella, P. & Azevedo, V. (2003). Oxidative stress in *Lactococcus lactis*. *Genet Mol Res* 2, 348-359.

Morrissey PA. (1995). Lactose : chemical and physicochemical properties. Dans : Developments in dairy chemistry 3. (FOX PF). Elsevier, London.

Pilet M.F., Magras C., Federigh M., 2005. Bactéries lactiques. *In* : bactériologie alimentaire (Federighi M.). *2e Ed., Economica*. Paris. 219-240.

Piveteau, P, Le lait N° 97, 1999, P 28-29.

Pot B., 2008. The taxonom of lactic acid bacteria. *In* : Bactéries lactiques de la génétique aux ferments (Corrieu G. et Luquet F.M.). Tec & Doc, Lavoisier. Paris.1-106.

Prescott, L., Harley, J., and Klein, D. (2003). Le métabolisme : la libération et la conservation de l'énergie. *In* : Boeck, d., and Larcier (Eds). *Microbiologie*. Bruxelles, Belgium. P.172-203.

Reumont P., (2009). Licencié Kinésithérapie, <http://www.medisport.be>

Richard, J. (1984). Evolution de la flore microbienne à la surface des camembert fabriqués avec du lait cru. *le lait* **64**,496-520.

Rigaux, P., Daniel, C., Hisbergues, M., Muraille, E., Hols, P., Pot, B., Pestel, J.& Jacquet,A. (2009). Immunomodulatory properties of *Lactobacillus plantarum* and its use as a recombinant vaccine against mite allergy. *Allergy* **64**,406-414.

Rouissat, L. and Bensoltane, A. (2006). Physico-chemical, microbiological and biotechnological studies of lactic acid bacteria isolated from ewe's milk of Algeria two breeds (Ouled Djellal and El Hamra). *Egypt. J. App.ci.21* : (2B), 567-580.

Saidi N., Guessas B., Bensalah F., Badis A., Hadadji M., Henni D. E., Prevost H. et Kihal M. (2002). Caractérisation des bactéries lactiques isolées du lait de chèvre des régions arides. *J. Alg. Reg. Arides*. 1 : 1-11.

Salminen, S., Wright, A., Ouwehand, A. (2004). Lactic acid bacteria. Microbiological and functional aspects. Marcel Dekker.Inc., U.S.A.

Serna L & Rodríguez A. (2006). Lactic acid production by a strain of *Lactococcus lactis* subs *lactis* isolated from sugar cane plants. *Electronic Journal of Biotechnology* ISSN : 0717-3458 Vol.9 No.1, 2006 ; 40-45.

Sookkee S., Chulasiri M., Prachyabrued W. (2001). Lactic acid bacteria from healthy oral cavity of Thai volunteers: inhibition of oral pathogens. *J.App. Microbiol.* 90:172-179.

Stiles M.E. et Holzapfel W.H., 1997. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int. J. Food microbiol.* 36 :1-29.

Tantaoui-Elaraki A. M., Berrada. Et EL Marrakchi A. (1983). Etude sur le lben marocain. *Lait*, 63, 230-245.

Terzaghi, B. & Sandine, W. (1975). Improved médium for lactic Streptococci and their bactériophages. *Appl Microbiol* 28, 807-813.

Thieulin G. et Vuillaume R., (1967).

Tormo H. (2010). Diversité des flores microbiennes des laits crus de chèvre et facteurs de variabilité. Thèse pour obtenir grade de Doctorat en Pathologie, Toxicologie, Génétique et Nutrition. Université de Toulouse. P28, 31-34.

Tredez M et Louise H.(2008). Méta- analyse des effets protecteurs des probiotiques sur la cancérogenèse colorectale chez les rongeurs. Thèse pour obtenir le grade de Docteur vétérinaire.Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE. P 38-39.

Valeria M Ozzetti. (2009). Novel technological approaches to enhance stress tolerance of *Bifidobacterium longum* NCC2705 cells using continuous cultures. A dissertation submitted for the degree to ETH ZU RICH of Doctor of Sciences. P15-18.

Van de Guchte, M., Penaud, S., Grimaldi, C. & other authors (2006). The complete genome sequence of *Lactobacillus bulgaricus* reveals extensive and ongoing reductive evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 9274-9279.

Vandamme P., Pot B., Gillis M., De Vos P., Kersters K. et Swings J., (1996). Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematic. *Microbiol.Rev.* 60 : 407.

Vierling E., (2003). Aliment et boisson-Filière et produit, 2ème édition, doin éditeurs, centre régional de la documentation pédagogique d'Aquitaine : 11(270 pages).

Vignola C. (2002). Science et Technologie du lait Transformation du lait. Edition presses Internationales Polytechnique, Canada. P.3-75.

Eau physiologique peptonée :

Utilise pour la réalisation des dilutions.

Peptone.....	1g
Chlorure de sodium	8.7g
Eau distillée.....	1000 ml

Milieu MRS (Man Rogosa et Sharpe, 1960)

Peptone.....	10g
Extrait de viande.....	08g
Extrait de levure déshydratée.....	04g
Acétate de sodium.....	05g
Phosphate di potassique.....	02g
Citrate d'ammonium.....	02g
Sulfate de magnésium, 7H ₂ O.....	0.2g
Sulfate de manganèse, 4H ₂ O.....	0.05g
Glucose.....	20g
Tween 80.....	1ml
Agar.....	20g
Eau distillée.....	1000ml

pH=6.5

Stérilisation à 120°C pendant 20 mn.

Milieu M17 (Terzaghi et Sandine, 1975)

Peptone de farine de soja.....	05g
Peptone de viande.....	2.5g
Peptone de caséine tryptique.....	2.5g
Extrait de levure.....	05g
Extrait de viande.....	05g
Acide ascorbique.....	0.5g
Glycérophosphate de sodium.....	01g
Sulfate de magnésium.....	0.25g
Agar.....	20g
Eau distillée.....	1000ml

pH=7.2

Stérilisation à 120°C pendant 20 mn.

Bouillon hypersalé :

Employé pour différencier les lactocoques et streptocoques thermophilus des streptocoques fécaux.

Peptone.....	15g
Extrait de viande.....	05g
Glucose	05g
Chlorure de sodium.....	6.5g
Eau distillée.....	1000ml

pH =7.2

Stérilisation à 120°C pendant 20 mn.

Milieu Clark et Lubs :

Utilisé pour mettre en évidence l'acétyle méthyle carbonyle (acétoïne).

Peptone.....	10g
Phosphate di potassique.....	.02g
Glucose.....	.05g
Eau distillée.....	1000ml

pH=7

Stérilisation à 120°C pendant 20 mn.

Milieu lait écrémé :

Utilisé pour les cultures bactériennes, l'étude du pouvoir acidifiant, l'étude de l'activité protéolytiques et la conservation des souches.

Lait écrémé.....	10g
Extrait de levure.....	0.5g
Eau distillée.....	1000ml

pH=6.8

Stérilisation à 120°C pendant 10 mn.

Milieu MSE :

Utilisé pour le test Dextrine

Tryptone.....	10g
Gélatine.....	2.5g
Extrait de levure.....	.05g
Sucrose.....	100g
Glucose.....	.05g

Citrate de sodium.....1g
Azide de sodium.....7.5g
Agar.....15g
Eau distillée.....1000ml

pH=6.9

Stérilisation à 120°C pendant 10 mn.

Milieu MRS ou M17 BCP :

Utilisé pour l'étude du profil fermentaire.

Les milieux MRS ou M17 contenant un indicateur de pH qui est le pourpre de bromocrésol à 0.02%.

Coloration de Gram :

1 .Matériels :

- Les lames
- Les colorants

2. Mode opératoire :

-Réaliser un frottis ou un étalement.

- Fixer la préparation à la flamme, sécher soigneusement puis laisser refroidir la lame.

-Immerger la lame dans la solution de Cristal violet pendant 1 mn.

-Immerger la lame dans Lugol 30 seconde.

-Décolorer jusqu'à disparition de la couleur violette dans l'alcool en faisant couler goutte à goutte sur la lame inclinée.

-Rincer à l'eau.

-Colorer avec la solution de Fuchine pendant 1mn.

-Laver à l'eau.

-Observer à l'objectif X 100, en immersion avec l'huile.

5. Résultat :

Les bactéries Gram+ sont colorées en violet, les bactéries Gram- sont colorées en rose.

Annexe III : Résultats des analyses physico-chimiques effectuées sur les échantillons de lait analysés.

Échantillons	01	02	03
Densité	1,0236	1,0344	1,0325
Acidité (°D)	16	18	16
pH	6,46	6,21	6,56
M.G (g/l)	23,5	34,4	23,6
M.P (g/l)	30,9	38,3	35,6
E.S.D(g/l)	78,8	99,8	92,8
Eau	6,70	0,00	0,00
Lactose (g/l)	42,0	54,0	50,3

Tableau IV : Pourcentage de répartition des genres des bactéries lactique

Le genre	%
<i>Streptococcus</i>	85%
<i>Lactococcus</i>	10%
<i>Enterococcus</i>	5%